



**L'IMAGERIE POST MORTEM  
TRIDIMENSIONNELLE CEREBRALE :  
CONSTITUTION ET APPORT POUR L'ANALYSE  
CONJOINTE DE DONNEES HISTOLOGIQUES  
ANATOMO-FONCTIONNELLES ET LA MISE EN  
CORRESPONDANCE AVEC L'IMAGERIE IN VIVO.**

Julien C. Dauguet

► **To cite this version:**

Julien C. Dauguet. L'IMAGERIE POST MORTEM TRIDIMENSIONNELLE CEREBRALE : CONSTITUTION ET APPORT POUR L'ANALYSE CONJOINTE DE DONNEES HISTOLOGIQUES ANATOMO-FONCTIONNELLES ET LA MISE EN CORRESPONDANCE AVEC L'IMAGERIE IN VIVO.. Interface homme-machine [cs.HC]. Ecole Centrale Paris, 2005. Français. NNT: . tel-00339418

**HAL Id: tel-00339418**

**<https://theses.hal.science/tel-00339418>**

Submitted on 17 Nov 2008

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

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



ÉCOLE CENTRALE DES ARTS  
ET MANUFACTURES  
« ÉCOLE CENTRALE PARIS »

## THÈSE

présentée par

Julien DAUGUET

pour l'obtention du

## GRADE DE DOCTEUR

**Spécialité :** Traitement des images

**Laboratoire d'accueil :** Service Hospitalier Frédéric Joliot, CEA, Orsay

**Sujet :**

L'IMAGERIE *POST MORTEM* TRIDIMENSIONNELLE  
CÉRÉBRALE : CONSTITUTION ET APPORT POUR L'ANALYSE  
CONJOINTE DE DONNÉES HISTOLOGIQUES  
ANATOMO-FONCTIONNELLES ET LA MISE EN  
CORRESPONDANCE AVEC L'IMAGERIE *IN VIVO*.

Soutenue le : **23 juin 2005**

devant un jury composé de :

MM.	C. SAGUEZ	<i>Président</i>
	N. AYACHE	<i>Directeur</i>
Mme	I. BLOCH	<i>Rapporteurs</i>
MM.	F. MAES	
	V. FROUIN	<i>Examineurs</i>
	P. MAGISTRETTI	
	P. HANTRAYE	<i>Invité</i>

Numéro : 2005-15



# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>9</b>
<b>1 Histologie et reconstruction 3D</b>	<b>17</b>
1.1 Traitement d'images et traitements histologiques . . . . .	18
1.1.1 Terminologie de l'Imagerie <i>Post Mortem</i> (IPM) . . . . .	18
1.1.2 Les différents types de déformations des coupes histologiques . . . . .	19
1.2 Les déformations secondaires . . . . .	21
1.2.1 Les petits cerveaux . . . . .	21
1.2.2 Les cerveaux de taille plus importante . . . . .	24
1.3 La modalité photographique . . . . .	29
1.3.1 Le recalage par propagation . . . . .	29
1.3.2 Modalités histologiques uniquement . . . . .	29
1.3.3 Lien avec une modalité <i>in vivo</i> . . . . .	29
1.4 Différences d'intensité inter-coupes . . . . .	31
1.4.1 Coupes et marquages spécifiques . . . . .	31
1.4.2 Apparition de différences d'intensité . . . . .	31
1.4.3 Correction . . . . .	31
1.5 Les déformations primaires . . . . .	34
1.5.1 Des déformations volumiques . . . . .	34
1.5.2 Le recalage 3D . . . . .	34
1.5.3 Recalage <i>post mortem-in vivo</i> . . . . .	35
1.5.4 Le choix FFD . . . . .	36
1.6 Synthèse : deux problématiques distinctes, deux protocoles distincts . . . . .	36
1.6.1 Études en séries, petits cerveaux peu circonvolués, pas de référence géométrique . . . . .	38
1.6.2 Études isolées, cerveaux circonvolués, lien avec une modalité <i>in vivo</i> . . . . .	38
1.6.3 Deux protocoles dédiés . . . . .	39
<b>2 Protocole rongeurs</b>	<b>41</b>
2.1 Construction des volumes tridimensionnels . . . . .	42
2.1.1 Les données . . . . .	42
2.1.2 Extraction des coupes . . . . .	43

2.2	Alignement des coupes . . . . .	45
2.2.1	Alignement des coupes histologiques marquées . . . . .	46
2.2.2	Co-alignement des coupes autoradiographiques . . . . .	47
2.3	Analyse 3D des données <i>post mortem</i> . . . . .	49
2.3.1	Conversion de l'image fonctionnelle . . . . .	50
2.3.2	Segmentation manuelle des structures d'intérêt . . . . .	51
2.3.3	Apports supplémentaires de la 3D . . . . .	53
2.4	Résultats quantitatifs . . . . .	55
2.4.1	Résultats morphométriques . . . . .	55
2.4.2	Résultats sur la consommation de glucose . . . . .	55
2.4.3	Ratio d'activation . . . . .	57
2.5	Discussion . . . . .	58
2.5.1	Un protocole automatisé . . . . .	58
2.5.2	Une analyse nouvelle . . . . .	59
2.5.3	Des applications prometteuses . . . . .	59
<b>3</b>	<b>Protocole Primates</b>	<b>61</b>
3.1	Présentation des données . . . . .	62
3.1.1	Étude principale . . . . .	62
3.1.2	Autres données traitées . . . . .	63
3.1.3	La modalité photographique . . . . .	63
3.2	Le recalage des coupes histologiques avec les coupes photographiques . . .	65
3.2.1	Un recalage rigide insuffisant . . . . .	65
3.2.2	La transformation birigide . . . . .	67
3.3	La normalisation d'intensité et la nouvelle modalité IPM . . . . .	77
3.3.1	Présentation de la problématique . . . . .	77
3.3.2	Description de la méthode proposée . . . . .	78
3.3.3	Résultats . . . . .	84
3.4	La correction élastique vers l'IRM : la transformation FFD . . . . .	87
3.4.1	Choix de la transformation . . . . .	87
3.4.2	Estimation de la transformation . . . . .	88
3.5	Constitution d'un atlas du thalamus . . . . .	100
3.5.1	Histologie et noyaux thalamiques . . . . .	100
3.5.2	Segmentation manuelle sur coupes . . . . .	102
3.5.3	L'atlas du thalamus amené sur l'IRM . . . . .	102
3.6	Validité de l'utilisation de l'atlas avec d'autres sujets . . . . .	104
3.6.1	Précision histologique sans sacrifice? . . . . .	104
3.6.2	Trois transformations pour adapter l'atlas . . . . .	104
3.6.3	Évaluation de la qualité de superposition . . . . .	104
<b>4</b>	<b>IRM de diffusion et segmentation du thalamus</b>	<b>113</b>

4.1	Signal de diffusion et noyaux thalamiques . . . . .	114
4.1.1	Parcellisation du thalamus . . . . .	114
4.1.2	État de l’art . . . . .	114
4.2	Une nouvelle méthode robuste de segmentation par classification . . . . .	117
4.2.1	Individus . . . . .	117
4.2.2	Classification . . . . .	119
4.2.3	Résultats de segmentation . . . . .	121
4.2.4	Discussion . . . . .	122
4.3	Confrontation avec un atlas réalisé sur IPM . . . . .	125
4.3.1	Segmentation du thalamus d’un babouin . . . . .	125
4.3.2	Un atlas du thalamus histologique . . . . .	126
4.3.3	Confrontation . . . . .	127
4.3.4	Discussion . . . . .	129
<b>5</b>	<b>Perspectives et discussion</b>	<b>133</b>
5.1	Du micro au macro . . . . .	134
5.1.1	Intérêt . . . . .	134
5.1.2	Les agrégats de Huntingtine . . . . .	134
5.2	Le projet Histodiff . . . . .	135
5.2.1	L’IRM de diffusion et le <i>tracking</i> . . . . .	138
5.2.2	Le marquage de la modalité histologique . . . . .	139
5.2.3	Confrontation du suivi de fibres histologie-diffusion . . . . .	141
5.3	Une transformation élastique biologiquement contrainte basée sur la méthode des éléments finis . . . . .	141
5.3.1	Déformations résiduelles . . . . .	141
5.3.2	Ébauche de méthode . . . . .	142
	<b>Conclusion</b>	<b>149</b>
	<b>Annexe A : Le recalage par mise en correspondance de blocs</b>	<b>155</b>
	<b>Annexe B : Galerie de recalages</b>	<b>159</b>
	<b>Annexe C : Publications</b>	<b>165</b>



# Remerciements :

Merci à...

Thierry Delzescaux, c'est un travail de thèse en soi que de recenser les raisons de le remercier : l'équipier que je souhaite à tous d'avoir un jour. Cette thèse lui doit beaucoup.

Vincent Frouin, pour m'avoir fait découvrir la recherche, m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse et de m'avoir lancé sur les bons rails, pour sa rigueur, ses conseils toujours à propos, sa parole, son recul et son expérience. La génomique a bien de la chance.

Nicholas Ayache, pour m'avoir fait découvrir le traitement d'images, d'avoir accepté d'être directeur de cette thèse et m'avoir donné l'opportunité de rencontrer l'équipe Epidauré, en particulier Sébastien Ourselin et ses travaux.

Philippe Hantraye, pour son soutien dans nos projets, son écoute, pour avoir pris le relais versant biologie, pour son enthousiasme et son optimisme à toute épreuve.

Christian Saguez, pour m'avoir permis de continuer les mathématiques, pour son efficacité à résoudre les problèmes, pour l'intérêt porté tout au long de ma thèse.

Les professeurs Isabelle Bloch, Frederik Maes et Pierre Magistretti, pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse, et pour m'avoir fait profiter de leur expérience dans leur domaine.

Françoise Condé, la reine de l'histologie du SHFJ : pour son extrême compétence, son esprit de coopération, son énergie, son enthousiasme dans nos entreprises, les heures de coupes, les projets, sa confiance.

Marie-Claude Grégoire, pour son oeil visionnaire, pour sa multidisciplinarité, ses conseils et sa compagnie. Bon vent à elle et à sa famille en Australie.

L'équipe des biologistes : Gilles Bonvento, pour sa foi originelle en la 3D, les projets auxquels ils nous a permis de participer, l'impression qu'il nous a donnée de faire un travail un tant soit peu utile... Anne-Sophie "Anso" Hérard pour monter si bien les coupes, pour nous avoir pleinement intégrés dans de "vrais" projets. Laurent Besret : pour m'avoir procuré mon premier jeu de coupes histologiques. Emmanuel Brouillet, pour les interactions accomplies : beaucoup de projets restent à venir...

L'UNAF : Jean-François Mangin pour montrer le très bon équilibre entre théorie et application, pour m'avoir suggéré de travailler sur la diffusion, pour le très intéressant travail de normalisation d'intensité. Denis Rivière pour son omniscience en informatique, sa patience, le rituel café. Yann Cointepas le père de BrainVISA, Dimitri Papadopoulos-Orfanos, Edouard Duchesnaïs.

Éric Bardinet, pour sa passion communicative pour la recherche, ses encouragements, sa compétence en histologie, l'aventure des TDs, sa connaissance du terrain...

Grégoire Malandain, pour son expertise en traitement d'images, ses algorithmes.



Albertine Dubois, pour s'être intégrée si bien dans l'équipe "3D" (pas seulement grâce à son nom), pour le portage BrainVISA des algorithmes. Bonne chance pour sa thèse.

Le labo MAS de Centrale pour les interactions mathématiques, et en particulier Pascal Laurent pour sa précieuse aide sur la MEF.

Le bureau B114 : Gwenaëlle, Sébastien J., Sébastien M., Pierre-Jean, Frédéric, Silke pour les discussions, la cohabitation, la diversité des thèmes de recherche et des personnalités.

L'UIIBP : Renaud Maroy et ses multiples idées, Régine Trebossen pour son intérêt, Claude Comtat pour sa constance.

Les coureurs : Cyril (de surcroît RMNiste de talent avec qui nous avons pu collaborer), Philippe (locomotive et expert Latex entre autres), Jean-Robert, Dimitri R.

Jean-Michel pour les pauses thé, son flegme anglais et ses suggestions à propos...

Les médecins : Xavier, Stéphane, Béchir (et les discussions passionnantes) pour nous rappeler le but ultime de la recherche : guérir.

Rozenn Rougetet et Frédérique Napoleone pour nous rendre la vie informatique plus souriante.

Tous pour les pauses café partagées, et l'ambiance du service.

Mes parents, ma soeur Claire, Philippe et Victor, mon frère Guillaume pour constituer ma Famille. Bienvenue à Héloïse.

Et pour la B.O. : AkTU, ETC...

# Introduction

Voir pour comprendre. La connaissance découle de l'observation. C'est ainsi que la science progresse dans tous les domaines. La biologie et la médecine ne font pas exception à cette règle. Face aux différentes maladies que l'humanité a rencontrées, les médecins et les biologistes de toutes les époques ont essayé de trouver des remèdes en observant le développement de la maladie et l'effet d'éventuelles thérapies. Très tôt, pour mieux comprendre les mécanismes de fonctionnement du vivant, les chercheurs observent bien sûr le vivant mais également partent à la découverte du corps humain en pratiquant les premières explorations *post mortem* pour appréhender de l'intérieur les mécanismes de vie. Cette science de l'observation, appelée anatomie descriptive, s'intéresse à la forme et à la position relative des différents organes, qui sont donc envisagés en 3 dimensions. Le Moyen Âge marque une pause dans ces études du fait des interdits religieux.

**Naissance de l'histologie** Vers la fin du XVII<sup>e</sup> siècle, l'histologie, ou étude descriptive des tissus<sup>1</sup> organiques, fait son apparition, donnant naissance à l'anatomie pathologique. Ce n'est pourtant qu'à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle que l'histologie prend un nouvel essor grâce au perfectionnement du microscope optique et à l'élaboration de nouvelles techniques permettant de fixer et de couper les tissus organiques (coupes fines de quelques dizaines de microns). La mise au point, par la suite, de techniques de marquage histologique offre la possibilité de séparer des groupes cellulaires spécifiques pour les étudier. Franz Nissl met au point une teinture qui permet de colorer les noyaux des cellules, alors que Camillo Golgi découvrit la coloration portant son nom qui permit à Ramon y Cajal d'établir le concept de cellules nerveuses. Dès lors, le neurone est devenu l'unité de base du système nerveux. L'utilisation de marqueurs de plus en plus variés et précis permet de définir les principales pathologies d'origine cérébrale et les caractéristiques histologiques qui les accompagnent (nosologie). Les observations histologiques sont réalisées sur coupes fines afin de pouvoir isoler les cellules et avoir suffisamment de luminosité : elles fournissent donc une information en 2 dimensions.

**Darwin et les modèles animaux** En 1859, le biologiste anglais Charles Darwin publiait son livre *L'origine des espèces* dans lequel il présentait sa théorie sur l'évolution. Cette théorie allait ouvrir de nouvelles perspectives concernant les recherches expérimentales sur le vivant : il était dès lors possible de se fier à des modèles animaux qui pouvaient ensuite être extrapolés à l'homme. L'idée sous-jacente est que les fonctions et la structure des organes dérivent d'un même ancêtre commun. Il existe donc des traits caractéristiques qui se retrouvent d'une espèce à l'autre : les différences sont le produit de l'adaptation de chaque espèce à son environnement naturel. Dès lors, les études sur les modèles animaux pour mieux comprendre l'Homme se développent. L'histologie s'impose alors naturelle-

---

<sup>1</sup>Un tissu est un ensemble de cellules.

ment comme la référence en termes de résolution et de richesse d'informations pour la compréhension du vivant. Assez paradoxalement, un des meilleurs moyens de comprendre le vivant est d'observer les données *post mortem*.

**Avènement de l'imagerie médicale *in vivo*** A la toute fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, la première radiographie aux rayons X est réalisée. C'est la première fois que l'intérieur du corps humain devient accessible de l'extérieur. C'est la naissance de l'imagerie médicale *in vivo*. Au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, l'imagerie médicale se développe d'abord en 2 dimensions (2D), avec la radiographie, la scintigraphie et l'échographie vers les années 1950. Puis les premiers imageurs produisant des images tridimensionnelles (3D) apparaissent : le premier scanner réalisant des images de Tomographie par Émission de Positons (TEP) est construit au début des années 60, le premier tomodensitomètre ou scanner à rayons X (CT pour *computer tomography*) est présenté en 1972, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) apparaît peu de temps après, pour ne citer que les principaux. C'est une véritable révolution médicale en matière d'étude du vivant mais également en termes de diagnostic et de suivi longitudinal de traitements thérapeutiques. C'est aussi l'occasion de la rencontre de deux mondes apparemment sans rapport : les sciences de l'ingénieur et la médecine. En effet, tous ces imageurs utilisent la physique pour l'instrumentation et les mathématiques pour la reconstruction. Il est intéressant de remarquer que, depuis cette époque, le monde biologique et médical a commencé à utiliser l'image, sur films d'abord, puis avec le développement de l'informatique, l'image numérique ou numérisée. Naturellement, du fait des besoins, le traitement des images médicales se développe, pour permettre de tirer le maximum d'informations des données provenant des imageurs.

**L'histologie comme référence** Pourtant, l'étude histologique sur coupe, qui constitue une modalité typiquement 2D par nature, reste encore aujourd'hui et pour sans doute longtemps, la modalité de référence indispensable dans la majorité des études. En effet, contrairement à l'imagerie *in vivo* qui ne reflète en chaque voxel<sup>2</sup> de l'image qu'une mesure physique particulière (propriétés des électrons plongés dans un champ magnétique pour l'IRM, activité d'un traceur en TEP, densité tissulaire en scanner X...), l'histologie représente directement le tissu organique sans intermédiaire et permet même d'en extraire par marquage spécifique des informations particulières (faisceaux de fibres, neurones, récepteurs d'un type précis...). De plus, comme l'accès à l'information n'est pas le résultat d'une reconstruction mathématique faisant intervenir des modèles physiques et toute une instrumentation, la résolution spatiale n'est quasiment pas limitée.

Ces 2 points, à savoir l'accès à l'information directe et une résolution quasiment illimitée (les limites sont celles du scanner ou du microscope utilisés pour acquérir l'image), font de l'histologie l'imagerie de référence absolue en termes de caractérisation tissulaire ou de cytoarchitecture. Une illustration simple de ces 2 points, qui sera reprise et développée au cours de cette thèse, concerne le thalamus et ses sous-régions. Le thalamus est une structure du cerveau subdivisée en noyaux mis en évidence par marquage histologique spécifique. Ces noyaux ne se différencient distinctement sur aucune modalité d'imagerie *in vivo*, d'abord parce qu'aucune mesure physique utilisée ne permet de différencier tous les noyaux, également parce que certains de ces noyaux ont un volume trop petit pour être distingués les uns des autres avec la résolution actuelle des imageurs.

---

<sup>2</sup> *Volume element.*, plus petit élément d'une image 3D de forme parallélépipédique en général

**Le contexte des maladies neurodégénératives** Notre propos ne sera développé dans ce document que dans le cadre des maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, maladie de Huntington, maladie d'Alzheimer), et par conséquent notre objet d'étude sera le cerveau. En effet, les maladies neurodégénératives constituent un enjeu majeur en termes de santé publique. Bien que des progrès importants aient été réalisés ces dernières années concernant leur compréhension, leurs causes et leur traitement, la plupart d'entre elles restent à ce jour incurables. La mise au point de modèles animaux pour certaines de ces maladies, couplée au développement de l'imagerie médicale a permis de mieux comprendre leurs mécanismes d'action et ainsi de mettre au point des traitements prometteurs dans certains cas. Beaucoup de progrès restent encore à faire, qui continueront de s'appuyer sur le lien entre l'imagerie *in vivo* et les données anatomo-pathologiques obtenues *post mortem*.

**Modèle animal** La recherche thérapeutique chez l'Homme, pour les maladies en général et les maladies neurodégénératives en particulier, comprend plusieurs étapes comme le montre le schéma de la **Figure 1**.

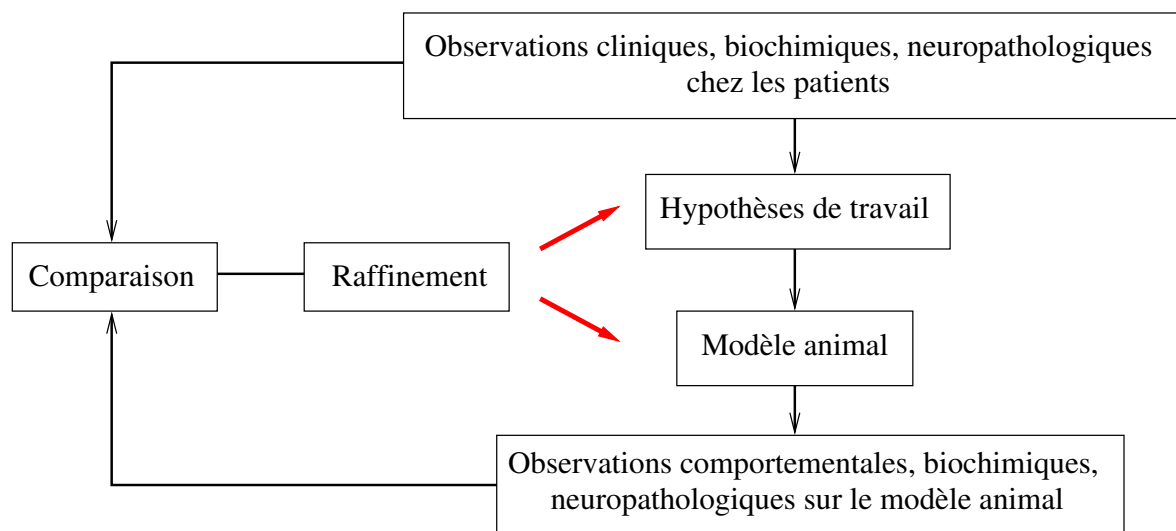


FIG. 1 – Mise en place d'un modèle animal d'une maladie neurodégénérative dans le cadre de la recherche thérapeutique chez l'Homme.

L'obtention d'un modèle animal de la maladie est une étape primordiale permettant d'avoir accès à un plus grand nombre de données anatomo-pathologiques (sans attendre le décès). En effet, les données *post mortem* exploitables chez l'Homme sont rares car elles sont imprévisibles et les facteurs non maîtrisés. Ce modèle doit être validé et son degré de confiance doit être déterminé, c'est-à-dire qu'il faut connaître précisément ce qui différencie le modèle de la maladie réelle. Cette étape est primordiale pour pouvoir passer des observations réalisées sur le modèle à des conclusions sur la maladie. Cette validation tire profit de plusieurs techniques d'observations dont l'étude des symptômes mais également l'histologie.

Une deuxième étape concerne les études sur la maladie à travers le modèle animal pour mieux comprendre son mode d'action, permettre le développement de thérapeutiques, et évaluer leur efficacité. Pour cela, l'étude sur coupe histologique est utilisée pour la quantification des atteintes provoquées par la maladie de façon précise. De façon à pouvoir

vérifier s'il en est de même chez l'Homme, objectif final de toutes ces études, il faut corrélérer les données anatomo-pathologiques avec l'imagerie *in vivo*, car elle constitue l'unique voie d'accès disponible chez le patient humain. Cela passe donc par l'observation des images anatomiques comme l'IRM mais surtout fonctionnelles comme la TEP. La mise au point de ligands permet de rendre compte en TEP des altérations observées *post mortem*. Pour valider un nouveau ligand, il faut vérifier qu'il est marquant par un émetteur de positons puis valider sa spécificité, son comportement métabolique et sa biodisponibilité. Tous ces stades requièrent la confrontation des images avec les données histologiques.

**Recherche thérapeutique** Les ligands une fois validés et modélisés doivent permettre également de rendre compte *in vivo* de l'efficacité de thérapies développées pour guérir ou améliorer l'état des patients. Dans le cadre des maladies neurodégénératives, les thérapies peuvent être du type :

- prise de médicaments,
- greffe de cellules souches,
- utilisation de facteurs trophiques,
- stimulation électrique,
- thérapie génique par utilisation de vecteurs viraux,

pour ne citer que quelques stratégies thérapeutiques. Des études sont menées au stade fondamental chez les rongeurs, puis au stade préclinique chez le singe plus proche de l'humain pour tester l'efficacité des traitements. A ce stade, les modalités telles que la TEP (utilisant des traceurs adaptés), l'IRM (pour examiner les structures internes) ou le scanner X (pour faire des mesures morphométriques) sont réalisées pour tenter d'interpréter le signal physique observé par rapport aux phénomènes physiologiques. Encore une fois, l'établissement d'un lien entre les données anatomo-pathologiques et l'imagerie *in vivo* est nécessaire. Enfin, les premiers essais cliniques sont menés chez des sujets humains : toutes les connaissances acquises lors des études antérieures sont alors utilisées. L'efficacité de la thérapie sur l'Homme est cette fois ci quasi-exclusivement appréciée par les modalités *in vivo*, qu'il a fallu apprendre à interpréter à la lumière des données histologiques.

Beaucoup de chemin reste encore à parcourir dans la recherche de thérapies pour les maladies neurodégénératives. Ainsi, l'unité URA 2210 avec laquelle j'ai étroitement collaboré pendant mes travaux de thèse mène depuis plusieurs années des études sur les maladies neurodégénératives. Elle a participé à la mise au point de modèles animaux utilisant l'intoxication au MPTP ([HVP<sup>+</sup>93]) pour la maladie de Parkinson (MP) et l'intoxication au 3NP ([BHF<sup>+</sup>95]) pour la maladie de Huntington (MH).

Pour ces maladies, des mécanismes d'action ont déjà été découverts (dégénérescence des neurones dopaminergiques pour MP, neurones GABAergiques du striatum pour MH), des ligands ont été développés (F-Dopa pour la MP, FDG et raclopride pour la MH) et des thérapies ont été proposées et testées (prise de L-DOPA pour MP, greffe neuronale, facteurs trophiques CNTF et GDNF ([KPB<sup>+</sup>04]), stimulation corticale ([DOB<sup>+</sup>04]) ). Ces traitements thérapeutiques ont un effet préventif (neuroprotection) ou freinent l'évolution de la maladie. La connaissance de ces maladies avance mais ne suffit pas encore pour permettre leur guérison complète.

Des projets d'étude de la maladie d'Alzheimer ont aussi été initiés, grâce notamment à la mise en place récente d'un nouveau modèle "primates". Les imageries *in vivo* et *post mortem* sont utilisées conjointement dans ces recherches thérapeutiques. L'histologie est indispensable pour obtenir une analyse précise au niveau cellulaire des lésions et des récupérations dans des structures particulières.

**Objectif de ce travail** Comme nous l'avons vu, l'histologie constitue une référence dans beaucoup de domaines comme l'anatomie (délimitation de structure...), la caractérisation tissulaire (tumeurs...) ou bien la cytoarchitecture (densité de récepteurs...) mais également l'activité fonctionnelle (consommation de glucose). Le problème de ces informations est qu'elles sont fournies dans la géométrie du cerveau *post mortem* qui n'a pas de pertinence. Or, à l'inverse, la référence en termes de géométrie, de forme, de volumétrie, est représentée par l'imagerie *in vivo*, notamment l'IRM ou le scanner X. Il faut donc choisir à l'heure actuelle entre l'information et la position dans les études utilisant une forme d'imagerie, comme il faut choisir en mécanique quantique entre la position et la vitesse avec le principe d'incertitude d'Heisenberg. Ce choix est particulièrement gênant lorsqu'il s'agit de confronter des mesures réalisées *in vivo* et sur coupes histologiques, ou même tout simplement pour retrouver la forme d'une structure ou d'une activation sur coupes. C'est pourquoi, il est primordial de mettre en correspondance les données *post mortem* et *in vivo* lorsque cela est possible, ou du moins de reconstruire un volume 3D à partir des coupes histologiques pour s'approcher de la géométrie originale 3D.

Cette volonté d'utiliser l'information des coupes histologiques dans la configuration géométrique tridimensionnelle originale constitue l'objectif premier de cette thèse. Nous allons donc étudier des méthodes de reconstruction et de correction de déformations pour pouvoir remettre un ensemble de coupes histologiques 2D dans une configuration spatiale la plus proche possible de celle observable *in vivo*.

Le deuxième objectif de ce travail est de chercher à extraire, grâce à cette reconstruction 3D, un maximum d'informations à partir des coupes histologiques, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux nécessaires à la compréhension d'un phénomène. L'imagerie *in vivo* progresse sans cesse, et grâce à l'éclairage apporté par l'étude *post mortem*, un nombre important de pathologies sont étudiées aujourd'hui par imagerie *in vivo* (déficits énergétiques, atrophies, mais également localisation de tumeurs). L'objectif à très long terme, serait de pouvoir tout observer du vivant du sujet, en limitant quasi-complètement l'étape *post mortem*.

Comme nous l'avons déjà précisé, l'objet d'étude de cette thèse sera le cerveau, en particulier le cerveau de rongeurs (rats, souris...) et de primates non humains (babouins, macaques). Les techniques qui vont être présentées s'appliquent cependant de la même façon pour la plupart des cerveaux quelle que soit l'espèce, en particulier pour le cerveau humain. Nous allons proposer des protocoles de reconstruction performants et précis dont le temps de traitement et la complexité de mise en oeuvre sont compatibles avec une étude biologique faisant intervenir l'histologie. L'objectif de cette thèse est plus la mise en place de protocoles de traitement robustes et génériques pour la constitution d'**Imagerie *Post Mortem* tridimensionnelle (IPM)** que le développement de nouvelles techniques de recalage, même si des points méthodologiques novateurs seront introduits. En effet, les techniques de recalage sont nombreuses et souvent performantes, mais peu de solutions génériques ont été proposées pour faire en sorte que la reconstruction histologique 3D puisse être intégrée dans une étude biologique et constitue un apport pour l'analyse des données.

Il existe un très grand nombre de contributions apportées par les chercheurs méthodologistes en imagerie. Ces méthodes complexes et virtuoses sont développées pour aider les médecins, les biologistes, et l'ensemble des chercheurs capables d'exploiter, à des fins thérapeutiques, les images histologiques ou provenant d'imageurs *in vivo*. Pourtant, le quotidien des études biologiques est souvent loin des algorithmes perfectionnés proposés par la communauté des chercheurs en traitement d'images médicales. Il est bien sûr nor-

mal qu'il existe un décalage temporel entre les dernières découvertes et le quotidien, ce n'est pourtant pas la seule raison. Compte-tenu de la complexité des problèmes, chaque chercheur méthodologiste se concentre sur un point précis, que l'on va qualifier de "noble", comme le recalage dans un contexte particulier. L'intégration ensuite de ces différentes contributions dans les études réelles globales n'est en général pas immédiate. Ainsi, les étapes d'acquisition de données, la question de l'exploitation des résultats, les étapes préliminaires, de préparation ne sont pas toujours abordées suffisamment précisément. La conséquence en est que l'utilisation effective des outils méthodologiques de traitement d'images dans les études biologiques n'est pas courante car la mise en place de ces outils et leur intégration dans l'étude globale ne sont pas organisées de façon pratique.

Cette thèse pourrait être qualifiée de méthodologie pratique. Le contexte pluridisciplinaire dans lequel elle s'est déroulée m'a conduit à être confronté à un grand nombre de données de par mon implication dans des projets assez divers. Ces projets constituent au final un échantillon relativement représentatif, semble-t-il, des types d'études classiques impliquant l'histologie. Pour chacune des situations rencontrées, la question s'est posée de déterminer quelles solutions méthodologiques adaptées au traitement des données histologiques avaient été proposées dans la littérature. Comme beaucoup de développements dans le domaine du recalage ont été menés, souvent plusieurs solutions étaient envisageables. Lorsqu'aucune solution ne convenait à la situation, ou lorsqu'il me semblait possible de faciliter le traitement des données histologiques, des apports méthodologiques nouveaux ont été introduits répondant aux besoins. Les observations tirées de chaque expérience ont débouché sur une catégorisation des différentes situations d'étude de données histologiques afin de mettre en place des protocoles à portée générale, depuis l'acquisition des données jusqu'à leur analyse. Ces protocoles incluent les solutions de la littérature, avec les adaptations nécessaires, qui m'ont semblé les mieux appropriées, ainsi que les solutions méthodologiques nouvelles apportées.

Nous procédons d'abord à une analyse descriptive des procédés d'obtention de coupes histologiques dans le chapitre 1 et de leur impact sur la constitution de l'IPM. Ce chapitre aboutit sur deux types de protocoles de constitution qui donnent chacun lieu à un chapitre : un premier protocole typiquement adapté aux études de séries sur les animaux aux cerveaux de petite taille (comme les rongeurs) est présenté dans le chapitre 2, et un autre protocole plus adapté aux cerveaux de taille plus importante (comme celui des primates) fait l'objet du chapitre 3. Les études concernant la constitution d'atlas du thalamus réalisées dans ce chapitre servent ensuite à évaluer les résultats d'une méthode de segmentation du thalamus *in vivo* qui fait l'objet du chapitre 4. Enfin, le chapitre 5 propose des projets d'application ou d'amélioration de l'IPM. Le schéma de la **Figure 2** indique à quel niveau des études biologiques se situent les différents apports présentés dans ce travail.

*Sauf mention explicite, l'ensemble des illustrations présentées dans ce travail proviennent du Service Hospitalier Frédéric Joliot, CEA, Orsay. Les photographies des figures 1.4, 1.6, 1.7, 3.2 (a) et (b) ont été réalisées par T. Delzescaux, SHFJ.*

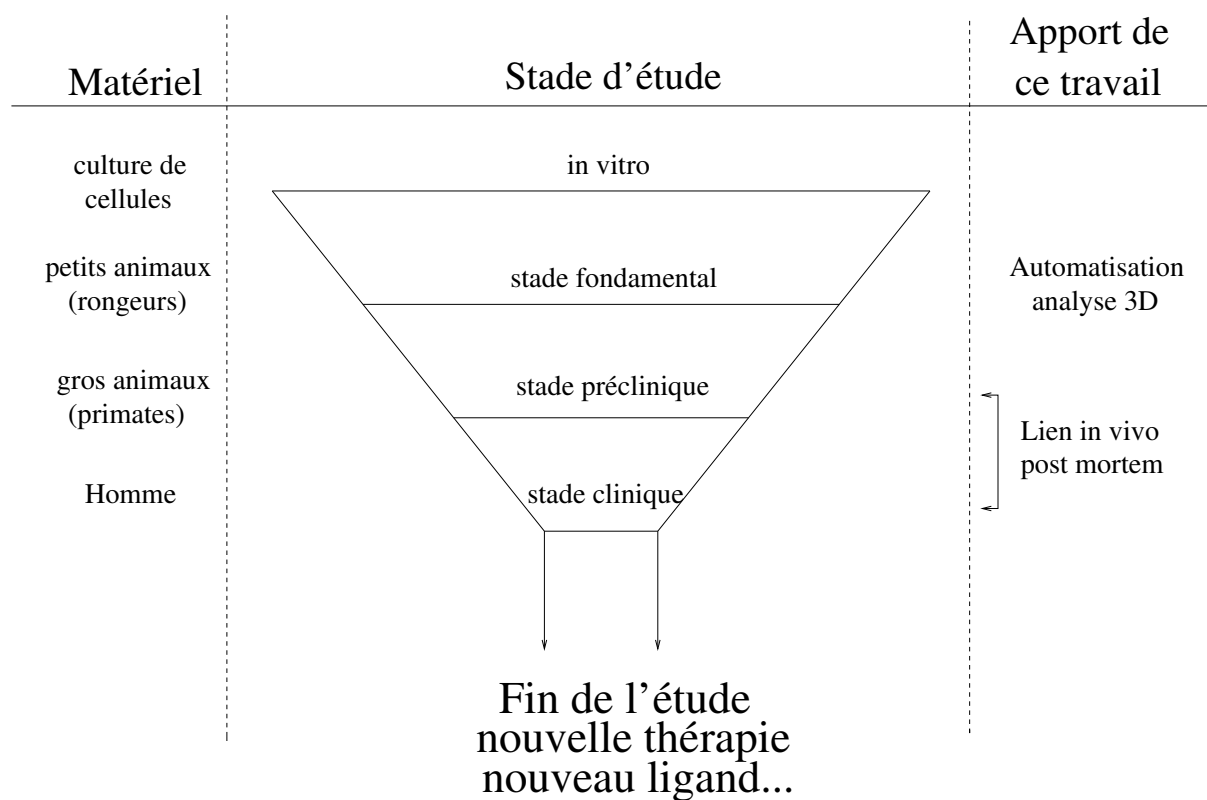


FIG. 2 – Schéma résumant les apports de ce travail de thèse dans le contexte des études biologiques incluant des études sur coupes histologiques.





# Chapitre 1

## Histologie et reconstruction 3D

*Nous aborderons dans ce chapitre particulier les notions qui sont utilisées dans les chapitres suivants. Tout d'abord, nous allons présenter les différentes techniques d'obtention des coupes histologiques, et leur influence sur les images de coupes obtenues. Nous ferons un état de l'art des méthodologies de traitement d'images disponibles dans la littérature adaptées à chaque technique. Enfin, nous proposerons une classification des études sur coupes histologiques, aboutissant à deux protocoles de reconstruction 3D avec des solutions originales adaptées.*

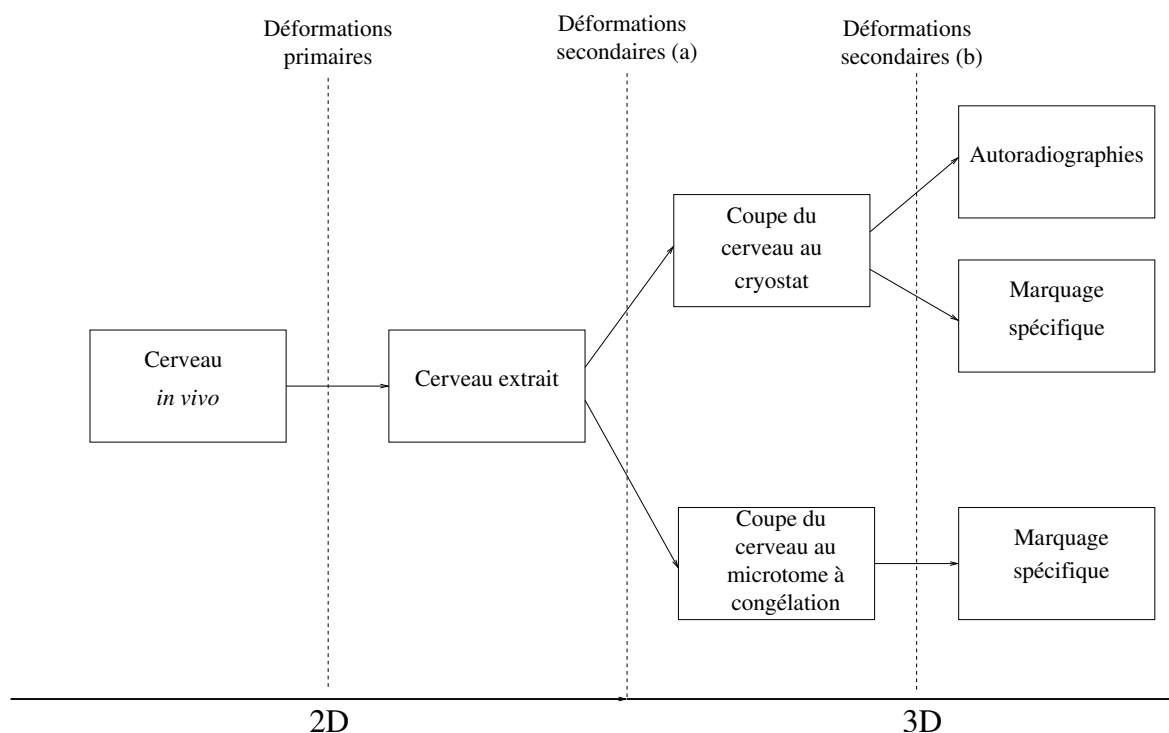


FIG. 1.1 – Les principales étapes de ce chapitre

## 1.1 Traitement d'images et traitements histologiques

### 1.1.1 Terminologie de l'Imagerie *Post Mortem* (IPM)

Avant toute chose, il est nécessaire de préciser brièvement quelques termes de vocabulaire qui seront utilisés dans la suite. Ce paragraphe n'a pas la prétention de donner une définition complète de ces expressions, mais plutôt de présenter les notions sur lesquelles nous allons nous appuyer dans notre discours.

**Image** Nous désignerons par image de dimension  $n$ , d'un point de vue informatique, une fonction discrète des intervalles d'entiers  $[0, dim_1] \times [0, dim_2] \times \dots \times [0, dim_n]$  dans un ensemble  $I$ . En général,  $n$  vaut 2 ou 3,  $dim_i$ ,  $1 \leq i \leq n$  désigne la taille de l'image dans la dimension  $i$  et l'ensemble  $I$  des intensités est généralement un intervalle d'entiers ou de réels limité par le format de l'image. En 8 bits d'entiers non signés (U8),  $I$  est un sous-ensemble d'entier,  $[0, 255]$  par exemple.  $I$  peut ne pas être un ensemble de scalaires mais de vecteurs dans le cas d'images en couleurs ou d'images particulières (tenseurs de diffusion). Sauf précision, nous considérerons des images en niveaux de gris entiers signés codés sur 16 bits (S16).

Nous désignerons indifféremment par *coupe* une tranche physique de cerveau ou l'image numérisée de cette coupe. Ce terme désigne plus généralement une image 2D d'un volume quelconque (coupe IRM, de scanner X...).

**Recalage** Le recalage d'une image T sur une image R désigne le déplacement et/ou la déformation de l'image T vers l'image R dans le but de mettre en correspondance au mieux des régions ou des caractéristiques analogues de chacune des deux images. On désigne par T pour "Test" l'image qui est transformée et par R pour "référence" l'image prise pour modèle. Les images R et T peuvent représenter le même sujet, (recalage *mono-sujet*), ou deux sujets différents (recalage *inter-sujet*). Lorsqu'il s'agit de coupes 2D, toutes les coupes proviennent généralement du même sujet mais le recalage d'une coupe avec une coupe voisine s'apparente à du recalage *inter-sujet*.

**Types de recalages** Les images à recaler peuvent être de même modalité (recalage *mono-modal*), ou de modalités différentes (recalage *multi-modal*).

L'opération qui consiste à recaler entre elles une série de coupes 2D successives d'un cerveau sera appelée *alignement*. L'alignement donne lieu à une *reconstruction 3D*, c'est-à-dire une image de dimension 3 obtenue par empilement de la série de coupes 2D alignées. On désignera également souvent par *volume* une image de dimension 3.

**Transformations affines** Nous parlerons de transformations affines d'images pour désigner les transformations P qui s'écrivent sous la forme  $P(x) = Ax + T$  pour tout élément  $x$  de l'espace de dimension  $n$  des coordonnées spatiales de l'image ( $n$  vaut 2 en 2D et 3 en 3D) et où  $A$  est une matrice réelle quelconque de taille  $n \times n$  et  $T$  un vecteur réel quelconque de taille  $n$ . Si on note R la matrice d'une rotation (c'est-à-dire vérifiant les conditions  $R^T R = Id_n$  et  $\det(R) = 1$ , où  $R^T$  est la transposée de  $R$ ,  $Id_n$  désigne la matrice carrée identité d'ordre  $n$  et  $\det$  désigne l'application déterminant), les transformations affines les plus courantes sont :

- la translation pure ( $A = Id_n$ ),

- la transformation rigide ( $A = R$ ),
- la similitude ( $A = s.R$  où  $s$  est un scalaire),
- l’homothétie ( $A = D$  où  $D$  est diagonale et  $T = 0$ ),
- la transformation affine générale ( $A$  est quelconque).

Notons que pour toute transformation affine,  $A$  peut s’écrire comme le produit d’une matrice d’échelle (matrice diagonale à coefficients non nuls), d’une matrice de cisaillement (matrice triangulaire inférieure à diagonale nulle) et d’une matrice de rotation. A toute transformation affine  $P : x \mapsto P(x) = Ax + T$  est associée une application vectorielle  $L : x \mapsto L(x) = Ax$ . Cette application linéaire vérifie pour tous points  $M$  et  $N$  de l’espace :  $P(\vec{MN}) = L(\vec{MN})$ . Certains travaux désignent à tort par transformations linéaires les transformations affines. Une transformation affine générale compte 12 degrés de liberté en 3D, et 6 en 2D. Elle conserve le parallélisme.

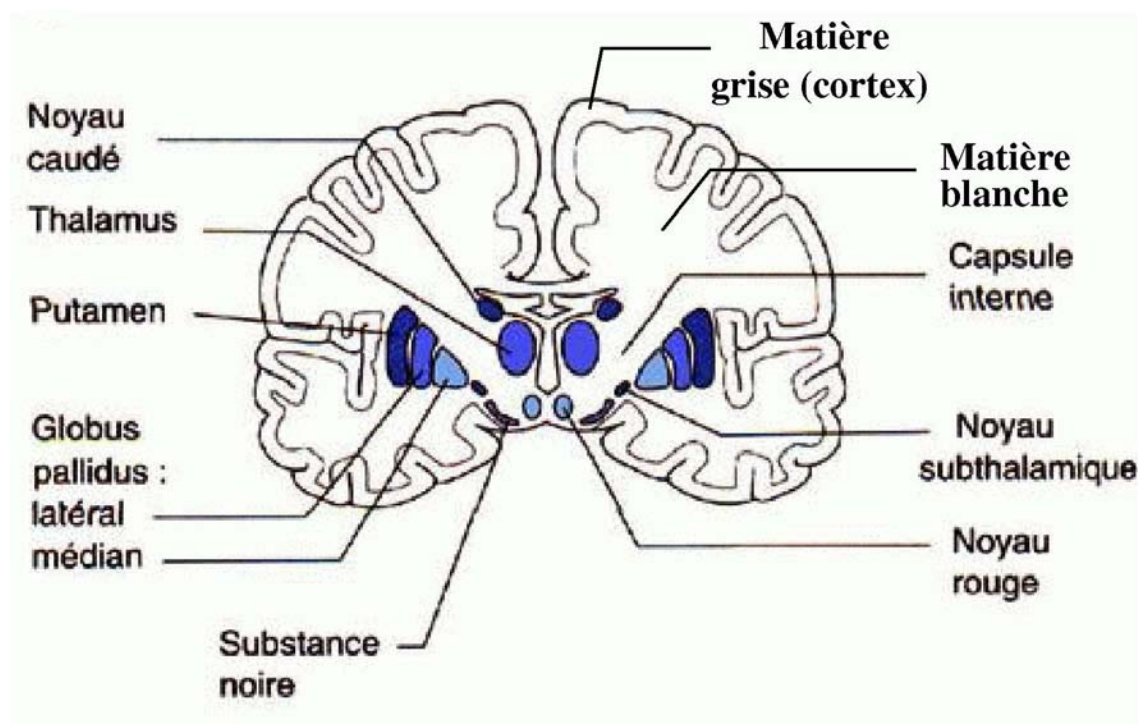
**Transformations non linéaires** Par abus de langage, nous désignerons par transformation non linéaire une transformation non affine. Une transformation non linéaire peut compter un nombre quelconque de degrés de liberté. Elle est dite paramétrique si elle peut s’exprimer avec un nombre fini de paramètres. Les transformations dites libres sont quant à elles non paramétriques. Parmi les transformations non linéaires, il existe une distinction entre les algorithmes dits élastiques, qui minimisent simultanément un terme d’attache aux données et une énergie de régularisation (initialement inspirée de la théorie de la mécanique des milieux continus), et les algorithmes fluides qui minimisent alternativement ces 2 termes, entraînant des déformations moins lisses mais plus précises. La transformation *Free Form Deformation* ([RSH<sup>+</sup>99], [Mat00]) que nous utiliserons ultérieurement appartient à la famille des transformations non linéaires élastiques : c’est une transformation paramétrique contrairement à ce que son nom (*Free*) laisse supposer.

**Anatomie** Terminons ces précisions terminologiques par des aspects plus biologiques : la planche anatomique 1.2 reprend les principales structures ou régions anatomiques qui seront utilisées par la suite.

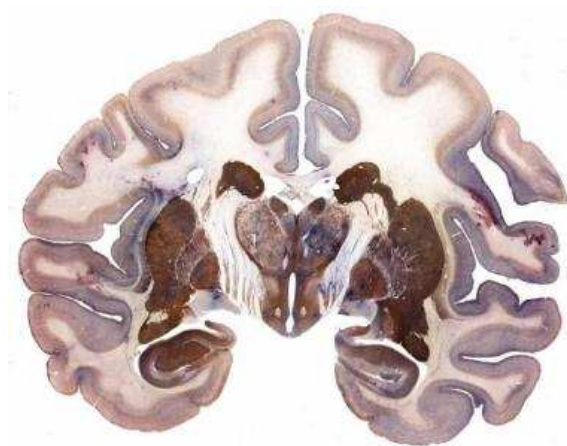
### 1.1.2 Les différents types de déformations des coupes histologiques

Les caractéristiques des coupes histologiques varient en fonction principalement du type d’animal traité et des techniques de marquage. Cependant, certaines étapes sont communes à tous les animaux et à une grande majorité de procédures.

**Extraction** Tout d’abord, après sacrifice de l’animal, le cerveau est extrait et des déformations dues à cette extraction se produisent. Ces déformations concernent le cerveau avant la coupe : ce sont des déformations globales tridimensionnelles. Il s’agit d’une contraction globale du cerveau due à la perte du liquide céphalo-rachidien et à la perte d’irrigation sanguine suivies d’une déshydratation, plus diverses déformations dues à la gravité ou à d’autres effets mécaniques (manipulation du cerveau). S’ajoutent à cela d’éventuels traitements spécifiques (fixation) qui peuvent entraîner des déformations supplémentaires. Nous appellerons ce premier type de déformation globale et 3D les **”déformations primaires”**.



(a)



(b)

FIG. 1.2 – Une planche anatomique représentant une coupe de cerveau de primate schématisée en incidence coronale avec les principales structures anatomiques (a) : en particulier matière blanche, matière grise et noyaux gris centraux (ensemble des structures en bleu). Une coupe histologique réelle (b).

**Coupe** Dans un second temps, le cerveau est coupé en tranches de faible épaisseur (quelques dizaines de microns) de façon à obtenir un ensemble de coupes 2D sériées. Remarquons que dans la grande majorité des cas, la coupe est effectuée en incidence coronale. Un des intérêts de la reconstruction 3D est de pouvoir *in fine* observer le volume histologique sous une incidence quelconque si bien que l'incidence de coupe originale importe moins. La résolution dans la direction orthogonale au plan de coupe reste cependant définie par l'intervalle inter-coupes, qu'il faut donc choisir avec précaution.

Il résulte de cette étape de coupe la perte de cohérence tridimensionnelle du cer-

veau mais également des déformations indépendantes 2D de chaque section. Celles-ci sont dues aux efforts de coupes (entraînant cisaillement, déchirures). D'éventuels marquages ou passage dans des solutions peuvent également entraîner une contraction des tissus. Le montage sur lames de verre enfin occasionne des changements dans la configuration spatiale de chaque coupe comme la séparation des hémisphères ou des mouvements locaux (par exemple mouvements des girus). Nous appellerons ce deuxième type de déformations individuelles 2D les **"déformations secondaires"**.

**Déformations et reconstruction** Nous pouvons noter qu'il est nécessaire de prendre en compte et de corriger les déformations secondaires pour permettre de reconstruire un volume 3D à partir de coupes 2D (voir [JMH94] pour une étude des distorsions chez le rat). Par contre, la correction des déformations primaires n'est indispensable que dans l'optique d'une mise en correspondance avec une modalité *in vivo* 3D comme une IRM lorsqu'elle est disponible. Notons également que sans référence géométrique, le processus même de reconstruction 3D, par propagation notamment, peut engendrer des déformations supplémentaires résultant de biais ou d'approximations successives, qui ne peuvent souvent pas être évitées. Ces effets artefactuels seront assimilés le cas échéant en ce qui concerne leur correction aux déformations primaires.

Le schéma de la **Figure 1.3** résume les différentes étapes d'une étude neuroanatomique standard utilisant des coupes histologiques, avec les déformations liées à chaque étape.

## 1.2 Les déformations secondaires

Les déformations secondaires n'ont pas la même importance et les mêmes caractéristiques en fonction du type d'étude et de l'espèce animale considérée.

### 1.2.1 Les petits cerveaux

#### Type d'étude

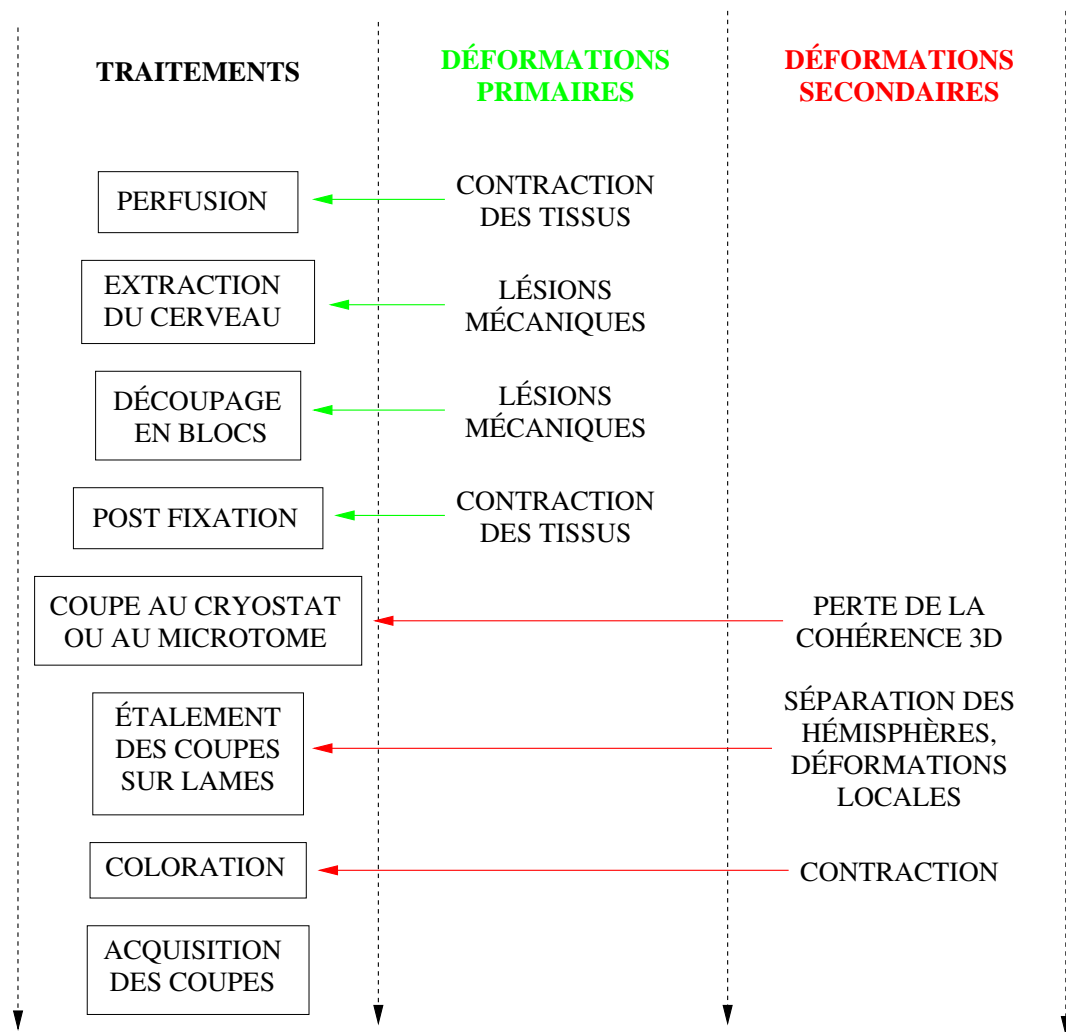
Comme il a été dit précédemment, les études biologiques enchaînent les expériences sur cellules en culture *in vitro* et les études sur les rongeurs, tels que les souris et les rats... Parce qu'ils sont petits, faciles à élever, qu'il est possible de mener des études exploratoires de groupe, que leur manipulation génétique est relativement maîtrisée, ces animaux interviennent très majoritairement dans les études réalisées dans les laboratoires de biologie. Compte-tenu du nombre important d'animaux intervenant dans ce type d'étude, les protocoles de traitement d'image et de reconstruction 3D doivent nécessiter le moins possible l'intervention d'un opérateur. C'est pourquoi nous proposons dans le chapitre 2 des méthodes d'acquisition automatisée des données.

#### Caractéristiques

Le cerveau des rongeurs présente très peu de circonvolutions<sup>1</sup> (voir **Figure 1.4 (a)**) et est sujet par conséquent à peu de déformations au cours de la coupe. Le sillon inter-hémisphérique (qui sépare le cerveau en deux hémisphères) est peu profond si bien que les hémisphères restent fortement connectés sur la grande majorité des coupes. Il y a

---

<sup>1</sup>Sillons corticaux.



TRAITEMENT D'IMAGES : RECONSTRUCTION 3D, NORMALISATION, ANALYSE...

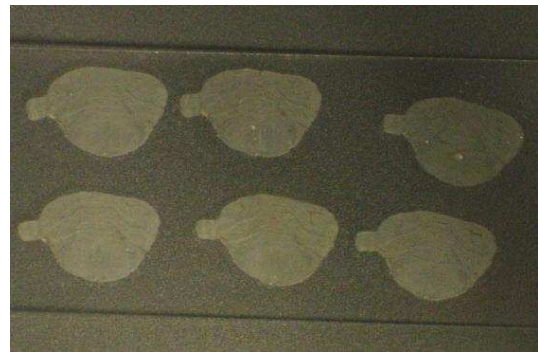
FIG. 1.3 – Les différentes étapes d'une étude neuroanatomique standard avec les déformations liées à chaque étape. Chaque déformation du cerveau est une difficulté pour la reconstruction 3D et la mise en correspondance avec l'imagerie in vivo.

également relativement peu de déformations locales de type déplacement de sillon (sillon "flottant"). Le cerveau n'est en général pas fixé<sup>2</sup>, et il est coupé au cryostat. Le cryostat est un appareil de coupe adapté aux petits organes comme le cerveau des rongeurs, qui maintient le cerveau et le couteau à la même température de l'ordre de -18 °C (voir **Figure 1.4 (c)**). Ce milieu froid est nécessaire aux cerveaux non fixés qui se désagrègent à température ambiante. Chaque coupe est directement amenée du couteau, sur lequel elle reste étalée grâce au froid, jusqu'au support sur lequel elle sera conservée (lame de verre, voir **Figure 1.4 (b)**) puis éventuellement exposée (film d'autoradiographie).

<sup>2</sup>La fixation consiste à remplacer le sang par une solution de paraformaldéhyde (PFA) en utilisant une pompe péristaltique, ce qui a pour effet d'établir des liaisons chimiques covalentes dans les tissus et donc de les rendre plus consistants.



(a)



(b)



(c)

FIG. 1.4 – Vue d'un cerveau de rat juste après son extraction du crâne (a) : il présente très peu de circonvolutions corticales. Des coupes de cerveau placées par apposition sur une lame de verre (b). Vue intérieure du cryostat montrant un cerveau de rat en cours de coupe en position sur la platine ayant servi à réaliser ces coupes (c).

## Recalage

Toutes ces caractéristiques font que les déformations secondaires sont considérablement réduites par rapport à des cerveaux plus complexes : seule la perte de cohérence 3D



coupe à coupe subsiste entièrement. De surcroît, même si les micro-imageurs (microTEP, microMRI, microScanner X) commencent à se développer, les modalités *in vivo* ne sont en général pas disponibles. En effet, les études biologiques de routine n'intègrent pas d'imagerie *in vivo* car la résolution reste limitée, à moins de séquences délicates à mettre en oeuvre, et leur débit de traitement est difficilement compatible avec des acquisitions sur imageurs. En effet, les imageurs mais également les développements en traitement d'images ne sont pas encore assez avancés ou pas assez diffusés pour être utilisés en grande série. La mise en correspondance des coupes histologiques avec les données d'imageurs n'est donc généralement pas réalisée, si bien que les déformations primaires ne sont pas considérées sauf étude spécifique. Une transformation rigide simple suffit donc pour recalcr de façon satisfaisante une coupe avec la suivante comme nous le verrons dans le chapitre 2. Hibbard et al. ([HH88]) ont été parmi les premiers à proposer des travaux d'alignement automatique par transformation rigide de coupes de cerveaux.

Dans certaines études biologiques particulières sur les rongeurs, plus de précision de mise en correspondance peut être nécessaire, par exemple dans le cas d'études de structures très précises, ou dans les études faisant intervenir des images acquises *in vivo*. Des transformations affines ou même non linéaires peuvent être utilisées pour recalcr les coupes entre elles ou pour assurer la mise en correspondance avec une image de référence ([KBFM97], [RCM<sup>+</sup>97], [CYHN98], [GTN03]). Cependant, dans le contexte des maladies neurodégénératives, les études de ce type ne constituent pas du tout la majorité des études menées sur les cerveaux de rongeurs dans les laboratoires de biologie.

## 1.2.2 Les cerveaux de taille plus importante

### Type d'étude

D'autres espèces d'animaux au cerveau de taille plus importante sont utilisées en tant que modèles animaux dans les laboratoires : ainsi, certains primates (babouins, macaques) occupent une place privilégiée en tant qu'espèces plus proches de l'Homme, en particulier en ce qui concerne le cerveau (voir **Figure 1.5**). En général, ils sont utilisés dans les stades plus avancés des études, le stade préclinique<sup>3</sup>.

Ces animaux interviennent dans des études souvent plus difficiles à mettre en place dont la durée se mesure en années généralement. Les données histologiques sont donc comparativement beaucoup plus rares que celles des rongeurs.

### Caractéristiques

Le cerveau est en général fixé par perfusion, puis/ou post-fixé<sup>4</sup> ce qui a pour but d'améliorer la qualité de conservation des constituants (les protéines en particulier). Le cerveau est souvent divisé en blocs pour permettre une meilleure post-fixation ou pour des raisons pratiques de coupe : cette séparation en blocs entraîne des difficultés supplémentaires pour la reconstruction 3D (voir **Figure 1.6**).

La coupe s'effectue avec un microtome à congélation, appareil de coupe adapté aux échantillons plus grands que pour le cryostat. Le couteau n'est pas refroidi et, sans traitement particulier et à température ambiante, les coupes sont trop grandes pour rester étalées. Elles se chiffonnent donc et sont récupérées au pinceau pour être stockées en l'état

<sup>3</sup>Stade précédant le stade clinique des premiers essais sur l'Homme.

<sup>4</sup>La post-fixation est une fixation du cerveau en solution de PFA après extraction.

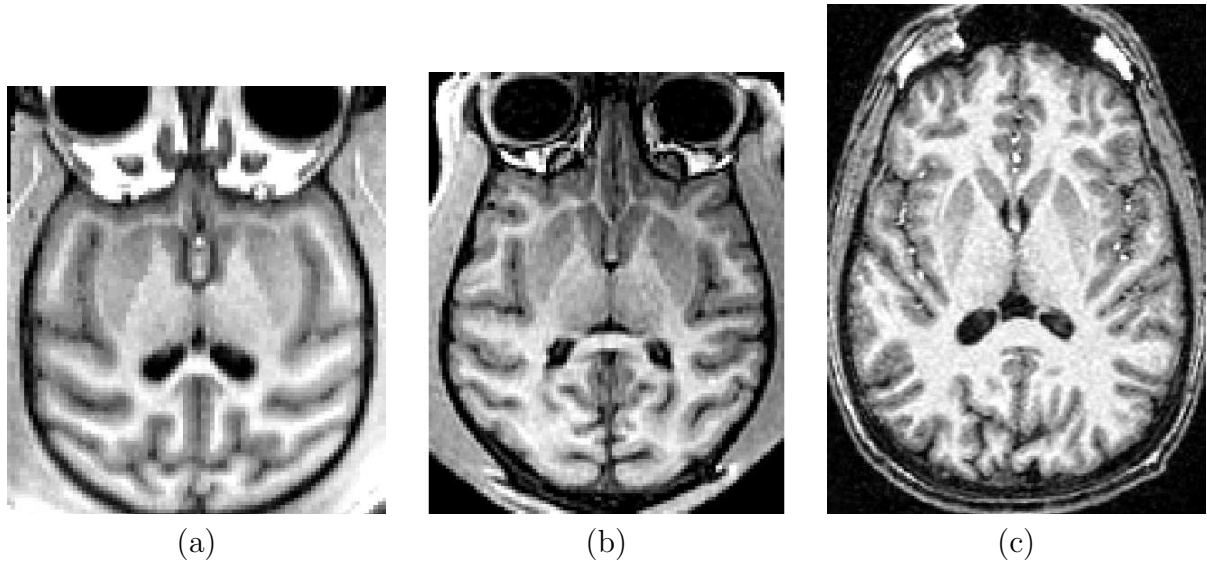


FIG. 1.5 – *IRM en incidence axiale de macaque (a), de babouin (b) et d’Homme (c) situées au même niveau anatomique. Les cerveaux présentent beaucoup de similitudes à ce niveau d’analyse.*

dans un premier temps dans un petit réceptacle étroit, contenant plusieurs coupes, rempli d’une solution tampon et dans lequel elles flottent et s’entremêlent. Le montage sur support a lieu dans un second temps : les coupes sont déversées dans un récipient large où elles s’étalent, puis sont généralement montées sur lame de verre au pinceau (voir **Figure 1.7**). Des techniques spéciales utilisant un milieu d’enrobage du cerveau pendant la coupe sont également utilisées, comme l’inclusion en paraffine (voir [GGH<sup>+</sup>03] par exemple).

Le cortex des primates est fortement circonvolué, et les déformations locales, comme les déplacements de sillons, sont donc plus courants. Le sillon inter-hémisphérique notamment est très prononcé, ce qui a pour conséquence importante qu’en coupe coronale, les deux hémisphères de chaque section sont séparés dans les régions frontales (rostrales) et occipitales (caudales), et qu’ils sont fragilement reliés par le corps calleux dans la partie centrale du cerveau (voir **Figure 1.8**).

## Recalage

L’ensemble de ces caractéristiques fait que les déformations secondaires sont nombreuses, et la perte de cohérence 3D plus importante que dans le cas des rongeurs. La séparation des hémisphères pose directement problème pour l’étape d’alignement, quel que soit le type de transformation que l’on souhaite utiliser. En effet, certaines coupes sont constituées de deux objets séparés et indépendants. Les solutions proposées dans la littérature pour pallier ce problème dans ce contexte primate sont énoncées ci-dessous.

**Demi cerveau** Tout d’abord, la solution la plus simple consiste à ne considérer qu’un seul hémisphère. C’est en fait très souvent le cas car, compte-tenu du fait que ces cerveaux sont assez rares, un seul des deux hémisphères peut n’être disponible pour la reconstruction 3D, l’autre étant réservé à d’autres traitements.

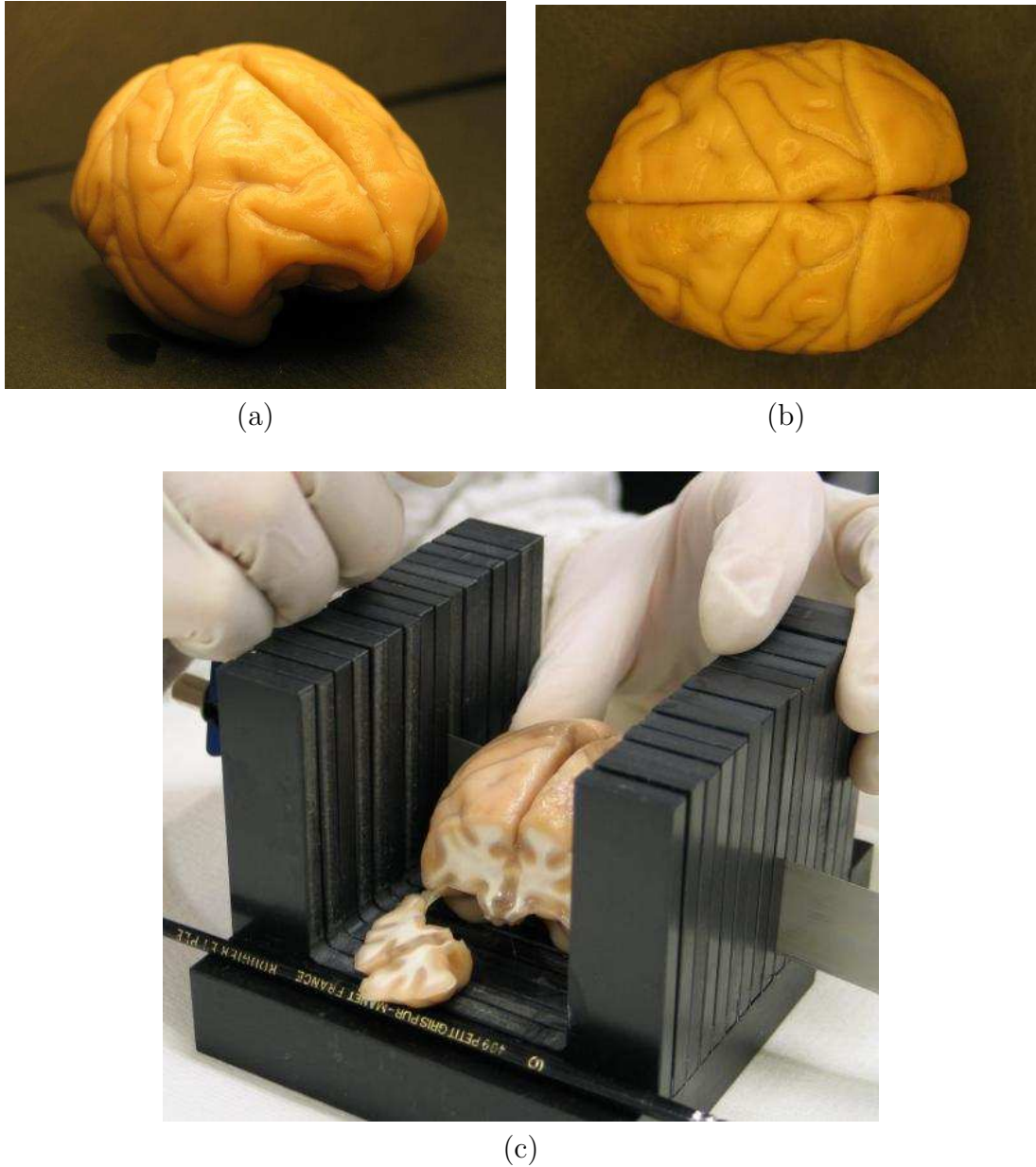


FIG. 1.6 – Vues d'un cerveau de macaque juste après son extraction (a) et (b). Découpage en blocs pour faciliter la fixation et la coupe (c).

