

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

Symboles

E_i = potentiel d'équilibre pour un ion i ,

V = potentiel électrique

I = courant électrique

G = conductance électrique

R = résistance électrique

C = capacitance électrique

$[i]$ = concentration ionique de l'ion i

F = constante de Faraday

T = température

R = constante des gaz parfaits

z_i = valence de l'ion i

\ln = logarithme naturel

ΔF = la largeur de bande

μm = micromètre

$\text{M}\Omega$ = mégaohms

$\Delta\nu$ = décalage du nombre d'onde

ν = nombre d'onde

λ = longueur d'onde

" = pouce

W= watt

l= litre

g= gramme

°= degré

°C= degré Celsius

°K= degré Kelvin

Hz= hertz

s= seconde

M= molaire (mol/l)

mol= mole

C= coulomb

k = constante de Boltzmann

m = mètre

σ = conductivité

kDa = kilodalton

Abréviation

AP = antéro postérieur

ACSF = fluide cérébral spinal artificiel

COPL = Centre optique, photonique et laser

CRULRG = Centre de recherche université Laval à Robert-Giffard

CCD = « Charge-Coupled Device », ou dispositif à transfert de charge

CO₂ = dioxyde de carbone

CaCl₂ = chlorure de calcium

Cl = chlore

D.N. = densité neutre

DV = dorso ventral

DiI = dialkylcarbocyanine

DS = déviation Standard

EGFP=	« EGreen Fluorescent protein » (Protéine fluorescente verte amplifié)
GFP=	« Green Fluorescent protein » (Protéine fluorescente verte)
GAD65=	protéine anti-glutamate decarboxylase 65
GeO ₂ =	dioxyde de germanium
HeNe=	laser hélium-néon
INO=	Institut national d'optique
KCl=	chlorure de potassium
L5=	vertèbre lombaire 5 de la moelle épinière
ML=	médio latéral
MCVD=	« modified chemical vapor deposition » ou dépôt chimique en phase vapeur modifié
MgSO ₄ =	sulfate de magnésium
NaH ₂ PO ₄ =	phosphate de potassium monobasique
NaHCO ₃ =	bicarbonate de sodium
NaCl=	chlorure de sodium
O=	oxygène
O.N. =	ouverture numérique

p.a.=	potentiel d'action
PMT=	« Photomultiplier tube » ou tube photomultiplicateur
PSF =	« point spread function » ou réponse impulsionnelle
RMS=	« root mean square » ou valeur efficace
SNC =	Système nerveux central
SN =	système nerveux
S1=	vertèbre sacrale 1 de la moelle épinière
UV=	ultraviolet
VPL =	noyaux ventraux pariétal latéral et médian du thalamus
VPM=	noyaux ventraux pariétal médian du thalamus
10x=	grossissement de 10 fois

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
ABSTRACT	iv
AVANT-PROPOS	vi
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	viii
TABLE DES MATIÈRES	xiii
Chapitre 1; Introduction	1
1.1.1 Le système nerveux central	3
1.1.2 Neurobiologie cellulaire	4
1.1.3 Les systèmes biologiques	10
1.2 Techniques pour sonder le vivant <i>in vivo</i>	12
1.2.1 Techniques d'enregistrement optique par fluorescence <i>in vivo</i>	12
1.2.2 Techniques d'enregistrement électrophysiologique unicellulaire <i>in vivo</i>	16
1.2.3 Les signaux électrophysiologiques <i>in vivo</i>	20
1.3 La problématique	25
1.4 Littérature en lien direct avec la problématique	26
1.4.1 La fibre optique traditionnelle	27
1.4.2 Les fibres optiques non conventionnelles	28
1.4.3 Littérature relative aux solutions à base de fibres optiques et d'électrodes	29
1.5 Microsonde optique et électrique	33
1.6 Présentation de la thèse	35
Chapitre 2; La microsonde : Matériel et méthode	36
2.1 Les quatre générations de fibres à doubles cœurs	37
2.1.1 La première génération de fibre	37
2.1.2 La deuxième génération de fibre	40
2.1.3 La troisième génération de fibre	42
2.1.4 La quatrième génération de fibre	44
2.2 Fabrication de la pointe et emplissage	46

2.2.1 Étirement de la pointe	46
2.2.2 La clive de la pointe	48
2.2.3 Emplissage de la pointe par l'électrolyte	53
2.3 Jonction électrique	54
2.3.1 Jonction électrique par trou latéral	54
2.3.2 Jonction électrique directe	57
2.4 Jonction optique	59
2.5 Montage	61
2.6 Conclusions	63
Chapitre 3; Propriétés optiques de la microsonde	65
3.1.1 Propagation de la lumière et perte lumineuse	67
3.1.2 Analyse du bruit optique	72
3.2 Détection optique <i>in vitro</i>	79
3.2.1 Preuve de concept <i>in vitro</i>	79
3.2.2 Détection de neurones en culture	82
3.2.3 Détection de neurones en tranches	83
3.3 Simulation numérique de la détection optique	87
3.3.1 Objectifs	87
3.3.2 Paramètres du modèle	87
3.3.3 Dynamique de la modélisation	89
3.3.4 Modélisation du champ de détection optique	92
3.4 Conclusions	98
Chapitre 4; Expérimentation <i>in vivo</i>	99
4.1 Résultats dans la moelle épinière de rats	100
4.1.1 Paramètres expérimentaux	101
4.1.2 Enregistrements électrophysiologiques extracellulaires	103
4.1.3 Enregistrement optique de neurones fluorescents unitaires	112
4.1.4 Artéfacts des mouvements physiologiques	115
4.1.5 Critère de co-localisation	118
4.1.6 Enregistrements optiques et électriques en parallèle	119
4.2 Résultats dans le cerveau de Souris Transgéniques	125
4.2.1 Enregistrement optique et électrique	125
4.3 Conclusions	128
Chapitre 5; Conclusions et perspective de recherche	131

5.1 Conclusions.....	131
5.1.1 Méthodologie	132
5.1.2 Propriétés optiques de la microsonde	133
5.1.3 Enregistrements <i>in vivo</i>	135
5.1.4 Conclusion générale de la thèse	136
5.1.5 Originalité et avantages:.....	137
5.2 Perspectives de recherche	138
5.2.1 Limites et améliorations	138
5.2.2 Expériences en continuation directe (court et moyen terme)	142
5.2.3 Expériences potentielles (moyen et long terme).....	142
Annexe A; Calcul du diamètre des corps cellulaires des neurones	144
A.1 Diamètre des neurones spino-thalamiques	144
A.2 Diamètre des neurones du Réticulaire talmique marqué à la GFP, des souris GAD-GFP+	146
Annexe B; Méthodologie relative aux tranches <i>in vitro</i>	147
B.1 Préparation des tranches cérébrales	147
Annexe C; Méthodologie relative aux expériences <i>in vivo</i>	149
C.1 Expérimentation <i>in vivo</i> chez le rat	150
C.1.1 Marquage rétrograde.....	150
C.1.2 Chirurgie et préparation des rats	150
C.1.3 Protocole d'enregistrement	151
C.2 Expérimentation <i>in vivo</i> chez la souris	151
C.2.1 Souris GAD65-EGFP+	151
C.2.2 Chirurgie et préparation des souris	151
C.2.3 Protocole d'enregistrement	152
Annexe D; Positionnement axial de la microsonde	153
Bibliographie	156

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La spécialisation de la recherche scientifique pousse de plus en plus les chercheurs à établir des collaborations multidisciplinaires. Ces types de coopérations ouvrent de nouveaux horizons. Prenons, par exemple, la rencontre entre la physique et la biologie. La biologie offre de nouveaux défis à la physique, avec ces systèmes hautement complexes et dynamiques. La physique, quant à elle, offre de nouveaux outils à la biologie, avec des méthodes expérimentales et des techniques d'analyse novatrices.

Cette thèse fut réalisée dans ce contexte multidisciplinaire. Elle se trouve à la jonction entre la photonique (l'étude de la génération, du contrôle et de la détection des photons) et la biologie (la science qui a pour objet l'étude des êtres vivants et des phénomènes qui les caractérisent)¹. Cette union donne lieu à la biophotonique, qui étudie l'interaction entre la lumière et la matière biologique². Cette thèse se situe plus précisément à la croisée entre la photonique et la neurobiologie (l'étude des cellules du système nerveux, de leurs organisations dans un circuit fonctionnel traitant l'information et de leurs influences sur le comportement)³. L'union de ces deux champs scientifiques se nomme la neurophotonique; elle permet d'utiliser le contrôle de la lumière pour sonder et influencer le système nerveux.

L'union entre la neurobiologie et l'optique semble toute naturelle, car les nouvelles techniques optiques ont de tout temps contribué à l'essor de la neurobiologie. Par exemple, dans les années 1830, l'amélioration des microscopes a fait voir le jour à la théorie cellulaire et, dans les années 1860, le développement des méthodes de coloration a permis d'approfondir l'étude des cellules nerveuses⁴. Des percées similaires se font encore de nos jours, comme le montrent les nouvelles technologies de microscopies à haute résolution⁵⁻⁸ (e.g. STED, PALM, STORM, Microscopie électronique) et les nouvelles techniques de coloration par fluorescence⁹ (le prix Nobel de chimie de 2008 fut décerné pour la découverte et le développement de la « Green Fluorescent Protein, GFP »)¹⁰.

Le présent document expose la démarche et les résultats scientifiques relatifs au développement d'une nouvelle méthode expérimentale permettant de sonder le système nerveux *in vivo*. Le but de cette technique est de détecter optiquement un neurone appartenant à une population spécifique et d'en enregistrer son champ électrophysiologique. Nous proposons ici une microsonde, à base de fibre optique, permettant d'acquérir de l'information provenant d'un neurone d'une population prédéterminée, et ce, profondément dans le système nerveux central (SNC) d'un animal vivant. Les données recueillies contribueront ainsi à la compréhension de l'encodage de l'information par le système nerveux.

Il est important de mettre les efforts nécessaires pour créer des outils qui aideront à mieux comprendre les causes des problématiques du système nerveux. Les développements faits en neurobiologie ont souvent une portée plus large, qui touche la neuroscience en général, une science qui vise à comprendre les procédés mentaux régissant les pensées, les émotions et le comportement humain ¹¹. Ces différents aspects de la vie humaine sont en partie contrôlés par le système nerveux. Une bonne compréhension de celui-ci permet de mieux cerner le fonctionnement de l'homme et offre la possibilité de déterminer les mécanismes impliqués lors de désordres neuronaux. Des maladies comme les troubles psychiatriques, l'Alzheimer, la douleur chronique, la sclérose en plaques, le parkinson et l'épilepsie sont des exemples de problèmes neurologiques qui ont de graves conséquences sur la vie des personnes atteintes et celle de leurs familles.

Le chapitre 1 présente une problématique neuroscientifique dans son contexte et propose une solution. La section 1.1 expose le contexte neurobiologie en parcourant le système nerveux central et la neurobiologie cellulaire pertinente à la thèse. La section 1.2 présente les façons d'enregistrer de la fluorescence et les méthodes d'enregistrement électrophysiologique unicellulaire *in vivo*. La section 1.3 expose la problématique; il s'agit de trouver un moyen d'enregistrer les signaux optique et électrophysiologique provenant d'un neurone *in vivo*. La section 1.4 montre les pistes de solutions retrouvées dans la littérature. La section 1.5 propose une solution à la problématique fondée sur une microsonde à base de fibre optique à deux cœurs, l'un optique et l'autre électrique. Finalement, la section 1.6 présente l'ensemble de la thèse.

1.1 LE CONTEXTE NEUROBIOLOGIQUE

1.1.1 Le système nerveux central

L'étude du système nerveux est un domaine vaste et complexe. Il importe donc de bien situer la présente étude. La microsonde présentée dans cette thèse vise l'enregistrement optique et électrique de neurones du SNC. Ce dernier se compose de six structures organisationnelles suivantes: la moelle épinière, le myélocéphale, le métencéphale, le mésencéphale, le diencephale et les hémisphères cérébraux ¹¹⁻¹³.

On présente à la figure 1.1 un schéma général des six différentes parties anatomiques.

- 1- La moelle épinière sert à la fois comme système d'intégration de l'information et comme voie de communication entre le cerveau et le reste du corps. Elle est composée de deux régions : une centrale et une périphérique. La région centrale (constituée de matière grise) contient des corps cellulaires servant à acheminer, à moduler et à récolter l'information hors de la moelle. La région périphérique (constituée de matière blanche) contient des fibres nerveuses myélinisées servant à conduire l'information. On y distingue des fibres sensorielles ascendantes et des fibres motrices descendantes.
- 2- Le myélocéphale est constitué principalement du bulbe rachidien. Il inclut divers centres responsables de fonctions autonomes vitales comme la digestion, la respiration et le rythme cardiaque.
- 3- Le métencéphale est composé du pont et du cervelet. Le pont est formé d'un faisceau de fibres nerveuses qui relie les deux parties du cervelet. Ce dernier est une structure intervenant essentiellement dans la coordination motrice et l'équilibre.
- 4- Le mésencéphale se trouve juste avant d'atteindre le cerveau. Il s'agit d'un centre de coordination sensoriel principalement impliqué dans le contrôle des mouvements oculaires chez les vertébrés supérieurs.
- 5- Le diencephale est au centre du cerveau. Il est composé de l'hypothalamus et du thalamus. L'hypothalamus est un système d'intégration essentiel à la survie impliqué dans les systèmes de régulation et d'adaptation à l'environnement, tandis que le thalamus est impliqué dans le traitement des informations sensorielles et/ou de certaines activités motrices (en faisant le pont vers le cortex).
- 6- Les hémisphères cérébraux, en périphérie du cerveau, sont constitués du cortex cérébral (impliqué dans la gestion des fonctions cognitives) et de trois structures profondes : les ganglions de la base (régulent les performances motrices), l'hippocampe (impliqué dans la mémorisation) et les noyaux amygdaliens (coordonnent les réponses autonomes et endocrines des émotions) ¹¹⁻¹³.

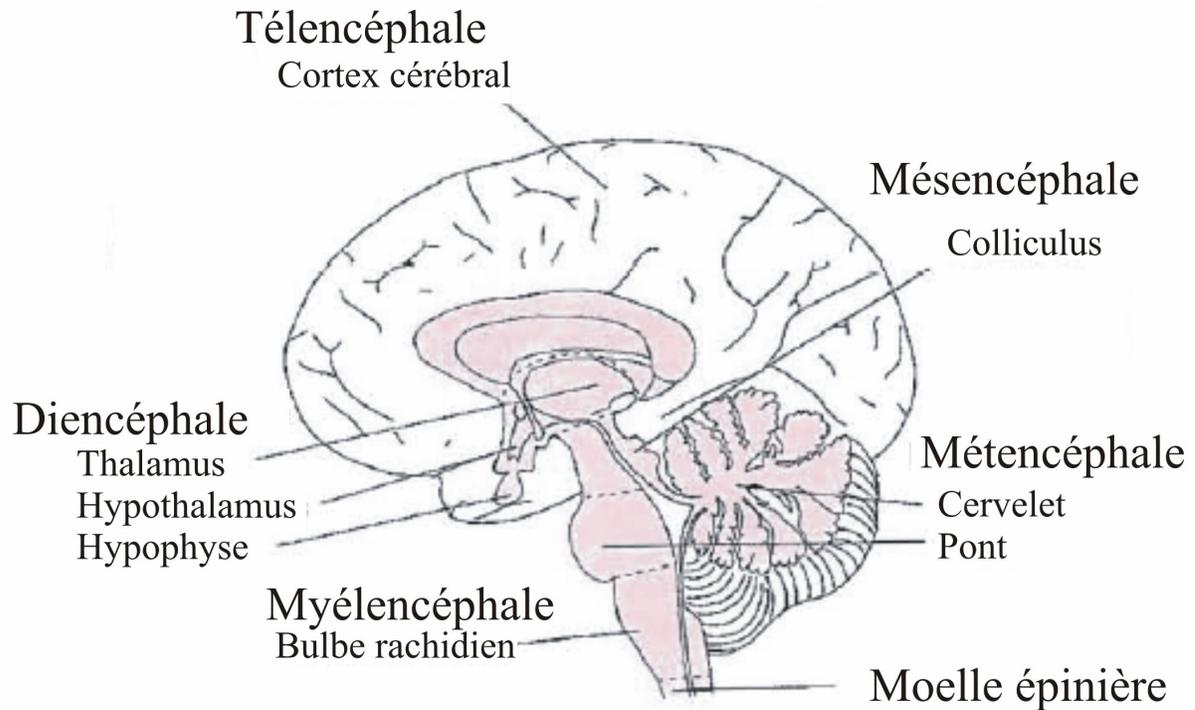


Figure 1.1 Illustration des principales structures du système nerveux central. La figure est tirée du livre de D. Richard et D. Orsal ¹³.

1.1.2 Neurobiologie cellulaire

Le Système nerveux central est composé de milliards de sous unités : les cellules. Deux types cellulaires composent principalement le SCN, les cellules nerveuses (neurones) et les cellules gliales (glie). Chez l'homme, on estime le nombre de neurones à 10^{13} et le nombre de glies à 10 fois plus¹³. Chaque neurone intègre l'information provenant de milliers d'autres neurones et il distribue son propre message à des milliers d'autres cellules. De plus, les cellules gliales qui entourent les neurones participent activement à cette dynamique. Ce qui en fait un réseau complexe de communication.

La glie joue un rôle actif dans le SNC. Elle fut longtemps négligée par les neuroscientifiques, mais ces nombreuses contributions au bon fonctionnement du SNC lui valent aujourd'hui une pleine attention. Trois types de cellules gliales sont présentes dans le SNC : les astrocytes (elles sont reliées par des jonctions communicantes, elles forment un réseau permettant la diffusion rapide de molécules et elles jouent un rôle dans l'architecture

du cerveau et auprès des synapses)¹⁴⁻¹⁸, les oligodendrocytes (forment une gaine de myéline autour de certains axones de SNC)^{14,19} et la microglie (les principales cellules immunocompétentes du SNC)²⁰⁻²². Ces cellules ne sont pas directement étudiées dans cette thèse, mais elles sont à prendre en compte lors de l'étude des dynamiques du SNC.

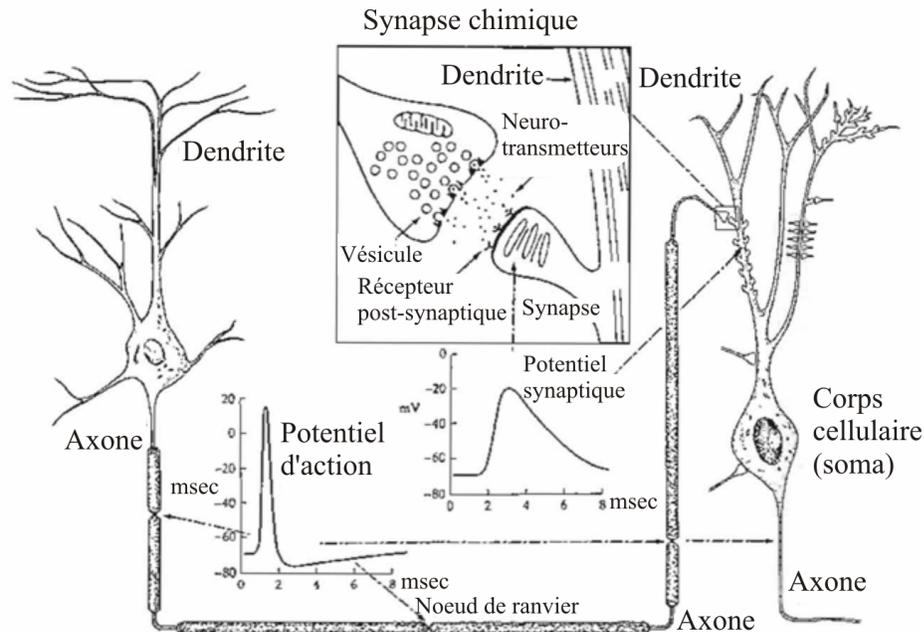


Figure 1.2 Propagation neuronale de l'information. La propagation électrique de l'information se fait à l'aide d'ions. Dans les axones, elle est principalement propagée par les potentiels d'action. À l'extrémité du neurone (terminaison présynaptique), il y a relâchement de neurotransmetteurs pour activer les récepteurs postsynaptiques d'un autre neurone. Cette transmission synaptique de l'information se fait chimiquement, ce qui induit des potentiels synaptiques qui sont propagés dans les dendrites et dans le corps cellulaire. Si la sommation de ces potentiels synaptiques est assez grande, ils peuvent induire un potentiel d'action dans le soma, ce qui permet de perpétuer la propagation du signal. Cette figure est adaptée du livre de D. Johnston et M. S. Wu.¹²

Les neurones sont à la fois des éléments d'intégration et de diffusion de l'information¹¹⁻¹³. Celle-ci se propage de deux façons: électriquement et chimiquement (figure 1.2). À l'intérieur d'un neurone, le signal se transporte électriquement par un échange ionique entre l'intérieur et l'extérieur de sa membrane. Entre deux neurones, le transfert d'information se fait chimiquement par le biais de neurotransmetteurs.

La propagation de l'information électrique est basée sur l'échange ionique entre l'extérieur et l'intérieur du neurone. Quatre principales espèces ioniques sont responsables

des courants transmembranaires : le sodium (Na^+), le potassium (K^+), le calcium (Ca^{2+}) et le chlore (Cl^-). Les concentrations de chacun de ces types ioniques sont différentes et elles varient aussi entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane cellulaire (Tableau 1.1). Dans des conditions physiologiques, les mouvements de ces ions sont influencés par le champ électrique intermembranaire et par le gradient de concentrations de chaque espèce. Une variation de concentration interspèce est induite par des transporteurs actifs d'ions (pompes protéiques capables de passer des ions d'un côté de la membrane vers l'autre côté) et par la perméabilité sélective de la membrane aux différents ions (distribution passive).

Les courants ioniques entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane sont dictés par quatre lois¹²: la loi de la diffusion de Fick (le flux de diffusion est proportionnel au gradient de concentration), la loi d'Ohm de la dérive des charges (la dérive des particules chargées positivement est proportionnelle au gradient du potentiel électrique), la relation d'Einstein entre la diffusion et la mobilité (elle établit que les procédés de diffusion et de dérive des ions sont additifs), et la neutralité spatiale des charges (pour un volume donné la charge totale des cations est égale à la charge totale des anions). À partir de ces lois, il est possible d'établir la différence de potentiel d'équilibre entre l'intérieur et l'extérieur pour chaque ion. Ce calcul se fait à l'aide de l'équation de Nernst ¹²,

$$E_i \equiv V_{\text{int}} - V_{\text{ext}} = \frac{RT}{zF} \ln \left[\frac{[i]_{\text{ext}}}{[i]_{\text{int}}} \right] \quad (1.1)$$

où E_i est le potentiel d'équilibre pour l'ion i , V et $[i]$ sont respectivement le potentiel électrique et la concentration ionique à l'intérieur ou l'extérieur de la cellule, R est la constante des gaz parfaits, F est la constante de Faraday, T est la température et z est la valence de l'ion i .

Ion	Concentration du milieu intracellulaire (mM)	Concentration du milieu extracellulaire (mM)	Potentiel d'équilibre (mV)
K ⁺	140	2-3	-89.7
Na ⁺	5-15	145	+90.7 à +61.1
Cl ⁻	4-30	110	-88 à -92
Ca ²⁺	1-2†	2.5-5	+136 à +145

Tableau 1.1 Concentration et potentiel d'équilibre des ions principalement responsables des courants transmembranaires dans une cellule typique de mammifère. Ces concentrations sont variables en fonction des types de neurones et sont présentés ici pour une température de 37 °C. † Le calcium libre est toutefois faiblement existant (10⁻⁴mM). Le potentiel de repos d'un neurone est d'environ -60 mV.¹²

Les neurones utilisent l'énergie du potentiel d'équilibre pour coder et propager l'information. Les éléments centraux de ce processus se nomment les potentiels d'action (p.a.). Ceux-ci forment le signal avec lequel le système nerveux reçoit, analyse et transmet l'information. En général, le potentiel d'action se caractérise par une variation d'amplitude du potentiel membranaire d'environ 120 mV, d'une durée d'environ 2 ms. Il existe deux types de potentiels d'actions : les p.a. sodiques, reliés majoritairement à des mouvements de Na⁺ et K⁺, et les p.a. calciques, reliés majoritairement à des mouvements de Ca²⁺ et K⁺. Cette variation est produite par l'ouverture et la fermeture de canaux ioniques situés sur la membrane. La probabilité d'activation des différents canaux impliqués dans la génération des PA dépend de la différence de potentiel membranaire (fonction de la tension). Ils peuvent ainsi être dans une configuration ouverte ou fermée. Lorsque le canal est ouvert, les ions peuvent circuler d'un côté à l'autre de la membrane et, lorsqu'il est fermé, les ions n'y circulent pas. Le sens de cette circulation est défini par l'équation de Nernst et le potentiel transmembranaire; les différents ions tendent à atteindre leur potentiel d'équilibre. Il existe plusieurs types de canaux ioniques qui peuvent répondre à des signaux électriques,

chimiques et mécaniques. Ils sont tous formés de protéines qui changent leurs conformations en fonction de ces divers signaux. Certaines conformations laissent passer les ions et d'autres non. Il existe trois mécanismes qui augmentent les probabilités de désactivation (fermeture) des canaux en fonction de la tension : le retour du potentiel de membrane sous le seuil d'activation, la liaison du canal avec du calcium intracellulaire et la déphosphorylation du canal. En résumé, les courants ioniques régulés par les canaux génèrent une fluctuation du potentiel de membrane (potentiel d'action) qui se déplace sur le neurone^{11,13}.

La propagation de l'information dans les neurones se fait de manière électrique. On peut comparer le neurone à une ligne de transmission où les signaux électriques peuvent s'y propager (figure 1.3). Ce type de modélisation quantitative fut introduit par Hodgkin et Huxley en 1952²³. Un tel modèle permet de conceptualiser la propagation du courant dans un neurone et d'en estimer les comportements.

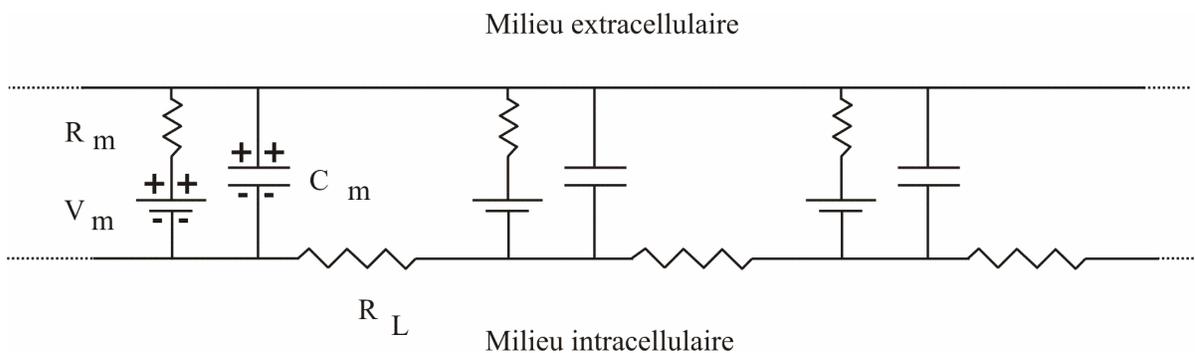


Figure 1.3 Représentation schématique de la conduction neuronale. Le neurone peut être représenté comme une succession de mailles électriques élémentaires. Chaque maille comporte des éléments de circuit représentant localement les effets de membrane. Le potentiel membranaire est représenté par V_m . Les phospholipides isolants de la membrane agissent comme un condensateur C_m . Les protéines peuvent conduire le courant à travers la membrane avec une résistance R_m . R_L représente la résistance longitudinale qui est fonction des propriétés du milieu intracellulaire.

La morphologie du neurone influencera grandement la propagation du signal. Les neurones ont typiquement quatre régions morphologiques : les dendrites, le corps cellulaire (soma), l'axone et les boutons synaptiques. Les dendrites sont principalement les récepteurs des stimuli. Elles acheminent l'information vers le corps cellulaire où les signaux excitateurs et inhibiteurs seront intégrés. Si l'excitation est suffisante, il y aura une production d'un potentiel d'action par le cône d'émergence. Celui-ci est situé entre le soma et l'axone²⁴. Le cône d'émergence est densément peuplé de canaux ioniques sensibles à la

tension. Si la somme des courants incidents dépolarise suffisamment la membrane du cône d'émergence, les canaux s'ouvrent massivement pour induire un potentiel d'action. Celui-ci sera propagé à travers l'axone jusqu'aux boutons synaptiques. La propagation dans les axones peut être favorisée par des cellules compagne (glie myélinisante) qui créent une gaine de myéline autour de l'axone. Cette gaine diminue localement les pertes de propagation. Un axone myélinisé est constitué d'une série successive de gaines. Chacune d'elle est formée d'une cellule qui s'enroule autour de l'axone. L'espace axonal entre ces gaines est nommé nœud de Ranvier. Ceux-ci sont densément peuplés de canaux ioniques servant à régénérer le potentiel d'action lors de la propagation. Ainsi si le neurone est suffisamment excité, un potentiel d'action est amorcé par le cône d'émergence et il est propagé à travers l'axone jusqu'aux boutons synaptiques pour créer une libération de sécrétions chimiques. Ces transmetteurs chimiques (neurotransmetteur) peuvent exciter ou inhiber d'autres neurones, stimuler des muscles ou encore influencer le comportement des capillaires sanguins.¹¹.

Les premiers enregistrements de l'amplitude absolue des potentiels d'actions furent faits de manière intracellulaire ²⁵(figure 1.4). Hodgkin et Huxley y ont inséré une électrode pour mesurer la différence de potentiel entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, ceci grâce à un axone de calmar ayant un diamètre de 500 μm . Depuis lors, il fut possible d'étudier directement les dynamiques électriques d'un neurone. Cette première prise de mesure électrophysiologique directe du potentiel d'action a profondément marqué la neuroscience. Ceci eut comme conséquence d'ouvrir la porte à une variété d'enregistrements électrophysiologiques permettant de décortiquer la dynamique des cellules nerveuses. La description des techniques d'enregistrement est faite dans la section 1.2.2.

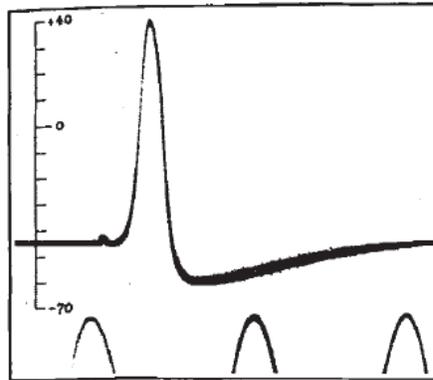


Fig. 2.

ACTION POTENTIAL RECORDED BETWEEN INSIDE AND OUTSIDE OF AXON. TIME MARKER, 500 CYCLES/SEC. THE VERTICAL SCALE INDICATES THE POTENTIAL OF THE INTERNAL ELECTRODE IN MILLIVOLTS, THE SEA WATER OUTSIDE BEING TAKEN AT ZERO POTENTIAL.

Figure 1.4 Il s'agit de la première figure illustrant les enregistrements intracellulaires d'un potentiel d'action. Elle fut publiée dans la revue *Nature* en 1939 par Hodgkin et Huxley²⁵.

1.1.3 Les systèmes biologiques

Cette sous-section a pour but d'exposer certaines particularités relatives aux systèmes biologiques.

L'étude des systèmes biologiques est complexe. Cette complexité provient entre autres de l'hétérogénéité des composantes du système. Leurs identifications difficiles, car malgré leurs différences physiologiques et fonctionnelles, ces composantes sont visuellement semblables. Il est donc ardu de reconnaître l'ensemble des constituants d'un système, de comprendre leurs interactions et de suivre les cascades d'événements qui en découlent. Par exemple, chaque cellule est composée de milliers de sous-composantes. Un faible changement dans cette composition peut entièrement modifier la dynamique intracellulaire et l'action de ces cellules dans le système.

Il est aussi difficile de regrouper les éléments d'étude en populations; le nombre d'éléments en jeu est grand, certains sont mal ou non identifiés, chaque élément peut avoir une dynamique complexe et l'ensemble des interactions est souvent méconnu. À cela, s'ajoute une variabilité à l'intérieur d'une même population animale ou cellulaire. Pour toutes ces raisons, les études en biologie impliquent très souvent des résultats statistiques sur un grand nombre d'expériences.

Il est aussi à noter que les systèmes biologiques sont très sensibles aux conditions environnementales. En biologie cellulaire, un résultat expérimental peut sembler juste alors qu'en fait, il est biaisé par un artéfact provenant d'un léger changement des conditions physiologiques auxquelles les cellules sont habituées. Ce fait est primordial et n'est surtout pas à négliger. De là l'importance de minimiser le côté invasif des mesures. L'expérimentation *in vivo* offre un cadre environnemental se rapprochant le plus possible des conditions physiologiques naturelles.

Pour acquérir de l'information pertinente à la compréhension d'un système, il faut obtenir ces données en minimisant l'influence de l'observation, ce qui n'est pas toujours simple. Dans les systèmes biologiques vivants, comme le système nerveux d'un animal, il est difficile d'atteindre l'information sans trop affecter celui-ci. Deux solutions sont offertes pour y parvenir, soit extraire le système d'intérêt de l'animal pour l'étudier dans des conditions artificielles (*ex vivo*), soit accéder directement au système dans l'animal vivant (*in vivo*). L'expérimentation *ex vivo* facilite l'accès à l'information (e.g. l'imagerie est plus aisée, les interventions sur le système se font plus librement et le contrôle de l'environnement expérimental est meilleur), mais le système d'étude se trouve complètement délocalisé. Cette extraction du contexte naturel biaise la dynamique des systèmes biologiques, car ils sont grandement sensibles à leur environnement. Il devient important, et parfois difficile, de faire la part entre les comportements propres au système et les comportements induits par la méthodologie expérimentale. Originellement, le terme *in vitro* fut utilisé lorsque les échantillons étaient déposés sur de la vitre, aujourd'hui plusieurs substrats artificiels sont aussi utilisés. Dans le cas de cette thèse, il s'agit d'enregistrement fait sur une lame sous un microscope. Quant à l'expérimentation *in vivo*, il est plus difficile d'accéder au système (e.g. l'imagerie est restreinte et les interventions physiques sont limitées), mais cette approche offre l'avantage d'un contexte presque naturel. Dans ce type d'expérimentation, le but est de minimiser l'impact des observations afin d'étudier un système dans son cadre le plus originel possible.

1.2 TECHNIQUES POUR SONDER LE VIVANT *IN VIVO*

Il existe plusieurs techniques pour effectuer des mesures physiologiques sur un animal vivant. Étant donné la nature de la microsonde présentée dans cette thèse, voici une revue des techniques pertinentes permettant l'enregistrement cellulaire *in vivo*. Il sera question des méthodes utilisant l'optique de fluorescence et les enregistrements électrophysiologiques unicellulaires²⁶.

1.2.1 Techniques d'enregistrement optique par fluorescence *in vivo*

L'utilisation de la fluorescence pour sonder le vivant a permis de fulgurantes avancées en neuroscience. La fluorescence est idéale pour l'étude des spécimens biologiques, car elle permet une détection sélective et spécifique de composantes en faible concentration. Ceci a entre autres permis de localiser un groupe précis de cellules parmi leurs semblables. Cette avancée est principalement due à l'avènement de la GFP (« Green fluorescent protein » ou en français : la protéine fluorescente verte), une protéine animale qui a la grande qualité d'être fluorescente²⁷. Cette capacité biophotonique fit de la GFP un outil incontournable pour observer le vivant en pleine action. Cette sonde lumineuse a rendu visible ce qui était invisible. Elle fut reconnue le 8 octobre 2008 lors de l'attribution du prix Nobel de chimie à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien¹⁰. Ces trois hommes ont chacun participé au développement de la GFP comme sonde biologique. C'est en 1962 que le Dr Shimomura a découvert la GFP²⁸. Il cherchait alors à comprendre pourquoi la méduse *Aequorea victoria* illumine en vert lorsqu'elle est agitée. Par la suite, le Dr Chalfie montra en 1994 qu'il était possible d'illuminer n'importe quelle cellule en y insérant cette protéine fluorescente. Pour ce faire, il implanta l'information génétique de la GFP directement à l'intérieur du génome d'un groupe bien précis de neurones appartenant à un petit ver transparent (*Caenorhabditis elegans*). Une prouesse qui a fait briller les neurones exprimant spécifiquement certains récepteurs (ALML, ALMR, PLML, et PLMR)²⁹. Quant au Dr Tsien, il modifia la GFP pour créer des variantes de différentes couleurs^{30,31}, ce qui a permis de multiplier les applications des marqueurs fluorescents. Cette diversification des marqueurs fluorescents a consolidé le marquage par fluorescence comme un incontournable moyen pour étudier la dynamique de la vie³².

Les marqueurs de base sont dits anatomiques, ils marquent une composante anatomique des cellules pour en signaler la présence. Certains autres marqueurs sont appelés fonctionnels, car leur intensité de fluorescence varie en fonction de certains

paramètres reliés à la fonctionnalité des cellules hôtes. Il est par exemple possible de suivre les variations du calcium³³⁻³⁶, du chlore³⁷⁻³⁹ ou du potassium intracellulaire⁴⁰. Il existe aussi nombre d'autres techniques de biomarquage par fluorescence, par exemple les colorants, les points quantiques ou les microbilles de latex^{9,41}. Il est à noter que, dans certains cas, il est possible de détecter directement de l'autofluorescence^{42,43}.

Il ne suffit pas de choisir le fluorophore approprié, il faut aussi l'implanter au bon endroit et de la bonne manière. Ceci n'est pas nécessairement évident lorsqu'on désire marquer un groupe spécifique de neurones dans un animal vivant. Voici un aperçu des techniques de marquage *in vivo*. Les deux principales avenues utilisées sont l'introduction directe de fluorophores dans les cellules et l'encodage génétique des cellules pour qu'elles produisent les fluorophores.

L'introduction de fluorophores directement dans les cellules se fait par différents moyens. Le marquage rétrograde (par les dendrites)^{44,45} ou antérograde (par l'axone)^{46,47} permet d'introduire des fluorophores à distance par rapport au corps cellulaire. En injectant le marqueur au site de projection des neurones, ces projections internalisent les fluorophores et les transportent jusqu'aux corps cellulaires. De cette façon, seuls les somas des neurones projetant leur axone dans la zone d'injection deviennent fluorescents. Il est aussi possible de marquer localement les neurones. Certaines techniques sont plus spécifiques, comme l'emplissage de neurones individuels à l'aide d'une micropipette⁴⁸⁻⁵⁰;⁵¹. D'autres sont plus générales, comme le marquage en groupe à l'aide de marqueurs perméables à la membrane³⁶.

L'autre avenue principale consiste à encoder génétiquement les cellules pour qu'elles produisent elles-mêmes les fluorophores. Ici encore il existe plusieurs moyens d'effectuer l'encodage génétique. Il est possible de modifier génétiquement un animal pour obtenir le marquage d'une population ciblée. Ce marquage peut être simplement anatomique⁵²⁻⁵⁴ ou encore fonctionnel^{35,55-58}. En encodant plusieurs fluorophores pour différentes fonctionnalités, il est possible de créer des souris exprimant de multiples couleurs. Par exemple, la souris « brainbow » utilise la combinaison de trois fluorophores⁵². Il est aussi possible de marquer des cellules *ex vivo* et les réintroduire dans une souris⁵⁹. L'encodage génétique peut aussi se faire à l'aide de virus⁶⁰.

Il ne suffit pas de marquer les neurones, il faut aussi les détecter. La microscopie par épi-fluorescence est la technique la plus simple et la plus standard permettant l'imagerie par fluorescence^{61,62}. De cette manière, la collection de la lumière se fait en sens inverse de

l'excitation; la collection et l'excitation se font par le même objectif. Ce moyen est aisément adaptable au microscope conventionnel et donne accès facilement aux technologies de fluorescence *in vitro*. La principale problématique de ce type d'imagerie vient de l'épaisseur des échantillons observés. La lumière hors foyer vient polluer l'image à la focale. Un second phénomène perturbe l'imagerie : la diffusion. Plus l'image est prise en profondeur plus la lumière provenant du plan focal est susceptible d'être diffusé. Pour contourner ces problèmes, une panoplie de solutions sont proposées pour optimiser la qualité et la résolution des images en microscopie de fluorescence.

La microscopie confocale a créé une réelle transformation de l'imagerie optique en biologie. Elle permet de détecter uniquement la lumière provenant du point focal en éliminant le signal de fond qui provient hors du foyer^{63,64}. Cette technique filtre spatialement la lumière à l'aide d'un sténopé placé devant le détecteur. En plaçant ce sténopé dans un plan conjugué au plan focal de l'objectif, seuls les photons provenant des alentours du point focal atteignent le détecteur. Pour obtenir une image, une matrice de points est enregistrée en balayant le spécimen. La construction de l'image se fait en additionnant l'information point par point. Il est ainsi possible d'obtenir des images ayant une résolution axiale de l'ordre du micron.

La microscopie confocale a cependant quelques défauts. Ce procédé par balayage prend du temps. Pour augmenter la rapidité d'acquisition, il est possible d'utiliser un disque rotatif ayant plusieurs ouvertures. Ce procédé n'est cependant pas très efficace, car seuls les photons provenant du point focal sont recueillis. L'excitation doit donc être accrue, faisant conséquemment augmenter la phototoxicité et le photoblanchiment. Le principal défaut de cette technique est que la qualité de l'image se dégrade en profondeur à cause de la diffusion. Cette dernière affecte le volume d'excitation et de collection. En excitation, plus le focus est profond, moins il y a de lumière au point focal, à cause de la diffusion. En collection, les photons émis hors focus peuvent ainsi être diffusés et être détectés comme provenant du point focal, ce qui atténue le ratio signal sur bruit. La diffusion ne permet donc que d'imager en surface (environ jusqu'à 100 μm). Cette limitation en surface réduit ainsi les applications *in vivo*, la microscopie confocale est donc majoritairement utilisée en ophtalmologie, en dermatologie et en gastroentérologie ⁶⁵⁻⁷⁰.

Pour améliorer la profondeur d'imagerie, il est possible d'utiliser la microscopie deux-photon. Cette technique très répandue est bien adaptée pour l'imagerie de moyenne profondeur (jusqu'à 1000 μm dans les tissus biologiques). Elle offre un bon contraste et une

bonne résolution dans les tissus diffusifs. Cette imagerie est basée sur l'absorption simultanée de deux photons pour atteindre l'excitation électronique nécessaire à la création de fluorescence. Cette excitation est non linéaire et très locale, car elle dépend de l'intensité au carré. Lors de la détection, tous les photons récoltés peuvent être considérés comme provenant du point focal. L'imagerie se fait alors point par point en effectuant un balayage. La résolution de tels systèmes est comparable à la microscopie confocale, quoi que légèrement inférieur. Le spectre d'absorption des fluorophores est plus large et légèrement décollé vers le bleu pour deux photons en comparaison avec un photon ^{9,71,72}. La microscopie deux-photon offre donc un double avantage pour l'imagerie dans les tissus : 1- en excitation, les longueurs d'onde utilisées (entre 700 et 1100 nm) sont minimalement absorbées, 2- en collection, tous les photons détectés sont pertinents, peu importe la diffusion qu'ils ont subie. En plus, elle induit moins de photodommage et de phototoxicité. Ces propriétés permettent d'atteindre des profondeurs d'imagerie *in vivo* entre 700 et 1000 μm ^{36,49,73-75}. De telles modalités *in vivo* offrent la possibilité d'étudier les fonctions et les structures cellulaires, d'imager des réseaux dynamiques ou encore de suivre des pathologies de manière longitudinale sur de longues périodes de temps⁷⁶. Il est aussi possible d'enregistrer électrophysiologiquement, à l'aide du « patch clamp » (voir sous-section 1.2.2) et des cellules imagées par deux-photon ⁷⁷⁻⁷⁹.

L'utilisation de la fibre optique permet une imagerie par fluorescence qui est moins limitée en profondeur. À l'aide d'endoscopes, il est possible d'acheminer localement la lumière à la zone d'intérêt et d'en détecter la fluorescence ⁸⁰. Ceci permet de contourner le problème lié à l'épaisseur des tissus. Cependant, les endoscopes ont un large diamètre (de l'ordre du mm), ce qui les rend invasifs et limite leur utilisation en neuroscience. Pour minimiser cette problématique, des microendoscopes (1000-350 μm de diamètre) ont été développés. Une fibre optique à gradient d'indice de réfraction (GRIN) est insérée dans une canule creuse implantée dans le cerveau ⁸¹⁻⁸³. Le volume de tissus compris à l'intérieur de cette canule (pouvant aller jusqu'à 2 mm de diamètre) est toutefois détruit, ce qui n'est pas négligeable comme invasion. Ces endoscopes et ces microendoscopes effectuent de l'imagerie à l'aide des trois modalités décrites précédemment : l'épi-fluorescence, la méthode confocale et l'excitation deux-photon.

La fibre optique est aussi utilisée *in vivo* pour la détection et l'excitation en champs larges. Cette modalité ne permet cependant pas de faire de l'imagerie. Elle ne fait que détecter les variations d'intensité de fluorescence pour un volume de tissus plus ou moins large. La résolution de ces fibres dépend ainsi de leur diamètre. Ces fibres peuvent être de

faible diamètre et peuvent avoir l'avantage de ne pas nécessiter d'ablation du tissu lors de l'intrusion. Une description plus détaillée en est faite à la section 1.4.1.

1.2.2 Techniques d'enregistrement électrophysiologique unicellulaire *in vivo*

Les microélectrodes sont étudiées depuis plus d'un demi-siècle⁸⁴. Il existe trois différentes modalités d'enregistrement électrophysiologique unicellulaire *in vivo*: l'intracellulaire, le « patch » et l'extracellulaire. Ils sont tous basés sur un principe commun : mesurer les champs électriques induits par les réactions physiologiques d'une ou de plusieurs cellules *in vivo*. Pour ce faire, une électrode est approchée ou introduite dans une cellule alors qu'une autre est référencée à l'animal. Ceci permet d'enregistrer les variations de potentiels électriques induits par un neurone. Il existe des microélectrodes de verre et de métal. Généralement, les microélectrodes de verre sont des tubes de borosilicate ou de silice qui sont étirés, et dont la pointe a un diamètre final de l'ordre du micromètre. Ces micropipettes sont remplies d'électrolyte pour permettre la conduction électrique. Quant aux microélectrodes de métal, elles sont composées de tiges métalliques ayant une pointe conductrice de l'ordre de quelques microns, le reste étant isolé par un revêtement. Les propriétés de ces électrodes sont décrites plus loin dans cette section.

La principale différence entre ces trois modalités repose sur la localisation de l'électrode par rapport à la cellule. 1- L'enregistrement intracellulaire se fait à l'aide d'une microélectrode de verre ayant un diamètre de pointe très fine ($< 1 \mu\text{m}$) et une haute impédance (30-60 M Ω)⁸⁵. L'extrémité des électrodes intracellulaires peut être incérées à l'intérieur de la cellule en perçant un petit trou dans la membrane. Cette dernière se referme sur la paroi extérieure de l'électrode et la pointe permet l'enregistrement du potentiel intracellulaire¹³. 2- La technique de « patch clamp », ou la technique d'électrode fixée, consiste à coller la pointe d'une microélectrode de verre sur la membrane cellulaire. Lors du contact entre la membrane et l'électrode, une légère pression négative permet de fixer la cellule à l'extrémité de l'électrode (configuration appelée cellule attachée ou « cell attach »). Par la suite, il est possible d'augmenter la pression négative pour briser la membrane et faire adhérer celle-ci aux parois internes de la microélectrode. Il se crée ainsi un lien direct entre le milieu intracellulaire et l'électrolyte contenu dans l'électrode. Cette configuration utilise une électrode de plus faible impédance (plus gros diamètre final que l'intracellulaire), ce qui favorise l'enregistrement d'événement de haute fréquence comme les événements synaptiques. 3- La technique extracellulaire utilise une électrode en périphérie du ou des neurones enregistrés. Elle capte les impulsions extracellulaires : les variations temporelles

du potentiel de champ extracellulaire à un endroit donné en bordure d'un neurone pendant le passage d'un potentiel d'action. Ces électrodes peuvent être en verre ou en métal; elles possèdent toutes deux des caractéristiques et des propriétés électriques différentes. Celles en verre sont semblables aux microélectrodes de « patch » et d'intracellulaire, mais le diamètre de la pointe varie entre plusieurs micromètres et moins d'un micromètre.

Avant d'entreprendre la description des principes même de l'enregistrement unicellulaire et/ou extracellulaire, il est important de présenter l'outil qui permet ce type de prise de mesure. Une emphase principale sera mise sur les microélectrodes en verre, car la microsonde optique et électrique présentée dans cette thèse s'inspire fortement de ces électrodes pour les enregistrements électrophysiologiques.

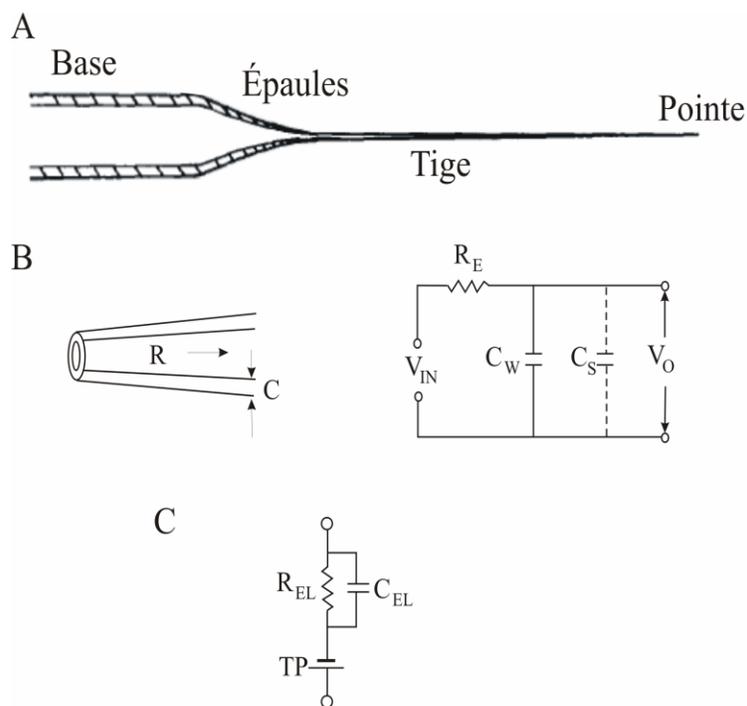


Figure 1.5 Microélectrode de verre. **A** Schéma d'une microélectrode de verre et la description de ces parties. **B** Schéma d'une pointe de microélectrode de verre et l'illustration des propriétés électriques lorsqu'elle est remplie d'un électrolyte. R est la résistance par unité de longueur, C est la capacitance sur unité de longueur, R_E Résistance total de la microélectrode, C_W la capacitance à travers les parois la partie immergée de la microélectrode, C_S est la capacitance de shunt du circuit, V_{in} est la tension venant du signal biologique et V_o est le signal. Cette configuration agit donc comme un filtre passe-bas. A et B ont été modifiés de Humphrey D.R. et Schmidt. E.M 1991. ⁸⁶. **C** Circuit équivalent à une microélectrode ou R_{EL} est la résistance de l'électrode, C_{EL} est la capacitance de l'électrode et TP est le potentiel de pointe. Modifié de Schanne O.F. 1968 ⁸⁷.

Les microélectrodes de verre sont en fait des micropipettes conductrices, car elles sont emplies d'électrolyte⁸⁸. Elles sont constituées d'un tube de borosilicate ou de silice (diamètre entre 1 et 2 mm). Pour en faire une microélectrode, ce tube est chauffé au centre. Une tension longitudinale est appliquée lors du chauffage. Selon des propriétés du verre, de la température, de la localisation du chauffage et de la force appliquée, le tube de verre s'étire et s'amincit pour former une pointe (figure 1.5 A). Généralement, le tube a 1-1.5 mm de diamètre à la base, les épaules ont 2-4 mm de long, la tige a de 5 à 15 mm de long et la pointe a un diamètre final entre 0.5 et 2 μm pour les enregistrements unicellulaires⁸⁶. Il est par la suite possible de raffiner la forme de la pointe à l'aide de microforge⁸⁹ ou d'une polisseuse⁹⁰. Suite à la fabrication de ces micropipettes, une solution d'électrolyte (typiquement du NaCl 1 à 3 M) est introduite à l'intérieur, le chlore et le sodium étant des ions que l'on retrouve déjà en forte concentration dans le milieu extracellulaire (tableau 1.1). L'électrolyte permet une conduction électrique entre la pointe et un fil métallique (en argent ou platine). Ce dernier est relié à un amplificateur pour permettre l'enregistrement des signaux électrophysiologiques. Les microélectrodes sont généralement munies de microfilaments qui favorisent l'emplissage de l'électrolyte par capillarité. Il faut cependant faire attention aux bulles qui peuvent nuire à la conduction.

Le fonctionnement électrique de ces électrodes peut être modélisé par un circuit (figure 1.5 B). Ce circuit est analogue à un filtre passe-bas en électronique⁹¹. Lors de l'enregistrement, des effets capacitifs apparaissent majoritairement aux parois de l'électrode. Ainsi, lors d'une variation de potentiel, cette capacitance prend un certain temps pour se charger, ce qui ralentit l'application du potentiel entre ces deux bornes. Étant donné qu'elle est en parallèle avec la tension de sortie, la lecture des signaux de haute fréquence est limitée par ce temps de charge. Les trop hautes fréquences ne sont donc pas transmises et les basses subissent un déphasage temporel. Mathématiquement, la tension de sortie V_o est représentée par la fonction suivante :

$$|V_o| = \frac{|V_m|}{\sqrt{1 + R_E^2 (C_W + C_S)^2 (2\pi f)^2}} \quad (1.2)$$

voir figure 1.5 B pour l'identification des variables. Il devient alors primordial de s'assurer que les électrodes utilisées ne filtrent pas les signaux ayant une fréquence de l'ordre de 5 à 20 kHz, car les signaux provenant des potentiels d'action ont des variations de l'ordre de la milliseconde. Il est à noter qu'il est possible de neutraliser en partie cette capacitance en

modifiant électroniquement la valeur efficace de la capacitance pour réduire la constante de temps de la pipette lors des enregistrements.

Il est aussi possible d'évaluer le bruit minimum de ces électrodes en fonction de la température T et de la résistance R de l'électrode :

$$V_{rms} = \sqrt{4kTR\Delta F} \quad (1.3)$$

où k est la constante de Boltzmann et ΔF est la largeur de bande des enregistrements^{86,92}. À température du corps d'un animal (environ 37 °C), pour une résistance de 10M Ω et une bande ΔF entre 5-10 kHz, le bruit minimum serait d'environ 20-40 μ V rms. Pour cette raison, il est mieux de remplir l'électrode avec une solution ayant une haute conductivité pour minimiser le bruit d'enregistrement. L'électrode idéale aurait donc une pointe infiniment petite pour enregistrer le champ le plus local possible et une résistance tendant vers zéro pour minimiser le bruit. Ce qui est physiquement contraire au principe reliant la surface d'un conducteur à sa résistance électrique :

$$R = \frac{l}{\sigma S} \quad (1.4)$$

où l représente la longueur du conducteur, S sa surface et σ la conductivité du matériel⁹³. Cette équation est valide pour un conducteur homogène et à surface constante. Étant donné que la surface d'une microélectrode est variable en fonction de sa longueur, il est donc préférable de minimiser la longueur des sections ayant de faibles diamètres pour diminuer la résistance totale. En conséquence, pour tenter d'optimiser la résistance des électrodes, la tige ne doit pas être trop mince et la fin de la micropipette doit se refermer rapidement pour offrir une petite ouverture. Il est toute fois nécessaire de faire des compromis, car la tige ne doit pas être trop large étant donné que la microélectrode doit être le moins invasive possible et la pointe ne doit pas être trop petite, car il faut minimiser la résistance totale. Il est à noter que la reproductibilité expérimentale des pointes n'est pas parfaite. Ce qui induit une certaine variabilité entre chaque électrode.

Les électrodes métalliques⁸⁶ sont principalement faites des matériaux suivant : stainless, tungstène, platinium/iridium (10-30%) et pur iridium. Elles sont entièrement constituées de métal et sont isolées sur presque toute l'électrode. Seule la pointe est conductrice sur 7 à 10 μm de long et 2 à 4 μm de large. Cette pointe est dégainée par électrolyse, par sablage ou par chauffage. Elles ont quatre grandes qualités. 1- Leur impédance est typiquement plus petite que les électrodes de verre par un facteur de 2 à 10. 2- Elles sont aussi plus rigides, ce qui leur permet de percer la dure-mère. 3- Elles sont plus faciles à faire de manière reproductible. 4- Elles sont plus facilement réutilisables, ce qui les rend disponibles commercialement.

1.2.3 Les signaux électrophysiologiques *in vivo*

L'enregistrement du potentiel de champ extracellulaire provenant d'un neurone unitaire se pratique depuis un demi-siècle. ^{86,94-96}. Ces enregistrements sont principalement utilisés pour étudier la réponse des neurones aux stimuli sensoriels ainsi que leurs comportements de décharge. Lorsqu'un neurone décharge (l'émission d'un potentiel d'action), il se produit un champ de potentiel complexe autour de celui-ci (potentiel de champ extracellulaire). Il se crée une circulation de courant autour du neurone à cause de l'augmentation de la conductivité électrique de la portion de membrane excitée (au cône d'émergence et/ou au soma). Le courant pénètre dans la cellule par les régions activées et provient des régions non activées.

Lors d'un potentiel d'action, il y a une augmentation de la conduction membranaire qui génère des déplacements ioniques entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Cette dynamique locale crée un effet de dipôle dans la cellule, ce qui induit des lignes de courant à l'intérieur et à l'extérieur. Lorsqu'un courant entre dans la cellule, il induit un déplacement de charge (courant) dans le volume extracellulaire. Par exemple, si un courant entre dans le soma, le courant extracellulaire induit semblera provenir des projections (dendrites et axone) (figure 1.6). Inversement, lorsque le courant sort du soma, il se produit un courant entrant dans l'arborisation dendritique. Il est à noter que lorsque l'arborisation dendritique n'est pas activée, elle n'est pas perméable aux charges, il se crée ainsi une capacitance membranaire. La composition du courant membranaire (I_M) des régions inactives est constituée d'une partie capacitive (I_C) et d'une partie résistive (I_R),

$$I_M = I_C + I_R \quad (1.5)$$

$$I_M = C_M \left(\frac{dV_M}{dt} \right) + G_M V_M \quad (1.6)$$

où C_M est la capacitance membranaire, G_M est la conductance membranaire et V_M est le potentiel membranaire ⁸⁶.

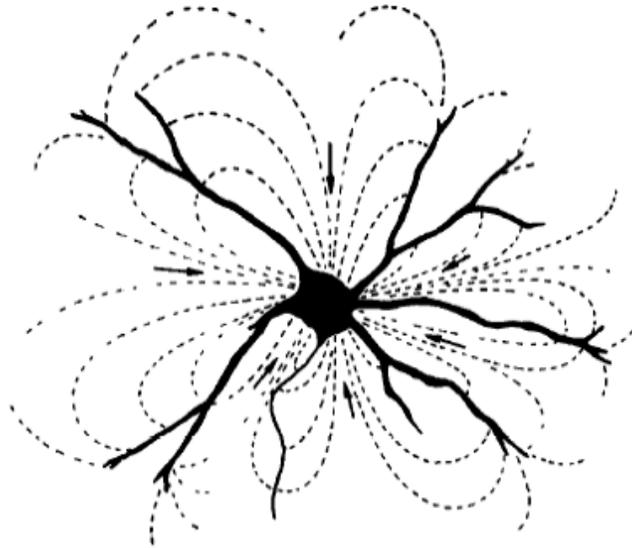


Figure 1.6 Modélisation de la direction des lignes de courant autour d'un neurone durant la décharge d'un potentiel d'action au soma. Cette figure représente le courant entrant dans le soma et montre un modèle de courant induit extracellulairement en fonction de l'arborisation dendritique. Intracellulairement, le courant circule du soma vers l'arborisation dendritique et, extracellulairement, le courant y circule inversement. Étant donné que la membrane n'est généralement pas perméable aux ions, ce procédé fait varier la capacitance membranaire de la cellule⁸⁶

Ces enregistrements reflètent les entrées d'ions positifs (courant négatif) et les sorties d'ions positifs (courant positif) dans la cellule. La source des potentiels d'action étant située au niveau du corps cellulaire²⁴, cet endroit est prédisposé à former un pôle (plus particulièrement au cône d'émergence). Étant donné qu'il y a différents canaux impliqués aux différentes phases d'un potentiel d'action, les courants générés varient avec le temps. Lors d'un potentiel d'action, il se produit premièrement un courant négatif (entrant) de Na^+ dans le soma suivi par un courant positif (sortant) de K^+ (Figure 1.6). Lors de la décharge d'un potentiel d'action, il se produit une impulsion extracellulaire. Celle-ci se caractérise par une variation temporelle du potentiel de champ extracellulaire à un endroit donné en bordure d'un neurone pendant le passage d'un potentiel d'action (figure 1.7A).

Contrairement à un potentiel d'action enregistré de manière intracellulaire, l'impulsion extracellulaire varie de forme et de polarité en fonction de la morphologie de la cellule et de l'emplacement de l'enregistrement.

La forme des impulsions extracellulaires enregistrées varie en fonction de la morphologie du neurone; les impulsions extracellulaires peuvent avoir, en fonction de la position par rapport à la cellule, un profil différent ou un profil relativement similaire (figure 1.7C). Si la physionomie du neurone est propice à former un dipôle (comme les neurones ganglionnaires ou certains pyramidaux), il est plus probable que la forme des impulsions extracellulaires aura tendance à varier avec la position (figure 1.8A). Si l'enregistrement extracellulaire se situe près du soma, l'électrode enregistrera un courant négatif suivi d'un positif, car elle détectera directement les flux d'entrée et de sortie du corps cellulaire. Au contraire, si l'électrode se situe loin du cône d'émergence, elle détectera les courants inverses. Autrement, si la physionomie du neurone est plus uniforme (comme les neurones étoilés) le champ de potentiel extracellulaire sera plus uniformément réparti et la forme des impulsions extracellulaires aura tendance à moins varier en fonction de la position (figure 1.7D)⁸⁶.

La forme et l'amplitude des impulsions extracellulaires enregistrées varient aussi en fonction de la position de l'électrode par rapport au neurone. Si l'électrode est proche du soma l'onde de l'impulsion extracellulaire devrait être biphasique (négatif-positif), si l'électrode est proche d'une dendrite, l'onde enregistrée devrait être triphasique (positive-négative-positive)^{13,97}. L'amplitude, quant à elle, varie en fonction de la position du neurone et de la grosseur de ceux-ci (figure 1.8)^{86,98}. Cette dernière propriété sera mise à profit lors de l'élaboration des critères de détection électrique des neurones par la microsonde présentée dans cette thèse (Chapitre 4.1.2).

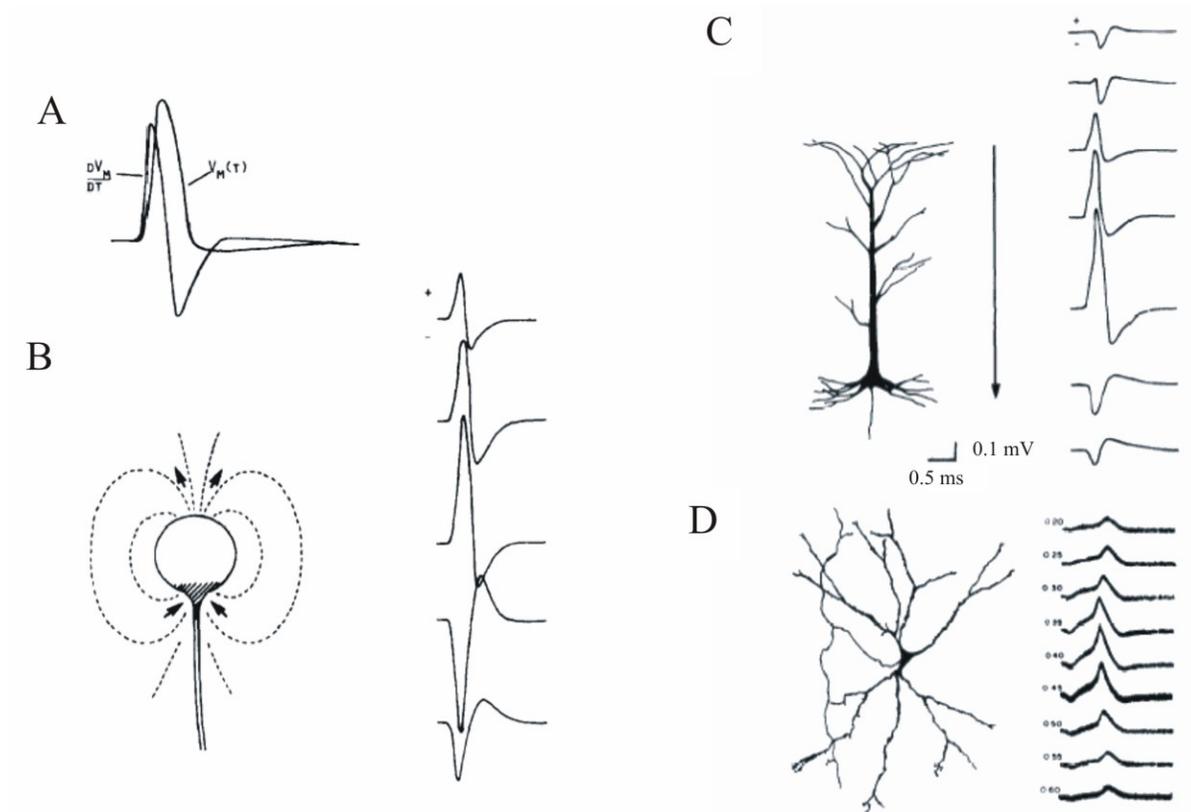


Figure 1.7 Configuration des impulsions et courants impliqués lors d'un potentiel d'action **A** La variation du potentiel membranaire (V_M) durant un potentiel d'action implique une variation du courant qui est proportionnelle à la dérivée de la variation de potentiel en fonction du temps. Modèle d'un neurone ganglionnaire. **B** Exemple d'impulsion enregistrée en fonction de la position de l'enregistrement par rapport au neurone ⁸⁶. La forme des impulsions extracellulaires détectées dépend aussi de la géométrie du neurone enregistré. **C** Un exemple d'enregistrement de l'impulsion extracellulaire *in vivo* pour un neurone pyramidal qui montre une morphologie relativement bipolaire. Les enregistrements électrophysiologiques s'inversent de polarité en fonction de la position de la prise de mesure. **D** Un exemple d'enregistrement des l'impulsions extracellulaires *in vivo* pour un neurone étoilé montrant une morphologie plus uniformément répartie. Les enregistrements électrophysiologiques conservent la même polarité peu importe la position de la mesure. Le chiffre représente (en mm) la position relative d'enregistrement^{86,94}.

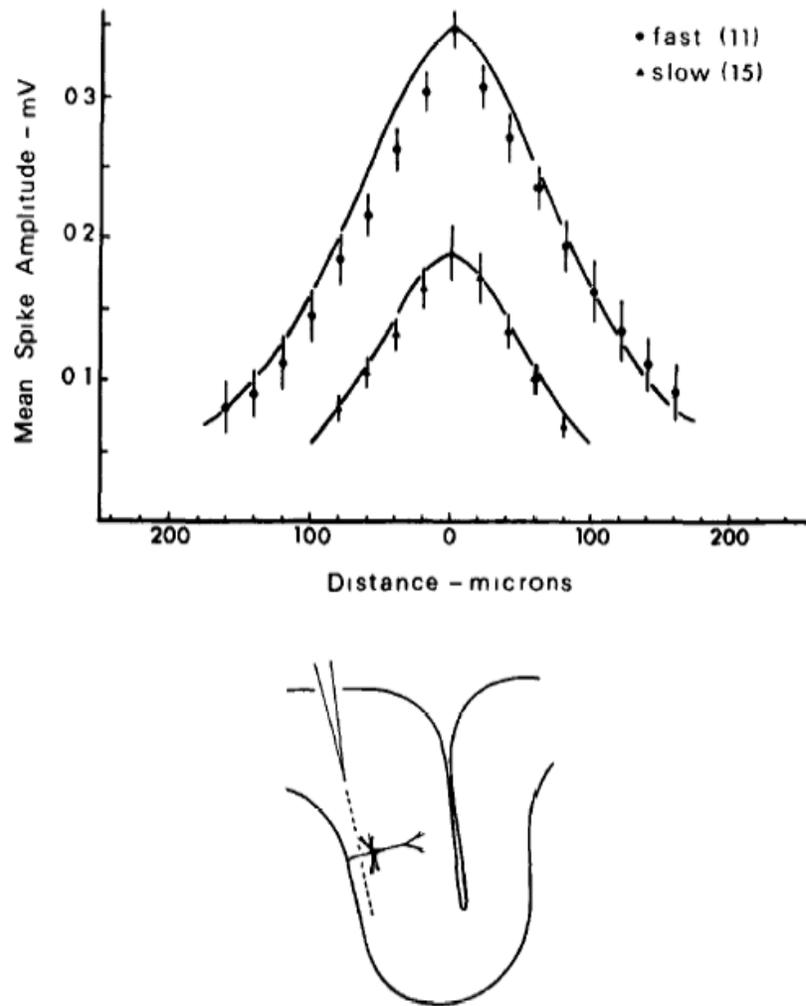


Figure 1.8 Amplitude des impulsions extracellulaire. **Haut-** Graphique montrant la variation de l'amplitude des impulsions extracellulaires en fonction de la position des enregistrements⁹⁸. La courbe du haut représente la moyenne sur 11 enregistrements de neurones ayant un soma de 20 à 50 μm de diamètre et la courbe du bas représente 15 enregistrements de neurones ayant un soma de 10 à 20 μm de diamètre ⁸⁶. Il est donc montré que les gros neurones produisent des impulsions extracellulaires de plus grandes amplitudes et qu'elles sont détectables sur une plus grande distance. **Bas-** Graphique illustrant le paradigme expérimental.

1.3 LA PROBLÉMATIQUE

Le système nerveux central est caractérisé par diverses populations de cellules ayant des phénotypes hautement spécialisés. Ces populations ont chacune leurs propriétés fonctionnelles, morphologiques, biochimiques et physiologiques. Une caractérisation efficace de chaque type cellulaire *in vivo* est un défi, car les neurones d'intérêts sont souvent dispersés à l'intérieur d'une population cellulaire hétérogène. Une telle caractérisation est toutefois essentielle à la compréhension du signalement électrique dans tout le réseau. En électrophysiologie, il importe donc de développer des moyens afin d'identifier le type cellulaire enregistré.

Les moyens d'identification cellulaire en électrophysiologie sont limités. L'activation antidromique^{99,100} ou orthodromique¹⁰¹ permet une identification cellulaire, mais elle exige une préservation des connexions entre les projections et le corps cellulaire. En plus, elle ne s'applique qu'à un faible nombre de cellules. Il est aussi possible de marquer les cellules suite aux enregistrements, ce qui permet une caractérisation morphologique et neurochimique. Cependant, ces informations sont seulement accessibles *a posteriori* et la technique est peu efficace lorsque les neurones recherchés peuplent faiblement une région.¹⁰²

Il est aussi possible d'utiliser la technologie des marqueurs neuronaux fluorescents pour l'identification cellulaire^{45,52-54,60,103-107}. Elle est très utile, car elle est indépendante des connexions, très spécifiques aux populations et permet plus d'un type de marquage par cellule. Cette technique est très efficace pour l'enregistrement en tranches^{62,108,109}, mais elle est grandement limitée par la diffusion de la lumière dans les tissus lors d'enregistrements *in vivo* (section 1.2.1). La microscopie deux-photon est limitée à la surface (500-1000 μm)⁷⁶, tandis que les microendoscopes^{81,82} n'offrent pas la combinaison optique et électrique nécessaire pour l'identification en électrophysiologie, et encore moins pour l'identification unicellulaire.

En marquant par fluorescence des cellules d'une population précise, il est possible de les identifier. Cette technique optique permet l'identification des cellules lors d'enregistrement électrophysiologique *in vitro*¹¹⁰ et *in vivo*⁷⁸. Ce type d'application *in vivo* est limité optiquement par la détection en profondeur. La fibre optique a le potentiel d'outrepasser cette limite en permettant de guider la lumière en profondeur pour exciter et récolter localement la fluorescence. L'utilisation de la fibre optique de petit diamètre offre

ainsi une combinaison importante : la détection optique de cellules spécifiques et les enregistrements en profondeur dans le SNC d'un animal vivant. En combinant une électrode pour enregistrer le champ électrophysiologique extracellulaire et une fibre optique ayant un champ de détection très local. La problématique est donc de créer une méthode capable d'identifier optiquement les cellules déchargeant des potentiels d'action.

Cette thèse propose donc une microsonde et capable d'enregistrer localement la fluorescence et les signaux électrophysiologiques de neurones *in vivo*. Cette microsonde est basée sur une fibre optique à deux cœurs : l'un optique et l'autre électrique, permettant de combiner ces deux types d'enregistrement. Cette thèse présente de manière conjointe un critère permettant de colocaliser des signaux de fluorescence et électrophysiologiques afin de supposer si deux signaux proviennent ou non du même neurone. Mais avant d'explicitier cette proposition, il est important de bien la mettre en contexte en présentant les travaux qui s'en rapprochent.

1.4 LITTÉRATURE EN LIEN DIRECT AVEC LA PROBLÉMATIQUE

La fibre optique fait partie intégrante des solutions envisagées pour résoudre la problématique. Il en est question dans toutes les propositions retrouvées dans la littérature ainsi que dans la proposition présentée dans cette thèse. Il est donc incontournable de décrire les propriétés générales de ce guide d'onde optique et puis de faire une revue des différentes fibres optiques non traditionnelles concernant cette thèse. Suite à cela seront présentées les différentes solutions, trouvées dans la littérature, qui sont en lien avec la problématique. Celles-ci sont toutes une hybridation de fibre optique et d'électrode. Nous verrons en détail les points positifs et négatifs relatif à chaque proposition.

1.4.1 La fibre optique traditionnelle

La fibre optique possède plusieurs propriétés optiques communes. La fibre optique est un guide d'onde, généralement souple, servant à propager la lumière d'un point à un autre ^{111,112}. Traditionnellement, les fibres optiques sont constituées d'un cœur dans lequel la lumière est guidée, celui-ci est recouvert d'une gaine ayant un indice de réfraction moins élevé. Cette différence d'indice entre les deux milieux permet de confiner la lumière et de la propager. La lumière qui entre dans le cœur de la fibre sera totalement réfléchi à la frontière entre le cœur et la gaine si elle entre avec un angle plus petit que l'angle de réflexion totale interne; l'interface diélectrique entre le cœur et la gaine confine la lumière qui est injectée dans le cœur avec un angle plus faible que l'angle d'acceptance de la fibre. Cet angle d'acceptance (θ_a) est défini par l'ouverture numérique (NA) de la fibre, qui est déterminée par l'indice de réfraction du cœur (n_1) et de la gaine (n_2);

$$\theta_a = \sin^{-1} NA \quad (1.6)$$

$$NA = (n_1^2 - n_2^2)^{1/2} \quad (1.7)$$

Certaines fibres sont dites à saut d'indice, car il y a une discontinuité entre l'indice de réfraction du cœur et de la gaine. D'autres sont dites à gradient d'indice, car l'indice du cœur varie en continuité avec la gaine, pour atteindre un maximum au centre de celui-ci.

En considérant la fibre optique comme un guide d'onde, il est possible de déterminer, à partir des conditions frontières (les changements d'indice de réfraction), la distribution spatiale des modes qui sont permis de se propager dans la fibre ^{111,112}. Le paramètre de fibre V permet d'identifier le nombre et le type de modes pouvant se propager dans la fibre en fonction du rayon du cœur (a) et la longueur d'onde guidé (λ) :

$$V = 2\pi \frac{a}{\lambda} NA \quad (1.8)$$

La fibre optique agit comme un guide d'onde monomode lorsque le rayon du cœur suffisamment grand pour guider le mode fondamental sans guidé les modes supérieurs. Pour les longueurs d'onde optique et des ouvertures numériques standards (environ 0.05 à 0.5), le rayon du cœur doit être de l'ordre du micromètre pour propager ce mode. Cependant, lorsque le cœur est plus grand, des modes supérieurs s'ajoutent et la

propagation devient multimode. La propagation de la lumière dans les fibres optiques ne se fait pas sans atténuation, les coefficients d'atténuation des fibres se calculent avec l'équation suivante :

$$\alpha = \frac{1}{L} 10 \text{Log}_{10} \frac{1}{T} \quad (1.9)$$

où T est la transmittance lors de la transmission sur une longueur L en km. Ces pertes sont principalement dues à l'absorption et la diffusion des matériaux guidant la lumière. Cela dit, ce paramètre est négligeable dans les conditions présentées dans cette thèse, car la longueur des fibres utilisées est de l'ordre du mètre et ce type de pertes est de l'ordre de 0.5%. Les propriétés précédentes sont généralement communes à l'ensemble des fibres optiques.

1.4.2 Les fibres optiques non conventionnelles

Plusieurs fibres non conventionnelles possèdent d'autres propriétés qui leur sont plus spécifiques. La prochaine sous-section présente la littérature en rapport à trois aspects non conventionnels de la fibre proposée dans cette thèse : le cœur creux, le cœur rempli de liquide et l'intégration d'une électrode dans la fibre optique.

Les fibres à cœur creux sont utilisées comme capteur de contrainte. Ces fibres sont constituées d'une fibre à double cœurs creux disposés de chaque côté du cœur optique. En injectant un gaz et en variant la pression, il est possible d'influencer la biréfringence du cœur optique, ce qui permet de créer un capteur de contrainte^{113,114}. Les fibres trouées sont aussi utilisées comme guide optique microstructuré. Il est possible en utilisant différentes stratégies de conduire la lumière dans un cœur creux. Une bonne revue des différentes options possibles est faite dans un chapitre d'un livre sur les fibres à cœur troué présenté par Jacobs et al.¹¹⁵. Il y est principalement question des solutions permettant le confinement de la lumière dans un cœur vide. Les revêtements métalliques, les couches diélectriques et les cristaux photoniques sont les trois principales solutions permettant de guider la lumière dans le vide. Les cristaux photoniques sont en fait une variation périodique d'indice de réfraction formant une structure réfléchissant la lumière et la confinant. Ce type de cristal photonique est généralement présenté sous la forme de fibres microstructurées¹¹⁶⁻¹¹⁸. Dans ces fibres, la gaine est composée d'une structure périodiquement trouée afin de créer un effet de miroir à la longueur d'onde désirée.

Des cœurs creux remplis de liquide sont utilisés comme guide d'onde. Dès le début des années soixante-dix, plusieurs études caractérisaient la propagation dans les fibres à cœur liquide¹¹⁹⁻¹²³. L'idée de la propagation lumineuse dans les fibres à cœurs liquides s'est grandement développée, un chapitre de livre écrit par J. Hernandez-Cordero¹²⁴ présente un bon résumé des techniques et des applications récentes. Les liquides ont aussi été utilisés pour modifier l'indice de réfraction d'une fibre microstructurée¹²⁵.

Certains designs de fibre permettent d'y incorporer des électrodes métalliques. Ces électrodes sont généralement utilisées pour induire une polarisation dans les cœurs optiques afin de modifier les propriétés de ceux-ci (créer de la biréfringence) en appliquant une tension dans les électrodes. Cette approche fut utilisée avec des fibres de polymère ayant deux électrodes métalliques de chaque côté du cœur¹²⁶ et, par la suite, avec un seul cœur dans une fibre de silice plus Mstandard¹²⁷. Ce type de design a permis de mettre sur pied un interféromètre de type Mach-Zehnder à l'aide d'une fibre optique ayant deux cœurs. Un champ électrique est appliqué préférentiellement sur l'un des deux cœurs à l'aide de deux électrodes¹²⁸.

Une fibre trouée remplie de liquide fut utilisée comme électrode pour effectuer de l'électrophorèse¹²⁹, un procédé consistant à appliquer un courant dans un liquide afin de déplacer des particules chargées¹³⁰. Ils n'utilisent cependant pas le cœur rempli comme une électrode d'enregistrement. Cette fibre sera plus détaillée à la sous-section suivante.

1.4.3 Littérature relative aux solutions à base de fibres optiques et d'électrodes

Quatre types de solutions ont été proposées dans la littérature pour acquérir de l'information à l'aide de fibre optique tout en enregistrant électriquement dans le système nerveux : l'utilisation de sondes distinctes introduites de manière séparée^{106,131,132}, l'utilisation d'une fibre optique attachée à une électrode¹³³⁻¹³⁵, l'utilisation d'une fibre optique insérée à l'intérieur d'une micropipette^{136,137} et finalement l'utilisation d'un multisenseur¹²⁹. Voici les détails de chacune de ces méthodes afin de bien situer la microsonde que nous proposons.

Le premier type de solutions proposées, pour l'acquisition optique et électrophysiologique, visait à enregistrer les signaux en introduisant indépendamment la fibre optique et les électrodes. Voici une description des quatre solutions de ce type les plus pertinentes. La première visait à enregistrer optiquement et électriquement un potentiel

d'action cardiaque dans un cœur de grenouille *in vitro*¹³¹. Ils utilisèrent une fibre optique monomode pour l'excitation et la détection de la fluorescence provenant de cellules cardiaques. Celles-ci contenaient un marqueur sensible à la tension (WW781, Molecular Probes). Un électrocardiogramme était parallèlement enregistré par une matrice d'électrodes. Ils ont montré qu'il était possible de détecter un potentiel d'action cardiaque par fluorescence de manière *in vitro*. La seconde visait à faire la spectroscopie de l'autofluorescence parallèlement avec des enregistrements électriques afin d'étudier les processus énergétiques d'une petite région du cerveau *in vivo*¹³⁸. Ils ont utilisé une fibre optique de 200 μm pour exciter et récolter le signal tout en enregistrant l'électroencéphalogramme (EEG) et l'électromyogramme (EMG) chez un animal endormi et éveillé. Il s'agit là d'une approche en champ large, autant pour l'électrique que pour l'optique, ce qui rend impossible l'étude d'une population précise de neurone. La troisième approche visait à enregistrer les variations calciques *in vivo* en parallèle avec l'enregistrement électrophysiologique¹³². Ils ont utilisé deux types d'optodes (senseur optique et électrique) différentes : l'excitation et la collection étaient faites par la même fibre pour l'une et par des fibres différentes pour l'autre. Ces fibres avaient un diamètre de 200 μm . Les injections du fluorophore étaient faites à l'aide d'une canule collée à la fibre optique. Parallèlement, ils enregistrèrent le signal extracellulaire à l'aide d'une microélectrode de verre insérée distinctement. L'emplacement de l'électrode était marqué à *posteriori* pour confirmer la position de celle-ci. Ils ont pu montrer une corrélation entre le signal électrique et les variations calciques d'une large population de neurone en profondeur. Ces types de solutions d'enregistrement optique et électrique distinct ne sont pas très pratiques et pour les enregistrements *in vivo*. Une autre solution proposée visait à enregistrer des fluctuations de fluorescence avec une fibre optique de petit diamètre (7 à 15 μm) tout en enregistrant l'électroencéphalogramme¹³⁹. Ils ont pu montrer une corrélation entre les fluctuations de fluorescence induites par du PBFI (marqueur potassique) et le potentiel électrique enregistré au EEG. Cette approche est prometteuse et permet un enregistrement local de la fluorescence, mais ne permet pas d'enregistrer le potentiel électrique local.

Le second type de solutions proposées, pour l'acquisition optique et électrophysiologique, visait à attacher une fibre optique à une électrode pour enregistrer localement les signaux en parallèle. Cette approche fut principalement menée par un même groupe qui a effectué des expériences *in vitro* et *in vivo*^{133 134 135}. Leur approche visait à enregistrer, grâce à une fibre optique de 300 μm , des variations calciques d'un groupe de neurones de l'hippocampe marqués au Fura-2 (marqueur fonctionnel). Ils ont attaché une

électrode métallique à la fibre pour effectuer en parallèle des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires. Ces derniers servaient à localiser la population de manière électrique afin de s'assurer qu'ils enregistraient optiquement dans la bonne région. Ce type d'approche (une localisation électrique pour enregistrer optiquement) est à l'inverse de ce que nous proposons dans cette thèse (une localisation optique pour enregistrer électriquement). Il est à noter que la grosseur de leur fibre optique ne permet que des enregistrements en champ large.

Le troisième type de solutions proposées, pour l'acquisition optique et électrophysiologique, visait à inclure une fibre optique à l'intérieur d'une micropipette pour enregistrer localement les deux types de signaux en parallèle. Deux groupes ont travaillé sur cette approche^{136,137}, mais seulement un groupe utilisait l'électrode pour enregistrer¹³⁷. Les études de Neunlist et al.¹³⁶ ont montré qu'il est possible d'utiliser une optrode pour exciter des potentiels d'action cardiaque *in vitro* et d'enregistrer les variations de fluorescence qui y sont associées. La fibre optique utilisée avait 300 μm et le marqueur fluorescent était sensible au voltage (di-4-ANEPPS). L'électrode avait 1 à 2.5 mm et était utilisée seulement pour stimuler la préparation. Cette approche n'est présentée ici que pour montrer les diverses optrodes existantes, car l'électrode n'est pas utilisée pour l'enregistrement.