**Algorithme de labellisation** Une autre solution proposée par [SDZ95] chez l'Homme consiste à opérer une binarisation de chaque coupe IRM, puis d'effectuer une identification de chaque structure par un algorithme de labellisation qui identifie, met en relation et labellise les différentes composantes connexes. Des points caractéristiques sont extraits des contours et sont appariés avec les points correspondants sur la coupe histologique permettant un recalage affine par moindres carrés en utilisant une stratégie robuste d'estimation. Ce travail insiste sur la nécessité d'un recalage global affiné avant tout recalage non linéaire et propose une solution en ce sens. La méthode décrite présente cependant plusieurs inconvénients. D'abord, seuls les contours servent pour la mise en correspondance. Ensuite, avec les petites composantes connexes, les appariements doivent être peu fiables. L'algorithme de labellisation introduit une complexité importante et limite la robustesse. Enfin, si les hémisphères ont un mouvement indépendant mais sont tout de même très

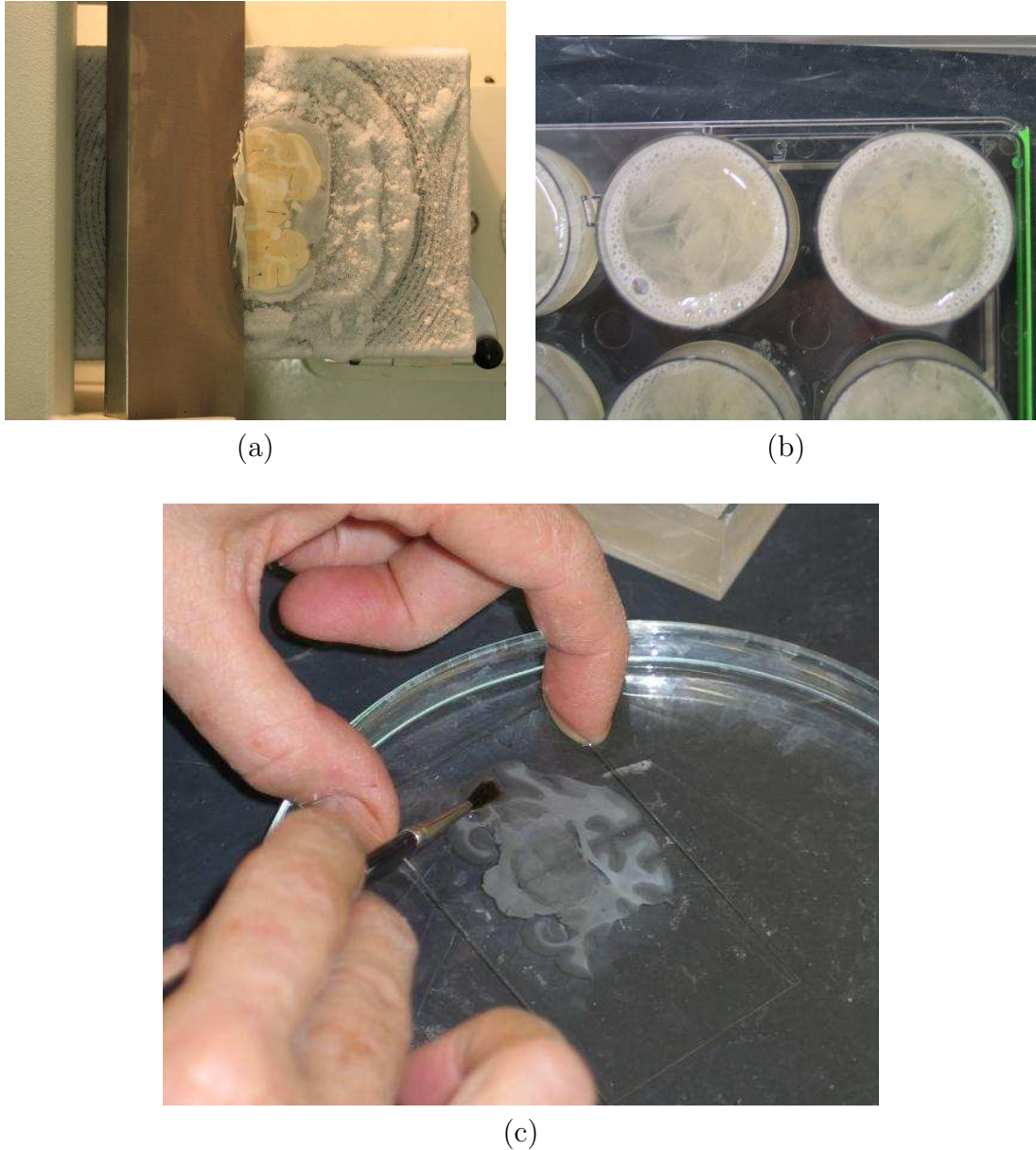


FIG. 1.7 – Coupe d'un cerveau de babouin en cours au microtome (a), les petits réceptacles appelés puits dans lesquels les coupes sont stockées et s'entremêlent (b) et le montage sur lame de verre après étalement de la coupe dans une boîte de Pétri (c). L'ensemble de ces différentes étapes qui imposent plusieurs manipulations mécaniques entraînent l'apparition de lésions tissulaires qui constitueront autant d'artefacts dans la reconstruction 3D du volume histologique (déformations secondaires).

fragilement reliées, une seule transformation affine est évaluée par coupe.

**Déformation non linéaire** La solution consistant à lancer directement un recalage non linéaire entre deux coupes dont les hémisphères sont séparés dans chacune des coupes est sous-optimale car les transformations non linéaires ont pour vocation d'estimer des déformations mais estiment très mal les déplacements.



FIG. 1.8 – Coupes en incidence coronale de babouin dans la région rostrale (a), centrale (b) et caudale (c). Les hémisphères sont séparés dans les images (a) et (c).

**Une nouvelle méthode** À notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature de solution réellement adaptée au recalage de deux coupes histologiques aux hémisphères séparés. Extrêmement peu de reconstructions 3D de coupes histologiques (et non pas de photographies) de cerveaux entiers sont d'ailleurs présentées explicitement (pas en rendu volumique) dans la littérature pour des cerveaux d'animaux de primates non humains ou humains. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de proposer une méthode adaptée à cette situation particulière qui s'avère assez courante lorsqu'il s'agit de traiter des coupes histologiques de cerveau de primates, ou d'autres cerveaux aux circonvolutions importantes, comme celui de l'Homme par exemple. Notre méthode, qualifiée de recalage *birigide* et décrite au chapitre 3, est adaptée à ce problème.

**Les petites déformations** En ce qui concerne les petites déformations locales comme les déplacements de sillons individuels à chaque coupe, des solutions ont été proposées dans la littérature.

La méthode de recalage proposée par [PMBT03] adaptée aux coupes histologiques opère un partitionnement et un recalage affine par parties automatiques de la coupe par analyse du champ de déformations, dans le but de corriger des déformations locales. Les zones frontières entre régions sont déformées élastiquement.

[APA05] proposent quant à eux une transformation polyaffine, localement affine mais globalement non linéaire, qui permet de passer de façon quasi-continue des transformations affines globales aux transformations non linéaires denses, et donc implicitement de parvenir au même but mais par optimisation globale d'un critère de similarité.

D'autres méthodes ont encore été proposées pour corriger les petites déformations (voir par exemple [ARH05] pour une transformation non-linéaire utilisant une interpolation par *thin-plate spline*) Ces méthodes supposent *a priori* les coupes connexes et donc constituées d'un seul objet, mais elles pourraient convenir à la correction de certaines déformations secondaires de coupes histologiques aux hémisphères séparés après l'étape *birigide*. Nous n'avons cependant pas utilisé ces méthodes dans nos protocoles car, bien qu'apparemment robustes et fiables, ces méthodes risquaient d'abord d'introduire des déformations des données initiales et limiteraient la robustesse de notre chaîne de traitement. Ensuite, les corrections qu'elles apportent se situent principalement au niveau des giri, et donc à la périphérie du cerveau alors que nos régions d'intérêt (thalamus, striatum) sont les structures centrales du cerveau. Ces corrections ne sont donc pas indispensables dans nos études alors qu'elles sont tout à fait adaptées à des études s'intéressant plus précisé-

ment au cortex. Nos protocoles visant une portée générale et robuste, nous mentionnons ces méthodes intéressantes mais ne les développons pas car elles concernent des études plus spécifiques et précises.

## 1.3 La modalité photographique

### 1.3.1 Le recalage par propagation

Nous avons vu dans la partie "terminologie" que la reconstruction d'un volume 3D s'effectuait par alignement des coupes, c'est-à-dire par recalage des coupes successives. La méthode la plus employée consiste à fonctionner par propagation : le recalage deux à deux entre toutes les coupes successives est évalué, puis toutes les transformations sont ramenées à une coupe choisie comme référence de façon à obtenir un volume aligné. Le type de transformation utilisé pour le recalage est classiquement affine, notamment parce que la composition de plusieurs transformations est alors aisée, mais tout autre type de transformation est possible. Comme nous l'avons dit précédemment, cette façon de procéder pour la reconstruction, sans référence géométrique, a tendance à faire perdre la courbure du cerveau, et donc à reconstruire un cerveau rectiligne (voir [MBNV04] et le *banana problem*).

### 1.3.2 Modalités histologiques uniquement

Dans le cas des cerveaux de rongeurs, cet artefact n'est pas très gênant d'une part parce que le cerveau des rongeurs présente une courbure moins prononcée que pour les plus gros animaux, et d'autre part, parce que la confrontation à une imagerie présentant la géométrie de référence n'est en général pas réalisée.

### 1.3.3 Lien avec une modalité *in vivo*

Pour les primates, il en est en général autrement. Leur cerveau présente une courbure très prononcée et la confrontation à la géométrie de référence (imagerie *in vivo*) est beaucoup plus souvent réalisée. Comme nous l'avons également dit, cet artefact ne peut pas vraiment être corrigé directement, puisque la courbure est une information qui semble se perdre dans la discrétisation en coupes 2D.

Il existe pourtant dans la littérature une solution à ce problème, il s'agit de la réalisation de photographies ou de vidéos du plan de coupe du cerveau au cours de la coupe ([LLH<sup>+</sup>89] appliquée au coeur de rats, [KBFM97], [MCT<sup>+</sup>97], [ORS<sup>+</sup>01], [BOD<sup>+</sup>02] pour le cerveau). Ces photographies réalisées exactement dans la même position par rapport au plan de coupe du cerveau, coupe après coupe, génèrent une série de photographies, que l'on appellera coupes photographiques (par opposition aux coupes histologiques), directement alignées, aux éventuels recalages inter-blocs près. La reconstruction 3D obtenue donne lieu à un volume photographique qui présente les déformations primaires sans présenter les déformations secondaires.

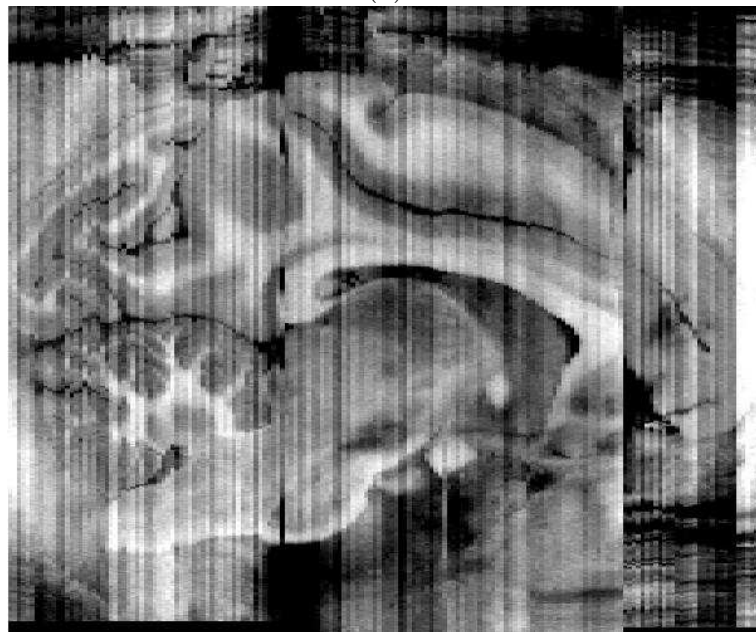
Cette modalité, qui ne constitue pas à proprement parler une modalité biologique puisqu'aucun marquage spécifique n'est possible, est pourtant d'un grand intérêt puisqu'elle permet de découpler la correction des deux principaux types de déformations des coupes histologiques. En particulier, ce volume photographique a conservé la courbure originale



du cerveau (ou une courbure proche de l'originale car cette modalité est une modalité *post mortem*). Les petites déformations locales secondaires sont effectivement très limitées puisque chaque photographie est réalisée alors que la coupe est encore solidaire du bloc cerveau. Ce volume constitue donc une référence géométrique pour la correction des déformations secondaires, et représente la modalité idéale pour estimer les déformations primaires par rapport à la géométrie du cerveau *in vivo* (voir **Figure 1.9**).



(a)



(b)

FIG. 1.9 – Une photographie du plan de coupe (partie rostrale du cerveau de babouin) au microtome illustrant la séparation des deux hémisphères mais qui apparaissent dans leur configuration originale grâce au rattachement de la coupe au reste du cerveau (a). Une vue en incidence sagittale du volume de photographies empilées et directement alignées, aux blocs près, dans laquelle on peut apprécier la conservation de la courbure du cerveau (b). On peut remarquer les différences d'intensités lumineuses inter-coupes pour les photographies.

La correction de la courbure et la possibilité de découplage des déformations sont intéressantes pour la reconstruction 3D de tout type de cerveau mais l'introduction de la modalité photographique est particulièrement utile pour les études faisant intervenir des cerveaux de taille importante pour lesquels la mise en correspondance avec l'imagerie *in vivo* est envisagée. Nous présentons la mise en oeuvre pratique et l'usage de cette modalité dans le chapitre 3.

## 1.4 Différences d'intensité inter-coupes

### 1.4.1 Coupes et marquages spécifiques

Un des principaux intérêts que présentent les coupes histologiques réside dans l'usage de colorations permettant de marquer des populations de cellules particulières. Il existe un grand nombre de marqueurs très divers, parmi lesquels on peut citer :

- la tyrosine hydroxylase (TH) marqueur des neurones dopaminergiques,
- le Nissl et sa variante le crésyl violet, marqueurs des noyaux des cellules,
- le NeuN marqueur des neurones,
- l'acétylcholinestérase (AChE) marqueur des systèmes de neurotransmission cholinergique,
- la cytochrome oxydase marqueur de l'état fonctionnel de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Cette liste est très loin d'être exhaustive. Un autre type d'usage des coupes histologiques consiste en l'autoradiographie (révélation sur film de la distribution d'un ligand radioactif injecté avant sacrifice). Ces techniques s'appliquent à toutes les espèces d'animaux (voir **Figure 1.10**). L'autoradiographie, qui impose de ne pas fixer le cerveau, entraîne une coupe au cryostat, et donc nécessite souvent de diviser le cerveau en petits morceaux s'il est trop volumineux comme celui des primates.

### 1.4.2 Apparition de différences d'intensité

La coloration des coupes histologiques peut varier d'une coupe à l'autre. En effet, l'intensité du marquage est fonction :

- de l'épaisseur de coupes qui peut légèrement varier d'une coupe à l'autre,
- de la concentration des différents bains,
- du temps d'incubation.

L'étape d'acquisition numérique peut également accroître ces différences d'intensité inter-coupes. Ces différences d'intensité sont gênantes pour l'appréciation visuelle des reconstructions 3D (voir **Figure 1.9 b**), c'est pourquoi il est intéressant de chercher à les corriger.

### 1.4.3 Correction

Des méthodes de correction d'intensité ont été proposées dans la littérature, principalement pour corriger les dérives en intensité constatées avec certaines acquisitions ou certaines antennes en IRM. Citons par exemple les travaux de [Man00] recherchant un champ correctif du biais par minimisation de l'entropie. Ces méthodes, bien adaptées aux dérives lentes des imageurs IRM, ne conviennent pas aux données histologiques.



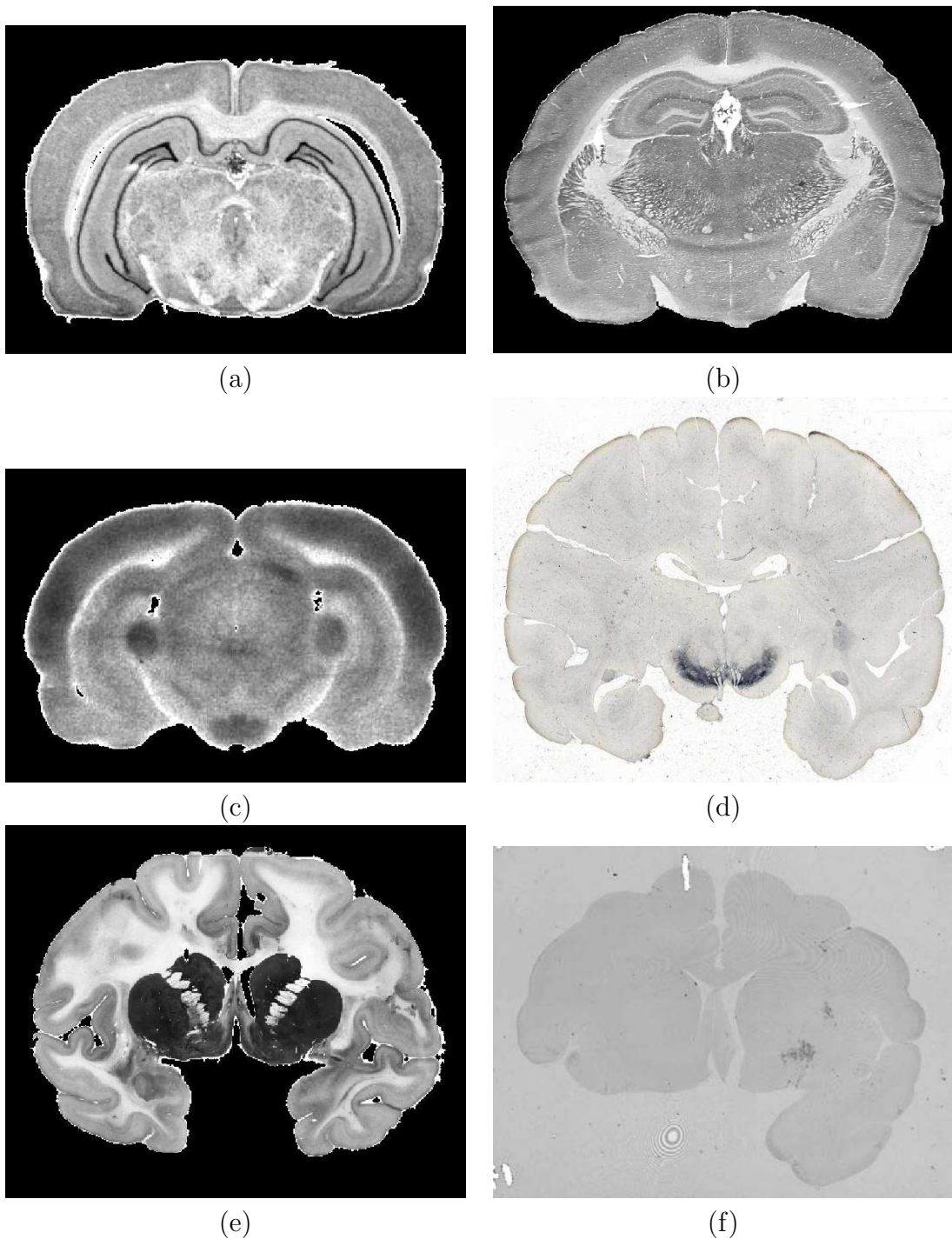


FIG. 1.10 – *Différents marquages de coupes histologiques : au crésyl violet (a) sur rat, à la cytochrome oxydase (b) sur souris, un autoradiogramme (c) sur rat, un marquage tyrosine hydroxylase (d), une coloration de Nissl associée à une mise en évidence de l'acétylcholinestérase (e) sur babouin et enfin un marquage spécifique pour les agrégats de huntingtine (modèle de MH) qui apparaissent en sombre (f) chez le macaque.*

Une méthode intéressante proposée par [MB03] pour la correction d'intensité inter-coupes histologiques, opère un recalage iconique<sup>5</sup> des histogrammes de chaque coupe. La méthode fonctionne avec des coupes autoradiographiques de primates et un certain nombre

<sup>5</sup>Recalage basé sur les niveaux de gris.

d'autres types de coupes, à condition que les histogrammes des coupes successives soient relativement similaires.

Parmi les données que nous avons traitées, des séries de coupes de primates colorées au Nissl associé à une mise en évidence de l'AchE (voir **Figure 1.10 d**) présentaient de fortes variations d'intensité, des changements importants de distribution des intensités dans les histogrammes et des classes de tissus bien différenciées variant d'une coupe à l'autre rendant très difficile un recalage iconique entre histogrammes. Pour parvenir à corriger ces différences d'intensité, nous avons donc développé une méthode de normalisation d'intensité consistant en un recalage robuste fondé sur des amers géométriques extraits par analyse multi-échelle des histogrammes. Cette méthode est présentée au chapitre 3. Bien que des différences d'intensité inter-coupes puissent exister pour tous les types de coupes histologiques de cerveaux, ce problème est à la fois plus marqué et plus gênant chez les primates. En effet, étant donné la taille importante de leur cerveau, les coupes sont traitées en plusieurs bains : les conditions de coupes qui peuvent différer d'un bloc de cerveau à l'autre, la fixation peut différer d'un bloc à l'autre, les bains de colorants peuvent avoir des concentrations légèrement différentes et les conditions expérimentales peuvent varier d'un jeu de coupes à un autre. De plus la confrontation à l'imagerie *in vivo* comme l'IRM rend la cohérence en intensité importante. Toutes ces raisons font que la méthode que nous proposons est plus spécifiquement dédiée et nécessaire aux traitements des cerveaux de primates plutôt qu'aux cerveaux de rongeurs (voir **Figure 1.11**).

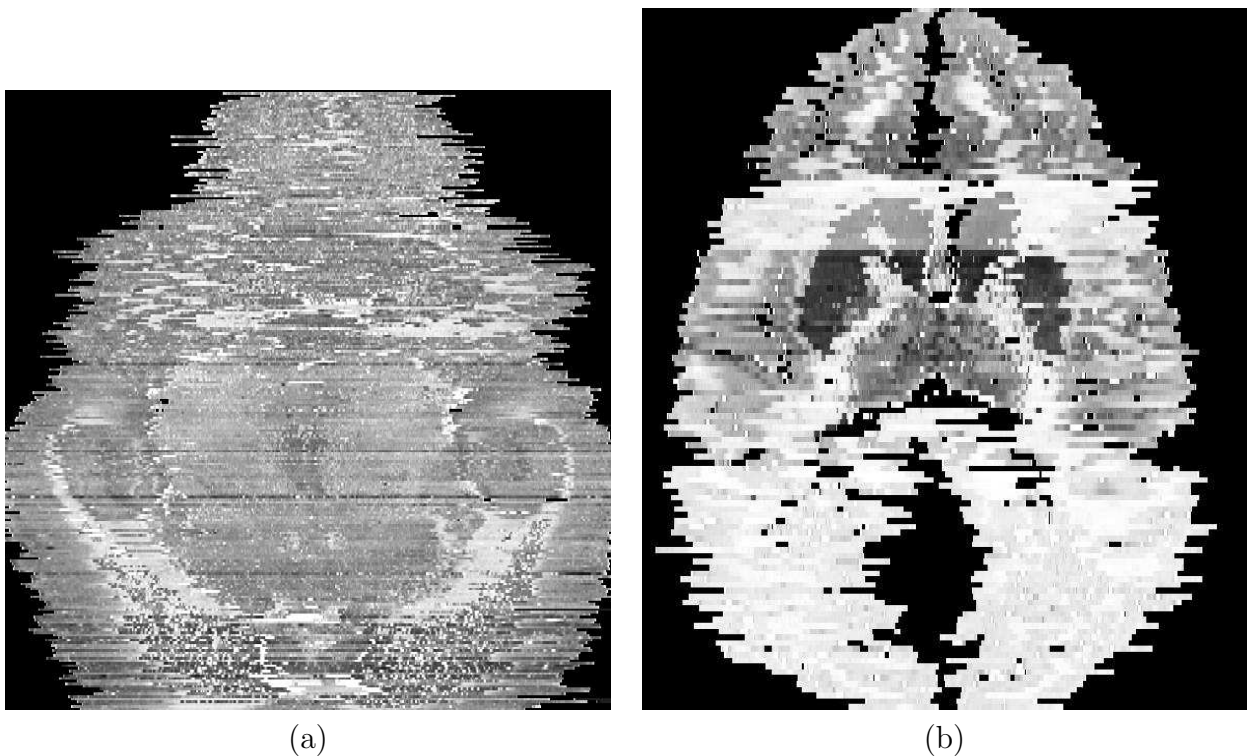


FIG. 1.11 – Vue en incidence axiale d'un empilement de coupes histologiques sans aucun traitement (autre que la mise du fond de l'image à noir) : les différences d'intensité chez la souris (a) sont beaucoup moins importantes que pour le babouin (b) sur cet exemple. L'homogénéité du marquage entre les coupes est plus difficilement obtenue pour les coupes de cerveau de primates que pour les coupes de rongeurs.

## 1.5 Les déformations primaires

### 1.5.1 Des déformations volumiques

Nous allons considérer à présent la question de la correction des déformations primaires, à savoir l'ensemble des déformation 3D qui différencient le cerveau extrait *post mortem* du cerveau dans sa géométrie originale *in vivo*. Notons que nous considérerons dans ce travail comme géométrie de référence du cerveau celle obtenue par IRM anatomique T1, qui est sans doute la modalité *in vivo* offrant les informations morphométriques et structurelles les plus fidèles et les plus précises. Pour y parvenir, nous allons chercher à recalibrer le volume histologique dont les déformations secondaires sont corrigées, avec la modalité de référence géométrique. Il s'agit cette fois d'un recalage 3D.

### 1.5.2 Le recalage 3D

Pour estimer des transformations 3D entre deux cerveaux, de nombreuses techniques ont été proposées dans la littérature. Elles se caractérisent principalement par l'espace de transformations choisi ainsi que par la mesure de similarité utilisée, qui dépendent tous deux du type de problème de recalage que l'on souhaite résoudre (voir les travaux de [Roc01] sur le recalage et les mesures de similarité).

#### Cas mono-sujet

Pour le recalage d'images d'un même sujet, l'espace de transformations adapté est généralement celui des transformations rigides. Pour le cas du recalage mono-modal mono-sujet, réputé le cas le plus favorable, des mesures de similarité "simples" telles que le coefficient de corrélation ou même la somme du carré des différences des intensités sont souvent les plus efficaces. Pour le recalage multimodalité mono-sujet, comme par exemple le recalage IRM / TEP d'un même sujet, des mesures de similarité plus générales, telles que l'information mutuelle principalement ou le rapport de corrélation, sont souvent utilisées ([VW97], [MVS03]).

#### Cas inter-sujet

Pour le recalage d'IRM anatomiques de différents sujets, soit un recalage mono-modal inter-sujet, des méthodes élastiques basées sur la modélisation du champ de déformation comme une combinaison linéaire de fonctions de bases cosinus en utilisant encore l'information mutuelle comme mesure de similarité (voir [FAF<sup>+</sup>95], [AF97]) sont classiquement utilisées. Beaucoup d'autres techniques efficaces de recalage non linéaire adaptées au recalage mono-modal inter-sujet existent : citons les travaux de [Cac02], [CE98] et [Thi98] pour n'en citer que quelques-uns. On notera que le recalage multimodalité multisujet est rarement considéré, car c'est le cas le plus défavorable, et qu'il a souvent peu de sens.

### 1.5.3 Recalage *post mortem-in vivo*

#### Cas mono-sujet particulier

Le recalage entre des données *post mortem* et *in vivo* entre dans la famille des recalages multimodalités mono-sujets. La transformation adaptée serait théoriquement la transformation rigide comme nous l'avons vu entre une TEP et une IRM. Cependant, comme les données *post mortem* ont subi un certain nombre de déformations, que l'on supposera limitées aux déformations primaires étant donné que les secondaires ont fait l'objet d'une correction préliminaire, la stratégie change. Dans la littérature, diverses solutions concernant la réalisation de ce recalage 3D ont été proposées : nous allons en présenter quelques-unes.

**Transformations affines 3D** Lorsque la région d'intérêt est très limitée, un recalage 3D affine simple focalisé (par fenêtrage par exemple) sur la structure d'intérêt peut convenir localement ([ORS<sup>+</sup>01]). En effet, certaines régions comme les noyaux gris centraux se déforment relativement peu entre les deux images.

**Transformations affines 2D/3D alternées** [MBNV04] proposent une correction originale alternée et itérative des déformations primaires et secondaires. Les coupes histologiques sont d'abord alignées par recalage affine (correction des déformations secondaires) menant à un premier volume histologique. Celui-ci est recalé en 3D de manière affine avec l'IRM (correction des déformations primaires) prise comme imagerie de référence en termes de géométrie. Ce recalage permet d'obtenir par rééchantillonnage les coupes IRM correspondant aux coupes histologiques. Cette correspondance est utilisée pour réaliser un nouvel alignement par recalage affine 2D de chaque coupe histologique sur la coupe correspondante en IRM. Le processus est itéré : la correction des déformations primaires et secondaires est donc effectuée progressivement et alternativement. La transformation finale est une série de compositions de transformations affines 2D/3D alternativement, et peut être assimilée à une classe de transformation non linéaire 3D particulière. Cette méthode est adaptée au cas où la modalité photographique n'a pas été acquise.

**Transformations non linéaires** Les méthodes de déformations purement non linéaires spécifiques à cette problématique de recalage histologique avec une référence géométrique comme l'IRM sont relativement rares dans la littérature. En effet, compte-tenu du grand nombre de degrés de liberté de ces méthodes et des artefacts propres aux données histologiques, robustesse et précision sont difficilement conciliables.

[TT96] ont développé une méthode de déformation basée sur la mise en correspondance des surfaces, qui semble adaptée à la correction des déformations primaires.

D'autres méthodes de recalage non linéaire ont été proposées et semblent donner des résultats intéressants sur des données d'histologie, comme celle élastique de [KBFM97] utilisant les Thin Plates Splines (TPS) ou les méthodes fluides de [Chr99].

Toutes ces méthodes fournissent des résultats précis mais nécessitent un réglage délicat d'un certain nombre de paramètres sensibles. La précision du recalage estimée par la ressemblance entre les images test et référence semble avoir été le point prioritaire, au détriment de la généralité, de la robustesse, du réalisme ou de la facilité d'utilisation à l'intérieur d'un protocole global. Seule une comparaison exhaustive de toutes ces méthodes permettrait bien sûr de les juger de façon certaine. Néanmoins, il nous est apparu que

les méthodes de la littérature dédiées au problème du recalage 3D images *post mortem* et images *in vivo* ne semblaient pas correspondre au compromis recherché d'une transformation beaucoup plus précise et plus fine qu'une transformation affine, mais cependant robuste et d'utilisation relativement aisée.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la méthode de *Free Form Deformation* (FFD) proposée par [RSH<sup>+</sup>99]. La déformation est modélisée par des *cubic B-splines* et l'information mutuelle est utilisée comme critère de similarité.

### 1.5.4 Le choix FFD

#### Une méthode adaptée aux déformations mono-sujet

Cette méthode a été appliquée initialement au recalage inter-sujet d'images IRM du sein, mais également au recalage TEP-CT d'images du thorax dans le but de corriger les différences entre l'inspiration maximale du scanner et l'inspiration normale de la TEP (voir [Mat00], [DFF03]). Il s'agit également d'un recalage mono-sujet multimodal qui ne peut être résolu avec un simple recalage rigide car des différences importantes de forme existent entre les deux images.

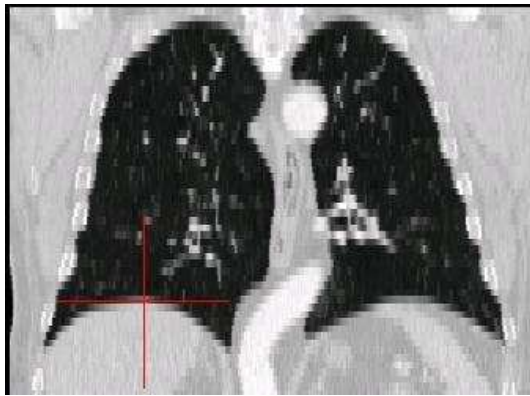
#### Analogie

Les problématiques de la correction élastique de la différence entre respiration normale et respiration maximale et de la différence entre cerveau *post mortem* et *in vivo* sont finalement assez similaires. Dans le cas du thorax, la différence de forme est due à la présence d'air tandis que dans le cas du cerveau la différence est due à la présence ou non des liquides physiologiques (eau, sang, liquide céphalo-rachidien). La méthode nous a donc paru adaptée à notre problème d'autant plus qu'il est possible de contrôler l'élasticité de la déformation en choisissant le nombre de degrés de liberté de la transformation. Sur la **Figure 1.12**, nous pouvons voir que les déformations du cerveau *post mortem* par rapport à la géométrie *in vivo* présentent une analogie avec la déformation du thorax en inspiration normale (TEP) par rapport à l'inspiration maximale (CT). Notre contribution consiste ici en l'utilisation de cette transformation pour un usage nouveau mais qui, *mutatis mutandis*, rentre dans le cadre d'utilisation de cette méthode.

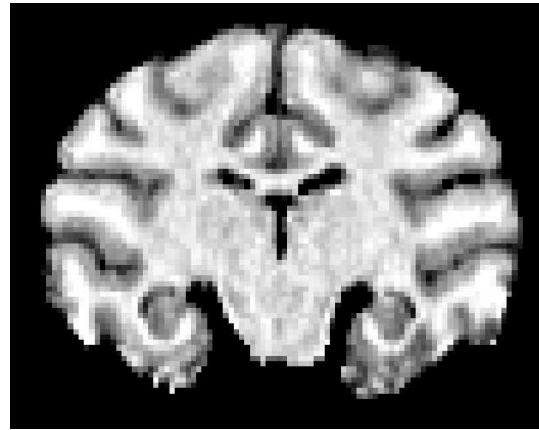
Nous présentons la modalité IRM *post mortem* pour cette illustration mais il s'agira bien sûr de corriger les déformations du volume histologique que nous présenterons plus loin. Il s'agit bien donc d'un recalage mono-sujet inter-modalité comme dans le cas PET-CT. Nous décrivons au chapitre 3 comment nous avons adapté la méthode FFD à la correction des déformations primaires.

## 1.6 Synthèse : deux problématiques distinctes, deux protocoles distincts

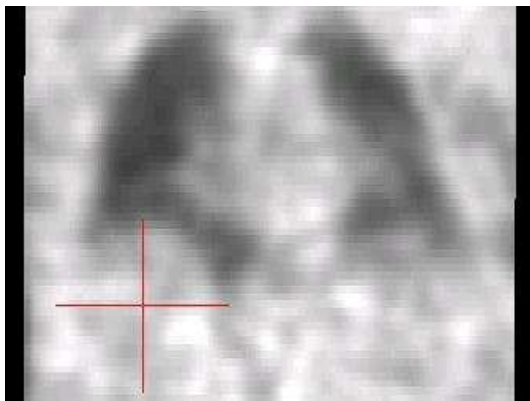
Compte-tenu de l'ensemble des remarques qui ont été faites dans ce chapitre, nous pouvons synthétiser l'analyse concernant l'obtention et le traitement des coupes histologiques en vue d'une reconstruction 3D de la façon suivante.



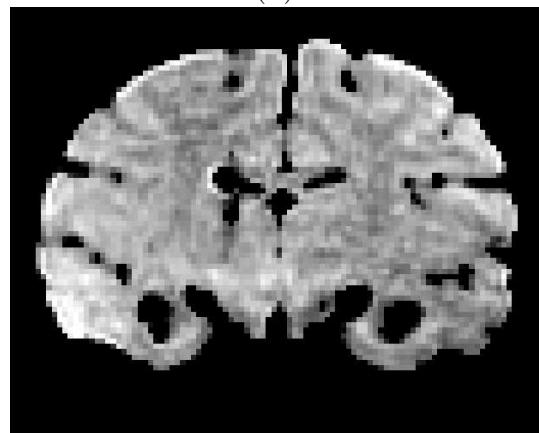
(a)



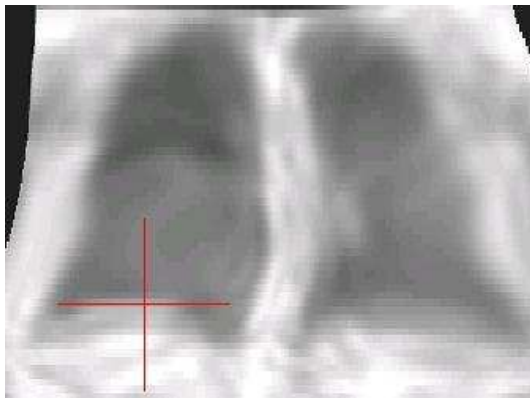
(d)



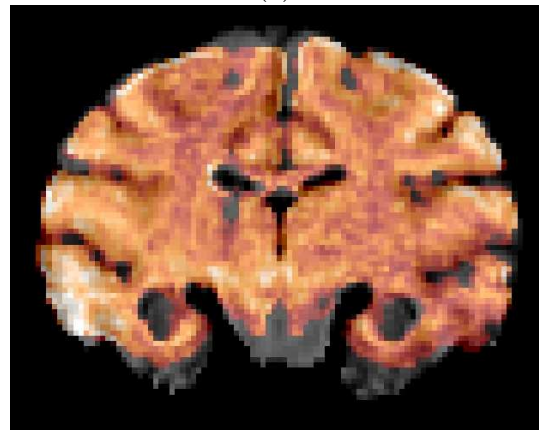
(b)



(e)



(c)



(f)

FIG. 1.12 – Comparaison de la déformation du thorax due à la respiration (CT respiration maximale (a), TEP transmission respiration normale (b) et TEP transformée par FFD dans la géométrie du CT (c) ) et de la déformation du cerveau due à la perte des liquides physiologiques (en incidence coronale, IRM in vivo (d), IRM post mortem recalée rigide-ment (e) et fusion des deux images avec l'IRM post mortem en fausses couleurs orangées (f) ). Les problématiques sont similaires. Les images de thorax sont issues de [DFF03].

### 1.6.1 Études en séries, petits cerveaux peu circonvolués, pas de référence géométrique

D'un côté, la majorité des études biologiques utilisant des coupes histologiques concerne les petits animaux de types rongeurs. Il s'agit d'étude moyen voire haut débit, c'est-à-dire que le nombre d'animaux mis en jeu est relativement important pour chaque étude (de l'ordre de la dizaine), et les temps d'étude (expérience, obtention des coupes, analyse) sont relativement réduits (de l'ordre du mois). Par conséquent, le degré d'automatisation des traitements doit être important, le protocole robuste et le temps de traitement limité.

La coupe est réalisée généralement au cryostat, le cerveau est compact et n'est pas séparé en blocs, il présente peu de déformations locales car il est peu circonvolué. Les hémisphères ne sont pas séparés sur les coupes ce qui permet d'utiliser des transformations affines pour corriger les déformations secondaires. La courbure du cerveau est faible et généralement aucune modalité de référence géométrique du type IRM *in vivo* n'est disponible compte-tenu de la difficulté d'imager correctement des cerveaux de petites tailles nécessitant notamment des systèmes dédiés. Une modalité intermédiaire de type photographies ne s'impose donc pas. La correction des déformations primaires n'est pas non plus généralement nécessaire étant donné qu'il s'agit d'études relativement fondamentales pour lesquelles la confrontation avec l'imagerie *in vivo* n'est pas forcément prioritaire. La reconstruction 3D et la mise en correspondance anatomo-fonctionnelle apportent en soi un bénéfice d'étude en termes de recherche exploratoire et d'approche volumique.

### 1.6.2 Études isolées, cerveaux circonvolués, lien avec une modalité *in vivo*

D'un autre côté, nous trouvons les études biologiques mettant en jeu des animaux au cerveau de taille plus importante comme les primates. Ces animaux sont plus proches de l'Homme d'un point de vue de l'anatomie et du fonctionnement du cerveau, ils sont moins nombreux dans les laboratoires, et les études les concernant comptent un nombre assez réduit d'animaux (de l'ordre d'une demi douzaine voire moins), elles sont moins courantes et sont plus longues dans le temps (durée de l'ordre de l'année). Le degré d'automatisation des traitements les concernant et le temps de traitement sont des paramètres moins importants que pour les études réalisées en grandes séries. Ces études se situent au niveau pré clinique généralement.

La coupe est souvent réalisée au microtome, le cerveau de ces animaux est de taille moyenne à importante (supérieure à 7 cm de longueur), il est souvent séparé en blocs pour des impératifs de fixation et de coupe, il est très circonvolué. Les hémisphères se séparent sur un grand nombre de coupes, ce qui fait qu'un alignement classique ne convient pas pour effectuer la reconstruction 3D. La courbure du cerveau est importante et la plupart du temps, des imageries *in vivo* (IRM, TEP) sont réalisées en vue d'une confrontation avec les coupes histologiques. Les différences d'intensité inter-coupes peuvent être importantes et difficiles à corriger compte-tenu du fait que la coloration est souvent réalisée en plusieurs fois. La modalité photographique est particulièrement intéressante pour guider la correction des déformations secondaires. Enfin, la correction des déformations primaires est nécessaire pour permettre la confrontation des informations obtenues *post mortem* avec l'imagerie *in vivo*.



### 1.6.3 Deux protocoles dédiés

Il nous a donc paru utile de proposer des protocoles de reconstruction 3D à partir des coupes histologiques différents en fonction de l'espèce animale utilisée et du type d'étude. Le premier protocole de reconstruction 3D, appelé **protocole rongeurs** et faisant l'objet du chapitre 2, met l'accent sur l'automatisation, la rapidité et la robustesse de traitement. La mise en correspondance avec une modalité *in vivo* n'est pas envisagée. Le second protocole, appelé **protocole primates** et faisant l'objet du chapitre 3, met en oeuvre une méthodologie plus complexe adaptée à des données plus complexes. La mise en correspondance avec l'imagerie *in vivo* est réalisée.

Le **tableau 1.1** synthétise les remarques de ce chapitre. Notons que ce tableau reflète des tendances générales et non des règles absolues. Notons également que nous désignons par le terme *rongeurs* les rongeurs de laboratoire (principalement souris, rat dans nos études), et par primates *les primates* de laboratoire (principalement macaques et babouins dans nos études). En effet, les genres rongeurs et primates désignent des classes beaucoup plus larges d'un point de vue strictement biologique. Les relations entre taille du cerveau (petit/moyen à grand), degré de circonvolution (lisse/plissé) et genre (rongeur/primate) sont généralement vérifiées mais ne constituent pas des règles absolues. Des contre-exemples existent (gros rongeurs, très petits primates) mais ces animaux sont peu étudiés en laboratoire et la création de protocoles mixtes le cas échéant à partir des briques des deux protocoles présentés permet de faire face à un très grand nombre de situations.



	Petits cerveaux (rongeurs)	Gros cerveaux (primates)
Stade de l'étude	fondamental	préclinique
Appareil de coupe	cryostat	microtome
Séparation hémisphères	très peu	oui
Coupes histologiques marquées	oui	oui
Autoradiographies	oui	possibles
Photographies du plan de coupe	difficiles	possibles
IRM <i>post mortem</i>	possible	possible
IRM <i>in vivo</i>	encore rare	courant
Autre imagerie <i>in vivo</i> (TEP, diffusion, fMRI)	très rare	courant
Nombre d'animaux par étude (ordre de grandeur)	environ 12	environ 6
Durée de l'étude biologique totale	de l'ordre du mois	de l'ordre de l'année

TAB. 1.1 – *Tableau de synthèse des différences entre les études sur petits et gros animaux menant à la création de deux protocoles de traitement distincts.*

# Chapitre 2

## Protocole rongeurs

Dans cette partie, nous détaillerons la notion d'exploitation conjointe de données histologiques anatomo-fonctionnelles en 3D chez le rongeur. Nous présentons d'abord une méthode d'acquisition optimisée qui, à partir d'images de colonnes de coupes, opère une individualisation puis réalise un empilement des images de chaque coupe pour former un volume par modalité. Les coupes histologiques marquées, qui représentent la modalité anatomique, sont alignées par transformation rigide. Une stratégie de co-alignement des coupes autoradiographiques sur les coupes anatomiques alignées est également proposée, qui présente l'avantage de pouvoir superposer des régions d'intérêts d'une modalité à l'autre. L'apport de la 3D est ensuite illustré dans une étude biologique concrète concernant l'inhibition du colliculus. L'automatisation des traitements dans le but d'une utilisation plus systématique et à grande échelle constitue le point clef de ce chapitre.

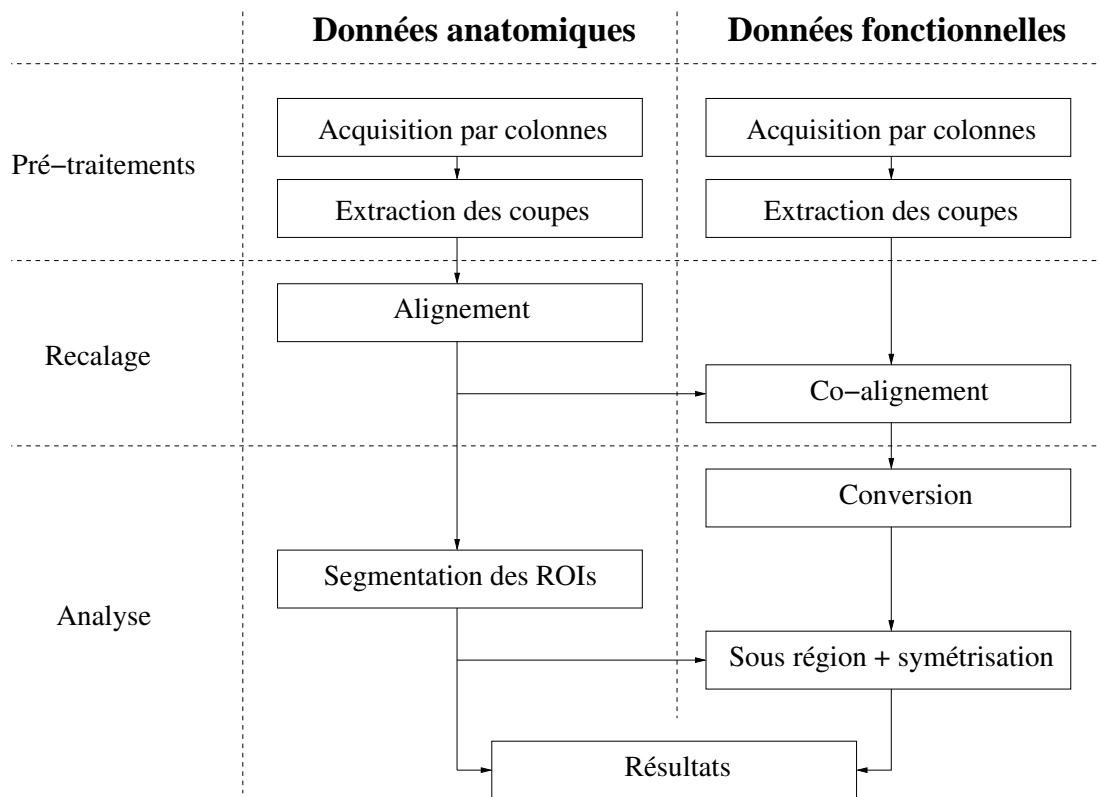


FIG. 2.1 – Les principales étapes de ce chapitre.

## 2.1 Construction des volumes tridimensionnels

### 2.1.1 Les données

Ce chapitre va décrire une méthodologie générale de traitement automatique en 3 dimensions de coupes histologiques marquées et de coupes autoradiographiques chez le rongeur. L'automatisation du traitement impose certaines contraintes au niveau de l'obtention des données par rapport à ce qui se fait classiquement en biologie : ces spécifications seront précisées au fur et à mesure.

#### Le projet colliculus

Pour plus de clarté, l'ensemble des étapes méthodologiques à vocation générale présentées dans ce chapitre seront illustrées au fur et à mesure par des résultats obtenus sur les données d'un projet particulier concernant l'étude des mécanismes d'activation au niveau de la synapse chez le rat. Cette étude vient d'une volonté des chercheurs en biologie de mieux comprendre les mécanismes qui sont à l'origine des déficits énergétiques constatés dans les maladies neurodégénératives en général, et dans la maladie d'Alzheimer en particulier. Pour cela, l'étude préliminaire présentée dans ce chapitre doit être mise en place et validée pour savoir s'il est possible de quantifier de façon précise une activation résultant d'une stimulation spécifique.

L'étude porte sur 5 rats dont un oeil est masqué servant de contrôle, et dont l'autre oeil est stimulé visuellement. L'analyse porte sur la région du colliculus, qui est le principal relais visuel, et où l'apport énergétique est supposé être le plus important.

Les rats sont soumis à une stimulation visuelle pendant 1 heure sous forme d'un damier tournant sur un écran. Juste avant la stimulation, du glucose marqué (2DG) leur est injecté. Lors de la stimulation, l'activité neuronale au niveau du colliculus va augmenter. Cette suractivité entraîne un afflux sanguin et une consommation de glucose accrue, qui peut être détectée par traitement autoradiographique au C14 radioactif.

Après la stimulation, les animaux sont sacrifiés et leur cerveau est extrait. Il est découpé au cryostat en incidence coronale dans la région du colliculus et les coupes successives sont placées directement sur des lames de verre. Pour faciliter l'automatisation des traitements, les coupes sont regroupées sur les lames par paquets de  $n$  exactement :  $n$  vaut 6 dans notre étude.

#### Autoradiographie

Ces coupes montées sont ensuite révélées sur des films autoradiographiques qui vont être impressionnés par l'activité accumulée dans chaque coupe après la stimulation, telle qu'elle était au moment du sacrifice. Les lames de 6 coupes sont placées régulièrement en colonnes sur un film au format A4 pour faciliter l'étape d'acquisition. La révélation dure 24 heures. La série de coupes autoradiographiques ainsi créée va constituer la modalité fonctionnelle puisqu'elle rend compte de l'activité au sein de la coupe : elle représente l'équivalent *post mortem* de la modalité *in vivo* TEP FDG (Tomographie par Émission de Positons au FluoroDéoxyGlucose).

## Marquage spécifique

Les mêmes coupes sont ensuite marquées au crésyl violet, qui est un marqueur anatomique des noyaux en rouge violet principalement. Ce jeu de coupes marquées au crésyl violet va quant à lui constituer la modalité anatomique qui peut être comparée à une IRM T1, puisqu'elle permet de distinguer clairement les structures internes du cerveau.

Le fait d'utiliser les mêmes coupes pour les deux modalités va faciliter leur mise en correspondance. En effet, le recalage d'images comprend deux acceptations proches : mettre en correspondance des structures analogues (même objet physique) ou mettre en correspondance des structures similaires (objets proches). Le premier cas est en général plus favorable.

## Acquisition globale

Les deux jeux de coupes sont acquis par transmission sur un scanner à plat à une résolution suffisante pour pouvoir distinguer clairement les principales structures du cerveau. Dans notre étude portant sur des cerveaux de rat, nous avons choisi une résolution de 600dpi : pour les études sur cerveaux de souris, une acquisition à 1200dpi est plus adaptée. Pour faciliter et accélérer la réalisation de cette acquisition au scanner, les coupes sont acquises par colonne de lames sur la hauteur du champ de vue du scanner (voir **Figure 2.2**). Ainsi pour 150 coupes environ, 5 ou 6 colonnes sont nécessaires seulement pour chaque modalité.

A cette étape, nous disposons donc d'images numérisées de colonnes de lames de 6 coupes autoradiographiques d'une part et de coupes marquées au crésyl violet d'autre part couvrant la région du colliculus.

### 2.1.2 Extraction des coupes

Nous allons décrire à présent comment nous passons automatiquement de l'image numérisée d'une colonne de lames de 6 coupes à un volume de coupes dans l'ordre dans lequel elles ont été obtenues initialement au cryostat. Cette étape se déroule de la même façon pour les coupes autoradiographiques et pour les coupes marquées au crésyl violet à quelques détails près, donc nous aborderons ce problème de façon générale.

## Binarisation

La première étape consiste à analyser l'histogramme de chaque colonne pour seuiller l'image de façon à différencier les coupes du fond de l'image. L'analyse se doit d'être relativement robuste car des artefacts comme le verre des lames créent des pics perturbateurs. L'histogramme est lissé successivement par un filtre gaussien et la trajectoire de chaque maximum est suivie le long de l'espace d'échelle. Les 2 pics qui survivent le plus longtemps correspondent au fond et aux coupes (voir **Figure 2.3**). La valeur moyenne entre ces 2 modes est utilisée pour seuiller l'image et ne garder que la région d'intérêt des coupes dans une image binaire (voir **Figure 2.4 a**). On pourra se reporter à la partie 3.3.2 du chapitre 3 pour plus de détails sur l'analyse d'histogrammes. Les histogrammes peuvent varier légèrement en fonction du type de données acquises (apparition de pics supplémentaires correspondant à des bords de lames par exemple) : il est possible d'adapter la méthode à des données particulières en spécifiant le pic d'intérêt.

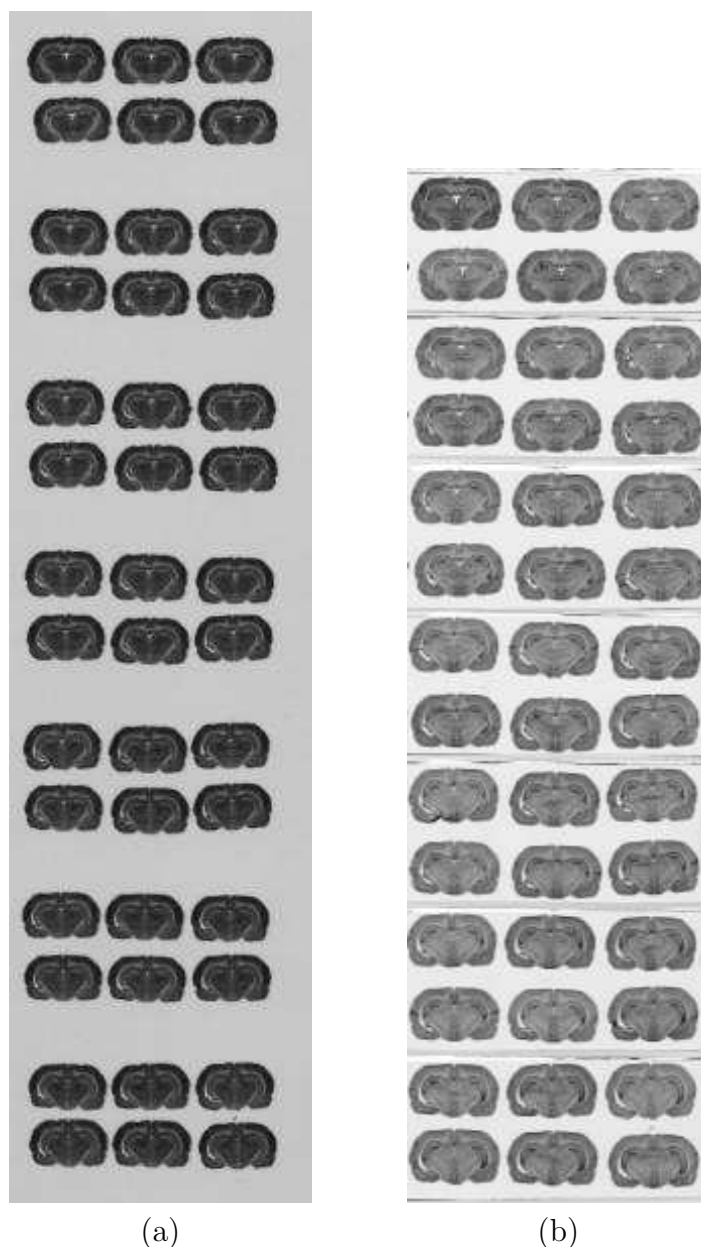


FIG. 2.2 – Une colonne de lames de 6 coupes autoradiographiques (a) et les mêmes coupes colorées au crésyl violet (b) scannées à 600dpi par transmission.

### Individualisation et numérotation

Après une légère érosion, de cette image binaire, les composantes connexes principales (au-dessus d'une taille minimale) sont extraites. Cette opération a pour conséquence d'assigner à chaque coupe un niveau de gris différent, mais dans un ordre pseudo-aléatoire (par ordre de taille croissante généralement). Il faut donc rétablir l'ordre de coupe initial. Les lames sont ordonnées de haut en bas et sur chaque lame, les coupes sont rangées par colonne (3 colonnes de 2 coupes). Un score est calculé de la façon suivante : on parcourt successivement toutes les lignes horizontales voxel par voxel en partant du coin supérieur gauche et on assigne un score à la ligne. Deux états possibles se présentent sur ce parcours : une composante connexe est rencontrée ou non. A chaque nouvelle composante connexe rencontrée, le score de la ligne est incrémenté (voir **Figure 2.4 b** ). Grâce à ce score, il

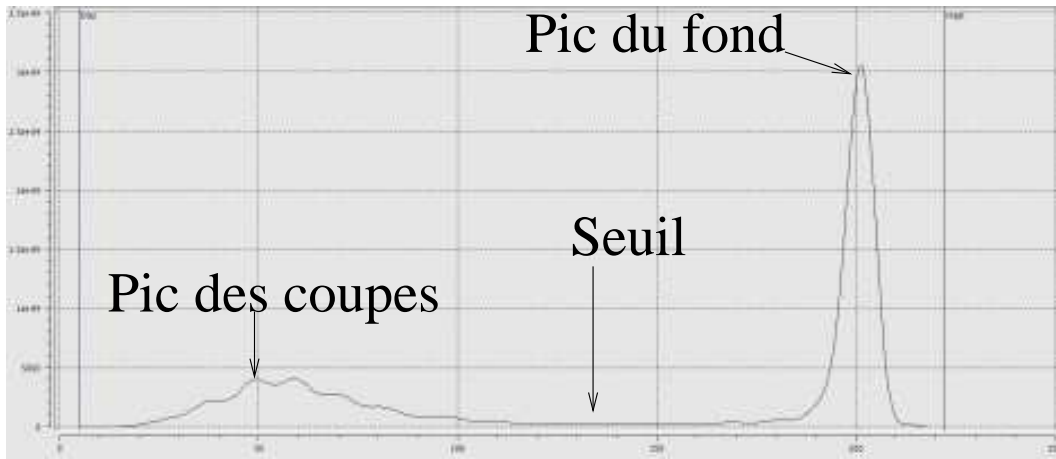


FIG. 2.3 – L’histogramme correspondant à la figure 2.2(a) à partir duquel est déduite la valeur du seuil pour la binarisation.

est aisé de numéroter les coupes dans l’ordre croissant de gauche à droite et de haut en bas en fonction de la position de leur centre de gravité, puis de rétablir la numérotation spécifique par lame modulo 6 organisée de la façon suivante :

1	3	5
2	4	6

Cet ordre, qui n’est pas l’ordre classique de lecture, est choisi pour des raisons pratiques de dépôt de coupe sur la lame au cryostat. Le nombre de coupes par lame ainsi que leur disposition sont des paramètres adaptables à chaque type de données. La **Figure 2.4 c)** illustre cette étape de numérotation.

### Extraction et empilement

Une boîte englobante rectangulaire basée sur les plus grandes dimensions en X (horizontale) et en Y (verticale) est créée autour de chaque composante connexe renumérotée (voir **Figure 2.4 d)** ). Chaque coupe peut ainsi être extraite dans une image de taille constante, puis l’ensemble de ces images sont concaténées pour former un volume. La boîte englobante étant centrée autour du centre de gravité de chaque coupe, la concaténation opère une initialisation d’alignement par la même occasion : ce centrage revient à l’application d’une simple translation alignant les centres de gravité des coupes. Le recalage coupe à coupe reste cependant à perfectionner. L’ensemble de ces étapes sont illustrées par la **Figure 2.4**.

## 2.2 Alignement des coupes

Cette partie décrit la stratégie suivie pour transformer les empilements de coupes 2D précédemment obtenus en volumes spatialement cohérents, et donc observables sous une incidence quelconque.

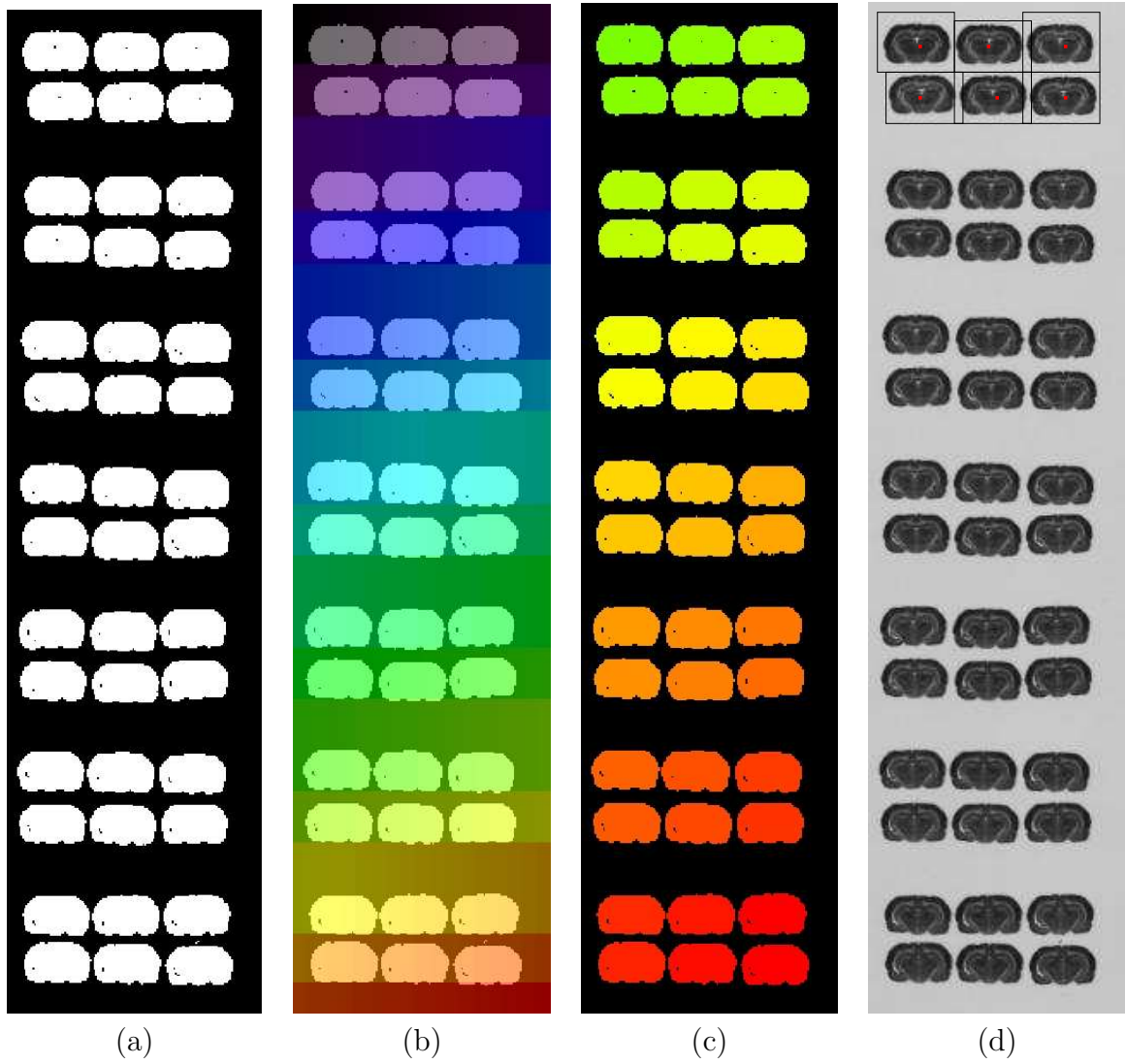


FIG. 2.4 – L'image binarisée correspondant à la figure 2.2(a) grâce au seuil déduit de l'analyse d'histogramme (voir **Figure 2.3**). Après une érosion morphologique, les masses connexes sont extraites séparant les coupes dans le désordre et un calcul de score par ligne est réalisé (b). Ce score permet de numéroté les coupes dans l'ordre de coupe initial (c), et une boîte englobante centrée autour du centre de gravité de chaque coupe permet de les extraire individuellement (d).

### 2.2.1 Alignement des coupes histologiques marquées

#### Le choix anatomique

Nous commençons par aligner les coupes histologiques marquées au crésyl violet, autrement dit la modalité dite anatomique. En effet, c'est sur cette modalité que les structures anatomiques internes du cerveau sont le mieux visibles. L'objectif de l'alignement est de retrouver une géométrie proche de la géométrie originale avant la coupe du cerveau pour recouvrer la cohérence tridimensionnelle perdue. Pour cela, l'information contenue dans cette modalité est la plus pertinente pour cet objectif car elle permet la mise en correspondance de structures anatomiques similaires d'une coupe à l'autre.

## Un alignement rigide par propagation

Pour cette étude, nous ne disposons pas d'imagerie *in vivo*, ou de photographies du bloc cerveau pendant la coupe, qui servirait de référence en termes de géométrie pour l'alignement. C'est d'ailleurs généralement le cas pour les études concernant les rongeurs compte-tenu de la difficulté d'obtenir une imagerie *in vivo* de résolution suffisante, ou la difficulté de prise de photographies sur cryostat (voir chapitre 1). Nous procédons donc à un recalage coupe à coupe qui est propagé à l'ensemble du volume en choisissant une coupe de référence.

En ce qui concerne la transformation, notre choix s'est porté sur un recalage par transformation rigide entre chaque coupe. En effet, ce type de recalage est classique et robuste. Il est bien adapté pour des coupes de cerveaux de rat coupées au cryostat car une transformation rigide suffit à superposer correctement une coupe sur la suivante. Les transformations affines avec davantage de degrés de liberté (cisaillement, échelle) peuvent s'avérer risquées en raison de la propagation abusive de correction (tendance à rendre cylindrique ce qui ne l'est pas forcément). Les transformations non linéaires présentent les mêmes inconvénients sans que l'apport en termes de mise en correspondance ne justifie de façon évidente cette difficulté.

## La mise en correspondance de blocs

Pour aligner le volume global, chaque coupe est recalée avec la coupe précédente. La transformation rigide est estimée grâce à une méthode basée sur la mise en correspondance de blocs et utilisant le coefficient de corrélation comme critère de similarité local comme décrit dans [ORS<sup>+</sup>01]. Cette méthode est particulièrement efficace pour le recalage affine de coupes histologiques en particulier grâce à la robustesse de son estimation, basée sur le principe des moindres carrés triés (voir Annexe A pour plus de détails sur la méthode utilisée). Une coupe particulière est choisie comme référence : il convient de sélectionner pour cela une coupe de bonne qualité, horizontale et située à peu près au centre de l'image et au centre du volume. La transformation entre chaque coupe et la coupe de référence est ensuite calculée par composition des transformations successives, d'où l'intérêt de choisir comme référence une coupe qui limite le nombre de compositions dans les 2 sens. Cette transformation composée est utilisée pour rééchantillonner une seule fois l'image de chaque coupe et constituer un volume anatomique spatialement cohérent (voir **Figure 2.5**). La composition des transformations peut occasionner la propagation d'une erreur de recalage. Cependant, compte tenu du très faible pourcentage d'erreurs de cette méthode particulière sur des jeux de coupes de qualité correcte, et en cas d'absence de modalité de référence géométrique, cette façon d'opérer reste la plus efficace. Dans le cas rare d'erreur de recalage entre deux coupes, il suffit de recalculer le recalage ayant échoué seulement, en affinant les paramètres, puis de recomposer les transformations à partir de la coupe considérée.

### 2.2.2 Co-alignement des coupes autoradiographiques

Nous allons nous intéresser à présent à la reconstruction 3D du volume fonctionnel constitué des coupes d'autoradiographie.