Toutefois, une étude récente utilise une fibre optique insérée dans une microélectrode de verre pour enregistrer optiquement et électriquement un petit groupe de neurones¹³⁷. Il s'agit de l'étude connue qui se rapproche le plus de ce que nous proposons dans cette thèse. Ils utilisent leur optrode pour enregistrer profondément dans le tronc cérébral *in situ* (préparation physiologique décérébrée où le sang est remplacé par une perfusion¹⁴⁰: voir figure 1.9). Des cellules situées entre 1500 et 2500 μm sont marquées avec du fluo-4 (marqueur sensible au calcium) et l'excitation des fluorophores se fait par une source externe (fibre optique ayant un cœur de 600 μm : voir figure 1.8). Cette source est déplacée pour optimiser le signal récolté par l'optrode. Celle-ci a un diamètre de 35 à 45 μm , ce qui permet d'enregistrer un petit groupe de neurones, mais elle n'a pas assez de résolution pour permettre des enregistrements unicellulaires. La portion optique est composée d'une fibre optique ayant un diamètre extérieur de 125 μm , un cœur de 62.5 μm et une ouverture numérique 0.275. Cette fibre est étirée par gravité à l'aide d'une torche au butane et l'extrémité est clivée par un crayon au diamant entre 25 et 35 μm de diamètre. Elle est introduite dans une micropipette ayant une pointe entre 35 et 45 μm de diamètre. L'électrode était emplie de 2 M de saline, ce qui donnait une résistance variant entre 1-6

Mhoms. L'extrémité de la fibre était à moins de 5 μm de l'extrémité de la micropipette. Avec ce diamètre de sonde, les enregistrements électrophysiologiques unitaires peuvent provenir d'un champ large, soit à plusieurs dizaines de microns de la pointe. Le diamètre de la fibre optique est lui aussi trop large pour enregistrer de manière unicellulaire. Les auteurs ont montré une corrélation entre les enregistrements optique et électrique, mais ils déclarent qu'une compréhension précise de ce que représente ce signal est rendu difficile dû à l'incapacité à visualiser directement les neurones enregistrés. Il est aussi à noter que le marqueur qu'ils ont utilisé, le fluo-4, est reconnu pour marquer principalement les cellules gliales et non les neurones ^{34,141}.

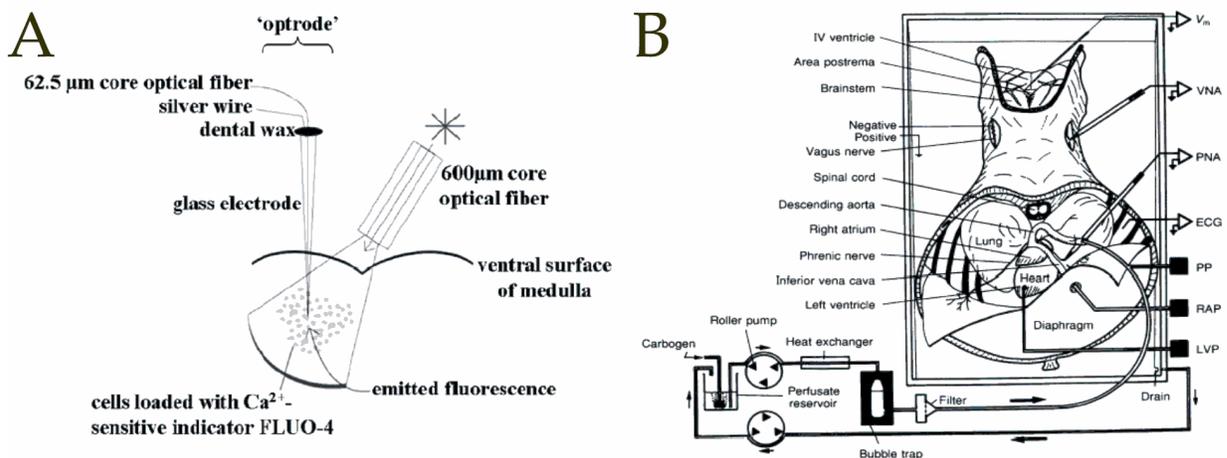


Figure 1.9 A Illustration de l'enregistrement *in situ*, dans le tronc cérébral, faite par Bradley et al 2008¹³⁷. Ils utilisent une fibre dans une micropipette pour enregistrer électriquement, puis ils récoltent en parallèle la fluorescence. Cette dernière provient de cellules marquées au fluo-4 et est excitée par une source externe. B Exemple du type de préparation *in situ* utilisée par Bradley et al. L'illustration représente une souris décérébrée auquel le cœur et le tronc cérébral sont maintenus en vie à l'aide d'une perfusion ¹⁴⁰. Pour l'article de Bradley et al. 2008, cette préparation de souris fut adaptée pour le rat.

Le quatrième type de solutions proposées, pour l'acquisition optique et électrophysiologique, visait à enregistrer les deux signaux à l'aide d'un multisenseur ¹²⁹. Cette approche visait à enregistrer quatre informations *in vivo*: l'électrophysiologie, le taux métabolique des neurones (à l'aide d'impulsions optiques), des événements biochimiques par électrophorèse et l'effet de champs électroosmotique. Quoique les résultats de ce « proceeding » soit préliminaires et relativement mal présentés, la sonde en tant que telle est

intéressante. La lumière est guidée *in vivo* dans une tige de verre de 250 μm qui est raccordée à une fibre optique puis à un système optique. Ils peuvent ainsi exciter et récolter la fluorescence provenant de la NADPH. La tige de verre possède un trou de 10 μm à l'intérieur qui est rempli d'un liquide électroosmotique. Cette électrode est utilisée comme senseur de potentiel de microphorèse et du potentiel osmotique. La tige de verre sert aussi de support pour une électrode métallique servant à l'enregistrement électrophysiologique. Bien qu'elle soit de large diamètre et qu'elle soit utilisée à des fins différentes, cette sonde a des similitudes avec la microsonde présentée ici. Elle vise l'enregistrement électrophysiologique et optique *in vivo* et elle possède un trou servant d'électrode lorsqu'elle est remplie d'électrolyte. Les grandes différences viennent du fait que la sonde est large (250 μm), que l'excitation et la collection optique sont en champs larges, qu'il n'y a pas de cœur optique pour guider la lumière et que l'électrode creuse n'est pas utilisée pour faire de l'électrophysiologie. Les enregistrements électrophysiologiques sont faits par une électrode métallique.

Suite à cette revue de littérature concernant l'utilisation de la fibre optique pour l'acquisition de signaux optiques en parallèle avec des enregistrements électrophysiologiques dans le système nerveux, voici notre proposition de microsonde.

1.5 MICROSONDE OPTIQUE ET ÉLECTRIQUE

Nous proposons dans cette thèse une microsonde optique et électrique, ayant une résolution unicellulaire, qui permet d'ajouter une information optique en parallèle aux enregistrements électrophysiologiques. Le but de cette méthode est de développer un outil capable d'identifier, à l'aide de la fluorescence, une cellule située en profondeur dans le système nerveux d'un animal vivant, et d'enregistrer ses signaux électrophysiologiques. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche visant à fusionner une fibre optique et une microélectrode de verre standard. Cette méthode originale est basée sur une fibre optique à deux cœurs : un cœur optique (guide d'ondes à gradient d'indice de réfraction) et un cœur électrique (cœur creux rempli d'électrolyte). L'une des extrémités de cette fibre est étirée pour obtenir une pointe ayant un diamètre plus petit que le corps cellulaire des neurones ciblés. Ceci donne assez de résolution pour obtenir des enregistrements unicellulaires optiques. À l'autre extrémité de la fibre, le cœur optique est aligné avec une fibre multi mode de diamètre et d'ouverture numérique comparable. Ceci permet de relier optiquement la pointe avec un système permettant l'illumination des cellules et la collection de la fluorescence émise. Le cœur creux est, quant à lui, rempli d'un électrolyte pour créer

une électrode servant à enregistrer le potentiel électrophysiologique unitaire à la pointe. L'autre extrémité du cœur creux est reliée à un système d'acquisition standard en électrophysiologie. De cette manière, il est possible de descendre la microsonde profondément dans le système nerveux d'un rat ou d'une souris et de détecter la fluorescence et les potentiels extracellulaires provenant de neurones uniques. Nous proposons aussi un critère spatial permettant d'établir une codétection optique et électrique afin d'identifier la cellule enregistrée électrophysiologiquement. Ce critère quantitatif est basé sur la morphologie des cellules marquées et sur la concordance spatiale des signaux récoltés par la microsonde.

1.6 PRÉSENTATION DE LA THÈSE

Cette thèse montre la démarche expérimentale faite pour produire la microsonde et la démonstration qu'il est possible de l'utiliser pour enregistrer optiquement et électriquement des neurones *in vivo*. Le chapitre 2 donne la méthode de fabrication de la microsonde et présente le montage expérimental permettant la détection des neurones. Le chapitre 3 vise à caractériser les propriétés optiques de la microsonde. Il y est question de la propagation lumineuse à travers les différentes parties de la sonde, de l'étude des sources de bruit optiques pouvant nuire à la détection, de la détection optique de neurone *in vitro* et par simulation numérique. Le chapitre 4 est destiné aux expériences effectuées *in vivo*. Il y est principalement question de la preuve de concept *in vivo* de la détection électrophysiologique et de la détection de neurones fluorescents. Il y est aussi présenté un critère permettant d'estimer si des signaux optique et électrique proviennent du même neurone. Finalement, le chapitre 5 présente les principales conclusions et les perspectives d'avenir en ce qui concerne l'utilisation de cette microsonde.

CHAPITRE 2

LA MICROSONDE : MATÉRIEL ET MÉTHODE

Ce chapitre présente la méthodologie utilisée pour la mise en œuvre d'une microsonde permettant de détecter optiquement et électriquement des neurones *in vivo*. L'élaboration et la mise au point de cette microsonde fut complexe, car il a fallu résoudre une série de problématiques techniques avant d'obtenir un instrument fonctionnel, efficace et reproductible. Les différentes étapes de production sont donc présentées ici pour permettre d'en comprendre les détails. Les problématiques encourues y sont aussi présentées pour aider à voir le cheminement fait et pour conserver de l'information expérimentale qui pourrait être pertinente à la suite de ce projet. Ce chapitre méthodologique se divise en cinq sections techniques. La section 2.1 présente la démarche faite lors de la production des quatre générations de fibres à deux cœurs. La section 2.2 décrit la fabrication des pointes, des clives et le procédé permettant l'emplissage du cœur creux par l'électrolyte. La section 2.3 expose les stratégies utilisées pour créer une jonction électrique efficace et facilement reproductible. Elle compare les deux principales solutions étudiées lors de cette thèse. La section 2.4 montre le protocole de fabrication des jonctions optiques. Celles-ci permettent de lier optiquement la fibre à deux cœurs avec une fibre conventionnelle pour relier le tout avec le montage optique. Quant à la section 2.5, elle décrit le montage optique et électrique utilisé lors des expériences. Finalement, la section 2.6 présente les conclusions.

2.1 LES QUATRE GÉNÉRATIONS DE FIBRES À DOUBLES CŒURS

Trois propositions ont été étudiées en début de projet : 1- l'introduction d'une fibre optique conventionnelle et d'un fil métallique à l'intérieur d'une micropipette de verre, 2- la création d'une fibre optique ayant un second cœur métallique et 3- la création d'une fibre optique ayant un second cœur creux pouvant être emplis d'un électrolyte. La première solution fut écartée, car les tests préliminaires ont montré qu'il était techniquement difficile de créer une pointe facilement reproductible de l'ordre de grandeur de la dizaine de microns. La seconde proposition demandait la mise au point d'une fibre optique ayant un cœur métallique pouvant être étirée au micromètre près. Ce type de fibre optique n'était pas (et n'est toujours pas) existant, alors il s'agissait plutôt d'un projet en soi et non d'un point de départ pour une nouvelle technologie. Finalement, la fibre à cœur creux fut choisie, car il était technologiquement possible de produire rapidement une telle fibre et la partie électrique se rapprochait des électrodes déjà existantes.

La première étape fut d'évaluer les caractéristiques désirées pour la microsonde, le but premier étant de reproduire, avec le cœur creux, des paramètres similaires aux micropipettes de verre utilisées en électrophysiologie. Le diamètre des micropipettes d'enregistrement électrophysiologique unicellulaire extracellulaire est d'environ 1 μm ⁸⁶. Ceci imposait deux contraintes principales : le diamètre du cœur creux devait être d'environ 1 μm à la pointe et le diamètre de la pointe devait être plus petit qu'un corps cellulaire de neurones. Il fut conséquemment décidé que la microsonde serait construite pour être utilisée avec un diamètre final d'environ 12 μm ; les ratios optimaux de la sonde étaient donc un cœur creux de 1 μm et un cœur optique se rapprochant le plus possible de 11 μm .

2.1.1 La première génération de fibre

Pour produire la fibre optique à deux cœurs, il était nécessaire d'établir une collaboration avec des producteurs de fibre. L'Institut national d'optique (INO) possédait l'expertise et la technologie nécessaires pour développer rapidement une telle fibre. Nous leur avons donc présenté le projet et un partenariat avec eux a été établi. La méthode de fabrication de la préforme fut fixée en fonction des paramètres désirés et des techniques de fabrication disponibles. La préforme fut construite en utilisant un support tubulaire de silice. À l'intérieur de ce support, un capillaire (cœur creux) et un cœur optique y sont soutenus par des tiges de remplissage en silice. Le cœur optique est à gradient d'indice et est fabriqué par la méthode MCVD qui consiste à introduire un gradient de concentration de

GeO₂ dans un substrat de silice ¹⁰⁵. Le tout est soutenu par une série de tiges de silice de remplissage (figure 2.1A). Pour faciliter la capillarité dans le cœur creux, une tige de verre fut introduite dans le capillaire lors du montage de la préforme. Pour respecter les contraintes présentées précédemment, la configuration proposé était la suivante : un cœur optique de 8/12 (66% par rapport au diamètre total), un cœur creux de 1/12 (8.3%), la distance entre les cœurs de 1/12 et deux fois 1/12 pour l'espace entre les cœurs et les bords.

La préforme fut chauffée et étirée pour donner 19 m de fibres divisées en deux parties : 9 m de la série 1 et 10 m de la série 2. Le diamètre total et le diamètre du cœur optique étaient semblables pour les deux parties, soit respectivement environ 950 μm et 570 μm. Les diamètres des cœurs creux étaient cependant différents pour chaque partie, 25-30 μm pour la partie 1 et 40-50 μm pour la partie 2 (figure 2.1B-C). L'étirement s'est relativement bien déroulé malgré certaines imperfections. Les interstices des tiges d'emplissage ne se sont pas tout à fait refermés, ce qui donna une fibre avec plusieurs trous secondaires ayant entre 1 à 20 μm de diamètre. Lors de la fabrication de la sonde, ces trous secondaires créeraient des multiélectrodes en parallèles. Ces électrodes secondaires complexifiaient la jonction électrique et les effets de telles électrodes secondaires devraient être contrôlés et caractérisés pour une utilisation efficace de la sonde, malgré un certain potentiel d'une telle multisonde électrique. Il était inopportun d'utiliser une sonde si complexe en début de projet. De plus, le ratio entre le cœur creux et le diamètre total était de 3-5% au lieu de 8.3%. Cette variation de diamètre aurait une grande influence sur la résistance électrique et ainsi sur la sensibilité de l'électrode (chapitre 1.2.2). Il est aussi à noter que la tige de verre à l'intérieur du cœur s'est décollée, n'offrant plus d'effet facilitant la capillarité.

Étant donné que la méthode de fabrication de la fibre n'était pas standard, les nombreuses différences entre la fibre désirée et le résultat final étaient anticipées. Il était donc nécessaire de produire une deuxième génération de fibres.

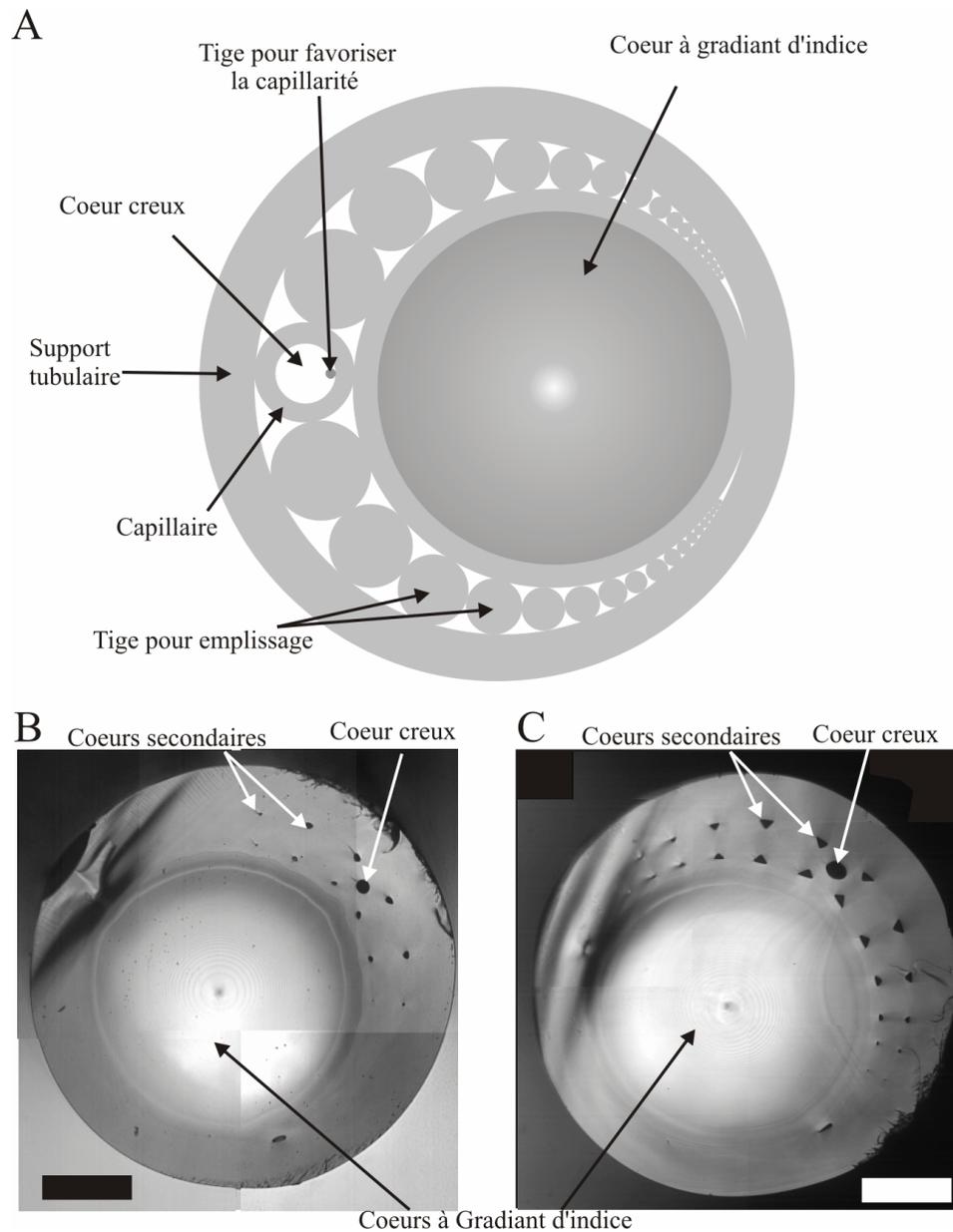


Figure 2.1 Première génération de la fibre à 2 cœurs. **A** Schéma de la préforme. **B** Photographie en coupe de la série 1. Les diamètres sont de : 950 μm au total, de 570 μm pour le cœur optique et de 25 μm par 30 μm pour le cœur creux. Barre d'échelle de 200 μm . **C** Photographie en coupe de la série 2. Les diamètres sont de 950 μm au total, de 570 μm pour le cœur optique et de 40 μm par 50 μm pour le cœur creux. Barre d'échelle de 200 μm .

2.1.2 La deuxième génération de fibre

Une deuxième génération fut rapidement mise en œuvre sur la base des résultats précédents. Certaines modifications furent faites pour corriger les problèmes survenus lors de la réalisation de la première génération. La principale modification fut faite au niveau du cœur creux, le capillaire utilisé était plus mince. Cette stratégie faisait en sorte que les parois du capillaire se collent au reste de la préforme pour créer des angles aigus. Ces angles avaient pour but de favoriser naturellement la capillarité (figure 2.2A-B). Les ratios des cœurs ont aussi légèrement été modifiés : Le ratio du cœur électrique fut augmenté à 10% et le ratio du cœur optique fut diminué à 60%. La dernière modification fut de remplir les interstices secondaires pour assurer qu'il se referme bien lors du tirage de la fibre.

Le tirage de la deuxième génération fut effectué avec un ordre plus clair des objectifs à atteindre : 1- le cœur creux devait avoir un diamètre de l'ordre de 100 μm , 2- le diamètre du cœur optique devait avoir un ratio (diamètre cœur/diamètre total) d'environ 60% et 3- le diamètre total de la fibre devait être d'environ 900 μm . Le tirage de la fibre à partir de la préforme s'est bien déroulé et l'étirement a donné environ 56 m de fibre. Le diamètre total moyen obtenu était de $900 \pm 17 \mu\text{m}$ (moyenne \pm D.S.) et le diamètre moyen du cœur optique était $586 \pm 19 \mu\text{m}$, ce qui donne un ratio de 65%, soit très près du ratio estimé. Les contours du cœur optique étaient légèrement déformés à l'interface entre le cœur et les tiges d'emplissage. Cependant, ces imperfections ne devraient pas trop nuire au guidage optique étant donné la composante multi mode et le gradient d'indice. La surface du cœur creux était de l'ordre de grandeur désiré, la forme était toutefois plus ovoïde (environ 120 μm par 60 μm), Ce qui dérogeait du schéma de base. L'hypothèse, voulant que des interstices en forme de pointes se crée dans le cœur creux pour favoriser la capillarité, ne s'est pas avérée. De plus, les trous secondaires se sont complètement refermés, ce qui éliminait le problème des multi-électrodes.

Donc, la deuxième génération de fibre répondait suffisamment aux critères désirés pour entamer la création de la microsonde. Cependant, la forme ovoïde du cœur avait le défaut de restreindre les possibilités de jonctions électriques (sous-section 2.1.3). Cette fibre était en pratique limitée à être utilisée avec une jonction électrique par trou latéral, ce type de jonction a toutefois été abandonné dû à son faible taux d'efficacité.

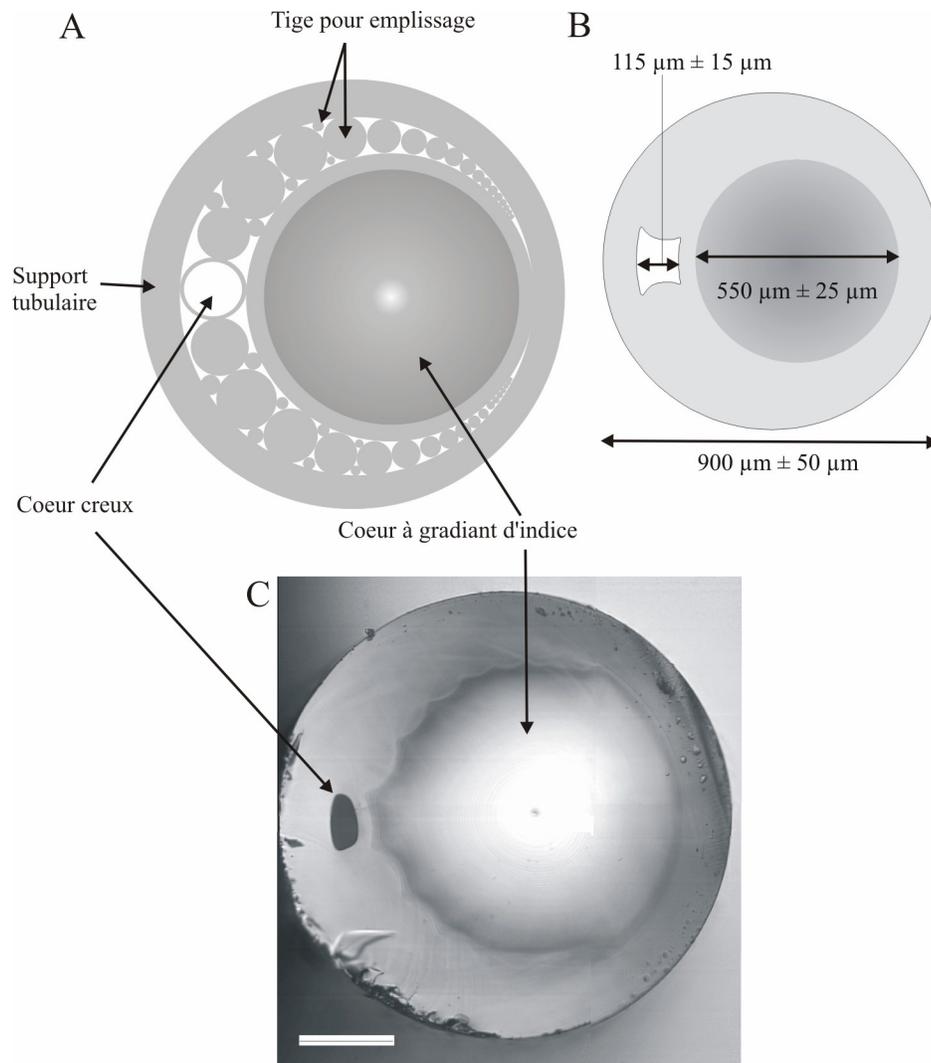


Figure 2.2 Deuxième génération de fibre à 2 cœurs **A** Schémas de la préforme de la deuxième génération de fibre. **B** Estimation de la fibre après l'étirement. **C** photographie en coupe, les diamètres sont de : $900 \mu\text{m}$ au total, $580 \mu\text{m}$ pour le cœur optique et $120 \mu\text{m}$ par $60 \mu\text{m}$ pour le cœur creux. Barre d'échelle de $200 \mu\text{m}$.

2.1.3 La troisième génération de fibre

Une troisième génération de fibre fut produite après l'utilisation de plus de la moitié de la quantité de la fibre produite de deuxième génération. Divers essais et caractérisations furent faits avec la deuxième génération et il était temps de raffiner la fibre utilisée, entre autres pour faciliter l'insertion d'un fil métallique directement par le cœur creux et créer un autre type de jonction électrique.

La préforme de la troisième génération fut un mélange des deux premières, le cœur creux était formé d'un capillaire (comme à la première génération) et les plus gros interstices étaient bouchés par des tiges d'emplissages supplémentaires (comme à la deuxième génération) (figure 2.3A). Cependant, une variation technique visait à favoriser le maintien de la tige de capillarité dans le cœur creux. Lors d'une étape préalable, cette tige fut fixée aux parois du capillaire et fut en suite introduite dans la préforme (Figure 2.3A). L'expérience acquise lors des deux premiers étirements fut un atout important pour le contrôle des paramètres d'étirement. Le diamètre du cœur creux par rapport au diamètre total désiré était de 11% et le rapport du cœur optique était de 61%.

Le tirage de la troisième génération a permis d'obtenir 51 m de fibre de grande qualité (figure 2.3B). Le diamètre total moyen était de $915 \pm 12 \mu\text{m}$, celui du cœur optique était de $556 \pm 16 \mu\text{m}$ et le cœur creux était relativement rond avec un diamètre de 95-105 μm . Tous les interstices se sont bien refermés pour ne laisser aucune place à des cœurs creux secondaires. Le cœur optique était sans asymétrie majeure, contrairement à la deuxième génération. Seule la tige visant à favoriser la capillarité du cœur creux n'a pas donné l'effet escompté. Elle semble avoir fusionnée au reste de la fibre lors de l'étirement. Donc, cette troisième génération de fibre à deux cœurs rencontre la presque totalité des critères préalablement fixés. Il est à noter que, à moins d'avis contraire, cette troisième génération sera utilisée pour l'ensemble des résultats *in vivo* présentés dans la thèse.

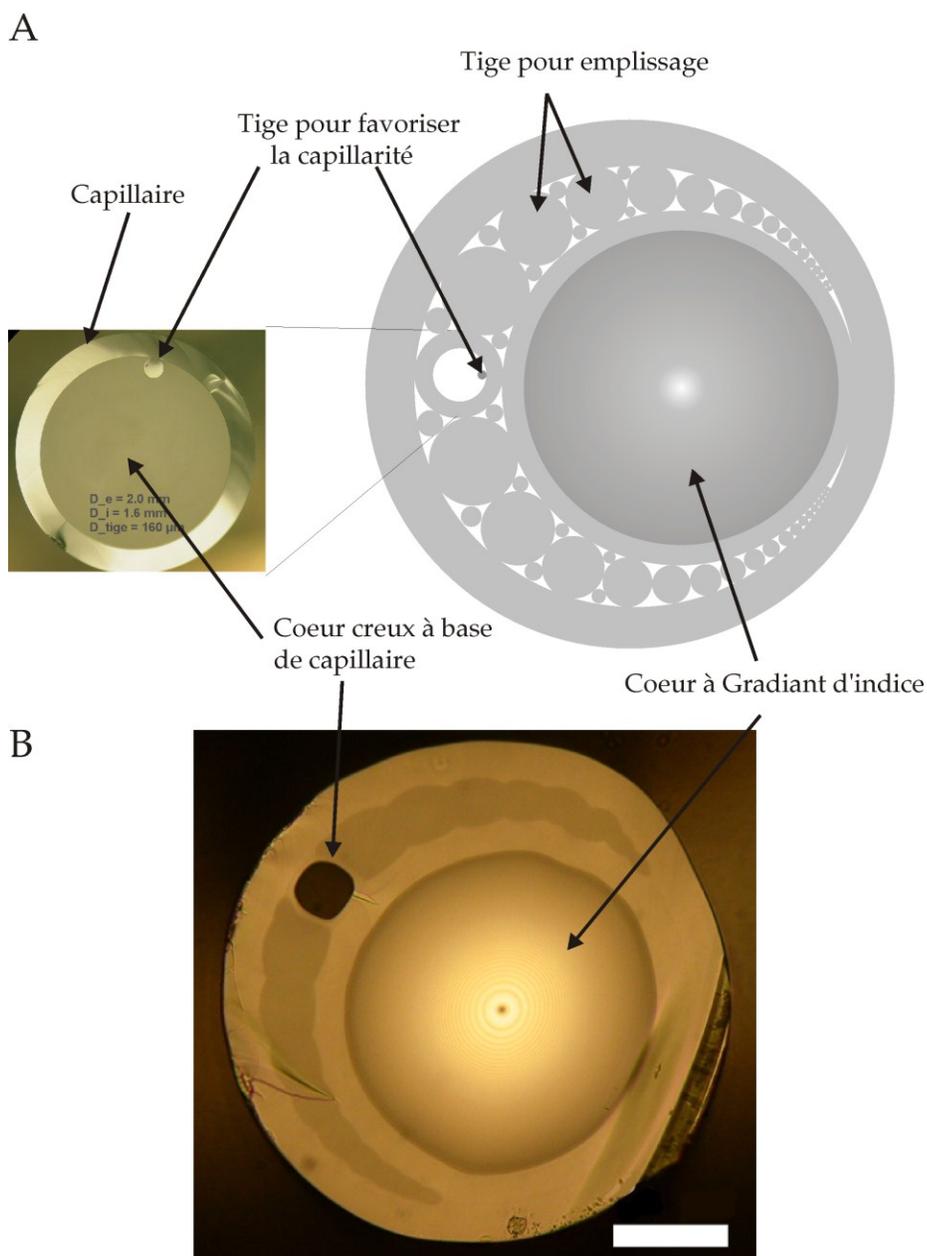


Figure 2.3 Troisième génération de fibre à 2 cœurs **A** Schéma de la préforme. La photographie de gauche montre le capillaire utilisé pour faire le cœur creux. **B** photographie en coupe des diamètres: 900 μm au total, 550 μm pour le cœur optique et 95-105 μm pour le cœur creux. Barre d'échelle de 200 μm .

2.1.4 La quatrième génération de fibre

Une quatrième génération de fibre fut produite pour maintenir un approvisionnement en fibre suffisant. En fonction des résultats *in vivo* (chapitre 4), il apparut pertinent de grandir le diamètre du trou pour permettre d'obtenir un diamètre de trou similaire pour de plus petites pointes. Ainsi, la quatrième génération fut planifiée en fonction d'obtenir un ratio de 15% entre le diamètre du cœur creux et le diamètre total. Le diamètre du cœur optique devait être conservé à 550 μm . Ces changements de paramètre imposaient un cœur optique de même taille et une augmentation du diamètre du trou. Ceci força une augmentation du diamètre total de la fibre, réduisant du même coup le ratio de cœur optique. Dans ces conditions, les paramètres désirés (en diamètre) furent de 1000 μm au total, 550 μm pour le cœur optique et 150 μm pour le cœur creux. L'idée de la tige de verre à l'intérieur du cœur creux fut abandonnée dû aux précédents échecs. Des changements ont donc été apportés pour obtenir ces proportions, mais le protocole général fut le même que pour la troisième génération.

Étant donné que le coût de production d'une telle fibre provient principalement du coût de la préforme, le coût de revient au mètre dépend du nombre de mètres de fibre étirée lors de la fabrication. Ce nombre de mètres dépend du volume de la préforme et du volume de la fibre étiré. Le principe de conservation du volume veut que plus la fibre étirée soit de petit diamètre, plus longue sera la fibre étirée. Ainsi plus le coût de revient au mètre sera faible. Pour tenter de diminuer ce coût, la dernière portion de la préforme (dernier 10% en volume) fut étirée pour obtenir une fibre de 400 μm de diamètre au lieu de 1000 μm . Cette portion de fibre devait conserver environ les mêmes ratios pour donner les diamètres suivants: 400 μm au total, 220 μm pour le cœur optique et 60 μm pour le cœur creux.

L'étirement de la quatrième génération fut donc fait en deux phases : une série 1 ayant 1000 μm de diamètre et une série 2 ayant 400 μm (figure 2.4). L'étirement de cette fibre fut aussi un succès, car tous les objectifs ont été atteints. Il y eu environ 49 m de la série 1 et 11.5 m de la série 2. Les diamètres obtenus ont été respectivement de: 1000 μm au total, 611 μm pour le cœur optique et 158-138 μm pour le cœur creux, puis de 400 μm au total, 250 μm pour le cœur optique et 50-45 μm pour le cœur creux. Ainsi, les résultats obtenus sont donc directement dans les spécifications souhaitées. Seul le cœur optique est légèrement plus élevé et le ratio du cœur creux de la fibre de 400 μm est légèrement plus bas que souhaité. Ces petites imperfections sont cependant négligeables en comparaison avec la qualité globale des deux portions de fibre de cette quatrième génération.

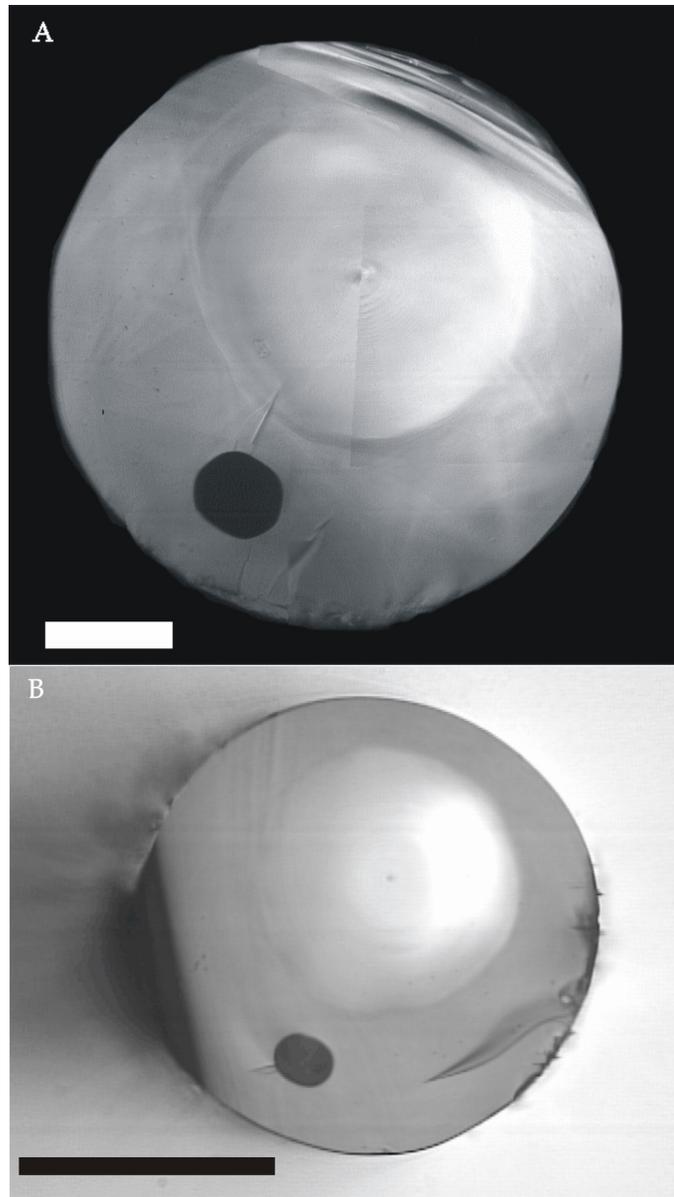


Figure 2.4 Quatrième génération de fibre à 2 cœurs. **A** Photographie en coupe de la série 1, les diamètres sont de : 1000 μm au total, 611 μm pour le cœur optique et 158-138 μm pour le cœur creux. **B** Photographie en coupe de la série 2, les diamètres sont: 400 μm au total, 250 μm pour le cœur optique et 50-45 μm pour le cœur creux. Barres d'échelles de 200 μm .

2.2 FABRICATION DE LA POINTE ET EMBLISSAGE

2.2.1 Étirement de la pointe

Après avoir fabriqué la fibre à deux cœurs, l'étape suivante était de modeler l'extrémité d'une section de fibre pour en faire une pointe. Une tireuse à fibre optique commerciale (P-2000, Sutter Instrument) fut utilisée pour chauffer la fibre et l'étirer. Le principe est simple, une tige d'environ 7 cm de la fibre à deux cœurs était placée en tension sur un support. Le faisceau d'un laser CO₂ chauffe la fibre et lorsque le point de fusion est atteint, la tension fait déplacer les deux extrémités selon l'axe de la fibre. Ainsi, la zone du milieu s'amincit jusqu'à séparer la tige en deux parties, où chacune possède une extrémité ayant une pointe de 3 à 7 mm de long. (Figure 2.5A).

Il est possible d'ajuster différents paramètres pour contrôler les conditions d'étirement afin de varier les formes des pointes. Les paramètres offerts par la tireuse sont : chaleur (Heat), filament (Fil), vitesse (Vel), délais (Del) et traction (Pul). Chacun de ces paramètres agit sur les conditions physiques suivantes : la puissance du faisceau laser (Heat), la surface d'illumination du faisceau (Fil), la température du verre au moment de l'application de la tension (Vel), le délai entre l'application de la tension et l'atteinte du seuil de température (Del), la force de la tension (Pul). La tireuse permet aussi d'effectuer l'étirement en plusieurs étapes. Le protocole pour la fibre de 3^e génération est le suivant : [étape 1: Heat=565, Fil=4, Vel=70, Del=124, Pul=45], [étape 2: Heat=500 à 575, Fil=4, Vel=65 à 75, Del=115, 122, Pul=70-120]. Un protocole différent fut utilisé pour la fibre de 4^e génération : [étape 1: Heat=750, Fil=5, Vel=77, Del=128, Pul=64], [étape 2: Heat=750, Fil=5, Vel=86, Del=125, Pul=75]. La première étape visait à amincir la fibre et créer le premier étranglement et la 2^e étape ajuste la longueur de la pointe. De cette manière, le diamètre de l'extrémité de la pointe produite était submicrométrique bouchant complètement le cœur creux (Figure 2.5B). Il est à noter que les paramètres de la 2^e partie sont variables en fonction du type d'extrémité voulu et qu'un ajustement est aussi nécessaire à chaque nouvelle séance d'étirement. Ce procédé n'est pas parfaitement reproductible, c'est-à-dire que chaque pointe est semblable, mais la forme de l'extrémité peut varier d'un étirement à l'autre. De ce fait, il était important de régulièrement observer au microscope les pointes lors de plusieurs tirages subséquents et de faire les ajustements nécessaires pour maintenir un type de pointes relativement uniforme.

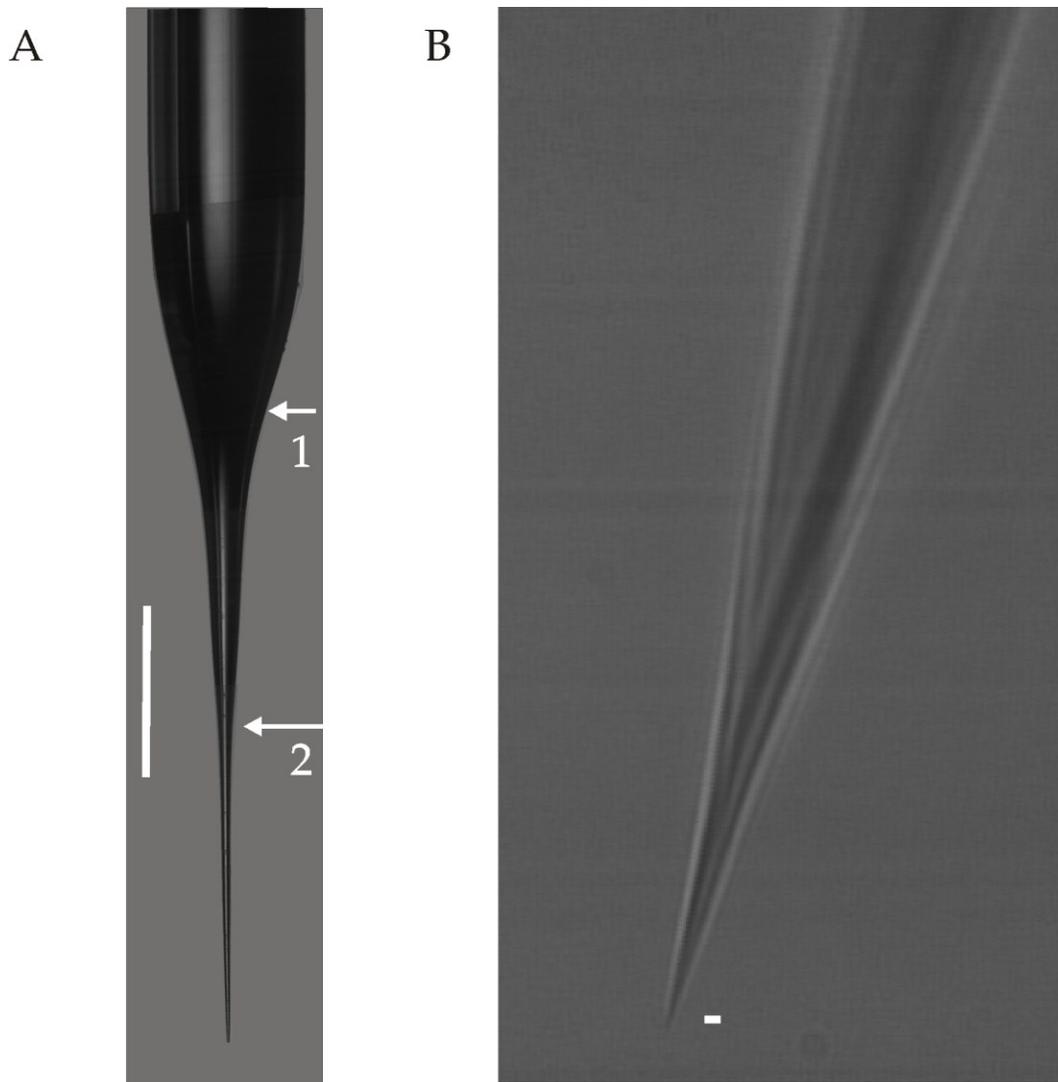


Figure 2.5 Pointes de la microsonde **A** Le double étranglement (flèches 1 et 2) est dû aux deux tirages successifs lors de la fabrication par tireuse laser. L'extrémité de cette sonde était polie. La barre d'échelle est de 1mm. **B** Image au microscope (40x) de l'extrémité d'une pointe d'une fibre à deux cœurs tirée par la tireuse à fibre au laser CO₂. La barre d'échelle est de 1µm.

2.2.2 La clive de la pointe

Il était nécessaire de développer une technique pour couper le bout de la fibre au diamètre voulu. Celle-ci devait laisser le cœur creux ouvert et la surface devait permettre une bonne transmission optique. Plusieurs approches furent tentées pour obtenir de tels résultats : la clive par laser CO₂, la clive par laser femtoseconde et le polissage de la pointe.

Les premiers tests ont été faits en collaboration avec l'INO pour tenter de cliver la pointe avec un laser impulsionnel de type CO₂. Cette collaboration nous permettait d'avoir accès à un système de micro usinage qui n'était pas disponible à l'époque dans nos laboratoires. Cette forme de sous-traitance permettait donc d'obtenir un aperçu du potentiel de cette technique, mais sans pouvoir prendre part aux expériences et sans connaître exactement les conditions expérimentales.

Pour cliver la pointe, plusieurs impulsions furent envoyées coup par coup sur la pointe pour couper celle-ci au diamètre voulu tout en minimisant la chaleur absorbée par la pointe. Les résultats obtenus ont montré que la clive faite par laser CO₂ coupait bien la pointe au diamètre voulu, mais il se formait un petit effet de sphère au niveau de la clive (figure 2.6A-B). Cet effet survenait lors de la fonte du verre, ce qui malheureusement refermait le trou creux (Figure 2.5B-C). À l'époque, soit en 2005, les nombreux essais et tentatives d'optimisation fait à l'INO n'ont pas permis de débloquent le cœur creux. Nous en sommes venu à l'hypothèse qu'il s'agissait probablement d'une limitation due au fait que le micro usinage par laser CO₂ implique un transfert de chaleur important qui fait fondre la pointe ^{142,143}.

Pour contrer cette limitation, nous avons poursuivi notre collaboration avec l'INO pour tenter quelques expériences avec un laser femtoseconde. Le procédé de micro usinage par impulsion laser femtoseconde ne nécessitant pas la fonte du matériel. Dû aux impulsions très courtes, le processus d'ablation est considéré comme une transition directe entre l'état solide et vapeur (ou solide-plasma). La conduction thermique peut, dans un tel cas, être négligée en première approximation ¹⁴⁴. Ainsi, la clive se produit sans que le verre ne fonde et sans que le cœur creux ne se bouche. Les résultats obtenus vont dans ce sens, le trou n'était pas refermé, mais la qualité de la clive n'était pas très bonne (figure 2.7A). La fracture mécanique à la pointe ne se faisait pas de manière droite, ce qui nuisait à la propagation optique. Nous n'avons cependant pas pu faire beaucoup d'essais sur ce système qui était très demandé à l'époque. Donc, à cause de la mauvaise qualité de la clive,

de la difficulté d'accès au système, du coût élevé relié au système, de la complexité du procédé et au manque d'autonomie dans une étape routinière de la création des sondes, nous n'avons pas poursuivi dans cette voie.

Il est à noter que, en 2007, après avoir établi la technique par polissage (voir la suite de cette sous-section), nous avons eu accès à des installations de micro usinage par laser femtoseconde au COPL. De plus amples essais ont été effectués par Jean-Philippe Bérubé. Les résultats ont montré qu'il était possible de cliver les fibres sans boucher le cœur creux, tout en obtenant une clive droite (figure 2.7B). Cependant, le fait que la technique par polissage était déjà bien établie, qu'elle donnait de bons résultats, qu'elle était simple, accessible et modique, a grandement influencé le choix de conserver la technique par polissage pour la poursuite du projet. Il est aussi maintenant possible de cliver la pointe à l'aide d'un faisceau d'ion grâce au FIB du COPL (figure 2.7C)

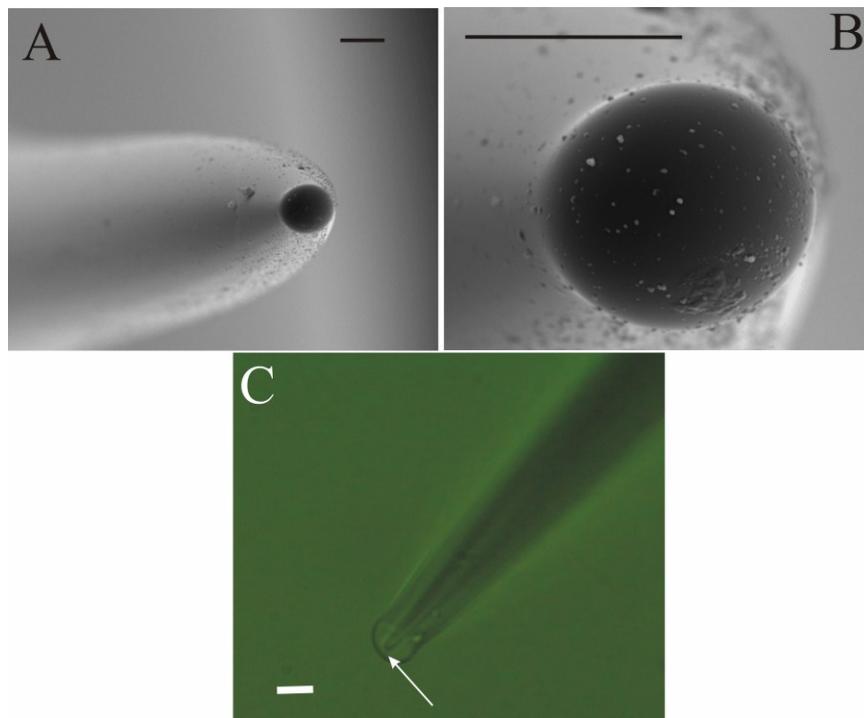


Figure 2.6 Clives par laser CO₂. **A** Images de l'extrémité de la pointe de microsonde clivée par impulsions d'un laser CO₂. **A** Image par microscopie électronique montrant la pointe. **B** Gros plan sur une surface qui a été clivée, le verre a fondu et s'est solidifié sous forme de sphère. Ce qui empêche l'accès au cœur creux. **C** Image en microscopie par transmission (40x). La flèche indique la couche de verre qui referme le cœur creux. Les barres d'échelles sont de 10 μm .

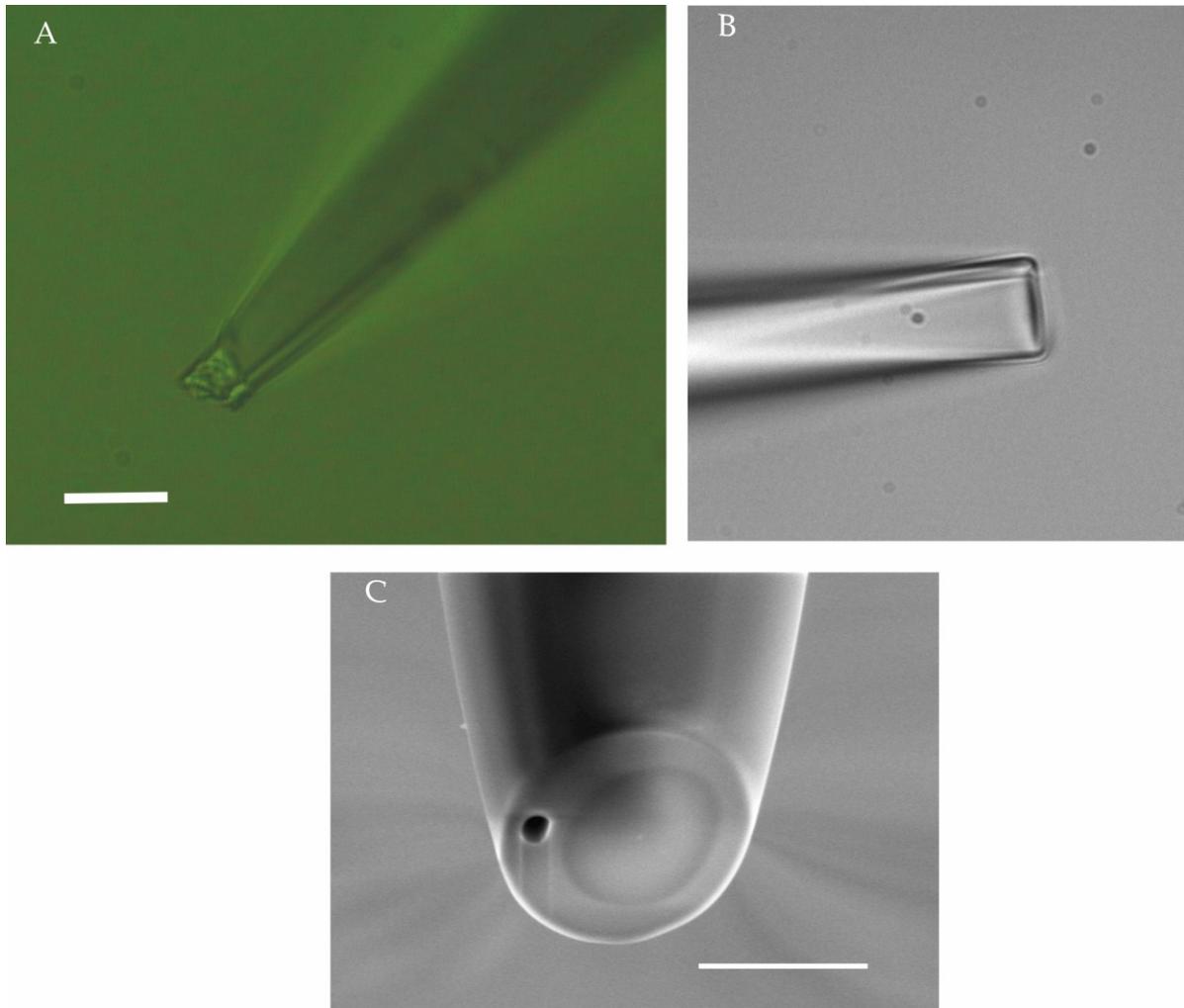


Figure 2.7 Clive de la microsonde par impulsions femtosecondes **A** Image d'une clive typiquement faite par un laser femtoseconde lors des essais en 2005 à l'INO. La clive n'est pas nette, mais le cœur est débouché. **B** Image d'une clive typiquement faite par un laser femtoseconde lors des essais en 2007 au COPL. La clive d'environ 10 μm est lisse et le cœur est débouché. **C** Exemple d'une coupe de la pointe par un faisceau d'ion (FIB), barre d'échelle 5 μm .

La solution finale à la problématique de la clive fut trouvée en utilisant une technique de polissage de la pointe. Pour ce faire, nous avons utilisé un système commercial permettant le polissage de micropipette (BV-10 Microélectrode Beveler, Sutter Instrument). Il s'agit d'un support muni d'une vis micrométrique à laquelle on fixe la fibre, ce qui permet d'approcher la pointe avec l'angle désiré (entre 5° et 90°) sur une plaque abrasive en rotation

(60 RPM). Ainsi, la pointe est polie plus ou moins grossièrement en fonction de la grosseur du grain de la surface abrasive utilisée.

En positionnant la fibre pour obtenir un polissage à 90°, les résultats ont montré une surface de clive perpendiculaire compatible avec une propagation optique (Figure 2.8A). L'absence de contrôle visuel adéquat, malgré la binoculaire 20x fournie avec la polisseuse, rendait le contrôle fin du diamètre difficile. Le micromanipulateur offre une précision de l'ordre du micron et le diamètre des pointes varie de 1 μm tous les 2 à 10 μm de long (dépendamment des formes de pointes). Ceci offrait une précision d'environ $\pm 2 \mu\text{m}$ pour des pointes de plus de 5 μm .

Le principal obstacle était d'obtenir une clive sans que les débris du polissage s'incrustent dans le cœur creux et le bloque. Les quatre plaques commerciales vendues par Sutter Instrument (104C, 104D, 104E, 104F, Sutter Instrument) ont été testées pour voir leur influence sur la clive. La grosseur du grain de la plaque abrasive à base de diamant influençait les résultats. Les débris bloquaient systématiquement le cœur creux lors de l'utilisation des surfaces abrasives à grains fins (104F, 104E, 104D) (figure 2.8B), tandis que l'utilisation de la surface ayant le plus gros grain (vendu pour polir des micropipettes de 5 à 50 μm) laissait régulièrement l'extrémité du cœur creux ouvert (figure 2.8C). Seul le taux d'efficacité (le nombre de polissages où le cœur creux restait ouvert/le nombre total de polissage) n'était pas très élevé.

Deux solutions complémentaires furent amenées. Premièrement, un agent mouillant (Photo-Flo 200 solution, kodak) était déposé sur la plaque pour favoriser la capillarité lors du polissage. Ceci avait pour effet d'emporter les débris avec le liquide. Il était ainsi possible d'éviter un agglomérat de débris bouchant l'extrémité. Deuxièmement, lorsque le cœur creux de la fibre était soumis à une pression négative, l'effet de suctions accélérat l'emplissage du cœur creux et, par conséquent, l'effet d'entraînement des débris était majoré. De cette façon, en polissant les pointes sur une surface abrasive recouverte d'un agent mouillant tout en créant une succion dans le cœur creux, il fut possible de polir les fibres adéquatement tout en laissant le cœur creux ouvert. Le taux d'efficacité de cette méthode avoisinait les 80-90% pour les pointes plus grandes que 10 μm et d'environ 60% pour les pointes de 5 à 10 μm . Il est à noter que le taux d'efficacité se détériore avec l'usure de la plaque abrasive.

Le principal défaut de cette méthode provient du fait que le cœur creux est rempli de l'agent mouillant après le clivage. Ce qui implique que l'emplissage du cœur creux par l'électrolyte doit se faire dans les heures suivant le clivage pour ne pas laisser sécher l'agent mouillant à l'intérieur et ainsi bloquer le cœur creux.

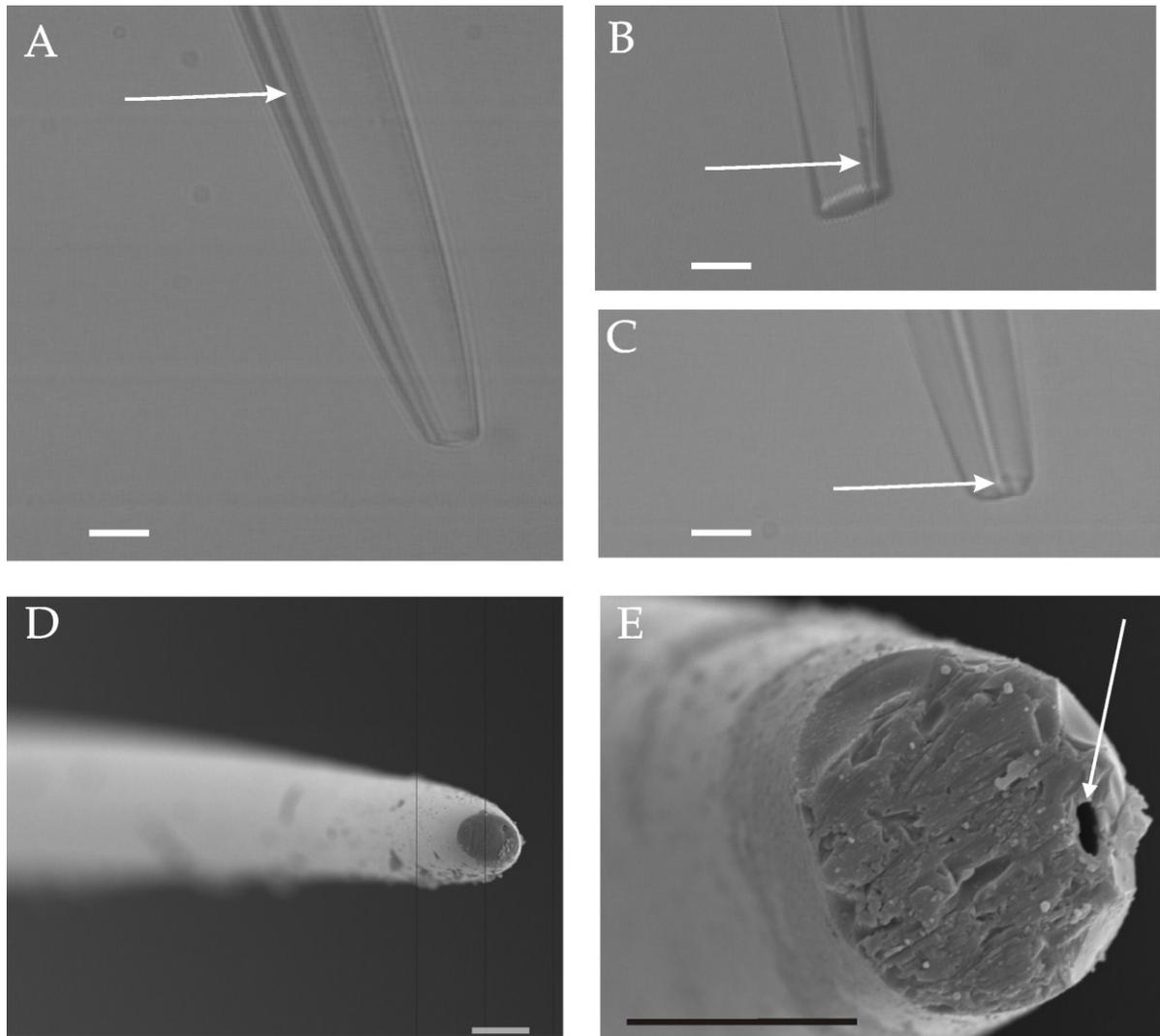


Figure 2.8 Polissage de la microsonde. **A** Photographie d'une pointe polie par une surface abrasive à environ 90° . La flèche indique le cœur creux. **B** Photographie d'une pointe type de microsondes où les débris de polissage ont bloqué le cœur creux. La flèche indique le cœur creux bloqué. **C** Photographie d'une où les débris de polissage n'ont pas bloqué le cœur creux. La flèche indique le cœur creux ouvert. **D** Photographie en microscopie électronique d'une pointe de microsonde. **E** Gros plan de la surface en D. La flèche indique le cœur creux qui est ouvert. Les barres d'échelles sont de $10\ \mu\text{m}$.

2.2.3 Emplissage de la pointe par l'électrolyte

Après avoir étiré et poli les pointes, il fallait emplir celles-ci avec un électrolyte. Comme les sondes étaient polies, la pointe de la fibre était donc préalablement remplie d'une petite quantité d'agent mouillant. Il fallait donc emplir le cœur creux par la pointe pour avoir une continuité dans l'emplissage. Il est à noter que le volume d'agent mouillant contenu initialement dans l'extrémité de la pointe se dilue de façon négligeable dans le volume d'électrolyte contenu dans une microsonde finale.

Après le polissage de la fibre, celle-ci était transférée sous le microscope, dans un bain d'électrolyte (1 à 3 M de NaCl), pour être emplie jusqu'à la moitié de la tige (environ 1.5 à 2 cm). Le contrôle visuel sous le microscope était essentiel pour s'assurer que la fibre n'était pas bouchée et que l'emplissage était constant. Le maintien de la succion appliquée par une pression négative accélère grandement l'emplissage, faisant passer le temps d'emplissage d'environ trois à quatre heures sans succion à environ 20 minutes. Étant donné que l'électrolyte entre par la pointe, il arrivait parfois que celle-ci se bouche en cours d'emplissage. Pour réduire ce risque, la solution d'électrolyte était préalablement filtrée dans un filtre 0.22 μm pour éliminer les impuretés. Le cas échéant, il était parfois possible de refaire une autre clive pour déboucher le cœur creux mais la sonde demeurait régulièrement bouchée et restait ainsi inutilisable.

Donc en trempant la fibre dans une solution d'électrolyte directement après le polissage, il était possible d'emplir le cœur creux pour permettre une conduction électrique entre la pointe et un système d'acquisition.

2.3 JONCTION ÉLECTRIQUE

La jonction électrique entre l'électrolyte contenu dans le cœur creux et le système d'acquisition fut un obstacle de taille dans ce projet. La première solution fut de joindre électriquement le cœur creux en créant un passage pour l'électrolyte au travers de la fibre. Cette jonction permettait de créer une conduction électrique entre une électrode à l'extérieur de la fibre et la pointe du cœur creux. Cette idée fut, avec le recul, une entreprise complexe et peu fructueuse. La deuxième solution consistait simplement à insérer une micro électrode (50 μm) directement à l'intérieur du cœur creux pour assurer le lien de conduction électrique. Cette solution nécessitait toutefois un cœur creux avec une surface assez grande pour y insérer la microélectrode, ce qui ne fut possible qu'à partir de la troisième génération de fibre.

2.3.1 Jonction électrique par trou latéral

La jonction électrique par trou latéral avait pour but de créer une continuité entre l'électrolyte dans le cœur creux et un réservoir d'électrolyte externe à la fibre. Le réservoir externe était par la suite connecté au système d'acquisition électrique par une électrode. Le moyen utilisé pour créer la jonction hydraulique fut de percer, par laser CO_2 , un trou sur le côté de la fibre jusqu'au cœur creux (figure 2.9A).

La faisabilité du concept fut d'abord montrée en collaboration avec l'INO. En utilisant le même système de micro usinage par laser CO_2 que pour les clives, il était possible de percer la fibre face au cœur creux. Un train d'impulsion provenant d'un laser CO_2 était envoyé sur la fibre pour créer un trou micro usiné. De cette manière, il fut démontré qu'il était faisable de trouser la fibre directement en face du cœur creux pour permettre un transfert de liquide entre l'intérieur et l'extérieur. Plus tard, un autre système de micro usinage laser CO_2 fut construit dans le cadre du projet de maîtrise d'Alex Fraser, du laboratoire du Pr. Réal Vallée au COPL. Nous avons établi une collaboration pour créer des jonctions similaires. Les résultats ont donné une jonction de bonne qualité, où un liquide introduit dans le cœur creux emplissait le trou formant un passage vers l'extérieur (figure 2.9). Pour en tester l'efficacité, plusieurs jonctions latérales ont donc été produites, autant à l'INO qu'au COPL.

Après la formation du trou latéral, il fallait emplir le cœur creux d'électrolyte et le faire passer par la jonction. Une bague en forme de «T» (T-connectors 1/16", Cole-Parmer

instruments) fut utilisée pour baliser la jonction hydraulique, permettant ainsi de créer un réservoir d'électrolyte à l'extérieur de la fibre (figure 2.10A). La bague était fixée à la fibre par de la colle époxy ou de la paraffine selon le cas. La colle époxy était fixe, mais devenait perméable au fil des jours, tandis que la paraffine (Parafilm «M», Pechiney plastic packaging) était plus mobile, mais complètement imperméable. Une tubulure était ajoutée à la bague pour y insérer une électrode et relier le tout au système d'acquisition.

Pour permettre le transfert de l'électrolyte entre l'intérieur et l'extérieur de la fibre, deux méthodes ont été essayées. Premièrement, le cœur creux était rempli par la pointe et la tubulure était mise sous vide. L'autre extrémité de la fibre était refermée par de la paraffine. De cette manière, l'électrolyte devait monter dans le cœur creux jusqu'au trou, sortir par celui-ci et remplir la jonction hydraulique. Le réservoir extérieur était alors rempli avec une seringue. Cependant, cette solution ne fut pas très efficace. L'électrolyte remontait jusqu'au trou, mais le transfert vers l'extérieur se faisait difficilement et des bulles d'air obstruaient régulièrement le passage, coupant ainsi la conduction électrique. Le taux de réussite était d'environ 10%, ce qui était très faible. Lors de la deuxième méthode, le trou de côté était bouché temporairement par de la paraffine, le cœur creux était rempli par la pointe comme à la sous-section 2.2.2.3. Ainsi, l'électrolyte emplissait le cœur creux jusqu'à ce qu'il dépasse le trou. Par la suite, la paraffine était enlevée pour faire place à la bague en «T», puis un agent mouillant (Photo-Flo 200 solution, kodak) était injecté à faible dose (20-50 μ l) au bord de la jonction hydraulique pour faciliter le passage de l'électrolyte. Puis, la bague était remplie à son tour par l'électrolyte à l'aide d'une seringue. Comme à la première méthode, des problèmes de bulles apparaissaient fréquemment et le taux d'efficacité de la jonction n'était pas très élevé (15-25%). Étant donné qu'il s'agissait d'une des dernières étapes de la production, il était très limitant de devoir produire plusieurs échantillons pour que bon nombre (75 à 90%) d'entre eux soient rendus inutilisables lors de la tentative de la jonction électrique. Il fallait donc trouver une autre solution.

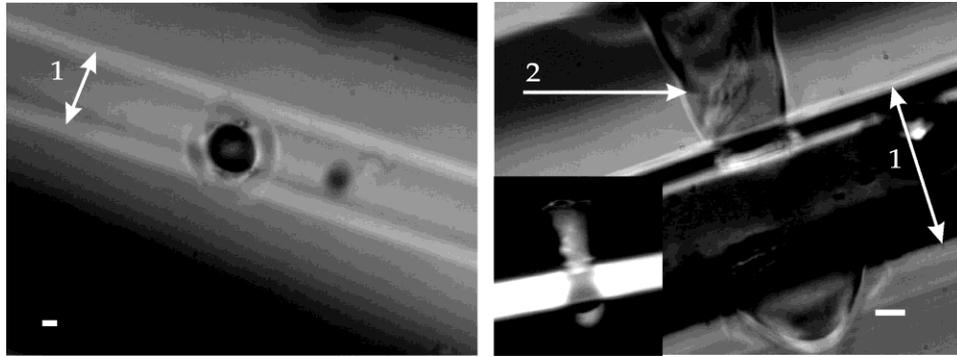


Figure 2.9 Jonction hydraulique **A** Photographie du trou fait par le laser CO₂ vu de haut. Ce trou servait à faire une jonction hydraulique entre le cœur creux et l'extérieur de la fibre. **B** Vu en plan du cœur et du trou fait par laser CO₂. L'encadré en bas à gauche montre que le liquide fluorescent dans le cœur creux entre bien dans le trou. **1** Le cœur creux. **2** Le trou micro usiné. Les barres d'échelles sont de 20 μm .

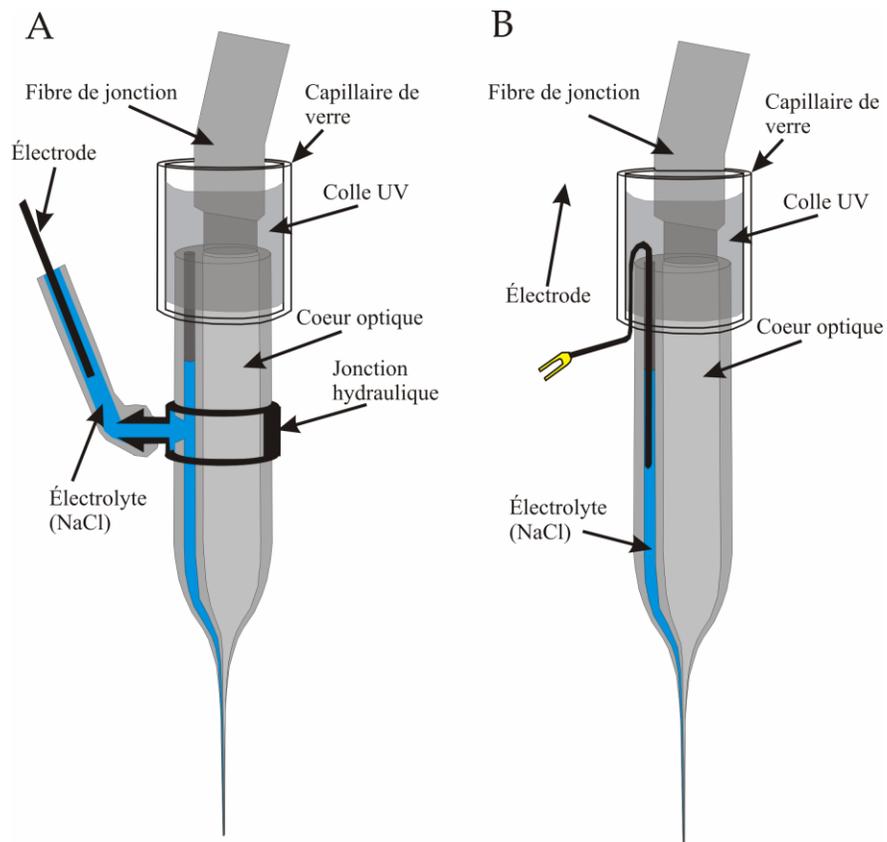


Figure 2.10 La microsonde **A** Microsonde à deux cœurs où la jonction électrique se fait par le côté de la fibre. Un trou est creusé par des impulsions d'un laser CO₂ pour relier l'extérieur de la fibre avec le cœur creux. Une jonction hydraulique en T permet la continuité de l'électrolyte entre l'extérieur et l'intérieur. **B** Microsonde à deux cœurs où la jonction électrique se fait directement par l'introduction d'une électrode de 50 μm à l'intérieur du cœur creux pour joindre l'électrolyte.

2.3.2 Jonction électrique directe

La jonction électrique directe est simple et efficace. Il s'agit d'introduire directement un fil métallique servant d'électrode à l'intérieur du cœur creux pour rejoindre l'électrolyte (figure 2.10 A). Un fil de 50 μm était introduit dans le cœur creux sur environ 3 cm pour faire la jonction. Ce diamètre était à la limite inférieure, car il est très ardu d'introduire des fils de plus petits diamètres (25 μm et 10 μm) sur quelques centimètres. Les fils de 10 à 25 μm de diamètre se plient facilement et sont naturellement recourbés en spirale, ce qui nuit fortement à leur introduction sur une distance de plus que quelques millimètres. Le problème majeur avec ce type de jonction vient du fait que le cœur creux doit être d'assez gros diamètre pour accepter l'électrode. Le cœur creux de la première génération était trop petit pour un fil de 50 μm , celui de la deuxième était juste à la limite (55-60 μm de largeur minimum), ce qui rendait l'introduction du fil difficile et peu praticable. Quant aux cœurs de la 3^e et 4^e génération, ils sont assez larges pour permettre l'introduction aisée d'une telle électrode (figure 2.11 A).

Cependant, il fut possible d'introduire dans le cœur creux, des fils de 25 μm sur environ 1 à 3 mm. Cette approche ne fut pas retenue, car elle offrait une jonction trop précaire, mais elle pourrait être optimisée et utilisée dans le cadre des fibres de 400 μm de la quatrième génération. Ces fibres furent produites pour ouvrir la voie à des sondes moins coûteuses, mais elles n'ont pas été testées comme microsondes.

Le principe de cette jonction est simple, lorsque le cœur creux était rempli de plus de la moitié, un fil de tungstène ou d'acier inoxydable de 50 μm était introduit dans le cœur creux. Il était nécessaire d'emplir de cœur creux de plus de la moitié, car l'introduction du fil créait un effet de capillarité et l'électrolyte remontait le long du fil. Donc, pour éviter qu'il se crée un espace d'air entre le fil et l'électrolyte, le fil était entré jusqu'au début de la pointe et le cœur creux était rempli de plus de la moitié de sa longueur. Lors des premiers essais, l'introduction se faisait à l'aide d'un positionneur x-y-z et d'une loupe binoculaire, avant de se rendre compte qu'il était plus facile et simple d'introduire le fil directement à la main, comme un fil dans le chat d'une aiguille. La localisation du cœur creux à l'aide d'une loupe 20x permettait d'y introduire directement le fil. Le fil métallique est préalablement soudé à un connecteur électrique pour être branché sur le système d'acquisition électrique (figure 2.10B). Pour mesurer la résistance, la microsonde était plongée dans une solution saline pour la mettre série avec un ohmmètre (BV-10 Microélectrode Beveler, $\pm 1 \text{ M}\Omega$, Sutter Instrument).

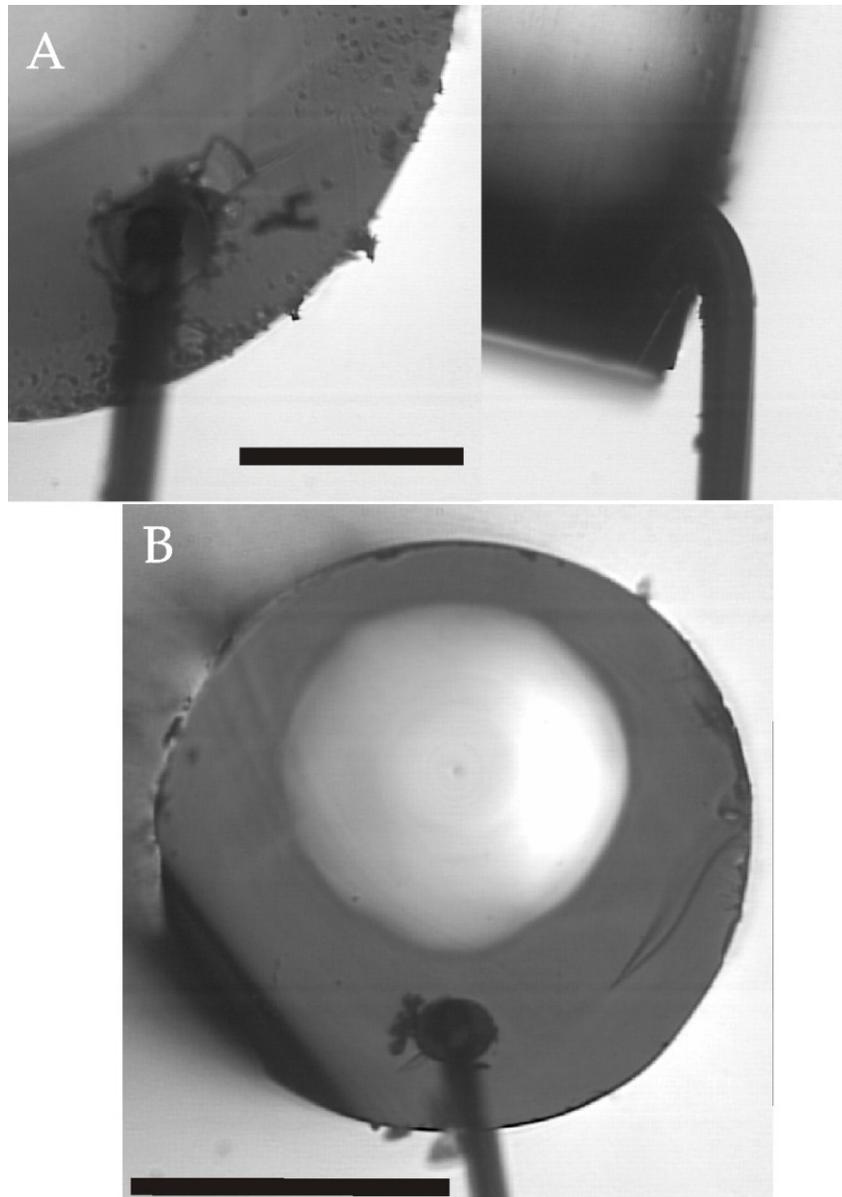


Figure 2.11 Photographies de la jonction électrique **A** Images d'un fil de 50 μm introduit dans le cœur creux d'une fibre de troisième génération. Vu en coupe à gauche et vu transverse à droite. **B** Photographie de la coupe de la fibre de quatrième génération de 400 μm où un fil de 25 μm y est introduit. Barre d'échelle 200 μm

2.4 JONCTION OPTIQUE

La dernière étape de production pour compléter la production d'une microsonde est de joindre le cœur optique de la fibre à deux cœurs avec une fibre traditionnelle. La fibre à deux cœurs est fixée sur une monture et un capillaire (Diamètre extérieur = 2.00 mm, Diamètre intérieur = 1.50 mm) remplis de colle UV (NOA81, Norland product) est placé à l'extrémité non tirée de celle-ci (figure 2.12A). Une fibre conventionnelle à saut d'indice (BFL22-550, cœur= 550 μm ; gaine 600 μm , O.N.=0.22) d'environ 2m de long est dégainée aux deux extrémités sur environ 1cm, puis clivée à l'aide d'une pointe à diamant pour qu'environ 3-5 mm de fibre soit dédaigné au final. La fibre est placée sur un positionneur xyz, une extrémité est alignée grossièrement pour que les 2 cœurs soient face à face et l'autre extrémité est mise face à un puissance-mètre (PM100, Thorlab) (figure 2.12A et B). Un faisceau laser HeNe (594 nm) légèrement à angle est utilisé pour injecter environ une centaine de μW à la pointe de la sonde. En déplaçant la fibre traditionnelle avec le positionneur, il est ainsi possible d'optimiser l'emplacement de celle-ci pour que le plus de puissance lumineuse soit transférée au photodétecteur et ainsi optimiser l'efficacité de la jonction optique. Pour solidifier le tout, un système d'illumination UV (Curing System UV75 Light, Thorlabs) est utilisé pour éclairer et durcir la colle (à base de polymère) contenue dans le capillaire (figure 2.12C).

L'efficacité de transmission moyenne de ce type de jonction est de 61% (Écart type de 10%) en collection, voir sous section 3.1 La qualité des deux clives, l'angle entre les deux fibres et la différence entre les types de cœurs sont les principaux facteurs pouvant influencer le taux de transmission. Pour ce qui est de la différence entre les cœurs, le diamètre est comparable (à moins de 2% près) et l'ouverture numérique au centre est la même pour les deux cœurs. La jonction entre un cœur à saut d'indice et un cœur à gradient d'indice influence l'efficacité de transmission, mais la haute nature multi mode due au grand diamètre réduit l'importance de ce paramètre. Il est aussi à noter que les principales pertes induites par cette différence (causant des variations locales d'ouverture numérique) seraient majoritairement observées en mode excitation plutôt qu'en collection, ce qui est plus tolérable, car les plus précieux photons sont ceux qui proviennent de la fluorescence collectée.

La jonction optique, qui consiste à aligner une fibre standard sur le cœur optique et à maintenir le tout dans un capillaire rempli de colle UV durcies, fut jugée suffisamment

simple et efficace pour en faire le procédé utilisé tout au long du projet. Donc, cette dernière étape compète le protocole de conception de la micro sonde.

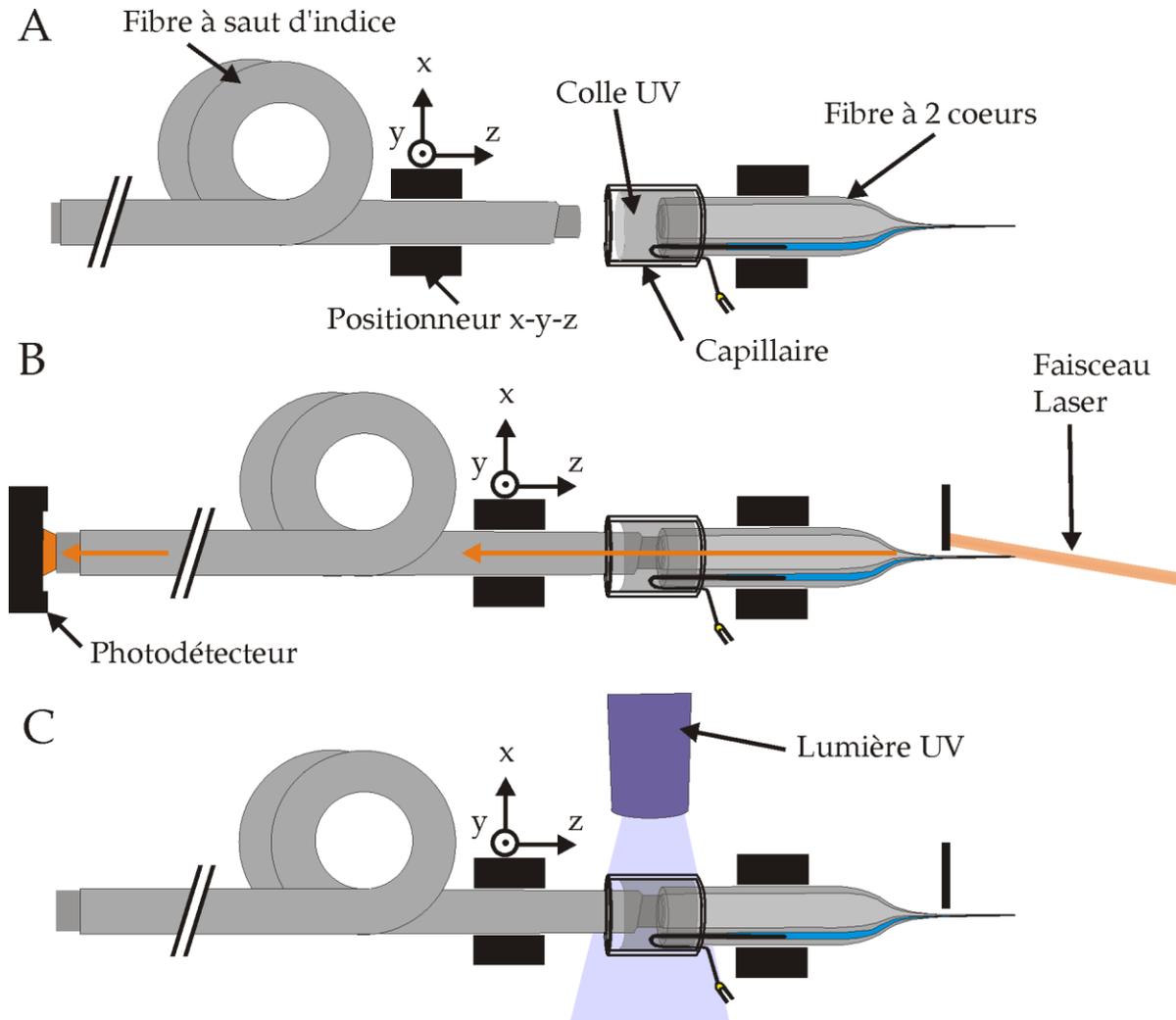


Figure 2.12 Jonction optique **A** La fibre à deux cœurs est placée sur une monture fixe, tandis qu'une fibre multi mode est placée sur un positionneur x-y-z. Un capillaire rempli de colle UV est placé à l'extrémité non tirée de la fibre à deux cœurs. **B** La fibre multi mode est alignée sur le cœur optique en optimisant la transmission d'une lumière laser He-Ne (594nm) injectée par la pointe et détectée par un photodétecteur à l'autre extrémité de la fibre multi mode. **C** La jonction optique est solidifiée par une lumière UV qui durcie la colle à base de polymère.

2.5 MONTAGE

Cette section présente le montage expérimental permettant l'utilisation de la microsonde, autant du côté optique qu'électrique. Le montage optique fut conçu pour permettre l'injection d'un faisceau laser à l'intérieur du cœur optique de la sonde pour l'excitation de fluorescence au bout de la sonde. Il doit aussi permettre de récolter cette fluorescence et la guider sur un détecteur. Le montage électrique, quant à lui, est composé d'un système d'amplification relié à un système d'acquisition de données.