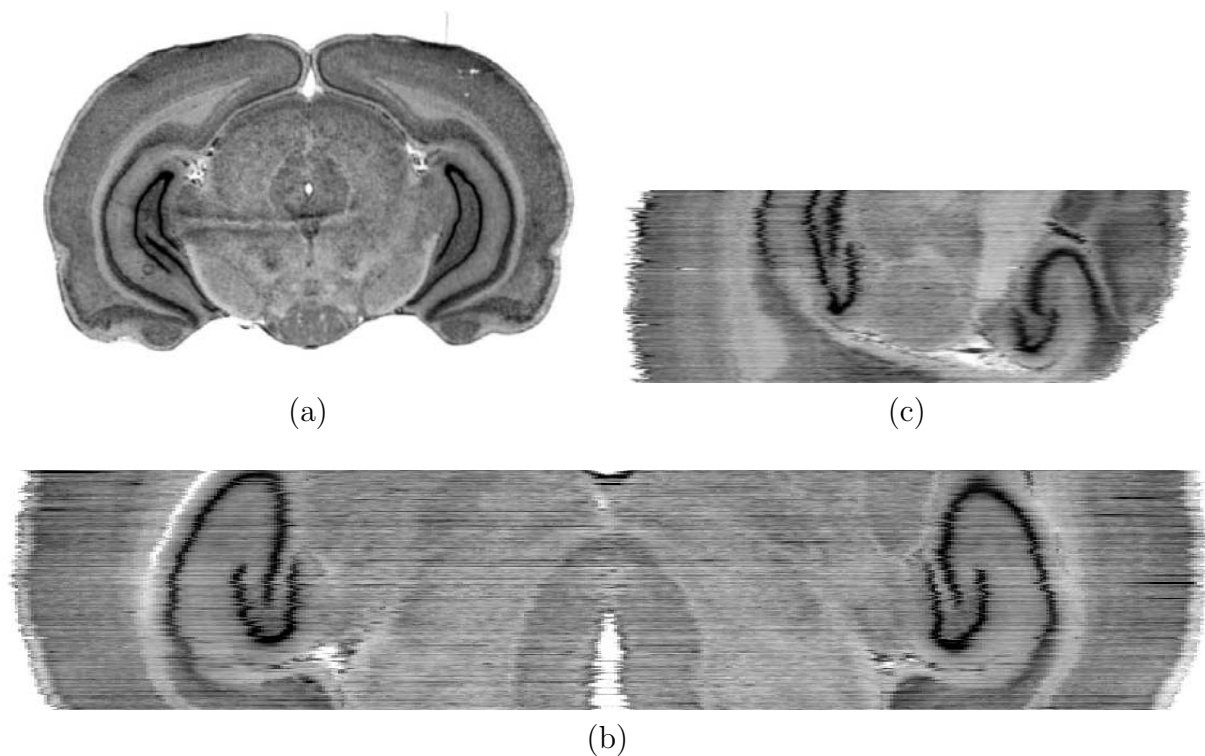


FIG. 2.5 – Vue du volume anatomique crésyl violet aligné en incidence initiale de coupe coronale (a), puis en incidence virtuelle axiale (b) et sagittale (c). Seule la partie du cerveau correspondant à la région du colliculus a été traitée.

### Absence de référence géométrique

En l'absence de référence géométrique, l'alignement d'une série de coupes 2D par propagation ne reflète pas exactement la géométrie du cerveau dans sa configuration *in vivo*. En effet, l'information de courbure du cerveau perpendiculairement au plan de coupe semble se perdre dans la discrétisation 2D. Cela entraîne une reconstruction "plate" du cerveau : c'est le "problème de la banane" décrit par [MBNV04] (tendance de la reconstruction sans référence géométrique 3D à reconstruire une banane en cylindre). De plus, tout écart du plan de coupe par rapport au plan coronal théorique (perpendiculaire au plan médian sagittal) a tendance à entraîner une légère déformation assimilable à un cisaillement tridimensionnel. Enfin, le résultat final d'une reconstruction 3D par propagation va dépendre fortement de la méthode utilisée mais également de la modalité, c'est-à-dire de l'information disponible dans les coupes. En effet, la méthode de mise en correspondance utilisée se base sur l'image entière pour estimer la transformation, et non pas seulement sur les contours.

Comme la mise en correspondance avec une modalité *in vivo* n'est pas réalisée, ce problème en soi ne serait pas vraiment gênant si l'on ne s'intéressait uniquement qu'à une seule modalité. Mais le but de l'étude est l'exploitation conjointe de données histologiques anatomo-fonctionnelles et donc cette variabilité pose problème. En effet, même en prenant la même coupe de référence et sachant qu'il s'agit exactement des mêmes coupes physiques, l'alignement indépendant des coupes autoradiographiques ne donnera pas le même résultat que l'alignement des coupes marquées au crésyl violet. Réutiliser pour reconstruire le volume fonctionnel les mêmes transformations que celles calculées pour le volume anatomique n'est pas non plus possible. En effet, même si ce sont les

mêmes coupes physiques, les coupes autoradiographiques ne sont pas extraites dans la même configuration que les coupes d’histologie marquée.

## L’anatomie comme référence

Pour pallier cette difficulté, nous optons pour une stratégie légèrement différente de celle décrite précédemment pour reconstruire le volume de coupes autoradiographiques. Nous allons procéder au **co-alignement** des coupes autoradiographiques avec les coupes histologiques marquées. c’est-à-dire que le volume aligné de coupes histologiques marquées va servir de référence, et chaque coupe autoradiographique va être directement recalée sur la coupe anatomique alignée correspondante, qui est en fait la même coupe physique.

De cette façon, le volume autoradiographique obtenu est directement aligné puisqu’il est rendu semblable à un volume cohérent de référence. Cette méthode de co-alignement donne des résultats de mise en correspondance anatomo-fonctionnelle beaucoup plus précis qu’un alignement indépendant des coupes autoradiographiques suivi d’un recalage 3D des volumes anatomiques et fonctionnels.

En effet, comme les mêmes biais de recalage décrits ci-dessus sont reportés, la géométrie tridimensionnelle pour les deux volumes est la même d’une part, mais cette méthode offre de surcroît une superposition anatomo-fonctionnelle optimale coupe à coupe (voir **Figure 2.6**). Ce dernier point est particulièrement intéressant pour l’analyse des données comme nous allons le voir dans la partie suivante.

## Précision du recalage

En ce qui concerne la précision des recalages effectués pour l’alignement et le coaligement, ce sont des recalages rigides réalisés par la méthode de mise en correspondance de blocs utilisant le coefficient de corrélation comme mesure de similarité. Il a été montré dans [Our02] que la précision de recalage rigide de coupes histologiques de cette méthode était subvoxelique pour la translation et commettait jusqu’à un angle de 28 degrés une erreur en rotation quasi-nulle. Cet algorithme grâce à son analyse locale et aux estimateurs robustes est particulièrement bien adapté au recalage de coupes histologiques avec des différences anatomiques locales. Nous avons retrouvé avec notre implémentation de la méthode sur des données simulées (translation et rotation connue) une précision équivalente. Il reste cependant délicat de tirer des conclusions quantitatives sur des données pour lesquelles il n’existe pas réellement de transformation idéale, comme deux coupes successives de cerveau (cas de l’alignement), ou la même coupe représentée sous deux modalités différentes (cas du coaligement). L’examen visuel quantitatif par fusion de l’image de référence et de l’image recalée reste la solution la plus efficace, bien que peu objective.

## 2.3 Analyse 3D des données *post mortem*

Nous avons obtenu grâce aux traitements précédents un volume anatomique et un volume fonctionnel alignés et recalés entre eux. Nous proposons à présent une méthodologie d’analyse de portée générale tirant profit de ces traitements.

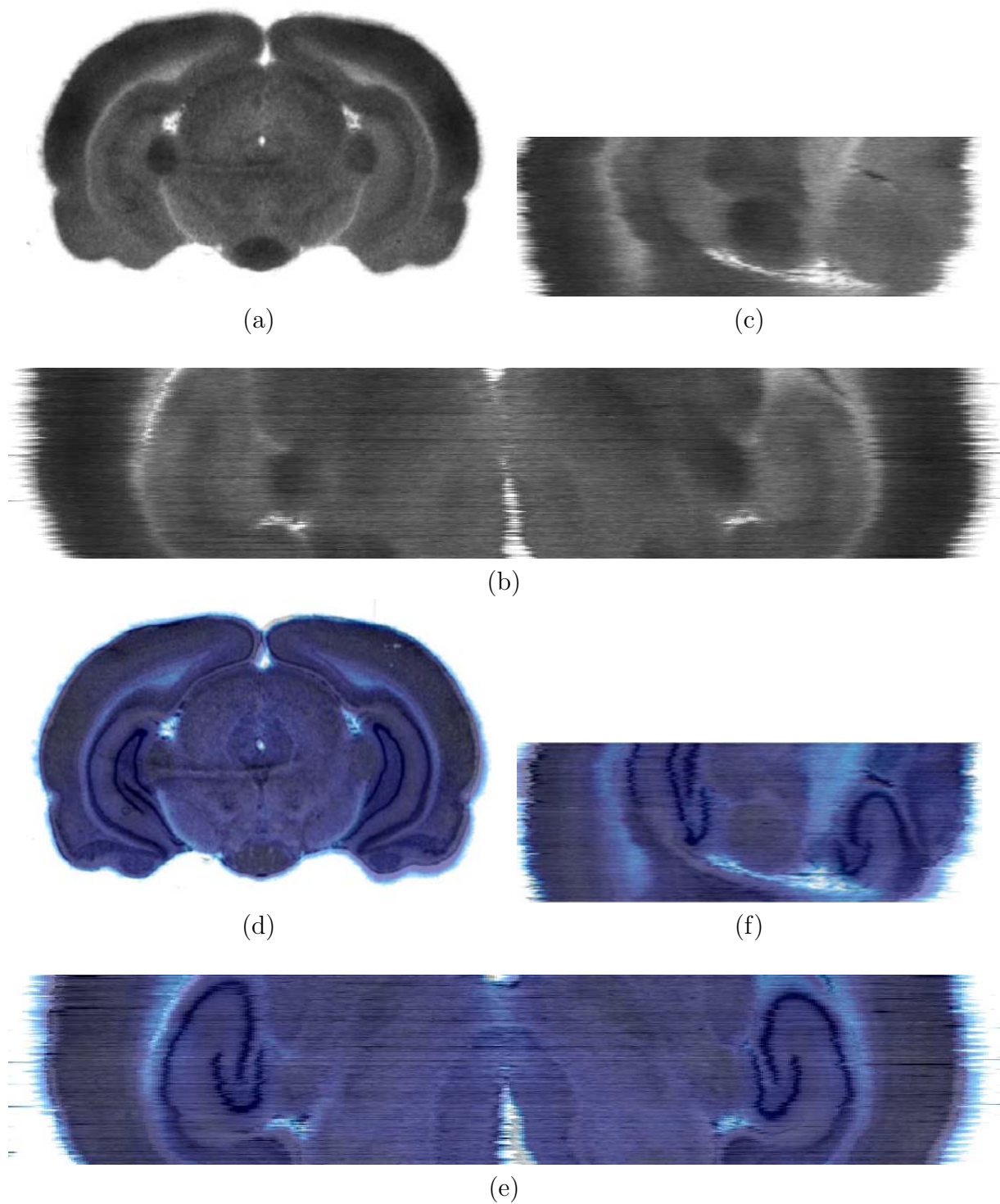


FIG. 2.6 – Vue du volume fonctionnel autoradiographique coaligné respectivement seul et en fusion avec le volume anatomique aligné (autoradiographies en fausses couleurs bleutées en fusion) en incidence initiale de coupe coronale (a) et (d), puis en incidence virtuelle axiale (b) et (e) puis sagittale (c) et (f). Seule la partie du cerveau correspondant à la région du colliculus a été traitée.

### 2.3.1 Conversion de l'image fonctionnelle

Afin de pouvoir analyser correctement les données d'autoradiographie, il est nécessaire avant tout de convertir les niveaux de gris, directement liés à la densité optique des tissus,

en paramètres physiologiques, à savoir la consommation de glucose qui est déduite de l'activité radioactive.

### Relation densité optique - activité

L'activité, exprimée en nCi/g, est liée empiriquement à la densité optique par une relation polynomiale d'ordre 4. Grâce à des standards d'activité présents sur le film scanné (voir **Figure 2.7** (a) ), nous évaluons automatiquement le meilleur polynôme d'interpolation aux moindres carrés de la façon suivante.

Notons  $m_i, 1 \leq i \leq n$  les moyennes des niveaux de gris dans chacun des  $n$  standards ( $n=16$  dans notre cas), et  $A$  la matrice des puissances de  $m_i$  de dimensions  $m \times p$ , où  $p$  est le degré du polynôme plus 1 ( $p=5$  dans notre cas) et de terme général  $a_{i,j} = m_i^{j-1}$  (matrice de Vandermonde non carrée).

Notons encore  $b$  le vecteur de taille  $n$ , de terme général  $b_i$  correspondant à l'activité connue de chaque standard. Si l'on désigne par  $x$  le vecteur colonne de taille  $p$ , de terme général  $x_j$  représentant les coefficients du polynôme  $P$  de degré 4, on cherche à résoudre l'équation :

$$Ax = b$$

en minimisant l'écart quadratique  $\|Ax - b\|^2$ . La solution est fournie en utilisant la pseudo inverse de  $A$  par :

$$x = (A^T A)^{-1} A^T b$$

Si  $A$  est de rang  $r < p$ ,  $(A^T A)$  n'est pas inversible mais il est possible de ne garder que les  $r$  valeurs singulières non nulles pour constituer une matrice de taille  $r \times r$  inversible et proposer une solution dans tous les cas. Le polynôme  $P$  trouvé est tel que :

$$\forall m \in \mathbb{R}, P(m) = \sum_{j=1}^p x_j m^{j-1}$$

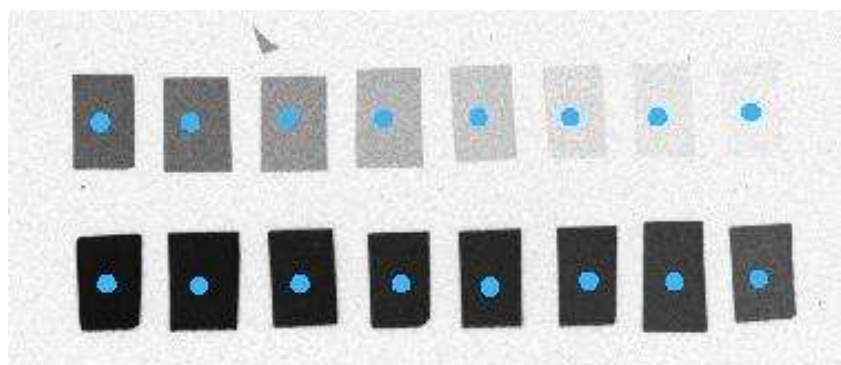
Il permet la conversion de l'image en activité (voir **Figure 2.7** (b) ).

### Consommation de glucose

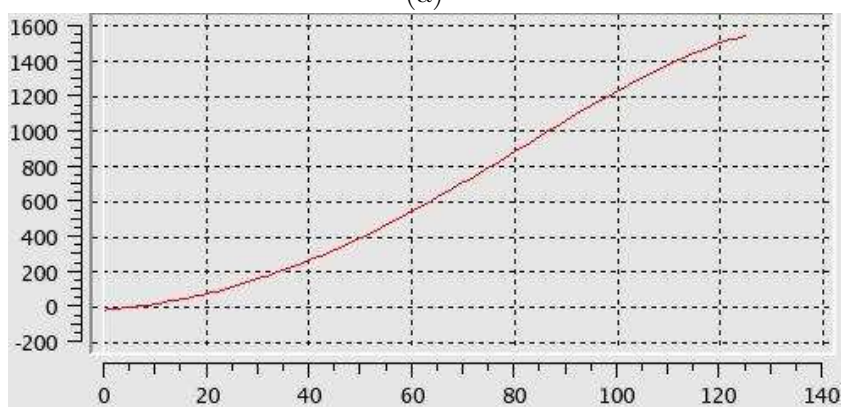
Il existe ensuite une relation linéaire sous certaines conditions respectées dans cette étude, dont les coefficients sont déterminés par l'équation de [Sok80] grâce aux prélèvements effectués pendant l'expérience, qui permet de passer de l'activité à la consommation de glucose (voir **Figure 2.7** (c) ). Cette conversion est indispensable pour comparer les animaux entre eux ou pour confronter les résultats avec d'éventuelles études réalisées en microTEP par exemple. Après cette étape de conversion des images fonctionnelles, nous pouvons proposer une méthodologie d'analyse tridimensionnelle de données histologiques.

### 2.3.2 Segmentation manuelle des structures d'intérêt

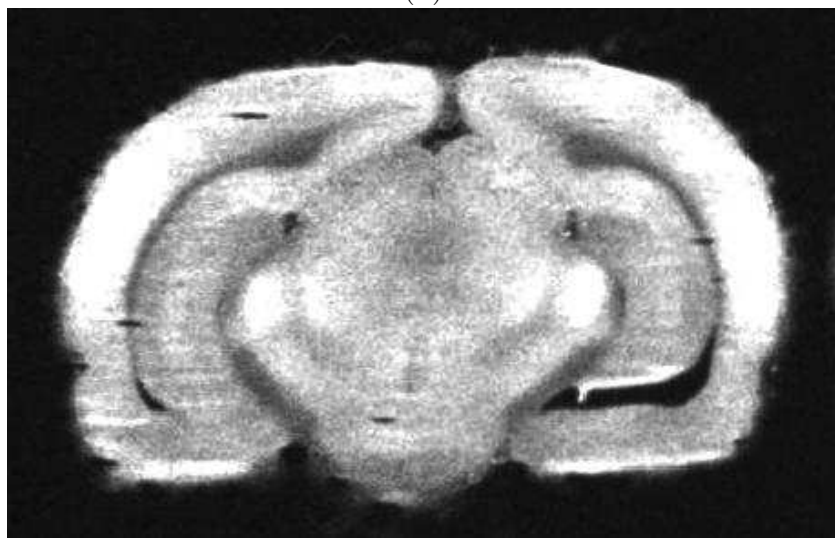
La première étape de l'analyse consiste en la segmentation manuelle par un expert en biologie des structures d'intérêt. Cette démarche est très générale lorsqu'il s'agit de traiter des données fonctionnelles, même *in vivo*.



(a)



(b)



(c)

FIG. 2.7 – Les standards d'activités avec la région d'intérêt pour le calcul de la moyenne du niveau de gris (a), le polynôme de degré 4 de conversion entre densité optique ( $\times 100$ ) et activité (nCi/g) (b) et une image autoradiographique convertie en consommation de glucose (c).

Dans l'étude particulière qui illustre ce chapitre à portée générale, les structures d'intérêt sont les colliculi supérieurs. Cette région anatomique précise constitue le principal relais visuel et c'est ici que la différence d'activité entre le colliculus activé et le colliculus contrôle (correspondant à l'oeil masqué) doit être particulièrement flagrante.

## L'objectivité anatomique

De façon à rendre l'étude la plus objective possible, la segmentation est réalisée sur la modalité anatomique, insensible à la stimulation (voir **Figure 2.8** (a) ). Cette segmentation est manuelle car elle demande un degré d'expertise important très difficilement automatisable : les régions d'intérêt sont considérées comme des données. Elle est réalisée sous le module de région d'intérêt du visualiseur d'images Anatomist ([RRC<sup>+</sup>03]). Le volume anatomique sur lequel la segmentation est effectuée est spatialement cohérent grâce à la reconstruction 3D réalisée au début de ce protocole. Cela implique que l'ensemble des régions délimitées dans le plan de coupe forment au final une grande région tridimensionnelle cohérente. Cela permet d'appréhender la forme du colliculus dans l'espace et d'aborder des questions morphométriques (voir **Figure 2.8** (b) ).

## L'information fonctionnelle

La modalité fonctionnelle contient l'information intéressante de l'expérience de stimulation, à savoir le degré d'activation dans les régions d'intérêt. Un autre avantage du protocole rongeurs réside dans le fait que, du fait du recalage coupe à coupe des volumes anatomique et fonctionnel entre eux, les régions obtenues sont directement applicables sur le volume fonctionnel (voir **Figure 2.8** (c) ). Ainsi, l'activité moyenne dans chaque colliculus peut être quantifiée et comparée pour évaluer l'importance de l'activation de manière globale.

### 2.3.3 Apports supplémentaires de la 3D

Les étapes suivantes, bien que généralisables, concernent notre étude particulière.

Le colliculus supérieur correspond à la région anatomique globale dans laquelle une activation est attendue lors d'une stimulation visuelle quelconque. Cependant, des zones spécifiques plus réduites au sein du colliculus supérieur sont spécifiquement activées lors d'une stimulation visuelle particulière comme celle de cette étude.

#### Sous-région activée

Il apparaît effectivement une sous-région de la région d'intérêt globale spécifiquement activée sur la coupe axiale fonctionnelle du volume reconstruit de la **Figure 2.9** (a) ). Pour parvenir à l'extraire, nous procédons de la façon suivante : sur le colliculus contrôle que l'on suppose être à l'état basal, l'activité moyenne  $m$  et l'écart type associé  $\sigma$  sont estimés. Partant d'une règle couramment utilisée par les chercheurs en biologie, nous définissons dans le colliculus correspondant à l'oeil non masqué la zone significativement activée durant cette stimulation comme l'ensemble des voxels dont l'activité est supérieure à  $m + 2\sigma$ . La région obtenue est régularisée par des opérations de morphologie mathématique (ouverture) et seule la composante connexe la plus importante est conservée.

#### Sous-région analogue par symétrisation

Pour obtenir la région la plus similaire dans le colliculus contrôle, nous "retournons" le colliculus activé en opérant une symétrie planaire par rapport au plan séparant l'image en



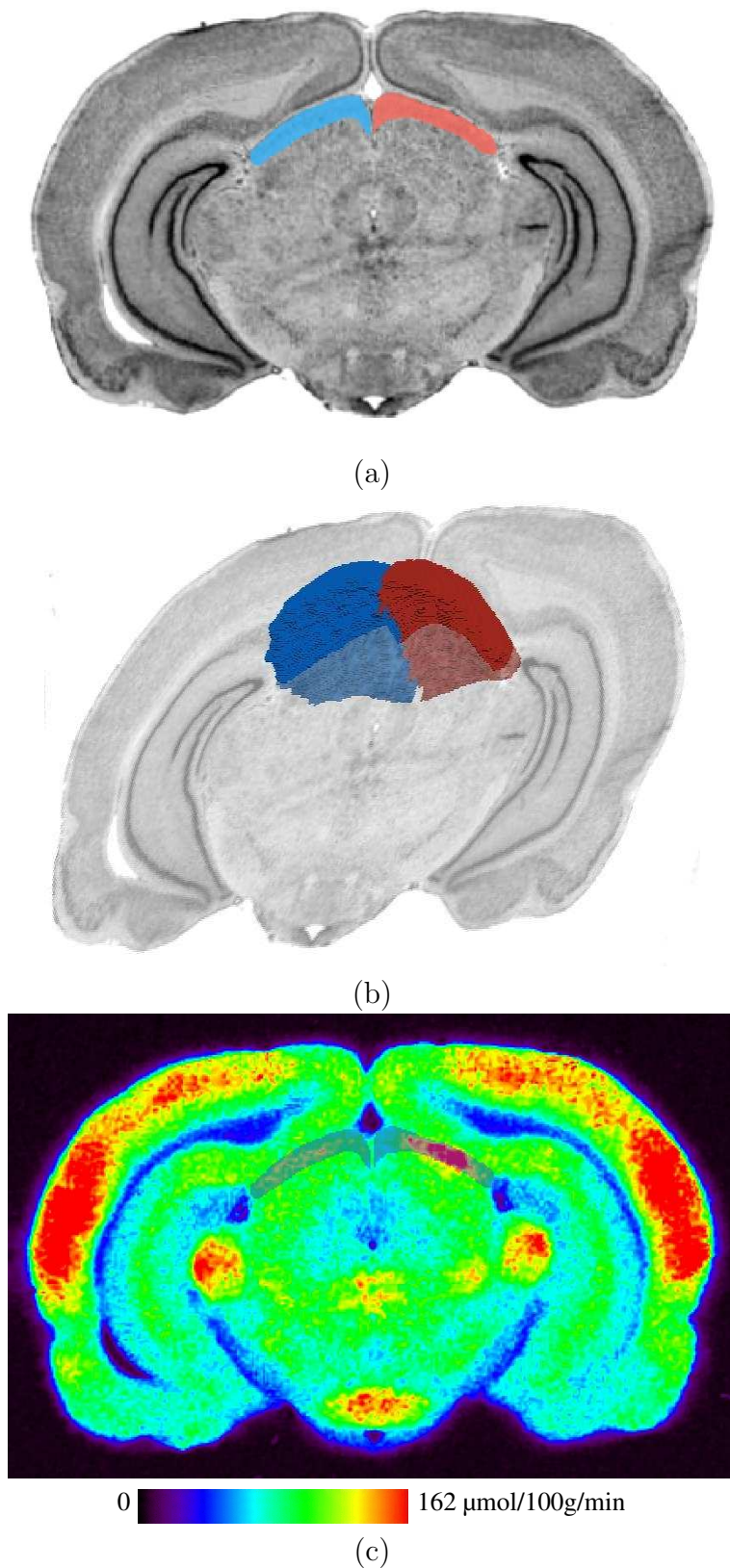


FIG. 2.8 – La segmentation manuelle du colliculus supérieur réalisée sur les coupes marquées au crésyl violet (a), la cohérence tridimensionnelle de la segmentation grâce à l'alignement préalable du volume anatomique (coupe inclinée semi transparente en (b) ) et le report direct de la segmentation sur les coupes autoradiographiques converties en consommation de glucose en fausses couleurs arc en ciel (c). La suractivation du colliculus correspondant à l'oeil non bandé stimulé est visible à droite.

deux parties égales ( $x = \dim X/2$ ). Cette opération permet de changer la chiralité du colliculus activé par effet miroir, c'est-à-dire de le retourner de telle manière qu'il ait l'aspect du colliculus contro-latéral contrôle. Le colliculus ainsi retourné est ensuite recalé rigide-ment en 3D avec le colliculus contrôle, ce qui permet de définir dans ce dernier une région symétrique de la région obtenue précédemment (voir travaux de [POA02] concernant la recherche du plan médian sagittal). Les deux régions obtenues de cette façon correspondent a priori à la même zone spécifique des neurones potentiellement activés dans chaque colliculus au cours de la stimulation visuelle particulière subie (écran en rotation). Ces deux sous-régions sont présentées en **Figure 2.9** b) et c). La technique décrite revient en fait à déterminer le plan inter-hémisphérique puis à effectuer une symétrie axiale par rapport à ce plan.

## 2.4 Résultats quantitatifs

L'ensemble des traitements du protocole rongeurs présenté dans ce chapitre ont été menés avec succès sur les 5 rats de l'étude portant sur le colliculus fournissant un ensemble de résultats présentés ci dessous.

### 2.4.1 Résultats morphométriques

La segmentation réalisée sur la reconstruction 3D anatomique ainsi que la définition de la sous-région activée et de sa symétrique réalisée sur le volume fonctionnel permettent d'accéder à des paramètres sur le volume et la forme des régions d'intérêt qui sont rassemblés dans le **Tableau 2.1**. Les volumes sont calculés en dénombrant les voxels constituant une région, connaissant les dimensions d'un voxel. Les formes sont appréciées visuellement. Ce tableau présente deux types de résultats : des résultats morphométriques purement anatomiques concernant le volume de la région du colliculus d'une part, et des résultats morphométriques concernant la taille de l'activation. Concernant les résultats anatomiques, notons que les volumes des colliculus droit et gauche sont proches, ce qui confirme la relative symétrie de cette structure. Les valeurs pour tous les rats sont assez proches, ce qui est logique étant donné que les animaux sont choisis très semblables. Concernant les volumes d'activation, notons qu'ils varient sensiblement entre les différents rats. Les volumes des zones d'activation droite et gauche ne sont pas exactement identiques, bien qu'elles soient obtenues par symétrie l'une de l'autre, du fait du rééchantillonnage d'une part, et du fait du masquage de la zone d'activation par la région du colliculus d'autre part. En effet, la zone d'activation symétrisée peut dépasser du colliculus dans certains cas, car les colliculus ne sont pas rigoureusement symétriques.

### 2.4.2 Résultats sur la consommation de glucose

Les mesures ont été réalisées dans les différentes régions sur la modalité fonctionnelle permettant d'obtenir les résultats présentés dans le **Tableau 2.2**. Ces résultats sont assez stables d'un animal à l'autre. Les différences d'activation entre les colliculus droit et gauche ne semblent pas ressortir de façon évidente, alors qu'elles semblent beaucoup plus marquées entre les zones d'activation droite et gauche extraites. C'est ce que nous confirment les ratios calculés ci-dessous.



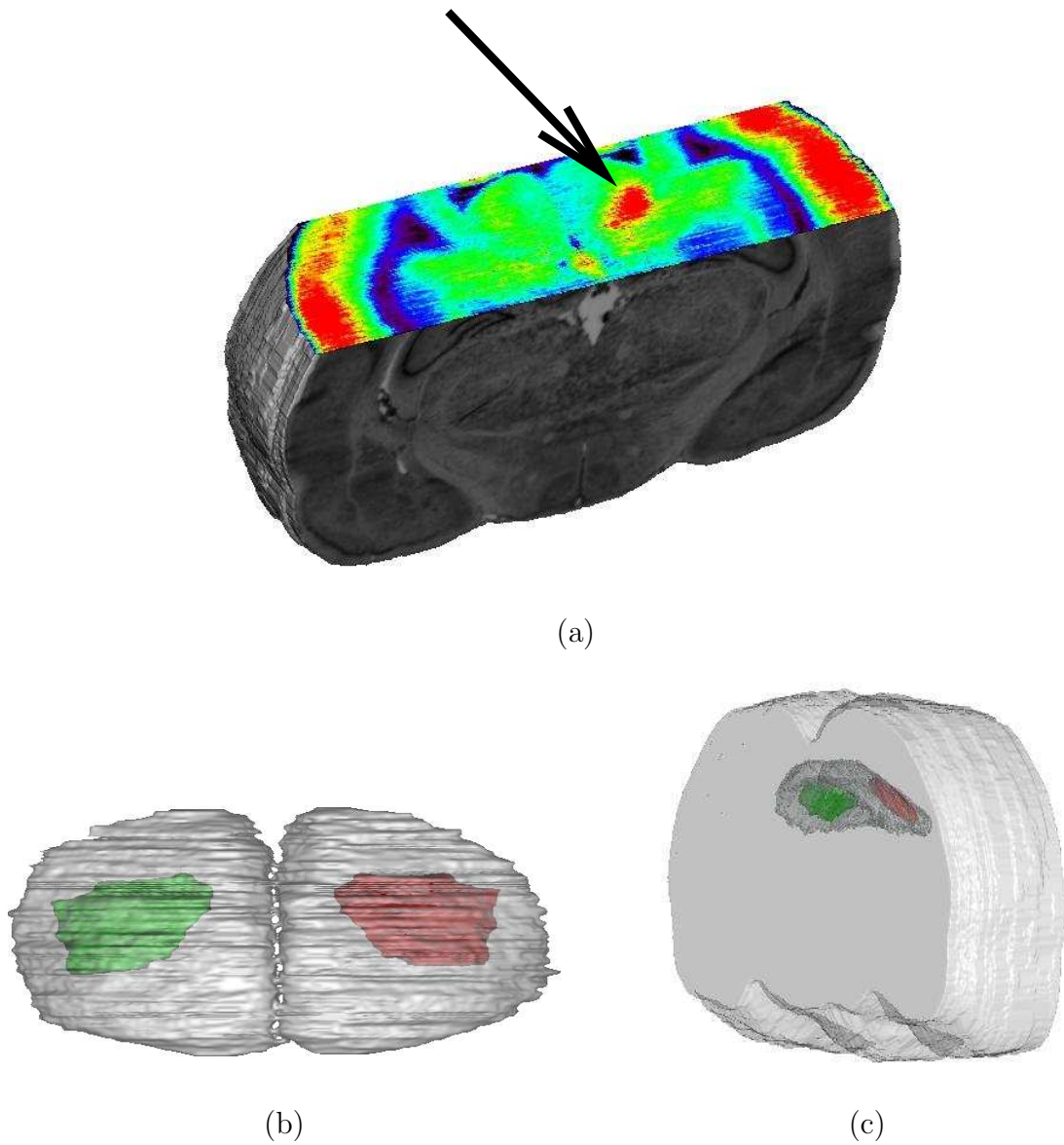


FIG. 2.9 – Sur le rendu volumique du cerveau tronqué au niveau du colliculus (texture extérieure : crésyl violet, texture du plan tronqué : autoradiographie en fausses couleurs arc en ciel), la zone d'activation significative (fléchée) correspondant à la stimulation est bien visible (a). A l'intérieur du rendu tridimensionnel de la région segmentée du colliculus supérieur (en gris semi-transparent), cette zone d'activation significative est extraite (en rouge), et symétrisée automatiquement dans le colliculus contro-latéral (en vert) (b). Les mêmes régions replacées à l'intérieur du rendu volumique global de la partie du cerveau traitée (c).

	Volume CS gauche ( $mm^3$ )	Volume CS droit ( $mm^3$ )	Volume zone d'activation gauche ( $mm^3$ )	Volume zone d'activation droite ( $mm^3$ )
Rat 1	4.19	4.16	0.47	0.51
Rat 2	3.54	3.47	0.56	0.57
Rat 3	3.39	3.72	0.22	0.37
Rat 4	3.66	3.88	0.10	0.11
Rat 5	3.29	3.31	0.28	0.33
Moyenne	3.62	3.71	0.33	0.38
Écart type	0.35	0.34	0.19	0.18

TAB. 2.1 – Tableau représentant le volume des colliculus supérieurs (CS) droit et gauche ainsi que le volume des zones droite et gauche extraites correspondant à la stimulation.

	Consommation de glucose CS gauche ( $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$ )	Consommation de glucose CS droit ( $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$ )	Consommation de glucose zone d'activation gauche ( $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$ )	Consommation de glucose zone d'activation droite ( $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$ )
Rat 1	120.37	119.58	126.48	162.49
Rat 2	105.44	109.68	112.53	149.68
Rat 3	114.01	107.10	127.49	157.52
Rat 4	102.58	102.93	117.59	154.12
Rat 5	132.59	133.73	147.08	172.42
Moyenne	115.00	114.60	126.23	159.24
Écart type	12.09	12.32	13.22	8.73

TAB. 2.2 – Tableau représentant la consommation de glucose des colliculus supérieurs (CS) droit et gauche ainsi que des zones droite et gauche extraites correspondant à la stimulation.

### 2.4.3 Ratio d'activation

Le **Tableau 2.3** enfin présente le rapport entre l'activité du colliculus correspondant à l'oeil vigile et l'activité du colliculus correspondant à l'oeil masqué, ainsi que le rapport entre l'activité de la sous-région activée du colliculus droit par rapport à l'activité de la sous-région symétrique. Comme on peut le voir dans ce tableau, l'activation spécifique moyenne liée à la stimulation visuelle de notre étude est de l'ordre de 26%.

	Ratio (%) d'activation du CS droit par rapport au CS gauche	Ratio (%) d'activation de la zone extraite du CS droit par rapport à celle du CS gauche
Rat 1	-0.66	28.47
Rat 2	4.02	33.02
Rat 3	-6.06	23.56
Rat 4	0.34	31.06
Rat 5	0.86	17.22
Moyenne	-0.36	<b>26.67</b>
Écart type	3.65	3.18

TAB. 2.3 – *Tableau final représentant le pourcentage d'activation du CS droit par rapport au CS gauche ainsi que celui de la zone extraite du colliculus correspondant à l'oeil non masqué par rapport à la zone contrôle symétrisée dans le colliculus correspondant à l'oeil masqué (les valeurs négatives indiquent une inactivation). Le ratio d'activation moyen (en gras) est de l'ordre de 26%.*

## 2.5 Discussion

### 2.5.1 Un protocole automatisé

Le protocole présenté dans cette partie a donc permis de mettre en place et de valider un modèle d'activation d'une région en proposant des méthodes de quantification et d'analyse tridimensionnelle précises et novatrices. Des résultats tant morphométriques que fonctionnels ont pu être obtenus grâce à ce protocole. Il a donné lieu aux communications [DDH<sup>+</sup>05b] et [DDH<sup>+</sup>05a].

#### Brainvisa

Comme nous l'avons vu précédemment, l'obtention des volumes anatomiques et fonctionnels recalés est réalisée de façon automatique en partant des images de colonnes de lames brutes sortant du scanner. Seule l'étape de segmentation des colliculus sur la modalité anatomique est manuelle, le reste des traitements est automatique et indépendant de l'opérateur, ce qui assure la reproductibilité et l'objectivité des résultats.

Cette automatisation laisse envisager un traitement en série d'une population correspondant à une étude. Pour un traitement facilité et une utilisation par les spécialistes en traitement d'images mais également par les chercheurs en biologie, il est nécessaire de rechercher une solution permettant de lancer un ensemble de traitements de façon aisée et conviviale. Le logiciel *Brainvisa* répond à ces attentes.

*Brainvisa* est une plateforme de traitement d'images ([CMG<sup>+</sup>01]) libre. Une interface graphique permet à un utilisateur non expert de lancer des chaînes de traitement sur des séries d'images. Ces traitements sont réalisés via des appels à des briques logicielles qui sont enchaînées à la suite automatiquement pour réaliser une tâche globale.

## Portage

Des essais de portage sur *Brainvisa* des commandes décrites dans ce chapitre ont été réalisés, visant à automatiser l'analyse conjointe tridimensionnelle d'images anatomiques et fonctionnelles de coupes de rat. Les premiers résultats sont très encourageants. Une série de tests sur de grandes bases de données sont nécessaires pour vérifier et améliorer la robustesse de la chaîne de traitements, de façon à ce qu'elle puisse s'adapter au plus grand nombre de types de données possible. A terme, l'outil sera proposé à des communautés de biologistes de plus en plus larges dans le but de vulgariser l'étude tridimensionnelle des coupes histologiques qui ne sont pour le moment pas exploitées au maximum. Des analyses 3D conjointes de données anatomiques et fonctionnelles *post mortem* sont ainsi envisageables en séries à moyen terme.

### 2.5.2 Une analyse nouvelle

L'extraction de la sous-région d'activité significative dans le colliculus activé, connexe et conforme à ce qu'une analyse coupe à coupe laisse visuellement envisager sans pouvoir le visualiser, est rendu possible uniquement grâce à l'étude tridimensionnelle.

La définition ensuite d'une sous-région symétrisée non pas coupe à coupe, mais en 3 dimensions, permettant de s'affranchir des défauts d'orthogonalité du plan de coupe par rapport à l'axe antéro-postérieur du cerveau, n'est réalisable que grâce à la reconstruction tridimensionnelle (voir **Figure 2.9** (c) ).

Nous sommes parvenus à détecter clairement des différences d'activation entre la sous-région extraite du colliculus supérieur droit et la sous-région symétrique du colliculus supérieur gauche non détectables en considérant les régions entières (voir **Tableau 2.3**).

### 2.5.3 Des applications prometteuses

Cette étude sert d'expérience de référence pour d'autres études dont le but sera d'estimer l'effet de la perturbation de la production de certains neurotransmetteurs sur l'activation au niveau de la synapse. Ces perturbations reproduisent des mécanismes supposés intervenir dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. La validation ou l'infirmerie de ces hypothèses augmente la connaissance de la maladie rendant ainsi possible la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La mise en place de techniques permettant de détecter des différences fines d'activation est très importante. En effet, la plupart des maladies neurodégénératives se manifestent par des déficits énergétiques et donc des activations diminuées. Des mécanismes compensatoires se mettent en place dans le cerveau cependant, masquant jusqu'à des stades très avancés la maladie d'un point de vue comportemental, mais également d'un point de vue de l'imagerie au repos.

Il est possible de détecter par l'imagerie fonctionnelle plus finement et donc plus précocement un début de dégénérescence sur des images rendant compte d'une stimulation plutôt que représentant simplement l'activité basale. Étant donné qu'à l'heure actuelle, la plupart des traitements des maladies neurodégénératives stabilisent seulement l'état du patient, on comprend l'intérêt de pouvoir détecter des différences faibles d'activité pour déceler le plus tôt possible une anomalie.



# Chapitre 3

## Protocole Primates

Ce chapitre est dédié à la description d'un protocole de mise en correspondance de coupes histologiques avec l'imagerie in vivo adapté aux cerveaux de primates. Ce protocole consiste à reconstruire un volume 3D à partir de coupes histologiques 2D en se basant sur des photographies acquises lors de la coupe. Le volume histologique obtenu est ensuite corrigé des différences d'intensité inter-coupes et enfin est recalé avec l'IRM in vivo par déformation élastique. Ce protocole, appliqué à 2 babouins et un macaque, est utilisé pour amener des atlas du thalamus réalisés sur coupes histologiques chez ces animaux dans la géométrie de leur IRM. Une étude est également menée concernant la pertinence d'utilisation d'atlas d'un sujet particulier vers un sujet quelconque.

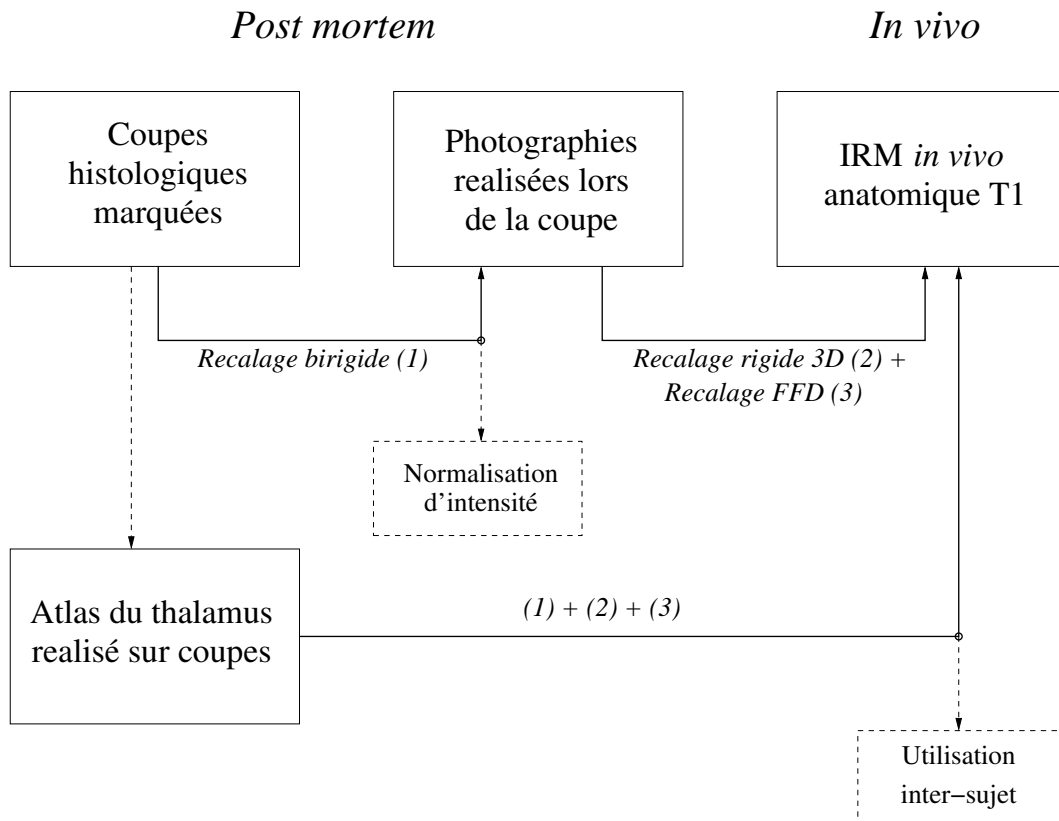


FIG. 3.1 – Les principales étapes de ce chapitre concernant la mise en correspondance in vivo et post mortem.

## 3.1 Présentation des données

### 3.1.1 Étude principale

#### La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui à partir d'un certain stade induit des déficits moteurs importants. Lorsque les médicaments ne sont pas ou plus efficaces pour limiter ces troubles, l'implantation d'électrodes est effectuée visant à stimuler électriquement le noyau sous-thalamique, une structure profonde et de petite taille des noyaux gris centraux. L'opération d'implantation est longue et délicate ce qui limite le nombre de cas traités par an.

#### L'étude de stimulation corticale

L'étude principale présentée dans cette partie concerne des essais de correction de ces troubles moteurs par stimulation corticale. Une électrode contrôlable de l'extérieur est placée à la surface du cerveau et les effets de cette stimulation sont étudiés. L'efficacité de ce traitement est testée sur des babouins rendus parkinsoniens par un modèle animal de la maladie et auxquels une électrode corticale est implantée. Différentes modalités d'imagerie *in vivo* sont réalisées au cours de l'étude : une IRM anatomique pondérée en T1, des TEPs avec différents marqueurs (FDG, eau marquée, A85) en conditions ON (électrode active) et OFF (électrode inactive). Divers autres examens sont également réalisés comme l'électrophysiologie. On pourra se référer à [DOB<sup>+</sup>04] pour une description détaillée du protocole.

#### Les coupes histologiques

A la fin de l'étude comportementale, les animaux sont sacrifiés, perfusés, et leur cerveau est extrait. Il est séparé en 3 blocs pour une fixation plus homogène puis il est coupé au microtome en tranches d'épaisseur 40 $\mu$ m, ce qui constitue environ 2300 coupes par cerveau. Les coupes sont recueillies dans des puits (petits réceptacles) qui fonctionnent par groupe de 18. Les coupes sont placées une à une dans les puits successifs du premier au dix huitième, puis la dix neuvième est replacée dans le premier puits et ainsi de suite jusqu'à ce que chaque puits compte 10 coupes. Les coupes d'un même puits sont donc espacées de 720 $\mu$ m (18\*40 $\mu$ m), ce qui est suffisant pour pouvoir les différencier et les réordonner a posteriori. Cette façon de procéder permet de pouvoir constituer plusieurs sous-jeux de coupes qui couvrent l'ensemble du cerveau, pour réaliser plusieurs marquages différents par exemple. Un sous-jeu d'une coupe sur 18 est ainsi extrait et marqué à l'acétylcholinestérase, marqueur spécifique des noyaux gris centraux, et au Nissl, marqueur des noyaux des cellules qui augmente le contraste matière grise/matière blanche. Une série d'environ 120 coupes histologiques marquées représentant le cerveau entier est ainsi constituée pour chaque babouin.

Nous avons appliqué l'ensemble des traitements présentés dans ce chapitre à 2 babouins de l'étude. Nous présenterons donc tous les résultats importants pour ces 2 babouins que nous appellerons babouins I et II, relativement à leur ordre chronologique de traitement.

### 3.1.2 Autres données traitées

Parallèlement à cette étude, nous présenterons également les résultats d'application de ce protocole, légèrement modifié pour le cas où l'intégralité des coupes histologiques du cerveau ne sont pas montées et marquées. Cette variante du protocole est très avantageuse lorsque la région d'intérêt est limitée à une partie du cerveau. C'est le cas pour cette seconde étude qui va illustrer cette partie, s'intéressant à la capacité de détection d'un ligand TEP dans la région du thalamus. Les données qui illustreront cette situation concerne un cerveau de macaque et sont très similaires à celles des cerveaux de babouins de l'étude principale : une IRM anatomique pondérée et T1, différents examens TEP, un jeu de 40 coupes histologiques centrées autour du thalamus et marquées à l'acétylcholinestérase et au Nissl.

Au total donc, 3 animaux, 2 babouins et un macaque, pour lesquels nous allons chercher à réaliser la mise en correspondance des images *in vivo* et *post mortem* afin de permettre une confrontation précise des informations apportées par les différentes modalités. Sauf mention explicite, les traitements sont réalisés pareillement pour les 3 animaux.

### 3.1.3 La modalité photographique

#### Le chaînon manquant

Nous allons décrire à présent une modalité qui ne constitue pas à proprement parler une modalité médicale ou biologique mais qui va servir d'intermédiaire entre les coupes histologiques marquées *post mortem* et l'IRM *in vivo*. Il s'agit de photographies du plan de coupe du bloc cerveau réalisées lors de la coupe au microtome. Un appareil photographique est placé verticalement au-dessus du plan de coupe et permet d'acquérir une image de la coupe juste avant le passage de la plateforme sous le couteau (voir **Figure 3.2 (a) et (b)** ).

#### Réalisation

La prise photographique est réalisée en butée de la course de la plateforme du microtome supportant le bloc ce qui assure le repositionnement à l'identique du bloc sous l'appareil après chaque coupe. Une photographie est prise systématiquement à chaque passage si bien qu'à chaque coupe histologique recueillie correspond sa photographie exactement (voir **Figure 3.2 (c) et (d)**). Le sous-jeu de photographies correspondant exactement aux coupes histologiques marquées extraites est ainsi constitué donnant lieu à un jeu d'environ 120 photographies par babouin avec une résolution isotrope de  $0.1mm$  dans le plan et un espace inter-coupes de  $0.72mm$ . Pour le macaque, le jeu comptait environ 160 photographies. Seuls ces sous-jeux de photographies correspondant aux coupes histologiques seront considérés et feront l'objet de traitements par la suite. Les autres photographies intermédiaires restent cependant bien sûr disponibles pour d'éventuelles études locales plus précises.

#### Constitution du volume photographique

Ces photographies numériques en couleurs sont converties en niveaux de gris (pour permettre leur conversion dans un format d'image adapté au traitement d'image) et sont empilées les unes sur les autres pour former une image tridimensionnelle. La prise des





(a)



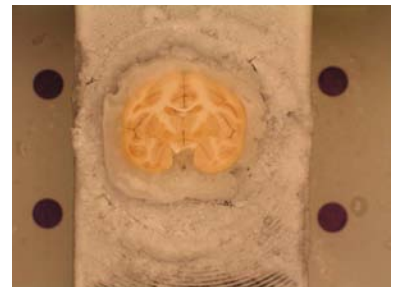
(b)



(c)



(d)



(e)

FIG. 3.2 – Le montage utilisé pour réaliser les photographies de la surface du bloc cerveau lors de la coupe au microtome en figures (a) et (b). Une photographie du plan de coupe réalisée avec ce montage pour le babouin I (c), pour le babouin II (d) et pour le macaque (e).

photographies exactement dans la même position de la plateforme coupe après coupe assure un alignement immédiat des photographies conforme à la géométrie du bloc cerveau avant sa coupe.

Seuls les recalages entre les 3 blocs du cerveau sont à réaliser. La tâche n'est pas triviale car inévitablement des coupes sont perdues entre les blocs ce qui entraîne que les faces en regard des blocs sont assez différentes. Un recalage automatique 2D avec des paramètres bien choisis permet cependant d'assurer au mieux la continuité entre les blocs pour former un cerveau complet (voir [COZ<sup>+</sup>00] pour un travail concernant le recalage des blocs de cerveau). L'hypothèse supposée vérifiée du parallélisme des plans de coupe entre les différents blocs est sous-jacente à ce recalage 2D : cette question intéressante mais difficile n'est pas abordée dans ce travail.

Les images sont ensuite segmentées pour ne laisser apparaître que la région d'intérêt correspondant au cerveau. Cette segmentation est manuelle car, avec le type de photographies dont nous disposons, le contraste entre le cerveau et l'extérieur est très faible, ce qui rend très difficile une segmentation automatique. Les contours externes du cerveau sont délimités puis la région intérieure est remplie automatiquement permettant par masquage d'obtenir une image représentant uniquement la coupe de cerveau (le fond est fixé à 0). Cette segmentation est réalisée sous le module de région d'intérêt du visualiseur d'images Anatomist ([RRC<sup>+</sup>03]). Nous obtenons les volumes photographiques présentés en **Figure 3.3** qu'il est possible d'observer sous une incidence quelconque, grâce à la reconstruction 3D.

On comprend alors l'intérêt de cette modalité qui présente les déformations tridimensionnelles propres aux données *post mortem* sans présenter la perte d'alignement coupe à coupe. De plus, la surface du cerveau présente beaucoup moins de déchirures et de déformations locales que la coupe histologique montée correspondante ce qui rend plus aisée l'estimation de la correction par rapport à l'IRM.

Le volume directement aligné obtenu, représentant les photographies de la surface du bloc cerveau au cours de la coupe, sera appelé volume photographique.

## 3.2 Le recalage des coupes histologiques avec les coupes photographiques

L'étape suivante consiste en l'alignement de l'ensemble des coupes histologiques marquées. Comme nous disposons du volume photographique, aligné par construction, dans sa géométrie initiale, nous allons effectuer le coalignement de l'image histologique avec le volume photographique. C'est-à-dire que nous allons chercher à recaler chaque coupe histologique marquée sur la photographie lui correspondant, de façon à propager ainsi la cohérence du volume photographique sur l'image histologique.

### 3.2.1 Un recalage rigide insuffisant

#### Le problème des hémisphères séparés

Contrairement au coalignement effectué dans le chapitre précédent concernant les rongeurs, une transformation rigide simple ne va pas suffire pour recaler correctement une coupe histologique sur sa photographie. En effet, par rapport au cerveau des petits animaux, les deux hémisphères du cerveau des primates se séparent sur une grande partie des coupes en deux composantes non connexes dans ses parties antérieure et postérieure (voir **Figure 3.4 (a)**).

Ainsi plus de la moitié des coupes se présentent en deux parties, qui ont été replacées sur la lame dans une configuration proche mais différente de celle du cerveau non coupé du bloc photographique de référence (voir **Figure 3.4 (b) et (c)**). Une transformation rigide globale ne convient donc pas pour ce recalage puisqu'elle permet de recaler au mieux un hémisphère correctement sur deux (voir **Figure 3.4 (d)**). En fait, même les coupes centrales qui sont d'un seul morceau présentent un déplacement indépendant de chaque hémisphère. En effet, le profond sillon médian (scissure inter-hémisphérique) courant sur les cerveaux très circonvolués comme celui du babouin fragilise la liaison et autorise une certaine liberté de mouvement de chaque hémisphère. L'ensemble des

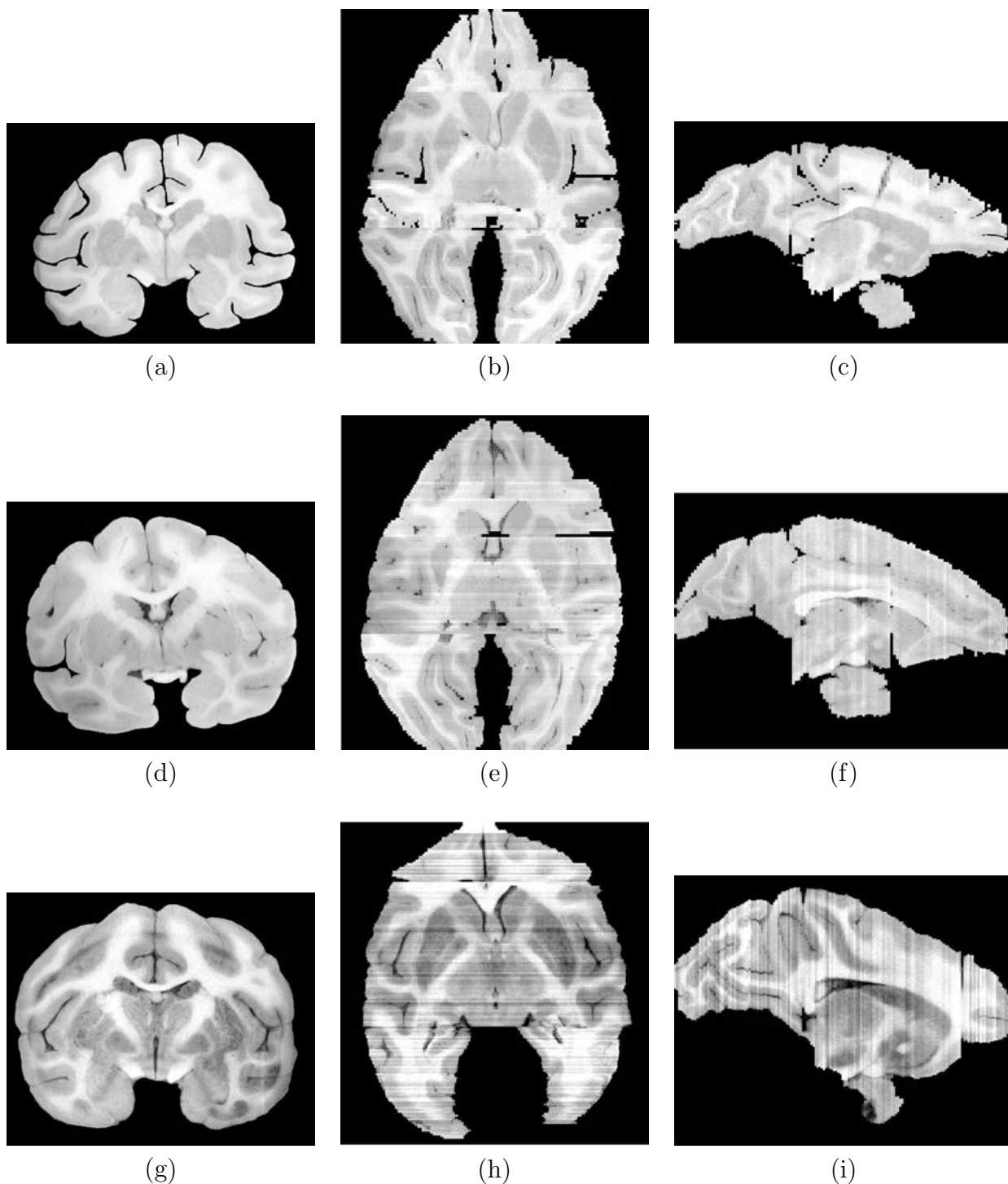


FIG. 3.3 – Le volume photographique obtenu après recalage des 3 blocs et après nettoyage des coupes pour ne laisser apparaître que le cerveau, respectivement pour les babouins I et II et le macaque, en incidence coronale de coupe (a), (d) et (g), axiale (b), (e) et (h), et coronale (c), (f) et (i).

autres sillons subissent des déformations locales propres également mais ces déformations concernent principalement la périphérie du cerveau, et non les structures centrales. Un travail intéressant visant à corriger spécifiquement ces mouvements locaux de girus sur un

hémisphère seul a été proposé par [PMBT03]. Une seule transformation affine avec plus de degrés de liberté (similitude, cisaillement) ne conviendrait pas pour autant, car une seule transformation ne permet pas de recalculer correctement dans le cas général 2 parties avec des déplacements différents. Il faudrait avoir recours à une transformation non linéaire très libre, donc très peu robuste<sup>1</sup>, pour résoudre ce problème. Or la robustesse est une condition essentielle pour rendre possible le coaligement automatique inter-modalité de plus de 120 coupes par animal, présentant chacune des artefacts.

### Nécessité d'une nouvelle transformation adaptée

C'est pourquoi nous avons développé une méthode adaptée qui identifie les deux hémisphères sur chaque coupe puis recherche simplement deux transformations rigide indépendantes, une pour chaque hémisphère. Nous appellerons cette transformation simplement "birigide". Cette méthode peut bien entendu s'étendre à la recherche de 2 ou plus transformations affines, et même plus généralement à n'importe quel type de transformation. L'idée est simplement de rendre indépendante la recherche des paramètres de transformation pour chaque hémisphère, ou toute autre entité ayant un mouvement propre. Nous avons cependant opté pour la classe des transformations rigides pour des raisons de robustesse et d'attention privilégiée portée au recalage des structures centrales du cerveau. Nous illustrerons ce point dans la partie suivante.

### 3.2.2 La transformation birigide

La méthode birigide comporte 3 étapes principales que nous allons décrire successivement.

#### La séparation automatique des coupes histologiques en 2 hémisphères

Que les deux hémisphères soient séparés ou non, nous utilisons la même stratégie. En effet, il arrive que parfois les coupes histologiques présentent plus de deux composantes connexes, et dans ce cas le rattachement des composantes connexes supplémentaires au bon hémisphère n'est pas évident. C'est pourquoi nous avons opté pour une stratégie de détermination d'une composante connexe dans chacun des deux hémisphères qui vont faire office de graines.

Pour cela, nous recherchons dans la coupe la ligne inter-hémisphérique, c'est-à-dire la ligne qui sépare le cerveau en deux parties les plus symétriques possibles. [POA02] ont proposé un algorithme spécifique de détermination du plan inter-hémisphérique en 3D que nous adaptons à notre problème, en repartant d'un logiciel de recalage standard. L'idée consiste à créer l'image symétrique de l'originale par rapport à la droite verticale centrale  $x = \text{dim}X/2$  (où  $\text{dim}X$  est la dimension de l'image selon  $x$ ), et de recalculer rigide la symétrique sur l'originale. L'hypothèse sous-jacente à cette symétrisation est que l'axe principal d'inertie de la coupe forme un angle avec l'horizontale inférieur à  $\pi/2$ , ce qui est toujours le cas dans les données que nous avons traitées. Ceci revient à dire que les coupes sont disposées plutôt horizontalement.

La transformation rigide obtenue s'exprime sous la forme d'une matrice de rotation  $R$  (rotation autour de l'origine) et d'une translation  $T$ . Nous cherchons la transformation

---

<sup>1</sup>Peu sensible à la variabilité des données ainsi qu'aux réglages des paramètres.

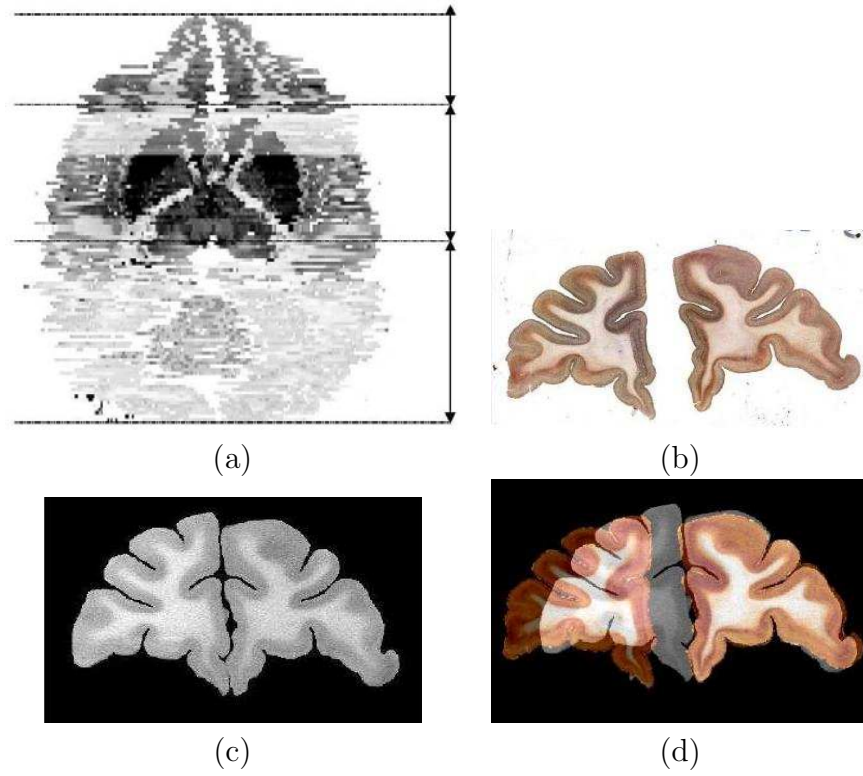


FIG. 3.4 – Vue en incidence axiale de l'ensemble des coupes histologiques superposées sans recalage : dans les parties antérieures et postérieures, les hémisphères sont séparés (a). En incidence coronale (incidence de coupe au microtome), une coupe histologique marquée de la partie antérieure du cerveau aux hémisphères séparés (b) et la photographie correspondante avec les hémisphères dans leur configuration originale (c). Le recalage rigide simple s'avère insuffisant pour superposer la coupe histologique sur la photographie correspondante : image de fusion (d) (histologie en fausses couleurs orangées).

"moitié", c'est-à-dire la transformation rigide (r,t) où r est la matrice de rotation et t le vecteur translation qui composée 2 fois avec elle-même redonne (R,T). Plus précisément, cela s'écrit (formules données en 3D, a fortiori valables en 2D) :

$$\forall x \in \mathbb{R}^3, Rx + T = r(rx + t) + t = r^2x + (Id + r)t$$

La décomposition d'une transformation rigide en une matrice de rotation et un vecteur translation étant unique, on a encore :

$$r^2 = R \quad (3.1)$$

$$t = (Id + r)^{-1}T \quad (3.2)$$

La solution r de 3.1 est la matrice de rotation de même axe que R et d'angle  $\theta/2$  si  $\theta$  est l'angle de la rotation R. L'axe de la rotation représentée par la matrice R est le vecteur propre normalisé associé à la valeur propre 1 de R, que l'on note  $\vec{n}$ . Les formules suivantes permettent de déterminer  $\theta$  :

$$\cos(\theta) = (\text{Trace}(R) - 1)/2$$

$$\sin(\theta) = -(R_{0,1} * n_z + R_{1,2} * n_x + R_{2,0} * n_y - 3 * (1 - \cos(\theta)) * n_x * n_y * n_z)$$

Nous pouvons alors exprimer r de la façon suivante, en notant  $c = \cos(\theta/2)$ ,  $s = \sin(\theta/2)$  et  $t = 1 - \cos(\theta/2)$  :

$$r = \begin{pmatrix} t * n_x^2 + c & t * n_x * n_y - s * n_z & t * n_x * n_z + s * n_y \\ t * n_x * n_y + s * n_z & t * n_y^2 + c & t * n_y * n_z - s * n_x \\ t * n_x * n_z - s * n_y & t * n_y * n_z + s * n_x & t * n_z^2 + c \end{pmatrix}.$$

Pour obtenir  $t$ , il suffit alors de résoudre 3.2, en sachant que  $(Id + r)$  est toujours inversible sauf dans le cas d'une rotation d'angle  $\pi$ , impliquant que l'angle double  $\theta$  vaille  $2\pi \equiv 0(2\pi)$ . Dans ce cas,  $R$  et  $r$  sont identiques et représentent en fait la transformation Identité (on a alors  $t = T/2$ ).

Si on applique la transformation rigide  $(r, t)$  trouvée à la droite  $x = \dim X / 2$ , on obtient effectivement la ligne inter-hémisphérique recherchée (voir **Figure 3.5 (a) et (d)**). Pour éviter que cette ligne ne sépare un hémisphère en plusieurs parties, une sécurité est prise en la dilatant, de façon à obtenir une bande large d'une vingtaine de voxels pour nos données. Cette bande sépare l'image en deux composantes connexes indépendantes au moins.

Nous extrayons alors les 2 plus grosses composantes connexes, qui vont constituer des graines (voir **Figure 3.5 (b) et (e)**). Ces graines sont ensuite dilatées à l'intérieur du masque binaire de la coupe complète à la manière d'une recherche de frontière par l'algorithme de Voronoï : nous obtenons l'image  $Vm$ , pour Voronoï avec masque. Cette technique respecte les frontières de la coupe dans son partitionnement mais ne traite pas les composantes connexes sans graine. C'est pourquoi nous effectuons également à partir des 2 graines initiales un partitionnement libre (sans contrainte de masque) : nous obtenons une seconde image  $Vl$ , pour Voronoï libre. Cette seconde technique associe un label non nul à tous les voxels de l'image mais ne respecte pas les frontières de la coupe. Nous créons donc une image spéciale à partir de ces 2 images précédentes, qui associe à chaque voxel du masque binaire de la coupe le label issu de  $Vm$  s'il existe, et le label de  $Vl$  sinon.

Cette méthode assure de partitionner l'image complète en 2 classes, de façon logique, c'est-à-dire en réunissant les parties proches dans la même classe (voir **Figure 3.5 (c) et (f)**). La recherche d'une transformation pour les petites composantes connexes supplémentaires serait possible mais risquerait de diminuer la robustesse de la méthode. En outre, ces cas sont relativement rares.

## Recherche des transformations

La recherche des transformations pour chaque hémisphère se déroule de la façon suivante.

**Initialisation globale** Un recalage rigide global est d'abord effectué entre la coupe histologique marquée et la photographie. Ce recalage exploite les propriétés robustes proposées par [Our02] pour la méthode de mise en correspondance de blocs utilisée, à savoir que la transformation estimée peut ne tenir compte que des "meilleurs" appariements.

En effet, une première transformation rigide est évaluée en prenant en compte la totalité des appariements disponibles, puis les appariements sont ordonnés par ordre croissant de résidus aux moindres carrés. Rappelons que le résidu  $r_i$  au carré est défini pour l'appariement de points  $(x_i, y_i)$  de la façon suivante, si on note  $(R, t)$  la transformation rigide trouvée de matrice de rotation  $R$  et de translation  $t$  :

$$r_i^2 = \|y_i - (R(x_i) + t)\|^2$$

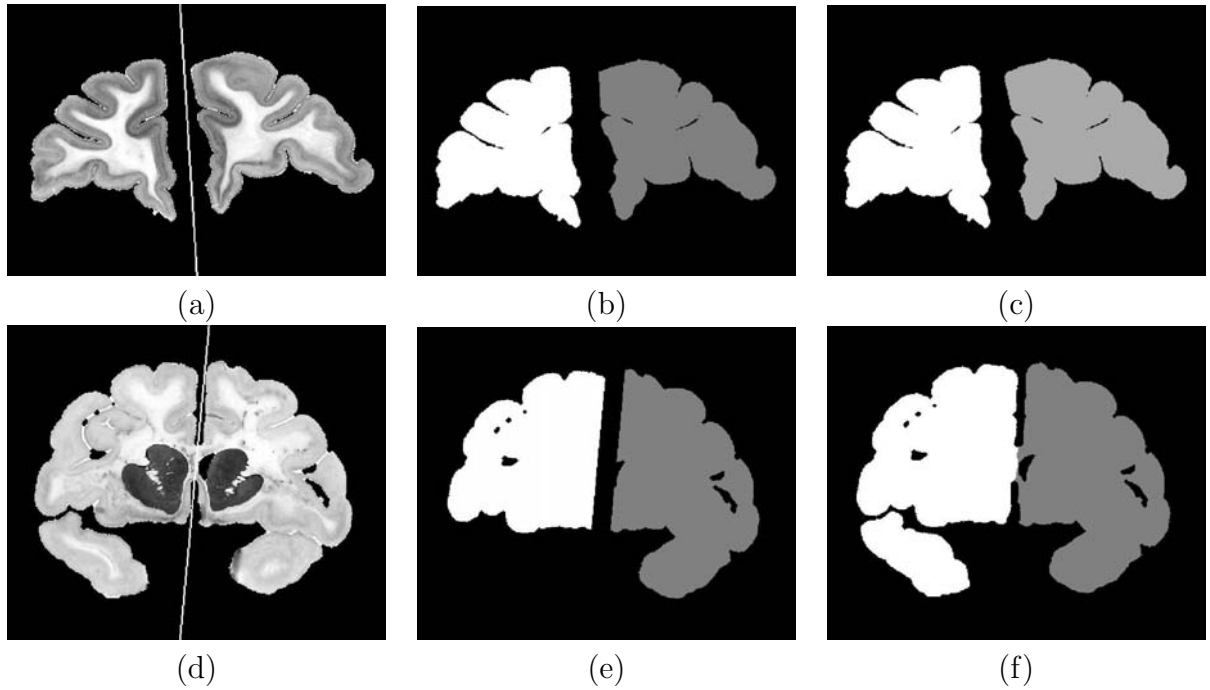


FIG. 3.5 – Détermination automatique de la ligne inter-hémisphérique respectivement sur une coupe histologique marquée aux hémisphères séparés et sur une coupe d'un seul morceau par la méthode décrite ci dessus (a) et (d), obtention de deux graines (b) et (e), et partitionnement de la coupe en deux parties correspondant aux hémisphères (c) et (f). La 3<sup>e</sup> composante connexe est bien associée au bon hémisphère sur l'image (f).

La transformation rigide est alors estimée une nouvelle fois mais en ne prenant en compte qu'une fraction de l'ensemble des appariements, ceux aux résidus les plus faibles. Ce schéma est itéré un certain nombre de fois (jusqu'à ce que la transformation estimée ne change plus, ou un nombre de fois fixe).

Initialement, cette stratégie robuste constituait une solution adaptée aux données histologique pour que le recalage ne soit pas perturbé par des appariements aberrants. En effet, le choix de la métrique  $L^2$  rend l'estimation sensible aux appariements aberrants car ils comptent d'autant plus qu'ils s'écartent de la solution recherchée. Ces "mauvais" appariements pouvant être dus soit à des erreurs de mise en correspondance de blocs, soit surtout dus au fait que dans les images histologiques, on trouve souvent des petites parties déplacées, des déchirures ou encore des parties manquantes qui perturbent le recalage, et en particulier l'estimation de la meilleure transformation rigide aux moindres carrés. Nous exploitons ici cette propriété pour que la transformation estimée favorise un des deux hémisphères, considérant l'autre comme aberrant, en fixant la fraction d'appariements conservés à 60% pour cette première étape. L'hémisphère conservé est en général le plus important en taille, ou celui qui est le plus similaire à l'hémisphère de la photographie sur lequel il doit être recalé (voir **Figure 3.6 (a)** ).

**Raffinement par hémisphère** Ensuite, la qualité du recalage de chaque hémisphère avec la transformation rigide globale est testée indépendamment, par calcul du coefficient de corrélation moyen entre l'hémisphère transformé et la photographie (voir **Figure 3.6 (b) et (c)** ). Le niveau de pyramide pour ce calcul est déterminé automatiquement : c'est le niveau précédent le passage de la plus petite dimension de l'image en dessous de



64 voxels. Ce niveau correspond empiriquement à une échelle adaptée pour apprécier la qualité du recalage de chaque hémisphère. L'hémisphère le mieux recalé sera désigné par  $H_1$ , et l'autre par  $H_2$ .

L'hémisphère  $H_1$  est alors transformé en masque binaire et utilisé pour faire disparaître sur la photographie la zone qu'il couvre, à savoir à peu près l'hémisphère correspondant comme on peut le vérifier sur la **Figure 3.6 (d)**. Un recalage est alors relancé entre l'hémisphère  $H_2$  de la coupe histologique et la photographie dont une partie est masquée. Le fait de cacher l'hémisphère  $H_1$  sur la photo va permettre le recalage de l'hémisphère  $H_2$  sur son équivalent sur la photographie (voir **Figure 3.6 (e)**). Il suffit ensuite d'utiliser l'hémisphère histologique  $H_2$  ainsi recalé pour cacher encore son correspondant sur la photographie, de façon à améliorer par une nouvelle estimation le recalage de l'hémisphère  $H_1$  (voir **Figure 3.6 (f)**). Ce schéma peut éventuellement être itéré mais tel qu'il est décrit, les résultats sont satisfaisants avec nos deux jeux de 120 coupes des babouins et le jeu de 40 coupes du macaque. A l'issue de ce processus, nous disposons d'une transformation rigide pour chaque hémisphère.

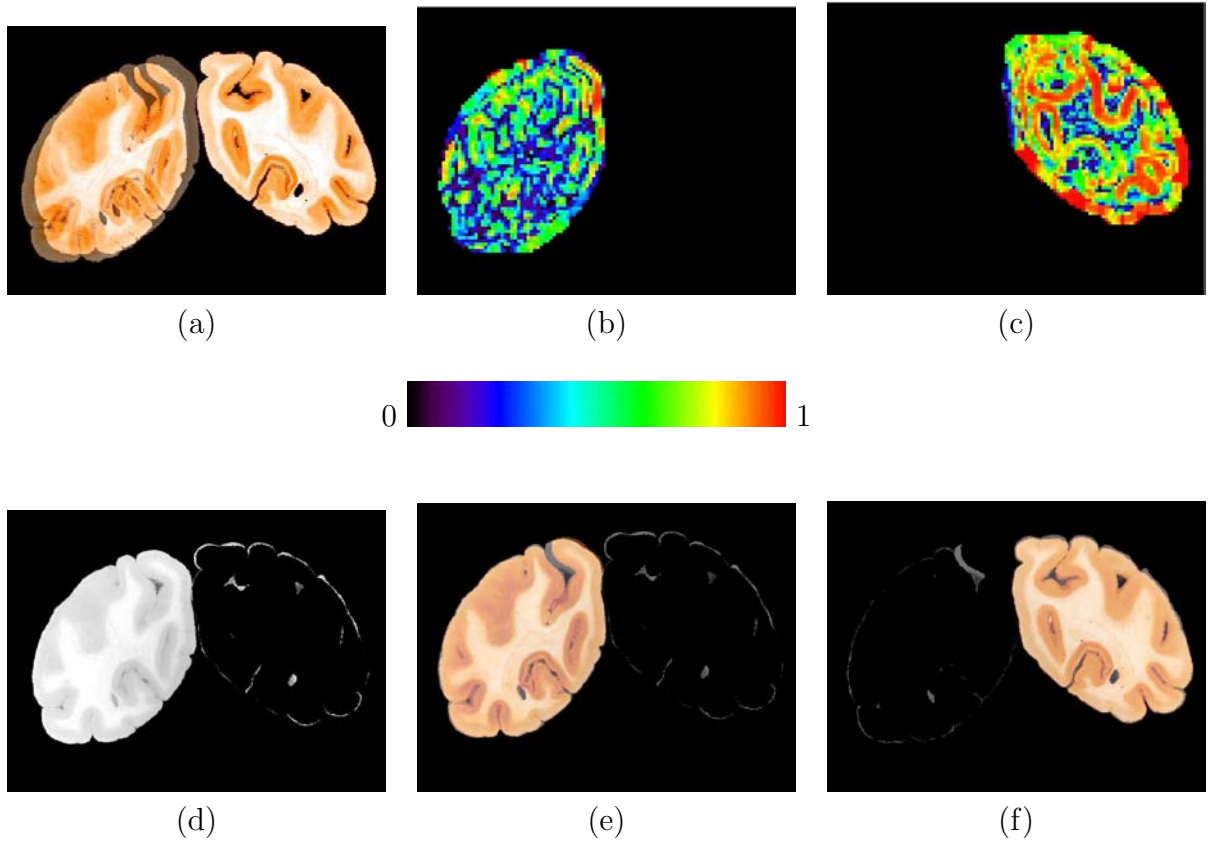


FIG. 3.6 – Image de fusion représentant la première étape de la méthode birigide : le recalage global (a). Les images (b) et (c) représentent le coefficient de corrélation local entre chaque hémisphère et la photographie (échelle entre 0 et 1) et permettent d'estimer la qualité du recalage : on retrouve bien que l'hémisphère de droite est le mieux recalé. L'image (d) représente la photographie masquée par l'image binarisée de l'hémisphère le mieux recalé, et les images (e) et (f) représente le recalage respectif final de chaque hémisphère sur les photographies masquées. L'histologie est en fausses couleurs orangées.



## Rééchantillonnage de l'image

La dernière étape du recalage consiste à rééchantillonner l'image histologique avec les deux transformations rigides trouvées (une par hémisphère). Pour cela, la double ligne frontière entre les deux hémisphères est détectée automatiquement, si elle existe, par passage d'un élément structurant reconnaissant l'interface (voir **Figure 3.7 (a)**). Chaque point de la frontière d'un hémisphère se voit attribuer le point en regard le plus proche appartenant à la frontière de l'autre hémisphère, et inversement. A l'issue de ce processus, tous les points de la ligne frontière de chaque hémisphère sont ainsi regroupés par paires.

Chaque hémisphère est ensuite rééchantillonné dans la même image en utilisant la transformation rigide qui lui est associée. L'hémisphère  $H_1$  recouvre arbitrairement le  $H_2$  en cas de superposition, qui peut survenir même avec un recalage correct compte-tenu des déformations locales. Dans le cas où un espace vide se crée entre les deux hémisphères recalés, nous effectuons une interpolation simple qui consiste à relier les points appariés des frontières. Pour cela, nous créons un chemin continu à l'échelle du voxel de l'image passant linéairement du niveau de gris du point de départ vers le niveau de gris du point d'arrivée (voir **Figure 3.7 (b)**). Remarquons que cette interpolation n'a lieu que dans le cas où un vide artificiel est créé entre les deux hémisphères, si bien que l'information initiale contenue dans la coupe n'est absolument pas modifiée. Elle est simplement complétée de manière à limiter l'impression visuelle de déchirure créée par la transformation birigide sur l'image finale (voir **Figure 3.7 (c)**). On ne peut donc pas parler de déformation élastique mais plutôt d'interpolation esthétique.

A l'issue de l'ensemble de ces traitements, nous disposons d'un volume histologique coaligné avec le volume photographique donc à ce titre cohérent spatialement en 3D. Les volumes histologique et photographique sont par construction très similaires du point de vue géométrie spatiale, comme on peut le voir sur la **Figure 3.8**. Il reste à présent à rendre le volume histologique obtenu également cohérent iconiquement en 3D pour constituer une véritable modalité tridimensionnelle.

Afin d'apprécier l'apport du recalage birigide par rapport à un recalage rigide simple, la **Figure 3.10** compare le volume histologique du babouin II reconstruit avec chacune des méthodes. L'apport pour les parties antérieures et postérieures du cerveau pour lesquelles les hémisphères sont séparés est assez flagrant. Pour la partie centrale du cerveau, l'apport est moins évident, même si les structures semblent plus régulières.

## Retour sur le choix du type de transformation

A propos du choix du type de transformation, rigide plutôt qu'affine, la justification est double.

**Robustesse** D'abord, l'utilisation d'une transformation affine pour notre méthode recherchant une transformation par hémisphère, en limite la robustesse. En effet, même si pour certaines coupes, le recalage est sensiblement amélioré par la correction du cisaillement, ou parfois du facteur d'échelle entre l'histologie et la photographie, l'estimation de la transformation affine est souvent perturbée par les artefacts des coupes qui entraînent des recalages incorrects. La méthode est par exemple plus sensible aux degrés de pyramide utilisés en fonction de l'écartement initial des hémisphères. Notons également que pour des données histologiques de cerveau fixé, le marquage des coupes après montage sur lame n'entraîne théoriquement aucune contraction globale entre la photographie et la

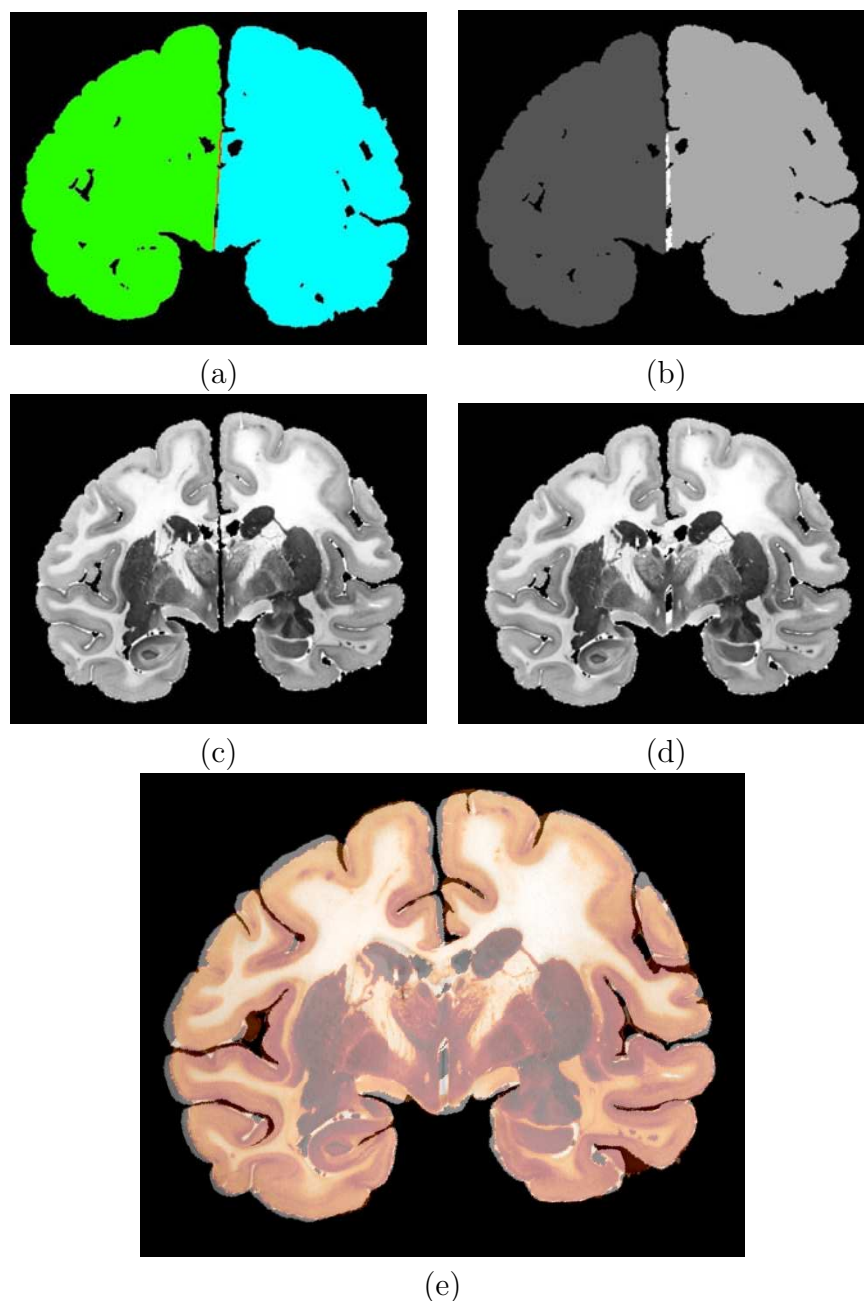
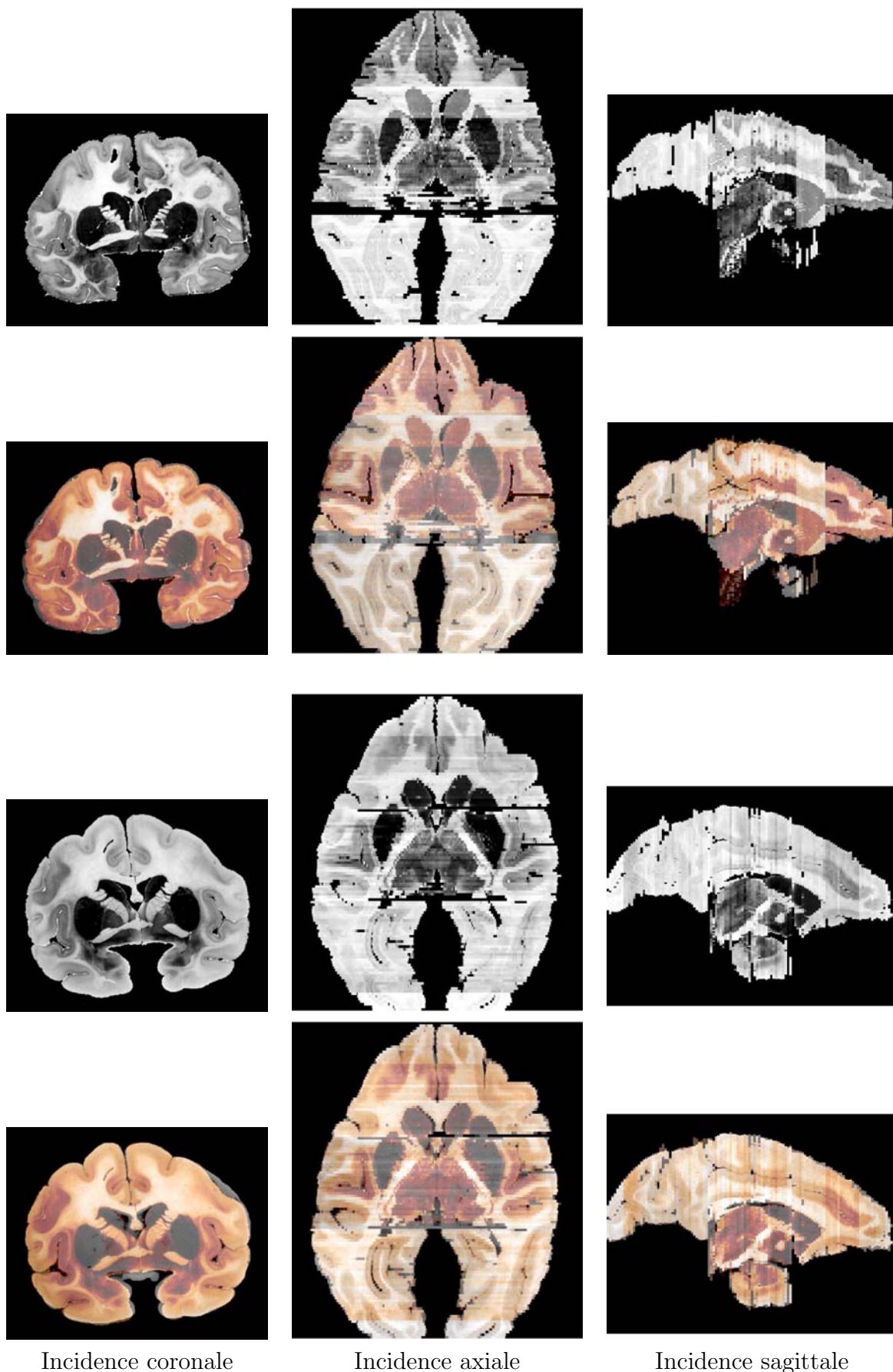


FIG. 3.7 – Image représentant la détection de la frontière commune, si elle existe, entre les deux hémisphère sur l'image initiale segmentée ( (a) : frontière en rouge et jaune). Après transformations de chaque hémisphère, un chemin continu est créé entre les points en regard ( (b) représenté en blanc ), permettant de combler le vide éventuel créé par le recalage indépendant de chaque hémisphère : image finale sans interpolation (c) et image finale avec interpolation (d). La même image représentée en fusion avec la photographie (e) (histologie en fausses couleurs orangées).

coupe histologique marquée. La recherche d'un facteur d'échelle global n'est donc théoriquement pas nécessaire, comme on peut le vérifier sur la **Figure 3.7 (e)** par exemple. Dans le cas de cerveaux non fixés (pour permettre l'autoradiographie par exemple), une transformation avec facteur d'échelle pourra être envisagée.



Incidence coronale

Incidence axiale

Incidence sagittale

FIG. 3.8 – Volume histologique résultat et fusion de ce volume histologique en fausses couleurs orangées coaligné avec le volume photographique respectivement pour les babouins I (lignes 1) et 2) ) et II (lignes 3) et 4) ) sous les 3 incidences.

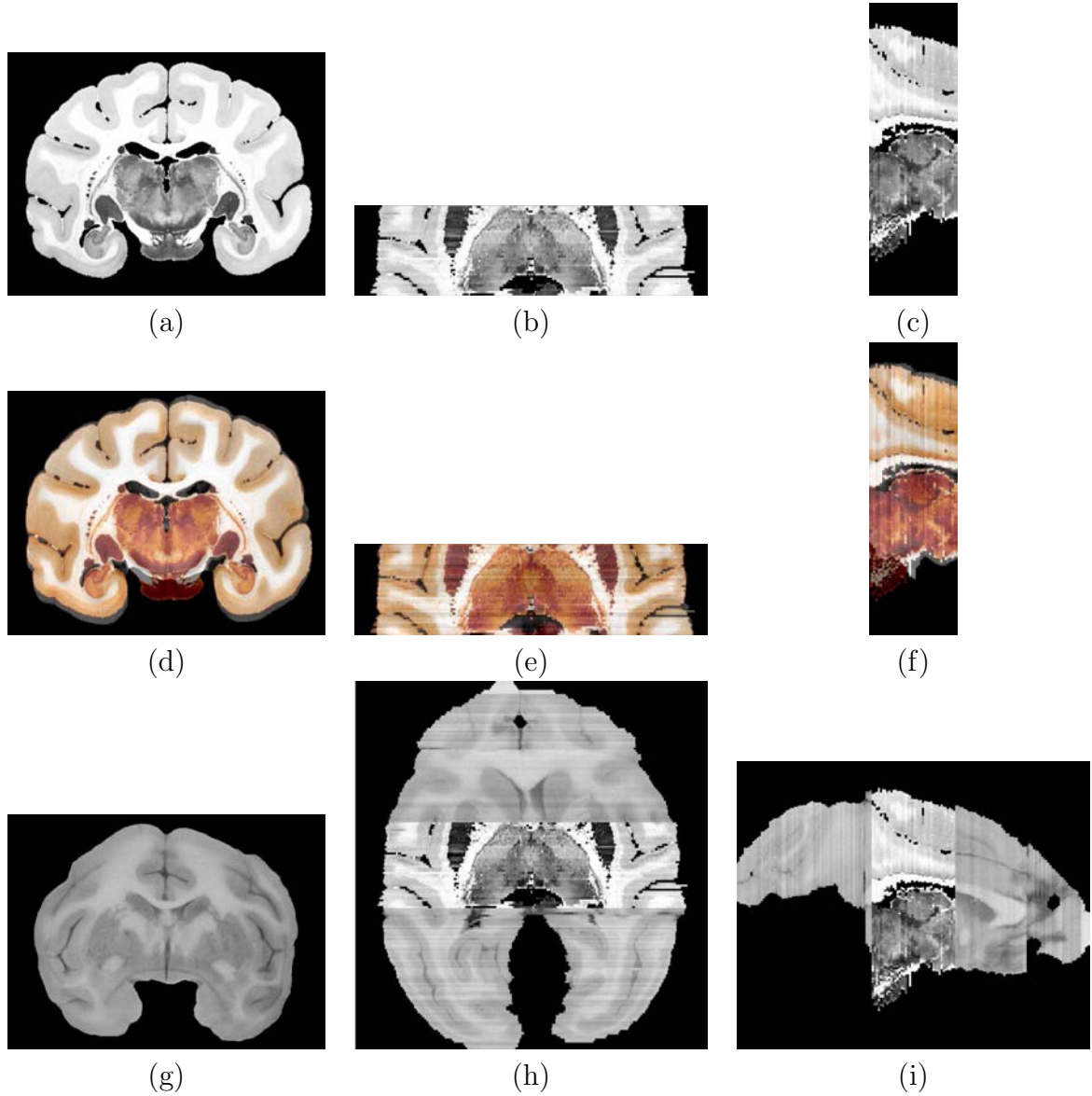


FIG. 3.9 – Volume histologique correspondant à la région du thalamus résultat, pour le macaque, en incidence coronale (a), axiale (b) et sagittale (c). Fusion de ce volume histologique en fausses couleurs orangées coaligné avec le volume photographique, en coronale (d), axiale (e) et sagittale (f). Représentation d'un volume hybride histologique / photographique sous les mêmes incidences coronale (g), axiale (h) et sagittale (i).

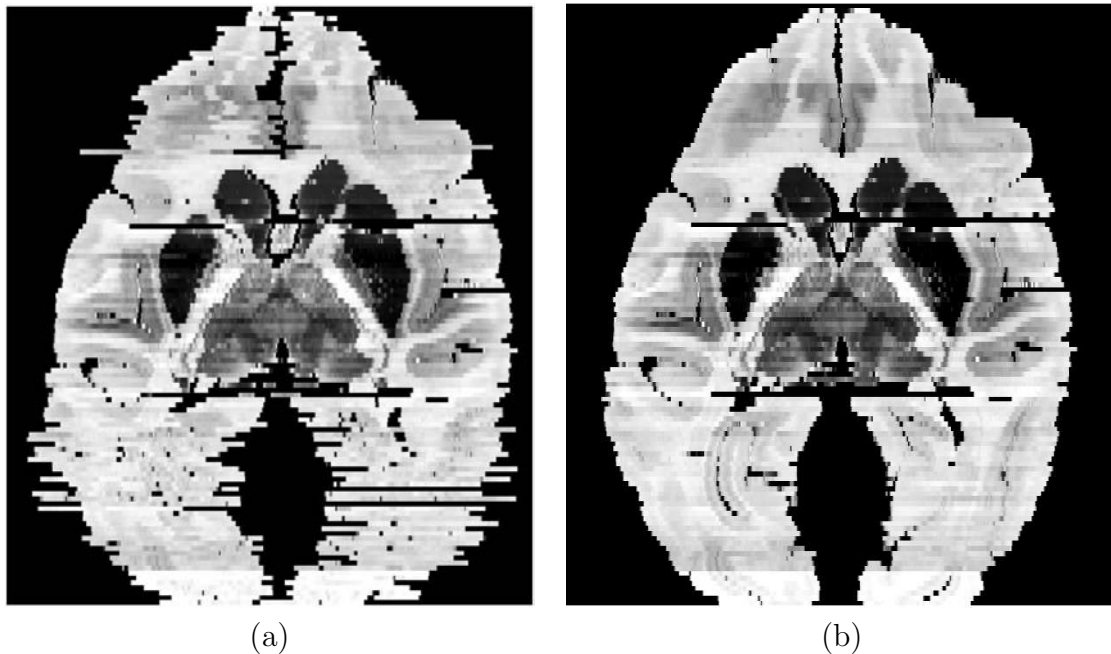


FIG. 3.10 – Vues en incidence axiale du volume histologique pour le babouin II permettant de comparer le coalignement rigide simple (a) et le coalignement birigide (b).

**Structures centrales** La deuxième raison pour ne pas utiliser de transformation affine concerne les structures d'intérêt du cerveau. Nous avons déjà mentionné le fait que les coupes histologiques comportaient beaucoup de petites déformations locales et de parties lacunaires, qu'une transformation affine ne parviendrait pas à parfaitement corriger. Seule une transformation non linéaire très libre pourrait parvenir à corriger la plupart de ces déformations, mais au prix d'une robustesse complètement perdue (notamment à cause des parties manquantes très fréquentes). Les transformations affines opèrent donc des choix de correction en quelque sorte, en privilégiant les zones les plus représentées et les plus déformées entre les images à recaler, à savoir le cortex et les sillons dans nos images. Ces transformations étant globales, les autres structures comme les noyaux gris centraux et le thalamus, suivent ces corrections globales, qui ne sont pas forcément pertinentes. Ce phénomène entraîne un alignement des structures centrales du cerveau paradoxalement moins bon avec l'utilisation de transformation affine par rapport au rigide. Compte-tenu du fait que ces structures centrales sont stables et relativement peu déformées par la coupe au microtome, et qu'elles constituent les structures qui nous intéressent le plus puisqu'elles comprennent le thalamus dont nous désirons réaliser un atlas, nous avons opté pour l'utilisation de transformations rigides. En outre, la robustesse est un critère primordial lorsqu'il s'agit de traiter automatiquement des données histologiques. Ce choix n'implique pas que le recalage au niveau cortical ne soit pas correct pour autant comme le montrent les résultats présentés. Enfin, l'information apportée par le volume photographique moins déformé, qui ne suffit pas pour différencier les noyaux thalamiques, est néanmoins exploitable au niveau du cortex : elle a d'ailleurs été utilisée pour l'étude de stimulation corticale.

### 3.3 La normalisation d'intensité et la nouvelle modalité IPM

Nous allons décrire dans cette partie une méthode robuste de normalisation d'intensité inter-coupes qui se base sur une analyse multi-échelle des histogrammes.

#### 3.3.1 Présentation de la problématique

##### Origine des différences d'intensité

Les images scannées des coupes histologiques marquées présentent d'importantes différences d'intensités entre elles, qui perturbent l'observation du volume histologique reconstruit (voir (**Figure 3.8**). En effet, l'étape de coupe au microtome n'assure pas une épaisseur pour chaque section parfaitement constante, en fonction de la température du bloc ou de la zone de tissu traversée. L'intensité du marquage histologique dépend de cette épaisseur, mais aussi de la concentration du bain de colorant et du temps d'incubation, qui peuvent varier légèrement d'un bloc de coupes à un autre. Enfin, l'étape d'acquisition par transmission des coupes au scanner peut accentuer ces différences, et varier d'une série d'acquisitions à une autre. Ces problèmes se remarquent particulièrement lorsque le jeu de coupes traitées est important et couvre le cerveau entier.

##### Un problème complexe

La correction de ces différences d'intensité est une tâche délicate pour diverses raisons :

- le nombre de tissus homogènes présents et leur taille varient d'une coupe à la suivante
- la distribution des intensités peut présenter de fortes discontinuités d'un bloc à l'autre (ces blocs correspondent aux endroits où le cerveau a été divisé juste après son extraction pour une meilleure fixation)
- le contraste relatif entre les différents tissus peut varier brutalement d'une coupe à l'autre (c'est-à-dire que la position relative des pics correspondant aux différents tissus peut fortement changer sans que l'aspect global de la coupe ne change forcément)
- une dérive spatiale intra coupe peut perturber la classification des tissus (cette dérive peut être due à une épaisseur non homogène dans une même coupe ou à un marquage accidentellement anisotrope).

##### Insuffisance des méthodes simples

Du fait de ces problèmes, les méthodes simples ne conviennent pas. La **Figure 3.11** montre les résultats d'une méthode de classification basique consistant à chercher pour chaque coupe un coefficient multiplicatif  $a$  et une constante additive  $b$  tels que, si l'on note  $m$  et  $\sigma$  la moyenne et l'écart type de la coupe à normaliser et  $m_{ref}$  et  $\sigma_{ref}$  la moyenne et l'écart type de la coupe prise comme référence pour la série entière, on ait :

$$\begin{cases} a = \sigma_{ref}/\sigma \\ b = m_{ref} - a * m \end{cases}$$

En utilisant cette méthode simple, qui constitue en quelque sorte l'équivalent du recalage spatial par axe d'inertie pour le recalage d'histogramme, on suppose que la réparti-



tion de chaque coupe en chacun des tissus est constante. Le volume photographique, bien que présentant des différences d'intensité inter-coupes parfois importantes, présente un contraste assez stable pour toutes les coupes. La méthode suffit pour améliorer considérablement la cohérence iconique tridimensionnelle du volume photographique du macaque : nous garderons cette normalisation pour la suite de l'étude.

Pour le volume histologique, il en est autrement. Le contraste entre matière grise et matière blanche n'est pas récupéré. La variété des tissus rencontrés dans chaque coupe ainsi que les différences de forme des histogrammes limite l'efficacité de la correction apportée. Cette méthode basique s'avère insuffisante pour la normalisation d'intensité du volume histologique.

## Nécessité d'une méthode dédiée

Des méthodes efficaces de correction d'intensité ont été proposées dans la littérature. La méthode la plus proche de cette problématique proposée par [MB03] est basée sur un recalage affine mono-dimensionnel des histogrammes des coupes successives par propagation. Cette approche, qui suppose que les histogrammes des coupes qui se suivent ont une forme proche, présente l'avantage d'être précise. Elle n'est cependant pas adaptée aux cas particulièrement difficiles de coupes adjacentes dont les histogrammes sont très différents et pour lesquelles l'optimum de la mesure de similarité ne correspond pas forcément au résultat attendu. Rechercher une transformation non linéaire entre les histogrammes ne résoudrait pas le problème d'optimisation pour autant. De plus, les méthodes par propagation sont sensibles aux erreurs de normalisation car elles les propagent sur toutes les normalisations suivantes.

C'est pourquoi, dans notre approche, nous cherchons dans un premier temps à analyser et à interpréter chaque histogramme indépendamment pour ne pas agir "en aveugle". Cela présente l'avantage de ne pas opérer par propagation et donc d'être moins sensible aux histogrammes pathologiques d'une part, mais aussi d'introduire une connaissance a priori dans l'analyse de ce problème complexe. Pour rendre la méthode plus robuste, un algorithme itératif est mis en place qui vérifie la cohérence spatiale de la classification déduite de l'analyse d'histogramme, et corrige par la solution la mieux adaptée.

### 3.3.2 Description de la méthode proposée

Notre méthode se compose de trois étapes :

- une **analyse** multi-échelle de l'histogramme est réalisée pour chaque coupe, menant à une classification en tissus basée sur une heuristique,
- la **cohérence** inter-coupe de ces classifications est vérifiée dans une seconde étape et les corrections nécessaires sont apportées,
- chaque coupe est **normalisée** grâce à une fonction d'interpolation recalant les histogrammes sur des valeurs de référence constituant une sorte d'histogramme modèle.

Un choix préliminaire consiste à décider de combien de tissus différents au maximum une coupe peut être constituée. Dans notre cas, nous avons décidé de distinguer 3 tissus au maximum dans nos coupes compte-tenu de notre marquage : matière grise, matière blanche (dont le contraste est accentué par la coloration au Neun) et marqueur. Nous appelons marqueur la région des noyaux gris centraux et du thalamus qui présente une teinte très foncée provoquée par la coloration à l'acétylcholinestérase. Nous avons choisi ces trois régions parce que, d'une part elles correspondent à des régions d'intérêt anatomique,

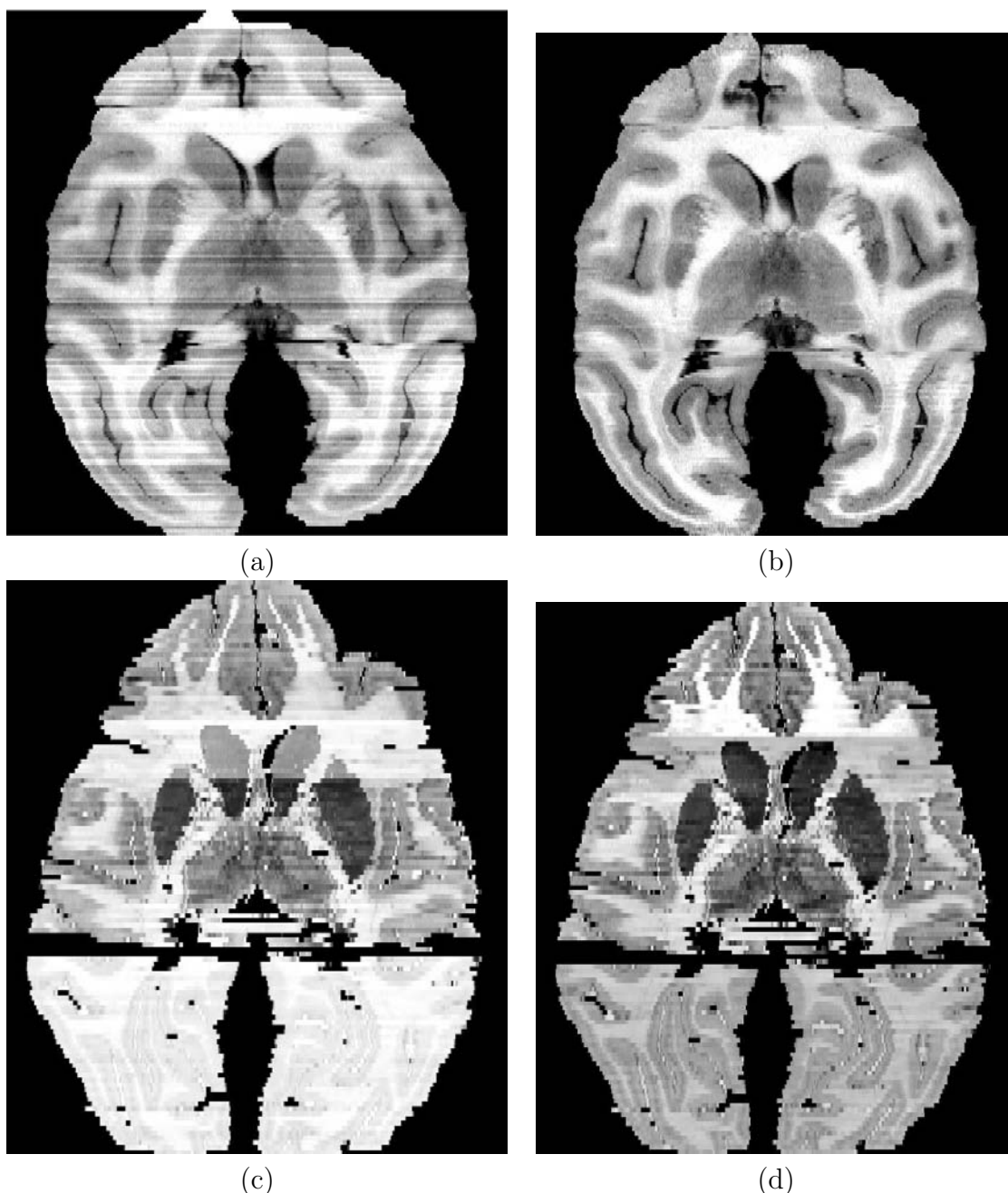


FIG. 3.11 – Vues en incidence axiale du volume photographique pour le macaque et du volume histologique pour le babouin I respectivement avant ( (a) et (c) ) et après ( (b) et (d) ) normalisation d'intensité avec une méthode simple. Le résultat est satisfaisant pour le volume photographique mais s'avère perfectible pour le volume histologique.

et d'autre part parce qu'elles sont relativement homogènes en termes de niveau de gris intra-région et suffisamment différentes inter-régions pour pouvoir être distinguées sur les histogrammes (voir **Figure 3.12**).

### Analyse multi-échelle des histogrammes : heuristique

**Détection des maxima** Une analyse multi-échelle linéaire est réalisée sur chaque histogramme. En effet, les signaux 1D se prêtent particulièrement bien à ce type d'analyse



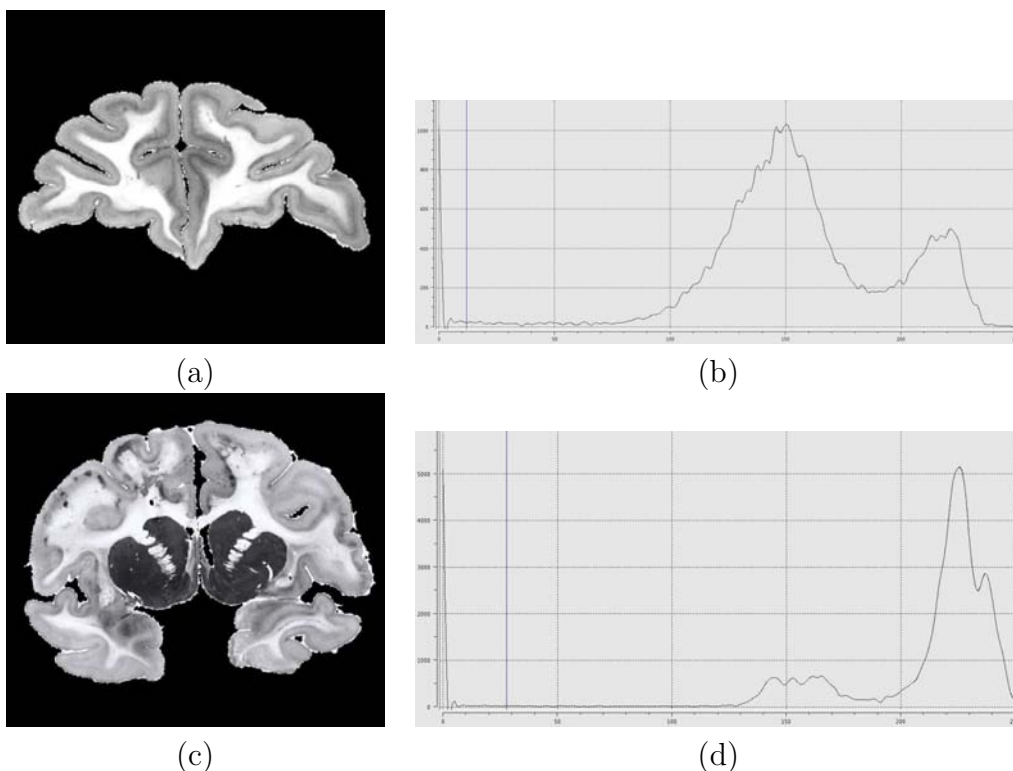


FIG. 3.12 – Exemple de coupes histologiques et de leur histogramme comportant 2 classes de tissus (matière blanche et matière grise : coupe en (a) et histogramme en (b) ) et comportant 3 classes de tissus ( matière blanche, matière grise et marqueur : coupe en (c) et histogramme en (d) ).

de part la simplicité de leur comportement le long des échelles. La propriété la plus intéressante de l'analyse multi-échelle en 1D est que le nombre de maxima décroît toujours lorsque l'échelle augmente. L'espace multi-échelle peut être obtenu en appliquant l'équation de la chaleur au signal, ce qui correspond à un lissage Gaussien de noyau croissant. Les extrema sont détectés et suivis le long des échelles jusqu'à leur extinction, ce qui arrive lorsque deux extrema ou plus se rencontrent. Le lissage se poursuit jusqu'à ce que ne survive plus qu'un seul maximum. Une stratégie d'analyse de l'histogramme est alors mise en place, tenant compte de la connaissance a priori du problème traité.

**Précautions particulières** Dans les cas simples, un lissage de l'histogramme jusqu'à ce qu'il ne reste seulement que les 3 pics qui survivent le plus longtemps suffirait pour détecter les 3 classes de tissus dans les coupes (voir **Figure 3.12 (b) et (d)** ). Mais cette stratégie simple ne convient pas pour la plupart des coupes, qui nécessitent une analyse plus sophistiquée pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, les coupes qui ne contiennent pas les noyaux gris centraux ne présentent pas de classe marqueur (voir **Figure 3.12 (a) et (b)** ), et cette situation doit être détectée automatiquement pour ne pas attribuer à tort une classe de tissu à un pic artefactuel.

Ensuite, sur certaines coupes, le contraste gris/blanc est très faible. Les pics du gris et du blanc se mélangent alors très tôt dans les échelles, alors que certains pics artefactuels survivent beaucoup plus longtemps. Dans les cas les plus difficiles, le pic du gris et du blanc ne forment qu'un sur l'histogramme. Il a été montré par [MCF98] que l'étude de la

dérivée seconde permet de surmonter ces situations : en effet, les extrema des dérivées aux ordres supérieurs renferment une information plus fine sur la courbure de l'histogramme.

Enfin, la position d'un pic sur l'axe des intensités de l'histogramme donne une estimation sur la moyenne d'intensité du tissu correspondant, en supposant la distribution des intensités dans un tissu proche d'une loi gaussienne. Or cette position, mais aussi les tissus que ce pic représente, varient en fonction des échelles. Intuitivement, les pics artefactuels ne survivent pas longtemps dans les échelles et se mélangent aux pics correspondant à des tissus, perturbant l'estimation de leur moyenne. Lorsqu'un petit mode fusionne avec un plus important dans l'espace des échelles, la position de son pic passe rapidement à une position proche de celle du mode plus important. En fait, la plupart des trajectoires des extrema alternent des périodes de forte vitesse horizontale avec des périodes de stabilité correspondant aux intervalles d'échelles durant lesquelles elles sont rattrapées par un autre mode. Pour cette raison, dans notre méthode, la position d'un mode est évaluée à l'échelle pour laquelle sa vitesse horizontale est minimale.

De façon à pouvoir classer les pics par ordre d'intérêt, deux critères sont utilisés : l'échelle à laquelle la trajectoire du minimum de la seconde dérivée s'éteint, et le nombre de voxels correspondants à ce pic. L'estimation de ce dernier critère est obtenue par intégration sur une fenêtre fixe autour du pic.

**Choix des maxima conservés** Avec cette méthode d'analyse, et compte-tenu de notre connaissance a priori des données, nous avons choisi d'utiliser l'heuristique suivante pour interpréter l'histogramme :

- le pic qui survit le plus longtemps dans l'espace des échelles est conservé : on le notera  $p_G$  pour "pic du gris". Il sépare l'histogramme en deux.
- à sa droite (niveaux de gris supérieurs), les deux pics qui vivent les plus longtemps sont détectés : un seuil sur le nombre de voxels que représente le pic est appliqué pour ne pas retenir un artefact isolé. Ils seront notés  $p_{B1}$  et  $p_{B2}$  pour "pic du blanc 1 et 2".
- à sa gauche (niveaux de gris inférieurs), le pic qui vit le plus longtemps est détecté et son volume est évalué pour déterminer s'il est conservé ou non. Ce pic sera noté  $p_M$  pour "pic du marqueur".
- on recherche ensuite les deux pics principaux entre  $p_M$  et  $p_G$ , que l'on notera  $p_{S1}$  et  $p_{S2}$  pour "pics supplémentaires 1 et 2".

Au total donc, 6 pics retenus, dans l'ordre croissant :  $p_M, p_{S1}, p_{S2}, p_G, p_{B1}$  et  $p_{B2}$ .

Ces 6 pics ont une valeur dans tous les cas : si les critères de seuillage sur le volume d'un pic ne sont pas respectés, le suivant en importance est recherché, et en cas d'échec, la valeur -1 est affectée au pic.

**Interprétation heuristique** A partir de ces données, une première interprétation de l'histogramme, que l'on appelle "heuristique", est donnée. Elle correspond à la distribution qui est, par expérience, la plus probable, à savoir, comme leur nom le laisse supposer :  $p_G$  pour le niveau de gris correspondant au mode de la matière grise et  $p_{B1}$  pour le mode de la matière blanche. De plus, on décide que le marqueur est présent dans la coupe considérée si le mode du marqueur  $p_M$  satisfait aux critères de volume fixés (200 points dans notre cas).

A partir de ces modes, une classification de l'image est réalisée, simplement en affectant à chaque voxel le label associé au mode dont son niveau de gris est le plus proche (ce

qui revient à une classification de type *k-means* mono-dimensionnelle à 1 itération avec une initialisation issue de l'heuristique). Cette classification constitue la classification heuristique.

La **Figure 3.13** montre l'analyse de l'histogramme de quelques coupes représentatives et la classification qui en résulte. Les lignes 1) et 2) montrent une analyse classique de coupe comportant respectivement 2 tissus et 3 tissus. La ligne 3 illustre le cas d'une coupe pour laquelle le contraste gris/blanc étant faible, le mode correspondant à la matière blanche ne donne pas lieu à un maximum : l'analyse des minima de la dérivée seconde de l'histogramme permet de le détecter avec succès. La classification résultante n'est pourtant pas parfaite à cause du biais spatial intra coupe que présente cette image. La ligne 4 donne l'exemple d'une coupe pour laquelle la classe du marqueur est représentée par plusieurs petits maxima : la recherche du minimum local de la vitesse horizontale le long de la trajectoire de la seconde dérivée permet d'estimer la position correcte de l'intensité moyenne de ce mode. Enfin, sur la ligne 5, nous pouvons apprécier la sensibilité de détection de présence d'un mode correspondant à un tissu, ici la naissance des noyaux gris centraux (classe du marqueur). L'analyse heuristique parvient à interpréter de façon satisfaisante l'histogramme dans la plupart des cas, mais certaines coupes posent plus de problèmes.

## Vérification de la cohérence spatiale

L'étape suivante consiste en une vérification de la cohérence spatiale de la classification heuristique précédemment obtenue.

**Autres classifications possibles** Pour cette étape, nous allons utiliser les 6 modes détectés lors de l'analyse multi-échelle de l'histogramme pour générer un ensemble de classifications possibles en plus de la classification heuristique. Les possibilités les plus plausibles pour l'attribution des modes à un tissu sont examinées, à savoir :

- pour le mode gris :  $p_{S2}$ ,  $p_G$  et  $p_{B1}$
- pour le mode blanc :  $p_G$ ,  $p_{B1}$  et  $p_{B2}$
- pour le marqueur : absent,  $p_M$ ,  $p_{S1}$  et  $p_{S2}$ .

en imposant la condition toujours respectée par les tissus que le niveau de gris de la matière blanche est supérieur à celui de la matière grise, lui-même supérieur à celui du marqueur. Cette combinatoire donne lieu à 21 classifications possibles au maximum en plus de l'heuristique.

**Calcul d'un score** Pour chaque coupe, toutes ces classifications sont testées l'une après l'autre par rapport à la classification gagnante de la coupe précédente et la classification heuristique de la coupe suivante. Ce test consiste à calculer un score  $S(i)$  défini de la manière suivante pour la coupe  $i$ , en notant  $commun_{j,i}^c$  le nombre total de voxels appartenant à la classe  $c$  à la fois dans la coupe  $j$  et dans la coupe  $i$  (à la même position spatiale) et où  $m, g$  et  $b$  désignent respectivement la classe marqueur, gris et blanc :

$$S(i) = \prod_{c \in m, g, b} commun_{i-1, i}^c + \prod_{c \in m, g, b} commun_{i+1, i}^c$$

Ce score rend compte de la superposition des classes entre une classification possible de la coupe  $i$  testée et la classification des coupes adjacentes. Remarquons que la cohé-

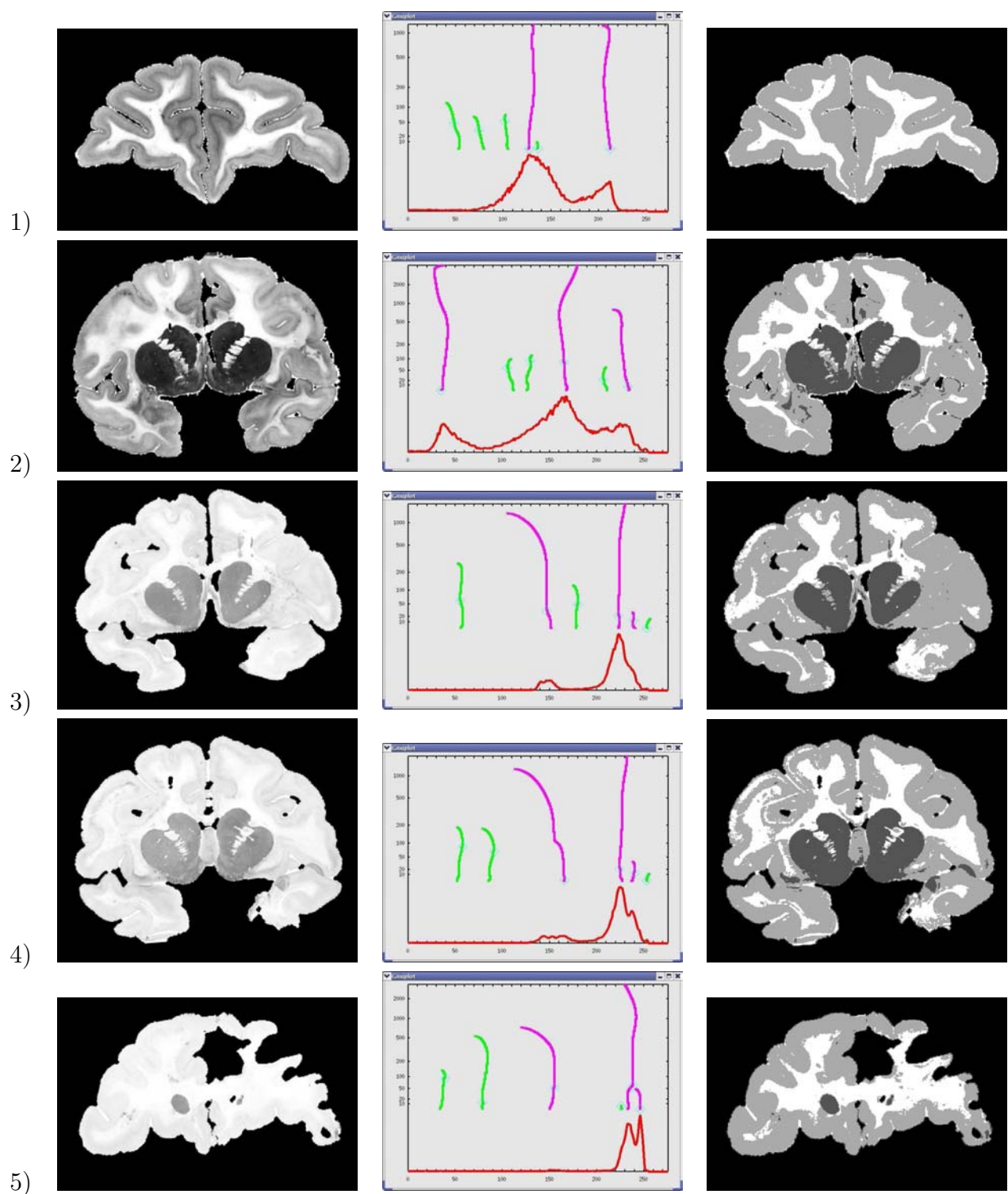


FIG. 3.13 – Quelques exemples d'analyse d'histogrammes : à gauche la coupe originale, au milieu l'histogramme correspondant avec l'analyse (les 6 modes détectés le long des échelles : en violet les 2 ou 3 modes sélectionnés pour l'analyse heuristique marqués par des diamants, en vert les autres), et à droite la classification résultant de l'analyse heuristique.

rence spatiale tridimensionnelle, obtenue grâce à l'alignement effectué précédemment, est exploitée pour ce calcul. La classification dont le score est maximum est désignée gagnante et est retenue pour la coupe  $i$ . Le processus est itéré jusqu'à convergence (ou un nombre maximum de fois). A partir de la seconde itération, la classification heuristique n'est plus systématiquement utilisée pour la coupe suivante car elle est potentiellement remplacée par la classification déclarée gagnante à l'itération précédente. La classification heuristique peut donc être considérée comme une bonne initialisation très proche de la solution pour cette étape de vérification de la cohérence spatiale.

Remarquons que le fait d'utiliser la classification corrigée par l'itération en cours évite les situations d'oscillations des classifications au cours des itérations, mais n'assure pas pour autant la convergence de la méthode en théorie. A l'issue de cette étape, à chaque coupe est attribuée une classification gagnante associée à un triplet de valeurs de niveaux de gris ( $m, g, b$ ) correspondant aux modes marqueur (-1 s'il est absent), gris et blanc. La **Figure 3.14** illustre l'étape de vérification de la cohérence spatiale.

## Normalisation effective

La dernière étape consiste en la normalisation effective de la coupe. Pour cela, nous calculons pour chaque coupe une fonction d'interpolation que nous choisissons linéaire par morceaux, qui associe respectivement les modes  $m, g, b$  sélectionnés à des valeurs de références  $m_0, g_0$  et  $b_0$  fixées par l'utilisateur pour le volume global. Ces valeurs de référence correspondent par exemple aux modes d'une coupe considérée comme présentant une distribution d'intensité satisfaisante. Rappelons que le mode marqueur  $m$  n'est pas présent sur certaines coupes : il n'est pas pris en compte dans la fonction d'interpolation dans ce cas. Le fond 0 est associé à 0 de même que le niveau maximum de l'image globale (255 en 8bits) au niveau maximum choisi (255 également dans notre cas).

Le mode d'interpolation retenu est linéaire par morceaux, car il est simple et assure la monotonie de la fonction entre les valeurs d'interpolation, contrairement aux polynômes par exemple. Une table de conversion est calculée pour tous les niveaux de gris de chaque image, ce qui permet d'effectuer rapidement le rééchantillonnage. La **Figure 3.15** présente un exemple de normalisation d'une coupe. L'ensemble des images rééchantillonnées de cette façon constitue un volume présentant une cohérence tridimensionnelle en intensité.

### 3.3.3 Résultats

#### Deux cerveaux entiers normalisés

Nous présentons dans cette partie le résultat de la normalisation réalisée sur les deux cerveaux entiers de babouin (pas pour le sous-volume histologique du cerveau de macaque). Le volume avant normalisation tout d'abord, la correction apportée par la seule étape heuristique ensuite, et la normalisation finale obtenue après 2 itérations sont présentés en **Figure 3.16**. Les valeurs de référence choisies pour les deux babouins sont  $m_0 = 60, g_0 = 160$  et  $b_0 = 230$ . Le temps nécessaire pour réaliser la normalisation d'un volume d'environ 120 coupes et de taille 500 sur 450 est d'environ 15 minutes sur un Pentium IV 1.8GHz.

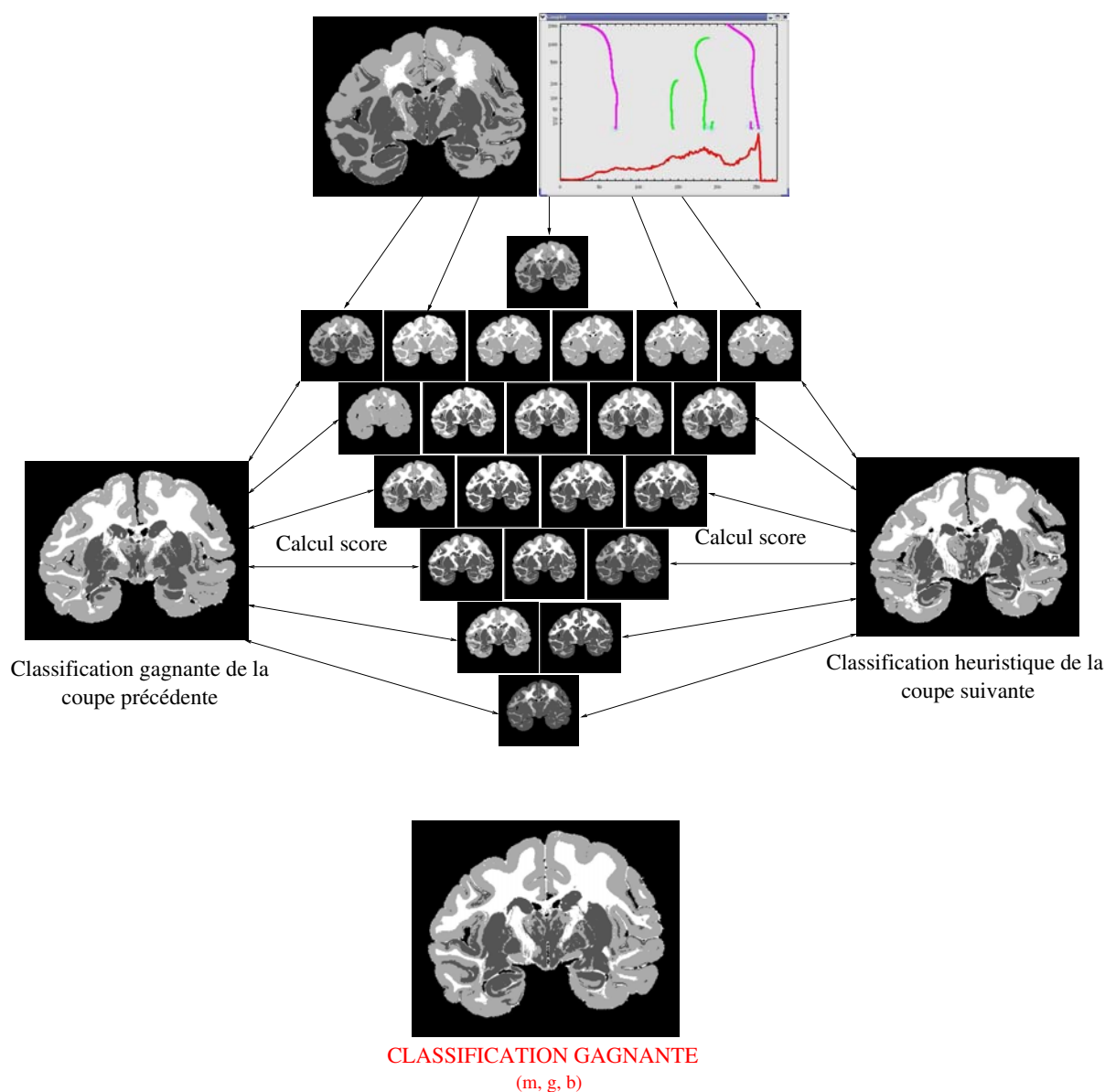


FIG. 3.14 – En haut, une classification correspondant à l'analyse heuristique mise en échec, et à côté l'histogramme avec les 6 modes extraits, qui donnent lieu à un ensemble de classifications plausibles (en pyramide inversée en dessous). Un score de cohérence spatiale est calculé entre chacune de ces classifications et les classifications gagnantes de la coupe précédente et heuristique (ou gagnante selon l'étape) de la coupe suivante. La classification ayant obtenu le meilleur score est déclarée gagnante et le triplet associé des valeurs des modes ( $m$ ,  $g$ ,  $b$ ) est retenu (en bas). Le processus est itéré.

### Perfectible mais performante

Les résultats présentés sont globalement satisfaisants. L'étape heuristique parvient à classer correctement environ 85% des coupes (évaluation visuelle). L'étape de vérification de cohérence spatiale parvient à récupérer une partie des coupes imparfaitement classifiées. Même s'il arrive que sur certaines coupes très bruitées, le choix de correction ne paraisse pas optimal, cette étape post-analyse apporte un gain en robustesse. Notons que la méthode est parvenue à corriger des coupes (très peu de contraste, un des tissus



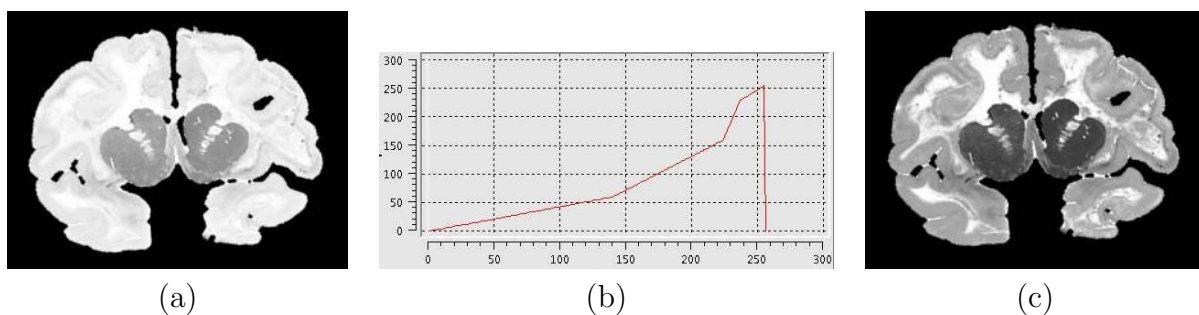


FIG. 3.15 – *La normalisation effective : la coupe originale (a), la fonction d'interpolation des intensités linéaire par morceaux (b) et l'image corrigée (c). On remarque la relation fortement non linéaire entre les deux distributions d'intensités.*

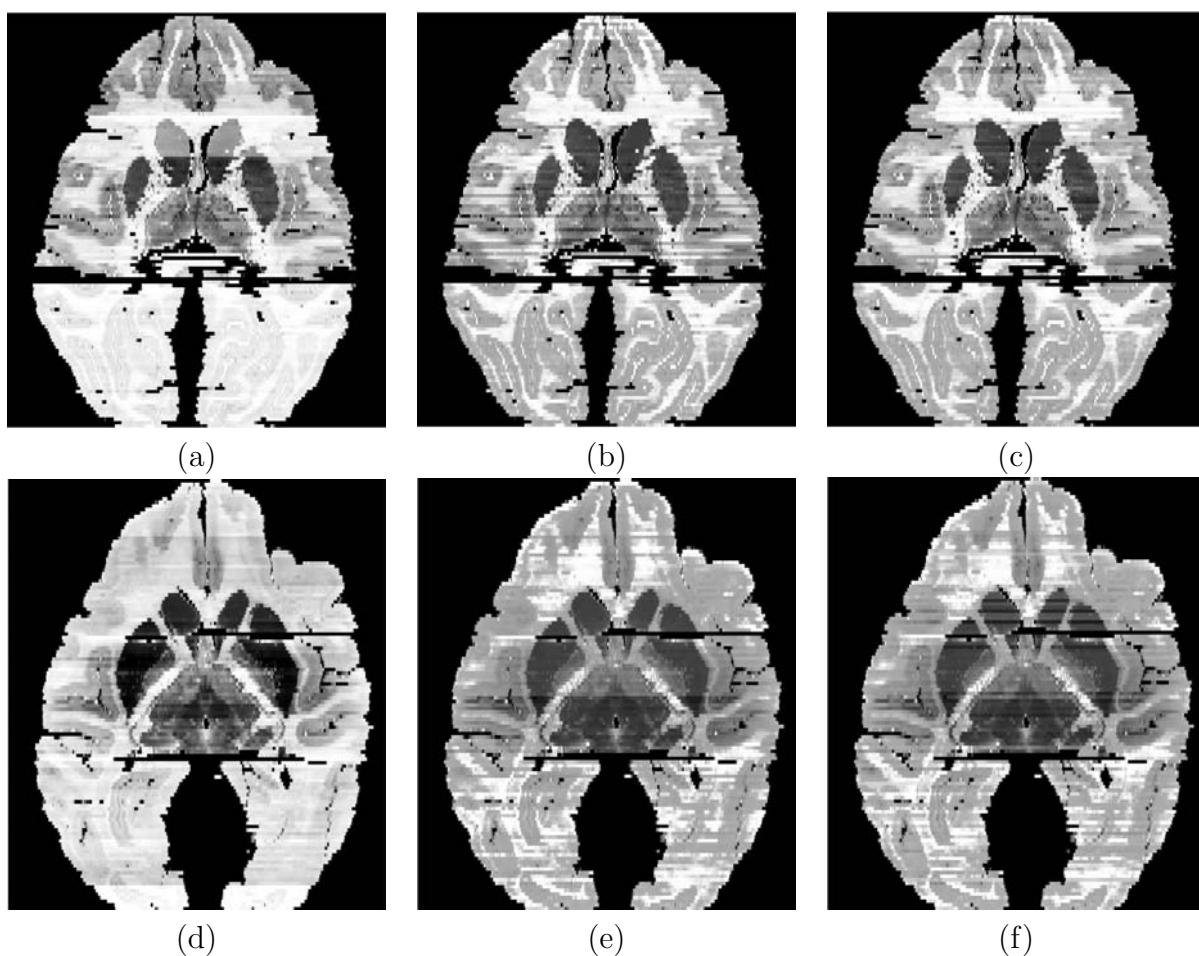


FIG. 3.16 – *Les résultats finaux de la normalisation inter-coupes d'intensité présentée sur le volume histologique complet en incidence axiale, babouins I et II respectivement : avant normalisation (a) et (d), après normalisation uniquement par l'analyse d'histogramme et l'interprétation heuristique (b) et (e), et enfin l'image corrigée après 2 itérations de vérification de la cohérence spatiale (c) et (f).*

très minoritaire) pour lesquelles la grande majorité des méthodes auraient été prises à défaut.

Certaines coupes sont cependant encore imparfaitement normalisées, cela est principa-

lement dû au fait qu'un biais spatial important perturbe le processus par endroit. Ce biais résulte d'une épaisseur de la section non homogène, ou d'une coloration non uniforme. Une seconde raison est que le nombre de classes choisi (3 classes : le marqueur, la matière grise et la matière blanche) se révèle parfois insuffisant. En effet, la région du marqueur en particulier rassemble les noyaux gris centraux et le thalamus, qui ne présentent pas tout à fait la même gamme d'intensités. Enfin, certaines coupes extrêmement abîmées sont incorrectement traitées, ce qui souligne l'attention à apporter à l'obtention des données au-delà de tout traitement *a posteriori*.

### Améliorations envisageables

Certaines solutions pourraient encore être envisagées pour améliorer cette normalisation. Concernant la dérive spatiale d'intensité à l'intérieur d'une coupe, difficile à corriger par crainte de mélanger des modes proches, une correction de biais *a posteriori* dépendant du contraste trouvé par l'analyse d'histogramme pourrait s'avérer efficace. Une nouvelle normalisation serait alors à relancer après cette correction.

La méthode que nous proposons est robuste, bien adaptée au problème posé et ne propage pas les erreurs. Mais le résultat final, bien que satisfaisant, pourrait être amélioré par une méthode de recalage d'histogramme de type iconique (et non basée sur des amers géométrique comme la nôtre), qui grâce à cette initialisation de très bonne qualité, perfectionnerait la normalisation.

Enfin, notons que notre méthode bien que présentant des réglages propres à notre problème, peut facilement être adaptée à d'autres cas similaires de normalisation de coupes. Nous l'avons d'ailleurs appliquée avec succès à la normalisation de coupes de rats qui présentaient des variations d'intensités importantes. Cette méthode de normalisation de coupes a fait l'objet de la communication : [DMDf04].

A ce stade de la mise en correspondance *in vivo et post mortem*, nous disposons d'un volume 3D photographique dans la configuration géométrique du cerveau extrait et un volume 3D histologique marqué dans la même configuration géométrique et normalisé en intensité.

## 3.4 La correction élastique vers l'IRM : la transformation FFD

Nous allons chercher dans cette partie à corriger les déformations tridimensionnelles apparues lors de l'extraction du cerveau.

### 3.4.1 Choix de la transformation

#### Origine des déformations primaires

Ces déformations, que nous avons appelées "primaires" dans le chapitre 1, sont principalement dues aux changements de conditions mécaniques et/ou physiologiques comme la pression du crâne, la perte du liquide céphalo-rachidien, la disparition de l'irrigation sanguine. S'ajoutent à cela la déshydratation et la fixation au sucre. Enfin, la congélation,



la séparation en blocs et les efforts de coupes viennent compléter ce rappel sans doute non complètement exhaustif des causes de déformations tridimensionnelles du cerveau *post mortem* représenté par le volume photographique par rapport au volume IRM *in vivo*.

### La transformation *Free Form Deformation*

Ces déformations sont clairement non linéaires car les différentes classes de tissus ne présentent pas les mêmes propriétés mécaniques. En particulier, la matière grise, à savoir le ruban cortical et les sillons, se déforment beaucoup plus que les noyaux gris centraux.

Il nous faut donc une transformation non linéaire avec suffisamment de degrés de liberté pour pouvoir tenir compte des propriétés différentes des tissus. Mais il faut également que cette transformation soit suffisamment robuste pour ne pas être trop sensible aux déformations locales artefactuelles de la modalité *post mortem*. Enfin, la transformation doit être capable d'effectuer des recalages inter-modalités.