Pour ce qui est des mesures optiques, étant donné que les expériences furent faites sur différents fluorophores, le choix de la source laser et des filtres optiques utilisés était fonction des fluorophores. Pour le cas des protéines fluorescentes de type EGFP, l'excitation fut faite par une diode laser FCD488 20mW à 488nm de JDS Uniphase et l'optique utilisée était : un miroir dichroïque T495LP et des filtre passe-bande ET525/50M de Chroma Technology. L'excitation du DiI fut, quant à elle, faites par une diode laser Lambda pro 50 mW à 532nm de Alltech Solution et l'optique utilisé était un miroir dichroïque (z543rdc) et les filtres passe-bande (ET605/70M) de Chroma Technology.

Le montage optique (Figure 2.13) est composé d'une source laser dont le faisceau était atténué par un filtre de densité neutre (D.N. 1-3 , NEK01, Thorlabs), puis réfléchi sur un miroir dichroïque et ensuite injecté dans un objectif de microscope 10x (UIS-2 Plan-N, O.N.= 0.25, Olympus) fixé sur une monture d'injection (KT110, thorlabs) qui était basé sur une table de translation (PT3 1" XYZ, Thorlabs). Le faisceau laser est ainsi aligné et injecté dans le cœur optique de la sonde pour être guidé jusqu'à la pointe. La fluorescence collectée par la pointe était guidée par le même trajet, collimée par l'objectif de microscope pour traverser le miroir dichroïque, puis elle entre dans un tube isolateur de 1" de diamètre (SM1L30, Thorlabs). La fluorescence passe ainsi par 2 filtres passe-bande et elle est finalement focalisée par une lentille ($f = 50\text{mm}$, LA1131-A, Thorlabs) sur un détecteur PMT (Photosensor Module H6780-20, Hamamatsu). Le détecteur était basé sur une table de translation x-y-z pour permette l'optimisation du signal collecté. Le tout est contenu dans une boîte noire en plexiglas ou chaque face est amovible et munie d'une fente refermable pour laisser passer le filage. Le signal provenant du détecteur PMT était amplifié et filtré (Gain = 0.5 to 10, passe-bas 30 Hz, Model 440, Brown Lee Precision) et finalement enregistré par le système d'acquisition (soit un Power 1401 mkII de CED ou un Powerlab/8sp de ADInstruments).

Le signal électrophysiologique extracellulaire est capté par la pointe et transmis à un amplificateur (ER-1 amplificateur extracellulaire, Cygnus technology) pour y être filtré (passe-bande 0.1-3.0 kHz). La mise à la terre de l'amplificateur doit être en contact avec l'animal. Le signal est ensuite enregistré en parallèle par le système d'acquisition (Power 1401 mkII de CED ou Powerlab/8sp de ADInstruments).

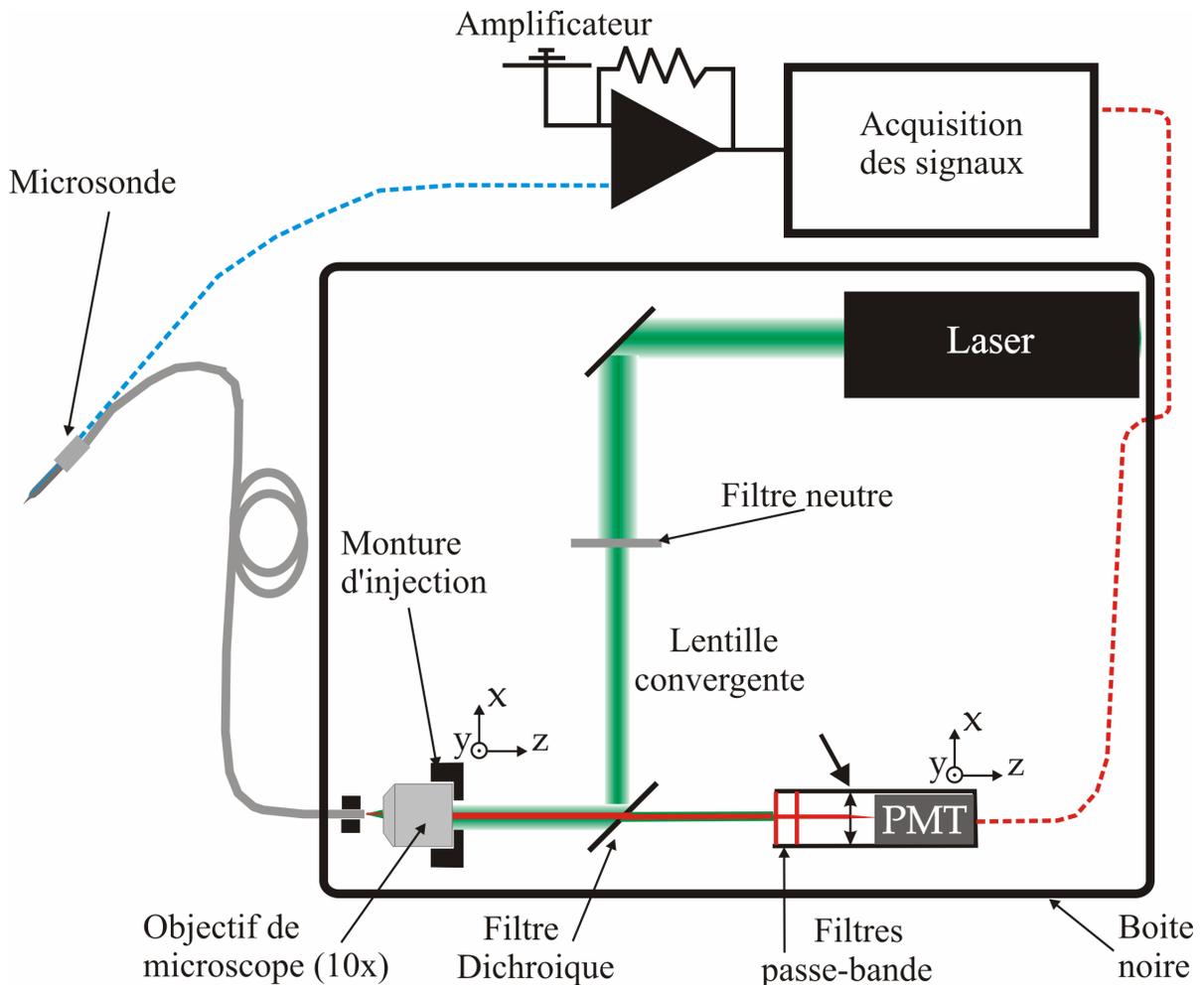


Figure 2.13 Montage optique et électrique permettant l'enregistrement des signaux captés par la microsonde. Un faisceau laser est injecté dans la partie optique de la microsonde pour être guidé jusqu'à son extrémité. Le signal lumineux capté par la pointe de la microsonde est lui aussi guidé par le cœur optique jusqu'à ce qu'il sorte de la fibre de jonction. Ce signal est collimé et puis filtré pour que seule la bande spectrale puisse traverser le filtre, cette bande concorde avec le signal de fluorescence désiré. Ce signal est focalisé sur un détecteur de type PMT. Il est ainsi possible d'exciter et de collecter la fluorescence d'une source située devant la pointe de la microsonde.

2.6 CONCLUSIONS

En conclusion, ce chapitre montre que nous proposons une méthode permettant de produire des microsondes optiques et électriques ayant un diamètre de pointe entre 5 et 25 μm . Ces microsondes sont le fruit de différentes approches afin de raffiner la production de chaque partie de celles-ci pour obtenir un protocole efficace et reproductible.

Il aura fallu trois générations de fibre à deux cœurs avant de trouver les paramètres justes permettant une production efficace des microsondes. La collaboration avec l'INO a été un fort succès, elle a permis de jouir de leur expertise pour produire la fibre à deux cœurs. Il fut rapidement possible de produire une première génération de fibre, mais les composantes de la préforme ne se sont pas bien soudées ensemble et il y avait plusieurs trous dans la fibre. Lors de la production des générations suivantes, il fut possible de corriger et d'optimiser les différents paramètres pour obtenir les paramètres désirés. En produisant une quatrième génération, nous avons montré que le procédé était non seulement reproductible, mais qu'il était possible d'optimiser plus finement les ratios. Donc, sans la collaboration des premiers instants avec l'INO, ce projet aurait difficilement pu voir le jour. Cette collaboration a permis de produire la fibre optique à deux cœurs que nous voulions.

Cette fibre optique à deux cœurs nécessitait par la suite plusieurs modifications pour la transformer en une microsonde. La première étape fut d'étirer celle-ci pour obtenir une pointe ayant l'extrémité plus petite qu'un corps cellulaire de neurone tout en conservant le cœur creux débouché. La production des pointes fut possible avec l'acquisition d'une tireuse à laser CO_2 . Celle-ci a facilement permis de produire des pointes permettant d'obtenir le diamètre final et la longueur de pointe désirée. Le problème avec ce type d'étirement, c'est qu'il y a peu de contrôle sur la forme de l'épaulement. Un plus grand contrôle de la forme permettrait certainement d'optimiser les pertes encourues lors du passage de la lumière lors d'excitation (chapitre 3.1.1). Une fois la pointe faite il fallait couper celle-ci avec une qualité optique sans boucher le cœur creux. Ici encore, plusieurs tentatives ont été faites pour joindre ces deux contraintes. La solution retenue est de polir la pointe sur une plaque abrasive tout en utilisant un agent mouillant afin que les débris de verre entrent dans la fibre. Cette solution est efficace et permet un bon contrôle du diamètre de la pointe si celle-ci est bien effilée. Par contre, cette solution demande d'emplir le cœur creux par la pointe avec l'électrolyte immédiatement après leur clivage. Il est toutefois possible d'emplir les pointes

sans les utiliser immédiatement comme sonde. En bouchant l'autre extrémité avec de la paraffine, il est possible de les garder de plusieurs jours à quelques semaines dans un contenant saturé en humidité. Donc, il fut possible d'établir un procédé reproductible afin de modifier une section de fibre, en l'étirant et en coupant la pointe, afin qu'elle devienne le point central d'une microsonde.

La section de fibre modifiée doit ensuite être jointe à une électrode et à une fibre de jonction afin de créer une microsonde. Ces deux éléments de jonction servent à relier le cœur optique aux systèmes d'excitation et d'acquisition optiques et le cœur creux rempli d'électrolyte au système de captation électrique. La jonction optique réunissant les deux cœurs optiques à l'aide d'un polymère durcissant sous les rayons UV fut relativement simple à implanter et offre une transmission très acceptable (chapitre 3.1). Par contre, la jonction électrique a posé problème. La première approche visait à créer une jonction hydraulique par le biais d'un trou latéral. Elle était parfaitement fonctionnelle, mais sa production était très inefficace. Le fait est que les deux premières générations ne permettaient pas l'insertion directe d'un fil métallique, ce qui a causé une lourde perte de temps et d'énergie. Lors de l'arrivée de la troisième génération, il était désormais possible d'introduire directement le fil dans l'électrolyte contenu dans le cœur creux. Cette dernière solution fut le point tournant de ce projet. Elle a permis d'éliminer le perçage du côté par laser, une étape coûteuse et fastidieuse. Ceci a surtout permis de produire de manière reproductible et à quasi-volonté des jonctions électriques durables. Conséquemment, il est maintenant possible de produire des microsondes optiques et électriques ayant les paramètres désirés afin de pouvoir enregistrer des signaux optiques et électriques (Chapitre 3 et 4).

Après la production de la microsonde, il restait à configurer un montage permettant d'injecter un faisceau laser dans la microsonde, puis d'acquérir les signaux optiques (chapitre 3) et électriques (chapitre 4) émis près de la pointe. Le système d'injection du laser d'excitation et de collection de la fluorescence fut aisé à mettre au point, car il ne comporte pas de particularités marquantes. Il s'agit d'un montage optique relativement courant. L'enregistrement des signaux électriques s'est fait en utilisant les méthodes standards d'électrophysiologie. Ainsi, la majeure partie du développement technique de ce projet fut directement reliée à la conception de la microsonde et à son optimisation.

CHAPITRE 3

PROPRIÉTÉS OPTIQUES DE LA MICROSONDE

Ce chapitre a pour but de caractériser les propriétés optiques de la microsonde. Les étapes pour y arriver visent à déterminer les propriétés de propagation dans la microsonde, définir les bruits optiques présents lors de la détection et définir les comportements d'illumination et de détection de la sonde. Deux approches différentes ont été utilisées pour comprendre l'excitation et la collection : une expérimentale faisant des séries d'enregistrements *in vitro* et une théorique simulant numériquement l'interaction sonde-neurone.

Le présent chapitre est divisé en quatre sections. La section 3.1 présente l'étude des propriétés optiques de la microsonde sous quatre aspects: l'efficacité de propagation optique dans la microsonde, l'illumination produite par la pointe, la provenance des principaux bruits optiques et l'efficacité de la transmission dans la jonction optique. La section 3.2 détaille la détection optique *in vitro*. Il s'agit de la preuve de concept optique de la microsonde. Des expériences ont été faites dans trois conditions expérimentales dans le but de s'approcher graduellement des conditions *in vivo*. Les premiers tests de détection ont été faits sur des microbilles, puis sur des neurones en culture et finalement sur des neurones en tranche. La section 3.3 présente un modèle numérique simulant la détection optique de neurone par la microsonde. Il est ainsi possible d'étudier des paramètres principaux, comme la position relative entre la sonde et le neurone, le diamètre de ceux-ci et l'ouverture numérique de la sonde, afin de voir l'impact sur la détection. Finalement, les conclusions sont présentées à la section 3.4.

3.1 CARACTÉRISTIQUES OPTIQUES DE LA MICROSONDE

Cette section vise à définir les principales caractéristiques optiques de la microsonde. Il y est principalement question de l'efficacité de la propagation à travers la microsonde et du bruit optique.

La détection d'une source fluorescente par la fibre optique est dépendante de deux propriétés distinctes. L'excitation et la collection de la fluorescence. Dans le cas présent, l'excitation de la fluorescence survient lorsque la lumière qui sort de la fibre optique atteint des fluorophores et que ceux-ci l'absorbent. La lumière à la sortie de la fibre est très directionnelle; elle est principalement dirigée par l'ouverture numérique (chapitre 1.4.1). Suite à l'excitation, les fluorophores se dé-excitent environ quelques nanosecondes plus tard ⁹ et réémettent l'énergie absorbée sous forme de lumière. Des pertes non radiatives décalent le spectre des photons réémis par rapport à ceux absorbés; la longueur d'onde réémise est donc plus longue. La collection survient lorsque les photons fluorescents sont injectés dans le cœur optique et guidés dans la fibre optique. Ces photons proviennent principalement du cône d'acceptance de la fibre (chapitre 1.4.1). La microsonde décrite dans cette thèse utilise ces deux propriétés de manière conjointe afin d'obtenir une détection locale et directionnelle; les fluorophores qui sont hors du champ de collection sont aussi hors du champ d'excitation.

Conséquemment, lorsque la sonde se déplace dans le tissu et passe en face d'un neurone, le signal optique augmente et diminue de manière différente. Le profil résultant n'est donc pas symétrique. Ce phénomène est dû à la propriété directionnelle des enregistrements optiques. La sonde excite et collecte seulement la zone face à elle. Lorsqu'elle approche une source fluorescente, le signal détecté augmente progressivement jusqu'à ce que la sonde soit collée sur la source, puis, lorsqu'elle dépasse celle-ci, le signal décroît abruptement. C'est ce que nous appellerons la propriété directionnelle de détection (Figure 3.1). Il est important de noter que les propriétés de détection optique sont différentes de celles reliées aux enregistrements électrophysiologiques. Ces dernières ne dépendent pas de la direction de l'électrode (non directionnelle), mais seulement de la distance; l'intensité de détection est similaire si, pour une même distance, la pointe de la sonde est située en face ou bien dépasse le neurone.

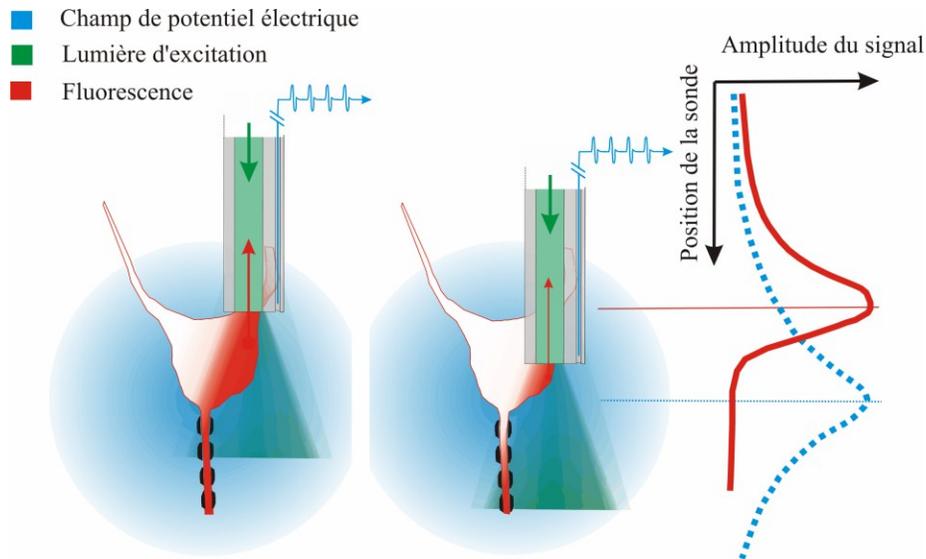


Figure 3.1 Représentations des propriétés géométriques de détection des signaux optiques et électriques. **À gauche et au centre** : Représentation d'un neurone fluorescent excité optiquement par une microsonde en deux endroits. **À droite** : Approximation de l'amplitude des signaux optiques et électriques détectés par la microsonde. La détection optique est dite directionnelle, car elle ne dépend non seulement de la position de la microsonde, mais aussi de son axe par rapport au neurone. La détection électrique est quant à elle dite non directionnelle, car elle dépend seulement de la position par rapport à la source. Donc, lors d'un déplacement axial de la sonde, le profil de détection optique devrait être non symétrique, tandis que le profil électrique devrait être symétrique. Les maxima des profils ne sont pas nécessairement à la même position axiale.

3.1.1 Propagation de la lumière et perte lumineuse

Les pertes dues à la propagation de la lumière à l'intérieur de la microsonde est un facteur important à connaître afin de quantifier la puissance d'excitation à la sortie de la fibre en fonction de la puissance injectée. Pour bien identifier la localisation des pertes, une série de fibres a été caractérisée pour connaître la transmission au long de la microsonde. Trois sections de la sonde ont été identifiées comme des sources potentielles de perte: 1- la jonction optique, 2- la portion de la fibre à deux cœurs ayant un diamètre constant et 3- la zone d'étranglement.

Premièrement, il était essentiel de caractériser la transmission dans la jonction optique dans les deux sens de propagation. La lumière servant à l'excitation des neurones provient d'une source laser continue (532nm ou 488 nm); elle est injectée dans la fibre de jonction afin

d'acheminer la lumière dans le cœur optique de la fibre à double cœurs (Chapitre 2). L'ouverture numérique (O.N.= 0.22-0.23) et le diamètre ($\approx 550 \mu\text{m}$) des deux cœurs sont similaires, mais les profils d'indice de réfraction sont différents. Le cœur de la fibre de jonction est à saut d'indice tandis que l'autre est à gradient d'indice. Cette différence entre les deux configurations d'indices crée une discordance lors de la transmission; pour un même diamètre et une même ouverture numérique, le cœur à gradient d'indice guidera deux fois moins de mode. Il y a normalement plus de perte lorsque la lumière passe du saut d'indice vers le gradient d'indice, car l'angle d'acceptance du cœur à gradient d'indice varie en fonction du diamètre du cœur; l'angle d'acceptance, qui est fonction de l'indice de réfraction du cœur, est plus grand au centre que sur les bords du cœur ¹¹². Dans le cas de la microsonde, il y aura donc moins de perte lors de la collection de la fluorescence et il y aura certainement une portion de la lumière d'excitation qui sera injectée dans la gaine, ce qui cause des pertes. Cette configuration fut considérée acceptable, car les photons de fluorescence collectée sont très précieux, tandis que la lumière d'excitation est déjà filtrée pour diminuer la puissance.

La fibre de jonction a été choisie en fonction de minimiser les pertes possibles aux longueurs d'onde utilisées (450-650 nm) et l'atténuation due à la fibre est négligeable, car la lumière est transportée sur une courte distance (environ 2m). Les fibres optiques en cause ici sont largement multi modes. Ces modes sont en pratique indissociables pour un cœur optique de $550 \mu\text{m}$ ¹¹². Le diamètre limite permettant de guider de la lumière de manière mono mode est d'environ $2 \mu\text{m}$ dans les présentes conditions ¹¹²; pour une fibre ayant une ouverture numérique de 0.22 et de la lumière à environ 500 nm. Il s'agit là de la limite théorique du diamètre du cœur optique pour la récolte. Sachant cela, il est normal que la lumière d'excitation ne soit pas seulement guidée par le cœur à l'extrémité de la pointe. La plupart des modes supérieurs ne peuvent plus être guidés dans le cœur lorsque le diamètre de cœur est de quelques micromètres.

Pour vérifier expérimentalement l'efficacité de la jonction optique utilisée (section 2.4), nous avons calculé l'efficacité de la transmission optique dans les deux directions de propagation. En mode illumination, la lumière passe de la fibre de jonction à la fibre à double cœurs (figure 3.3 A). En mode collection, la lumière passe de la fibre à double cœurs à la fibre de jonction (figure 3.3 B). Dans les deux cas, une mesure de la puissance injectée dans la fibre (puissancemètre, PM100 Thorlabs) était prise avant et après la jonction. L'efficacité moyenne de transmission en mode illumination était de $76 \pm 16 \%$ ($\pm\text{DS}$) et celle en mode collection était de $61 \pm 10 \%$ ($\pm\text{DS}$). Lors de l'illumination, une portion de la lumière

est injectée et guidée dans la gaine, ce qui expliquerait que le passage entre la fibre de jonction et la fibre à deux cœurs induise moins de perte; le fait de mesurer la lumière se propageant dans la gaine. Pour s'assurer de la pérennité des jonctions optiques, des mesures ont été faites sur une base hebdomadaire lors de quatre séries s'étalant sur une période 21 jours. L'efficacité de la jonction optique ne varie pas significativement sur cette période. Les moyennes d'efficacité varient entre 73% et 80%. La qualité de la jonction optique ne semble donc pas se dégrader à court et moyen terme. Étant donné que les sondes sont généralement utilisées dans les jours ou parfois les semaines suivant leur fabrication, la qualité de la jonction peut donc être considérée comme constante. Cette technique de jonction fut donc considérée comme suffisamment simple et efficace pour être utilisée tout au long du projet.

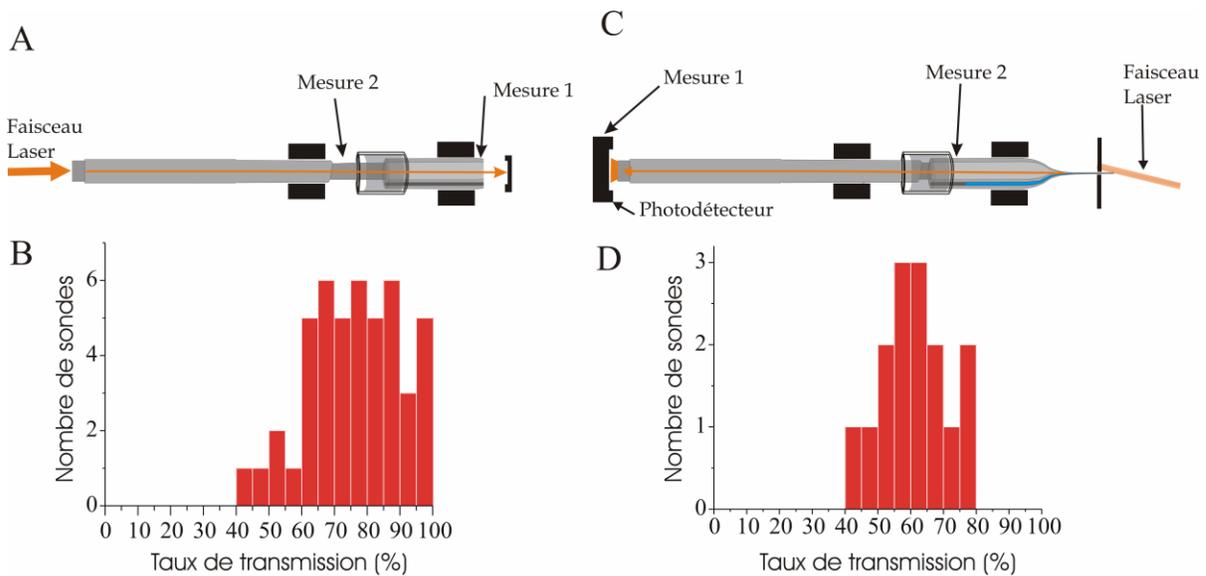


Figure 3.2 Efficacité de transmission de la jonction optique dans le sens de l'illumination et collection. **A** Illumination : un faisceau Laser (594 ou 532 nm) était injecté dans la fibre de 600 μm. Des mesures de la puissance lumineuse étaient prises aux endroits 1 et 2 afin de calculer le taux de la puissance transmise à travers la jonction optique. **B** Histogramme montrant le taux de transmission de la lumière à travers la jonction optique (N=46 sondes). L'efficacité moyenne était de $76 \pm 16\%$ ($\pm DS$). **C** Collection : un faisceau Laser (594 ou 532 nm) était injecté dans la fibre par la pointe. Des mesures de la puissance lumineuse étaient prises aux endroits 1 et 2 afin de calculer le taux de la puissance transmise à travers la jonction optique. **D** Histogramme montrant le taux de transmission de la lumière à travers la jonction optique (N=15 sondes). L'efficacité moyenne était de $61 \pm 10\%$ ($\pm DS$).

Deuxièmement, une autre série de fibres fut utilisée afin de quantifier les pertes en illumination tout au long de la fibre et pour quantifier la puissance d'illumination à l'extrémité. Pour ce faire, sept microsondes furent alignées de la même façon que lors des expériences *in vivo* (chapitre 4) et elles furent sectionnées à sept endroits pour y mesurer la puissance (figure 3.3). Cette expérience montre que les pertes induites par la jonction optique sont de l'ordre de 10%, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus précédemment (figure 3.2). Les pertes dues à la transmission dans la fibre à deux cœurs, lorsque le diamètre du cœur est constant, sont aussi de l'ordre de 10% sur 3-4 cm. Celles-ci incluent les pertes dues aux modes de gaines, ce qui laisse supposer que la transmission dans le cœur optique est supérieure à 90%. Le fait marquant de cette expérience est qu'environ 70% du signal total est perdu dans l'étranglement et le transport dans la pointe. La lumière est expulsée hors de la pointe (figure 3.4A). Ces pertes sont majeures. L'intensité d'illumination est toutefois plus grande à la sortie de la fibre, mais il y a des pertes de puissance considérables le long de la pointe. Ces pertes sont probablement causées par les modes de propagation ne pouvant pas être guidés dans un cœur de faible diamètre. Ils sont ainsi expulsés hors de la fibre. Donc, la propagation dans le cœur optique de la fibre à double cœurs n'induit pas de pertes très considérables, mais l'étranglement pour obtenir une pointe de faible diamètre conduit mal la lumière lors de l'illumination. Ce problème de transport ne devrait normalement pas apparaître en collection, car le diamètre du cœur augmente au fil de la propagation au lieu de diminuer.

L'intensité à la sortie de la fibre est généralement de l'ordre de 10 à 100 μW pour 1 mW de lumière avant les épaules. Ceci montre que des pertes très considérables (de l'ordre de 90 à 99%) surviennent lors du transport de l'illumination par la microsonde. Pour connaître l'intensité à la sortie de la microsonde, la pointe fut photographiée face à un objectif 40x à l'immersion (Figure 3.4C). À la sortie de la sonde, la lumière n'est pas seulement guidée par le cœur optique, mais par l'ensemble de la fibre, à l'exception du cœur creux. Il semble cependant que l'intensité dans la zone du cœur optique soit plus élevée. Les pertes générées dans cette zone peuvent être guidées dans des modes de gaine grâce à la différence d'indice entre la silice et l'eau. À noter que cette différence d'indice est très similaire à celle entre la fibre et le milieu extracellulaire¹⁰⁷ et que ce type de répartition de la lumière d'excitation est probablement aussi vrai dans des conditions *in vivo*.

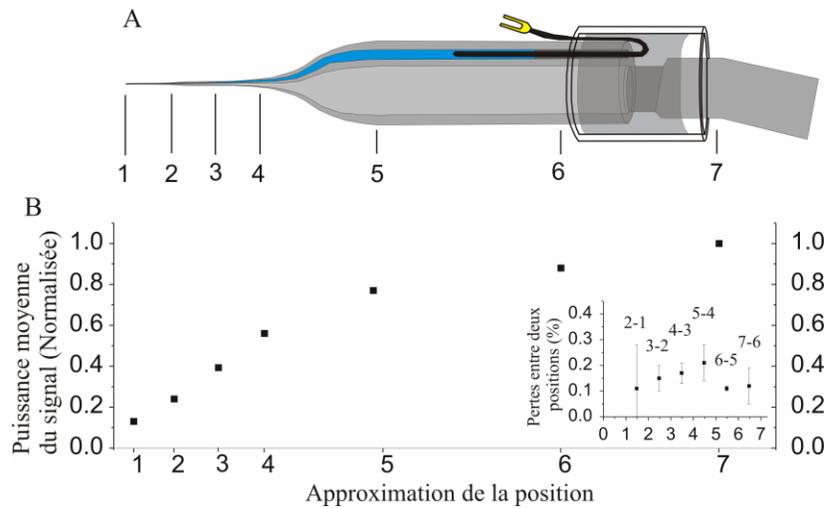


Figure 3.3 Localisation des pertes dans la microsonde. **A** Schéma de la microsonde. Les positions 1 à 7 représentent approximativement les emplacements où la puissance fut enregistrée: 1-sortie, 2-fin du 2e étranglement, 3-mi-parcours entre 2 et 4, 4-fin du 1er étranglement, 5- début du 1er étranglement, 6-après la jonction optique, 7-avant la jonction optique. **B** Puissance moyenne du signal d'excitation guidé par rapport aux différents emplacements. Le signal est normalisé en fonction de la puissance avant la jonction optique. Ceci montre la localisation des pertes dans la sonde. Les pertes induites par la jonction optique et la propagation dans la fibre à 2 cœurs sont environ 3 fois moins élevées que celles induites par la pointe. (inset) Ratio des pertes entre les différentes positions par rapport au signal initial (position 7); n=7 microsondes, barres représentant l'erreur standard.

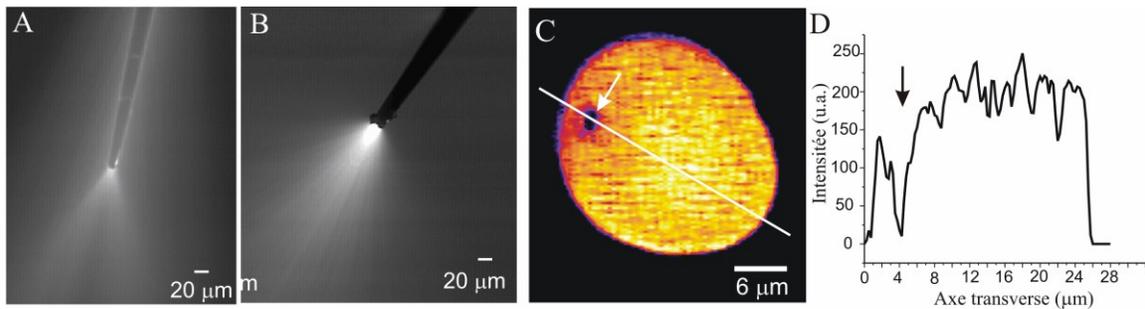


Figure 3.4 **A** Fluorescence induite par une pointe plongée dans un fluorophore (Lucifer Yellow) L'illumination est plus intense face à la pointe, mais il y a d'importantes pertes lumineuses par les côtés de la fibre. **B** Fluorescence induite par une pointe couverte d'une couche de 150nm d'aluminium plongée dans le Lucifer Yellow. Il n'y a plus de pertes de côté et l'illumination est concentrée face à la pointe. **C** Photographie de la surface de la pointe d'une microsonde de 24 µm à laquelle était injecté de la lumière laser (488nm). La pointe était face à un objectif de microscope 40x et elle baignant dans l'eau pour reproduire le milieu extracellulaire. La ligne représente l'axe transversal utilisé pour la figure B et la flèche représente le cœur creux de la fibre. La lumière d'illumination au niveau de la pointe, semble être guidé partout dans la fibre et non seulement dans le cœur optique. **D** Intensité sur la ligne tracé en C. La flèche montre l'emplacement du cœur creux qui ne guide pas la lumière.

3.1.2 Analyse du bruit optique

L'un des principaux enjeux, pour optimiser la détection du signal de fluorescence venant du bout de la sonde, est de bien comprendre d'où proviennent les photons indésirables. Le signal de fluorescence est détecté sur le PMT (section 2.5). Le montage était en permanence sous une boîte noire de polyméthacrylate de méthyle (polymère mieux connu sous le nom commercial de « Plexiglas ») pour minimiser la détection des photons ambiants. Le PMT était directement raccordé à un tube isolateur de 1" de diamètre (SM1L30, Thorlabs) par un adaptateur étanche à la lumière. Deux filtres passe-bande (aux longueurs d'onde appropriées aux fluorophores détectés) étaient mis en série (figure 3.5).

Le principal bruit de fond apparaissait lors de l'injection du laser dans la fibre. De cette manière, plusieurs sources de lumière pouvaient ainsi polluer le signal détecté au PMT. La première hypothèse fut d'évaluer l'impact de la lumière excitatrice. Celle-ci pouvait provenir de manière diffuse ou d'une réflexion directe. Selon le montage expérimental utilisé, la lumière qui est hors du spectre d'émission du fluorophore est coupée d'un facteur variant entre 10^{-5} et 10^{-7} par filtrage. Les deux filtres présents devaient donc couper la raie laser d'un facteur 10^{-10} pour la raie à 532nm et d'un facteur 10^{-14} pour les raies 488 et 473nm (figure 3.5). Pour s'assurer que les bruits ne provenaient pas des raies laser d'excitation, deux autres filtres ont été rajoutés en série pour obtenir une transmission de 10^{-20} pour la raie à 532nm et de 10^{-28} pour les raies 488 et 473nm. Ceci éliminait vraisemblablement toute possibilité de détection des photons d'excitation traversant les quatre filtres. Le niveau de bruit détecté avec deux filtres et quatre filtres (532nm), lors de l'injection du laser d'excitation dans la microsonde, s'est avéré le même. Ceci a montré que le bruit détecté ne provenait pas de l'excitation. Ce bruit devait donc provenir des longueurs d'onde comprises dans la bande passante du filtre.

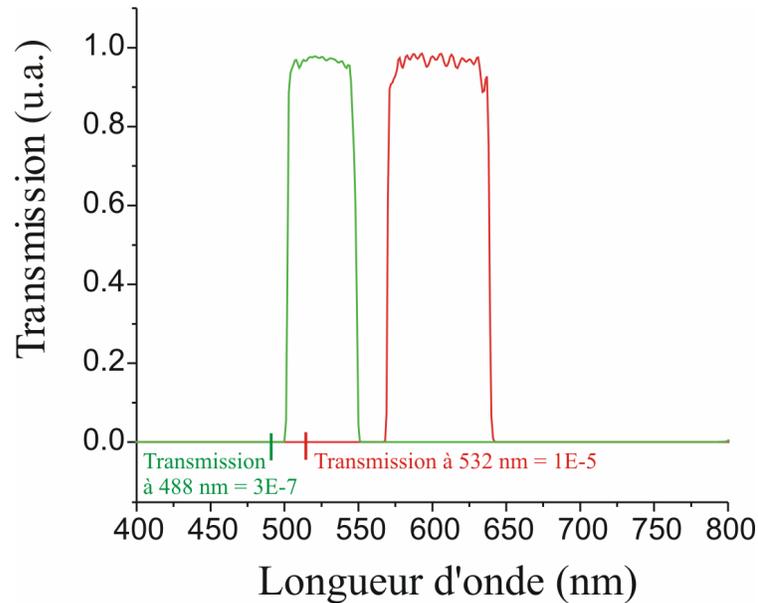


Figure 3.5 Spectres de la transmission des filtres utilisés pour la détection de fluorescence. (Vert) Spectre de la transmission du filtre ET525/50 (Chroma technology) utilisé pour détecter la GFP et couper la raie d'excitation laser à 488 ou 473 nm (la transmission est de 3×10^{-7}). (Rouge) Spectre de la transmission du filtre ET605/70 (Chroma technology) utilisé pour détecter le DiI et pour couper la raie d'excitation laser à 532 nm (la transmission est de 1×10^{-5}). Pour s'assurer de couper au maximum les photons hors bande, deux filtres étaient toujours mis en série.

Si le bruit ne provenait pas de la source d'excitation, il pouvait provenir de la microsonde. Il était possible que l'excitation laser génère de l'autofluorescence ou de la diffusion Raman à l'intérieur de la fibre. Les photons ainsi générés pouvaient être guidés par la fibre de manière rétrograde, puis être détectés par le PMT. Les tests préliminaires ont montré que le bruit détecté par le PMT croissait linéairement en fonction de la puissance d'injection (figure 3.6 A). Encore plus intéressant, il était linéaire en fonction de la longueur de fibre commerciale qui fait la jonction entre la fibre à deux cœurs et le montage optique (figure 3.6 B). Des tests ont aussi montré que l'impact de la jonction optique et de la section de la fibre à deux cœurs est négligeable sur ce bruit.

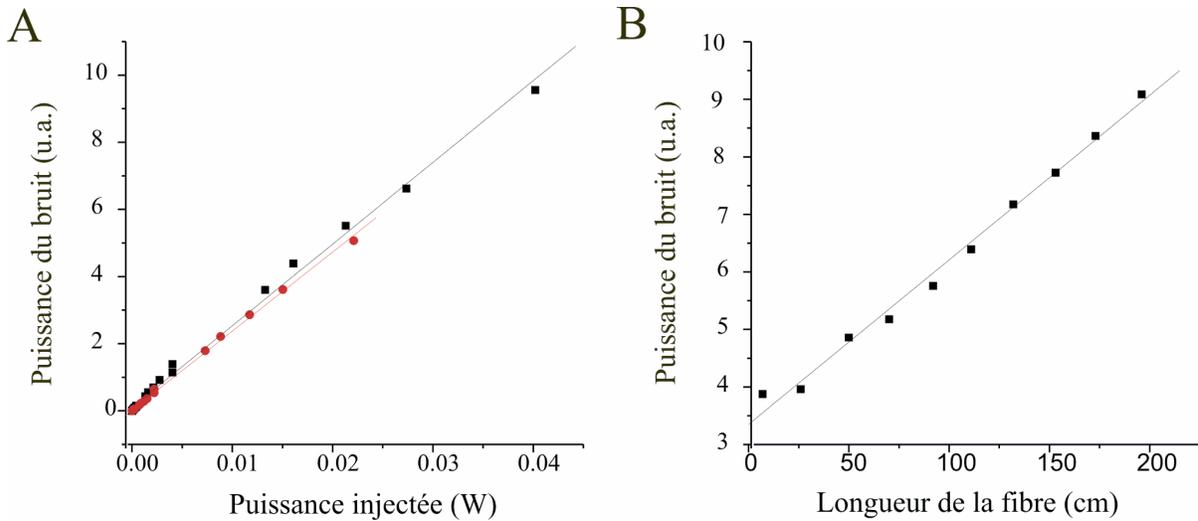


Figure 3.6 Puissances du bruit (signal de base) détecté par le PMT lors de l'injection dans la fibre de jonction constituant la microsonde. **A** Le bruit augmente linéairement plus la puissance injectée dans la fibre est grande. (Carré noir) Bruit lors de l'injection dans 1.87 m de fibre BFH 550 (Thorlabs). (Rond rouge) Bruit lors de l'injection dans 1.87 m de fibre HP5UV600(Oxford electronics). **B** Le bruit augmente linéairement plus la longueur de la fibre injectée augmente. Le bruit est donc directement proportionnel à la longueur de la fibre de jonction.

Afin de décortiquer le bruit optique provenant de la fibre de jonction, il était nécessaire d'analyser le spectre de celui-ci. Pour ce faire, le PMT normalement utilisé pour la détection du signal fut remplacé par un spectromètre (Ocean Optics, USB2000), pour voir l'intensité du bruit en fonction de la longueur d'onde. Comme ce bruit apparaît lors de l'injection, il était aussi nécessaire de regarder l'effet de la position du point d'injection en fonction de la position de l'entrée de la fibre. La position du faisceau d'injection fut donc déplacée par rapport à l'entrée de la fibre tout en enregistrant en parallèle la puissance à la sortie de la fibre, la puissance diffusée par le côté de la fibre et le spectre du bruit qui retourne normalement au PMT (figure 3.7 A-B). Le laser utilisé ici correspond à la source d'excitation utilisée pour la GFP (473 nm). Les résultats montrent que les pertes par diffusion sont maximales sur le bord de la fibre (mauvaise injection; injection dans la gaine) et qu'elles sont minimales lorsque l'injection est au centre de la fibre (bonne injection; puissance de sortie maximale) (figure 3.7 C). Ceci montre une corrélation entre les maxima de bruit et la position du faisceau d'injection par rapport à la fibre.

Maintenant que les maxima de bruit sont connus, comparons les spectres lors du déplacement transversal du faisceau d'injection par rapport à de la surface de la fibre. Le diamètre du faisceau à la surface de la fibre (100 à 200 μm) est 2-5 fois plus petit que celui du cœur optique (550 μm). La figure 3.7 montre la comparaison entre cinq positions du faisceau d'injection. Premièrement, lorsque le faisceau n'injecte pas dans la fibre, le spectre détecté montre uniquement un maximum à 473nm, soit la longueur d'onde d'excitation (figure 3.7 D1). Deuxièmement, lorsque le faisceau s'injecte majoritairement dans la gaine, il y a un maximum de perte par diffusion et on observe l'apparition d'un renflement de signal entre 500 et 650 nm (figure 3.7 D2). Cette plage de signal superpose entièrement la bande passante des filtres utilisés pour détecter la fluorescence. Ce signal est donc normalement détecté par la PMT. Il constitue ainsi une source directe de bruit. Troisièmement, lorsque le faisceau est bien centré sur la surface de la fibre, il y a un minimum des pertes par diffusion et il y a beaucoup moins de signal entre 500 et 650 nm (figure 3.7 D3). Quatrièmement, lorsque le faisceau repasse par un maximum de perte par diffusion, il y a un autre maximum de signal entre 500 et 650 nm (figure 3.7 D4). Et cinquièmement, lorsque le faisceau n'injecte plus dans la fibre, il y a disparition du renflement de signal entre 500 et 650 nm (figure 3.7 D5). Ceci confirme que le signal de bruit ne provient pas d'une interaction avec la férule métallique servant de support pour l'injection. Cette expérience montre donc qu'il y a une corrélation entre les pertes par diffusion et l'intensité du signal de bruit détectable dans la bande passante des filtres utilisés lors de la détection de fluorescence. Cependant, lorsque l'injection est bien centrée, il y a un maximum du signal transmis tout en montrant un minimum de bruit généré par la fibre, ce qui offre une fenêtre optimale pour la détection de fluorescence par la microsonde.

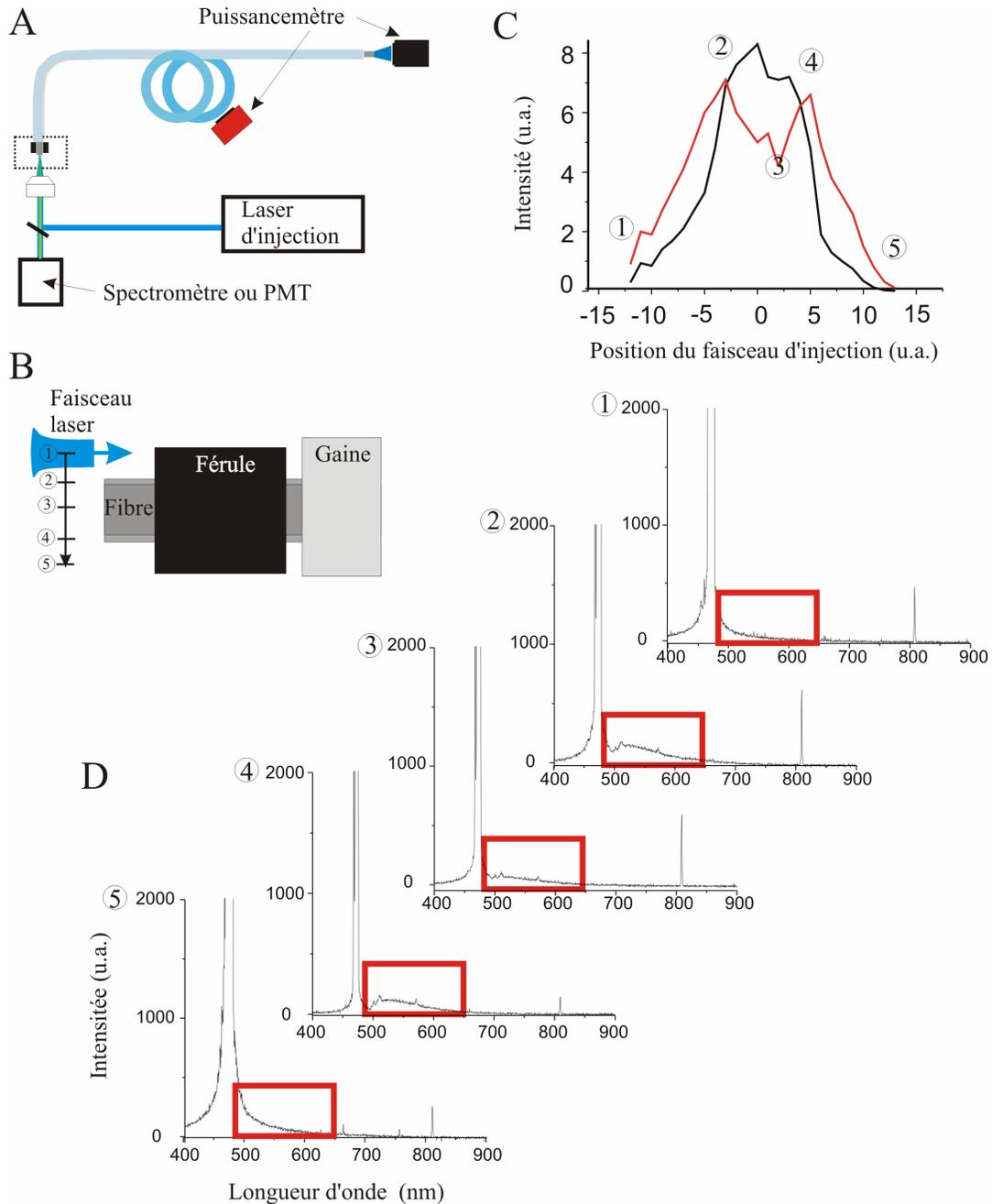


Figure 3.7 Bruit optique **A** Montage de l'injection dans une microsonde. Seule la fibre de jonction est illuminée par le laser d'excitation. Un spectromètre remplace le PMT pour analyser le spectre du bruit provenant de la fibre de jonction. Les puissances, diffusées par le côté et à la sortie de la fibre sont aussi enregistrées. **B** Position du faisceau d'injection en fonction de l'entrée de la fibre. Les positions 1 à 5 indiquent la position estimée du faisceau d'injection. **C** Intensité de la puissance diffusée par le côté (rouge) et de sortie (noir) de la fibre en fonction de la position relative du faisceau d'injection. On y remarque un maximum de la puissance de sortie lorsque le faisceau est au centre et un maximum de pertes en diffusion lorsque le faisceau d'injection est dans la gaine. **D** Les spectres en fonction de la longueur d'onde du signal de bruit détecté. (Encadré rouge) Il y a un maximum de signal de bruit lorsque l'injection est dans la gaine et un minimum lorsque l'injection est au centre de la fibre. Ce qui concorde avec le signal de perte en diffusion. La position centrale du faisceau optimise le ratio signal de sortie par rapport à l'amplitude bruit détecté.

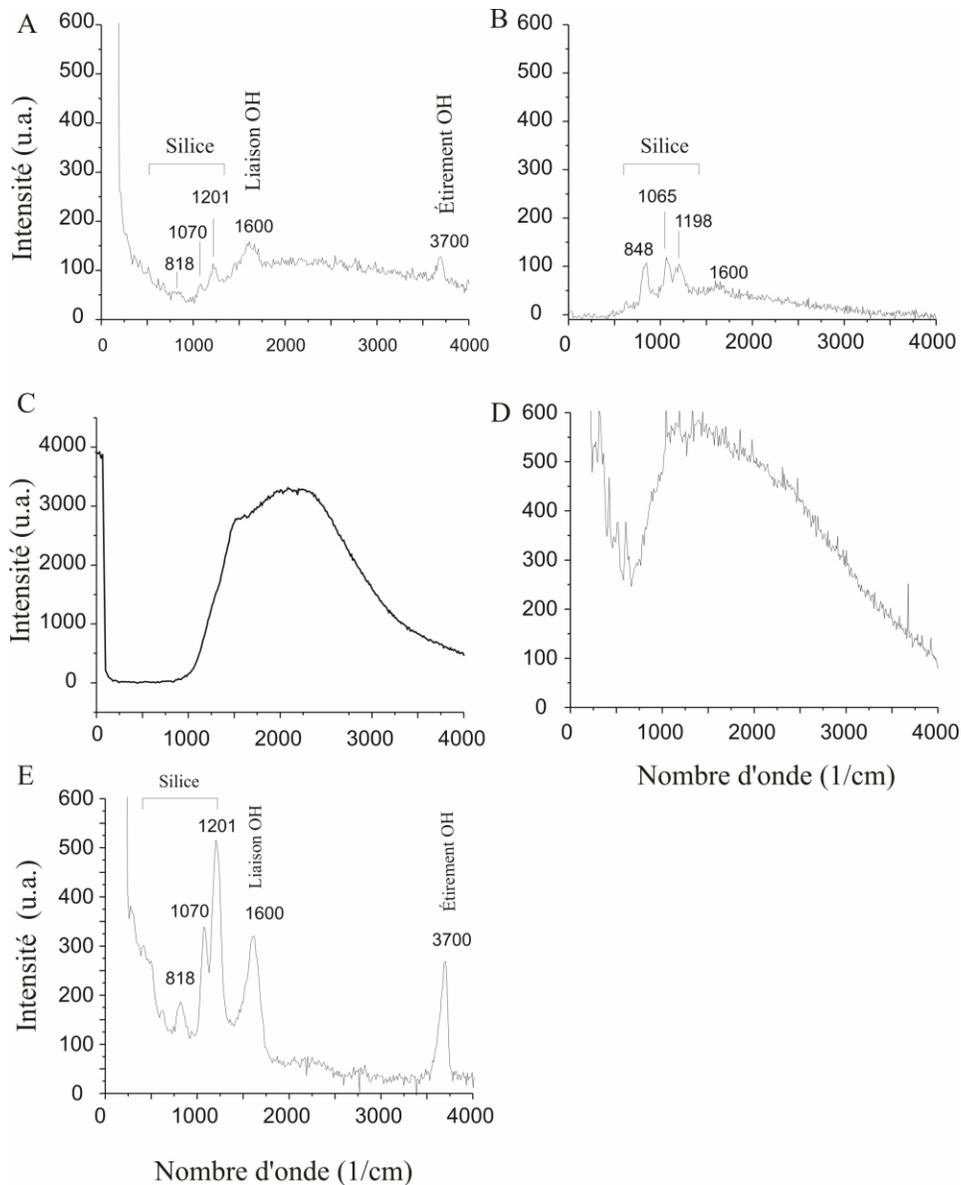


Figure 3.8 Spectres de signaux de bruit optique **A** Signal provenant de la fibre (BFH 550, Thorlabs) lors d'une excitation à 473nm. **B** Signal provenant de la fibre (BFH 550, Thorlabs) lors d'une excitation à 532 nm. Le signal présent est celui traversant le filtre normalement utilisé pour la collection de fluorescence; il n'y a pas de signal provenant du laser d'excitation. **C** Signal provenant uniquement du recouvrement de plastique de la fibre de Thorlabs (Tefzel) lors d'une excitation à 473 nm. **D** Signal provenant uniquement du recouvrement de plastique de la fibre de Thorlabs (Tefzel) lors d'une excitation à 532 nm. **E** Signal provenant de la fibre à gaine de cuivre (HP5UV600, Oxford electronics) lors d'une excitation à 473 nm. La fibre BFH 550 a un bruit composé de fluorescence et de pic Raman. La fibre HP5UV600 a un bruit composé principalement de pics Raman. La présence élevée de fluorescence dans le signal provenant de la fibre BFH 550 est explicable dû à la fluorescence générée par le recouvrement de plastique Tefzel.

Les propriétés spectrales du bruit détecté dans la fenêtre de détection normalement utilisée pour la détection de fluorescence ont été étudiées. Deux types de signaux sont principalement susceptibles d'apparaître dans cette fenêtre lors de l'injection à faible puissance dans une fibre optique : de l'autofluorescence ⁹ et de la diffusion Raman ¹⁴⁵. L'autofluorescence génère généralement un spectre large et étendu ayant un décalage vers les basses fréquences (moins énergétiques). Quant à la diffusion Raman ¹⁴⁶, elle produit des pics de signal qui proviennent de l'interaction avec les modes rotationnels et vibrationnels des molécules présentes dans le milieu. Cette interaction non linéaire est de faible efficacité (10^{-6}). Pour qu'une molécule soit activable de manière Raman, l'interaction avec les modes de vibration ou de rotation moléculaire doit pouvoir changer la polarisabilité de la molécule, c'est-à-dire changer la prédisposition d'une molécule à se polariser. La diffusion Raman peut générer un décalage vers les basses fréquences lorsqu'un photon transfère de l'énergie à la molécule (décalage de Stokes) ou un décalage vers les hautes fréquences lorsque la molécule transfère de l'énergie au photon (décalage anti-Stokes). La signature du signal Raman est une série de pics pouvant être corrélés avec certains modes de mouvements moléculaires. Dans une fibre optique, les molécules les plus susceptibles de générer un signal Raman sont la silice, l'eau (provenant des défauts de fabrication) et les composantes additionnées au verre comme du germanium ou du fluor par exemple. Il est aussi possible de stimuler de la diffusion Raman en excitant le revêtement de la fibre par les modes de gaines.

Dans le cas présent, nous avons comparé deux types de fibres de jonction : une fibre avec un revêtement de plastique (BFH 550, Thorlabs) et une fibre avec un revêtement de cuivre (HP5UV600, Oxford electronics). Pour bien analyser le signal, celui-ci est représenté en décalage du nombre d'onde par rapport au signal d'excitation, ce qui normalise le décalage Raman en fonction de l'excitation. Le contenu spectral du bruit généré par ces deux fibres s'est révélé différent. Le spectre du bruit dans la zone d'intérêt de la fibre à revêtement de plastique était constitué d'un renflement continu de signal ayant quelques maxima (aux alentours de 830, 1070, 1200, 1600 et 3700 cm^{-1}) (Figure 3.8 A et B). Le renflement est typique d'un signal de fluorescence⁹. En plus, il correspond directement à la fluorescence générée par le plastique qui recouvre la fibre (figure 3.8 D) et il est plus intense lorsque l'injection est faite dans la gaine (figure 3.7-1 D). Ceci porte fortement à croire que ce renflement de bruit est dû à l'autofluorescence provenant du revêtement de plastique Tefzel. Quant aux maxima en forme de pics, ils sont typiques d'un signal Raman. Cette dernière hypothèse se renforce avec le fait que les maxima enregistrés correspondent aux modes Raman provenant de la silice et de l'eau^{145,147,148}. De plus, ces mêmes pics sont

présents aux deux longueurs d'onde d'excitations utilisées (figure 3.8 A et B). Quant à la fibre à revêtement de cuivre, les mêmes pics Raman sont présents, mais il y a peu ou pas de renflement associé à la fluorescence, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle la fluorescence de la fibre BFH 550 proviendrait du revêtement de plastique.

En résumé, le signal de bruit provient de la fibre de jonction reliant la fibre à deux cœurs et le montage optique. Celui-ci est proportionnel à la puissance injectée et à la longueur de la fibre. Ce bruit est apparu dans la même fenêtre de détection que le signal de fluorescence recherché. Il est composé de fluorescence, provenant de la gaine de plastique de la fibre de jonction, et de diffusion Raman, provenant de la silice et de l'eau comprise dans la fibre. Il est possible de minimiser ce bruit en injectant directement dans le cœur de la fibre de jonction et dans ce cas, le niveau de bruit est similaire entre une fibre de jonction à gaine de plastique et une à gaine de cuivre.

3.2 DÉTECTION OPTIQUE IN VITRO

Les enregistrements optiques *in vitro* ont été réalisés afin de caractériser les propriétés de détection de la microsonde. Premièrement, il fallait montrer qu'il était possible de détecter un neurone fluorescent, puis il fallait quantifier les profils de résolution transverse et axiale lors de leur détection. Il était primordial d'effectuer ces expériences *in vitro* afin d'avoir un contrôle visuel sur les enregistrements. Cette sous-section présente les différentes étapes de cette caractérisation en montrant la détection de microbilles, de neurones en cultures et de neurones provenant de tranches cérébrales de rat (deux types de marquage *in vivo*; Annexe A).

3.2.1 Preuve de concept *in vitro*

Pour obtenir une preuve de concept, il fallait premièrement démontrer que le système de détection couplé avec la microsonde était capable de résoudre spatialement un objet de l'ordre de la dizaine de micromètres. Par la suite, il fallait s'assurer que le système possédait assez de sensibilité pour détecter la fluorescence provenant d'une source biologique (un neurone fluorescent).

Il était important d'arriver à détecter une source fluorescente de l'ordre de grandeur du corps cellulaire d'un neurone (10-20 μm). Des microbilles fluorescentes (FluoSphere, absorption maximale à 454 nm et émission maximale à 492 nm, 15 μm de diamètre,

Molecular probe) offraient une source permettant de démontrer que la microsonde possède assez de résolution spatiale pour détecter séparément ces microbilles côte à côte. Elles ont les avantages suivants : elles sont une source aux propriétés optiques uniformes et stables, elles sont aisément manipulables (non-vivant) et leurs fluorescence est très intense. La solution commerciale de microbille était mélangée dans un rapport de 1 pour 4 avec une solution de gélatine (0.55 g de poudre de gélatine (D-2625 type A ,Sigma) /10 ml d'eau) pour obtenir la densité souhaitée. Cette solution était déposée sur une lamelle, puis placée sous un microscope à épi-fluorescence (Axioscop, Zeiss). Cette solution permettait d'obtenir un milieu qui laisse la sonde se déplacer facilement tout en gardant les billes fixes. Ce protocole a permis d'initier la caractérisation des propriétés de détection de la microsonde. À l'aide du montage et de la microsonde décrite au chapitre 2 (figure 2.10B et 2.13), il fut rapidement possible de détecter des microbilles et de montrer qu'il était possible de résoudre spatialement trois billes alignées. La figure 3.9B montre la détection de trois billes successives dont la distance sonde-bille varie entre 2 et 13 μm , ce qui fait varier l'intensité de détection et la largeur de la détection transverse; les deux premières billes ont une largeur à mi-hauteur de 15 et 16 μm , tandis que la troisième (détectée à environ 13 μm) est perçue comme plus large (18 μm). Cette variation de la résolution transverse est prévisible et traitée numériquement à la section 3.3. Les microbilles ont aussi permis d'établir les premiers profils de détection axial (figure 3.9 C-D). Les résultats montrent que la distance axiale, pour que l'intensité passe de 90% à 10%, augmente avec le diamètre de la sonde (figure 3.9 D). Ce qui est probablement dû à l'augmentation de la surface de collection. Donc, les microbilles ont permis de montrer qu'une microsonde de 10 μm de diamètre et le système de détection utilisé permet de résoudre spatialement des sources de l'ordre de grandeur des corps cellulaires de neurones.

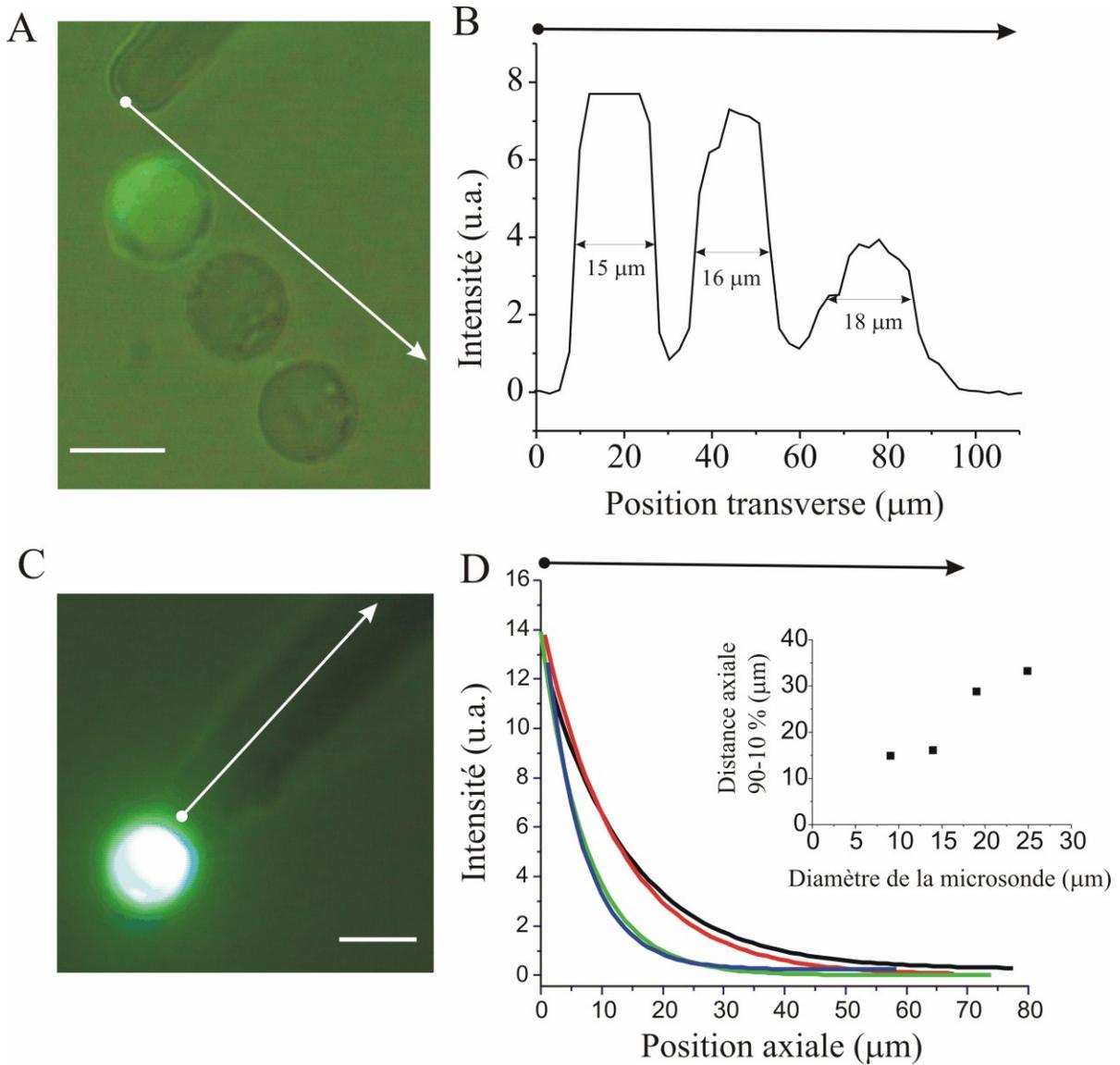


Figure 3.9 Résolutions spatiales de la microsonde avec des microbilles fluorescentes. **A** Photographie montrant la pointe d'une microsonde devant une série de trois microbilles fluorescentes (Fluosphere, Moléculaire probe). La microsonde est déplacée transversalement selon l'axe représenté par une flèche blanche. Barre d'échelle de 15 μm . **B** Enregistrement de la fluorescence détectée lors du déplacement décrit en A. Il est clairement possible de résoudre spatialement les trois microbilles. **C** Photographie montrant une microbille excitée par la lumière (473 nm) provenant d'une microsonde. La microsonde est déplacée axialement selon la flèche blanche. Barre d'échelle de 15 μm . **D** Enregistrement de la fluorescence détectée lors du déplacement axial de 4 microsondes de différents diamètres (bleu : 9 μm , vert : 14 μm , rouge : 19 μm , noir : 25 μm). Le graphique en haut à droite met en évidence la distance à laquelle la sonde doit se déplacer pour passer de 90 à 10% du signal détecté, en fonction du diamètre de la sonde utilisée. Plus le diamètre est large, plus cette distance est élevée.

3.2.2 Détection de neurones en culture

L'étape suivante était de montrer que le système avait assez de sensibilité pour détecter de la fluorescence provenant d'un neurone marqué d'un agent fluorescent. Cette étape était primordiale afin de démontrer qu'il est possible d'enregistrer un seul neurone lors de futurs enregistrements *in vivo*. La détection de neurones en culture fut premièrement choisie pour tester le tout. En collaborant avec le laboratoire du Pr. Paul De Koninck, il s'agissait d'une méthode relativement facile d'accès et qui était bien maîtrisée. Avec l'aide de Francine Nault, nous avons fait des transfections de EGFP à l'intérieur de neurones en culture. Ce procédé consiste à introduire de l'ADN encodant EGFP dans des neurones non fluorescents pour que ceux-ci produisent des protéines EGFP¹⁴⁹. Lorsque les neurones sont fluorescents ils sont posés sous le microscope dans une solution physiologique (ACSF, Annexe B) permettant la survie de ceux-ci. Par la suite, la microsonde fut déplacée axialement devant le neurone afin de le détecter (figure 3.10). Cette expérience a permis de montrer que la microsonde et le système optique étaient assez sensibles pour détecter un neurone marqué et vivant dans des conditions physiologiques. Le ratio signal sur bruit était entre 15 et 30. Étant donné que le but de la microsonde était d'enregistrer des neurones directement dans un animal vivant et que les diverses techniques de marquage *in vivo* utilisent des procédés différents pour marquer les neurones, il fallait voir par la suite si la sonde était assez sensible pour détecter ces types de marquage.

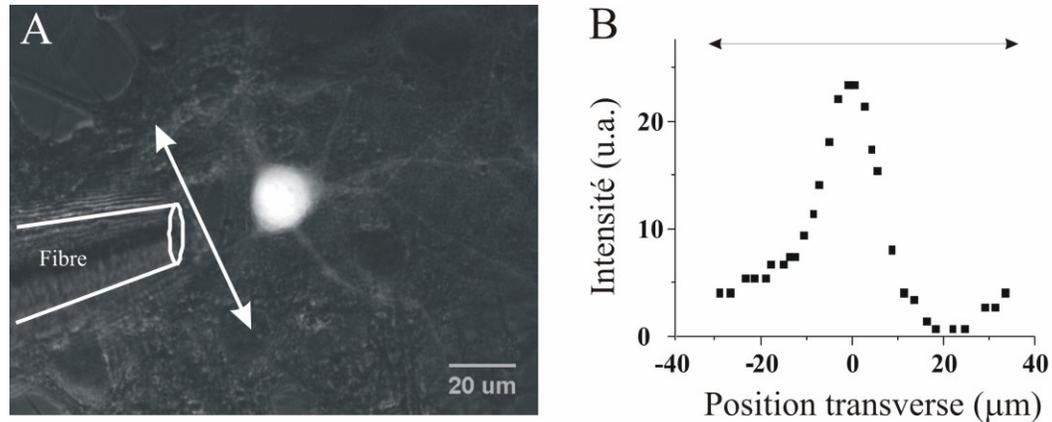


Figure 3.10 Détection par la microsonde de la fluorescence provenant d'un neurone en culture. **A** Photographie d'un neurone fluorescent transfecté avec de la EGFP. La flèche blanche montre l'axe transverse. **B** Exemple de détection de fluorescence par une microsonde (pointe de 20 µm) lors d'un déplacement transverse au neurone. Il y a une augmentation claire de la fluorescence lorsque la pointe passe devant le neurone, ce qui montre que le système est assez sensible pour détecter de la fluorescence provenant de neurones.

3.2.3 Détection de neurones en tranches

L'étape suivante était de montrer qu'il est possible de détecter des neurones dans des conditions similaires à celle retrouvées *in vivo*. Pour ce faire, nous avons utilisé des neurones marqués *in vivo*, mais ils ont été enregistrés *in vitro*, en utilisant des tranches cérébral de rat (annexe B). De cette manière, les conditions de fluorescence étaient directement comparables à celles retrouvées *in vivo*, mais nous pouvions caractériser les enregistrements à l'aide d'un support visuel indépendant. Les principales mesures ont été faites sur deux types de tranches de cerveaux (annexe B): des tranches de neurones marqués rétrogradement par du Dil (annexe C.1) et des tranches de neurones génétiquement modifiées pour exprimer de la EGFP (annexe C.2). Les conditions de marquage fluorescent *in vivo* étaient similaires à celles en culture, ce qui nous a rapidement permis de détecter des neurones en tranches (figure 3.11). Par la suite, nous avons caractérisé les propriétés de détection de la microsonde pour des neurones comparables à ceux retrouvés *in vivo*.

Les tranches furent observées sous un microscope par épi-fluorescence pour localiser les cellules marquées. Puis, la source externe de fluorescence fut fermée avant de placer la sonde près des cellules d'intérêts. Pour caractériser la résolution spatiale transverse, la microsonde était déplacée transversalement pour enregistrer le signal en trois positions 1-au

côté de ou des cellules (signal de base), 2-devant celles-ci et 3- de l'autre côté de ou des cellules. L'exemple de déplacement transversal présenté ici montre une série de 3 neurones côte à côte (figure 3.11A-B). La sonde fut déplacée transversalement et le signal détecté montre que la sonde a suffisamment de résolution transverse pour détecter distinctement des neurones adjacents.

Il est d'autant plus important de montrer que la microsonde possède assez de résolution axiale, car les déplacements *in vivo* sont faits selon cet axe. Il a donc fallu caractériser l'approche d'un neurone par la sonde. Des cellules fluorescentes marquées par GFP ont été enregistrées lors du déplacement axial de la sonde. Nous avons mesuré la distance à laquelle l'intensité de fluorescence détectée augmentait de 10% à 90% (figure 3.11C-D) du signal maximum, ce que nous appellerons la distance de détection optique. En utilisant une sonde de 9 μm de diamètre et des corps cellulaires de $10 \pm 2 \mu\text{m}$ de diamètre, la distance de détection optique était de $18 \pm 4 \mu\text{m}$ (n=6 cellules). Bien que les maxima d'intensité varient de cellule en cellule, la distance de détection optique reste constante et était indépendante de la puissance d'excitation, selon des mesures faites sur la même cellule en variant la puissance d'excitation (figure 3.11D). Nous avons aussi effectué une détection axiale de deux cellules situées l'une derrière l'autre afin de montrer que chacune d'elles étaient détectée de manière indépendante et que la première cellule n'était plus détectée significativement lorsque la sonde passe au-delà de celle-ci (figure 3.12). Le ratio signal sur bruit lors des détections en tranche était d'environ 20 pour 1. En conséquence, la distance de détection optique peut servir comme critère de détection afin d'identifier une seule cellule dans un tissu.

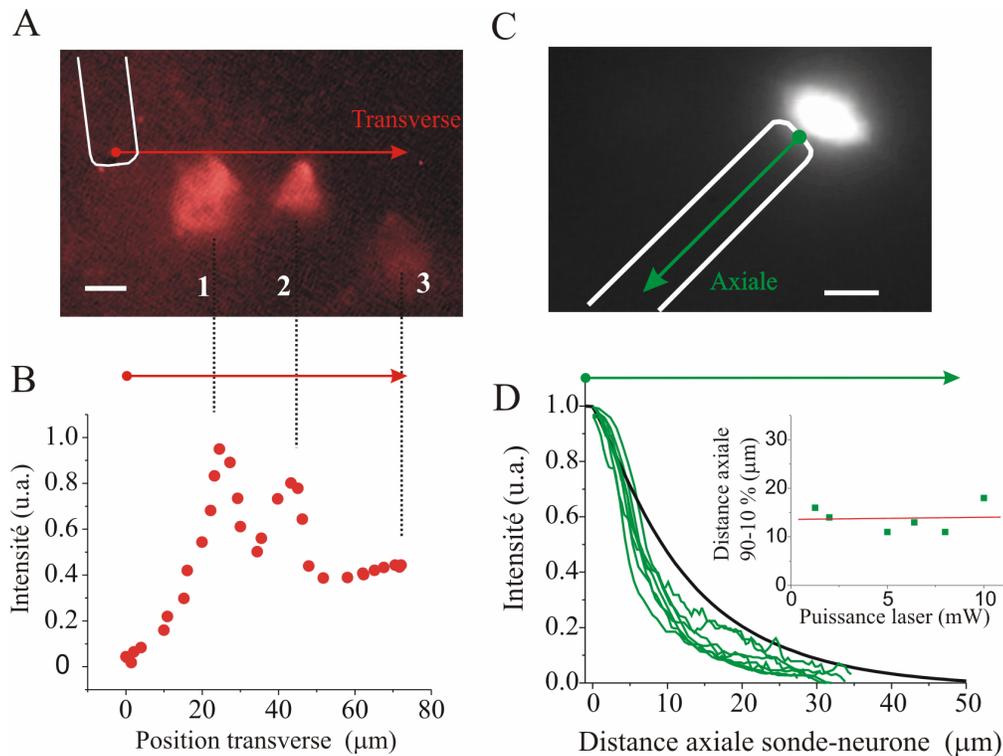


Figure 3.11 Caractérisation de la détection de fluorescence en tranche **A** Photographie de trois neurones fluorescents marqués au DiI dans une tranche vivante de cerveau de rat. Les neurones sont identifiés par des chiffres de 1 à 3. Le contour de la microsonde est mis en évidence par un trait blanc et les axes de déplacement de la fibre sont représentés par des flèches : rouge pour le déplacement transverse et bleu pour celui axial. La barre d'échelle est de 10 μm . **B** Graphique montrant la variation de fluorescence détectée par la microsonde lors du déplacement transverse décrit en A. Il est clairement possible de résoudre spatialement les deux premiers neurones. Le troisième neurone n'est pas bien détecté, car il n'est pas dans le même plan que le bout de la sonde. **C** Photographie d'un neurone marqué à la GFP provenant d'une tranche du néocortex d'une souris GAD-GFP+. Ce neurone est excité par l'illumination à 488 nm provenant d'une microsonde (mise en évidence par un trait blanc, diamètre de pointe 9 μm). Le déplacement axial de la microsonde est indiqué par une flèche verte. **D** Enregistrement de la fluorescence détectée (vert) lors du déplacement axial de la microsonde devant 6 neurones différents (le diamètre moyen des corps cellulaires était de $10 \pm 2 \mu\text{m}$). La décroissance de l'intensité est similaire et elle concorde avec les simulations numériques (noir) réalisées (section 3.3). Le graphique en haut à droite montre qu'il n'y a pas de lien entre la distance de détection de fluorescence entre 90-10% ($14 \pm 3 \mu\text{m}$) en fonction de la puissance d'excitation.

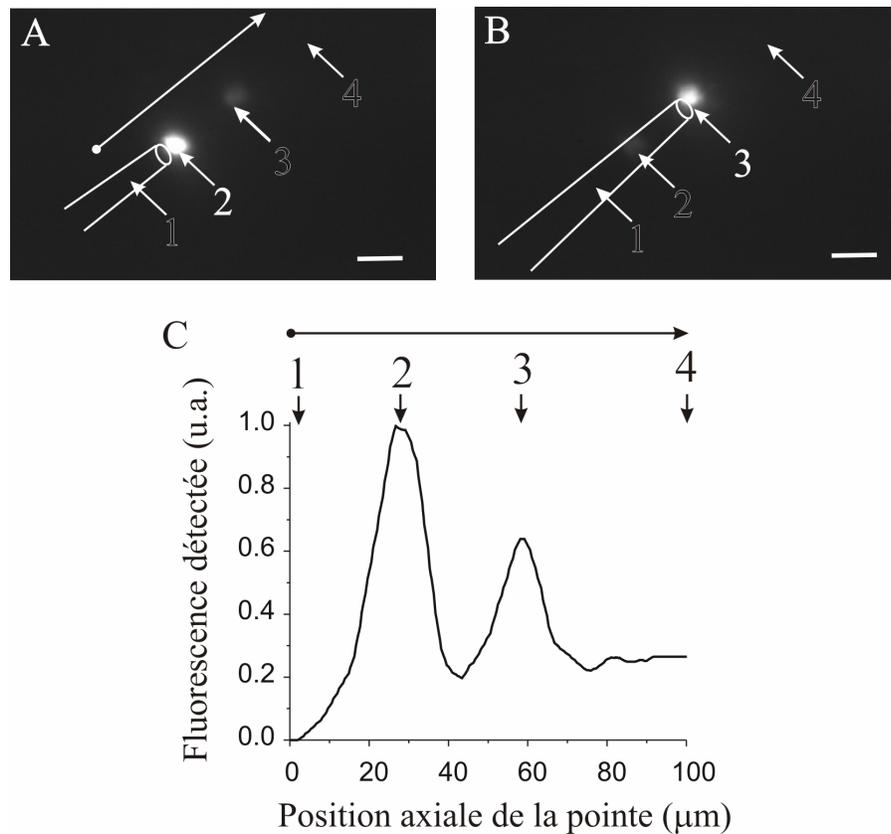


Figure 3.12 Détections axiales doubles en tranche **A-B** Photographie de deux neurones du cortex de souris GAD65-GFP+ alignés axialement. La microsonde est déplacée du point 1 au point 4. **C** Graphique montrant l'intensité de fluorescence détectée par la microsonde en fonction de sa position. Les deux neurones sont clairement indépendamment résolus par la microsonde.

Les résultats de cette sous-section montrent qu'il est possible de détecter *in vitro* la fluorescence provenant de microbilles, de neurones en culture et de neurones en tranches cérébrales. Ils montrent aussi que les résolutions transverse et axiale sont suffisantes pour détecter un seul neurone avec un ratio signal sur bruit important.

3.3 SIMULATION NUMÉRIQUE DE LA DÉTECTION OPTIQUE

Le modèle numérique présenté ici simule la détection optique d'un neurone fluorescent à l'aide de la microsonde. Il modélise l'excitation de la fluorescence lorsqu'un neurone est situé face à la pointe de la sonde. Par la suite, il calcule la quantité de fluorescence qui est récoltée par la microsonde. Cette quantité varie en fonction de la position de la microsonde par rapport au neurone. Il devient donc possible d'approximer la dynamique d'excitation-collection lors d'une approche axiale de la microsonde ou encore lors d'un passage transverse.

3.3.1 Objectifs

L'objectif premier de simuler numériquement l'illumination et la collection de la fibre était d'approximer le volume de détection d'une microsonde pour mieux comprendre la portée des enregistrements optiques. En second lieu, ce type de modèle permet d'évaluer l'impact de différents paramètres (c.-à-d. le diamètre du neurone, le diamètre de la fibre, l'ouverture numérique de la fibre) sur la dynamique de détection. Ce modèle nous permet aussi de comparer les résultats expérimentaux avec des prévisions théoriques.

3.3.2 Paramètres du modèle

Voici les six principaux éléments constituant le cadre paramétrique dans lequel les simulations ont été faites :

1- Nous supposons que la lumière est se propage seulement dans le cœur optique et non dans le reste de la fibre. Cette supposition est basée sur le fait que les pertes de lumière sont beaucoup plus grandes dans les modes de gaines que dans les modes de cœurs. Il est à noter que l'illumination expérimentale à la sortie de la fibre est plus large, car il semble y avoir une quantité de lumière guidée par la gaine à la sortie de la fibre (figure 3.4C). Cependant, la collection de la lumière devrait être restreinte seulement au cœur optique, car les pertes sont élevées dans la gaine. De plus, la fibre de jonction a un diamètre équivalent au cœur optique et est normalement directement alignée sur ce dernier, ce qui minimise considérablement les apports des modes de gaines.

2- La propagation de la lumière a été faite à l'aide de l'optique géométrique. Ce paradigme fut choisi pour sa relative simplicité.

3- Le modèle fait l'hypothèse que les mesures *in vivo* sont faites dans la matière grise (chapitre 1.1.1) et prend en compte les caractéristiques optiques qui y sont associées ¹⁰⁷. L'indice de réfraction de la matière grise fut considéré comme étant égal à 1.36 ¹⁰⁷. Dans le cas présent, les propriétés optiques de la matière grise permettent de négliger la diffusion et l'absorption de la lumière, car les coefficients d'absorption ($\mu_a = 0.4-0.5$ [1/cm]; 500 nm) et de diffusion ($63 < \mu_d < 109$ [1/cm]; 500 nm) sont relativement faibles par rapport aux distances en jeu dans les simulations.

En absorption, le libre parcours moyen ($l_a \approx 2-2.5$ cm) est de plus de deux à trois ordres de grandeur comparé aux distances impliquées dans le modèle (< 0.01 cm), ce qui permet de négliger l'impact de l'absorption.

$$l_a = 1/\mu_a \quad (3.1)$$

En diffusion, le libre parcours moyen réduit des photons ($l_d' = 0.76$ mm) est d'environ un ordre de grandeur plus grand que les distances impliquées dans le modèle. Le libre parcours moyen réduit est basé sur le coefficient de diffusion réduit μ_d' qui tient compte des propriétés anisotropes de la diffusion dans certains milieux.

$$l_d' = 1/\mu_d' \quad (3.2)$$

$$\mu_d' = (1-g)\mu_d \quad (3.3)$$

où g est le cosinus moyen de diffusion (une mesure de la répartition de la diffusion dans la direction de propagation suite à une collision); $g = 0.88$ pour la matière grise ¹⁰⁷. Afin de tenir compte des effets combinés de l'absorption et de la diffusion, le libre parcours moyen effectif de la matière grise (l_t') est de 0.74 mm :

$$l_t' = 1/\mu_t' \quad (3.4)$$

$$\mu_t' = \mu_a + (1-g)\mu_d \quad (3.5)$$

Donc, le libre parcours moyen effectif de la matière grise est d'un ordre de grandeur plus grand que les distances simulées dans le modèle, ce qui permet de négliger l'impact de l'absorption et de la diffusion.

4- Le marquage fluorescent est considéré comme réparti uniformément dans la cellule. Cette approximation est particulièrement valable pour les marqueurs fluorescents libres dans le milieu intracellulaire. L'absorption des fluorophores est négligée lors de l'illumination à travers le neurone; le modèle considère que la partie la plus éloignée du neurone est excitée avec la même puissance que la partie la plus rapprochée.

5- Le cœur optique est modélisé comme une surface 2D et le neurone comme une série de surface 2D de différents diamètres qui sont parallèlement alignés sur l'axe optique pour former une sphère (figure 3.13A).

6- Le modèle simule seulement la détection optique lorsque la fibre se trouve devant le neurone. Il ne modélise pas la détection lorsque la sonde entre en contact avec le neurone, car cette interaction entre le tissu biologique et la pointe fut considérée trop imprévisible pour tenter de l'approximer.

3.3.3 Dynamique de la modélisation

Voici une description des étapes effectuées par le modèle pour calculer la fluorescence excitée par la microsonde et celle collectée par le cœur optique.

L'excitation du neurone est faite de la manière suivante. Premièrement, la puissance à la sortie du cœur optique est représentée sur une surface par une image où chaque pixel possède sa puissance (figure 3.13 B). La distribution de l'intensité est de type gaussienne sur la surface. Chaque pixel possède aussi son ouverture numérique locale qui est calculée en fonction de l'indice de réfraction local (au pixel) et de celui de la gaine (figure 3.13 C). Par la suite, chaque pixel est considéré comme une source illuminant devant lui. La zone d'illumination est déterminée par un cône d'acceptance qui est proportionnel à son ouverture numérique associée. Lors de l'illumination, la puissance initiale de chaque pixel est répartie sur la surface d'illumination définie par le cône (figure 3.13 D). Donc plus l'illumination est propagée sur une longue distance, plus l'aire d'illumination est grande, et plus l'intensité locale est faible (la puissance totale est conservée). Pour chaque pixel du cœur, le modèle calcule la projection de la surface d'illumination sur une coupe donnée de

neurone. Cette projection est fonction de la position relative entre le pixel et la coupe du neurone (en x et y sur le plan transverse et en z sur l'axe optique). Le modèle calcule ensuite l'intensité d'illumination reçue par chaque pixel neuronal (figure 3.13 D-E). Ainsi, pour chaque coupe de neurone, le modèle calcule l'illumination de tous les pixels du cœur et enregistre leurs contributions totales. Il est ainsi possible d'obtenir une image représentant l'excitation de chaque coupe de neurone (figure 3.13 E).

La collection de la fluorescence se calcule d'une manière similaire. Chaque pixel neuronal est considéré comme une source de fluorescence isotropique⁹ ayant une puissance proportionnelle à son excitation locale (figure 3.13 F). Pour chacun des pixels neuronaux, le modèle calcule la portion de lumière injectable dans le cœur optique; cette portion est définie par le cône d'acceptance de la fibre défini par l'ouverture numérique (O.N.=0.22). Par la suite, le modèle compare spatialement la position de la portion de fluorescence injectable avec la surface du cœur optique. Il est ainsi possible de calculer la section efficace entre la surface injectable et la surface du cœur optique. De cette manière, le modèle calcule la puissance injectée dans le cœur pour chaque pixel neuronal afin d'obtenir la puissance totale collectée par la sonde.

Donc pour obtenir le champ d'excitation-collection de la microsonde face à un neurone, il suffit de déplacer la position de la microsonde par rapport au neurone et de calculer la puissance collectée (Figure 3.14).