Parmi le grand nombre de transformations non linéaires qui ont été proposées dans la littérature, la transformation élastique FFD (pour Free Form Deformation [RSH<sup>+</sup>99]) nous a paru être un bon candidat (voir la partie 1.5.4 du chapitre 1 pour plus de justifications). Nous avons en fait utilisé une variante de cette méthode entièrement recodée dans le service, en adoptant la technique d'optimisation proposée par [Mat00].

### 3.4.2 Estimation de la transformation

#### Le volume photographique : meilleur représentant de la géométrie *post mortem* 3D

L'objectif recherché au final est de corriger les déformations tridimensionnelles du volume histologique marqué. Cependant, ce volume présente beaucoup de déchirures, de petites déformations locales, présente des parties lacunaires notamment à l'interface des blocs. Ces déformations sont trop locales pour être corrigées par FFD mais perturbent considérablement l'estimation de la correction vers l'IRM.

Étant donné que ce volume histologique est exactement dans la même configuration que le volume photographique beaucoup moins abîmé, nous avons opté pour estimer la correction tridimensionnelle sur ce volume photographique.

#### Initialisation rigide 3D

La première étape de recalage consiste en un recalage rigide 3D du volume photographique avec l'IRM pour initialiser la transformation. Ce recalage est réalisé automatiquement par un logiciel utilisant l'information mutuelle comme mesure de similarité ([VW97], [MVS03]). Le volume photographique est ensuite dégradé par filtrage médian dans une résolution proche mais supérieure à celle de l'IRM pour des raisons de temps et de robustesse, sans perdre en qualité pour l'estimation du recalage. A la fois sur le volume photographique mais aussi sur le volume IRM, les images ont été segmentées de telle manière que seul le cerveau apparaisse, sans le crâne, le tronc ou le cervelet. De cette manière, les risques de perturbations et de déformations erronées sont minimisés. Toutefois, les résultats de cette initialisation rigide, qui apparaissent en **Figure 3.17**, sont présentés avec l'IRM non segmentée pour mieux différencier chaque modalité.

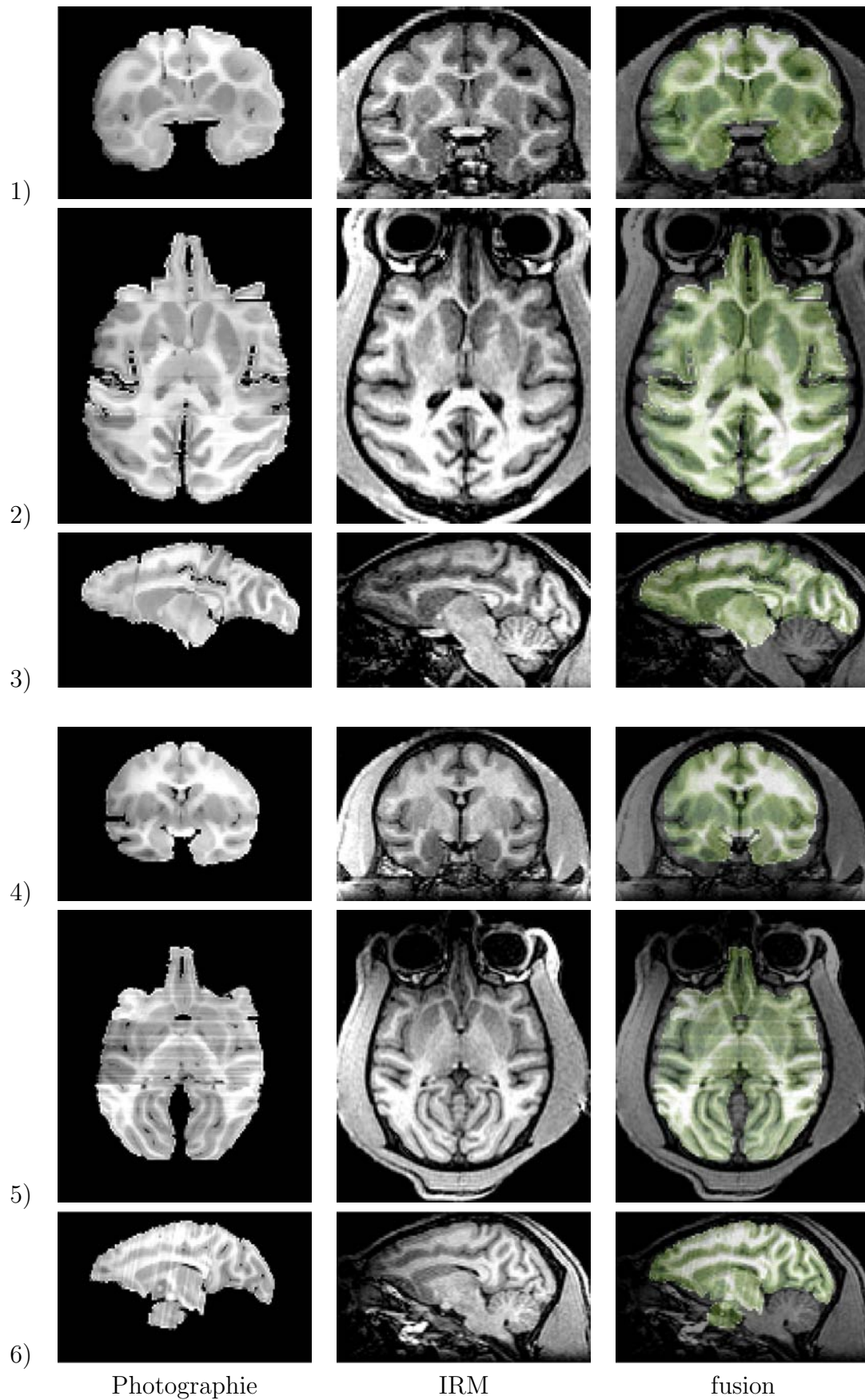


FIG. 3.17 – Recalage rigide d'initialisation du volume photographique avec l'IRM pour les babouins I (incidences coronale 1), axiale 2) et sagittale 3) ) et II (incidences coronale 4), axiale 5) et sagittale 6) ). La photographie est en fausses couleurs vertes dans les images de fusion. Des différences de volume importantes sont visibles.

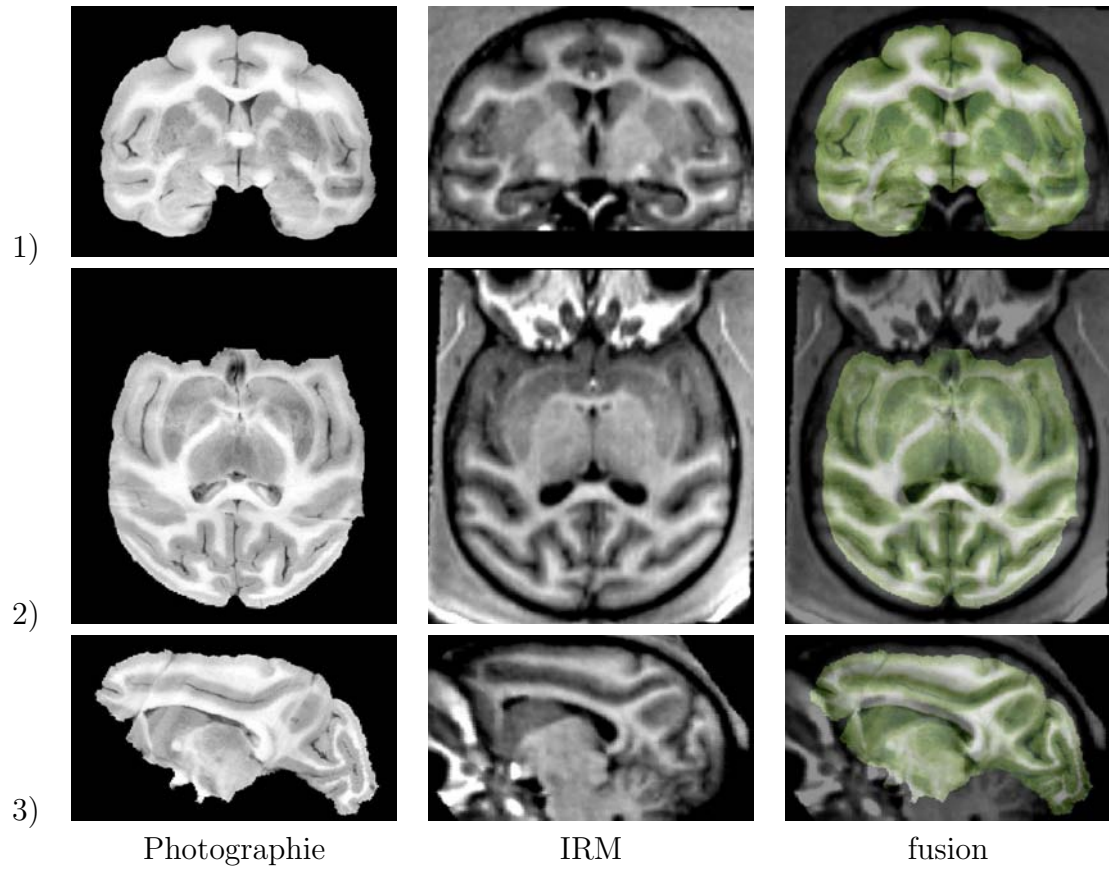


FIG. 3.18 – *Recalage rigide d'initialisation du volume photographique avec l'IRM pour le macaque (incidences coronale 1), axiale 2) et sagittale 3) ). La photographie est en fausses couleurs vertes dans les images de fusion. Des différences de volume importantes sont visibles.*

## Correction FFD

A partir de cette préparation des données, une transformation FFD est estimée du volume photographique vers le volume IRM. Là encore, l'information mutuelle est utilisée comme critère de similarité à optimiser. Nous avons opté pour une approche pyramidale consistant à augmenter graduellement le nombre de points de contrôle servant à la paramétrisation de la transformation élastique. Pour les 2 cas que nous avons traités, nous avons commencé avec 4 points de contrôle par direction pour terminer avec 10. Cela permet de commencer par corriger les grandes déformations de façon robuste au début puis peu à peu de relâcher la contrainte, proche de la solution, pour affiner l'estimation de la transformation.

Nous avons évalué les résultats au travers des images fusionnées de l'IRM et du volume photographique élastiquement transformé. Une évaluation des résultats prenant en compte les principaux sillons, qui peut être trouvée dans [DDC<sup>+</sup>03], montre que la correction FFD améliore nettement la mise en correspondance des principaux sillons par rapport à une transformation rigide.

Les différences de volume global ont été nettement corrigées par la transformation élastique. Un compromis sur le nombre de points de contrôle a été trouvé permettant un recalage correct des principales structures tout en évitant des déformations locales aberrantes (voir **Figure 3.19**).

La transformation FFD a donc permis de corriger de façon satisfaisante les déformations tridimensionnelles du volume photographique du cerveau des 2 babouins traités.

## Application des transformations au volume histologique

La transformation rigide d'initialisation ainsi que la correction élastique FFD ont ensuite été directement appliquées au volume histologique marqué. En effet, le volume histologique marqué ayant été rendu très similaire au volume photographique par l'étape de coalignement par transformation birigide, la correction estimée sur l'un correspond à l'autre.

C'est ce que semblent nous confirmer la **Figure 3.21** pour l'initialisation rigide et la **Figure 3.23** corrigée par déformation FFD, où l'on peut constater que les différences de volume de l'histologie par rapport à l'IRM sont corrigées et que la superposition des structures internes est nettement améliorée.

La mise en correspondance des coupes histologiques marquées avec l'IRM de deux cerveaux de babouins a donc été réalisée. Le volume histologique marqué obtenu après l'ensemble de ces transformations présente une cohérence tridimensionnelle tant spatiale qu'iconique et sa configuration géométrique est celle du cerveau *in vivo* : il constitue à ce titre une nouvelle modalité tridimensionnelle à part entière que nous avons donc appelée **Imagerie Post Mortem** ou IPM. Son exploitation peut être menée au même titre que n'importe quelle modalité *in vivo* intrinsèquement tridimensionnelle comme l'IRM. En particulier, il est possible de segmenter les structures en 3D.

## Résultats morphométriques

Nous avons ensuite mené une étude volumique globale dans le but d'estimer le pourcentage de contraction du cerveau *post mortem* reconstruit à partir des coupes histologiques et le cerveau dans sa géométrie *in vivo* représenté par l'IRM. Les **tableau 3.1 et 3.2**



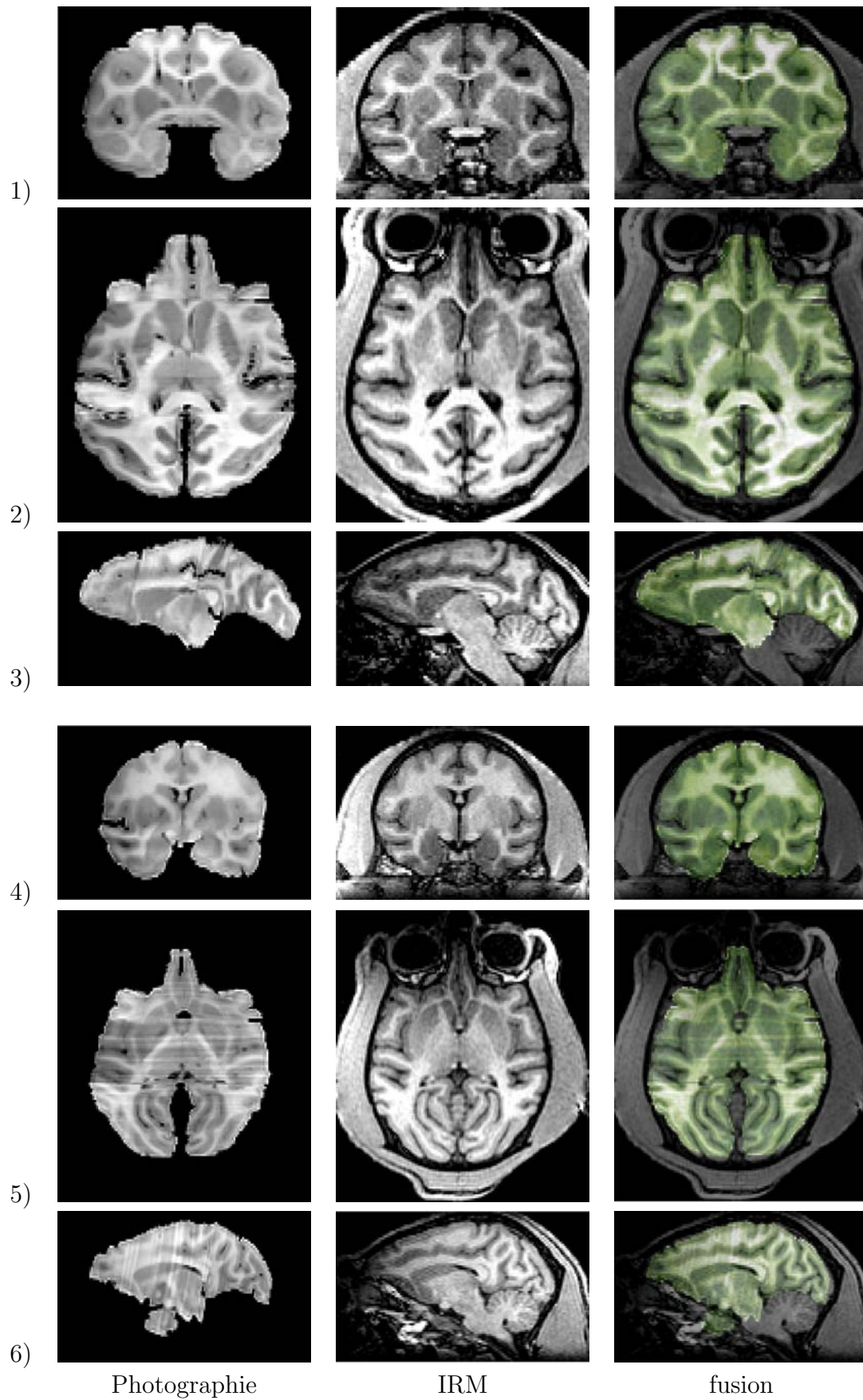


FIG. 3.19 – Correction de déformation du volume photographique par transformation FFD vers l'IRM pour les babouins I (incidences coronale 1), axiale 2) et sagittale 3) ) et II (incidences coronale 4), axiale 5) et sagittale 6) ). La photographie est en fausses couleurs vertes dans les images de fusion. Les principales différences de volume sont corrigées.

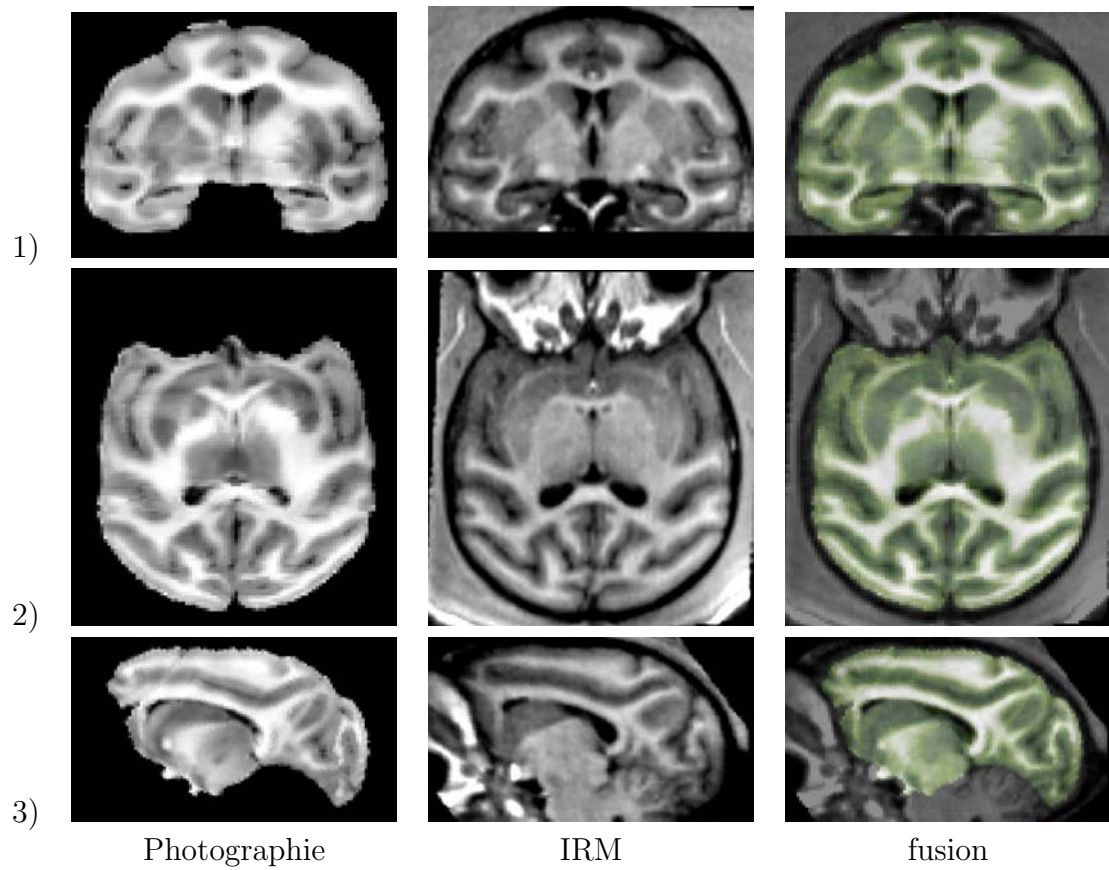


FIG. 3.20 – Correction de déformation du volume photographique par transformation FFD vers l'IRM pour le macaque (incidences coronale 1), axiale 2) et sagittale 3) ). La photographie est en fausses couleurs vertes dans les images de fusion. Les principales différences de volume sont corrigées.

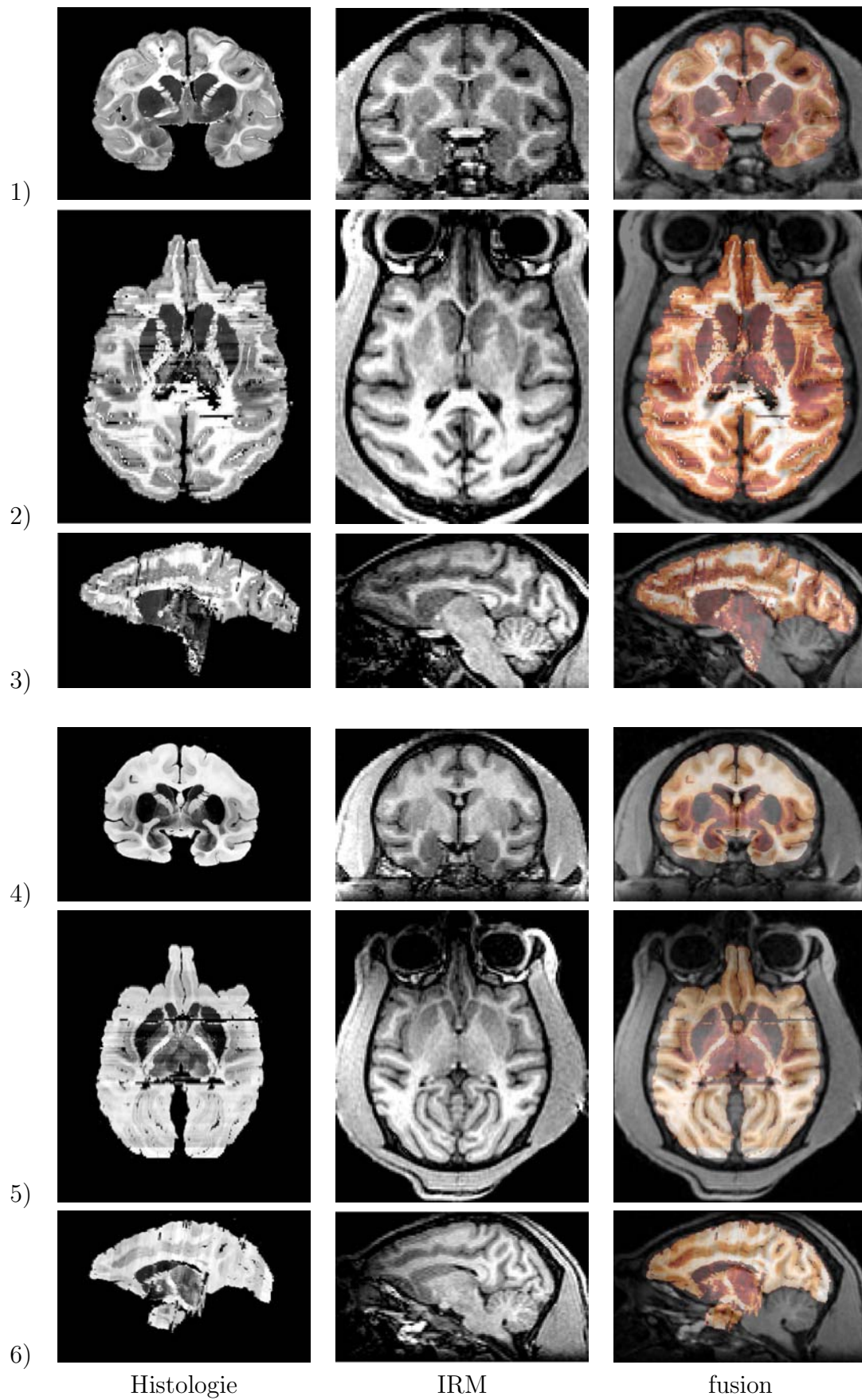


FIG. 3.21 – Recalage d'initialisation du volume histologique avec l'IRM en utilisant la transformation estimée pour le volume photographique pour les babouins I et II respectivement (incidences coronale 1) et 4), axiale 2) et 5), et sagittale 3) et 6) ). L'histologie est en fausses couleurs orangées dans les images de fusion. Des différences de volume importantes sont visibles.



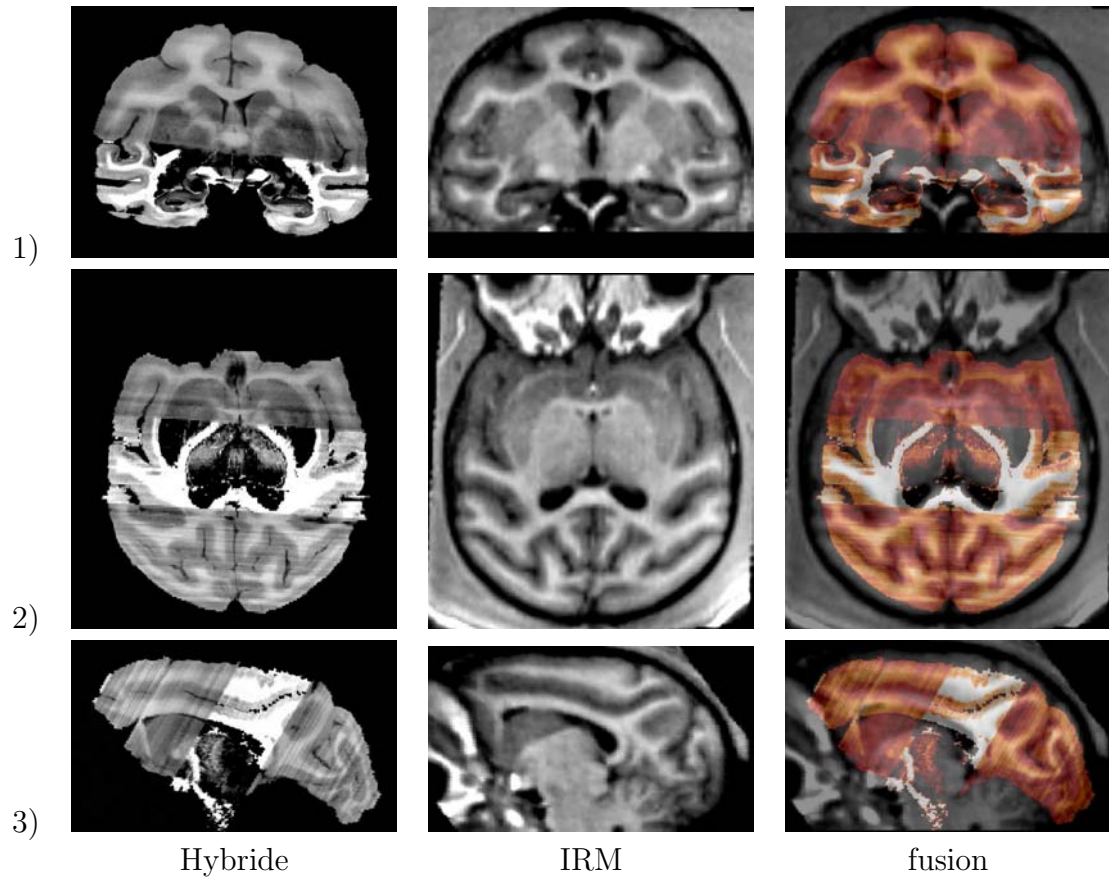


FIG. 3.22 – Recalage d'initialisation du volume histologique avec l'IRM en utilisant la transformation estimée pour le volume photographique pour le macaque (incidences coronale 1), axiale 2) et sagittale 3) ). L'histologie est en fausses couleurs orangées dans les images de fusion. Des différences de volume importantes sont visibles.



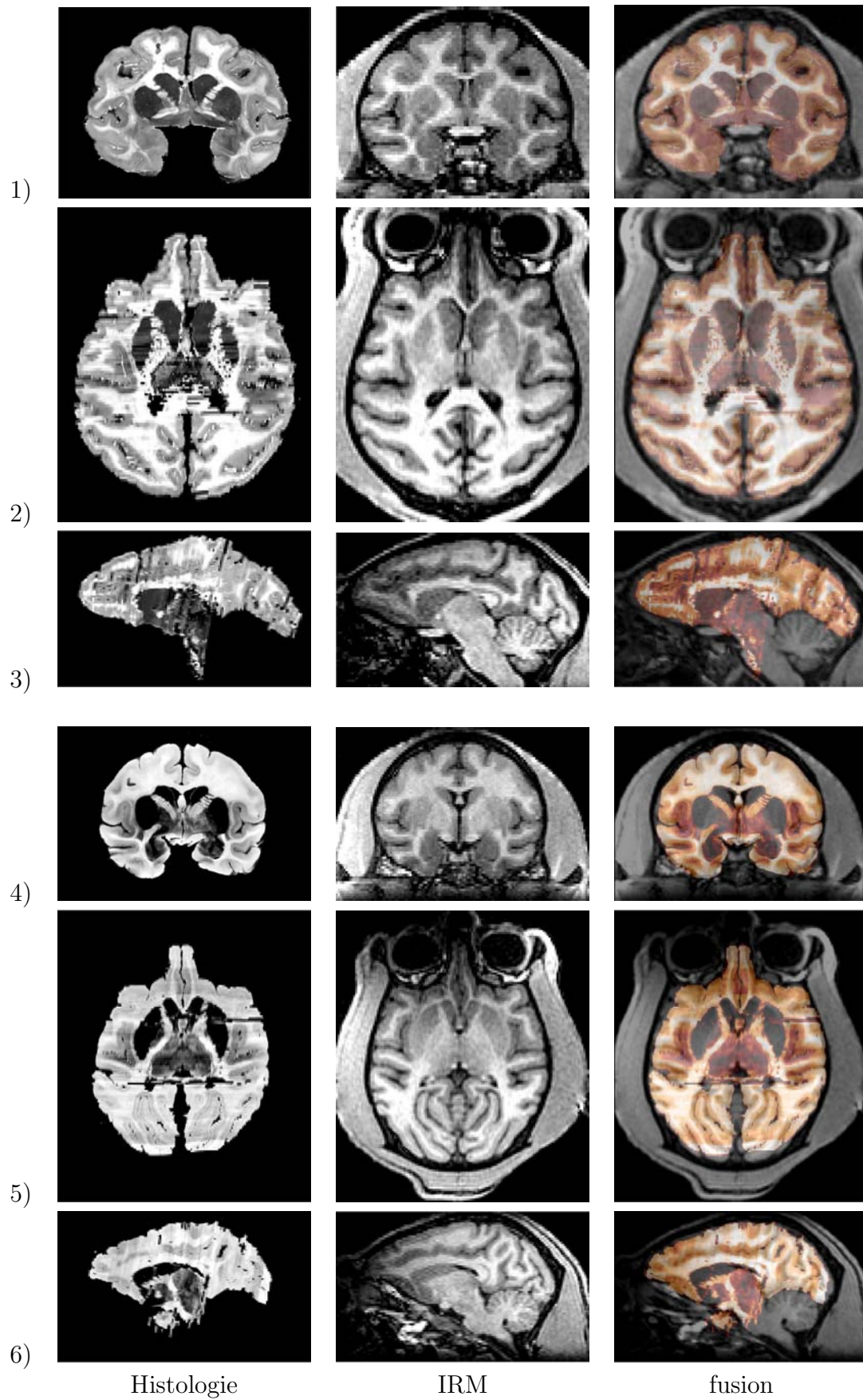


FIG. 3.23 – *Correction de déformation du volume histologique en utilisant la transformation FFD estimée entre le volume photographique et l'IRM pour les babouins I et II respectivement (incidences coronale 1) et 4), axiale 2) et 5), et sagittale 3) et 6) ). L'histologie est en fausses couleurs orangées dans les images de fusion. Les principales différences de volume sont également corrigées.*

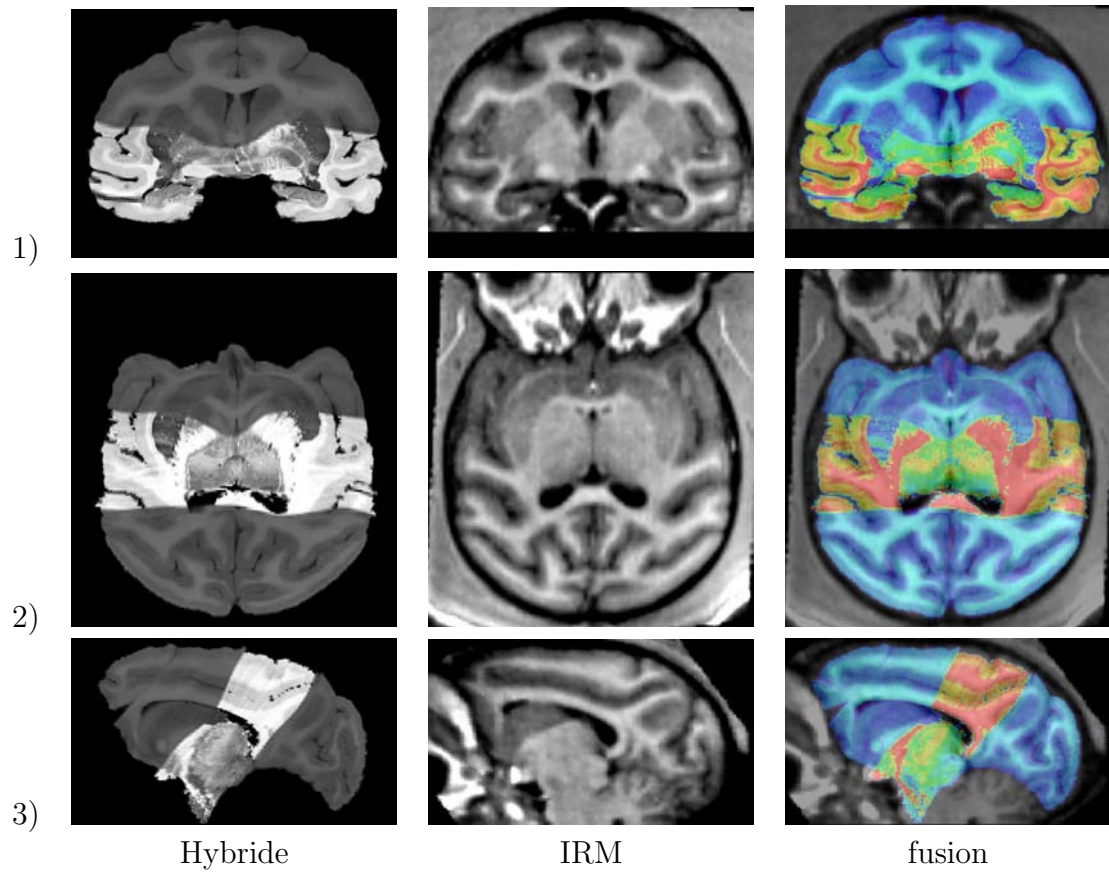


FIG. 3.24 – Correction de déformation du volume histologique hybride en utilisant la transformation FFD estimée entre le volume photographique et l'IRM pour le macaque (incidences coronale 1), axiale 2) et sagittale 3) ). L'histologie est en fausses couleurs orangées dans les images de fusion. Les principales différences de volume sont également corrigées.

synthétisent les résultats obtenus pour les babouins I et II. Notons que pour le babouin II, l'IRM *post mortem* n'a pas été réalisée et que les données étant légèrement de moins bonne qualité, la segmentation entre matière blanche et matière grise s'est avérée moins précise (d'où des pourcentages de contraction pour ces deux tissus très différents de ceux du babouin I).

Pour des raisons de qualité et de disponibilité des données, tous les mêmes paramètres n'ont pas pu être calculés pour les deux animaux (IRM *post mortem* non disponible et données histologiques de moins bonne qualité ).

	Volume ( $cm^3$ )	Coefficient de contraction
IRM	$V_{IRM} = 132$	1
IRM matière blanche	$V_{IRM_B} = 60$	1
IRM matière grise	$V_{IRM_G} = 72$	1
IRM <i>post mortem</i>	$v_{IRM} = 124$	0.94
Volume histologique cerveau total (avant FFD)	$v_{histo} = 113$	0.85
Volume histologique cerveau total (après FFD)	$V_{histo} = 135$	1.02

TAB. 3.1 – *Volumes et coefficients de contraction calculés pour le cerveau entier, uniquement la matière blanche et uniquement la matière grise, dans sa géométrie originale (représentée par l'IRM), dans sa géométrie post mortem et après correction élastique de la contraction propre à l'histologie pour le babouin I.*

Nous pouvons noter que le pourcentage de contraction total du cerveau *post mortem* par rapport au cerveau *in vivo* semble stable et de l'ordre de 15% pour les deux animaux traités.

	Volume ( $cm^3$ )	Coefficient de contraction
IRM cerveau total	$V_{IRM} = 143$	1
IRM matière blanche	$V_{IRM_B} = 41$	1
IRM matière grise	$V_{IRM_G} = 102$	1
Volume histologique cerveau total (avant FFD)	$v_{histo} = 122$	0.85
Volume histologique cerveau total (après FFD)	$V_{histo} = 138$	0.97

TAB. 3.2 – *Volumes et coefficients de contraction calculés pour le cerveau dans sa géométrie originale (représentée par l'IRM) et dans sa géométrie post mortem pour le babouin II.*

## Précision de la déformation FFD

Pour les déformations estimées par FFD, il est encore plus difficile que pour les transformations affines d'estimer la précision des recalages effectués puisque la transformation n'est pas globale. La déformation peut être de très bonne précision dans une région de l'image et peu précise ailleurs. Estimer une erreur moyenne ne renseignerait pas précisément sur la qualité de la déformation.

Quelques travaux se sont penchés sur la précision d'un recalage : [GBR<sup>+</sup>99] en utilisant des repères anatomiques placés manuellement, [FGB<sup>+</sup>99] pour des recalages 2D de coupes histologiques, [HBC<sup>+</sup>03] en utilisant principalement les sillons extraits automatiquement et récemment [CGH04] qui propose une méthode automatique utilisant l'image résiduelle.

L'étude des grilles de déformation pour les déformations non affines est d'un grand intérêt pour évaluer la pertinence de la transformation. L'extraction manuelle de régions d'intérêt et l'examen de l'amélioration de la mise en correspondance locale de chacune des structures extraites paraît une des méthodes les plus efficaces pour l'évaluation. Nous nous sommes restreints généralement à une analyse visuelle en fusion des images recalées, ce qui ne constitue pas une évaluation suffisante pour comparer des méthodes différentes

par exemple, mais permet d’apprécier malgré tout de façon qualitative la précision de l’estimation (voir également encore l’étude concernant le babouin I sur la qualité de mise en correspondance des contours et des sillons décrite dans [DDC<sup>+</sup>03]).

Nous présentons en **Figure 3.25** une validation supplémentaire pour le macaque : il s’agit de la superposition des contours extraits de l’IRM avec le volume hybride histologie-photographie avant et après correction FFD afin de pouvoir apprécier l’efficacité du recalage. La régularité de la transformation FFD peut également être appréciée sur la **Figure 3.26** qui représente la déformation d’une grille régulière en fusion avec l’image du volume hybride toujours chez le macaque.

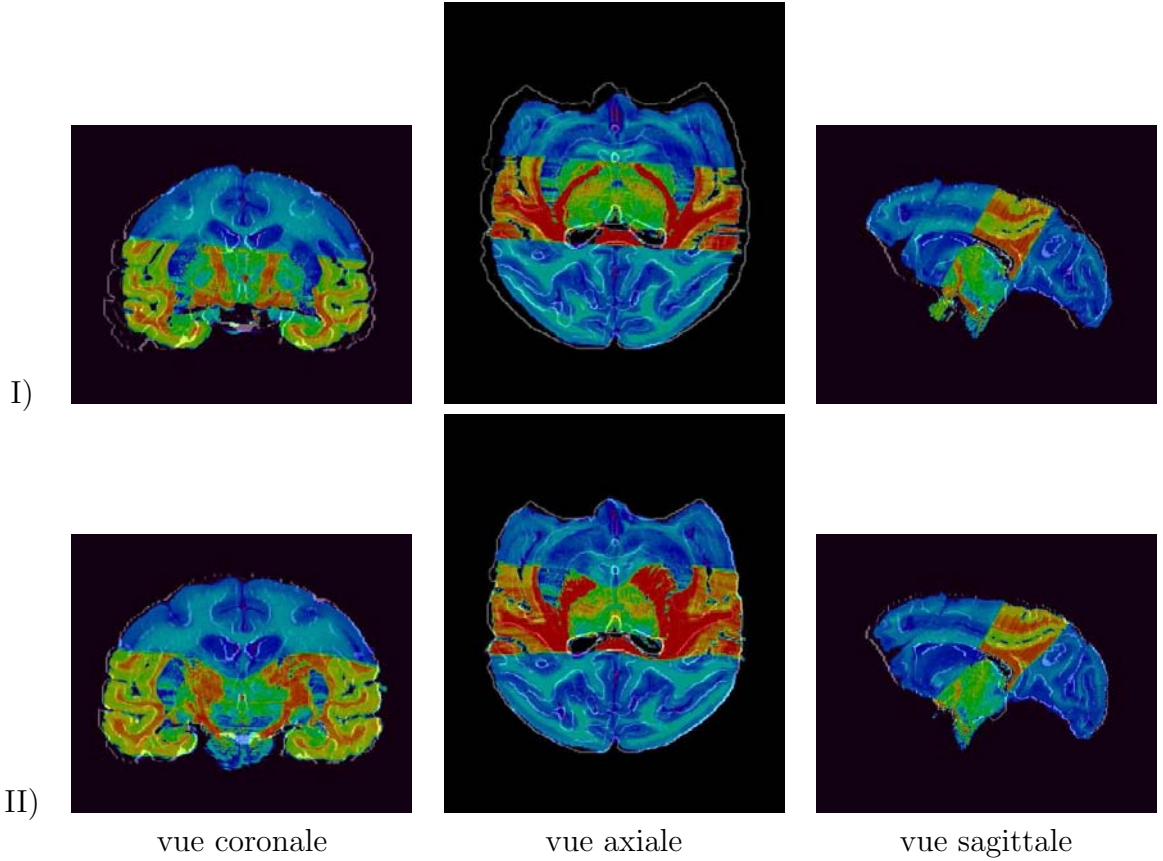


FIG. 3.25 – Images de fusion entre les contours de l’IRM et l’image hybride histologie-photographie pour le macaque avec simple initialisation rigide I et après correction FFD II) sous les 3 incidences (volume hybride en fausses couleurs arc-en-ciel).

## 3.5 Constitution d’un atlas du thalamus

### 3.5.1 Histologie et noyaux thalamiques

#### Capacité de différenciation de l’histologie marquée

La nouvelle modalité IPM présente la caractéristique d’être extrêmement résolue. Les volumes histologiques de cette étude ont été dégradés à une résolution déjà excellente de  $0.1 \times 0.1 \times 0.72mm$  pour pouvoir être manipulés plus aisément, mais ils ont en réalité été acquis à une résolution 5 fois supérieure dans le plan, et potentiellement 18 fois supérieure



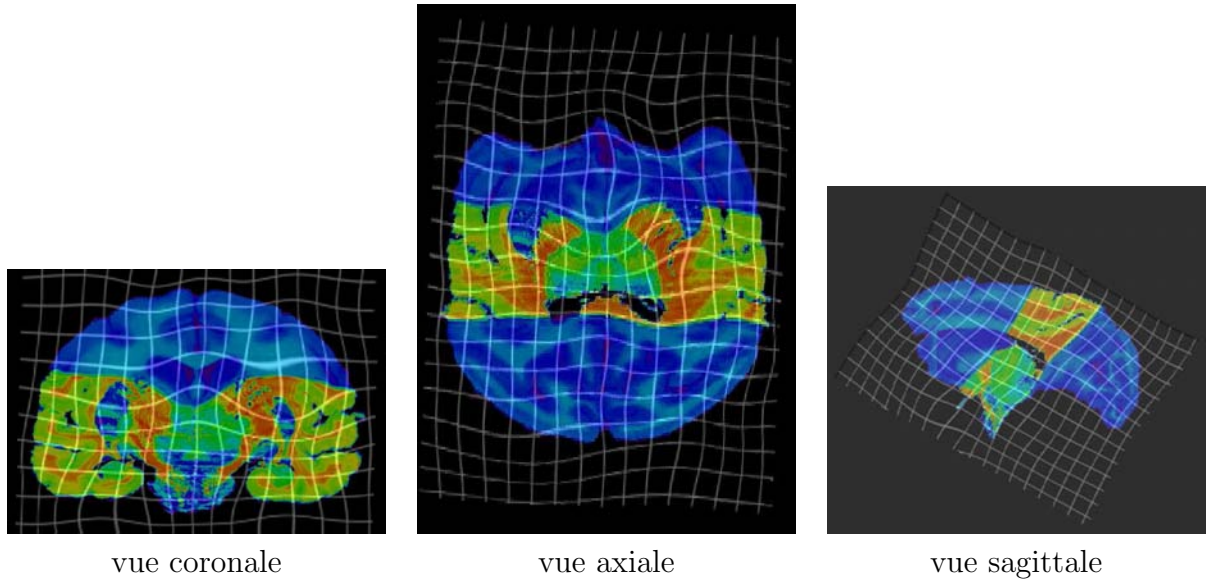


FIG. 3.26 – *Superposition d’une grille régulière avec l’image hybride histologie-photographie pour le macaque après déformation FFD sous les 3 incidences (volume hybride en fausses couleurs arc-en-ciel). La transformation ne présente pas de singularités.*

en Z. Il n’y a pas de limite à la résolution d’acquisition : des informations microscopiques peuvent parfaitement être tirées de ces coupes (voir la partie “Du micro au macro” du chapitre 5). Outre la résolution, l’étude sur coupes marquées apporte des possibilités de différenciation des structures très fines extrêmement variées, par des colorations adaptées, qu’aucune autre modalité *in vivo* ne peut égaler à l’heure actuelle.

Ainsi, le thalamus qui est une structure centrale du cerveau, relais de la plupart des connexions internes, se divise en différents noyaux pour le moment non décelables précisément sur aucune modalité *in vivo*. Par contre, ces noyaux peuvent très bien être distingués sur les coupes marquées, et donc sur l’IPM.

### Intérêt de la création d’un atlas du thalamus

La connaissance de la subdivision en noyaux est particulièrement intéressante dans les cas d’Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC) par exemple, où seuls les noyaux reliés à la région attaquée peuvent être touchés (voir [HMP<sup>+</sup>05] et chapitre 4). Une information précise sur la subdivision du thalamus en noyaux serait d’une grande utilité pour améliorer le diagnostic et décider de stratégies thérapeutiques dans les AVC, en particulier pour l’administration d’anticoagulant.

Un autre champ d’application important concerne la mise au point de ligands spécifiques pour les examens TEP pour pouvoir étudier les récepteurs nicotiniques. Or le thalamus est une structure où la densité des récepteurs nicotiniques est particulièrement importante, et différente d’un noyau à l’autre. L’étude de cette densité *in vivo* intervient dans la compréhension et la détection précoce des maladies neurodégénératives, dans le but de proposer des traitements efficaces. Ceci est actuellement impossible sur les modalités *in vivo*.

Enfin, des applications concernant la localisation d’activation en IRM fonctionnelle sont également intéressantes. Voilà pourquoi nous avons décidé de créer un atlas du tha-

lamus sur le volume IPM utilisable *in vivo*.

### 3.5.2 Segmentation manuelle sur coupes

#### De l’atlas papier vers l’atlas 3D

Les régions correspondant aux différents noyaux du thalamus ont été tracées manuellement par un expert en se basant sur un atlas papier ([PHT00]) directement sur les coupes histologiques marquées, coalignées avec les photographies. Une segmentation automatique de ces structures est très difficilement envisageable compte tenu de leur complexité : le regard expérimenté d’un expert paraît indispensable. Le logiciel Anatomist développé au Service Hospitalier Frédéric Joliot, CEA, Orsay ([RRC<sup>+</sup>03]) a été utilisé pour ces segmentations : il permet notamment d’associer le nom de la structure segmentée à la région d’intérêt. En effet, à ce stade, nous avons pu profiter de la cohérence tridimensionnelle apportée par le coalignement birigide pour pouvoir vérifier la qualité des segmentations dans toutes les incidences (voir **Figure 3.27**). Nous avons choisi par contre de ne pas effectuer la segmentation sur l’IPM rééchantillonnée tridimensionnellement vers l’IRM car nous voulions travailler sur les coupes avant le rééchantillonnage élastique 3D pour plus de précision.

#### Noyaux segmentés

Il existe une quinzaine de noyaux thalamiques. Certains sont très petits et leur segmentation n’aurait pas de sens dans le cadre d’une mise en correspondance avec une modalité *in vivo* du fait de la résolution. C’est pourquoi nous n’avons gardé que les principaux, à savoir, avec les couleurs associées : le groupe antérieur (en rose), le groupe médio latéral (en bleu foncé), le noyau géniculé latéral (en bleu clair), le noyau médio dorsal (en vert clair), le noyau géniculé médian (en vert foncé), le pulvinar (en jaune) et le groupe ventral antérieur (en rouge) soit 7 noyaux.

### 3.5.3 L’atlas du thalamus amené sur l’IRM

Les transformations 3D estimées précédemment, à savoir l’initialisation rigide et la transformation FFD, ont ensuite été appliquées à l’ensemble des régions tracées sur les coupes histologiques marquées. Le rééchantillonnage de l’atlas est effectué de la façon suivante :

- chacune des 7 régions est extraite de l’image de labels globale de façon à obtenir 7 images binaires différentes comportant une seule région chacune au niveau de gris 100,
- chaque image binaire de région est rééchantillonnée individuellement en utilisant une interpolation trilinéaire classique, donnant lieu à 7 images en niveaux de gris compris entre 0 et 100 (non binaires),
- chaque image en niveau de gris est seuillée pour ne garder que les voxels d’intensité supérieure à 50 (valeur moitié classique pour le rééchantillonnage d’image binaire),
- une compétition est réalisée entre ces 7 images seuillées pour constituer une seule image comportant en chaque voxel le label de l’image de région avec l’intensité la plus élevée en ce point.

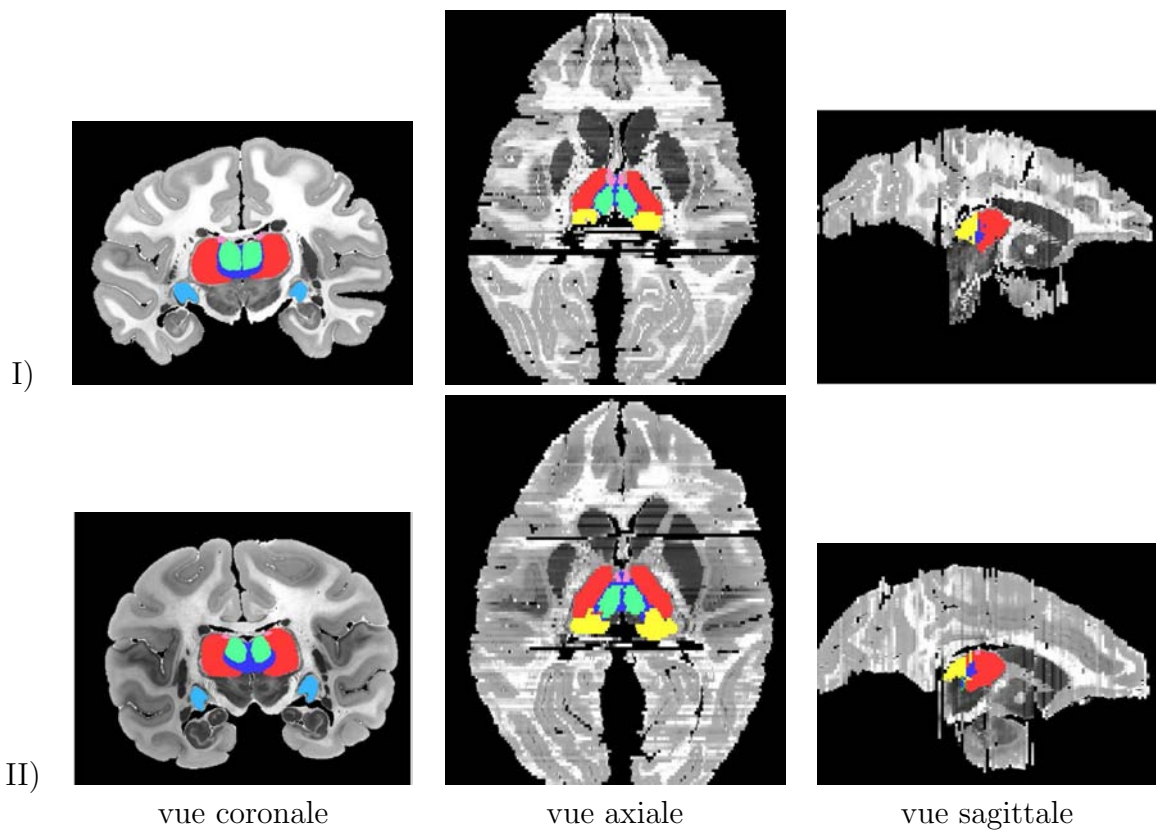


FIG. 3.27 – *Segmentation manuelle par un expert des principaux noyaux thalamiques superposée au volume histologique pour les babouins I et II, sous les 3 incidences (groupe antérieur en rose, groupe médio latéral en bleu foncé, noyau géniculé latéral en bleu clair, le noyau médio dorsal en vert clair, le noyau géniculé médian en vert foncé, le pulvinar en jaune et le groupe ventral antérieur en rouge).*

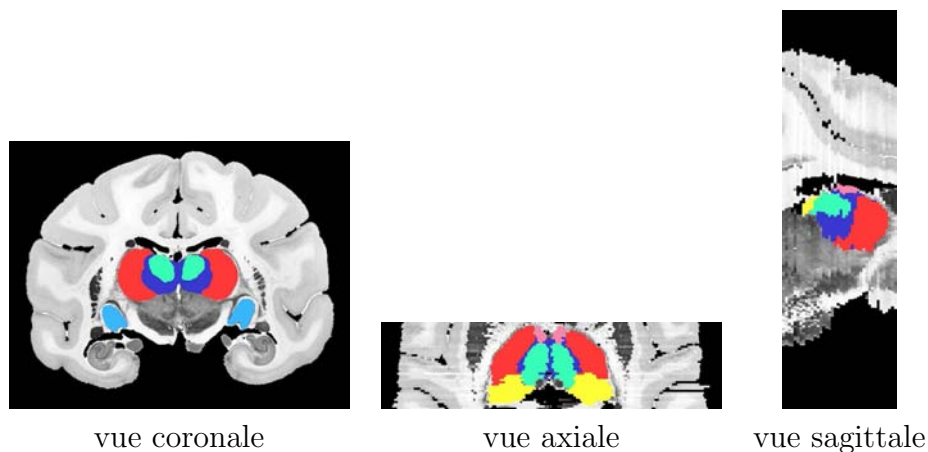


FIG. 3.28 – *Segmentation manuelle par un expert des principaux noyaux thalamiques superposée au volume histologique pour le macaque, sous les 3 incidences (groupe antérieur en rose, groupe médio latéral en bleu foncé, noyau géniculé latéral en bleu clair, le noyau médio dorsal en vert clair, le noyau géniculé médian en vert foncé, le pulvinar en jaune et le groupe ventral antérieur en rouge).*



De cette façon, nous obtenons les segmentations dans la configuration géométrique *in vivo* de l'IRM. La superposition des régions ainsi obtenues sur l'IRM permet de vérifier la bonne correspondance des contours externes du thalamus discernables sur l'IRM avec les contours externes de l'atlas (voir **Figure 3.29**). Ainsi, cet atlas permet de superposer les régions définies sur coupes histologiques, avec une définition adaptée à l'identification des noyaux thalamiques, sur l'IRM en 3D (voir **Figure 3.31**).

## 3.6 Validité de l'utilisation de l'atlas avec d'autres sujets

### 3.6.1 Précision histologique sans sacrifice ?

Chacun des atlas réalisés précédemment permet d'obtenir une information très fine sur le cerveau du babouin sur lequel il a été tracé. Mais le protocole pour l'obtention de ces atlas est lourd et nécessite le sacrifice des animaux. C'est pourquoi une idée naturelle est de vouloir déformer un des atlas réalisés, ou une moyenne des deux, pour s'adapter à l'IRM d'un babouin quelconque. Il s'agit donc d'effectuer un recalage inter-individus entre l'IRM correspondant à l'atlas et l'IRM du babouin sur lequel on voudrait l'adapter. C'est une démarche qui est assez fréquemment réalisée dans la littérature avec les atlas. La question sous-jacente reste pourtant de savoir dans quelle mesure il est pertinent de déformer un atlas réalisé sur un individu particulier vers un individu quelconque.

### 3.6.2 Trois transformations pour adapter l'atlas

#### Recalage inter-individus des IRMs

Pour répondre à cette question, nous avons appliqué cette démarche aux babouins de cette étude. C'est-à-dire que nous avons estimé une transformation entre l'IRM du babouin II, sur lequel l'atlas que l'on souhaite tester a été réalisé, et l'IRM du babouin I, sur lequel on voudrait l'utiliser. Nous avons testé 3 types de transformation : rigide, affine et FFD. Les résultats de ces recalages sont présentés en **Figure 3.32**.

#### Application à l'atlas

Nous avons ensuite déformé l'atlas du babouin II vers le babouin I à l'aide des transformations estimées entre les IRMs pour pouvoir comparer l'atlas déformé à l'atlas propre. Ceci est bien sûr rendu possible car le babouin I vers lequel l'atlas est déformé possède lui-même son propre atlas, réalisé sur l'histologie et donc servant de référence. Nous avons testé les 3 types de transformations pour cela : rigide, affine et transformation FFD. Les résultats sont présentés en **Figure 3.33**.

### 3.6.3 Évaluation de la qualité de superposition

#### Score de superposition

Pour évaluer la qualité de l'adaptation de l'atlas déformé à l'individu, nous avons calculé un score de superposition avec l'atlas propre. Ce score  $S(i,j)$ , calculé entre les

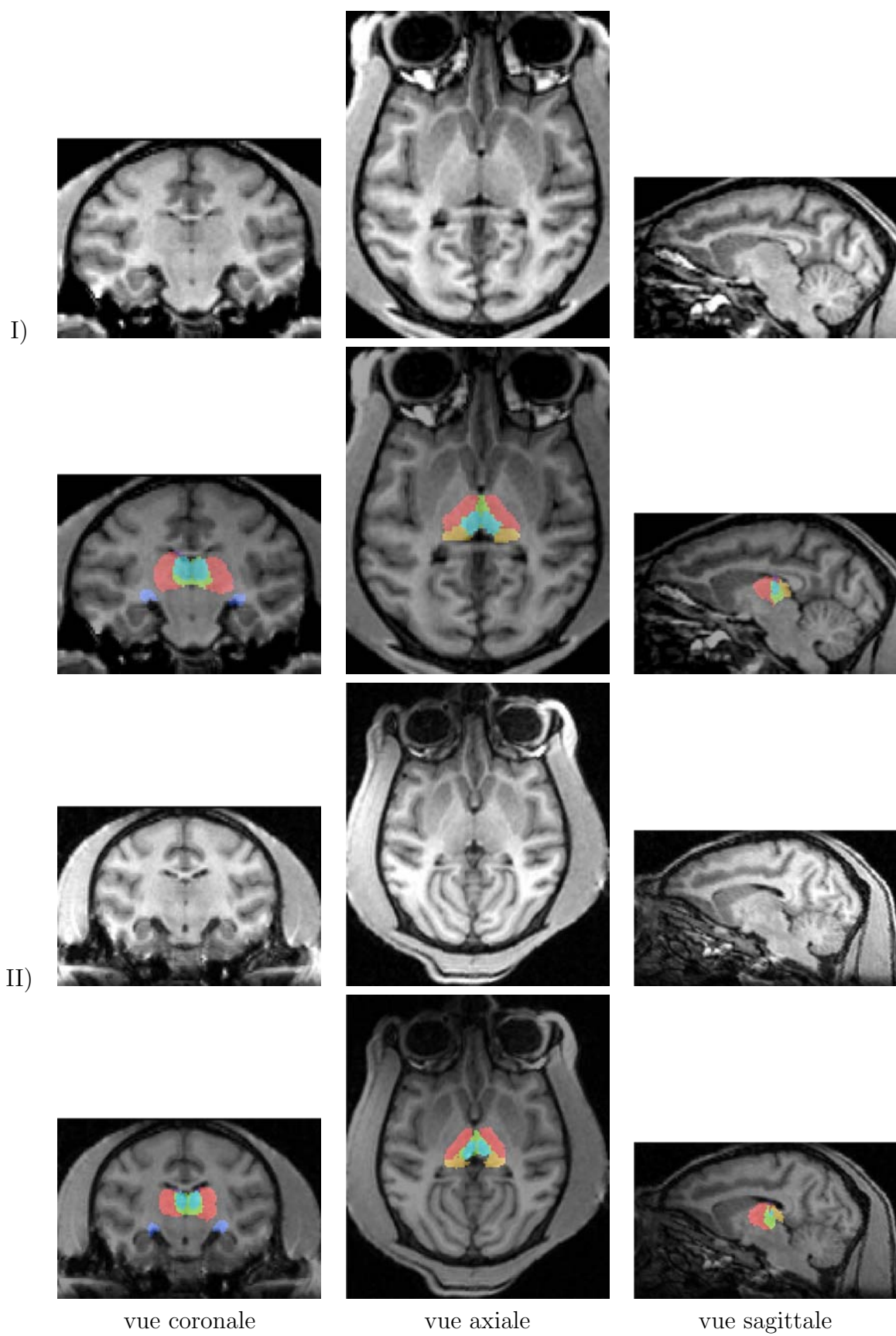


FIG. 3.29 – Visualisation de l'IRM in vivo (lignes 1 et 3) et de l'atlas du thalamus en superposition sur l'IRM (lignes 2 et 4) sous les 3 incidences pour les babouins I et II.

noyaux  $N_i$  et  $N_j$ , est défini de la façon suivante ( $\text{card}(N)$  désigne le cardinal de l'ensemble  $N$ ) :

$$S(i, j) = \frac{\text{card}(N_i \cap N_j)}{\text{card}(N_i \cup N_j)}$$

Ce calcul de score est classique pour évaluer la superposition d'un ensemble de structures entre elles ([CRJ<sup>+</sup>04]). Pour l'ensemble des 7 noyaux du thalamus de l'atlas entre eux, ce score a été calculé, donnant lieu à une matrice  $7 \times 7$  pour chaque transformation regroupant tous les résultats présentés dans le **Tableau 3.3** (chaque label regroupe les noyaux droit et gauche).

## Résultats

Ce tableau montre une amélioration notable de la superposition entre la transformation rigide et la transformation affine, mais ce phénomène est beaucoup moins net entre la transformation affine et la transformation FFD. En effet, comme nous l'avons remarqué précédemment, la correction estimée est globale et plus particulièrement influencée par les différences importantes entre les volumes à recaler. Or, les plus grosses différences se situent au niveau du cortex, et non au niveau des structures centrales comme le thalamus, qui sont assez stables entre deux individus similaires. Pour certaines structures même, la superposition est moins bonne avec la transformation élastique qu'avec l'anne.

En conclusion de cette étude, nous pouvons dire que, plus le nombre de degrés de liberté de la transformation est important, meilleure est la mise en correspondance de façon globale. Néanmoins, le bénéfice apporté par l'utilisation de transformations élastiques par rapport aux transformations affines n'est pas véritablement significatif pour amener l'atlas d'un sujet particulier dans la géométrie d'un sujet quelconque. Grâce à cette étude, nous allons pouvoir utiliser l'IPM, ainsi que les atlas créés grâce à l'IPM, pour valider des techniques de segmentations réalisées sur imagerie de diffusion *in vivo*.

Noyaux	1	2	3	4	5	6	7
1	<b>0.175</b>	0.000	0.002	0.000	0.001	0.000	0.000
2	0.000	<b>0.127</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.025	0.000	<b>0.478</b>	0.000	0.056	0.002	0.006
4	0.000	0.007	0.000	<b>0.221</b>	0.000	0.000	0.006
5	0.068	0.000	0.158	0.000	<b>0.213</b>	0.012	0.017
6	0.000	0.050	0.003	0.009	0.003	<b>0.433</b>	0.055
7	0.013	0.000	0.015	0.000	0.033	0.00	<b>0.543</b>

Transformation Rigide

Noyaux	1	2	3	4	5	6	7
1	<b>0.234</b>	0.000	0.007	0.000	0.003	0.000	0.000
2	0.000	<b>0.391</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.017	0.000	<b>0.497</b>	0.000	0.053	0.009	0.003
4	0.000	0.015	0.000	<b>0.318</b>	0.000	0.000	0.001
5	0.037	0.000	0.146	0.000	<b>0.281</b>	0.016	0.013
6	0.000	0.032	0.001	0.015	0.001	<b>0.503</b>	0.041
7	0.011	0.000	0.019	0.000	0.042	0.006	<b>0.606</b>

Transformation Affine

Noyaux	1	2	3	4	5	6	7
1	<b>0.324</b>	0.000	0.006	0.000	0.005	0.000	0.010
2	0.000	<b>0.461</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.004	0.000	<b>0.524</b>	0.000	0.084	0.007	0.009
4	0.000	0.014	0.000	<b>0.350</b>	0.000	0.000	0.000
5	0.022	0.000	0.101	0.002	<b>0.307</b>	0.014	0.032
6	0.000	0.033	0.002	0.012	0.001	<b>0.497</b>	0.041
7	0.001	0.000	0.007	0.001	0.027	0.004	<b>0.584</b>

Transformation FFD

TAB. 3.3 – Score de superposition des différents noyaux entre eux de l’atlas du babouin II recalé sur l’atlas du babouin I par 3 types de transformations. La correspondance des numéros avec les noms des noyaux et les couleurs de la **Figure 3.33** est la suivante : 1 pour groupe antérieur (rose), 2 pour noyau géniculé latéral (bleu clair), 3 pour noyau médio dorsal (vert clair), 4 pour noyau géniculé médian (vert foncé), 5 pour groupe médio latéral (bleu foncé), 6 pour pulvinar (jaune) et 7 pour groupe ventral antérieur (rouge). Le score de superposition des mêmes noyaux est indiqué en gras.