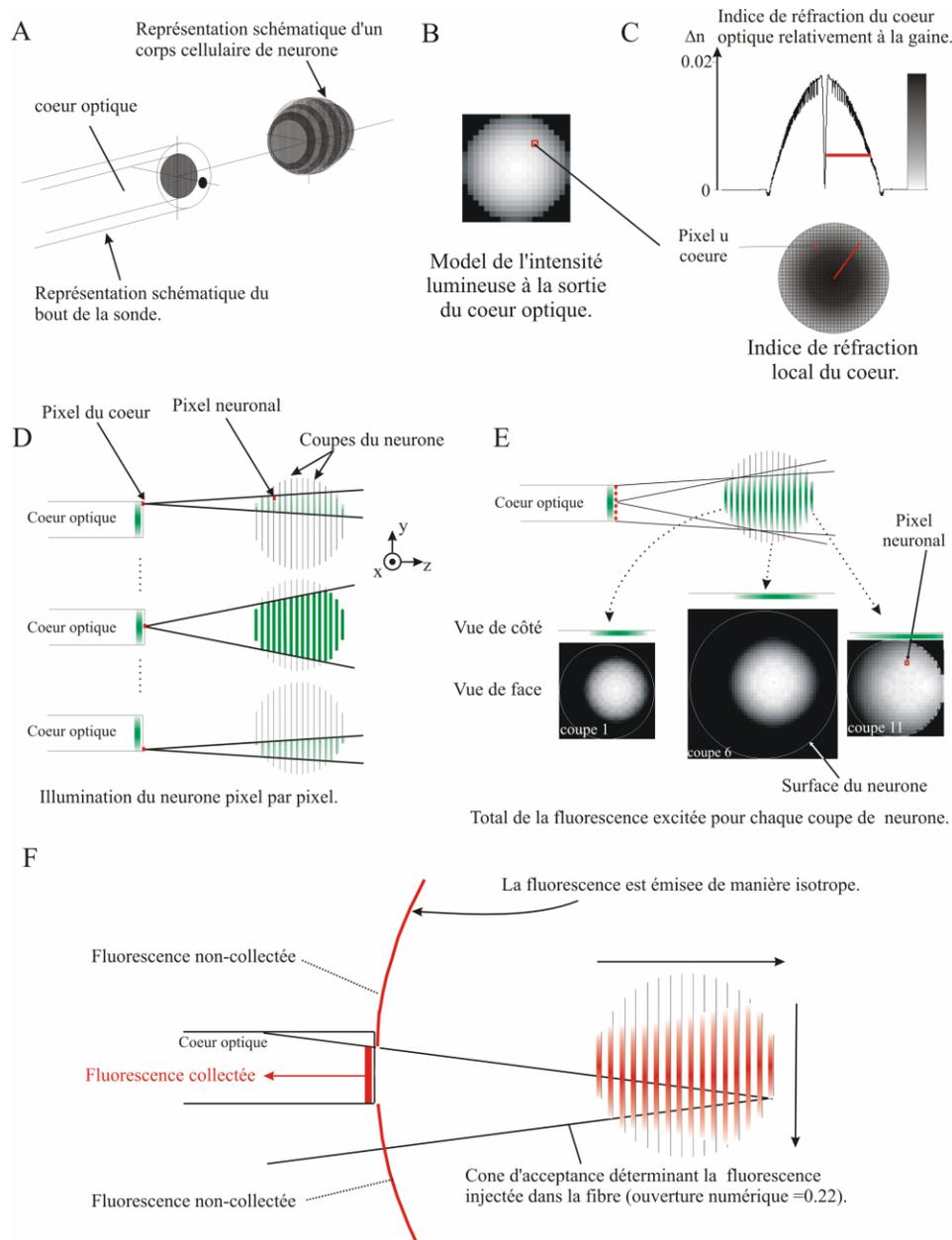


Figure 3.13 Modèle numérique de la détection optique. **A** Représentation schématique du modèle en 3D. La pointe de la sonde est illustrée en face d'un neurone modélisé en sphère. **B** Simulation de l'intensité lumineuse à la sortie du cœur optique. Un profil gaussien établit l'intensité de chaque pixel (grosseur des pixels = 0.25 μm). **C** Profil de réfraction du cœur optique. L'indice local (pour chaque pixel) définit une ouverture numérique afin de déterminer l'angle d'illumination de chaque pixel. **D** Représentation schématique du procédé d'illumination d'un neurone, illustré pour trois pixels. Chaque pixel du cœur optique agit comme une source ponctuelle directionnelle. La puissance de cette source est déterminée en B et l'angle d'illumination est déterminé par l'ouverture numérique en C. **E** Intensité de l'excitation de fluorescence résultant de l'illumination faite par tous les pixels du cœur. Les images montrent trois coupes d'un neurone illuminé. **F** Pour calculer la fluorescence collectée par la fibre, chaque pixel du neurone a été considéré comme une source isotrope de fluorescence ayant une puissance proportionnelle à son excitation locale. Lors de la collection, seule la lumière arrivant dans le cône d'acceptance de la fibre (O.N. = 0.22) est considérée comme injectée dans le cœur optique. Pour calculer les variations de signal détecté en fonction des déplacements transverses et axiaux, la séquence présentée en D, E & F est répétée pour chaque position relative (entre de la sonde et le neurone).

3.3.4 Modélisation du champ de détection optique

Le modèle permet d'évaluer le champ de détection de la fluorescence provenant d'un neurone lorsque l'excitation et la collection se font par la microsonde (figure 3.14). Afin d'obtenir des champs de détection reflétant les résultats *in vivo*, nous avons modélisé les deux principales conditions expérimentales : la détection des neurones du réticulaire thalamique et ceux du faisceau spinothalamique. Ces deux conditions expérimentales requièrent un ajustement du diamètre de la microsonde en fonction du diamètre des neurones à enregistrer; le diamètre de la microsonde doit toujours être plus petit que celui des neurones pour avoir la résolution spatiale désirée. Dans le cas de la détection des neurones du réticulaire thalamique, le diamètre du neurone fut établi à 12 μm (diamètre moyen mesuré; annexe A) et le diamètre de la microsonde fut établi à 9 μm (un diamètre standard; chapitre 4.2). Dans le cas de la détection des neurones spinothalamiques, le diamètre du neurone fut établi à 26 μm (diamètre moyen mesuré; annexe A) et le diamètre de la microsonde fut établi à 12 μm (un diamètre standard; figure 4.1.1).

Pour ce qui est du déplacement axial, lorsque la sonde est au centre du neurone, le signal chute de 90 à 10 % sur environ 25 μm pour le cas des neurones du réticulaire thalamique et d'environ 50 μm pour le cas spinothalamique (Figure 4.14). Ces résultats modélisés sont très comparables aux résultats expérimentaux *in vitro* (Figure 3.11) et *in vivo* (Chapitre 4 : Figure 4.6 B et figure 4.12 B), confirmant ainsi que le modèle est valable axialement.

Pour ce qui est de l'axe transverse, le signal est bien maximal au centre et décroît jusqu'à ce que le cœur optique ne soit plus devant le neurone. Comparons ces résultats avec ceux obtenus expérimentalement à l'aide de microbilles. Le premier cas présenté ici (figure 3.15A) montre la détection d'une microbille du même diamètre (15 μm) que la microsonde (n.b. le cœur optique est environ 0.6 fois celui de la microsonde). Le deuxième cas (figure 3.15 B) montre la détection d'une microbille beaucoup plus petite (2 μm) que la microsonde (10 μm). Ce dernier cas s'apparente à la réponse impulsionnelle de la microsonde; ce qui permet de déterminer la résolution de la détection optique. Dans les deux cas, la concordance à mi-hauteur est très bonne mais la sonde capte expérimentalement un faible signal alors que le cœur optique a dépassé la source. Cette discordance entre les résultats expérimentaux et ceux du modèle pourrait s'expliquer par une illumination plus large de la microsonde; la lumière sortant de la fibre ne provient pas seulement du cœur optique, mais de l'ensemble de la pointe (comme le montre la figure 3.4C). De plus, il se peut aussi qu'un

faible couplage entre la gaine et le cœur optique soit à l'origine de ces ailettes. Dans l'ensemble, le fait que les largeurs à mi-hauteur des résultats modélisés et expérimentaux concordent montre que le modèle est bon.

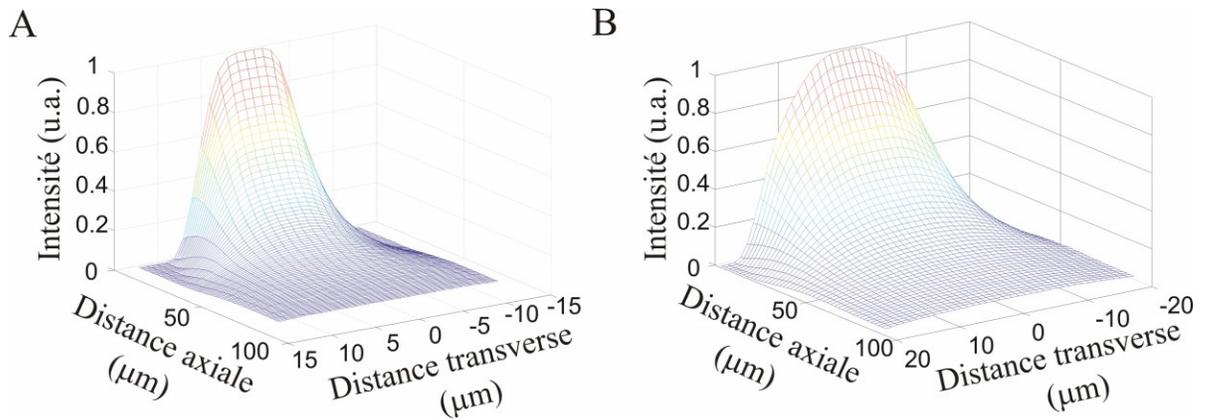


Figure 3.14 Champs de détection des microsondes. **A** Simulation de l'intensité de la fluorescence détectée par une microsonde de 8 μm face à un neurone de 12 μm . Ces conditions sont typiques aux enregistrements de neurones GAD-GFP+ dans le cerveau (chapitre 4.2) **B** Simulation de l'intensité de la fluorescence détectée par une microsonde de 12 μm face à un neurone de 26 μm . Ces conditions sont typiques aux neurones spinothalamiques enregistrés dans la moelle épinière (chapitre 4.1) **A & B** La distance axiale représente la différence entre la position de la pointe et la position du début du neurone. La distance transverse représente la distance entre la position des deux centres.

À l'aide de ce modèle, il est possible d'évaluer l'impact sur la détection optique de certains paramètres clés. Les trois principaux paramètres étudiés ici sont : le diamètre du neurone, le diamètre de la microsonde et l'ouverture numérique de celle-ci. Il est important de noter que plusieurs résultats sont normalisés afin de bien comparer la forme des profils de détection. Cette forme des profils est jugée plus importante que l'amplitude de détection, car l'amplitude dépend de paramètres autres que ceux liés aux propriétés de la sonde ou du neurone, comme l'efficacité des fluorophores, la qualité du marquage ou encore la puissance d'excitation.

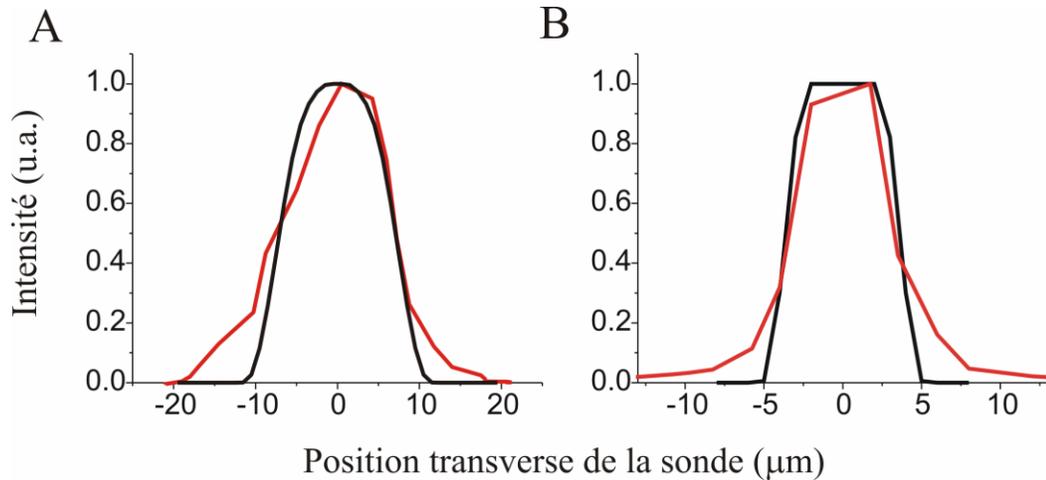


Figure 3.15 Résolution transverse expérimentale de la microsonde en comparaison avec le modèle numérique **A** Cas où la pointe de la sonde est de même diamètre que la microbille; microbille et microsonde de 15 μm (cœur optique de 9 μm) **B** Cas où la microbille est beaucoup plus petite que la microsonde; microbille de 2 μm et microsonde de 10 μm (cœur optique de 6 μm). Ce cas s'apparente à la réponse impulsionnelle de la microsonde. Dans les deux cas, la concordance à mi-hauteur est bonne, mais la sonde capte expérimentalement un faible signal alors que le cœur optique a dépassé la source.

Le diamètre du neurone détecté influence la détection transverse et non la détection axiale (figure 3.15). Les résultats obtenus en simulant la détection, par la même microsonde (diamètre de 9 μm), de neurones ayant différents diamètres (10, 15 et 26 μm), montrent que le champ de détection axiale est très peu influencé par le diamètre du neurone. Ceci est probablement dû au fait que le détecteur (le cœur optique) est toujours plus petit que la source (le neurone). Ainsi, l'influence d'un plus ou moins large volume de fluorescence semble minimisée. Le champ de détection transversale est quant à lui directement relié à la largeur du neurone, ce qui est conforme aux attentes.

Le diamètre de la pointe de la microsonde influence grandement la détection axiale et peu la détection transverse (figure 3.16). Les résultats obtenus en simulant la détection du même neurone (diamètre de 15 μm) par des microsondes ayant différents diamètres (10, 15 et 26 μm) montrent que la détection axiale est très influencée par le diamètre de la sonde. Plus le diamètre est grand, moins l'intensité de détection diminue en fonction de la distance sonde-neurone. La distance de détection (90-10%) augmente donc avec le diamètre de la sonde, ce qui est principalement dû à l'augmentation de la surface de collection. Donc, pour avoir une meilleure résolution axiale, il est préférable d'avoir une pointe plus petite. Le profil de détection transverse est, quant à lui, peu influencé par le diamètre de la sonde. La

largeur à mi-hauteur est pratiquement la même pour tous les diamètres, mais les microsondes plus larges ont un profil de détection qui dépasse la largeur du neurone, car le chevauchement sonde-neurone est plus important lorsque la sonde est plus large.

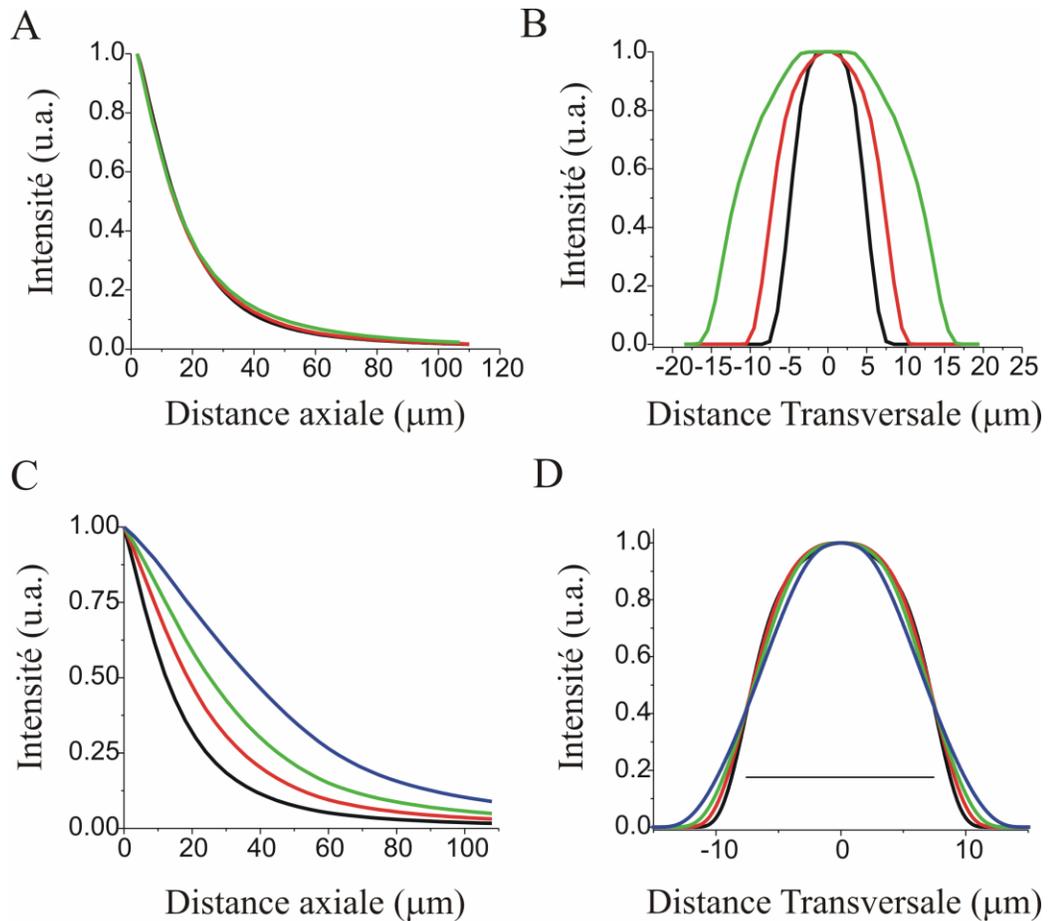


Figure 3.16 Détection optique en fonction du diamètre des neurones et des microsondes. **A-B** La sonde est constante (diamètre de $9\ \mu\text{m}$) et le diamètre du neurone varie (diamètres; noir : $10\ \mu\text{m}$; rouge : $15\ \mu\text{m}$; vert : $26\ \mu\text{m}$) **A** Profils de détection axiale pour la même sonde détectant différents neurones. Les profils sont similaires, ce qui montre que le diamètre du neurone influence peu la résolution axiale. **B** Profils de détection transverse pour la même sonde détectant différents neurones. Le profil de détection transverse est directement influencé par le diamètre des neurones détectés. **C-D** Le diamètres des microsondes varient (noir : $9\ \mu\text{m}$; rouge : $12\ \mu\text{m}$; vert : $15\ \mu\text{m}$, bleu : $20\ \mu\text{m}$) et le neurone est le même (diamètre de $15\ \mu\text{m}$). **C** Profils de détection axiale par des microsondes ayant différents diamètres lors de la détection du même neurone. Le diamètre de la pointe de la microsonde a donc un important effet sur le profil de détection axiale **D** Profils de détection transverse par des microsondes de différents diamètres lors de la détection du même neurone. Le diamètre de la microsonde influence donc peu la résolution transverse de la microsonde. **B-D** distances axiales de $2\ \mu\text{m}$

L'ouverture numérique de la fibre optique influence grandement la détection axiale et la détection transverse (figure 3.17). Les résultats obtenus en simulant la détection d'un neurone de 15 μm de diamètre par une microsonde de 12 μm de diamètre montrent que la distance à laquelle le signal détecté passe de 90% à 10% diminue avec l'ouverture numérique (figure 3.17 B). Le fait que les résultats sont représentés de manière normalisée vise toujours à mettre l'accent sur la forme des profils, car la forme de ces profils est utilisée comme critère de détection axiale. Une large ouverture numérique augmente la résolution axiale (figure 3.17 A). Cependant, elle diminue la résolution transversale avec la distance sonde-neurone (figure 3.17 C). Cette perte de résolution transverse peut occasionner des maxima de détection qui ne se trouvent pas directement. Une ouverture numérique plus faible augmente la résolution transverse, mais elle diminue la résolution axiale. Un autre point est à considérer : la puissance d'excitation. Cependant, le modèle est limité, car il ne peut pas comparer les puissances normalisées entre les différentes ouvertures numériques. Par contre, il est clair que plus l'ouverture numérique est basse, plus la puissance lumineuse qui sera dirigée face à la microsonde sera grande et que la fluorescence émise y sera proportionnelle. Ainsi, la puissance de collection diminue normalement avec l'augmentation de l'ouverture numérique. L'ouverture numérique idéale doit donc faire un compromis entre la résolution axiale, celle transverse et l'efficacité de la puissance d'illumination. Il semble, selon les résultats présentés à la figure 3.17, qu'une ouverture numérique de l'ordre de 0.2 soit un bon compromis.

Cette sous-section montre donc que les résultats du modèle numérique sont comparables aux enregistrements optiques faits *in vivo* et *in vitro*, ce qui donne un certain appui aux projections faites par ce modèle. En variant les principaux paramètres, le modèle montre que l'impact du diamètre de la microsonde influence beaucoup plus le profil de détection axiale que le diamètre du corps cellulaire. Il semblerait aussi que le diamètre du neurone influence majoritairement le profil de détection lors de la détection transverse. En ce qui concerne l'ouverture numérique, il faut établir un compromis entre la résolution transverse, la résolution axiale et la puissance d'illumination. Ceci semble être aux alentours d'une ouverture numérique d'environ 0.2, ce qui concorde avec l'ouverture numérique de la microsonde.

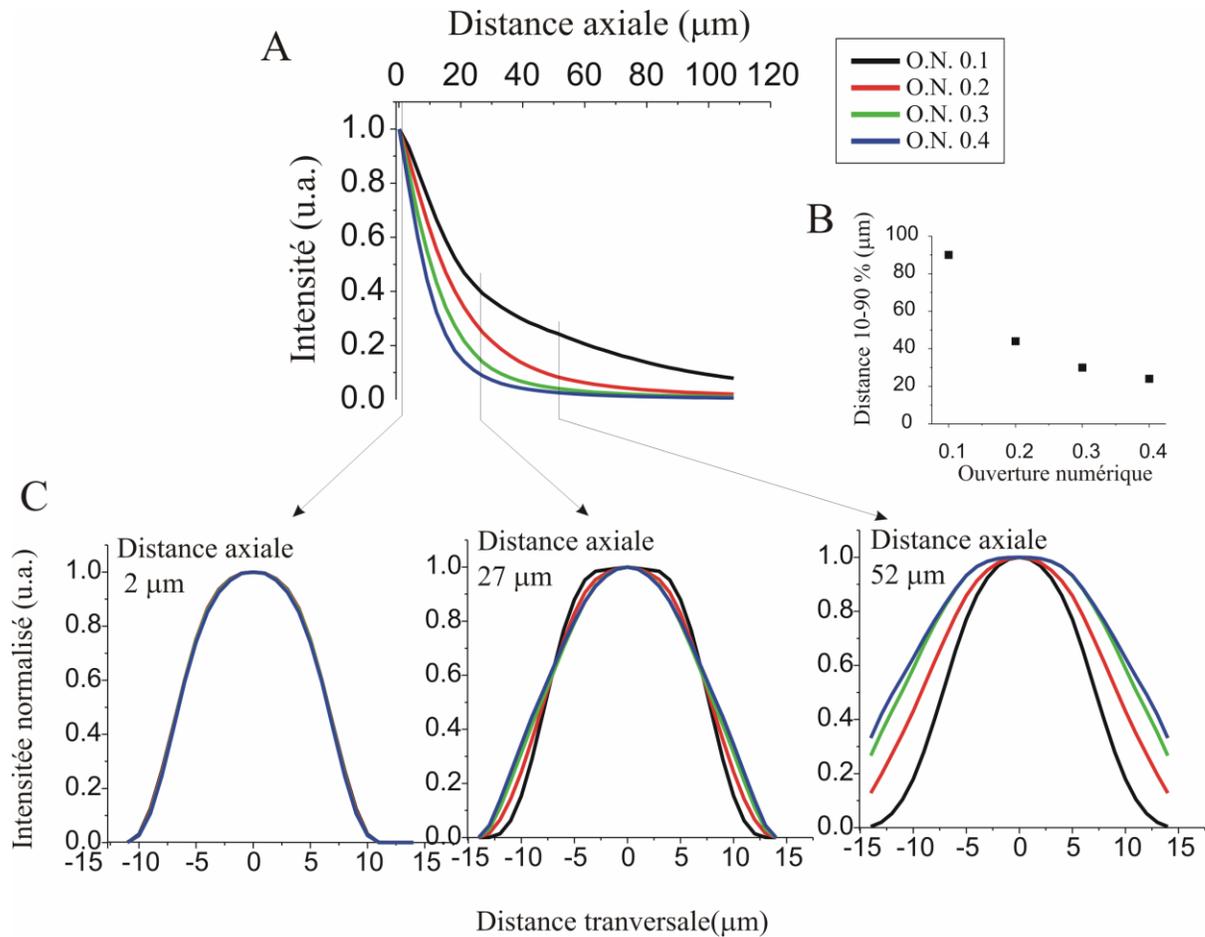


Figure 3.17 A Profil de détection de la microsonde (diamètre sonde 9 μm , diamètre neurone 10 μm) en fonction de l'ouverture numérique de la fibre optique. Plus l'ouverture numérique est petite, plus l'illumination est localisée en face de la fibre et plus l'illumination-collection est efficace. Pour cette raison, plus l'ouverture numérique de la fibre est faible, plus la détection se fait de loin. La figure en haut à droite montre la distance de détection en 10 et 90 % du signal; elle diminue avec l'ouverture numérique. Plus l'ouverture numérique est grande, plus la résolution axiale est bonne. B Plus l'ouverture numérique est grande, moins la résolution spatiale transverse est bonne. Mieux avec une bonne résolution transverse pour la détection des neurones face à la sonde.

3.4 CONCLUSIONS

Il était essentiel de caractériser les propriétés optiques de notre microsonde avant de la tester *in vivo*. Différentes expériences ont permis de montrer que les pertes de lumière excitatrice étaient non négligeables et qu'elles survenaient majoritairement à la pointe. L'efficacité de transmission est d'environ 1 à 10 % entre la lumière injectée dans la sonde et la lumière à la sortie de la pointe. Ces pertes sont importantes, mais ne sont pas critiques dans les présentes conditions, car la puissance du laser excitateur n'est pas à sa limite et le marquage est peu dense. Cependant, il serait intéressant de minimiser les pertes car la principale source de bruits optiques provient de la fibre de jonction (autofluorescence et signal Raman) et ce bruit est relié linéairement avec la puissance d'injection. Donc, en minimisant les pertes à la pointe, il serait possible d'illuminer avec la même puissance tout en diminuant le bruit; il y aurait ainsi une augmentation nette du ratio signal sur bruit.

La seconde partie de ce chapitre présentait la preuve de concept de la détection optique de neurones. Il y est démontré que la microsonde a assez de résolution et de sensibilité pour détecter un seul neurone fluorescent. Pour se faire, une approche évolutive montre que la sonde peut détecter des microbilles fluorescentes, de neurones fluorescents en culture et finalement des neurones en tranche. Cette dernière étape montre qu'il est possible de détecter des neurones dans des conditions s'apparentant à celles retrouvées *in vivo*.

Un modèle numérique fut aussi créé pour calculer le champ de détection de la fibre. Il simule l'illumination d'un corps cellulaire d'un neurone et il évalue la quantité de fluorescence collectée par la fibre en fonction de sa position. Les résultats du modèle concordent avec les résultats expérimentaux. Selon le modèle, l'impact du diamètre de la microsonde influence beaucoup plus le profil de détection axiale que le diamètre du corps cellulaire. Pour ce qui est de la détection transverse, c'est le contraire, le diamètre du neurone influence majoritairement le profil de détection. Il semble qu'une ouverture numérique de l'ordre de 0.2 soit un bon compromis entre la résolution axiale et la puissance de détection.

L'ensemble des résultats de ce chapitre a permis de conclure que le design de la microsonde et du montage est acceptable pour effectuer la détection optique de neurones fluorescents. Conséquemment, il fut jugé acceptable d'utiliser cette microsonde pour entreprendre les expériences *in vivo*.

CHAPITRE 4

EXPÉRIMENTATION *IN VIVO*

Le but de ce chapitre est de rendre compte des résultats obtenus lors de l'utilisation de la microsonde en condition *in vivo* (un animal qui est toujours vivant sous anesthésie). Il s'agissait de tester expérimentalement la microsonde dans les conditions réelles pour laquelle elle fut créée. Le paradigme expérimental choisi fut d'utiliser la moelle épinière de rats comme milieu d'enregistrement. Cette série d'expérience avait trois objectifs bien précis. 1- La microsonde devait détecter des potentiels d'action de manière électrophysiologique. 2- Elle devait être capable de détecter et reconnaître des neurones fluorescents dans les conditions *in vivo*. 3- Elle devait permettre l'enregistrement des neurones en parallèle (optiquement et électriquement) et il fallait établir un critère afin de reconnaître si des potentiels d'action provenaient d'un neurone fluorescent ou non. Par la suite, la microsonde fut testée avec un second paradigme expérimental : le cerveau d'une souris fluorescente génétiquement modifiée. Cette seconde série d'expérience permettait de voir le comportement de la microsonde dans des conditions bien différentes, ce qui pouvait ouvrir la porte à de nombreuses autres expériences.

Ce chapitre est divisé en trois sections principales. La première partie présente les résultats et analyses obtenue suite aux enregistrements faits dans la moelle épinière de rats. Les résultats électriques, optiques et les enregistrements faits en parallèle y sont présentés. Un critère de co-localisation est aussi présenté pour permettre d'identifier si des potentiels d'actions peuvent être considérés comme provenant d'un neurone fluorescent ou non. La seconde partie montre les enregistrements faits dans le cerveau de souris GAD65-EGFP+, un paradigme qui permet d'évaluer les performances de la microsonde et du critère de co-localisation dans d'autres conditions. Finalement, un retour sur le chapitre est fait afin d'exposer les résultats et les idées principales soulevées dans ces enregistrements *in vivo*.

4.1 RÉSULTATS DANS LA MOELLE ÉPINIÈRE DE RATS

Cette première série d'expérimentations *in vivo* permettait, pour la première fois, de mettre à l'épreuve la microsonde dans les conditions pour lesquelles elle a été créée. L'environnement *in vivo* offrait l'opportunité de tester électriquement les sondes afin de savoir si les microélectrodes permettaient réellement d'enregistrer des potentiels d'actions. C'était aussi l'occasion d'enregistrer à l'aveugle des neurones fluorescents et, finalement, de voir s'il était possible pour la microsonde de rechercher optiquement des neurones marqués de fluorophores pour enregistrer leur potentiel électrique.

Le but de cette série d'expérience était de tester les microsondes *in vivo*. Trois objectifs clairs ont été définis en fonction des trois modes d'enregistrement possibles, soit : la détection électrique seule, la détection optique seule et les deux détections en parallèles. L'objectif premier était d'enregistrer électriquement des neurones et de caractériser leurs détections afin de définir des critères de détection unitaire. Le deuxième objectif était d'enregistrer les fluctuations optiques provenant de neurones fluorescents, puis de définir un critère permettant d'associer ces fluctuations à la détection d'un neurone unique. Le troisième et principal objectif était d'enregistrer les signaux en parallèle afin d'obtenir des enregistrements optiques et électriques simultanés. Trois principaux cas de figures pouvaient survenir. 1- L'enregistrement de signaux électriques seuls, 2- l'enregistrement de signaux optique seuls, 3- l'enregistrement simultané électrique et optique. Il fallut donc poser un critère permettant d'établir s'il y avait une relation entre les deux détections ; le critère de co-détection.

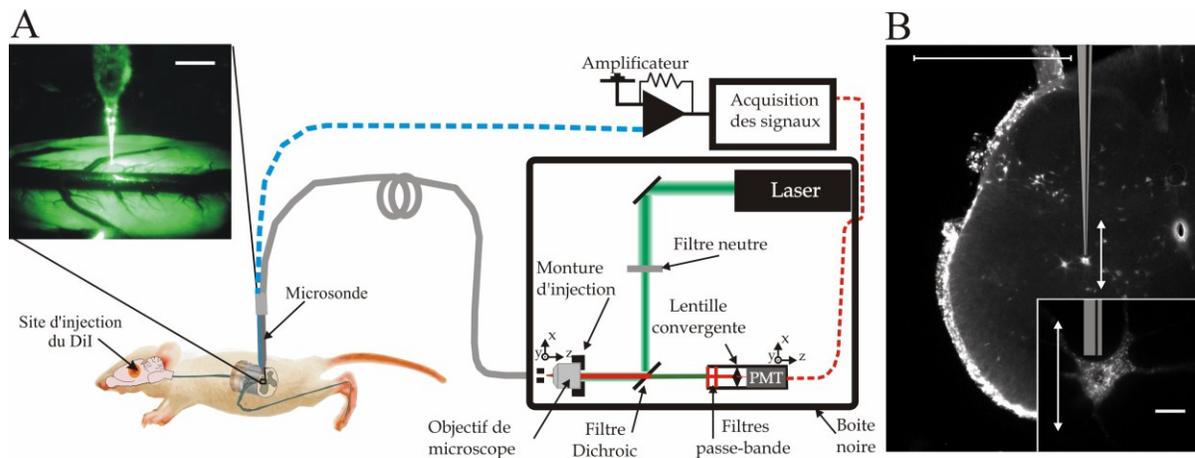


Figure 4.1 Enregistrements dans la moelle épinière de rats **A** Schéma du montage expérimental utilisé pour l'enregistrement *in vivo* dans la moelle épinière de rats. La microsonde, reliée au système d'acquisition (chapitre 2.3), est insérée dans la moelle épinière du rat et descendue lentement ($4-8 \mu\text{m/s}$) afin d'y enregistrer le signal optique et électrique. **A-haut à gauche** Photographie d'une microsonde dans la moelle épinière. Barre d'échelle = 1 mm **B** Photographie en fluorescence d'une tranche ($100 \mu\text{m}$) de moelle épinière où les neurones de projection spino-thalamiques ont été marqués rétrogradement par du DiI. **B-bas à droite** Agrandissement d'un neurone fluorescent. La flèche à double sens et le schéma de la microsonde indiquent le type de déplacement fait lors des enregistrements. Les cellules fluorescentes ne sont pas densément peuplées, ce qui minimise les chances d'une double détection optique. La sonde était typiquement insérée et descendue jusqu'à environ $1800-1500 \mu\text{m}$ (pour dépasser les neurones de la couche V de la moelle épinière) Les barres d'échelles sont de 1 mm pour l'image de la tranche et de $20 \mu\text{m}$ pour l'agrandissement.

4.1.1 Paramètres expérimentaux

La moelle épinière fut choisie comme site d'enregistrement pour plusieurs raisons. Il s'agissait premièrement d'un paradigme déjà bien connu au laboratoire du Pr. Yves De Koninck et ce site offrait des neurones de projections spino-thalamiques ayant des caractéristiques favorables : ils ont des soma de large diamètre et une faible densité de la population se projette au site de marquage, ils répondent à un stimulus sensoriel simple (stimulation de la patte) et ils nécessitent, pour les trouver expérimentalement, une technique conventionnelle complexe (stimulation antidromique¹⁵⁰). Ils offraient donc un excellent paradigme. Les corps cellulaires de ces neurones sont situés entre la surface et $2000 \mu\text{m}$ de profondeur de la moelle épinière (couches I-VII). Une sous-population de ceux-ci se projette dans les noyaux ventraux pariétal latéral et médian du thalamus (VPL et VPM)^{151,152}, ainsi des injections de fluorophores dans ces zones permettaient un marquage

rétrograde des neurones⁴⁴. Les enregistrements ont été effectués entre les segments spinaux L5 et S1 pour permettre une stimulation de cette sous-population, celle-ci est faite manuellement en utilisant la patte de l'animal^{150,153}.

Nous avons donc utilisé le montage décrit au chapitre 2.3 afin de descendre la microsonde dans la moelle épinière (figure 4.1). Les détails du protocole expérimental sont décrits dans l'annexe C.1. Ces expériences furent faites en collaboration avec Guillaume Lavertu (étudiant au doctorat en neurobiologie au laboratoire du Pr. Yves De Koninck). Lavertu utilisait couramment ce paradigme pour des expériences sur le système sensoriel et maîtrisait déjà les techniques de chirurgie et d'enregistrements électrophysiologiques. Ma contribution dans ces expériences consistait à concevoir les expériences, à fabriquer les microsondes, à régler le système optique et à apprendre les bases expérimentales de l'électrophysiologie.

Il importait de produire des microsondes capables d'enregistrer autant les signaux unitaires optiques que des signaux unitaires électriques. Pour obtenir assez de résolution spatiale optique pour ne détecter qu'un seul neurone à la fois, le diamètre de la pointe doit être plus petit que le diamètre des neurones de la population visée. Ceci limite le diamètre de la pointe des microsondes. Pour connaître cette limite, nous avons calculé le diamètre moyen des neurones marqués *in vivo* (annexe A). La population des neurones spino-thalamiques étudiée avait un diamètre de $24.2 \pm 6.2 \mu\text{m}$ (moyenne \pm D.S.), ce qui est considéré comme la limite supérieure pour le diamètre de la pointe des microsondes.

Conséquemment, les microsondes utilisées avaient un diamètre compris entre 6 et 21 μm et le diamètre moyen était de $14 \pm 3 \mu\text{m}$. Cette plage de diamètre imposée a pour conséquence de fixer la plage de résistance électrique, car la résistance électrique d'un conducteur est entre autre dépendante de la forme de celui-ci (équation 1.4). Dans le cas présent, la forme de l'électrode était dépendante de la forme de la pointe et du ratio entre le diamètre du cœur creux et le diamètre total. Les paramètres de la pointe étaient légèrement variable entre les sondes et le ratio des diamètres était toujours constant (seule la fibre de 3^e génération a été utilisée ici (chapitre 2.2.1.3). L'autre paramètre principal qui définit la résistance des microsondes était l'électrolyte utilisé. Celui-ci était toujours une solution aqueuse de NaCl dont la concentration variait entre 1 et 3 M. Plus la concentration de l'électrolyte est élevée, plus la résistance est faible. Étant donné que plus la résistance est basse, plus le niveau de bruit l'est aussi (équation 1.3); Une concentration plus élevée était

généralement favorisée (2-2.5 M). Dans ces conditions, les microsondes avaient une plage de résistances variant entre 7 à 26 M Ω (figure 4.6).

Pour localiser les neurones *in vivo*, le protocole de descente devait permettre d'enregistrer les signaux (électrique et optique) à différents endroits dans l'espace. Pour se faire, la microsonde était descendue dans le tissu à vitesse constante (4-8 $\mu\text{m/s}$) ; Un échantillonnage de 10 à 20 kHz permettait de résoudre temporellement les potentiels d'actions. Le déplacement constant de la sonde permet de convertir les données temporelles en données spatiales (annexe D). De cette manière, il est possible d'obtenir l'amplitude du signal en fonction de la position de la sonde. Il est à noter que les déplacements des microsondes n'induisaient généralement pas de dommage apparent au neurone (e.g. une augmentation soudaine de la fréquence de décharge en réponse au mouvement de la sonde, figure 4.11B).

4.1.2 Enregistrements électrophysiologiques extracellulaires

4.1.2.1 Enregistrement de neurone unitaire *in vivo*

Cette sous-section montre et analyse des résultats d'enregistrements de potentiels d'actions provenant de cellules unitaires *in vivo*. Les microsondes furent testées électriquement dans les conditions expérimentales décrites précédemment (section 4.1.1) afin d'enregistrer le potentiel de champ extracellulaire présent dans la moelle épinière de rats. Ainsi, il fut possible d'isoler les potentiels d'action (p.a.) d'un seul neurone à l'aide de la microsonde (figure 4.1A-B). Il est à noter que des centaines de neurones ont été enregistrés de la sorte, mais seulement quelques exemples typiques sont présentés dans le cadre de cette thèse.

Pour permettre un enregistrement électrique unitaire, il est primordial de s'assurer que les potentiels d'actions captés proviennent d'un seul neurone. Pour se faire, nous nous sommes principalement appuyés sur deux critères : la forme et l'amplitude des potentiels d'actions.

Le critère basé sur la forme s'appuie sur le fait que les variations du champ électrique, causées par l'émission de potentiels d'action, varient selon les neurones enregistrés. Ces variations sont dépendantes de la position de la sonde par rapport au neurone émetteur et des propriétés électrophysiologique de celui-ci ⁸⁶. Ainsi, si la microsonde enregistre

parallèlement deux neurones, il est peu probable que ceux-ci aient la même forme de p.a.; chacun des neurones aura une signature différente. En présence d'une série de potentiels d'action, il est possible d'évaluer si nous sommes en présence d'un ou de plusieurs neurones en comparant la forme des impulsions. Par exemple, pour savoir si la série de p.a. de la figure 4.2C comporte un ou plusieurs neurones, il suffit de superposer les impulsions pour en comparer leur forme. La figure 4.2D montre la superposition des quatre p.a. de l'encadré rouge (figure 4.2C). La forme temporelle des p.a. est quasi exactement la même; malgré le fait que les amplitudes crête-à-crête (c-c) varie légèrement. En comparaison, la figure 4.2E montre de deux p.a. provenant de neurones différents. En conséquence, les p.a. enregistrés à la figure 4.2C ont une très grande chance de provenir du même neurone. Le critère de comparaison de la forme des potentiels d'actions est un bon indice permettant de valider si un enregistrement est unitaire ou non.

Nous proposons aussi un second critère basé sur l'amplitude des potentiels d'actions enregistrés. Ce critère s'appuie sur le fait que, lorsque la sonde est fixe par rapport au neurone, l'amplitude crête-à-crête des p.a. est relativement stable dans le temps, mais lorsque la sonde se déplace en fonction du neurone, l'amplitude c-à-c enregistrée varie en conséquence (figure 4.2F). Plus la sonde est proche du neurone, plus le signal est élevé et vice versa. En conséquence, l'intensité des impulsions enregistrées varie avec le déplacement de la sonde; un signal maximal est considéré comme le point le plus rapproché de la source d'émission (le neurone).

En combinant les deux critères, il est possible de détecter la présence de deux neurones sur un enregistrement multiple (figure 4.3A-B). La partie A montre un enregistrement temporel où la sonde est enfoncée à vitesse constante. Puis, la partie B montre l'amplitude crête-à-crête des potentiels d'action détectés en fonction de la position de la sonde. Selon le critère de variation d'amplitude, deux groupes de potentiels d'action se distinguent à la figure 4.3A; il y a successivement deux pics d'amplitudes (groupe 1 et 2). Ceci suggère que deux neurones sont séparés spatialement de 43 μm (figure 4.3B). Pour corroborer cette hypothèse, le critère de comparaison des formes d'impulsions est utilisé. La figure 4.3C et D montrent que les p.a. des groupes 1 et 2 sont similaires entre eux et différents les uns envers les autres. Par conséquent, le critère de forme indique aussi que les deux groupes de p.a. proviendraient de deux neurones différents. Donc, les deux critères indiquent indépendamment la présence de deux neurones sur l'enregistrement.

Un autre test permet de percevoir la présence d'un deuxième neurone. Il s'agit de calculer l'intervalle entre chaque potentiel d'action et de s'assurer qu'il n'y a pas de chevauchement. Lorsqu'un potentiel d'action est émis, le neurone impliqué ne peut en réémettre un second à l'intérieur d'un court intervalle de temps (la période réfractaire ; environ 2 ms). Si deux potentiels d'actions sont détectés à l'intérieur de cette période, un deuxième neurone doit obligatoirement l'avoir produit. La figure 4.2G montre, pour l'enregistrement de la figure 4.2F, qu'il n'y a pas de p.a. émies entre 0 et 2 ms, alors que 189 p.a. sont émis entre 2 et 30 ms. Ce test ne montre pas la présence d'un deuxième neurone et, étant donné la fréquence rapprochée des événements, laisse supposer un neurone unique. Cette technique permet donc de détecter, ou non, la présence d'un deuxième neurone, mais ne permet pas de prouver directement l'inexistence de celui-ci. Par conséquent, il peut être utilisé en complément pour enforcer une analyse.