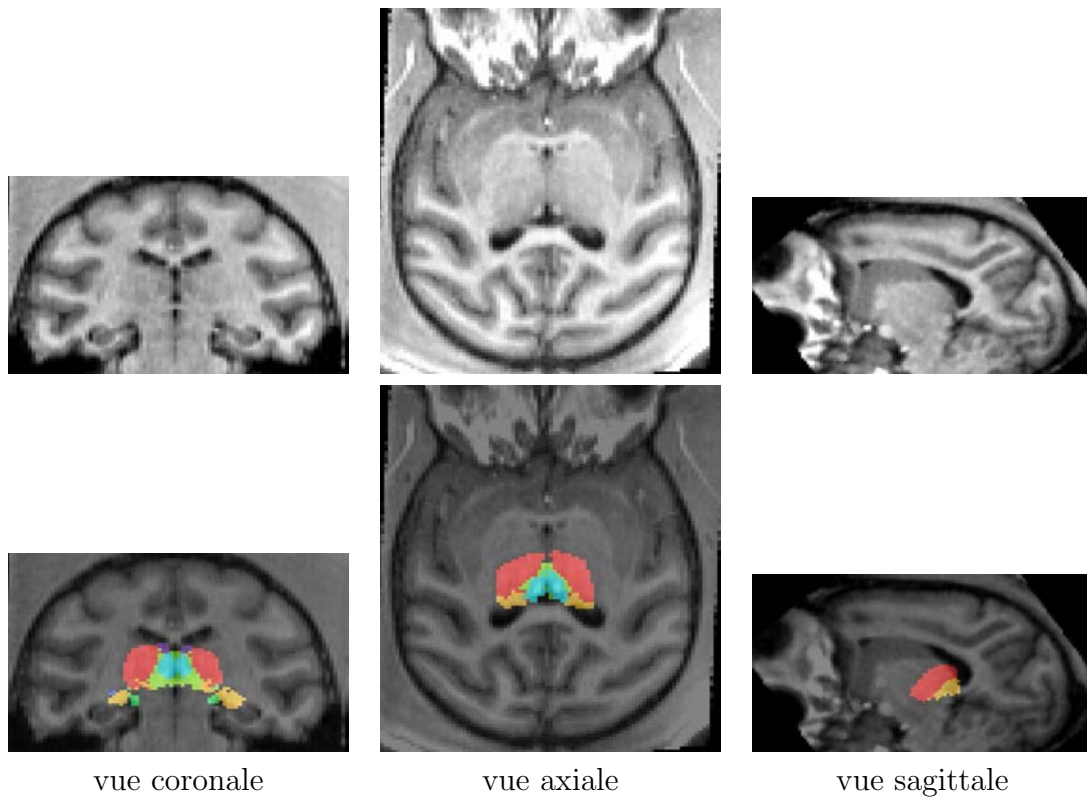
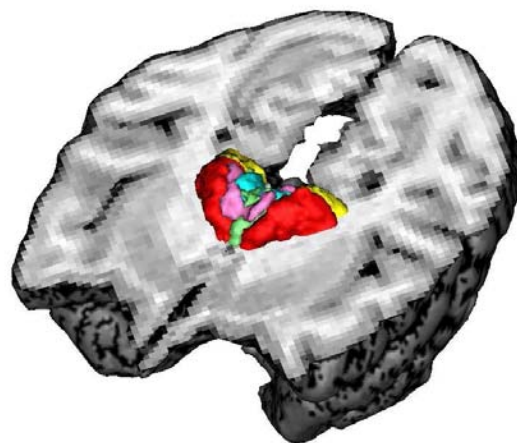
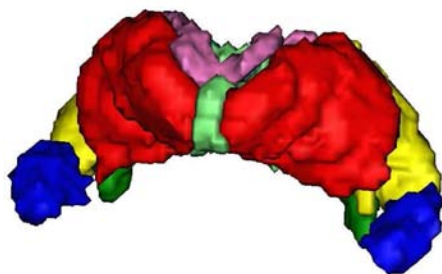
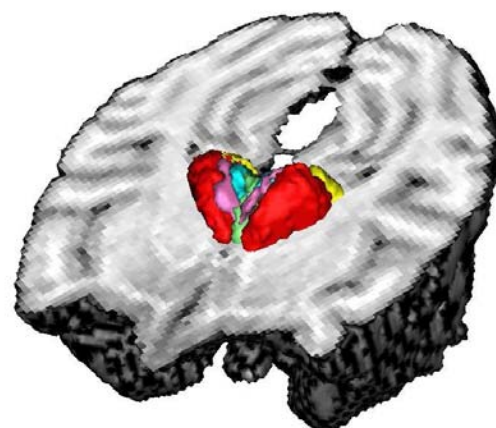
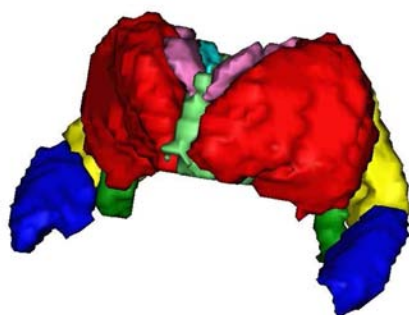


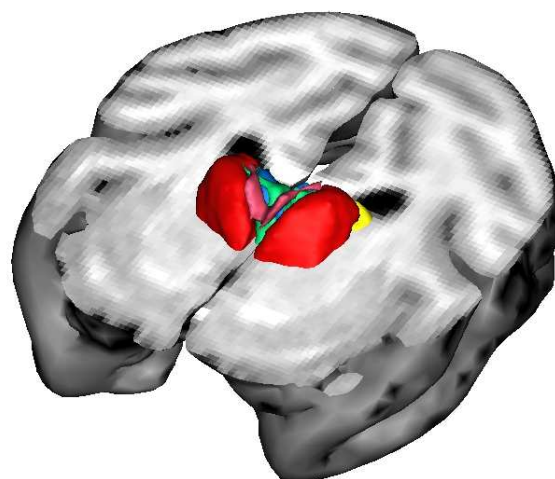
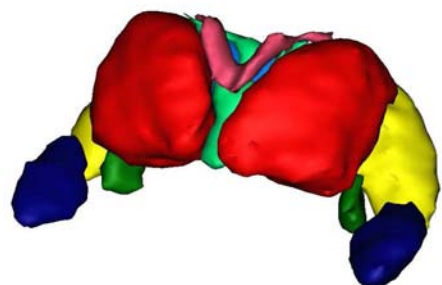
FIG. 3.30 – *Visualisation de l'IRM in vivo (lignes 1) et de l'atlas du thalamus en superposition sur l'IRM (lignes 2) sous les 3 incidences pour le macaque.*



I)



II)



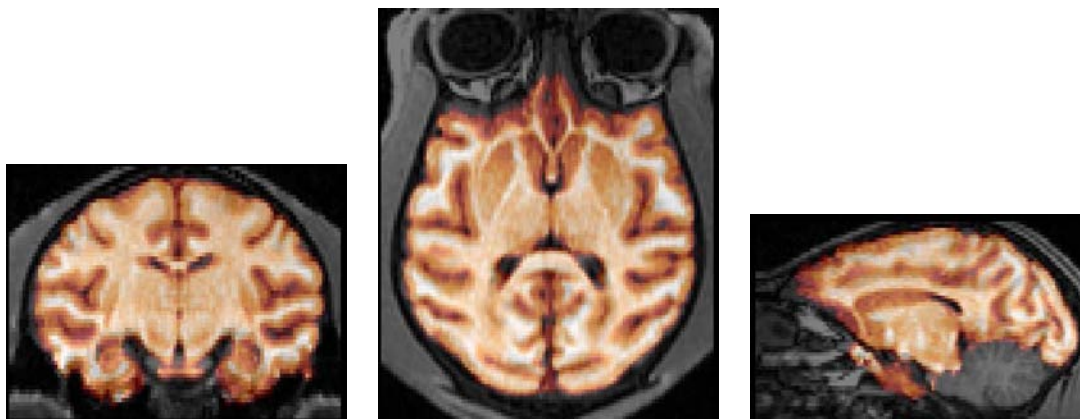
mac)

Atlas 3D

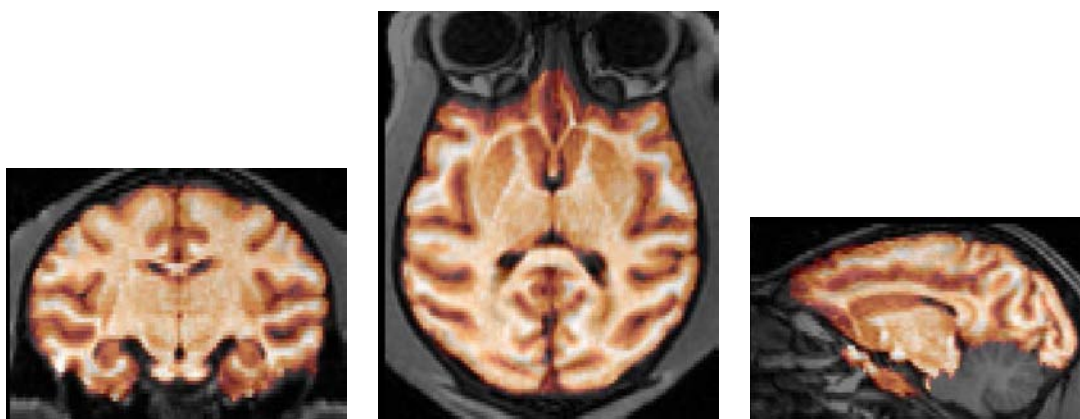
Atlas sur l'IRM 3D

FIG. 3.31 – Rendus tridimensionnels de l'atlas des noyaux du thalamus et du repositionnement dans l'IRM pour les babouins I et II et pour le macaque (mac).

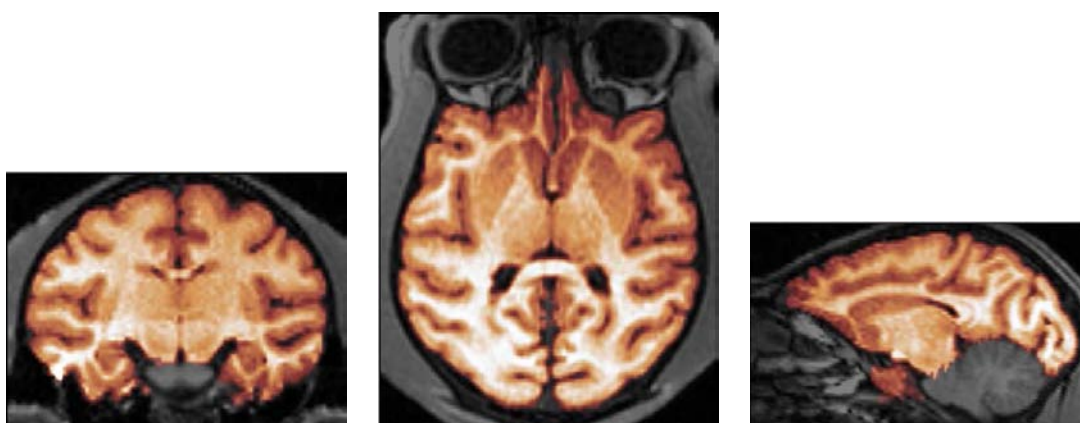




Transformation RIGIDE



Transformation AFFINE



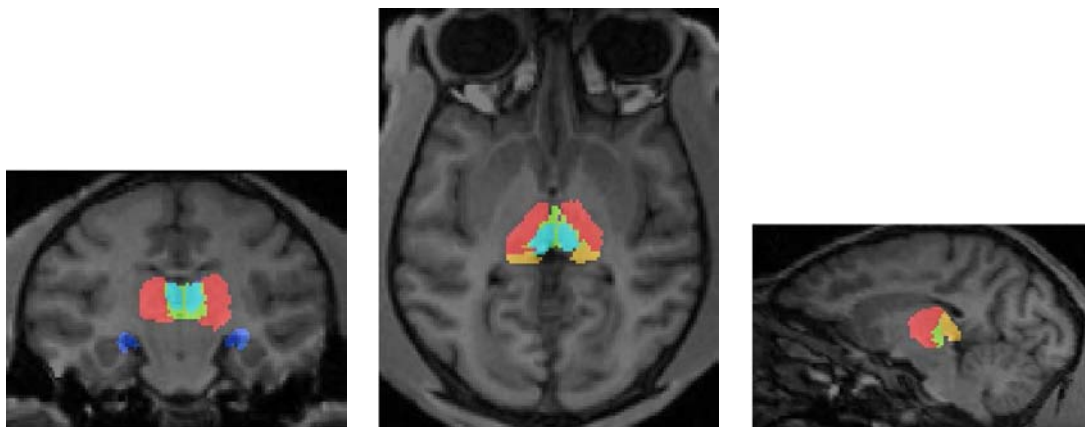
Transformation FFD

Vue coronale

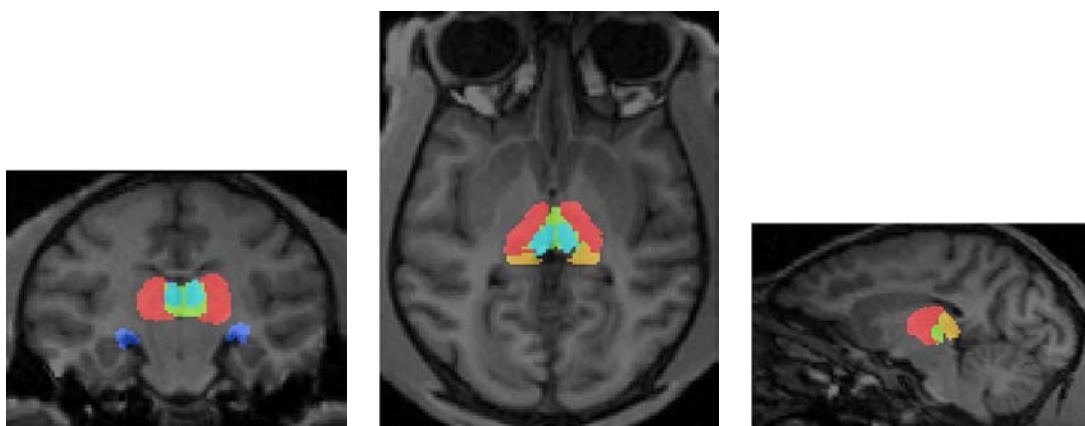
Vue axiale

Vue sagittale

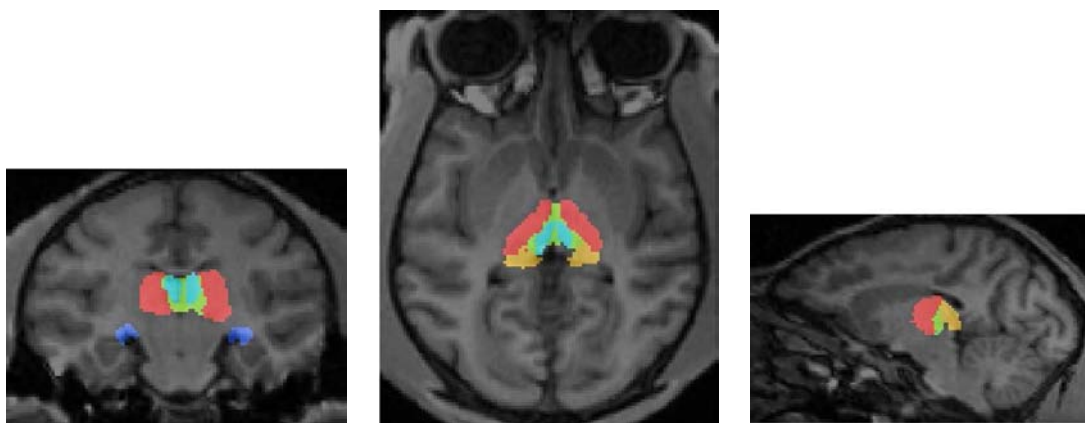
FIG. 3.32 – Images de fusion suivant 3 incidences présentant le recalage entre le babouin II (en fausses couleurs orangées, cerveau segmenté) et le babouin I (IRM complète) par 3 types de transformations au nombre de degrés de liberté croissants : rigide, affine et FFD. La qualité de la mise en correspondance croît globalement avec le nombre de degrés de liberté (différences principalement visibles en incidence axiale dans la région du cortex frontal).



Transformation RIGIDE



Transformation AFFINE



Transformation FFD

Vue coronale

Vue axiale

Vue sagittale

FIG. 3.33 – *Superposition de l'atlas réalisé sur le babouin II déformé sur l'IRM du babouin I par les transformations aux degrés de liberté croissants (groupe antérieur en rose, groupe médio latéral en bleu foncé, noyau géniculé latéral en bleu clair, le noyau médio dorsal en vert clair, le noyau géniculé médian en vert foncé, le pulvinar en jaune et le groupe ventral antérieur en rouge.)*





# Chapitre 4

## IRM de diffusion et segmentation du thalamus

*Nous parlerons d'abord dans cette partie de segmentation des noyaux thalamiques par IRM de diffusion en rappelant les techniques proposées jusqu'alors. Nous proposons également une méthode robuste originale de segmentation basée sur l'information de diffusion inspirée des méthodes existantes. Les segmentations réalisées chez 3 sujets humains sains sont ainsi présentées. Cette méthode in vivo est ensuite appliquée à la segmentation des groupes nucléaires du thalamus chez un babouin. Les résultats obtenus sont ensuite confrontés à un des deux atlas réalisés sur coupes histologiques marquées au chapitre 3.*

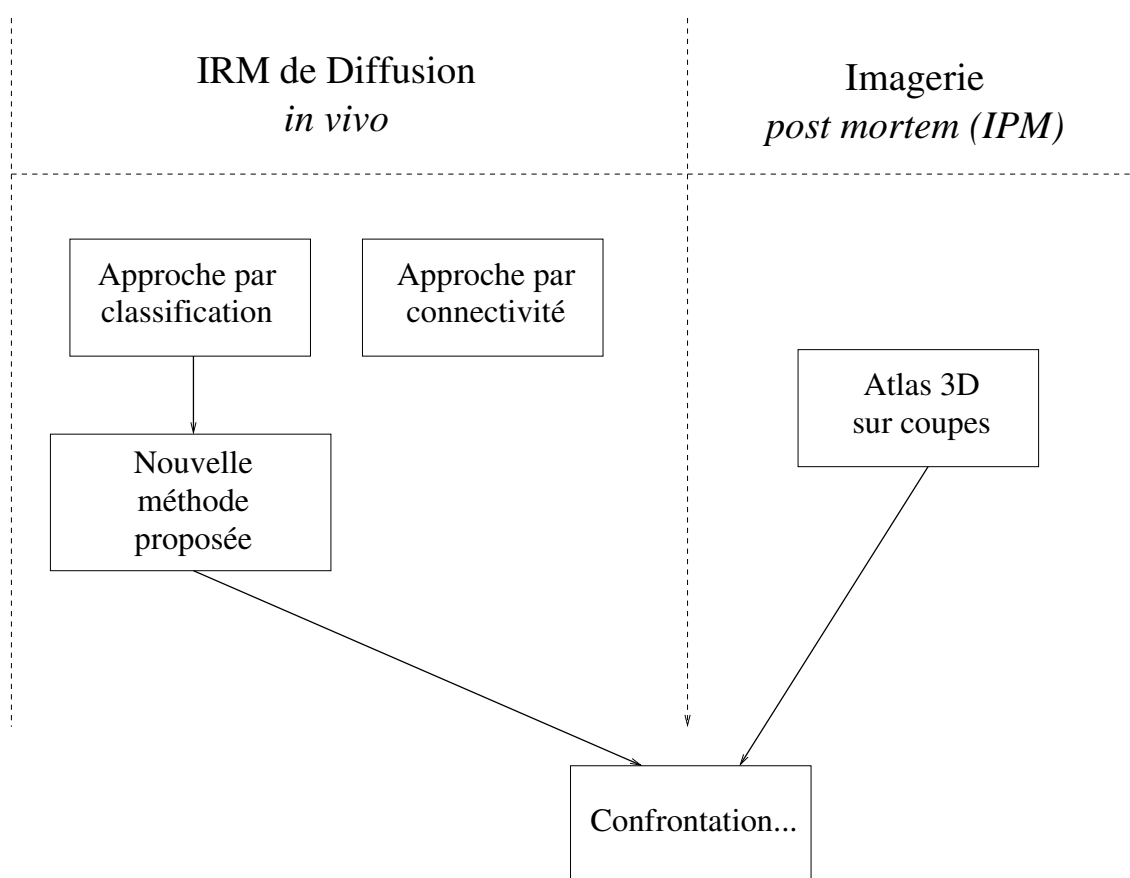


FIG. 4.1 – Les principales étapes de ce chapitre.

## 4.1 Signal de diffusion et noyaux thalamiques

L'étude des données d'IRM de diffusion est variée, depuis l'étude directe des cartes d'anisotropie jusqu'aux traitements plus complexes comme le suivi de faisceaux de fibres.

### 4.1.1 Parcellisation du thalamus

Nous nous intéressons à une branche un peu moins explorée que le suivi de faisceaux de fibres mais en plein essor : il s'agit de la segmentation de structures internes à partir des informations d'imagerie de diffusion. Nous allons plus particulièrement nous consacrer aux techniques concernant la sur-segmentation du thalamus qui est la structure du cerveau la plus fréquemment traitée pour ce type d'applications.

En effet, c'est le lieu de terminaison de la plupart des voies sensitives et il présente des connexions avec le cervelet, le pallidum, le striatum et l'hypothalamus. Le thalamus réalise ainsi une fonction centrale puisqu'il fait partie de la plupart des systèmes du cerveau. Ces nombreuses connexions expliquent qu'il soit constitué de plusieurs groupes nucléaires de structures différentes (voir [Kah79] et **Figure 4.2**). La segmentation de ces groupes nucléaires a une importance pratique, puisque de nombreux troubles moteurs et des algies <sup>1</sup> sont traités par des interventions sur certains territoires particuliers du thalamus.

Il est possible de distinguer 4 grands groupes nucléaires représentés en couleurs sur la **Figure 4.2** : le groupe nucléaire antérieur (BD5) (en jaune), le groupe nucléaire médial (BD6) (en rose), le groupe nucléaire latéral (CD7) (en bleu) et le groupe nucléaire postérieur (principalement BC8-9-10) (en blanc).

Précisons que dans toutes les méthodes présentées, le thalamus global est préalablement segmenté à la main et le masque global obtenu est utilisé pour lancer les segmentations automatiques en sous-noyaux. Des méthodes automatiques de segmentation du thalamus global existent (voir [Pou99b] pour un exemple de méthode et un état de l'art) mais ne font pas l'objet de cette partie.

### 4.1.2 État de l'art

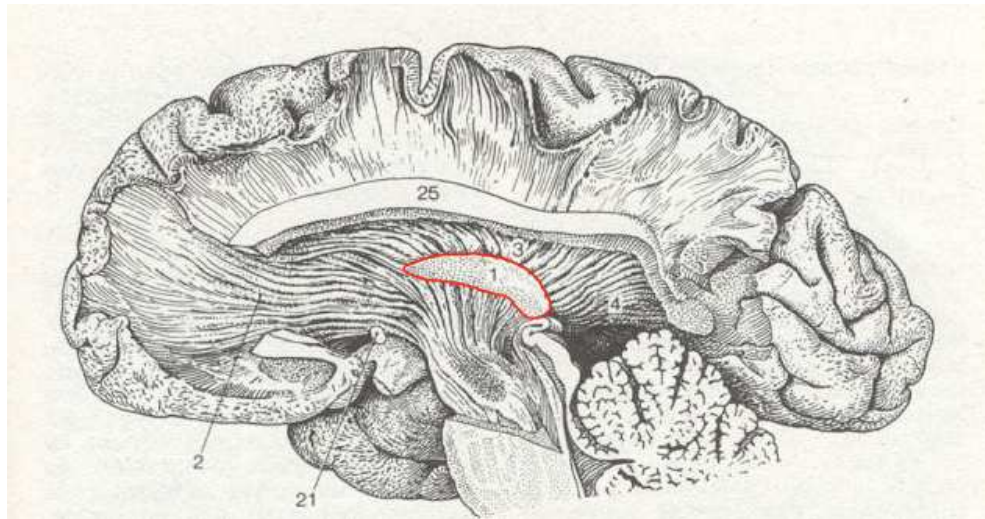
La structure nucléaire du thalamus est corrélée à ses différentes connections avec le reste du cerveau. Le signal de diffusion donne en chaque point une information sur la mobilité directionnelle des molécules d'eau. Cette mobilité dépend de l'environnement et en particulier de l'agencement local des fibres axonales. Le signal de diffusion serait donc capable de fournir une signature caractéristique de certains territoires du thalamus. Deux principales classes de méthodes pour parvenir à segmenter le thalamus à partir des données de diffusion ont émergé de cette idée.

#### Classification

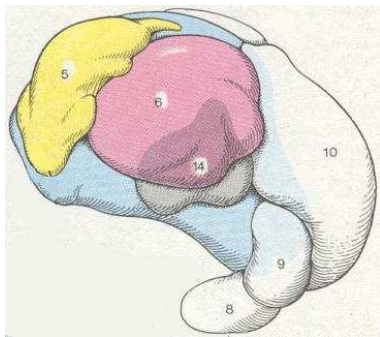
Le premier type de méthode consiste à utiliser des classifieurs pour regrouper les voxels du thalamus les plus similaires au sens d'une distance particulière. Pour cela, des attributs sont choisis pour chaque voxel utilisant les données de diffusion. La méthode la plus connue utilise comme attributs les coefficients du tenseur de diffusion (9 coefficients dont 6 indépendants) évalué en chaque voxel à partir des images des directions (voir [BML94]

---

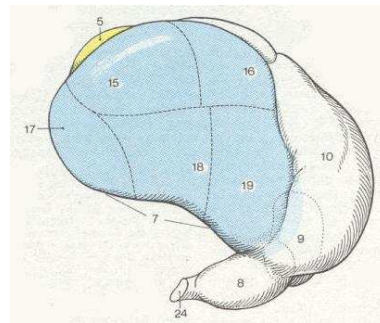
<sup>1</sup>Douleurs.



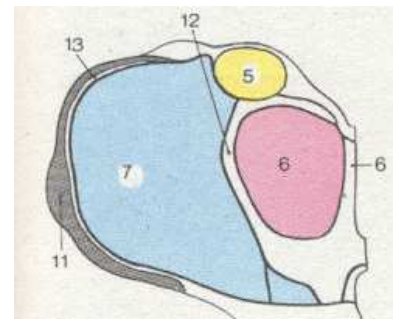
A Coupe sagittale de cerveau humain : dissection des fibres (d'après Ludwig et Klingler)



B Thalamus vue interne



C vue externe



D coupe axiale

FIG. 4.2 – Légende des figures : thalamus (A1) (entouré de rouge), pédoncules thalamiques antérieur (A2), supérieur (A3) et postérieurs (A4), groupe nucléaire antérieur (BD5) (en jaune), groupe nucléaire médial (BD6) (en rose), groupe nucléaire latéral (CD7) (en bleu), corps géniculé latéral (BC8) et médial (BC9), le pulvinar (BC10), noyau réticulaire (BC11), lame médullaire interne (D12) et externe (D13), noyau centromédian (B14), noyaux latéraux dorsal (C15) et postérieur (C16), noyaux ventraux antérieur (C17), latéral (C18) et postérieur (C19). Cette planche anatomique est extraite de [Kah79] (p.167).

pour la définition du tenseur de diffusion), plus les coordonnées spatiales et opère une classification par la méthode des *k-means* (consulter [HW79] pour une description des *k-means*). La distance alors utilisée est une combinaison linéaire entre la distance entre tenseurs et la distance entre les coordonnées spatiales de chaque voxel. La distance entre tenseurs peut être la distance de Frobenius, la distance euclidienne classique mais aussi une métrique riemannienne (voir [PFA04] et [LRRF04]). La distance entre les coordonnées spatiales peut quant à elle être la distance de Mahalanobis ou la distance euclidienne classique par exemple.

L'article de [WTLW03] est sans doute le premier décrivant ce type de méthode : une segmentation du thalamus en 14 noyaux par hémisphère de 4 sujets sains humains est réalisée en utilisant des images pondérées en diffusion à 6 directions. Une comparaison des centres de gravité des noyaux trouvés par cette méthode avec les centres de gravité des noyaux déduits d'un atlas histologique est effectuée et les positions respectives semblent

concorde.

Cependant, la compréhension de l'information guidant réellement la segmentation dans ce genre de méthode hybride est délicate car la part de l'initialisation et de la simple information spatiale lors de la classification prévaut peut-être sur une réelle utilisation de l'information de diffusion. Cette question est d'autant plus intéressante pour les sujets à l'anatomie non standard. Néanmoins, même si la possibilité de détecter des noyaux de quelques voxels comme le noyau ventral antérieur est soumise à question, l'idée initiale d'utiliser les coefficients de diffusion comme attributs est très intéressante et porteuse. Ce type de méthode sera qualifié d'*approche par classification*.

## Connectivité

Une deuxième classe de méthodes utilise la connectivité cérébrale pour segmenter le thalamus. Le principe en est le suivant : une parcellisation du cortex est réalisée (manuellement en général) donnant lieu à un ensemble de classes ayant un sens anatomique et/ou fonctionnel. Les frontières représentées par les différents sillons délimitant les aires corticales sont notamment utilisées pour cette parcellisation.

A partir de cette étape, les techniques de suivi de faisceaux de fibres (pour un exemple de cette technique, voir [MCCvZ99]) sont utilisées pour déterminer à quelles régions corticales sont reliés les différents voxels du thalamus. Chaque voxel du thalamus se voit donc assigner le label de la région corticale à laquelle il est relié, donnant lieu à une classification du thalamus en sous-structures.

L'article de référence décrivant ce type de méthode basé sur la connectivité cérébrale est probablement celui de [BJBW<sup>+</sup>03]. Dans ces travaux, une méthode spéciale de suivi de fibres probabilistes est utilisée pour pouvoir progresser dans la matière grise. Les voxels du thalamus se voient assigner une probabilité de connexion avec chacune des régions corticales, et la région à la probabilité la plus élevée l'emporte pour leur labellisation. Dans ces travaux, la parcellisation du cortex est manuelle : 4 puis 7 régions sont délimitées correspondant à des sites de connexion connus du thalamus. La segmentation obtenue est assez stable sur 8 sujets et semble ressembler à la segmentation en groupes nucléaires d'un atlas papier.

La dualité entre noyaux histologiques du thalamus et classes de connectivité n'est pas évidente : plusieurs noyaux différents pourraient projeter dans la même région corticale et inversement, un noyau seul pourrait projeter dans plusieurs régions corticales. En fait, le résultat dépend beaucoup de la parcellisation du cortex, qui reste manuelle dans cette étude visant initialement plus à établir les connexions thalamo-corticales qu'à segmenter les noyaux du thalamus. Notons en outre que les techniques de suivi de fibres à la base de ces méthodes ne sont pas elles même réellement validées. Cette méthode de segmentation est cependant très intéressante d'autant que les résultats exploitent pleinement et uniquement (à part pour la parcellisation corticale) l'information de diffusion. Ce type de méthode sera qualifié d'*approche par connectivité*.

## 4.2 Une nouvelle méthode robuste de segmentation par classification

Nous proposons à présent notre propre méthode de segmentation par classification qui peut être considérée comme une variante de la première méthode décrite précédemment ([WTLW03]). Cette méthode a fait l'objet de la communication [DFC<sup>+</sup>02].

### 4.2.1 Individus

Avant de parler de la classification à proprement parler, nous présentons le formatage des données. Des traitements préliminaires appliqués aux images de diffusion que nous allons considérer permettent d'estimer en chaque voxel le tenseur de diffusion de façon robuste ([MPC<sup>+</sup>02]).

#### Symétrisation des données de diffusion

Le cerveau, à quelques régions près, présente une forte symétrie par rapport au plan inter-hémisphérique. Les deux thalamus, et leur subdivision en noyaux, ne font pas exception à cette constatation, comme nous avons pu le voir dans les atlas constitués à partir des coupes histologiques du chapitre 3. Cela signifie que les caractéristiques tensorielles et géométriques d'un point du thalamus droit et du point symétrique dans le thalamus gauche sont très semblables, aux inversions de direction près.

Nous allons exploiter cette propriété pour doubler le nombre d'individus par classe dans la classification et donc gagner en robustesse. Pour cela, nous devons d'abord rechercher la matrice de changement de base qui permet de redresser l'image, c'est-à-dire de superposer son plan inter-hémisphérique avec le plan  $x = \dim X / 2$ , où  $\dim X$  désigne la dimension selon la direction  $\vec{X}$  de l'image. En effet, les propriétés de symétrie ne se manifestent de façon claire que lorsque l'un des axes (l'axe  $\vec{X}$  dans notre cas) de la base orthogonale dans laquelle les grandeurs sont exprimées est normal au plan de symétrie.

Pour estimer cette matrice de changement de base  $P$ , on se reportera à la section 3.2.2 du chapitre 3 et aux travaux de [POA02]. Nous exprimons le tenseur de diffusion  $D$  de chaque voxel  $(x, y, z)$  dans la nouvelle base. Si l'on note  $D_B(x, y, z)$  le tenseur de diffusion exprimé dans la base initiale  $B$ , et  $D_{B'}(x, y, z)$  le même tenseur exprimé dans la nouvelle base  $B'$ , on a :

$$D_{B'}(x, y, z) = P^{-1} D_B(x, y, z) P$$

Après cette opération de changement de base, le plan inter-hémisphérique qui sépare le cerveau, et donc les deux thalamus, en deux parties les plus symétriques possibles devient normal à l'axe  $\vec{X}$ . Par conséquent, les tenseurs d'un point du thalamus droit et de son symétrique géométrique par rapport à ce plan dans le thalamus gauche deviennent donc identiques aux signes près. Il suffit alors de changer le signe des termes du tenseur relatifs à l'axe  $X$  pour qu'ils soient comparables. Dans le tenseur ci dessous, nous représentons en gras les termes qui sont opposés dans les tenseurs des points des thalamus droit et gauche et que nous modifions arbitrairement pour le thalamus gauche :

$$[D] = \begin{pmatrix} D_{xx} & \mathbf{D}_{xy} & \mathbf{D}_{xz} \\ \mathbf{D}_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ \mathbf{D}_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{pmatrix}$$

Rappelons que la matrice carrée représentant le tenseur de diffusion est symétrique (au sens algébrique du terme) étant donné que la direction mais pas le sens de diffusion est mesurable uniquement. Par conséquent, nous avons :  $D_{xy} = D_{yx}$  et  $D_{xz} = D_{zx}$ . Le terme  $D_{xx}$  n'est pas modifié car la direction  $\vec{X}$  n'est pas changée par symétrie par rapport au plan  $x=\dim X/2$ .

De façon à ce que les attributs de position spatiale soient également comparables dans les deux thalamus, nous les exprimons en coordonnées barycentriques dans chaque thalamus, puis nous changeons le signe de la coordonnée  $x$  pour les voxels du thalamus gauche également.

Les vecteurs  $V(x, y, z)$  ainsi préparés constituent les individus donnés à classer. Cette technique permet donc d'opérer la segmentation des deux thalamus en une seule fois.

## Pondération tenseur et coordonnées spatiales

Le vecteur d'attributs  $V(x, y, z)$  que nous considérons alors pour le voxel de coordonnées  $(x, y, z)$  est le suivant :

$$V(x, y, z) = \alpha \cdot \begin{pmatrix} D_{xx} \\ D_{yy} \\ D_{zz} \\ D_{xy} \\ D_{xz} \\ D_{yz} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + \beta \cdot \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ x \\ y \\ z \end{pmatrix}$$

Les coefficients  $\alpha$  et  $\beta$  permettent de pondérer la contribution de chacun des termes. Ainsi nous pouvons contrôler l'influence de l'information d'intérêt, à savoir la diffusion susceptible de différencier les groupes nucléaires, par rapport à la simple régularisation spatiale.

Notons que les attributs de coefficients de diffusion et de positions ayant des ordres de grandeur très différents, il est nécessaire de les normaliser pour pouvoir calculer des distances entre individus qui ont un sens. Les 6 coefficients de diffusion de tous les individus sont donc normalisés par le coefficient de plus grande valeur absolue rencontré. De même, les coordonnées spatiales sont normalisées par la position de valeur absolue la plus élevée rencontrée parmi tous les individus considérés. La valeur absolue des attributs, aussi bien relatifs aux tenseurs qu'aux coordonnées spatiales, se retrouve donc entre 0 et 1.

## 4.2.2 Classification

### Cartes auto-organisatrices de Kohonen

Nous avons utilisé les cartes auto-organisatrices de Kohonen ([Koh84]) comme classifieur à la place des *k-means*.

Le principe en est le suivant : les données à classer sont présentées sous forme de vecteurs d'attributs dans l'espace des données. Un certain nombre  $n$  de vecteurs appelés vecteurs codes et notés  $C_i$ ,  $1 \leq i \leq n$ , sont tirés aléatoirement dans l'espace des données : ces vecteurs codes vont représenter les différentes classes. A chaque vecteur code  $C_i$  est associé un noeud  $N_i$  dans un espace dual, généralement à 1 ou 2 dimensions. Ces noeuds sont organisés sous la forme d'une grille régulière (rectangulaire, hexagonale) : de la forme de cette grille dépendent les relations de voisinage des noeuds. La classification s'effectue de la manière suivante à l'itération  $t$  : un vecteur  $x$  de l'espace des données est présenté à l'ensemble des vecteurs codes  $C_i$ , le vecteur code  $C_{i_0}$  dont  $x$  est le plus proche au sens d'une distance  $d$  donnée transmet sa classe à  $x$ . Les vecteurs codes  $C_i$  sont alors mis à jour de la manière suivante :

$$C_i = C_i + \delta(i, i_0, t)\varepsilon(t)(x - C_i)$$

$\varepsilon(t)$  est ce que l'on appelle classiquement le pas d'apprentissage, il décroît avec  $t$ . Le terme  $\delta(i, i_0, t)$ , qui décroît également avec  $t$ , représente une fonction de voisinage qui vaut 1 pour  $i = i_0$  et qui décroît plus le noeud  $i$  est éloigné du noeud  $i_0$  dans la grille associée aux vecteurs codes. La **Figure 4.3** illustre une étape d'apprentissage de cet algorithme.

C'est dans cette notion de voisinage dans la grille, appelée également carte auto-organisatrice de Kohonen, que réside l'originalité de la méthode. À l'issue d'un grand nombre d'itérations, il s'établit une sorte de somatotopie<sup>2</sup> entre l'espace des données et la carte, à l'image de l'organisation des neurones dans le cerveau. Notons que la convergence de la méthode est établie pour les grilles mono-dimensionnelles seulement. Ce principe influence la structuration de la classification en amenant les classes voisines dans la carte à se ressembler. Cela favorise la formation de groupes de vecteurs codes (et donc de classes) similaires qui forment des méta-classes.

### Classification ascendante hiérarchique

Cette propriété d'agrégation des classes semblables est exploitée par l'étape suivante qui va chercher à déterminer ces méta-classes. Pour cela, nous opérons une classification ascendante hiérarchique sur les vecteurs codes obtenus à la fin des itérations. Cela consiste à construire un dendrogramme, c'est-à-dire un arbre de fusion des classes (voir **Figure 4.4**).

Le principe en est le suivant : à la première étape, à partir des  $n$  vecteurs codes résultant de la classification de Kohonen, la distance inter-classe est calculée entre tous les vecteurs codes, et les 2 classes les plus proches sont fusionnées. A l'étape suivante, une nouvelle classe constituée de ces 2 vecteurs les remplace et ce schéma est répété jusqu'à ce que toutes les classes soient fusionnées en une seule grande classe regroupant tous les vecteurs codes.

La distance entre 2 ensembles doit être définie. il en existe plusieurs : distance entre centres de gravité des ensembles, distance minimale ou maximale par exemple. Le dendrogramme donne l'information du coût de la fusion à chaque étape, qui peut être représenté

---

<sup>2</sup>Initialement, organisation particulière d'une aire cérébrale en régions représentant chacune une partie du corps.



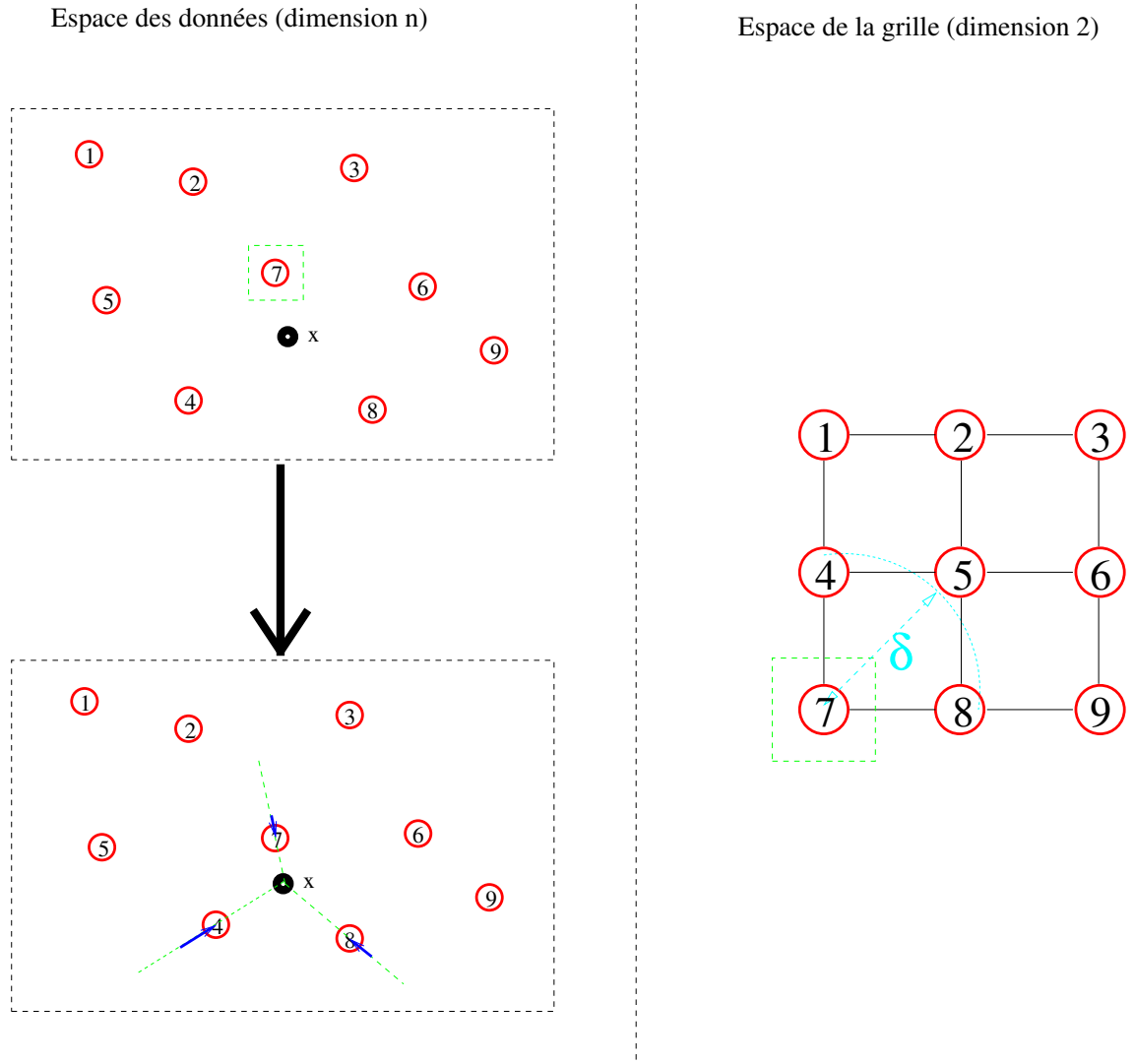


FIG. 4.3 – Une étape d'apprentissage de la classification de Kohonen. Les vecteurs codes sont représentés sous forme de cercles rouges et un individu  $x$  sous forme d'un disque noir. Le vecteur code "7" gagnant ainsi que les vecteurs codes dans un voisinage pondéré  $\delta$  dans la grille ("4" et "8") sont mis à jour. L'individu  $x$  est labellisé "7" à l'issue de cette étape d'apprentissage.

sur une courbe. Ce coût augmente globalement bien sûr mais des sauts importants de coût apparaissent à certaines étapes. Ces sauts reflètent la fusion de classes fortement dissemblables, ce qui peut être interprété comme l'étape à laquelle deux méta-classes sont regroupées. Ces discontinuités permettent de décider du nombre de méta-classes qui peuvent être différenciées correctement (voir [CG00] pour cette utilisation des cartes de Kohonen).

Cette information est particulièrement intéressante et adaptée à notre problème puisque le nombre de noyaux que permet de différencier l'information issue de la diffusion n'est pas connu. Ce peut être 14 comme peut-être aucun, et ce nombre dépend vraisemblablement des caractéristiques des données de diffusion utilisées pour la classification (résolution, nombre de directions...).

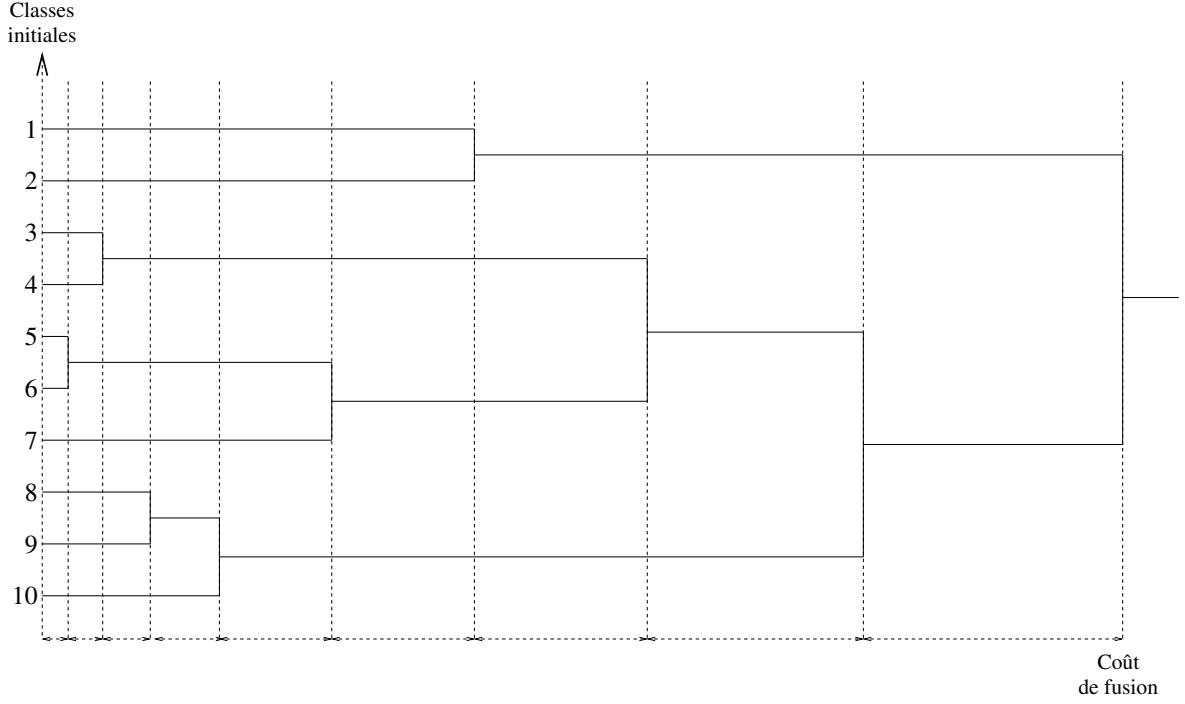


FIG. 4.4 – Représentation d'un dendrogramme : les classes initiales sont progressivement fusionnées 2 à 2 jusqu'à ce qu'il n'en reste qu'une. Le coût d'une fusion est représenté par l'écartement entre les lignes verticales successives.

### 4.2.3 Résultats de segmentation

Nous appliquons notre méthode à 3 sujets humains pour lesquels nous disposons d'IRMs anatomiques T1 de résolution  $0.94 \times 0.94 \times 1.40mm$ , et d'IRMs pondérées en diffusion à 6 directions, 5 Bvalues et 2 répétitions, de résolution  $1.88 \times 1.88 \times 2.80mm$ .

#### Paramètres utilisés

Pour la classification de Kohonen, nous choisissons une grille rectangulaire de taille  $10 \times 10$ , qui est un choix relativement standard, et dont la topologie s'apparente à celle de l'organisation des noyaux du thalamus. Cette grille donne lieu à 100 classes différentes, ce qui est un nombre très supérieur au nombre de groupes nucléaires que l'on souhaite différencier. La distance utilisée entre individus est la distance euclidienne classique. Après une initialisation aléatoire des vecteurs codes tirés dans l'intervalle de normalisation et 10000 itérations du classifieur (choix du nombre d'itérations standard et empirique), nous obtenons une labellisation de chacun des voxels des 2 thalamus allant de 1 à 100, ainsi que 100 vecteurs codes qui sont les représentants de chacune des classes. Nous opérons ensuite une classification ascendante hiérarchique sur les ensembles résultant de cette classification. Nous utilisons la distance de Ward  $d_W$  comme coût de fusion entre ensembles, définie de la façon suivante entre les ensembles A et B :

$$d_W(A, B) = \frac{n_A n_B}{n_A + n_B} \times d^2(\bar{x}_A, \bar{x}_B)$$

avec

$$\bar{x}_A = \frac{1}{n_i} \times \sum_{k=1}^{n_i} x_{i_k}$$

C'est une distance classique également entre ensembles qui prend en compte dans la fusion la distance entre centres de gravité qui sépare les 2 ensembles mais également le nombre d'individus de chaque ensemble.

Enfin, pour le réglage des poids  $\alpha$  (pour les attributs du tenseur de diffusion) et  $\beta$  (pour les attributs de position spatiale) définis précédemment, nous choisissons 3 jeux de poids notés  $(\alpha, \beta)$  :

- un jeu de poids "tenseur" utilisant uniquement l'information de diffusion pure pour la classification :  $(1, 0)$ ,
- un jeu de poids "coordonnées" utilisant uniquement l'information de position spatiale pour la classification :  $(0, 1)$ ,
- un jeu de poids "mixte" utilisant à la fois l'information de diffusion et l'information de position spatiale pour la classification :  $(0.75, 0.25)$ .

## Nombre de classes différentiables

Nous obtenons des courbes de fusion présentées en **Figure 4.5** pour les 3 sujets avec les différentes pondérations. Ces courbes représentent, pour chaque étape  $i$  de fusion, la différence de coût entre l'étape  $i$  et l'étape  $i - 1$  : elles rendent donc compte de l'accroissement du coût de fusion.

Avec les 3 pondérations utilisées et sur les 3 sujets traités, la courbe présente une augmentation brutale de coût aux alentours du passage de 4 groupes à 3 groupes. Ceci suggère que la méthode ainsi que la qualité des données permettent de différencier de l'ordre de 4 méta-classes distinctement, à une classe près. Étant donné que l'anatomie nous indique qu'il existe 4 groupes nucléaires bien différenciés (voir **Figure 4.2**), nous allons fixer à 4 le nombre de méta-classes finales à l'issue de la classification ascendante hiérarchique. Un niveau de gris correspondant au numéro de la classe à laquelle il appartient est attribué à chaque voxel du thalamus : nous obtenons alors une segmentation simultanée des 2 thalamus.

## Segmentations obtenues

Les images des thalamus labellisés en 4 sous-groupes nucléaires pour les 3 sujets sont présentées en **Figure 4.6** avec les 3 jeux de pondération "tenseur", "coordonnées" et "mixte".

### 4.2.4 Discussion

Deux résultats sont intéressants à noter. Le premier est que, lorsque les paramètres de pondération sont réglés à  $\alpha = 1$  et  $\beta = 0$  (pondération "tenseur"), les classes créées sont spatialement assez fortement connexes. C'est-à-dire qu'avec l'unique information des attributs de diffusion, la classification regroupe naturellement les voxels en amas spatialement assez cohérents, alors qu'aucune information de connexité n'est fournie. Cette constatation n'est plus vraie lorsque l'on augmente le nombre de classes : les labels se mélangent alors. Cela nous confirme qu'il est difficile de différencier plus de 4 groupes nucléaires dans le thalamus à partir de l'information de diffusion avec ce type de données chez l'Homme, mais également que la segmentation obtenue a un sens anatomique et que la signature de diffusion peut caractériser des régions spatiales.

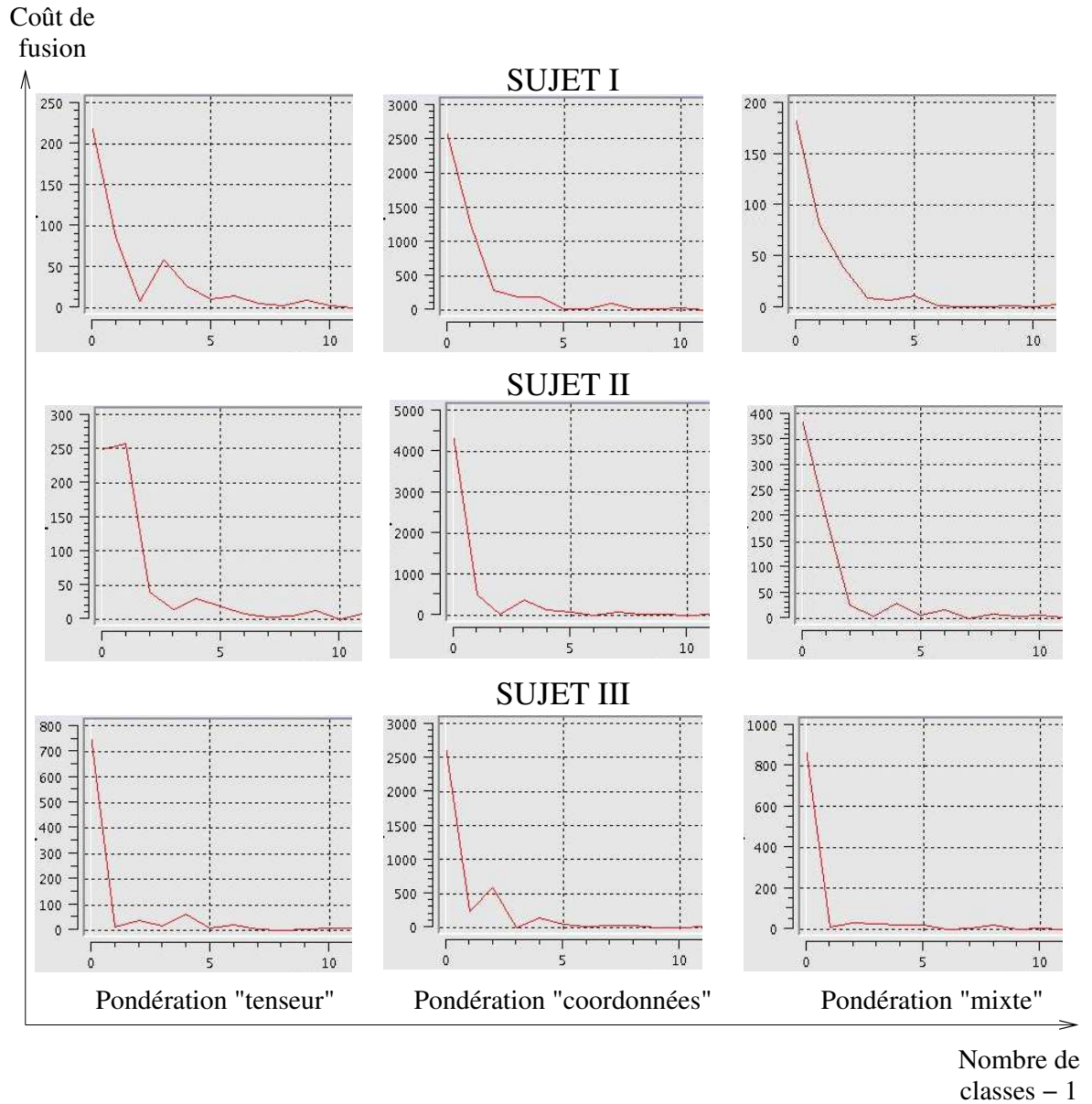


FIG. 4.5 – Courbes du coût de fusion en fonction du nombre de classes -1 pour les sujets I, II et III des 10 dernières classes sur les 100 classes issues des classifications de Kohonen. Trois jeux de pondérations sont présentés (information de diffusion pure "tenseur", information spatiale pure "coordonnées" et information "mixte" pondérée à 75% pour la diffusion et 25% pour le spatial).

Le deuxième point intéressant est que la classification est naturellement symétrique. Cela signifie d'une part que l'opération de changement de base a fonctionné, et d'autre part que la signature de diffusion reconnaît naturellement les groupes nucléaires similaires des 2 côtés.

Ces deux remarques sont très importantes pour s'assurer de la capacité des attributs de diffusion seuls à différencier des structures anatomiques cohérentes.

Le deuxième jeu de pondération (pondération "coordonnées") guide la classification avec les paramètres extrêmes inverses, à savoir  $\alpha = 0$  et  $\beta = 1$ . Cette pondération ne prend en compte que les données spatiales et aucunement les données issues de la diffusion. Assez

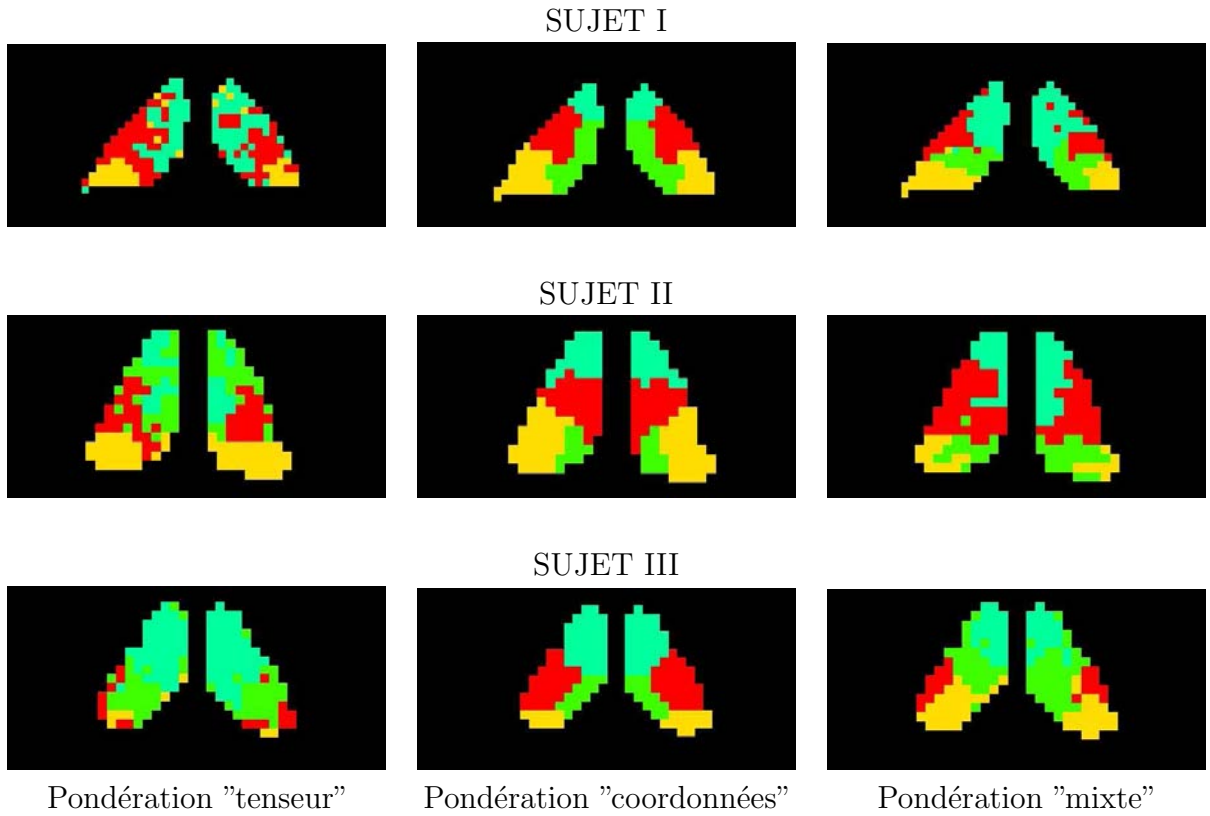


FIG. 4.6 – Résultats de segmentation en 4 sous-groupes nucléaires du thalamus pour les sujets I, II et III en utilisant différents jeux de pondérations (information de diffusion pure "tenseur", information spatiale pure "coordonnées" et information "mixte" pondérée à 75% pour la diffusion et 25% pour le spatial)

étonnamment, le résultat obtenu est relativement proche du précédent. Des différences sont tout de même notables : une taille et une forme des groupes nucléaires plus régulières, avec une tendance de géométrie circulaire. Cette ressemblance pousse à une utilisation prudente des attributs spatiaux qui tendent à créer des classes apparemment réalistes et régulières mais sans aucun fondement anatomique puisqu'il s'agit d'une parcellisation purement géométrique.

La troisième pondération "mixte"  $\alpha = 0.75$  et  $\beta = 0.25$  a été déterminée de façon empirique après plusieurs tests sur les jeux de paramètres de pondération. Elle semble proposer un bon compromis entre une attache aux données majoritaire et une régularisation efficace mais non prioritaire. Visuellement, cette pondération conserve la forme globale des classes obtenue avec la pondération "tenseur" en limitant les points aberrants. Même si cette pondération présente une régularité améliorée par rapport à la pondération "tenseur", il subsiste des irrégularités dans cette segmentation. Il faudrait vraisemblablement envisager une étape de régularisation supplémentaire pour assurer la connexité de chacune des classes qui, on le sait, est vérifiée anatomiquement.

## 4.3 Confrontation avec un atlas réalisé sur IPM

### 4.3.1 Segmentation du thalamus d'un babouin

Nous appliquons à présent notre méthode de segmentation du thalamus par classification à un babouin pour lequel nous disposons d'une IRM anatomique T1 de résolution  $0.78 \times 0.78 \times 1.00mm$ , et d'une IRM pondérée en diffusion à 6 directions, 5 Bvalues et 6 répétitions, de résolution  $1.56 \times 1.56 \times 1.60mm$ . Ce babouin sera appelé le "babouin III" par référence aux babouins du chapitre 3.

Nous obtenons pour cet animal les courbes de coûts présentées en **Figure 4.7**.

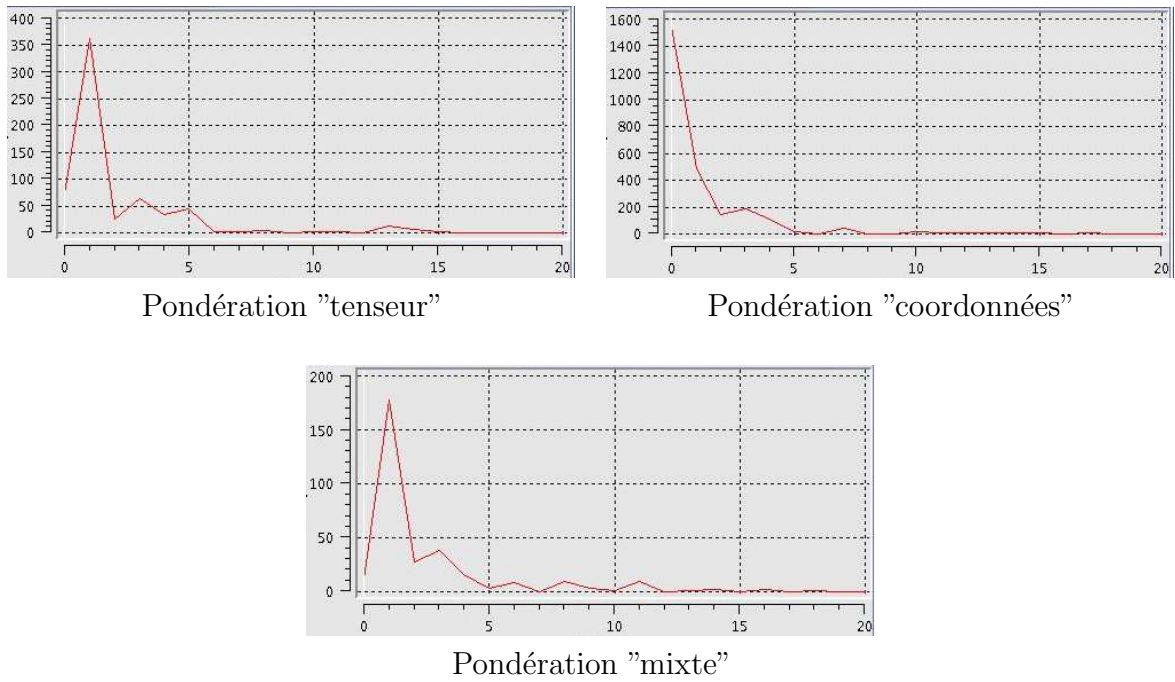


FIG. 4.7 – *Babouin III* : courbes de fusion des 21 dernières classes (coût de fusion en fonction du nombre de classes -1) sur les 100 classes issues des classifications de Kohonen associées à différents jeux de pondérations (information de diffusion pure "tenseur", information spatiale pure "coordonnées" et information "mixte" pondérée à 75% pour la diffusion et 25% pour le spatial).

Remarquons que par rapport aux données de sujets humains, le nombre de classes différenciables semble plus faible puisque l'accroissement brutal de coût de fusion apparaît aux alentours de 3 classes avec les 3 pondérations. En effet, le cerveau du babouin étant de taille plus faible que celui de l'humain, la capacité de différenciation de l'IRM est proportionnellement moins importante. Nous présentons en **Figure 4.8** les segmentations en respectivement 2, 3 et 4 classes pour estimer plus précisément cette capacité de différenciation de la méthode chez le babouin.

Compte-tenu de la relative irrégularité de la segmentation en 4 noyaux, nous conservons la segmentation en 3 classes pour la suite de l'étude. Cette segmentation est présentée en rendu volumique sur la **Figure 4.9**.

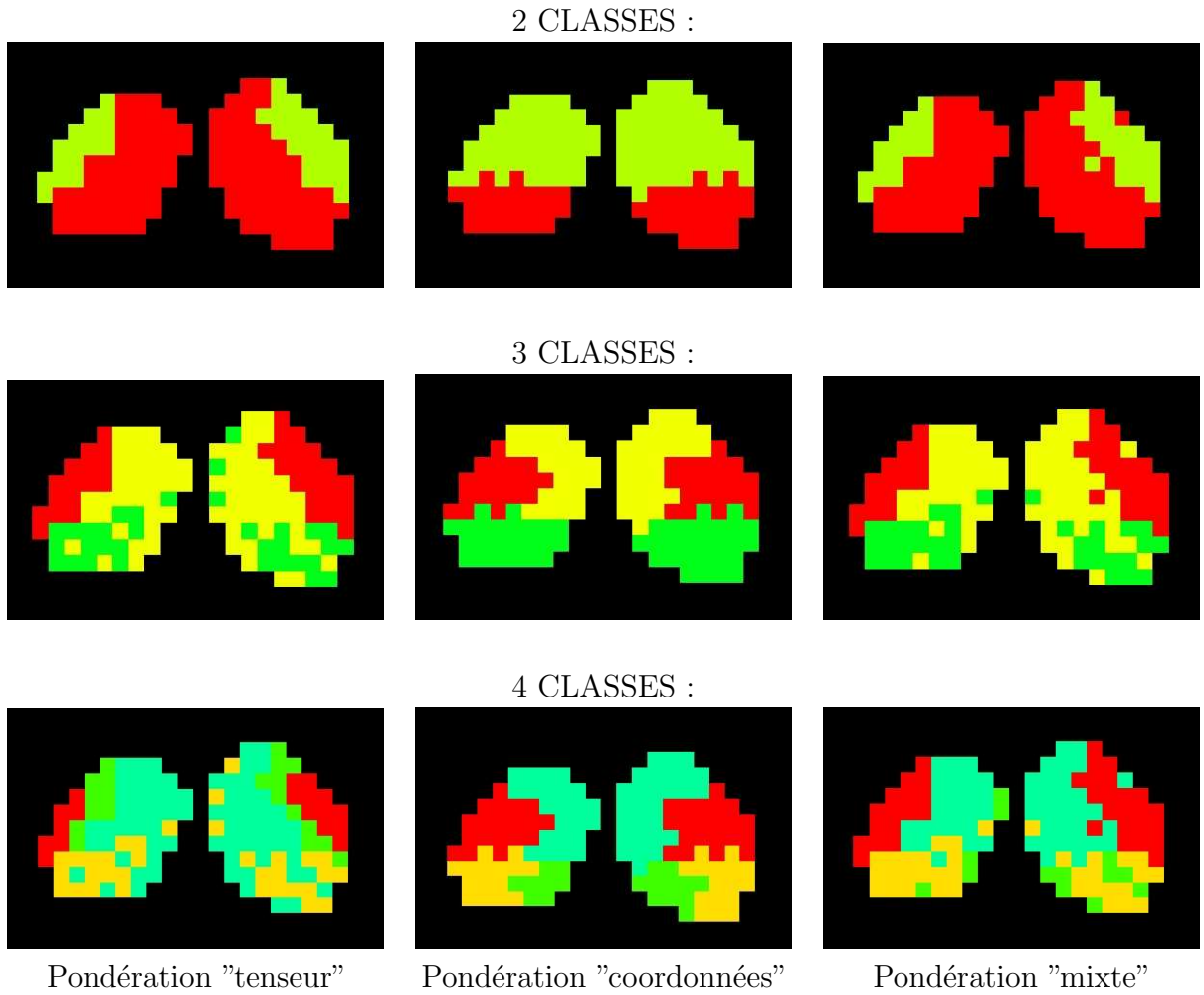


FIG. 4.8 – *Babouin III* : résultats de segmentation en 2, 3 et 4 sous-groupes nucléaires du thalamus en utilisant différents jeux de pondérations (information de diffusion pure "tenseur", information spatiale pure "coordonnées" et information "mixte" pondérée à 75% pour la diffusion et 25% pour le spatial)

### 4.3.2 Un atlas du thalamus histologique

Nous disposons pour 2 autres babouins d'un atlas du thalamus réalisé sur coupes histologiques et recalé avec les IRMs des animaux correspondants grâce au protocole de constitution d'IPM proposé au chapitre 3. Nous choisissons arbitrairement l'atlas d'un des deux babouins (le II) pour le confronter à la segmentation réalisée avec notre méthode par classification mixte des données de diffusion et de position.

En effet, le babouin II du chapitre 3 et le babouin III sur lequel la méthode présentée dans cette partie est appliquée, sont des animaux distincts mais ils appartiennent à la même espèce et sont proches anatomiquement

Cet atlas de référence est représenté superposé sur l'IRM anatomique T1 du même animal et en rendu volumique sur la **Figure 4.10**. Rappelons que l'atlas du thalamus réalisé sur cet animal comportait les 7 principaux noyaux ou groupes nucléaires : le groupe antérieur (rose), le noyau géniculé latéral (bleu clair), le noyau médio dorsal (vert clair), le noyau géniculé médian (vert foncé), le groupe médio latéral (bleu foncé), le pulvinar (jaune) et le groupe ventral antérieur (rouge).



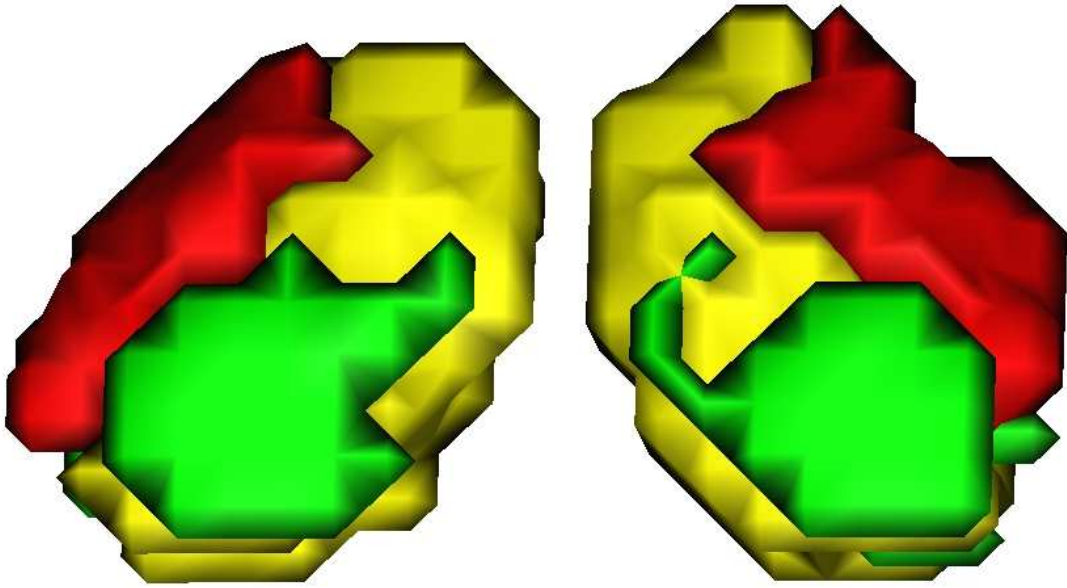


FIG. 4.9 – *Babouin III : rendu volumique de la segmentation en 3 classes du thalamus en prenant en compte une information "mixte" pondérée à 75% pour la diffusion et 25% pour le spatial. Par rapport aux notations du tableau 4.1, la classe A est en vert, la classe B en jaune et la classe C en rouge.*

### 4.3.3 Confrontation

Nous avons partitionné le thalamus du babouin III en 3 classes en s'appuyant sur les données de diffusion, et nous avons également réalisé un atlas du thalamus différenciant les 7 principaux noyaux sur l'histologie du babouin II. Nous supposons que le partitionnement réalisé par diffusion correspond à des groupes nucléaires anatomiques. Compte-tenu de la forme des résultats issus de la classification, nous supposons que notre partitionnement en 3 classes du thalamus n'est pas sans rapport avec les grands groupes nucléaires proposés dans [Kah79] (voir partie 4.1.1) : groupe nucléaire antérieur, latéral, médial et le pulvinar. Nous cherchons donc un méta partitionnement des 7 segmentations effectuées sur l'histologie pour correspondre aux 3 régions issues de la classification.

Pour essayer d'inférer les structures qui sont effectivement segmentées par notre méthode de classification utilisant la diffusion, nous allons d'abord chercher à superposer les deux segmentations.

Les masques globaux du thalamus pour les babouin II et III ne sont pas tout à fait comparables. En effet, le tracé des contours du thalamus sur les seules IRMs anatomique T1 et pondérée en T2 *in vivo* disponibles pour le babouin III (non sacrifié) est une tâche délicate compte-tenu de leur résolution relativement limitée (rappel : l'image pondérée en T2 a une résolution de  $1.56 \times 1.56 \times 1.60mm$  et le cerveau mesure moins de  $100mm$  en antéro-postérieur).

A l'inverse, le masque global du thalamus du babouin II obtenu par réunion des segmentations en noyaux réalisées sur IPM est riche en détails : le corps genouillé, par exemple, y est inclus mais n'est pas pris en compte sur le masque global du thalamus du babouin III (cette remarque est également valable pour les sujets humains précédem-

ment traités). C’est pour cette raison que la superposition des deux images de labels est réalisée semi-automatiquement : une transformation affine 3D par thalamus est recherchée indépendamment avec une initialisation manuelle sur le logiciel Anatomist ([RRC<sup>+</sup>03]) et un affinage automatique par mise en correspondance de blocs en utilisant le coefficient de corrélation comme critère de similarité (pour les détails de la méthode, se reporter à [ORS<sup>+</sup>01]). On cherche à adapter l’atlas du babouin II réalisé sur IPM au babouin III. Le résultat de superposition est présenté en **Figure 4.11**.

Nous avons ensuite calculé un pourcentage de superposition des 7 noyaux de l’atlas du babouin II recalé sur la segmentation en 3 classes du babouin III. Ce pourcentage  $p$  est calculé de la façon suivante, pour un noyau  $N$  de l’atlas et une classe  $C$  issue de la segmentation ( $cardE$  désigne le nombre d’éléments de l’ensemble  $E$ ) :

$$p(N, C) = 100 \times \frac{card(N \cap C)}{card(N)}$$

Ce score prend comme référence (au dénominateur) le cardinal des noyaux de l’atlas car ils sont globalement plus petits :  $p$  vaut 100 si le noyau est entièrement inclus dans la classe. Ces pourcentages ont pour but de déterminer de quels noyaux anatomiques sont constituées les classes issues de la classification. Ils sont rassemblés dans le **Tableau 4.1**. Le total de chaque ligne ne fait pas forcément 100% car la région du fond de l’image n’est pas représentée.

Les notations suivantes sont utilisées (les couleurs font référence à la **Figure 4.9** pour la segmentation du babouin III et à la **Figure 4.10** pour l’atlas du babouin II) :

- pour l’atlas, 1 représente le groupe antérieur (rose), 2 représente le noyau géniculé latéral (bleu clair), 3 représente le noyau médio dorsal (vert clair), 4 représente le noyau géniculé médian (vert foncé), 5 représente le groupe médio latéral (bleu foncé), 6 représente le pulvinar (jaune) et 7 représente le groupe ventral antérieur (rouge)
- A représente la classe verte, B la classe jaune et C la classe rouge

		Segmentation babouin III		
Atlas babouin II	Noyaux	A	B	C
	1	0	<b>75</b>	0
	2	0	0	0
	3	11	<b>89</b>	0
	4	25	0	0
	5	17	<b>72</b>	0
	6	25	39	3
	7	6	25	37

TAB. 4.1 – *Tableau de pourcentage de superposition des noyaux 1 à 7 de l’atlas anatomique du thalamus réalisé sur le babouin II et de la segmentation obtenue par la méthode de classification des données de diffusion sur le babouin III. Sur chaque ligne, plus le pourcentage est élevé, plus une part importante du noyau considéré est inclus dans la classe correspondante.*

En affectant à chacun des noyaux histologiques le label de la classe en diffusion avec laquelle il partage le plus de voxels en commun, nous obtenons l’équivalence classes de

diffusion / atlas anatomique suivante :

- classe A en vert : 4 (noyau géniculé médian)
- classe B en jaune : 1, 3, 5 et 6 (groupe antérieur, noyau médio dorsal, groupe médio latéral et pulvinar)
- classe C en rouge : 7 (groupe ventral antérieur)

#### 4.3.4 Discussion

Seuls les pourcentages d’inclusion élevés du **tableau 4.1** ont du sens : seule la classe B semble représenter les noyaux 1, 3 et 5 assez précisément. Les autres pourcentages partagés entre les classes signifient soit que la classification basée sur la diffusion délimite certaines régions sans sens anatomique particulier, soit que la variabilité inter-individuelle et l’imprécision du recalage empêchent d’avoir une mise en correspondance suffisante des structures respectives.

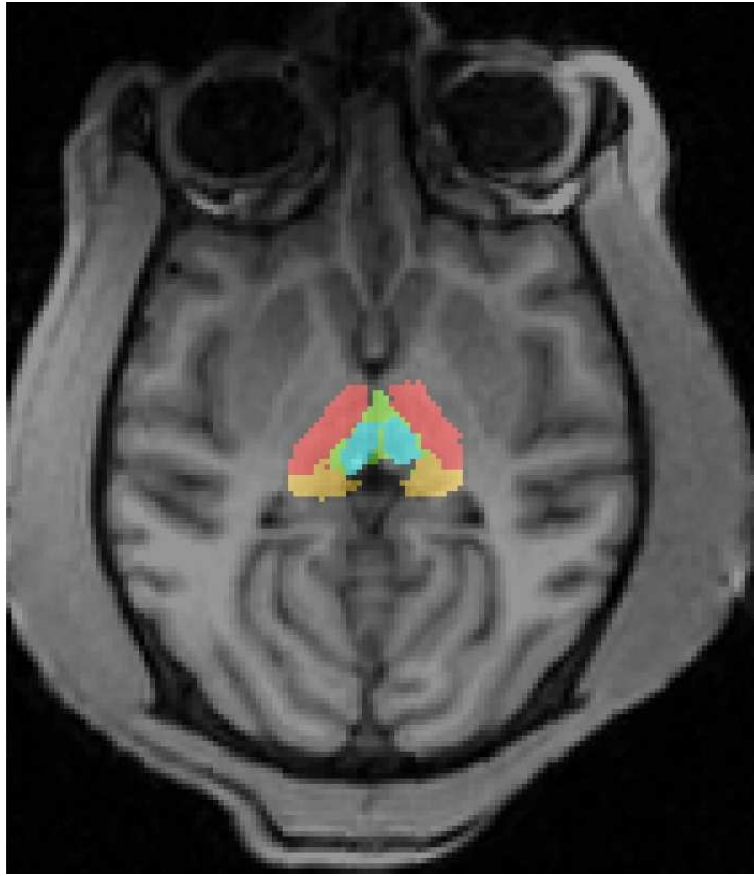
Rappelons également que le noyau 2 (corps genouillé) ne fait pas partie du masque global initial du thalamus pour le babouin III, et donc il n’est pas pris en compte dans le processus de classification (pourcentage de superposition nul).

Ces résultats constituent un premier pas dans la nécessaire compréhension de la segmentation aveugle basée sur les données de diffusion. Les faibles pourcentages de superposition des noyaux entre la segmentation et l’atlas illustrent la difficulté de valider ce genre de techniques dans de bonnes conditions sur des animaux différents.

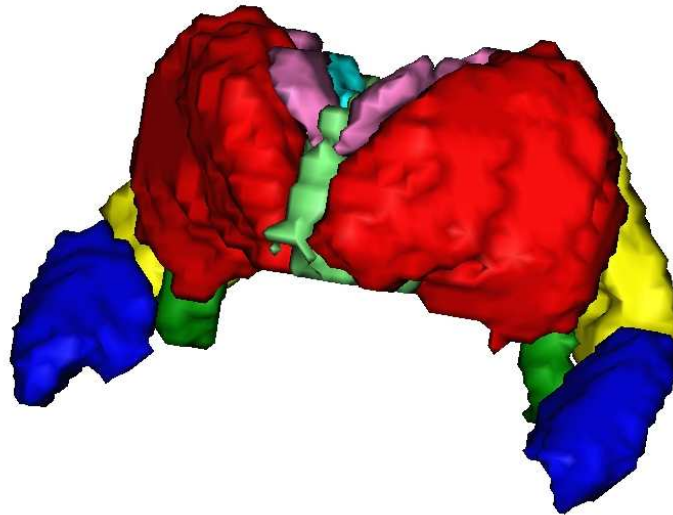
La réalisation sur le même animal de la classification basée sur les informations de diffusion et de l’atlas histologique semble maintenant une condition indispensable pour améliorer ces résultats préliminaires.

La qualité des données acquises occupent également une place importante dans la précision de la segmentation. La résolution et le contraste de l’IRM anatomique T1 déterminent la qualité de la segmentation manuelle globale du thalamus. La résolution, l’isotropie des voxels ainsi que le nombre de directions de l’IRM pondérée en diffusion impactent directement sur la qualité de l’information fournie en entrée pour la classification.

Enfin, l’introduction d’attributs plus complexes que les coefficients du tenseur de diffusion ainsi que l’utilisation de métriques mieux adaptées constituent également des facteurs d’amélioration à envisager.



(a)



(b)

FIG. 4.10 – Atlas 3D des 7 principaux noyaux du thalamus du babouin II (a) (voir chapitre 3) réalisé sur coupes histologiques, recalé avec l'IRM in vivo correspondante. Rendu volumique de cet atlas 3D (b). Légende des couleurs : groupe antérieur (rose), noyau géniculé latéral (bleu clair), noyau médio dorsal (vert clair), noyau géniculé médian (vert foncé), groupe médio latéral (bleu foncé), pulvinar (jaune) et groupe ventral antérieur (rouge)

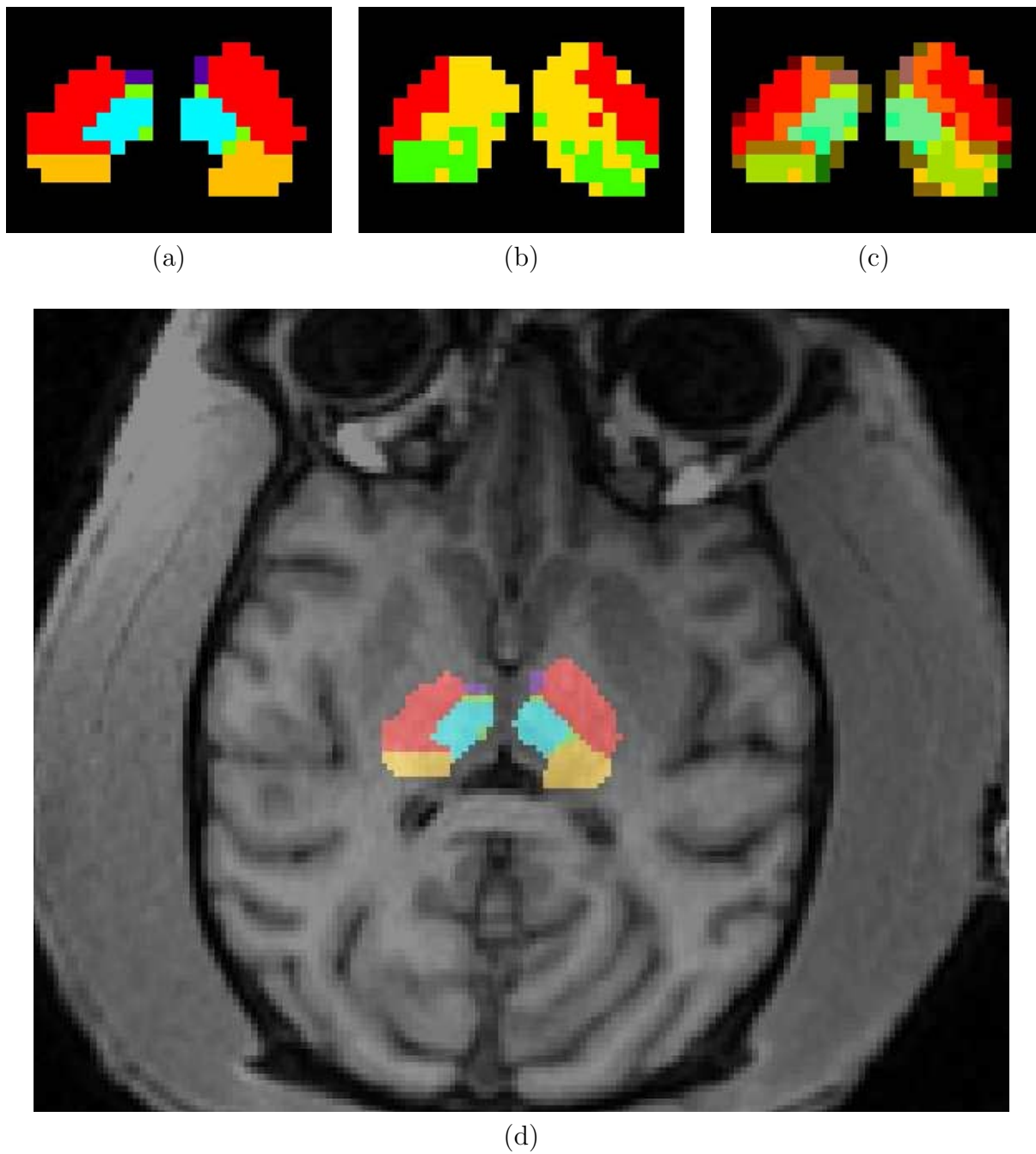


FIG. 4.11 – *Atlas du thalamus du babouin II (a) et segmentation du thalamus par classification des données du babouin III (b) recalés comme le montre leur fusion (c). L'atlas a été amené sur l'IRM du babouin III (d) pour permettre cette confrontation.*



# Chapitre 5

## Perspectives et discussion

*Nous proposons dans ce chapitre trois perspectives d'utilisation ou d'amélioration de l'IPM. Le premier projet décrit une mise en correspondance d'informations extraites à l'échelle microscopique avec des images macroscopiques. Le second projet s'intéresse à la validation des techniques de suivi de faisceaux de fibres en IRM pondérée en diffusion par confrontation avec des fibres de référence extraites sur une IPM particulière. Le dernier projet enfin, présente les grandes lignes d'une méthode visant à améliorer la correction des déformations secondaires. Cette méthode consiste en une déformation non affine biologiquement contrainte basée sur la méthode des éléments finis appliquée à la mécanique qui serait adaptée aux artefacts des coupes histologiques.*

APPLICATIONS		AMÉLIORATIONS
LIEN MICRO-MACRO	PROJET "HISTODIFF"	MÉTHODE DES ÉLÉMENTS FINIS
Mise en correspondance d'informations extraites à l'échelle microscopique avec des images macroscopiques	Confrontation du suivi de fibres par IRM de diffusion et en histologie	Description d'une méthode de déformation élastique de coupes histologiques biologiquement contrainte

FIG. 5.1 – Les 3 projets d'utilisation ou d'amélioration de l'IPM exposés dans ce chapitre.



Certains des projets présentés dans ce chapitre ont été juste envisagés, d'autres ont été plus approfondis mais aucun n'a pu être mené jusqu'au bout pour des raisons de temps, de priorités ou d'aléas d'expériences. Nous les décrivons cependant car ce sont des applications directes et particulièrement intéressantes de ce que permet l'IPM, afin d'appréhender les possibilités qu'elle offre. Les diverses perspectives d'applications ou d'améliorations sont présentées à la suite, et se suivent sans logique particulière. Leur seul point commun est de traiter de l'IPM.

## 5.1 Du micro au macro

### 5.1.1 Intérêt

Comme nous l'avons déjà signalé, les principaux intérêts des données histologiques résident dans la résolution quasi-illimitée d'observation et dans la possibilité de caractérisation tissulaire spécifique. Nous avons déjà exploité ces caractéristiques à plusieurs reprises dans les applications, notamment avec la création d'atlas du thalamus dont la taille et la différenciation des noyaux n'est pas compatible avec l'imagerie *in vivo*. Cependant, l'étude des coupes histologiques ouvre des possibilités d'observation bien plus importantes par utilisation du microscope. Il est même souvent obligatoire de passer par de forts grossissements pour observer certains phénomènes comme la forme de cellules pathogènes. Ces observations sont classiquement réalisées sur une coupe, à un endroit particulier, et le résultat est difficilement situable dans un volume global.

Il est donc intéressant de pouvoir passer d'observations microscopiques et locales à des résultats macroscopiques et globaux. Certains travaux ont déjà été réalisés dans ce sens, comme ceux de [FM05], dans lesquels une squelettisation des vaisseaux d'une coupe épaisse de cerveau observée au microscope confocal est réalisée sur des imagerie acquises à très forte résolution. La taille des vaisseaux est également enregistrée. Une image mosaïque globale est ensuite obtenue qui résume les observations réalisées sur les petites imagerie en gérant les jonctions, et qui représente le résultat de la squelettisation globale à une échelle compatible avec une manipulation classique des données. Dans ce travail, l'observation est faite en 3D mais sur l'épaisseur d'une coupe.

Nous proposons une information d'un type nouveau et particulièrement prometteur consistant en la représentation macroscopique et tridimensionnelle de phénomènes microscopiques. Voici un exemple concret de réalisation de ce type.

### 5.1.2 Les agrégats de Huntingtine

L'étude porte sur le rat et le macaque. Dans le cadre de recherches sur la maladie de Huntington, un vecteur viral est injecté à un animal dans le striatum dans le but de provoquer la mutation du gène responsable de la maladie (voir la communication [BBB<sup>+</sup>04] présentant cette étude).

Ponctuellement, de petits agrégats de huntingtine se forment autour du point d'injection. Sur les coupes avec une coloration spéciale marquant les agrégats et à fort grossissement ( $\times 20$ ), un logiciel (*Morphostar* de la société IMSTAR) permet de détecter et d'analyser les agrégats sur des images de résolution de l'ordre de  $0.3\mu m$  dans le plan (voir **Figure 5.2**). Il est ainsi possible de déterminer pour chaque agrégat sa position spatiale, sa taille (de l'ordre d'une dizaine de microns) ainsi que sa forme (sphérique ou

allongée). En récupérant cette information, il est intéressant de représenter macroscopiquement l'ensemble des agrégats détectés. Un jeu de coupes équivalentes marquées au Neun, marqueur des noyaux cellulaires offrant un marquage anatomique standard, est aligné de façon à constituer un volume de référence anatomique. Par recalage de chaque coupe au marquage spécifique des agrégats avec la coupe du volume Neun aligné correspondante (coalignement), il est possible de représenter en 3D la répartition spatiale des agrégats. L'information de taille ou de forme qui n'a pu s'obtenir que grâce à l'analyse au microscope, peut ainsi être injectée dans ces images macroscopiques (voir **Figure 5.3**).

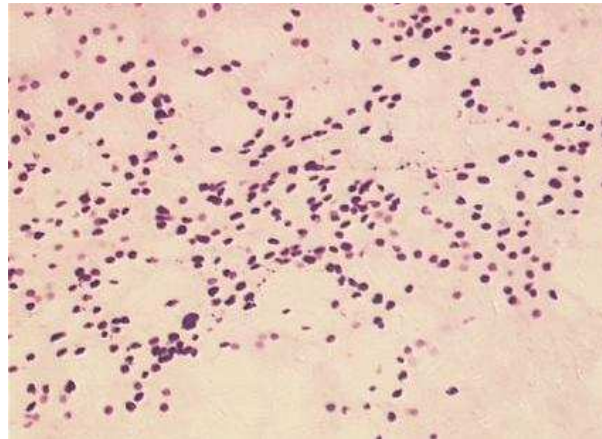


FIG. 5.2 – Image acquise à grossissement  $\times 20$  d'une région du striatum d'une coupe marquée spécifiquement pour révéler les agrégats de huntingtine. La résolution est de l'ordre de  $0.3\mu\text{m}$  dans le plan.

Après cette étude préliminaire chez le rat, un travail similaire a été mené chez le macaque. Nous avons recalé manuellement la dizaine de coupes histologiques marquées correspondant à la région injectée avec une IRM *in vivo* d'un autre macaque. Nous avons ainsi pu replacer les agrégats dans un volume global du cerveau pour appréhender leur répartition spatiale (voir **Figure 5.4**).

Nous entrevoyons sur cet exemple particulier la possibilité de bénéficier d'informations microscopiques très spécifiques dans la géométrie d'images *in vivo*. Les possibilités qu'offrent cette mise en correspondance dépassent très largement en résolution et en caractérisation tissulaire ce que les imageurs *in vivo* les plus modernes et les plus performants peuvent actuellement proposer.

## 5.2 Le projet Histodiff

Nous avons vu dans le chapitre 4 précédent une confrontation possible entre la segmentation réalisée par un traitement des données de diffusion *in vivo* et la segmentation réalisée par un expert sur coupes histologiques. Une autre grande exploitation des données de diffusion, qui constitue même historiquement l'application principale, concerne le suivi de fibres d'axones, ou "tracking". Ces techniques visent à révéler la connectivité du cerveau d'un point de vue anatomique (et non fonctionnel comme l'IRM fonctionnelle cherche à le faire) en mettant en évidence les grands faisceaux d'axones (à l'échelle du millimètre : un axone ne mesure que quelques microns) reliant les différentes zones du cerveau.

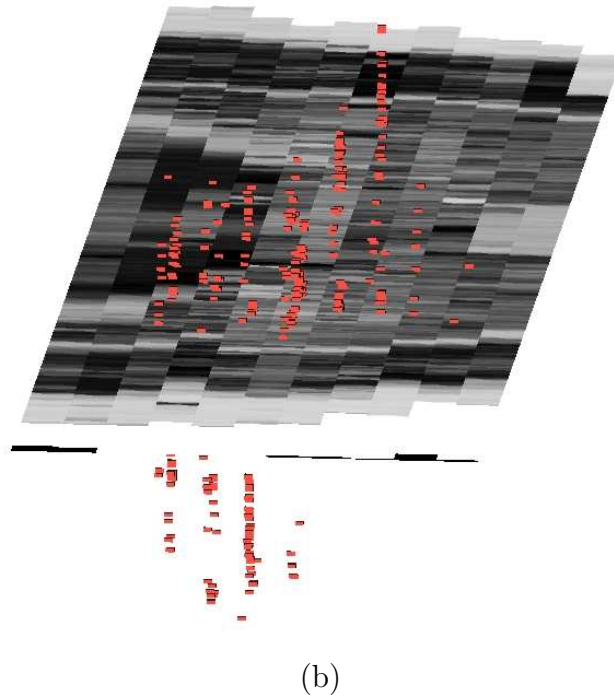
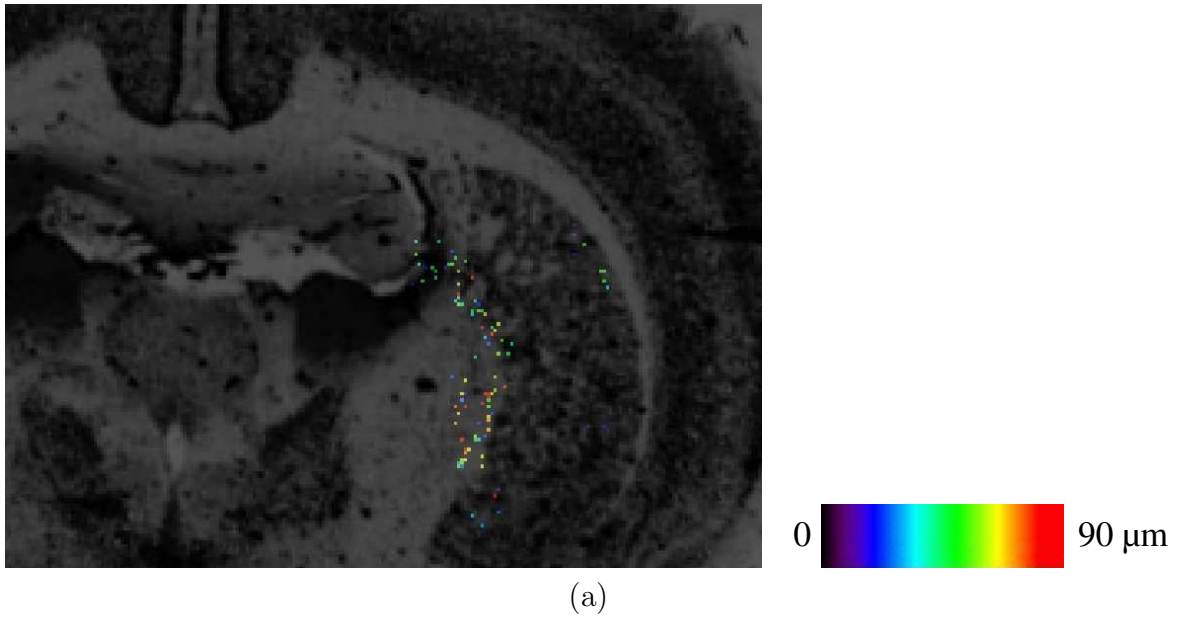
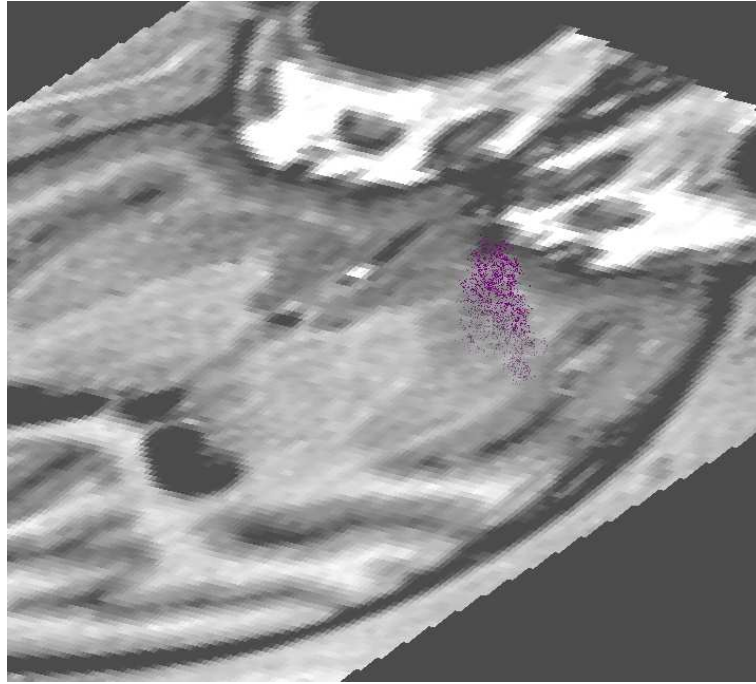
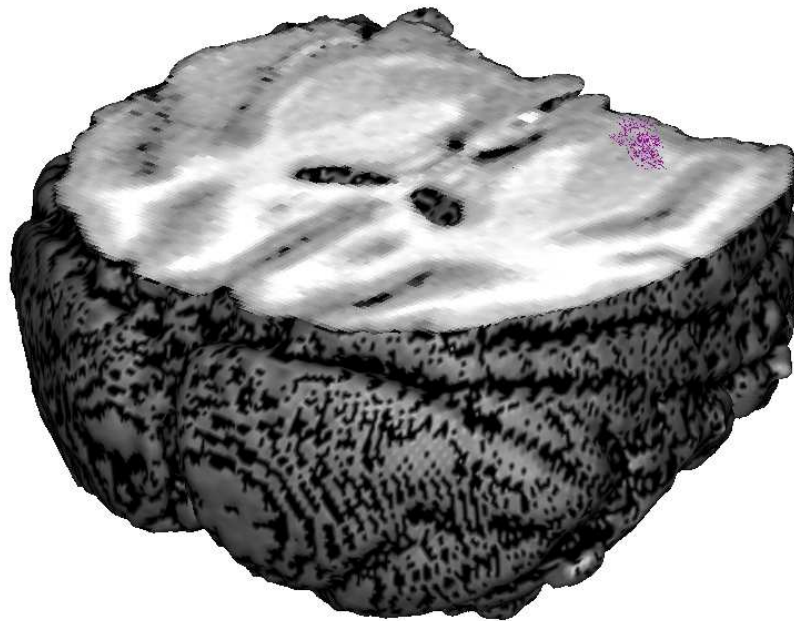


FIG. 5.3 – Une coupe coronale de rat colorée au Neun avec en superposition une représentation des agrégats de Huntingtine codés en couleurs en fonction de leur taille (a). Une représentation 3D des agrégats dont la taille est inférieure à 20 microns replacés autour d'une coupe axiale reconstruite d'un volume marqué au Neun autour du point d'injection (b).

Les validations de ces techniques de suivi de fibres sont réalisées principalement par comparaison visuelle avec des atlas papiers, en vérifiant que les grands faisceaux de fibres tels que le faisceau pyramidal ou le corps calleux sont bien retrouvés. Des techniques de validation par injection de manganèse détectable par IRM T1 *in vivo* ont permis de vérifier que la cartographie de la direction principale des tenseurs de diffusion et de la



(a)



(b)

FIG. 5.4 – *En violet, les agrégats détectés à très fort grossissement chez un macaque replacés dans une IRM in vivo sur une vue en perspective d'une coupe IRM (a) et sur un rendu volumique tronqué axialement (b).*

trace du manganèse étaient globalement compatibles (voir [LWC<sup>+</sup>03]). Des validations sur fantômes ont également été réalisées mais elles ne rendent pas compte de ce qui se passe réellement à l'intérieur d'un cerveau vivant. Aucune validation réelle n'a été faite à notre connaissance permettant de confronter les fibres axonales réelles du cerveau aux

tracés proposés par ces méthodes *in vivo*. En effet, cela implique de pouvoir mettre en correspondance un marquage qui serait visible sur coupes histologiques afin de pouvoir suivre des fibres en histologie. Une validation des techniques de suivi de fibres *in vivo* par confrontation avec un marquage histologique de référence est complexe à mettre en oeuvre car il fait intervenir un nombre important d'étapes :

- acquisition d'IRM (T1, diffusion) *in vivo* de bonne qualité chez le primate,
- méthode de suivi de fibres *in vivo*,
- réalisation d'un marquage spécifique détectable sur coupes *post mortem*,
- résolution de problèmes importants en traitement de l'image tels que reconstruction 3D de séries de coupes histologiques, mise en correspondance *in vivo/post mortem*, segmentation et visualisation des faisceaux en 3D.

La réunion de l'ensemble de ces compétences est possible dans très peu de centres mais la réalisation d'une telle étude est possible dans un laboratoire multidisciplinaire tel que le Service Hospitalier Frédéric Joliot (CEA, Orsay, France). Nous allons proposer un protocole expérimental pour la réalisation de ce projet reposant sur l'expertise de plusieurs équipes dans les domaines de la biologie, du traitement de l'image et de la physique de l'IRM : la modalité IPM joue bien sûr un rôle premier dans cette étude mettant en jeu des traitements réalisés *in vivo* et *post mortem*.

### 5.2.1 L'IRM de diffusion et le *tracking*

Les séquences de diffusion permettent d'évaluer le coefficient de diffusion suivant un certain nombre de directions en chaque point. Dans un milieu isotrope, ce coefficient dépend uniquement du milieu mais pas de la direction. Par contre, dans un environnement fortement anisotrope comme dans le voisinage d'un faisceau de fibres, ce coefficient dépend de la direction selon laquelle il est mesuré. En particulier, il est très différent selon qu'il est mesuré dans la direction des fibres ou perpendiculairement à elles. La représentation la plus répandue des caractéristiques de diffusion en un point est la représentation sous la forme d'un tenseur, dit tenseur de diffusion, comme nous l'avons vu au chapitre 4. Ce tenseur est la représentation d'une application bilinéaire qui permet de donner en un point le coefficient de diffusion suivant une direction  $\vec{u}$  quelconque. On pourra se référer à [Pou99a] pour une description de la physique et des modèles de diffusion. De nombreuses techniques ont été mises en oeuvre pour tenter de suivre les faisceaux de fibres à partir de l'information du coefficient de diffusion directionnel. L'idée la plus naturelle, proposée par [MCCvZ99], consiste à utiliser la direction principale fournie par le tenseur de diffusion en chaque point pour construire une fibre (voir **Figure 5.5**). Le principal problème de cette technique est qu'elle est incapable de gérer les croisements de fibres. Cette méthode propose des résultats de suivi de fibres néanmoins intéressants qui peuvent servir de point de départ à la confrontation.

Plusieurs variantes ont été proposées pour gérer les croisements, notamment l'estimation de plusieurs tenseurs en chaque point (modèle multitenseur). Plus récemment, le modèle du Q-ball proposé par [Tuc04] permet de décrire plus précisément la distribution de probabilités de déplacement d'une particule suivant toutes les directions de l'espace en un point. L'apport de ce modèle dans le suivi des fibres pourrait être testé également.

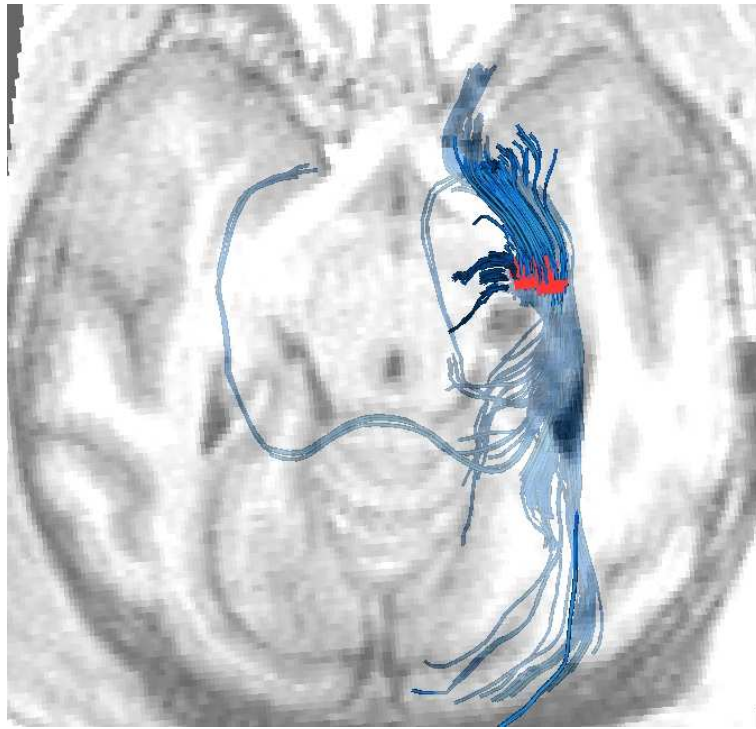


FIG. 5.5 – Un suivi de fibre obtenu par la méthode de [MCCvZ99] utilisant l'information de diffusion en partant de la région rouge représenté dans une IRM anatomique pondérée en T1 en incidence axiale semi-transparente : les fibres semblent correspondre aux connaissances anatomiques des voies optiques mais aucune validation réelle n'a jusqu'alors été réalisée.

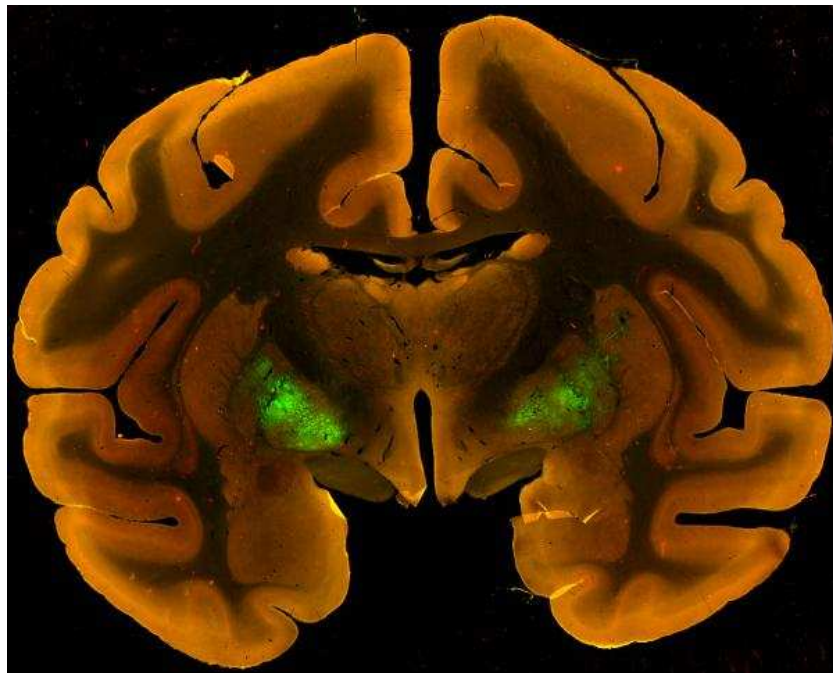
### 5.2.2 Le marquage de la modalité histologique

Pour pouvoir obtenir un marquage de référence, il est nécessaire de mettre en évidence les fibres de façon précise et certaine. Les techniques permettant un marquage visible *in vivo* par IRM comme l'injection de manganèse que nous avons déjà évoquée, sont bien entendu intéressantes mais ne constituent pas en fait de validation ni de référence étant donné que la résolution et donc la précision d'étude reste la même que celle des données de diffusion. D'autre part, le comportement du marquage n'est pas totalement maîtrisé, surtout dans les situations singulières et son emploi, compte-tenu de sa toxicité, n'est pas possible dans toutes les régions du cerveau. Il est donc indispensable d'avoir recours à un marquage histologique qui apporte la résolution et la maîtrise permettant de le considérer comme référence. Ces techniques de marquage sont visibles uniquement sur coupe après sacrifice, soit par fluorescence directe soit après traitement immunohistochimique. La difficulté de ces techniques réside dans l'obtention d'un marquage massif mais spécifique de certains faisceaux d'axones sur tout leur trajet.

Le marquage peut s'effectuer par injection de virus saturant les fibres reliées au point d'injection et comportant une séquence transgénique codant pour la production d'une substance fluorescente comme la Green Fluorescent Protein (GFP) qui puisse être détectée sur coupes (voir **Figure 5.6**). Cependant, l'utilisation de virus est délicate car les virus les plus utilisés et maîtrisés comme le lentivirus exigent des conditions de confinement très contraignantes (laboratoires spéciaux sécurisés) et donc rendent l'expérience difficile à réaliser. Nous avons mené une telle étude utilisant les virus qui ne s'est pas révélée com-



plètement concluante compte-tenu des difficultés d'expérimentation mais également du comportement inconnu des virus utilisés dans certaines régions du cerveau (cortex notamment). Des alternatives aux virus existent bien sûr : il s'agit des marqueurs de neurones fluorescents classiques non viraux comme le Lucifer Yellow qui semblent, dans certaines conditions d'utilisation, conduire aux mêmes résultats que les virus sans les inconvénients de confinement. C'est la solution que nous préconisons pour ce projet. D'autant qu'il est possible d'éviter la coloration *a posteriori* de l'ensemble des coupes en exploitant la fluorescence naturelle des tissus. En effet, l'acquisition de deux images par coupe avec un scanner à fluorescence de type Amersham Biosciences Typhoon peut être réalisée successivement. L'une sélectionne la longueur d'onde d'émission du marquage de fibre. Ce marquage se détache très fortement de l'émission naturelle des tissus, ce qui permet une segmentation des fibres par seuillage (on peut d'ailleurs imaginer plusieurs fibres marquées par différents marqueurs donnant lieu à une image spécifique par marqueur). La deuxième image est acquise dans une autre longueur d'onde : elle reflète la fluorescence naturelle des tissus et offre un contraste des structures suffisant pour constituer une IPM, en suivant le protocole du chapitre 3 dans lequel elle remplace la coupe histologique marquée. Grâce à la cohérence 3D de l'IPM obtenue, nous obtenons une représentation tridimensionnelle des fibres issues de l'histologie.



(a)

FIG. 5.6 – Un essai concluant d'acquisition de coupe marquée en fluorescence de cerveau de macaque (*macaca fascicularis*) par un scanner à fluorescence (Amersham Biosciences, Typhoon). Une image sensible à la longueur d'onde de l'émission du marquage (vert) et une autre image sensible à une autre longueur d'onde (contraste structures internes) sont ajoutées pour former cette image.



### 5.2.3 Confrontation du suivi de fibres histologie-diffusion

Nous avons vu dans le chapitre 3 que la constitution de l'IPM pouvait mener à la mise en correspondance avec les modalités *in vivo*, en particulier avec l'IRM anatomique T1. Nous proposons donc d'utiliser le protocole décrit dans le chapitre 3 pour constituer une Imagerie *Post Mortem* tridimensionnelle, dans la géométrie des modalités *in vivo*, à partir des coupes histologiques acquises par scanner à fluorescence, et donc mettant en évidence les fibres marquées. Après segmentation des fibres sur les coupes, il suffit ensuite d'appliquer aux fibres extraites l'ensemble des transformations permettant de les amener dans la géométrie des fibres segmentées par la méthode *in vivo* basée sur l'information de diffusion. Cette opération s'apparente à celle qui a été appliquée aux segmentations des noyaux thalamiques dans le chapitre précédent dans le même but de confrontation avec l'IRM *in vivo*.

Il est alors possible de confronter les fibres obtenues par les deux méthodes puisqu'elles sont représentées dans la même géométrie. La validation peut être visuelle d'abord, grâce à des rendus volumiques du même type que la **Figure 5.5**. Il est possible d'imaginer des validations plus perfectionnées, qui estimeraient par exemple la distance moyenne entre la fibre de référence obtenue sur coupe et la fibre issue du traitement sur les données de diffusion. Des essais sont actuellement en cours pour réaliser cette expérience, en commençant par vérifier les techniques de marquage histologique chez le rongeur d'abord, avant de lancer l'étude réelle chez le primate, qui permet la réalisation d'IRMs *in vivo* anatomique et pondérée en diffusion avec une résolution suffisante. On peut alors envisager, dans le cas où l'expérience s'avère concluante, de proposer à la communauté scientifique s'intéressant au suivi de fibres par IRM de diffusion, de tester leurs algorithmes. Un jeu de référence incluant les fibres issues du marquage histologique amenées dans la configuration de l'IRM anatomique et de l'IRM pondérée en diffusion, serait mis à disposition sur un site internet, et permettrait de vérifier la pertinence du suivi réalisé, en particulier dans les zones de croisement.

## 5.3 Une transformation élastique biologiquement contrainte basée sur la méthode des éléments finis

### 5.3.1 Déformations résiduelles

Nous avons vu dans le chapitre 1 que le cerveau *post mortem* subissait des déformations primaires 3D liées aux modifications physiologiques, et des déformations secondaires 2D principalement liées à la coupe et aux éventuels traitements de marquage. Nous avons proposé de corriger les principales déformations secondaires par la transformation birigide, traitant chaque hémisphère indépendamment et les déformations primaires par la transformation FFD. Ces solutions donnent des résultats satisfaisants et robustes. Cependant, elles présentent leurs limites, en particulier pour la correction des déformations secondaires.

Les plus importantes déformations secondaires, à savoir les déplacements indépendants d'hémisphères entiers, sont corrigées par la transformation birigide décrite au chapitre 3. Il subsiste cependant encore des déformations entre la photographie et la coupe histologique marquée après cette correction (voir **Figure 5.7**). Ces déformations sont des déplacements et des déformations de girus principalement. Les travaux de [PMBT03] et

d'[APA05] proposent des solutions intéressantes dont nous avons déjà parlé à base de plusieurs transformations affines dans un souci de robustesse face aux artefacts de l'histologie. Les déformations locales semblent cependant non affines étant donné que les différents tissus se déforment différemment, comme le montrent les résultats morphométriques du chapitre 3. Pourtant, l'utilisation de transformations plus libres sans précaution particulière est certainement vouée à l'échec compte-tenu des nombreux artefacts qui caractérisent les données histologiques. Nous proposons donc les grandes lignes d'une méthode qui prendrait en compte des *a priori* biomécaniques sur la transformation. Pour cela, l'utilisation de la méthode des éléments finis nous a paru appropriée. Nous allons décrire les principales étapes de la mise en place de cette méthode adaptée à notre problématique.

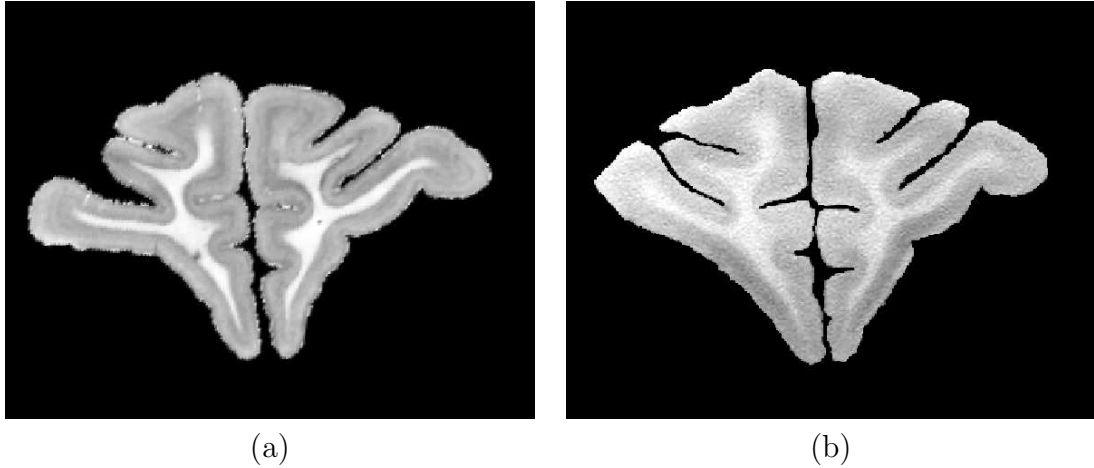


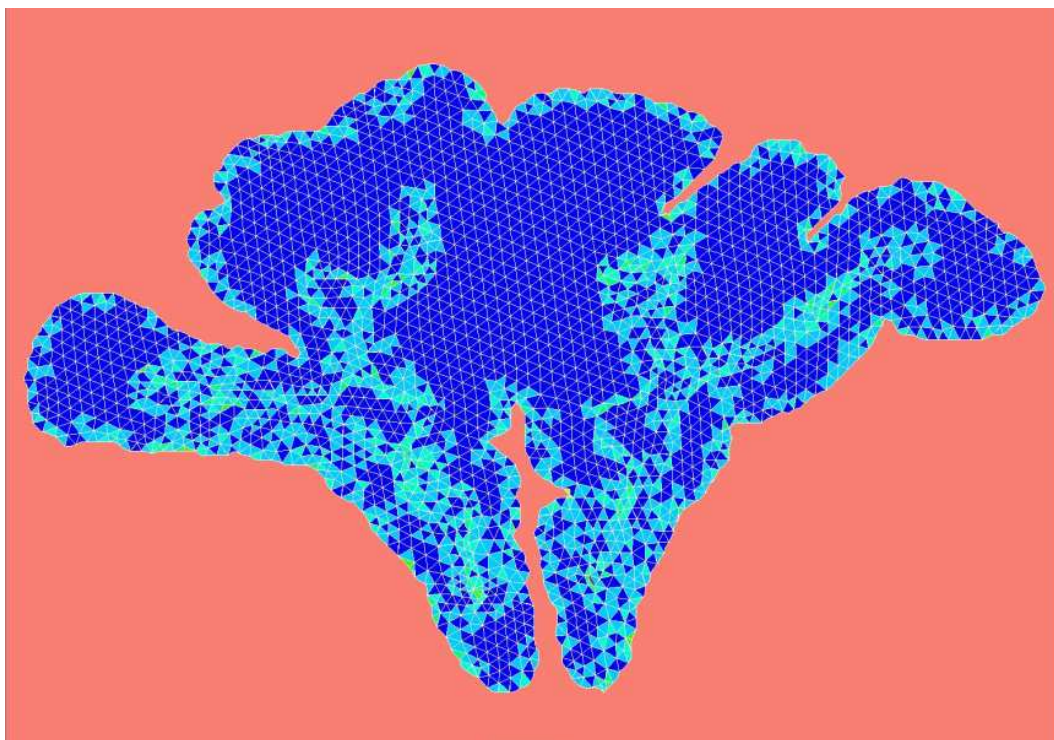
FIG. 5.7 – Une coupe histologique marquée (a) après recalage birigide avec la coupe photographique correspondante (b) : même si les hémisphères sont recalés, il subsiste des déformations locales résiduelles.

### 5.3.2 Ébauche de méthode

Nous allons illustrer les différents traitements de la méthode sur une coupe histologique particulière sur laquelle l'intérêt d'une telle transformation paraît particulièrement justifié.

#### Maillage

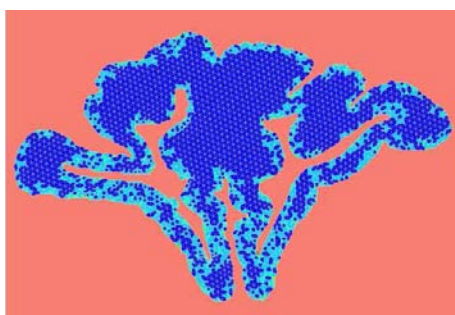
La coupe histologique marquée dont on souhaite corriger les déformations doit d'abord être maillée, c'est-à-dire qu'elle doit être partitionnée en petits domaines élémentaires qui transforment un domaine continu en domaines discrets. Les éléments doivent respecter certaines propriétés de régularité : il s'agit en général de polygones de type triangle ou rectangle en 2D. Les sommets de chaque élément constituent les noeuds du maillage. Le principe de la méthode des éléments finis repose en effet sur le calcul des efforts et des déplacements aux noeuds uniquement, et ensuite à une interpolation par élément partout ailleurs. Nous pouvons voir une coupe maillée avec le logiciel libre *Méfisto* (<http://www.ann.jussieu.fr/~perronnet/mefisto.gene.html>) avec des éléments triangulaires en **Figure 5.8**. L'interface entre la matière grise et la matière blanche, issue de la normalisation d'intensité par analyse d'histogramme décrite au chapitre 3 a été respectée : aucun élément ne se situe à cheval sur la frontière.



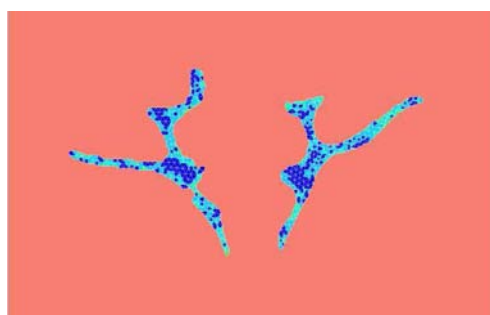
(a)



(b)



(c)



(d)

FIG. 5.8 – Une coupe histologique maillée (a) par le mailleur libre Mefisto : l'interface gris/blanc déduite de la méthode de normalisation par l'analyse d'histogramme (b) est respectée comme on peut le voir sur le maillage de la matière grise seule (c) et de la matière blanche seule (d).

## Champ de déplacement

Le champ de déformations, calculé aux noeuds uniquement, serait par exemple estimé d'une manière similaire mais plus robuste à celle de la méthode de mise en correspondance de blocs utilisée dans ce document pour estimer les transformations affines. Cette estimation robuste du champ de déformations reste à approfondir. Le champ présenté en **Figure 5.9** obtenu par la méthode de mise en correspondance de blocs utilisant le coefficient de corrélation comme critère de similarité (voir Annexe A) comprend les bons déplacements mais également beaucoup de déplacements erronés qu'il faudrait filtrer.

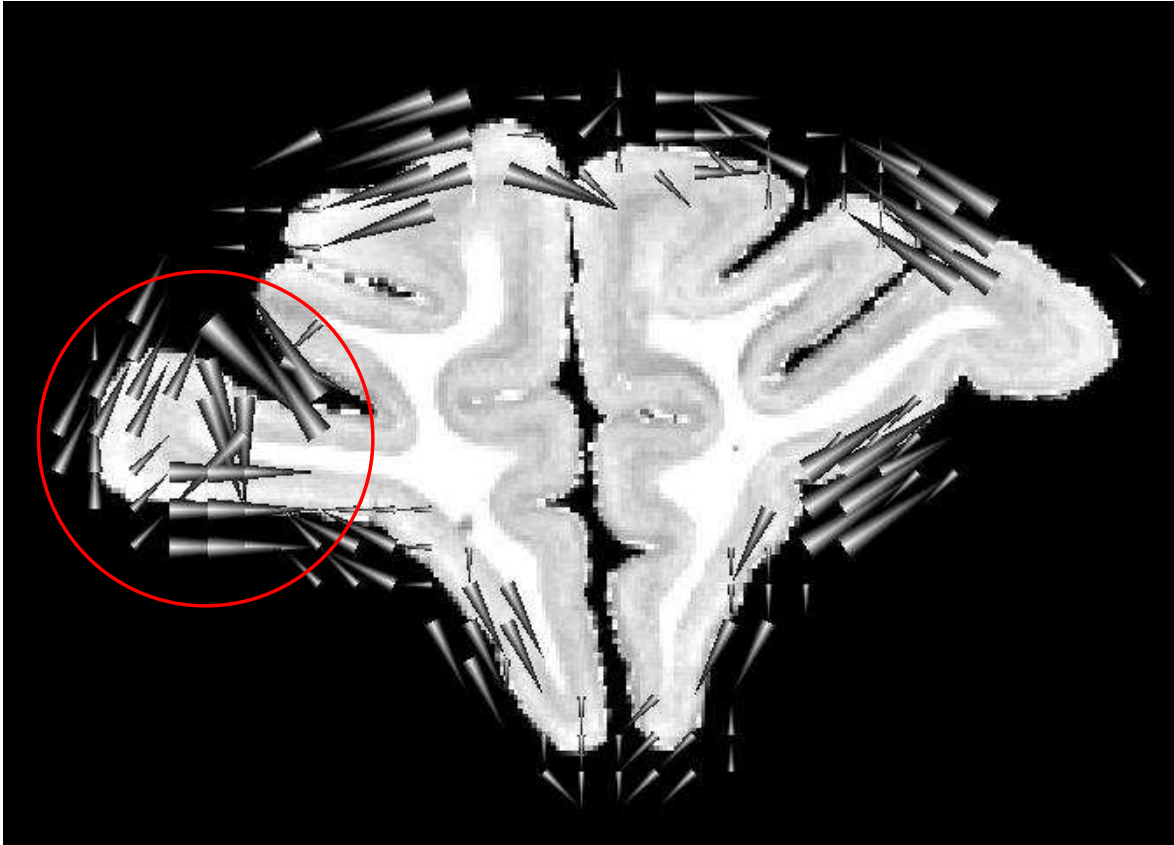


FIG. 5.9 – *Champ de déplacement estimé entre la coupe histologique marquée et la photographie par la méthode de mise en correspondance de blocs utilisant le coefficient de corrélation (voir Annexe A) : la correction du déplacement du sillon (cercle rouge) est bien estimée mais le champ est très bruité.*

## Champ de force

Ce champ de déplacements serait transformé en champ de forces. En effet, imposer des déplacements limiterait l'intérêt de la méthode étant donné qu'en histologie, le champ est très bruité et qu'il est impossible d'accorder une confiance absolue à tous les appariements. Pour cela, le modèle utilisé serait celui d'un ressort de longueur initiale nulle et de raideur  $k$  qui aurait été allongé entre un point de la coupe photographique et le point apparié jugé le plus équivalent sur la coupe histologique marquée (voir **Figure 5.10**). De cette manière, la coupe histologique aura tendance à venir se déformer vers la photographie car les ressorts exerceront une force de rappel de chaque noeud vers la photographie.

La déformation obtenue sera conforme aux propriétés biomécaniques des tissus. En effet, à effort égal, la matière grise se déforme plus que la matière blanche, qui elle-même se déforme plus que les noyaux gris centraux et le thalamus (classe appelée "marqueur" dans la partie traitant de normalisation d'intensité inter-coupes). Notons que la raideur  $k$  du ressort peut être différente pour chaque noeud : il serait possible d'utiliser cette raideur pour refléter la confiance accordée à l'appariement, en fonction par exemple du score de similarité trouvé entre les zones appariées. Il est à noter qu'en fonction des efforts calculés en chaque noeud, il serait possible de détecter les appariements aberrants (aux efforts trop importants), de relâcher la force en ces points et de recalculer la position d'équilibre.

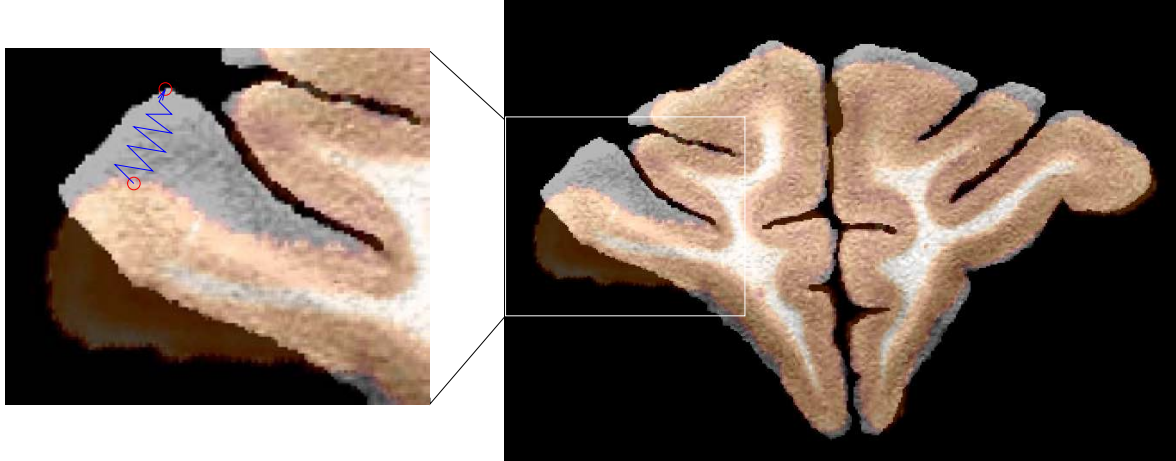


FIG. 5.10 – Image de fusion d'une coupe photographique et d'une coupe histologique marquée (en fausses couleurs orangées) rigidement recalées : représentation dans le cadre grossi d'un ressort virtuel allongé entre deux points appariés pour tenter de ramener le girus déplacé dans sa position originale qui est celle de la photographie.

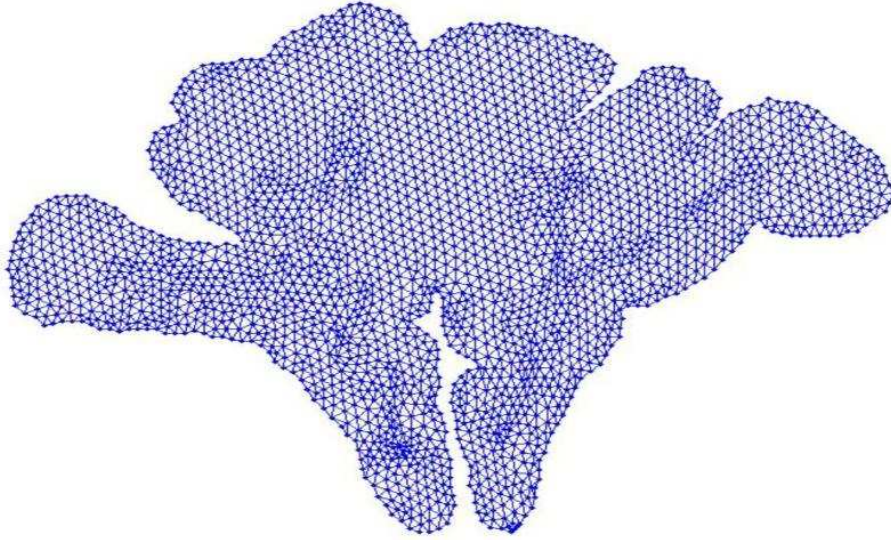
Enfin, il est possible de donner à chaque élément des propriétés mécaniques différentes, en particulier le module d'Young (voir [Bat95] pour plus de précisions), et en cela réside le grand intérêt de la méthode. L'idée est de profiter encore de la classification en tissus obtenue par la méthode de normalisation d'intensité par analyse d'histogramme du chapitre 3 pour affecter les propriétés mécaniques propres au tissu d'appartenance de chaque élément. Ces propriétés peuvent être déduites des pourcentages de contraction du volume de chaque tissu entre le cerveau *in vivo* et *post mortem* en valeurs relatives (cf. chapitre 3).

## Déformation

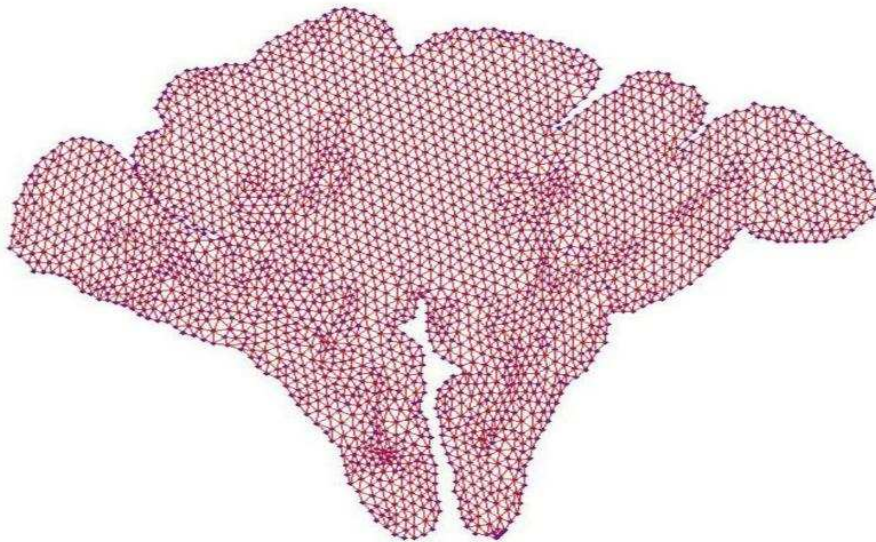
Nous avons réalisé un premier essai de déformation de la coupe histologique marquée. Nous avons réglé les paramètres de telle sorte que les efforts internes soit de l'ordre de  $1N.m^{-1}$  et nous avons choisi la raideur des ressorts de rappel à  $k = 0.1N.m^{-1}$ . Avec ces réglages, nous cherchons à utiliser les efforts internes pour pénaliser les forces de rappel aberrantes. Nous obtenons le champ de déplacement par application d'une transformation affine estimée entre le girus histologique et le girus photographique, transformé en force de rappel. Nous introduisons dans ce champ de force un point aberrant par inversion du champ en ce point. Le résultat obtenu est présenté en **Figure 5.11** : le déplacement du girus n'est pas affecté par la force aberrante. Ce choix de  $k$  assure une certaine robustesse à



la méthode. Le réglage de  $k = 10N.m^{-1}$  entraîne une déformation très perturbée autour du point aberrant. (essais réalisés en collaboration avec P. Laurent, professeur au laboratoire Mathématiques Appliquées aux Systèmes, École Centrale de Paris).



Maillage initial



Maillage déformé

FIG. 5.11 – *Maillage initial et après déformation de la coupe histologique marquée avec un champ de déplacement correspondant à une transformation affine estimée localement entre le girus déplacé de l'histologie et le girus de la photographie. Un point aberrant est introduit dans le champ de déplacement, mais le réglage de la raideur  $k$  de la force de rappel assure une régularité de la déformation.*

Cette méthode de recalage en est encore au stade des premiers essais, en particulier la prise en compte des propriétés mécaniques différentes des tissus n'a pas encore été introduite dans la déformation réalisée. Plusieurs points sont encore à approfondir, comme l'estimation du champ de déplacements ou encore le réglage des propriétés mécaniques des éléments. La mise au point d'une méthode de déformation non affine de ce type constitue un point de grand intérêt pour améliorer la précision de la mise en correspondance entre les modalités *in vivo* et *post mortem*.





# Conclusion

La reconstruction d'une image tridimensionnelle à partir de coupes histologiques bidimensionnelles a constitué le point de départ de ce travail. Nous avons essayé de montrer, à travers les protocoles de constitution et les applications proposées, l'intérêt d'exploiter les informations histologiques en 3 dimensions dans les études biologiques. Retrouver la cohérence spatiale perdue par l'étape de coupe, s'affranchir de l'incidence originale de coupe, appréhender les formes, les volumes et les localisations relatives des structures du cerveau : tels sont les apports premiers de la reconstruction 3D.

Avant cette thèse, de nombreuses méthodes d'alignement de coupes avaient déjà été proposées dans la littérature et des reconstructions de la plupart des types de cerveaux avaient été présentées, mais la méthodologie restait à chaque fois spécifique à une étude précise sans volonté de généralisation. A chaque nouvelle étude, qu'elle soit classique ou particulière, toute la démarche méthodologique nécessaire à la reconstruction 3D était à repenser.

**Histologie et reconstruction 3D** La première démarche de ce travail a donc consisté à essayer de classer les études biologiques utilisant les coupes histologiques en fonction de la démarche à suivre pour obtenir une reconstruction 3D des données. L'impact du type de cerveau traité et l'influence de la nature de l'étude ont ainsi été analysés dans cette optique, et ont mené à la distinction de deux très importantes classes d'études.

La première comprend les études biologiques menées en séries à un stade fondamental, succédant au stade *in vitro* et mettant en jeu des cerveaux de petite taille très faiblement circonvolués tels que ceux de la plupart des rongeurs. Il n'est en général pas réalisé d'imagerie *in vivo*, mais des modalités histologiques anatomiques et fonctionnelles, typiquement des coupes histologiques marquées et des autoradiogrammes, sont disponibles et apportent chacune une information différente et complémentaire. Le protocole "rongeurs", adapté à ce premier type de problématique, décrit comment les reconstructions 3D permettent une exploitation conjointe optimale de ces données.

La seconde classe d'études comprend plutôt quant à elle les études menées à un stade préclinique voire clinique, et s'intéresse aux cerveaux de plus grande taille, présentant un degré de circonvolution important tels que ceux de la plupart des primates. A ce stade d'étude et compte-tenu de la taille des cerveaux considérés, l'imagerie *in vivo* (IRM, TEP...) joue un rôle majeur : une mise en correspondance *in vivo* / *post mortem* est donc de grand intérêt. Le protocole "primates", adapté à ce second type d'études, montre comment établir ce lien en s'appuyant sur les reconstructions 3D.

L'examen de la liste des problèmes rencontrés pour réaliser une reconstruction 3D en fonction des spécificités des études biologiques menant à cette classification constitue la contribution principale du chapitre 1.

**Le protocole rongeurs** Le premier protocole, appelé donc protocole "rongeurs", comporte d'abord une étape d'acquisition optimisée des données anatomiques et fonctionnelles permettant d'obtenir des empilements de coupes à partir d'images globales de colonnes de coupes.

L'étape suivante s'intéresse à l'alignement des coupes anatomiques menant à un volume anatomique spatialement cohérent, puis au co-alignement des coupes fonctionnelles. La méthode de recalage utilisée est celle décrite par [ORS<sup>+</sup>01] entièrement réimplémentée et intégrée dans la plateforme de développement du CEA, Orsay (voir Annexe A). Cette technique d'utilisation de l'anatomie comme référence pour la reconstruction et de co-alignement des données fonctionnelles coupe à coupe assure un recalage tant tridimensionnel que bidimensionnel des deux modalités entre elles.

Ces deux étapes constituent la base de ce protocole de reconstruction 3D couplé : elles sont entièrement automatiques et intégrées dans une interface graphique conviviale.

Grâce à ce couplage anatomo-fonctionnel, il est possible à un expert de délimiter manuellement sur la modalité anatomique des régions tridimensionnelles d'intérêt pour l'étude, en profitant de la cohérence spatiale apportée par la reconstruction. Ces régions peuvent alors être reportées directement sur le volume fonctionnel afin de mener une analyse objective des résultats. Les reconstructions 3D donnent ainsi accès à des données morphométriques classiquement non disponibles.

A ces données viennent s'ajouter des exploitations spécifiques comme l'extraction d'une sous-région d'activation à l'intérieur de la région d'intérêt globale en s'appuyant sur la connexité tridimensionnelle, puis la symétrisation de cette sous-région d'activation en s'affranchissant de l'incidence de coupe. Ces deux traitements, qui sont irréalisables sans reconstruction 3D, donnent lieu à des résultats d'analyse d'un type nouveau : plus précis, objectifs et reproductibles car ne dépendant pas de l'opérateur, et exploitant plus en profondeur les données.

Ce premier protocole global intégrant toutes les étapes depuis l'acquisition des données jusqu'à l'analyse est décrit dans le chapitre 2. Il comprend comme principales contributions l'acquisition optimisée des coupes anatomiques et fonctionnelles, la stratégie de co-alignement permettant une exploitation anatomo-fonctionnelle conjointe, ainsi que l'extraction et la symétrisation automatique d'une sous-région d'activation fonctionnelle.

L'analyse tridimensionnelle conjointe de coupes histologiques anatomiques et fonctionnelles permet d'envisager des approches exploratoires globales, du même type que les études menées chez l'Homme avec des images intrinsèquement 3D comme l'IRM et la TEP. C'est-à-dire qu'il deviendra possible d'aller plus loin que les études biologiques classiquement menées en 2D où l'analyse portait sur une région particulière définie avant l'expérience, connue dans la littérature pour être le siège d'activation lors d'une stimulation particulière. Les reconstructions 3D couplées à des traitement statistiques et des analyses de groupes permettront de découvrir les différentes régions du cerveau significativement impliquées dans une expérience sans *a priori*.

**Le protocole primates** Le second protocole, désigné par protocole "primates", décrit une méthodologie de mise en correspondance d'images *in vivo* et *post mortem*. Il commence par la constitution d'un volume photographique servant de modalité intermédiaire entre l'histologie et l'IRM. Ce volume est obtenu par alignement direct des photographies prises lors de la coupe du cerveau. Les coupes histologiques marquées sont coalignées avec

les coupes photographiques en utilisant une nouvelle transformation dite "birigide", estimant une transformation rigide indépendante par hémisphère. Cette étape donne lieu à un volume histologique similaire au volume photographique de référence. Une déformation non linéaire est ensuite estimée en utilisant les transformations FFD pour corriger les différences de volumes entre la photographie et l'IRM anatomique T1. Cette déformation est ensuite directement appliquée au volume histologique, l'amenant ainsi dans la géométrie du cerveau *in vivo* et réalisant ainsi la mise en correspondance désirée. Le volume histologique corrigé des déformations inhérentes aux données histologiques est ensuite corrigé des différences d'intensité inter-coupes par une méthode originale basée sur une analyse multi-échelle d'histogrammes et exploitant également la cohérence spatiale du volume reconstruit. L'image obtenue, constituée des coupes histologiques coalignées par transformation 2D birigide avec le volume photographique, corrigée des déformations pour retrouver la géométrie du cerveau *in vivo*, et corrigée des différences d'intensité inter-coupes, constitue une modalité d'imagerie biologique à part entière, cohérente spatialement et iconiquement. Cette modalité nouvelle a été appelée **Imagerie *Post Mortem***, ou **IPM**.

Cette démarche est mise en oeuvre pour constituer un atlas 3D du thalamus à partir de tracés réalisés sur coupes histologiques marquées, puis pour l'amener dans la géométrie de l'IRM, et par conséquent de toutes les modalités *in vivo* classiques. Une étude est également menée s'intéressant à la question de la pertinence d'utiliser sur des sujets quelconques un atlas réalisé sur un sujet particulier.

Ce protocole décrivant la réalisation de l'IPM et proposant des applications fait l'objet du chapitre 3. Il intègre comme principales contributions méthodologiques : la mise en place de la transformation "birigide" adaptée à la reconstruction 3D de cerveaux circonvoqués, le choix d'utilisation de la transformation FFD pour estimer les déformations par rapport à l'IRM, la stratégie d'utiliser la modalité photographique pour représenter la géométrie du cerveau *post mortem*, la réalisation de volumes hybrides histologie-photographie et la méthode de correction d'intensité opérant un recalage d'histogrammes basé sur un appariement d'amers géométriques.

Plusieurs points restent à améliorer pour ce protocole qui comporte encore un certain nombre d'étapes non automatisées. En premier lieu, la prise de photographies au cours de la coupe pourrait être couplée au mouvement du couteau, et un système de voyant lumineux pourrait guider l'opérateur pour placer les coupes dans les bons puits afin de permettre à une personne seule de couper et d'obtenir un volume photographique simultanément et sans effort supplémentaire. L'introduction d'un colorant dans la glace entourant le cerveau pendant la coupe permettrait *a posteriori* de segmenter chaque coupe plus facilement sur les photographies en renforçant le contraste. La jonction des blocs reste un problème gênant puisqu'un certain nombre de coupes sont perdues à l'interface et que les plans de coupe de chaque bloc sont souvent non parfaitement parallèles. Relâcher tridimensionnellement la position relative de chaque bloc photographique indépendamment dans l'IRM pourrait s'avérer intéressant à tester, en utilisant une transformation semblable à la transformation birigide mais en trois dimensions et avec autant d'entités que de blocs. L'utilisation d'une transformation plus libre, comme celle décrite au dernier chapitre, peut s'avérer également intéressante après la transformation birigide pour corriger les déformations locales résiduelles et rendre le volume histologique encore plus proche du volume photographique.

**IRM de diffusion et sur-segmentation du thalamus** L'imagerie *in vivo* classique, telle que l'IRM anatomique classique pondérée en T1, fournit une information qui peut s'avérer insuffisante pour certaines structures comme le thalamus. La constitution d'atlas à partir de coupes histologiques marquées constitue une solution *post mortem* particulièrement efficace pour pallier cette insuffisance. Nous avons exploré dans le chapitre suivant une autre façon de bénéficier d'une information supplémentaire au niveau du thalamus. Cette classe de méthodes entièrement *in vivo* consiste à utiliser l'information apportée par l'IRM pondérée en diffusion.

Diverses méthodes basées sur l'utilisation de l'IRM de diffusion ont vu le jour depuis quelques années tentant de parcelliser le thalamus en sous-entités ayant un sens anatomique ou fonctionnel. Après un bref état de l'art de ces méthodes, qui peuvent se regrouper en approche par classification et en approche par connexité, nous avons présenté et appliqué une nouvelle méthode de classification du thalamus basée sur les cartes auto-organisatrices de Kohonen, s'inspirant de méthodes existantes mais cherchant à mieux comprendre la nature de la classification effectuée. Nous avons ensuite confronté les résultats de parcellisation de cette méthode *in vivo* avec les noyaux d'un des atlas réalisés dans le chapitre précédent afin de tenter de trouver un sens anatomique à cette segmentation. Il ressort de cette confrontation qu'une région extraite par IRM de diffusion semble relativement bien correspondre à certains noyaux histologiques, mais que des études supplémentaires sont à mener en testant toutes les méthodes chez le même animal.

Les contributions de ce chapitre 4 concernent principalement la mise en place d'une nouvelle méthode de classification renseignant sur la capacité intrinsèque de l'information de diffusion à différencier des sous-structures dans le thalamus, ainsi que la description d'un protocole de validation de ce type de méthodes par les atlas réalisés sur IPM basé sur la mise en correspondance d'images acquises *in vivo* et *post mortem*.

Plusieurs pistes sont envisageables pour continuer ce travail : tester d'autres types de classifieurs (méthodes à noyaux), tester d'autres types d'attributs que le tenseur (tous les coefficients de directions ou même la distribution de probabilités), tester des distances entre attributs bien adaptées (métrique riemannienne, distance de Kulback) mais également introduire des *a priori* de connexité et de positions géométriques pour aider la classification. La classification des données de patients présentant des pathologies visibles au niveau du thalamus constitue une perspective intéressante également : un travail sur la robustesse de la méthode sera alors à mener pour traiter ces données difficiles.

**Perspectives et discussion** Le dernier chapitre enfin a proposé un ensemble de perspectives supplémentaires possibles concernant l'IPM, qui sont présentées car elles ont déjà fait l'objet de débuts de développements et qu'elles nous ont semblé particulièrement intéressantes.

La première perspective examine la possibilité de profiter de l'information microscopique contenue dans chaque coupe histologique dans une image macroscopique tridimensionnelle obtenue par reconstruction 3D, ou même dans une IRM *in vivo*.

La seconde perspective rejoint la thématique du chapitre précédent puisqu'elle décrit une expérience visant à valider les techniques de suivi de faisceaux de fibres *in vivo* basées sur l'information de diffusion, par confrontation avec un type d'IPM spécialement marquée pour mettre en évidence certaines fibres particulières.

Enfin, la dernière perspective concerne l'amélioration de l'étape de coaligement pour

les primates par introduction d'une transformation élastique biologiquement contrainte utilisant la méthode des éléments finis, et prenant en compte les propriétés de chaque tissu visant à concilier robustesse et précision.

Dans ce chapitre 5, les contributions sont la réalisation d'un lien entre l'information microscopique et les images macroscopiques, la description précise d'une expérience de confrontation de traitements réalisés sur des images acquises *in vivo* et *post mortem* incluant les techniques de marquage histologique et d'acquisition des données, et enfin la description d'une transformation élastique adaptée aux données histologiques.

Comme unification des deux principales thématiques abordées dans ce travail, à savoir le recalage d'images histologiques et l'imagerie de diffusion, une perspective supplémentaire prometteuse consisterait à introduire l'information de diffusion (noyaux, fibres) pour contraindre la déformation d'une image. Tout d'abord, pour le recalage d'une image IRM *in vivo* d'un sujet quelconque avec l'IRM d'un sujet particulier pour adapter un atlas, l'information de diffusion pourrait être utilisée comme attribut supplémentaire associée au niveau de gris et être introduite dans le calcul du coefficient de similarité (comme les vecteurs d'attributs de [SD02] utilisant des moments géométriques invariants). En outre, les fibres d'axones renseignent sur la connectivité cérébrale bien sûr, mais également sur les propriétés mécaniques du cerveau : le tissu cérébral se déforme moins facilement dans le sens des fibres que perpendiculairement. Cette propriété pourrait être exploitée dans un modèle comme celui présenté au chapitre 5 pour contraindre biologiquement la déformation.

Ce travail s'est déroulé dans un environnement pluridisciplinaire où tous les acteurs des études étaient présents et avec lesquels il a été possible d'interagir. Les interactions se sont situées au moment de la mise en place de l'expérience globale pour définir les rôles, mais également au cours de l'expérience au niveau de l'obtention des données, des besoins méthodologiques permettant d'améliorer leur traitement et leur analyse. La méthodologie n'est autant que possible pas intervenue en fin de chaîne comme une sur-couche décorrélée de l'analyse biologique première.

C'est pourquoi une volonté majeure de ce travail a été de penser les traitements dans leur globalité, depuis l'acquisition des données brutes jusqu'à la partie analyse. Cette volonté a impliqué d'envisager la méthodologie dans l'environnement biologique dans lequel elle devait s'intégrer, c'est-à-dire en prenant en compte des contraintes de robustesse dans les traitements, un degré d'automatisation suffisant, une pertinence biologique des résultats, un temps de traitement compatible avec l'étude, un surcoût en efforts compensé par l'apport de résultats nouveaux. Par conséquent, les protocoles proposés assurent un transfert des techniques de la littérature adaptées à la problématique considérée, ou intègrent des méthodologies nouvelles lorsque le besoin s'en fait ressentir.

La notion qui ressort de ce travail est principalement l'**Imagerie *Post Mortem* (IPM)**, qui constitue la base de tous les thèmes développés. Elle constitue une modalité à part entière à prendre en compte dans les laboratoires utilisant l'imagerie histologique, en particulier dans les plateformes multidisciplinaires qui se créent, comme le projet *Imagegene* intégrant des imageurs *in vivo* en même temps que des laboratoires de biologie et d'histologie, et pour lesquels le lien entre l'imagerie *in vivo* et *post mortem* constitue une nécessité absolue.

FIN...





# Annexe A : Le recalage par mise en correspondance de blocs ou *blockmatching*

La technique à la base de la reconstruction 3D est celle du recalage par mise en correspondance de blocs, ou *blockmatching*. Elle a été initialement développée dans le projet de recherche Epidaure de l'INRIA Sophia Antipolis, organisme en collaboration avec lequel cette thèse s'est déroulée, et elle est décrite dans [ORS<sup>+</sup>01]. Étant donné que cette technique est fréquemment utilisée dans ce travail, que mon choix a été de la recoder entièrement (en m'inspirant du logiciel INRIA *Baladin*), afin de l'intégrer dans la plateforme de développement *Aims* (voir le site internet : <http://brainvisa.info>) du Service Hospitalier Frédéric Joliot, CEA, Orsay, et qu'elle sert de point de départ pour notre nouvelle méthode "birigide", nous allons en rappeler le principe.

Nous appellerons I l'image de référence et J l'image que l'on souhaite recaler. Nous supposons les images 2D pour simplifier mais le logiciel fonctionne également en 3D. La méthode se décompose en 2 temps : une recherche d'appariements puis l'estimation de la transformation.

## Recherche des appariements

La première étape de cette méthode consiste à rechercher un champ de déplacement de certaines régions de l'image J vers les régions de l'image I les plus similaires au sens d'une mesure de similarité. Les régions sont définies comme des blocs rectangulaires, généralement carrés par défaut, et la mesure de similarité choisie est généralement le coefficient de corrélation. L'algorithme est itératif.

L'image J est partitionnée en blocs, généralement régulièrement distribués, avec recouvrements possibles. A chaque bloc correspond une position, le centre du bloc par exemple. Pour chacun de ces blocs, une recherche du bloc le plus similaire dans l'image I est effectuée. Pour cela, la position du bloc de l'image J est reportée directement dans l'image I et permet de définir un voisinage de recherche. Le coefficient de similarité entre le bloc de l'image J et les différentes positions de bloc possibles dans le voisinage de l'image I est calculé et la position de bloc dans I proposant le meilleur score est retenue. Le vecteur reliant la position initiale à la position gagnante constitue le vecteur d'appariement associée à la position du bloc de l'image J considéré. L'ensemble des vecteurs d'appariement associés à toutes les positions de blocs de J constitue le champ de déplacement de J vers I.

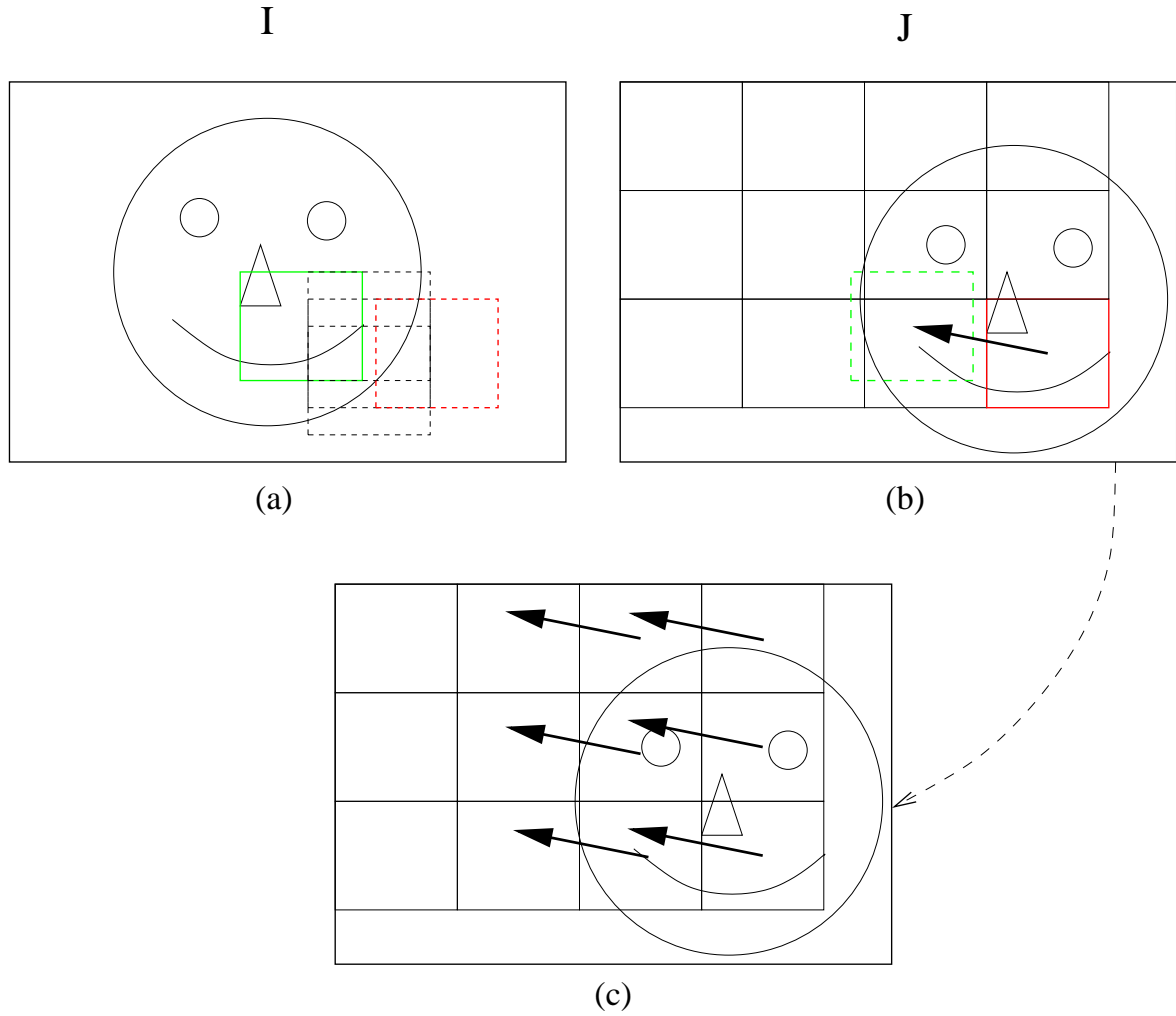


FIG. 5.12 – Principe de la recherche d'appariements par la méthode de mise en correspondance de blocs entre l'image *I* (a) prise comme référence et l'image *J* (b) à recaler. Les appariements trouvés constituent le champ de déplacements (c) utilisé pour estimer la transformation entre les deux images.

Notons qu'il s'opère initialement une sélection des blocs dans *J* consistant à éliminer les blocs homogènes à la variance nulle ou faible, ou ne respectant pas des conditions imposées de seuil sur les niveaux de gris par exemple. De même, les appariements gagnants présentant un score de similarité trop faible peuvent être écartés. La **Figure 5.12** illustre le principe de la recherche d'appariements.

## Estimation de la transformation

### Estimation globale

À partir de ce champ de déplacement, la transformation  $T_0$  appartenant à un ensemble de transformations  $\mathcal{T}$  minimisant l'écart aux moindres carrés entre les appariements initiaux et les déplacements induits par  $T_0$  est estimée. Plus précisément, si l'on

note  $(x_i, y_i), 1 \leq i \leq n$  les points de J et de I appariés,  $T_0$  se caractérise par :

$$T_0 = \underset{T \in \mathcal{T}}{\operatorname{argmin}} \sum_{i=1}^n \|y_i - T(x_i)\|^2$$

L'espace de transformation choisi peut *a priori* être quelconque. La résolution est cependant possible analytiquement pour les ensembles de transformations rigide, similitude et affine (voir [Pen96]). Ce sont donc ces transformations qui sont généralement calculées à partir du champ de déplacements.

## L'étape robuste

Un des points les plus intéressants de cette méthode consiste à l'étape d'estimation robuste que nous allons décrire. Nous avons vu qu'en choisissant un écart aux moindres carrés, la résolution pouvait être analytique. L'inconvénient de cette métrique est sa sensibilité aux points aberrants. De façon à pallier ce problème, une stratégie d'estimation a été proposée consistant à faire plusieurs estimations successives de la transformation, en éliminant à chaque fois les points s'écartant "trop" de la solution. Plus précisément, pour une transformation  $T_0$  estimée, on définit les résidus  $r_i$  de la manière suivante (les résidus sont utilisés au carré) :

$$r_i^2 = \|y_i - T_0(x_i)\|^2$$

Ces résidus indiquent pour chaque point  $x_i$  si son transformé par la transformation  $T_0$  est proche de  $y_i$ . Si un appariement est aberrant, le résidu associé sera important. C'est pourquoi les appariements sont classés par ordre de résidus croissants et ne sont conservés qu'un pourcentage  $p$  des meilleurs résidus. En général,  $p = 50\%$  ce qui autorise un grand nombre de points aberrants. Les transformations affines recherchées étant globales, et comptant au maximum 12 degrés de liberté, le champ offre une importante redondance d'information ce qui permet d'en éliminer une grande partie sans perte de précision.  $T_0$  est alors recalculée avec les appariements sélectionnés uniquement, ce qui permet une estimation plus précise sans perturbation. Ce schéma est itéré plusieurs fois (3 fois dans notre implémentation). Remarquons que ce tri permet d'éliminer les mauvais appariements mais opère également un choix dans les régions à recalculer, dans le cas où la transformation affine recherchée ne suffit pas correctement superposer l'ensemble des images J et I. Cette propriété est exploitée dans la méthode "birigide" présentée au chapitre 3.

À l'issue de cette étape robuste, la transformation  $T_0$  trouvée est utilisée pour ré-échantillonner J. Ce schéma est également itéré, c'est-à-dire que la nouvelle image J' transformée est considérée à la place de J pour l'itération suivante. Environ 3 itérations sont nécessaires au minimum pour estimer une transformation correctement. Ce principe est intégré également dans un schéma multi-échelle qui apporte un gain de temps, un gain en robustesse, et autorise les grands déplacements.

L'estimation de transformations affine par cette méthode, grâce à la stratégie de tri des résidus et à l'approche pyramidale, s'avère particulièrement robuste et efficace, notamment dans le contexte des données histologiques.

## Reconstruction 3D à partir de coupes

La méthode de *Blockmatching* en elle-même n'opère que le recalage de deux images. Pour effectuer une reconstruction 3D complète, il faut opérer un recalage de chaque coupe avec la coupe suivante (cas de l'alignement). Les transformations estimées sont alors composées par rapport à une coupe prise comme référence, puis chaque image est rééchantillonnée par sa transformation composée. Le volume 3D est alors obtenu par empilement des coupes alignées.

Dans le cas du coalignement, chaque coupe est recalée avec la coupe correspondante d'un volume pris comme référence. Aucune composition n'est alors nécessaire, le volume final est obtenu par empilement des coupes coalignées.

Toutes ces opérations sont enchaînées automatiquement grâce à des *scripts* dédiés à chaque application, qui peuvent être lancés à travers une interface graphique.

## Annexe B : Galerie de recalages

Nous allons présenter quelques recalages qui n'avaient pas leur place dans le corps du manuscrit, soit pour des raisons de place et de cohérence, soit parce que ce sont des applications particulières marginales par rapport au thème principal de ce travail, à savoir l'imagerie cérébrale dans le contexte des maladies neurodégénératives principalement.

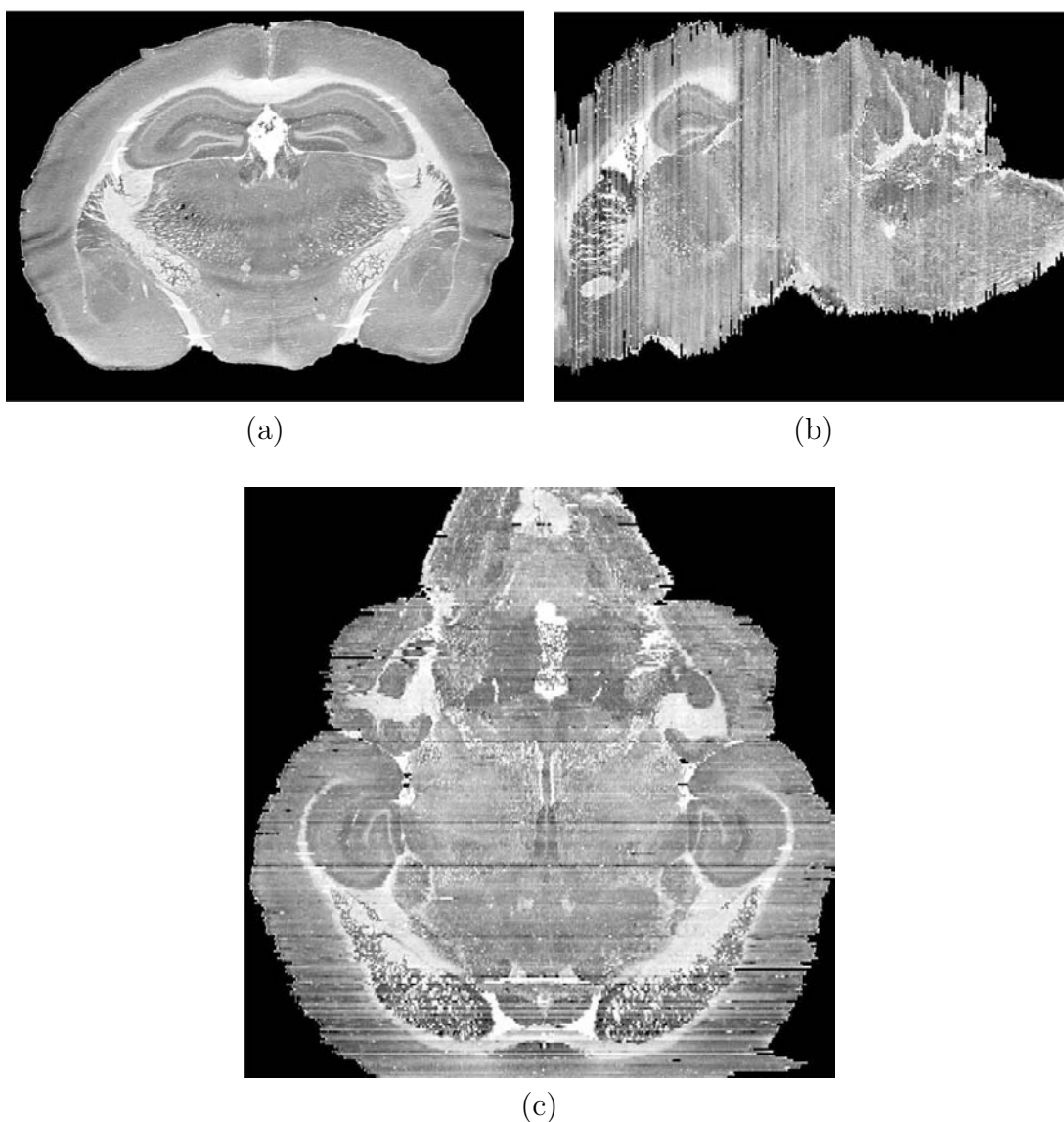


FIG. 5.13 – *Reconstruction complète de coupes histologiques de souris marquées à la cytochrome oxydase présentée sous incidence coronale (a), sagittale (b) et axiale (c).*

Nous présentons à présent une reconstruction d'un hémisphère de cerveau de macaque

qui a la particularité d'avoir été coupé en incidence sagittale. Le but de cette incidence de coupe était de mieux observer les plissements du cerveau dans la partie postérieure du cerveau, qui est difficile à découper en incidence coronale. La reconstruction présentée en **Figure 5.14** illustre bien le problème de déplacements de sillons particulièrement marqués dans cette incidence de coupe et qui perturbent la reconstruction. Néanmoins, dans les régions centrales (noyaux gris centraux), les déformations sont moins prononcées, et la cohérence 3D parvient à être récupérée. Les images proviennent d'une étude décrite dans [DGB<sup>+</sup>96] (merci à R. Toro, UMR 5015 CNRS-Université Claude Bernard Lyon 1 pour ces images).

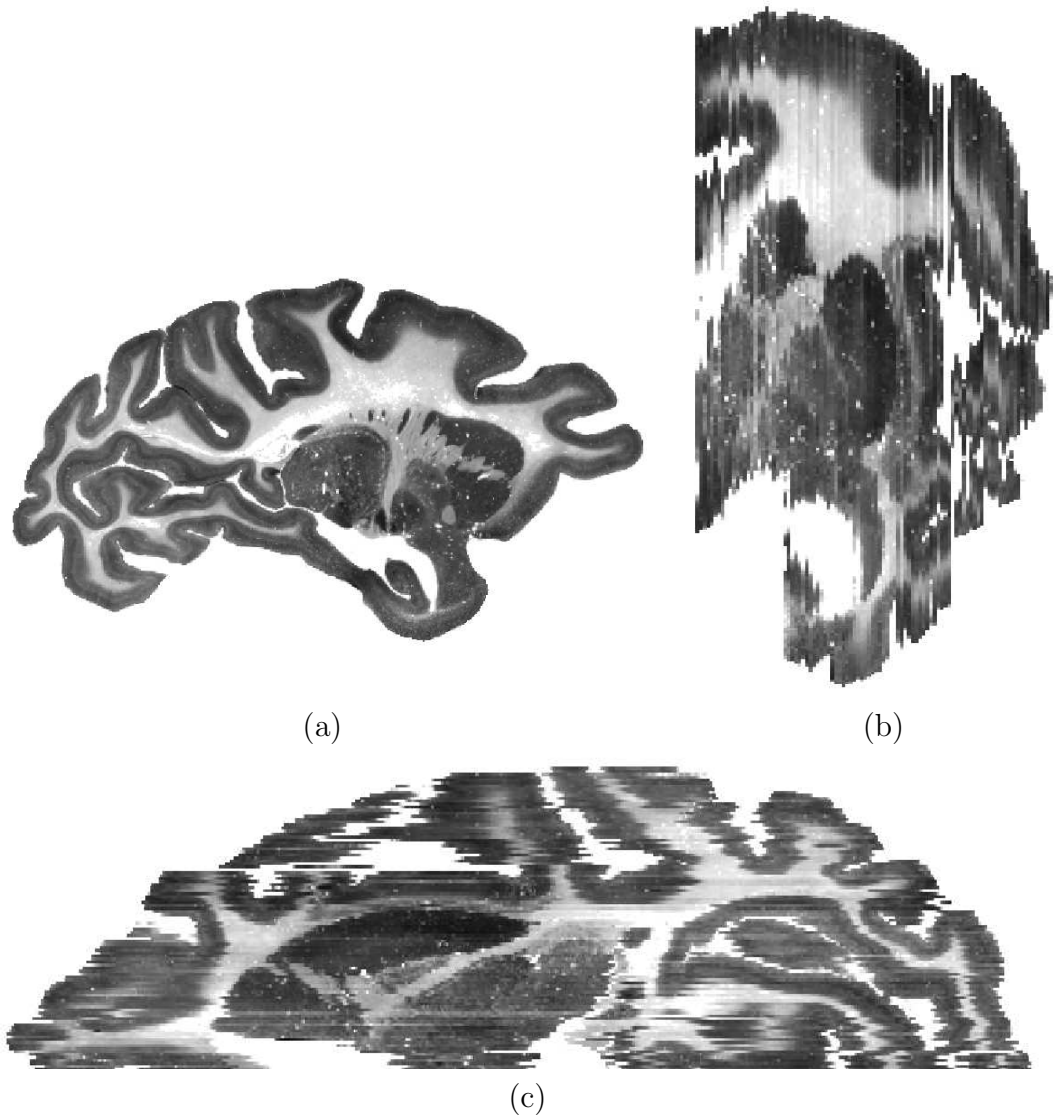


FIG. 5.14 – *Reconstruction de coupes histologiques d'un hémisphère de cerveau de macaque coupé en incidence sagittale (a) et présenté en vue coronale (b) et axiale (c).*

La reconstruction suivante concerne une région du cerveau particulière qui est habituellement non reconstruite en 3D car elle est très fragmentée : il s'agit du cervelet. Les reconstructions conjointes des modalités anatomiques et fonctionnelles de cette structure sont présentées en **Figure 5.15**.

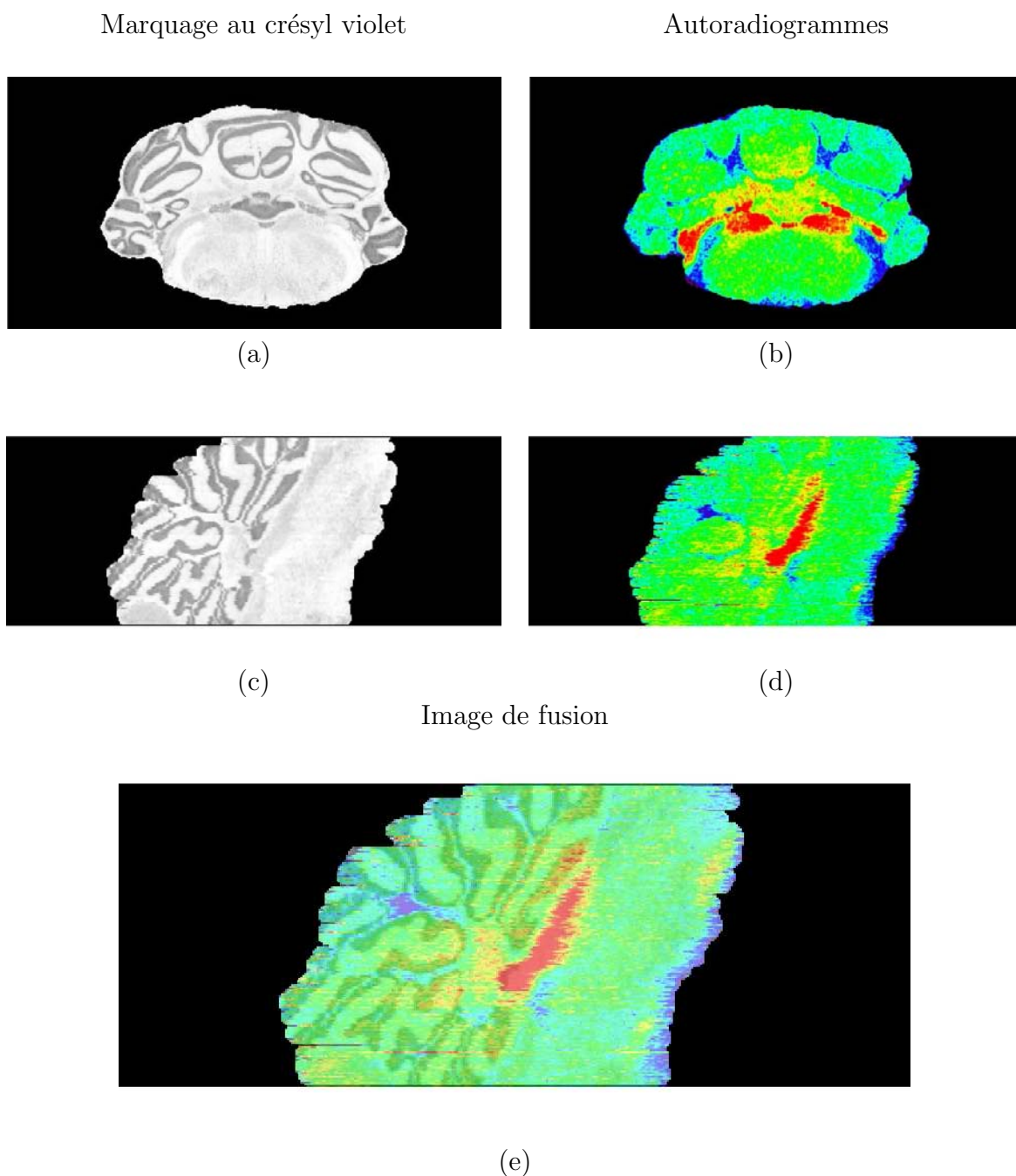


FIG. 5.15 – *Reconstruction 3D du cervelet d'un rat en incidence coronale ( (a) et (b) ) et sagittale ( (c), (d) et (e) ).*

Pour les deux dernières illustrations, il ne s'agit pas de reconstruction 3D à proprement parler puisque l'image initiale est une image tridimensionnelle par nature. Une correction d'alignement est pourtant nécessaire.

Le premier exemple concerne une image échographique bidimensionnelle au cours du temps du foie. Les mouvements respiratoires principalement ont introduit des déplacements périodiques que l'on supposera dans le plan d'observation initial. Ces oscillations sont visibles dans les incidences perpendiculaires au plan d'observation (voir **Figure 5.16** ). L'alignement des coupes successives améliore la stabilité des images permettant un examen de l'image facilité (voir **Figure 5.16** ). Ces images ont été acquises par le docteur



F. Tranquart du CHU Bretonneau à Tours dans le cadre d'une collaboration avec l'unité INSERM U678 de la Pitié-Salpêtrière (F. Frouin, G. Renault).

Enfin, le dernier recalage concerne une IRM d'embryon réalisée *in utero*. Les mouvements de l'embryon entraînent des déplacements des coupes que l'on supposera également plans. La **Figure 5.17** montre l'IRM avant et après alignement. L'image corrigée a une meilleure cohérence tridimensionnelle permettant d'améliorer la qualité de ce genre d'images particulièrement délicates à acquérir. Ces images proviennent du service de Radiologie Pédiatrique du Pr. Brunelle de l'Hôpital Necker pour l'équipe SHFJ/UNAF (J.-F. Mangin, A. Cachia).

Avant correction

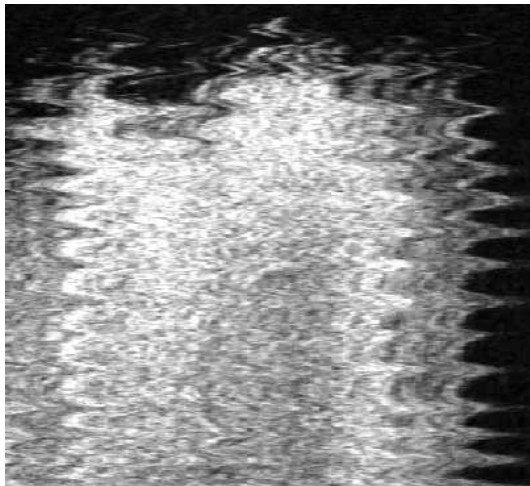
Après correction



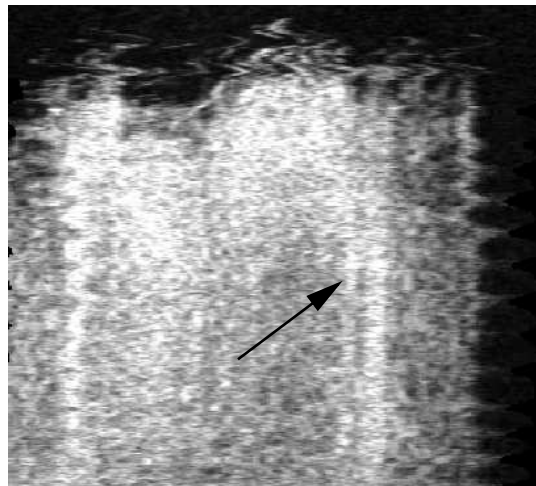
(a)



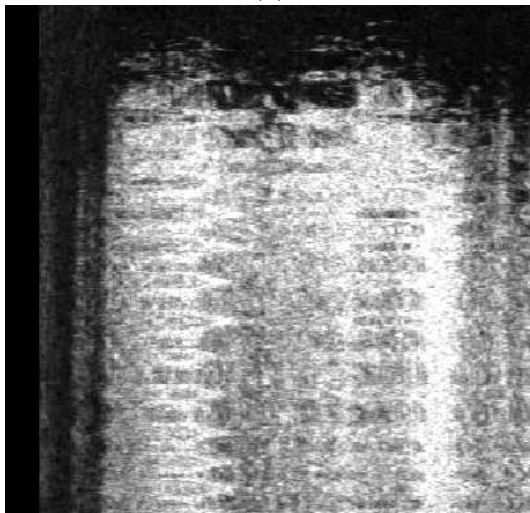
(b)



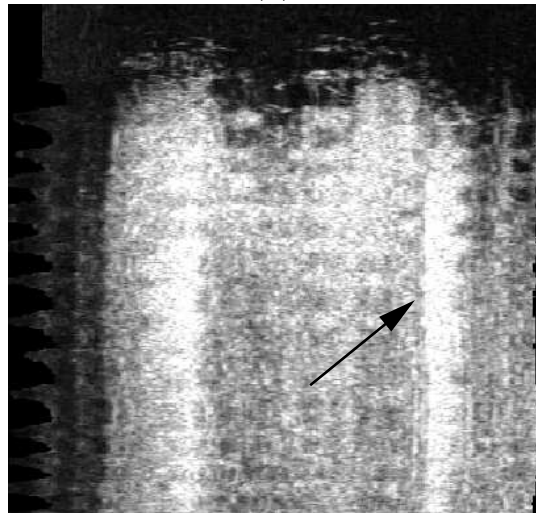
(c)



(d)



(e)



(f)

FIG. 5.16 – Avant et après correction de la stabilité d'une image échographique 2D temporelle du foie : plan d'observation à un instant  $t$  ( (a) et (b) ), incidences perpendiculaires ( (c) et (d) ) et ( (e) et (f) ). Les flèches indiquent les endroits où l'amélioration apportée par l'alignement est particulièrement visible.

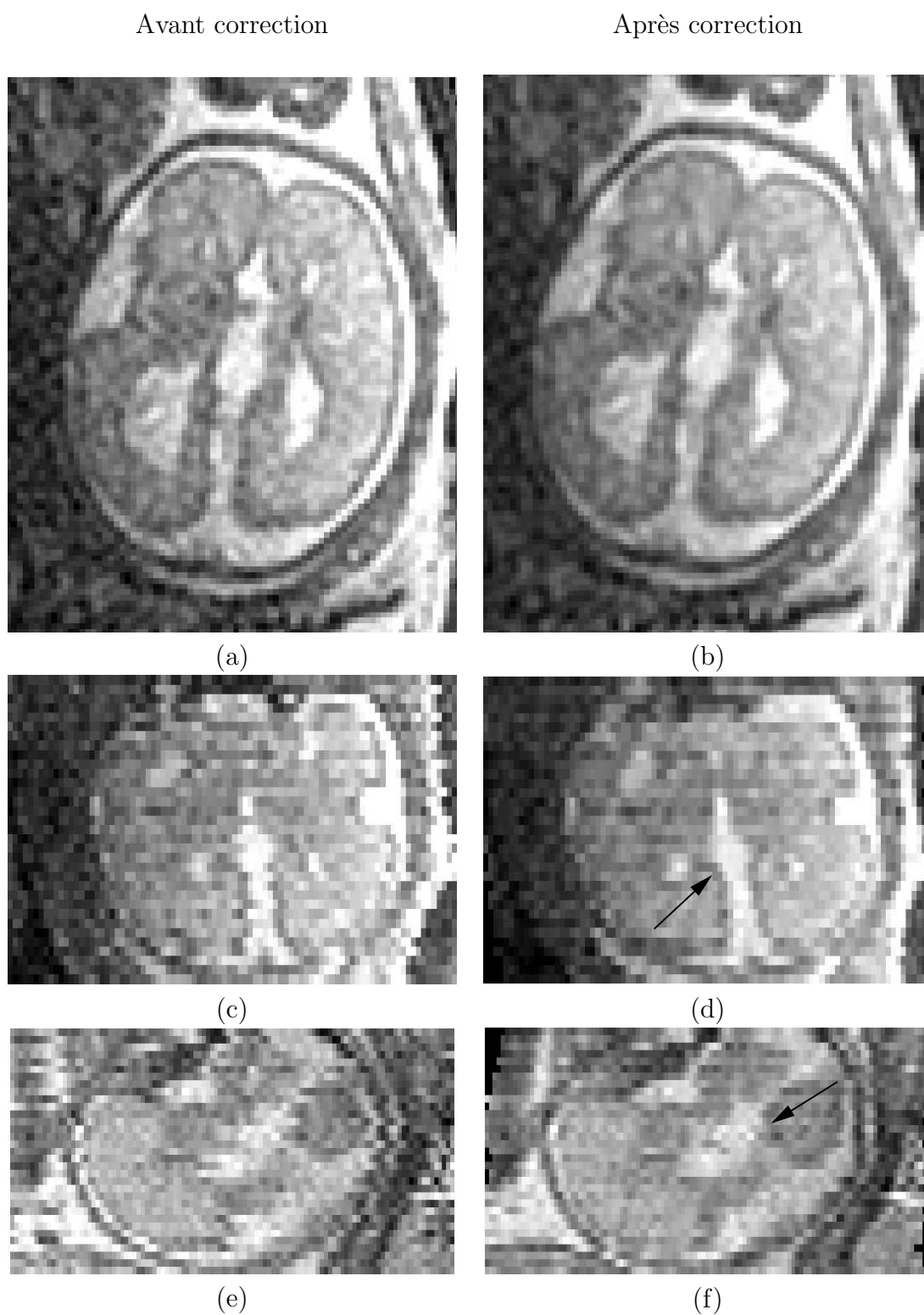


FIG. 5.17 – *IRM de foetus in utero avant et après correction d'alignement selon la direction Z en incidence axiale ( (a) et (b) ), coronale ( (c) et (d) ) et sagittale ( (e) et (f) ). Les flèches indiquent les endroits où la correction est la plus visible.*

# Annexe C : Publications

## Articles

A. S. Hérard, L. Besret, A. Dubois, **J. Dauguet**, T. Delzescaux, P. Hantraye, G. Bonvento and K. L. Moya. siRNA targeted against amyloid precursor protein impairs synaptic activity in vivo. *Neurobiology of Aging*, accepted, 2005.

J. Ros, L. Pellerin, F. Magara, **J. Dauguet**, F. Schenk and P. Magistretti. Metabolic activation pattern of distinct hippocampal subregions during spatial learning and memory retrieval. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, accepted, 2005.

X. Drouot, S. Oshino, L. Besret, B. Jarraya, H. Kishima, P. Rémy, **J. Dauguet**, J. P. Lefaucheur, F. Dollé, F. Condé, M. Bottlaender, M. Peschanski, Y. Kéravel, P. Hantraye, and S. Palfi. Functional recovery in a primate model of parkinson's disease following motor cortex stimulation. *Neuron*, 44(5) :769–78, dec 2004.

H. Kishima, T. Poyot, J. Bloch, **J. Dauguet**, F. Condé, F. Dollé, F. Hinnen, W. Pralong, S. Palfi, N. Déglon, P. Aebischer, and P. Hantraye. Encapsulated gdnf-producing c2c12 cells for parkinson's disease : a pre-clinical study in chronic mptp-treated baboons. *Neurobiol Dis.*, 16(2) :428–39, jul 2004.

## Conférences

**J. Dauguet**, A. Dubois, A.-S. Hérard, L. Besret, G. Bonvento, A. Syrota and T. Delzescaux. An Automated and Robust Protocol to Reconstruct 3D Volume from Histological Sections : Application to an Activation Study in Rat Brain. communication in *The Society of Nuclear Medicine (SNM)*, 52nd Annual Meeting, Toronto, 2005.

**J. Dauguet**, A. Dubois, A.-S. Herard, L. Besret, G. Bonvento, P. Hantraye and T. Delzescaux. Towards a Routine Analysis of Anatomical and Functional *post mortem* Slices in 3 Dimensions. communication in the *XXIInd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function (BRAIN)* and *VIIth International Conference on Quantification of Brain Function with PET (BRAIN-PET)*, Amsterdam, 2005.

A. Dubois, **J. Dauguet**, A.-S. Herard, L. Besret, G. Bonvento and T. Delzescaux. Développement d'un protocole automatisé d'acquisition et de traitement de données biologiques 2D acquises *post mortem*. In *Journées Sciences, Technologies et Imagerie pour la Médecine (JSTIM)*, Nancy, Mars, 2005.

E. Brouillet, N. Bizat, F. Boyer, C. Escartin, **J. Dauguet**, X.-J. Li, M. Peschanski, P. Hantraye, N. Déglon. Aging increases the formation of neuropil aggregates in the rat striatum infected with lentivirus encoding mutant huntingtin. In *Society for Neuroscience Annual Meeting (SFN)*, San Diego, 2004.

A. S. Herard, L. Besret, **J. Dauguet**, T. Delzescaux, A. Dubois, P. Hantraye, K. Moya, G. Bonvento. Decreased Metabolic Response to Visual Stimulation in the Rat Superior Colliculus after Local Knockdown of APP with siRNAs. In *Society for Neuroscience Annual Meeting (SFN)*, San Diego, 2004.

**J. Dauguet**, J.-F. Mangin, and T. Delzescaux and V. frouin. Robust inter-slice intensity normalization using histogram scale-space analysis. Oral presentation in Christian Barillot, David R. Haynor, and Pierre Hellier, editors, *Medical image computing and computer-assisted intervention (MICCAI 2004)*, volume 3216 of *LNCS*, pages 242–249, Saint-Malot, France, September 2004. Springer Verlag.

R. Maroy, G. Douaud, **J. Dauguet**, J. F. Mangin, P. Hantraye. Striatum Parametrisation : a New Basis for the Study of Neuro-Degenerative Processes in Huntington’s Disease. In *Human Brain Mapping (HBM)*, Budapest, 2004.

T. Delzescaux, **J. Dauguet**, F. Condé, R. Maroy, and V. Frouin. Using 3D non rigid ffd-based method to register *post mortem* 3D histological data and in vivo MRI of a baboon brain. In Randy E. Ellis and Terry M. Peters, editors, *Medical image computing and computer-assisted intervention (MICCAI 2003)*, volume 2879 of *LNCS*, pages 965–966, Montreal, Canada, November 2003. Springer Verlag.

**J. Dauguet**, V. Frouin, Y. Cointepas, D. Hervé, N. Ayache, P. Hantraye. Robust Segmentation of the Thalamus using Kohonen algorithm from diffusion tensor images. In *International Society of Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM)*, Toronto, 2002.

# Bibliographie

- [AF97] J. Ashburner and K.J. Friston. Spatial transformation of images. In R.S.J. Frackowiak, K.J. Friston, C. Frith, R. Dolan, and J.C. Mazziotta, editors, *Human Brain Function*, pages 43–58. Academic Press USA, 1997.
- [APA05] Vincent Arsigny, Xavier Pennec, and Nicholas Ayache. Polyrigid and polyaffine transformations : a novel geometrical tool to deal with non-rigid deformations - application to the registration of histological slices. *Medical Image Analysis*, 2005. In press.
- [ARH05] M. Auer, P. Regitnig, and G.A. Holzapfel. An automatic nonrigid registration for stained histological sections. *IEEE Transactions on Image Processing*, 14 :475– 486, 2005.
- [Bat95] J.-L. Batoz. *Modélisation des structures par éléments finis - Tome 1*. Hermès, 1995.
- [BBB<sup>+</sup>04] E. Brouillet, N. Bizat, F. Boyer, C. Escartin, J. Dauguet, X.-J. Li, M. Peschanski, P. Hantraye, and N. Déglon. Aging increases the formation of neuropil aggregates in the rat striatum infected with lentivirus encoding mutant huntingtin. In *Society for Neuroscience Annual Meeting*, San Diego, USA, 2004.
- [BHF<sup>+</sup>95] E. Brouillet, P. Hantraye, R.J. Ferrante, R. Dolan, A. Leroy-Willig, N.W. Kowall, and M.F. Beal. Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci (PNAS)*, 92 :7105–7109, 1995.
- [BJBW<sup>+</sup>03] T.E. Behrens, H. Johansen-Berg, M.W. Woolrich, S.M. Smith, C.A. Wheeler-Kingshott, P.A. Boulby, G.J. Barker, E.L. Sillery, K. Sheehan, O. Ciccarelli, A.J. Thompson, J.M. Brady, and P.M. Matthews. Non-invasive mapping of connections between human thalamus and cortex using diffusion imaging. *Nat. Neurosci.*, 19 :750–757, 2003.
- [BML94] P.J. Basser, J. Mattiello, and D. LeBihan. Mr diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys. J.*, 66 :259–267, 1994.
- [BOD<sup>+</sup>02] Eric Bardinet, Sébastien Ourselin, Didier Dormont, Grégoire Malandain, Dominique Tandé, Karine Parain, Nicholas Ayache, and Jérôme Yelnik. Co-registration of histological, optical and MR data of the human brain. In Takeyoshi Dohi and Ron Kikinis, editors, *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI’02)*, volume 2488 of *LNCS*, pages 548–555, Tokyo, September 2002. Springer.
- [Cac02] P. Cachier. *Recalage non rigide d’images médicales volumiques - contribution aux approches iconiques et géométriques*. PhD thesis, École Centrale des Arts et Manufactures, 2002.

- [CE98] D.L. Collins and A.C. Evans. *Animal : Automatic non-linear image matching and anatomical labeling*. A. Toga, ed., Academic Press, 1998.
- [CG00] Marie Cottrell and Patrice Gaubert. Classification of recurring unemployed workers and unemployment exits. *European Journal of Economic and Social Systems*, 14 :53–68, 2000.
- [CGH04] William R. Crum, Lewis D. Griffin, and David J. Hawkes. Automatic estimation of error in voxel-based registration. In *MICCAI (1)*, pages 821–828, 2004.
- [Chr99] G.E. Christensen. Consistent linear-elastic transformations for image matching. In *Information Processing in Medical Imaging*, volume 1613 of *LCNS*, pages 224–237. Springer-Verlag, 1999.
- [CMG<sup>+</sup>01] Y. Cointepas, J.-F. Mangin, L. Garnero, J.-B. Poline, and H. Benali. Brain-VISA : Software platform for visualization and analysis of multi-modality brain data. In *Proc. 7th HBM*, page S98, Brighton, United Kingdom, 2001.
- [COZ<sup>+</sup>00] A. C. F. Colchester, S. Ourselin, Y. Zhu, E. Bardinet, Y. He, A. Roche, S. Al-Sarraj, B. Nailon, J. Ironside, and N. Ayache. 3-d reconstruction of macroscopic optical brain slice images. In A.M. DiGioia and S. Delp, editors, *Third International Conference on Medical Robotics, Imaging And Computer Assisted Surgery (MICCAI 2000)*, volume 1935 of *Lectures Notes in Computer Science*, Pittsburgh, Pennsylvanie USA, octobre 11-14 2000. Springer.
- [CRJ<sup>+</sup>04] W. R. Crum, D. Rueckert, M. Jenkinson, D. Kennedy, and S. M. Smith. A framework for detailed objective comparison of non-rigid registration algorithms in neuroimaging. In Christian Barillot, David R. Haynor, and Pierre Hellier, editors, *Medical image computing and computer-assisted intervention (MICCAI 2004)*, volume 3216 of *LNCS*, pages 679–686, Saint-Malot, France, September 2004. Springer Verlag.
- [CYHN98] F.S. Cohen, Z. Yang, Z. Huang, and J. Nissanov. Automatic matching of homologous histological sections. *IEEE Trans Biomed Eng.*, 45(5) :642–649, 1998.
- [DDC<sup>+</sup>03] T. Delzescaux, J. Dauguet, F. Condé, R. Maroy, and V. Frouin. Using 3D non rigid ffd-based method to register post mortem 3D histological data and in vivo MRI of a baboon brain. In Randy E. Ellis and Terry M. Peters, editors, *Medical image computing and computer-assisted intervention (MICCAI 2003)*, volume 2879 of *LNCS*, pages 965–966, Montreal, Canada, November 2003. Springer Verlag.
- [DDH<sup>+</sup>05a] J. Dauguet, A. Dubois, A.-S. Herard, L. Besret, G. Bonvento, P. Hantraye, and T. Delzescaux. Towards a routine analysis of anatomical and functional post mortem slices in 3 dimensions. In *XXIInd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function (BRAIN) and VIIth International Conference on Quantification of Brain Function with PET (BRAIN-PET)*, Amsterdam, 2005.
- [DDH<sup>+</sup>05b] J. Dauguet, A. Dubois, A.-S. Hérard, L. Besret, G. Bonvento, A. Syrota, and T. Delzescaux. An automated and robust protocol to reconstruct 3d volume from histological sections : Application to an activation study in rat brain. In *The Society of Nuclear Medicine (SNM)*, Toronto, 2005.
- [DFC<sup>+</sup>02] J. Dauguet, V. Frouin, Y. Cointepas, D. Hervé, N. Ayache, and P. Hantraye. Robust segmentation of the thalamus using kohonen algorithm from diffusion

- tensor images. In *International Society of Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM)*, Toronto, 2002.
- [DFF03] T. Delzescaux, H. Foehrenbach, and V. Frouin. A performance study for whole-body helicoidal ct/pet-fdg a posteriori registration using rigid and non-rigid ffd-based methods. In *Proceedings of Society of Nuclear Medicine (SNM)*, Nouvelle-Orléans, 2003.
- [DGB<sup>+</sup>96] C. Dehay, P. Giroud, M. Berland, H. Killackey, and H. Kennedy. Contribution of thalamic input to the specification of cytoarchitectonic cortical fields in the primate : Effects of bilateral enucleation in the fetal monkey on the boundaries, dimensions, and gyrification of striate and extrastriate cortex. *J Comp Neurol*, 367 :70–89, 1996.
- [DMDf04] J. Dauguet, J.-F. Mangin, T. Delzescaux, and V. frouin. Robust inter-slice intensity normalization using histogram scale-space analysis. In Christian Barillot, David R. Haynor, and Pierre Hellier, editors, *Medical image computing and computer-assisted intervention (MICCAI 2004)*, volume 3216 of *LNCS*, pages 242–249, Saint-Malot, France, September 2004. Springer Verlag.
- [DOB<sup>+</sup>04] X. Drouot, S. Oshino, L. Besret, B. Jarraya, H. Kishima, P. Rémy, J. Dauguet, J. P. Lefaucheur, F. Dollé, F. Condé, M. Bottlaender, M. Peschanski, Y. Kéravel, P. Hantraye, and S. Palfi. Functional recovery in a primate model of parkinson’s disease following motor cortex stimulation. *Neuron*, 44(5) :769–78, dec 2004.
- [FAF<sup>+</sup>95] K.J. Friston, J. Ashburner, C. Frith, J.B. Poline, J. D. Heather, and R.S.J. Frackowiak. Spatial registration and normalization of images. *Human Brain Mapping*, 2 :165–189, 1995.
- [FGB<sup>+</sup>99] A.A. Flynn, A.J. Green, G. Boxer, R.B. Pedley, and R.H. Begent. A comparison of image registration techniques for the correlation of radiolabelled antibody distribution with tumour morphology. *Phys Med Biol.*, 44(7) :N151–N159, Jul 1999.
- [FM05] Céline Fouard and Grégoire Malandain. 3-d chamfer distances and norms in anisotropic grids. *Image and Vision Computing*, 23(2) :143–158, February 2005.
- [GBR<sup>+</sup>99] I.D. Grachev, D. Berdichevsky, S.L. Rauch, S. Heckers, D.N. Kennedy, V.S. Caviness, and N.M. Alpert. A method for assessing the accuracy of intersubject registration of the human brain using anatomic landmarks. *Neuroimage*, 9 :250–268, 1999.
- [GGH<sup>+</sup>03] L.L. Grate, J.A. Golden, P.J. Hoopes, J.V. Hunter, and A.C. Duhaime. Traumatic brain injury in piglets of different ages : techniques for lesion analysis using histology and magnetic resonance imaging. *J. Neurosci. Methods*, 123 :201–206, 2003.
- [GTN03] S. Gefen, O.J. Tretiak, and J. Nissanov. Elastic 3-d alignment of rat brain histological images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 22, 2003.
- [HBC<sup>+</sup>03] P Hellier, C Barillot, I Corouge, B Gibaud, G Le Goualher, D L Collins, A Evans, G Malandain, N Ayache, G E Christensen, and H J Johnson. Retrospective evaluation of intersubject brain registration. *IEEE Trans Med Imaging*, 22(9) :1120–30, September 2003.



- [HH88] L.S. Hibbard and R.A. Hawkins. Objective image alignment for three-dimensional reconstruction of digital autoradiograms. *J. Neurosci. Methods*, 26(1) :55–74, Nov 1988.
- [HMP<sup>+</sup>05] D. Hervé, N. Molko, S. Pappata, F. Buffon, D. Lebihan, M.G. Bousser, and H. Chabriat. Longitudinal thalamic diffusion changes after middle cerebral artery infarcts. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 76(2) :200–205, Feb 2005.
- [HVP<sup>+</sup>93] P. Hantraye, M. Varastet, M. Peschanski, D. Riche, P. Cesaro, J.C. Willer, and M. Maziere. Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic mptp administration in baboons. *Neuroscience*, 53(1) :169–178, Mar 1993.
- [HW79] J.A. Hartigan and M.A. Wong. A k-means clustering algorithm. *Appl. Statist.*, 28 :100–108, 1979.
- [JMH94] A.S. Jones, B.K. Milthorpe, and C.R. Howlett. Measurement of microtomy-induced section distortion and its correction for 3-dimensional histological reconstructions. *Cytometry*, 15 :95–105, 1994.
- [Kah79] W. Kahle. *Anatomie Tome 3 : système nerveux et organes des sens*. Flammarion Médecine-Sciences, édition 13, 2000, 1979.
- [KBFM97] B. Kim, J.L. Boes, K.A. Frey, and C.R. Meyer. Mutual information for automated unwarping of rat brain autoradiographs. *NeuroImage*, 5 :31–40, 1997.
- [Koh84] T. Kohonen. *Self-Organization and Associative Memory*. Springer-Verlag, 1984.
- [KPB<sup>+</sup>04] Haruhiko Kishima, Thomas Poyot, Jocelyne Bloch, Julien Dauguet, Françoise Condé, Frédéric Dollé, Françoise Hinnen, William Pralong, Stéphane Palfi, Nicole Déglon, Patrick Aebischer, and Philippe Hantraye. Encapsulated gdnf-producing c2c12 cells for parkinson’s disease : a pre-clinical study in chronic mptp-treated baboons. *Neurobiol Dis.*, 16(2) :428–39, jul 2004.
- [LLH<sup>+</sup>89] A.C. Laan, W.H. Lamers, D.P. Huijsmans, A. Te Kortschot, J. Smith, J. Strackee, and J.A. Los. Deformation-corrected computer-aided three-dimensional reconstruction of immunohistochemically stained organs : application to the rat heart during early organogenesis. *The Anatomical Record*, 224 :443–457, 1989.
- [LRRF04] C. Lenglet, M. Rousson, R.Deriche, and O. Faugeras. Towards segmentation of 3d probability density fields by surface evolution : Application to diffusion mri. Research Report 5243, INRIA, July 2004.
- [LWC<sup>+</sup>03] C.P. Lin, V.J. Weeden, J.H. Chen, C. Yao, and W.Y.I. Tseng. Validation of diffusion spectrum magnetic resonance imaging with manganese-enhanced rat optic tracts and ex vivo phantoms. *Neuroimage*, 19 :482–495, 2003.
- [Man00] J.-F. Mangin. Entropy minimization for automatic correction of intensity nonuniformity. In *IEEE Work. MMBIA*, pages 162–169, Hilton Head Island, South Carolina, 2000. IEEE Press.
- [Mat00] D. Mattes. *Automatic Multimodality Image Registration with Deformations. Technical report, Thesis for the degree of MS in Electrical Eng.* PhD thesis, Univ. of Washington Medical Center, Seattle, 2000.
- [MB03] Grégoire Malandain and Eric Bardin. Intensity compensation within series of images. In Randy E. Ellis and Terry M. Peters, editors, *Medical image*

- computing and computer-assisted intervention (MICCAI 2003)*, volume 2879 of *LNCS*, pages 41–49, Montreal, Canada, November 2003. Springer Verlag.
- [MBNV04] Grégoire Malandain, Éric Bardinet, Koen Nelissen, and Wim Vanduffel. Fusion of autoradiographs with an MR volume using 2-D and 3-D linear transformations. *NeuroImage*, 23(1) :111–127, sep 2004.
  - [MCCvZ99] S. Mori, B.J. Crain, V.P. Chacko, and P.C. van Zijl. Three-dimensional tracking of axonal projections in the brain by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol.*, 45, 1999.
  - [MCF98] J.-F. Mangin, O. Coulon, and V. Frouin. Robust brain segmentation using histogram scale-space analysis and mathematical morphology. In *Proc. 1st MICCAI*, LNCS-1496, pages 1230–1241, MIT, Boston, Oct. 1998. Springer Verlag.
  - [MCT<sup>+</sup>97] M.S. Mega, S.S. Chen, P.M. Thompson, R.P. Woods, T.J. Karaca, A. Tiwari, H.V. Vinters, G.W. Small, and A.W. Toga. Mapping histology to metabolism : Coregistration of stained whole-brain sections to premortem pet in alzheimer’s disease. *NeuroImage*, 5, 1997.
  - [MPC<sup>+</sup>02] J.-F. Mangin, C. Poupon, C. Clark, D. Le Bihan, and I. Bloch. Distortion correction and robust tensor estimation for mr diffusion imaging. *Med. Image Anal.*, 6, 2002.
  - [MVS03] Frederik Maes, Dirk Vandermeulen, and Paul Suetens. Medical image registration using mutual information. *Proceedings of the IEEE*, 91(10) :1699–1722, 2003.
  - [ORS<sup>+</sup>01] S. Ourselin, A. Roche, G. Subsol, X. Pennec, and N. Ayache. Reconstructing a 3d structure from serial histological sections. *Image and Vision Computing*, 19(1-2) :25–31, January 2001.
  - [Our02] S. Ourselin. *Recalage d’Images Médicales par Appariement de régions. Application à la construction d’atlas histologiques 3D*. PhD thesis, Université de Nice Sophia Antipolis, 2002.
  - [Pen96] X. Pennec. *L’incertitude dans les problèmes de reconnaissance et de recalage – Applications en imagerie médicale et biologie moléculaire*. PhD thesis, Ecole Polytechnique, 1996.
  - [PFA04] X. Pennec, P. Fillard, and N. Ayache. A riemannian framework for tensor computing. Research Report 5255, INRIA, July 2004. To appear to the Int. Journal of Computer Vision.
  - [PHT00] G. Paxinos, X. F. Huang, and A. W. Toga. *The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 2000.
  - [PMBT03] A. Pitiot, G. Malandain, E. Bardinet, and P. Thompson. Piecewise affine registration of biological images. In J.C. Gee, J.B. A. Maintz, and M. W. Vannier, editors, *Second International Workshop on Biomedical Image Registration WBIR’03*, volume 2717 of *Lecture Notes in Computer Science*, pages 91–101, Philadelphia, PA, USA, 2003. Springer-Verlag. Also research report INRIA RR-4866.
  - [POA02] S. Prima, S. Ourselin, and N. Ayache. Computation of the mid-sagittal plane in 3d brain images. *IEEE Transaction on Medical Imaging*, 21(2) :122–138, February 2002.

- [Pou99a] C. Poupon. *Détection des Faisceaux de Fibres de la Substance Blanche pour l'Etude de la Connectivité Anatomique Cérébrale*. PhD thesis, ENST, 1999.
- [Pou99b] F. Poupon. *Parcellisation systématique du cerveau en volumes d'intérêt. Le cas des structures profondes*. Phd thesis, INSA Lyon, Lyon, France, Dec. 1999.
- [RCM<sup>+</sup>97] A. Rangarajan, H. Chui, E. Mjolsness, S. Pappu, L. Davachi, P. Goldman-Rakic, and J. Duncan. A robust point-matching algorithm for autoradiograph alignment. *Med Image Anal.*, 1(4) :379–398, Sep 1997.
- [Roc01] Alexis Roche. *Recalage d'images médicales par inférence statistique*. Thèse de sciences, Université de Nice Sophia-Antipolis, February 2001.
- [RRC<sup>+</sup>03] D. Rivière, J. Regis, Y. Cointepas, D. Papadopoulos-Orfanos, A. Cachia, and J.-F Mangin. A freely available anatomist/ brainvisa package for structural morphometry of the cortical sulci. In *Human Brain Mapping*, page 934, 2003.
- [RSH<sup>+</sup>99] D. Rueckert, L. I. Sonoda, C. Hayes, D. L. Hill, M. O. Leach, and D. J. Hawkes. Non-rigid registration using free-form deformations : Application to breast mr images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 18(8) :712–721, 1999.
- [SD02] Dinggang Shen and Christos Davatzikos. Hammer : Hierarchical attribute matching mechanism for elastic registration. *IEEE Trans. Med. Imaging*, 21(11) :1421–1439, 2002.
- [SDZ95] T. Schormann, A. Dabringhaus, and K. Zilles. Statistics of deformations in histology and application to improved alignment with mri. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 14 :25–35, 1995.
- [Sok80] L. Sokoloff. Regional cerebral glucose utilization measured with the 2-[14c]deoxyglucose technique : its use in mapping fonctionnal activity in the nervous system. *Acta Neurol. Scand.*, 62 :128–146, 1980.
- [Thi98] J.-P. Thirion. Image matching as a diffusion process : an analogy with maxwell's demons. *Medical Image Analysis*, 2(3) :243–260, 1998.
- [TT96] P.M. Thompson and A.W. Toga. A surface-based technique for warping 3dimensional images of the brain. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 4 :1–16, 1996.
- [Tuc04] D.S. Tuch. Q-ball imaging. *Magn Reson Med.*, 52 :1358–1372, 2004.
- [VW97] P. Viola and W. M. Wells. Alignment by maximization of mutual information. *International Journal of Computer Vision*, 24 :137–154, 1997.
- [WTLW03] M.R. Wiegell, D.S. Tuch, H.B. Larsson, and V.J. Wedeen. Automatic segmentation of thalamic nuclei from diffusion tensor magnetic resonance imaging. *Neuroimage*, 19 :391–401, 2003.

**Résumé :** La reconstruction 3D de coupes histologiques donne lieu à une nouvelle modalité tridimensionnelle que nous désignons par Imagerie *Post Mortem* ou IPM. Après avoir proposé une classification des études mettant en jeu l’histologie et concernant le cerveau, nous décrivons dans ce travail de thèse deux protocoles de constitution d’IPM cérébrale. Le premier protocole concerne les animaux de type rongeurs. Il comprend l’acquisition et l’extraction en séries de données anatomiques (coupes histologiques marquées) et fonctionnelles (coupes autoradiographiques). Ces étapes sont suivies de l’alignement et du coaligement des coupes histologiques pour constituer un volume anatomique et un volume fonctionnel spatialement cohérents et recalés entre eux, permettant de mener des analyses 3D. Le deuxième protocole concerne les animaux de type primates. Il décrit une méthode complète de mise en correspondance d’images *in vivo* et *post mortem*. Un volume de coupes histologiques est obtenu par coaligement avec des photographies prises lors de la coupe. Une normalisation d’intensité inter-coupes robuste est proposée pour rendre également cohérent tridimensionnellement en intensité ce volume. Enfin, une déformation élastique est estimée entre le cerveau *post mortem* et le cerveau dans sa géométrie *in vivo* (représenté par l’IRM) pour corriger les différences de volume inhérentes à l’histologie. La réalisation d’atlas du thalamus, puis une confrontation avec une segmentation réalisée *in vivo* en IRM de diffusion par une nouvelle méthode par classification sont présentées comme applications directes de ce protocole. Nous concluons ce travail par diverses perspectives d’utilisation de l’IPM.

---

**Title and summary :** Cerebral three-dimensional *Post Mortem* Imaging : constitution and contribution for the joint analysis of anatomo-functional histological data and matching with *in vivo* imaging.

The 3D reconstruction of histological slices yields a new modality that we call *Post Mortem* Imaging (PMI). In this thesis, we propose a classification for brain histology studies, and we describe two protocols for the constitution of cerebral PMI. The first protocol deals with animals such as rodents. It includes the acquisition and the extraction of anatomical (stained histological slices) and functional (autoradiographies) series. This step is followed by the alignment and the coalignment of the histological slices to constitute anatomical and functional volumes that are spatially consistent and registered, allowing the performance of 3D analysis. The second protocol deals with animals such as primates. It describes a complete method for matching *in vivo* and *post mortem* data. A volume of histological slices is obtained by coalignment with block face photographs taken of the brain during the cutting process. Furthermore, a robust inter-slice intensity normalisation is proposed to recover intensity 3D consistency. Finally, an elastic deformation is estimated between the *post mortem* brain and the brain in its *in vivo* geometry (embodied by the MRI data) to correct for volume differences related to histology. As direct applications of this protocol, we present the creation of atlases of the thalamus, which are compared to an *in vivo* segmentation of the thalamus realized on diffusion MRI data using a new method based on classification mechanisms. We conclude this work through the utilisation of PMI and its prospects for the future.

---

**Discipline :** Traitement des images.

---

**Mots clefs :** reconstruction 3D, coupes histologiques, recalage *in vivo-post mortem*, atlas.

---

**Laboratoire :** Service Hospitalier Frédéric Joliot, CEA 4, place du Général Leclerc 91401 Orsay France.