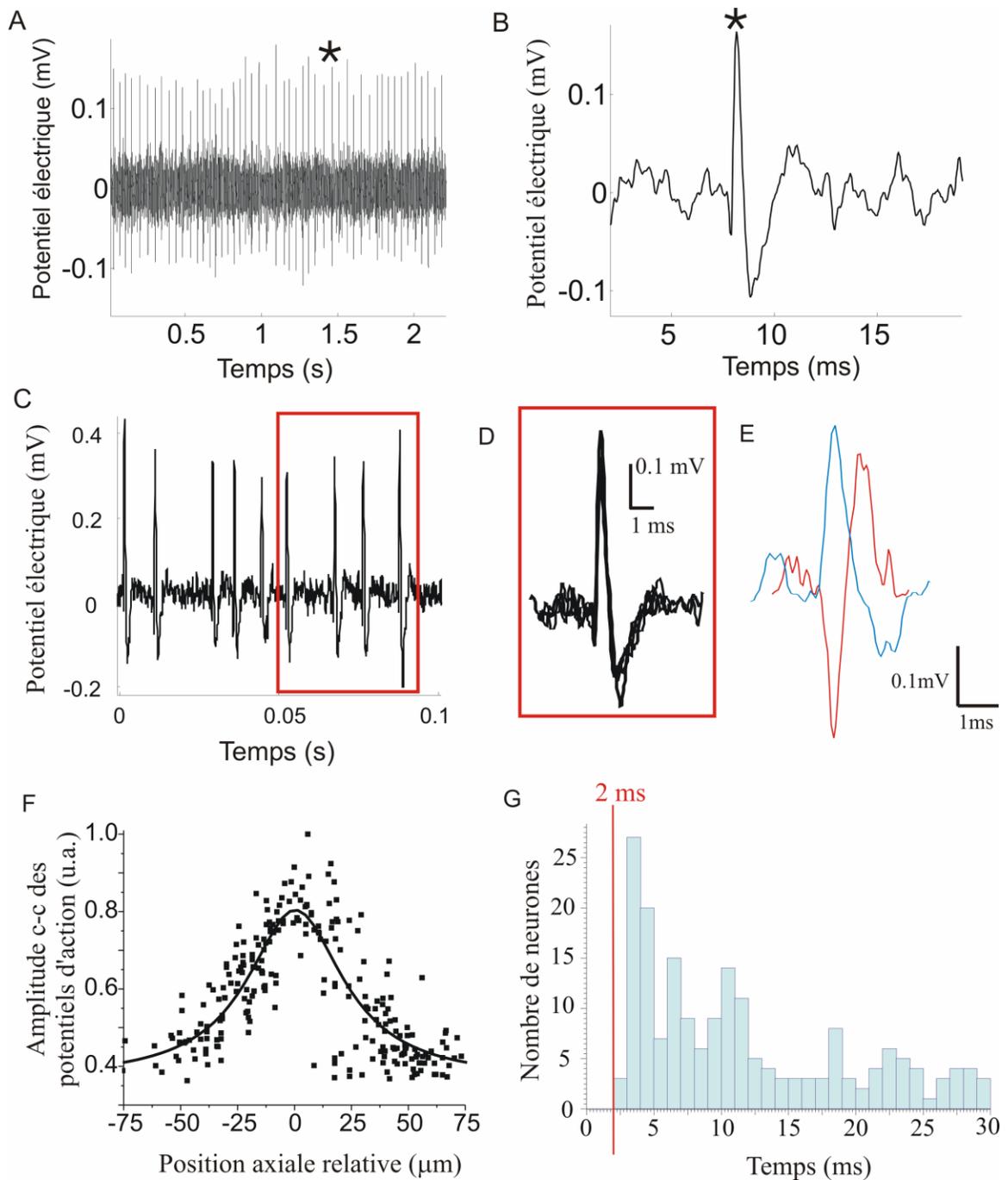


Figure 4.2 **A** Enregistrements typiques de potentiels d'action (p.a.) extracellulaires par une microsonde (S/B entre 6 et 9) **B** Agrandissement d'un p.a. montré en A (S/B=7.8, bruit RMS = 0.32 mV) **C** Enregistrement de p.a. extracellulaires par une microsonde (S/B entre 14 et 18) **D** Superposition des quatre p.a. de l'encadré rouge en C; les quatre potentiels ont la même forme. **E** Deux p.a. extracellulaires provenant de deux neurones différents. **F** Amplitude des p.a. d'un neurone en fonction de la position axiale relative de la microsonde. La courbe noire est une courbe lorentzienne. **G** Histogramme de l'intervalle entre les p.a. pour une série de $n=189$ p.a. .

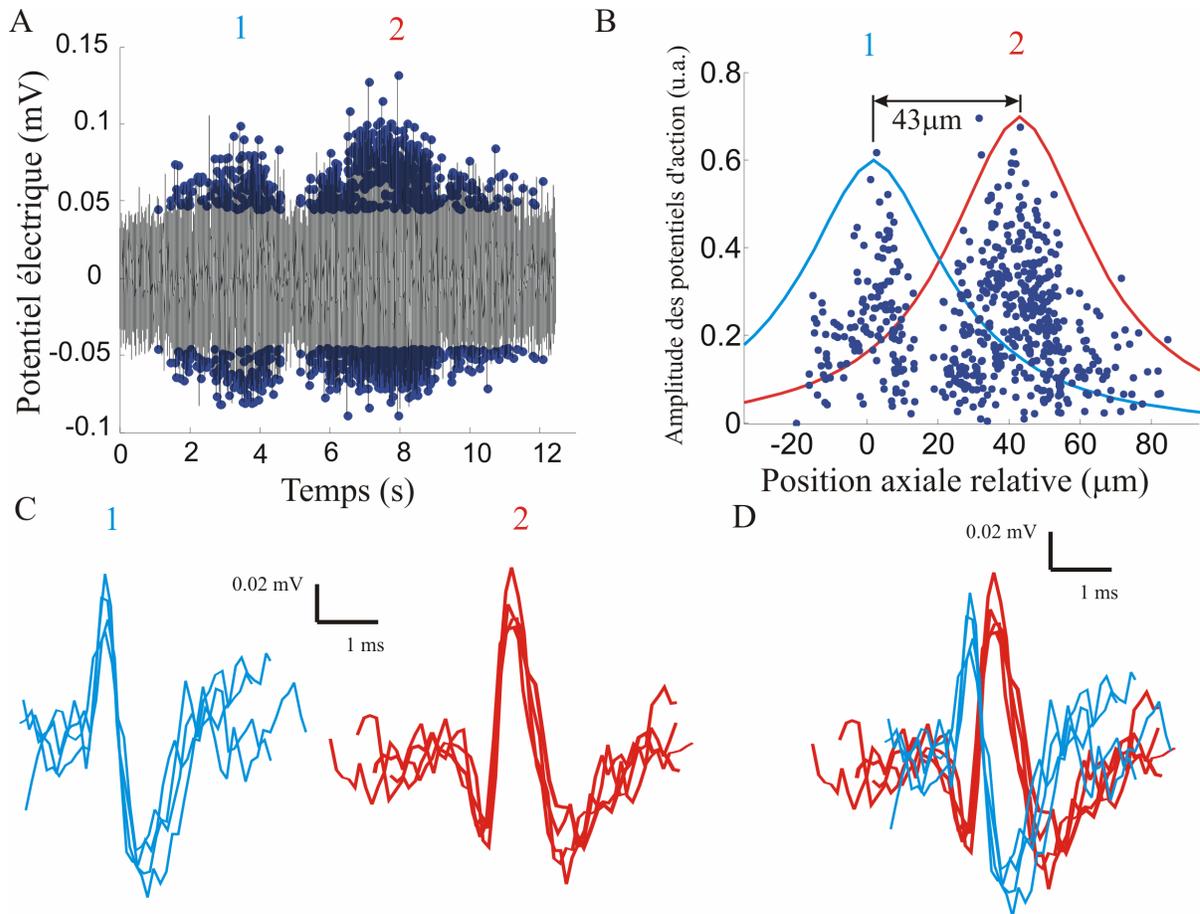


Figure 4.3 **A** Enregistrements électriques d'une microsonde qui se déplace à vitesse constante. Les chiffres 1 et 2 montrent deux groupes de potentiels d'action. **B** Amplitude crête-à-crête des p.a. enregistrés en A en fonction de leur position axiale relative. **C** Superposition de quatre p.a. de chaque groupe. **D** Superposition des p.a. provenant des deux groupes.

4.1.2.2 Efficacité d'enregistrement électrique des microsondes

Il était essentiel de quantifier statistiquement l'efficacité d'enregistrement des microsondes. Cette analyse quantitative consiste à mesurer le ratio signal sur bruit (S/B) des enregistrements ; le signal (S) étant la valeur crête-à-crête des potentiels d'action et le bruit (B) étant la valeur efficace (RMS ; « Root Mean Square ») du signal en absence de p.a.

La première étape de l'analyse consistait à établir un critère de sélection définissant la limite selon laquelle les enregistrements de neurones étaient considérés utilisables à des fins électrophysiologiques. Nous considérons que le ratio S/B devait être supérieur à 4 pour permettre des analyses électrophysiologiques valables, donc les enregistrements ayant un $S/B < 4$ ont été rejetés. Étant donné que l'amplitude des p.a. enregistrés varie selon la position de la sonde par rapport au neurone, le calcul du ratio S/B était basé sur le maximum du signal. L'examen d'une partie des enregistrements (n=155 neurones sur 13 animaux) donne un ratio S/B moyen de 7.6 ± 3.7 et un bruit moyen de $31 \pm 3 \mu\text{V}$. Les microsondes utilisées avaient une résistance entre 7 et 26 M Ω et un diamètre entre 6 et 21 μm .

Pour illustrer les résultats électrophysiologiques typiques, la figure 4.4A-B montre un exemple d'enregistrement extracellulaire effectué par la microsonde. Ces résultats sont considérés comme représentatifs de l'ensemble des enregistrements, car les amplitudes moyennes des potentiels d'actions ($S/B= 7.8$) et du bruit ($B=32 \mu\text{V}$) correspondent aux valeurs moyennes obtenues lors de l'analyse de 155 neurones. Pour illustrer les performances de détection des microsondes, la figure 4.5-A montre un histogramme du nombre de cellules enregistrées en fonction du ratio S/B des p.a.

Pour bien comprendre les propriétés d'enregistrement des microsondes, nous avons étudié l'amplitude des potentiels d'action émis par d'une sous-population de neurones (n=15) en fonction de la position de la microsonde. Les résultats montrent systématiquement une augmentation de l'amplitude crête-à-crête des p.a. suivie d'une diminution, le tout sur une plage variant entre 75 et 300 μm (du début de la montée jusqu'à la fin de la descente) (figure 4.4 C-D). Cette variation est centro-symétrique, car la croissance et la décroissance du signal se fait similairement par rapport au maximum et la distance moyenne entre 10 et 90% du signal maximum est de $50 \pm 18 \mu\text{m}$.

Le patron de détection électrique de chaque neurone donne systématiquement un seul maximum. Nous considérons donc la position de ce maximum d'intensité comme le meilleur indicateur permettant la localisation en profondeur des neurones enregistrés. Ce critère sera utilisé pour l'ensemble de la thèse.

Pour mieux comprendre l'influence des caractéristiques des microsondes sur les enregistrements, nous avons comparé le ratio S/B et le bruit en fonction de la résistance, puis en fonction du diamètre des sondes. Les résultats montrent qu'il n'y a aucune corrélation significative entre le S/B et la résistance des microsondes dans une plage comprise entre 7 et 26 M Ω (figure 4.5B). La plage de résistances testée est fonction du diamètre des sondes entre (6 et 21 μm), car la résistance dépend du diamètre. Le rapport S/B ne semble pas dépendre du diamètre des sondes (figure 4.5C). De façon complémentaire, les résultats montrent que pour 18 microsondes, il n'y a pas non plus de corrélation significative entre le bruit enregistré et la résistance (figure 4.5D). Nous n'avons remarqué aucune influence de la résistance et du diamètre, des sondes en ce qui trait à l'efficacité d'enregistrement (ratio signal sur bruit) et au bruit enregistré dans la moelle épinière de rat.

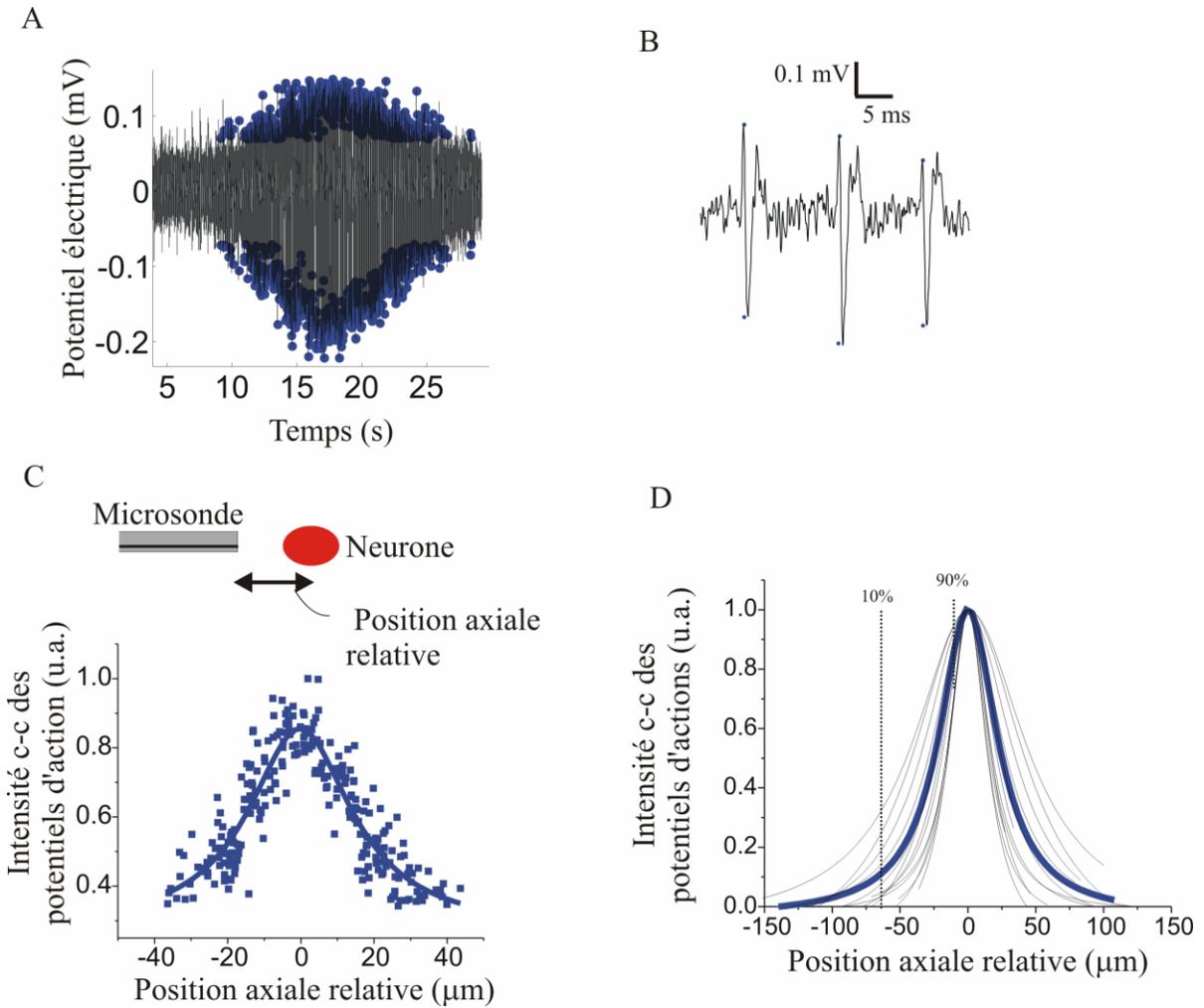


Figure 4.4 **A** Exemple d'un enregistrement électrophysiologique d'un neurone lorsque la microsonde est descendue dans le tissu à vitesse constante. **B** Exemple de potentiels d'actions enregistrés en **A**. **C** Amplitude crête-à-crête des potentiels d'action enregistrés en **A** (point bleu) exprimé en fonction de la position relative de la microsonde selon son axe de descente (centré à zéro). La ligne bleu montre la fonction lorentzienne qui correspond à la série de points. Au dessus, une représentation de la position de microsonde en fonction du neurones selon l'hypothèse que le maximum du signal représente le centre du neurone. **D** Superposition des profils d'intensité lorentzien de $n=15$ neurones. La distance entre 10 et 90% d'intensité est de $50 \pm 18 \mu\text{m}$ (moyenne \pm DS).

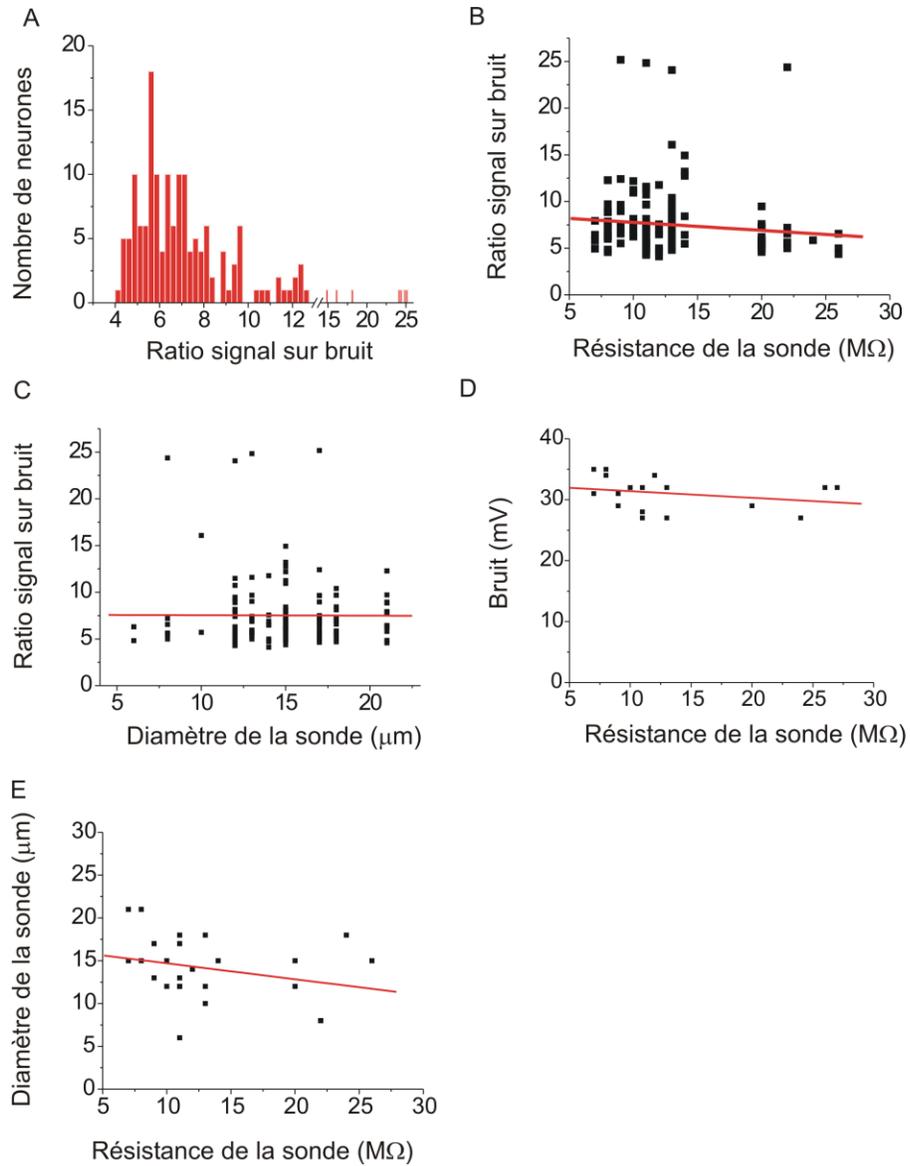


Figure 4.5 **A** Histogramme du nombre de neurones enregistrés en fonction du ratio signal sur bruit des potentiels d'action détectés. **B** Ratio signal sur bruit en fonction des résistances des microsondes utilisées. **C** Ratio signal sur bruit en fonction des diamètres des microsondes utilisées. **D** Amplitude du bruit détecté en fonction de la résistance de la microsonde utilisée. **E** Diamètre de la sonde en fonction de la résistance.

4.1.3 Enregistrement optique de neurones fluorescents unitaires

Les enregistrements optiques dans la moelle épinière *in vivo* visent à détecter de manière unitaire un neurone marqué par des fluorophores. Lors des expériences, du DiI a été injecté dans le VML et/ou le VPM du thalamus (annexe C). Les neurones de projections spino-thalamiques internalisaient les fluorophores par leurs dendrites et le DiI remontait de manière rétrograde jusqu'aux corps cellulaires situés dans les couches I à VII de la moelle épinière. Ce type de marquage offrait une faible densité de neurones fluorescents dans la moelle (figure 4.1B).

La première étape visait à établir des critères de base permettant de reconnaître la signature fluorescente d'un neurone lors d'une descente. Sur la base des expériences *in vitro* et des simulations numériques effectuées (chapitre 3), les augmentations du signal de fluorescence attendues devaient être à l'intérieur d'une centaine de micromètre, suivies par une diminution plus abrupte. Les expériences ont montré que des variations semblables à celle prévues étaient régulièrement détectées. Les résultats obtenus lors de 158 descentes dans N=12 rats ont permis de détecter n=87 variations optiques ayant des profils type d'un neurone. Le taux de succès moyen d'un neurone optique par deux descentes (1 neurone par 1.83 descentes). Il était donc peu probable d'enregistrer optiquement plusieurs neurones simultanément. Il est à noter que, nous avons effectué une série de descentes dans un rat contrôle (les neurones n'étaient pas marqués au DiI) et qu'aucune variation optique ayant ce type de profil n'a été trouvée. Nous avons comparé les profils normalisés entre eux (figure 4.6A-B). Bien que l'amplitude de détection n'est généralement pas la même d'une détection à l'autre, le profil d'augmentation et de diminution du signal était similaire pour l'ensemble des enregistrements. Lorsque la sonde approche les neurones, le signal passe de 10% à 90% du maximum à l'intérieur de $51 \pm 25 \mu\text{m}$ (moyenne \pm D.S., n=14) et, lorsque la sonde dépasse les neurones, le signal passe de 90% à 10% du maximum à l'intérieur de $23 \pm 9 \mu\text{m}$. Ce profil d'augmentation concorde très bien avec le profil prévu numériquement (figure 4.6B). Cette analyse quantitative des profils de détection a permis d'établir un critère de détection optique. Il devient ainsi possible d'utiliser des résultats pour établir si une variation de fluorescence doit être considérée comme une détection de neurone ou non. Le critère de détection optique pour les enregistrements de neurones spinothalamiques fut donc établi de la sorte : le signal optique devait augmenter de 9 fois le bruit de base à l'intérieur d'une distance de $100 \mu\text{m}$, puis redescendre dans les $50 \mu\text{m}$.

Le rapport signal sur bruit du signal n'est pas considéré comme un facteur clé pour l'identification des neurones, car la quantité de fluorescence détectée varie beaucoup d'un cas à l'autre (figure 4.6 D). Plusieurs paramètres peuvent influencer le rapport entre le signal maximum et le bruit, comme : le niveau de fluorescence intrinsèque du neurone, la puissance d'illumination, l'alignement du montage de détection, la qualité optique de la sonde ou encore l'alignement transverse entre la sonde et le neurone. Pour toutes ces raisons, il est presque impossible de faire des analyses comparatives entre les neurones sur la base de l'amplitude maximale de détection. Ce rapport doit cependant être assez élevé pour reconnaître le profil. Nous avons fixé à 9 le rapport S/B minimal permettant de bien distinguer un neurone. Le rapport S/B moyen était de 72 pour les n=87 neurones détectés et il variait entre 9 et 600. Il ne varie pas significativement avec le diamètre des fibres (figure 4.6 E), ce qui laisse supposer qu'il n'y a pas de désavantage à réduire la taille de la pointe afin d'augmenter la résolution optique.

Lorsque la sonde se déplace dans le tissu et qu'elle passe en face d'un neurone, le signal optique augmente et diminue de manière non symétrique. Ce phénomène est dû à la propriété directionnelle des enregistrements optiques (chapitre 3.1). La sonde détecte seulement le signal qui provient face à elle. Cette propriété est très importante, car il se crée un maximum de détection lorsque la sonde est directement collée sur le neurone ; ce maximum peut être utilisé comme une excellente approximation de la position du neurone selon l'axe de la microsonde. Ce phénomène est expérimentalement vérifié, car la montée est environ 2 fois plus longue que la descente (figure 4.6 B). Cette asymétrie entre les profils de montées et ceux de descentes doit donc induire une différence d'enregistrement en fonction du sens du déplacement axial ; l'intensité de fluorescence détectée est supposée être fixe pour une même position de la sonde par rapport au neurone, indépendamment du sens de déplacement de la microsonde. Cette propriété fut confirmée à plusieurs reprises. La figure 4.6 C montre bien que, pour un même neurone, le profil d'enregistrements lors de la descente est l'inverse de celui enregistré lors de la montée.

Lors des descentes, une petite augmentation du signal de base survenait généralement au fur et à mesure que la pointe s'enfonçait. Cette légère et régulière augmentation du signal optique peut être attribuable aux pertes de côté de la pointe. Celles-ci peuvent générer un peu d'autofluorescence pouvant être captée par le côté de la pointe. Bien que ce procédé soit peu efficace, il semble globalement suffisant pour induire des légères augmentations du signal. Cette augmentation proportionnelle à l'enfoncement de la sonde n'influence pas beaucoup la détection, mais il faut en tenir compte afin de ne pas omettre de

détecter des neurones ayant un faible S/B. Ainsi, pour repérer les neurones, il faut prendre une attention particulière aux baisses soudaines de fluorescence lors de la descente de la microsonde ou l'inverse lors de la remonté.

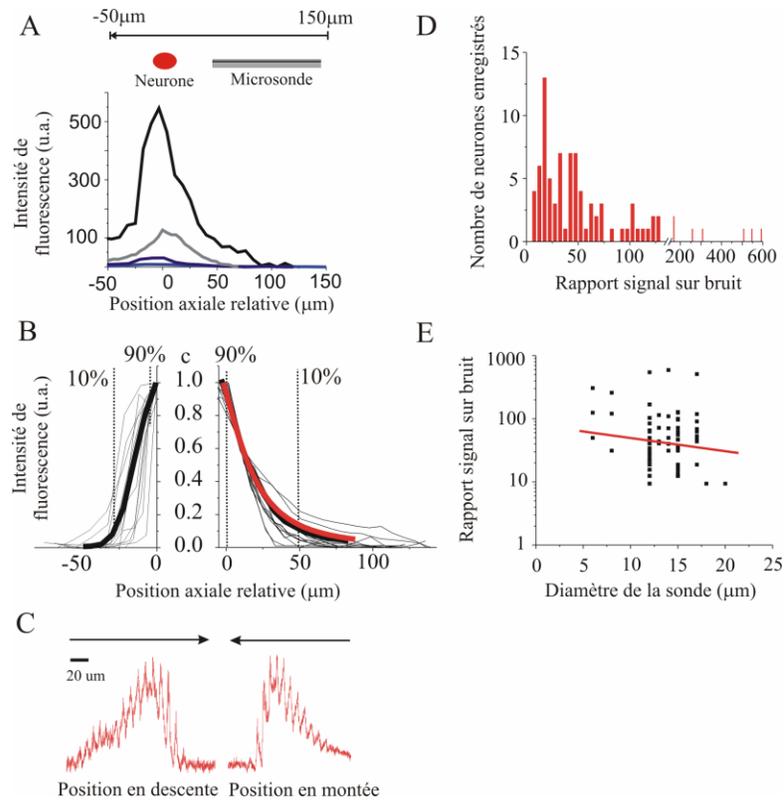


Figure 4.6 Enregistrements optiques de neurones spinothalamiques fluorescents. **A-Haut** Représentation dynamique du déplacement de la microsonde en fonction d'un neurone fluorescent. La flèche montre la direction axiale du déplacement. **A-Bas** Quatre enregistrements typiques de la fluorescence lorsque la microsonde dépasse un neurone fluorescent. L'amplitude de détection varie d'un neurone à l'autre, mais le profil de détection est similaire. **B** Profils normalisés de la détection de neurones fluorescents ($n=14$) en fonction de la position axiale de la microsonde : détection des neurones (gris), moyenne (noir), simulation numérique (rouge). **B-Droite** lorsque la sonde approche les neurones, le signal passe de 10% à 90% du maximum à l'intérieur de $51 \pm 25 \mu\text{m}$. **B-Gauche** Lorsque la sonde dépasse les neurones, le signal passe de 90% à 10% du maximum à l'intérieur de $23 \pm 9 \mu\text{m}$. Ces caractéristiques du profil de détection optique sont similaires lors de la détection des différents neurones. La simulation numérique concorde avec les enregistrements expérimentaux (diamètres du neurone : $26 \mu\text{m}$; diamètre de la microsonde : $12 \mu\text{m}$). **C** Comparaison entre deux profils d'enregistrements optiques du même neurone en fonction du déplacement axial de la microsonde. **C-Droite** Le profil enregistré lorsque le sonde descend. **C-Gauche** Le profil enregistré lorsque la sonde remonte. **D** Rapport entre le maximum du signal lors de la détection optique d'un neurone et la valeur efficace du bruit avant la détection. Le rapport S/B moyen est de 72. **E** Le diamètre ne semble pas affecter de manière significative le rapport S/B.

4.1.4 Artéfacts des mouvements physiologiques

Les enregistrements dans la moelle épinière sont propices aux artéfacts induits par les mouvements de l'animal. Comme la moelle est située directement au dessus de la cage thoracique, les mouvements respiratoires et les mouvements créés par les pulsations cardiaques peuvent influencer les enregistrements.

Les mouvements physiologiques influencent le signal optique détecté. Un déplacement de quelques microns peut faire varier considérablement le signal optique lorsque la microsonde est devant un neurone fluorescent. La figure 4.7 A montre la superposition de deux artéfacts de mouvements lorsque la sonde est fixe et qu'un neurone situé en face se déplace avec les mouvements physiologiques du rat. L'artéfact le plus important est une variation optique de grande amplitude et de basse fréquence (0.8 Hz) qui est directement en phase avec le taux de CO₂ rejeté par le rat, soit en corrélation directe avec la fréquence de respiration. Le second artéfact est de plus faible amplitude et de plus haute fréquence (6-7 Hz). La figure 4.7 A montre des petites variations du signal de fluorescence qui semblent être induites par les mouvements dus aux pulsations cardiaques ; la fréquence concorde directement avec celle des battements cardiaques des rats ¹⁵⁴. Ainsi, les mouvements physiologiques du rat influencent directement l'enregistrement des signaux optiques. Pour minimiser l'impact de ces mouvements, le rat était ventilé et la moelle était retenue par deux pinces prise sur les vertèbres les plus rapprochées (annexe C.1.2). Étant donné qu'il est presque impossible d'éliminer complètement ces mouvements, il est possible de moyenniser le signal sur une période correspondant à un cycle de respiration ; cette approche a été utilisée afin d'adoucir les tracés optiques (Figure 4.6).

Il est possible de tirer avantage de ces artéfacts, car ces mouvements sont évidemment plus intenses lorsque la pointe de la microsonde est proche de la source (neurone). Donc, lorsque l'amplitude des oscillations augmente, c'est que la pointe s'approche d'une source de fluorescence. Ce type d'augmentation peut parfois permettre de détecter des neurones ayant un faible rapport S/B.

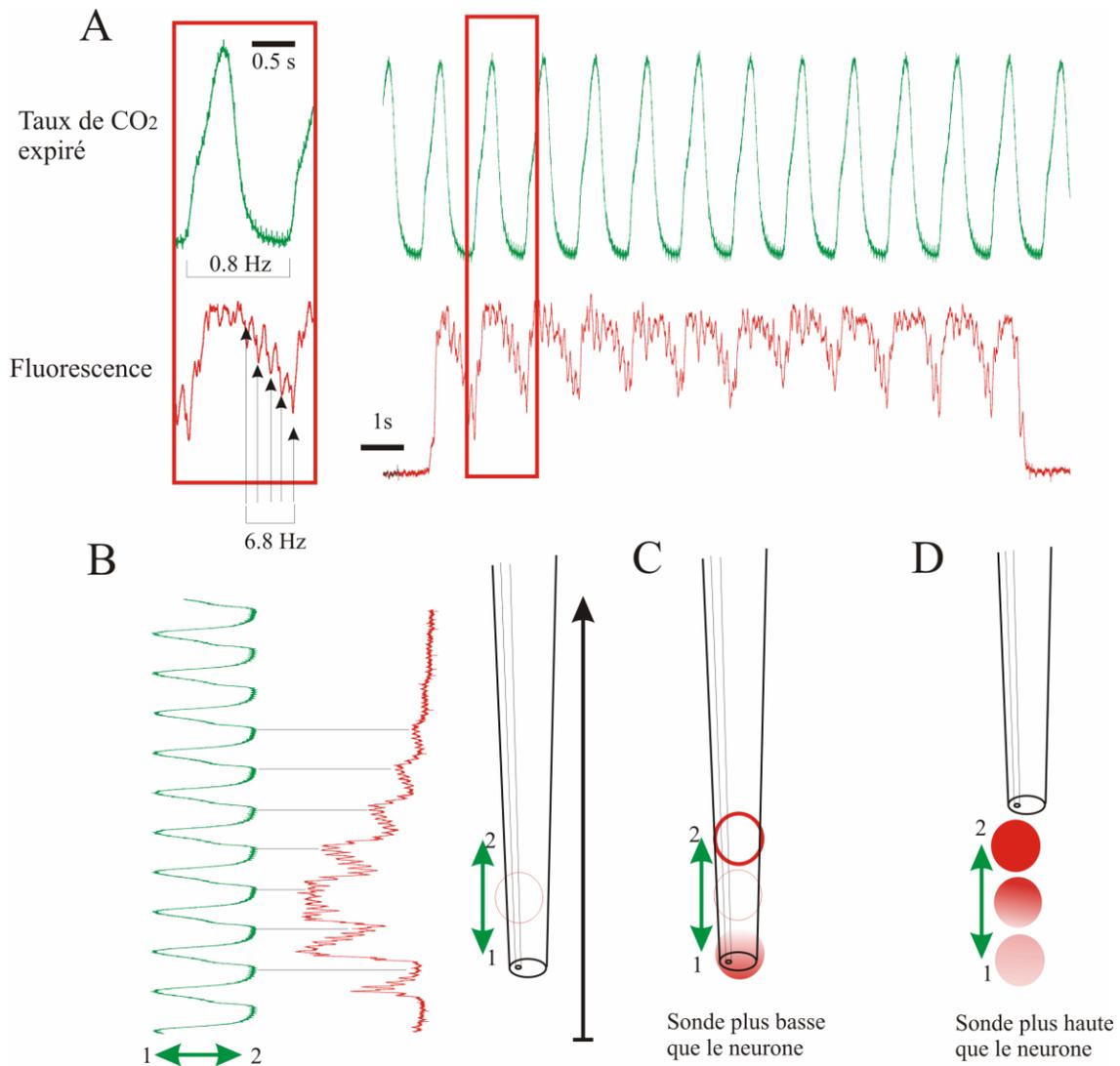


Figure 4.7 Artéfact des mouvements physiologiques de l'animal. **A** Exemple montrant la synchronisation entre les variations à basse fréquence (0.8Hz) du signal optique et le rythme respiratoire, lorsqu'une microsonde est placée devant un neurone fluorescent. Des oscillations de plus haute fréquence (6.8Hz) et de plus petite amplitude sont aussi présentes et coïncident avec le rythme cardiaque du rat. **B** Les deux courbes représentent le rythme respiratoire (taux de CO₂ en vert) et le signal optique (en rouge) lors du déplacement de bas en haut (flèche noire) d'une microsonde par rapport à un neurone fluorescent. La flèche verte extrapole les variations de position du neurone causées par la respiration, par rapport à la sonde. Lorsque la sonde est plus basse que le neurone, les maxima et les minima sont en phase et lorsque la sonde est plus haute que le neurone, la situation est inversée. Ceci s'explique aisément si les mouvements respiratoires font baisser le neurone en 1 et le font monter en 2. **C** Lorsque la sonde est plus basse que le neurone, les mouvements vers le bas (1) rapproche le neurone de la sonde et font augmenter le signal. **D** Lorsque la sonde est plus haute que le neurone, mouvement vers le bas (1) éloigne le neurone de la sonde et font décroître le signal détecté.

Les signaux électriques détectés peuvent aussi être influencé par les mouvements physiologiques, mais ils semblent être moins sensibles que les signaux optiques. La figure 4.8 A montre un cas où le signal électrique n'est pas influencé significativement par les mouvements physiologiques, alors que le signal optique varie en phase avec la respiration. Ceci montre qu'il y a une différence de sensibilité entre les deux types de signaux. Cependant, les signaux électriques peuvent aussi être influencés par les mouvements respiratoire; l'amplitude des potentiels d'action détectés est en phase avec la respiration dans certains cas (figure 4.8B). L'influence des mouvements cardiaques n'a jamais été remarquée, probablement que ces variations font partie intégrante du bruit électrique. Ces deux cas illustrent la tendance des signaux électrophysiologiques à être plus ou moins affectés par les mouvements physiologiques par rapport aux signaux optiques. Ceci est probablement dû aux propriétés non-directionnelles de ce mode de détection. La sensibilité à la position de la microsonde est moindre pour la partie électrophysiologique que pour la partie optique.

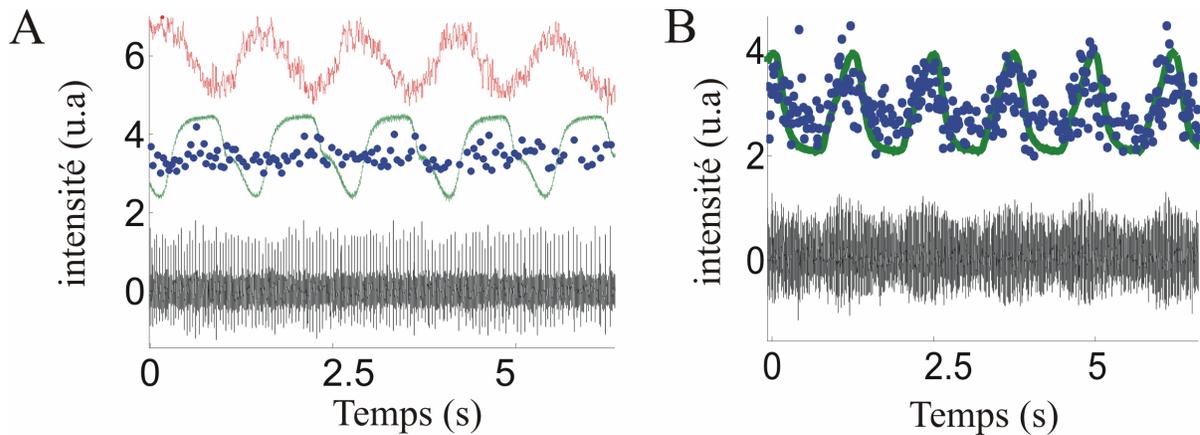


Figure 4.8 Influence du rythme respiratoire sur les enregistrements électriques. **A** Les mouvements respiratoires influencent peu la détection électrique (noir) alors que le signal optique (rouge) varie en phase avec la respiration. Les points bleus représentent l'amplitude crête à crête des potentiels d'action détectés. **B** Exemple où l'amplitude des potentiels d'action enregistrés (points bleu) varie en phase avec le rythme respiratoire.

4.1.5 Critère de co-localisation

Après avoir montré la détection de neurones de manière électrique et optique, l'objectif était de trouver un moyen de reconnaître si les deux signaux provenaient du même neurone. Pour se faire, nous proposons d'utiliser le seul degré de liberté disponible lors de la détection, soit le positionnement de la microsonde selon l'axe de déplacement. Selon les critères de détection électrique et optique, il est possible d'approximer la position des neurones selon l'axe de déplacement de la sonde (position axiale) en fonction de l'intensité du signal détecté. Électriquement, étant donné que la source des potentiels d'action est émise au niveau du corps cellulaire ²⁴, l'endroit où l'amplitude des potentiels d'action est maximale permet d'approximer la position axiale du neurone source. Optiquement, plus la microsonde est proche de la source, plus l'amplitude du signal est grande; l'endroit où l'amplitude du signal optique est maximale permet ainsi d'approximer la position axiale du neurone source. Toutefois, la position des deux maxima peut différer à l'intérieur du corps cellulaire, dépendamment de la forme, de la distribution de fluorophore et/ou de la position du cône d'émergence (figure 3.1). Cependant, les maxima devraient quand même être situés à l'intérieur du soma.

Si le signal optique et électrique provient du même neurone, les maxima des deux signaux devraient être spatialement superposés selon l'axe de descente de la microsonde. Étant donné que la source des deux signaux devrait être émise au corps cellulaire, les deux maxima devraient normalement être détectés à l'intérieur d'un diamètre de soma. Il s'agit là du concept de base du critère spatial de co-localisation, celui-ci sert à approximer si deux signaux proviennent du même neurone.

Comme la dimension des corps cellulaires est dépendante de la population de neurones en cause, il faut bien quantifier la taille de cette population. Pour se faire, il faut procéder à une étude histologique des neurones fluorescents étudiés (section 4.1.1 et annexe A). Dans le cas des neurones de projection spino-thalamique, le corps cellulaire moyen est de 24.2 μm (D.S.=6.2 μm) et 90% des neurones ont un diamètre de plus de 16 μm . Suite à cette quantification, il fallait établir un diamètre servant de limite de distance permettant de considérer que deux maxima proviennent du même neurone. Les deux mesures envisagées étaient : le diamètre moyen et la distance pour laquelle 90% des somas sont plus grands. Afin de minimiser les faux positifs, nous avons fixé que la distance à considérer pour établir le critère de co-localisation, doit être plus petite que le diamètre de 90% de la population en cause.

Il est à noter qu'il est possible qu'un autre neurone soit exactement à la même position axiale, mais qu'il soit décalé transversalement. C'est principalement pour cette raison que nous parlerons de haute probabilité de co-détection.

Donc, lors de la détection d'un neurone fluorescent unitaire et de potentiels d'action, nous proposons un critère de localisation spatiale permettant d'établir, avec une haute probabilité, si les potentiels d'action proviennent du neurone fluorescent ou non. Pour les neurones de projections spino-thalamiques, nous considérons qu'il y a une haute probabilité que les signaux optiques et électriques proviennent du même neurone si la distance entre les maxima est plus petite que 16 μm .

4.1.6 Enregistrements optiques et électriques en parallèle.

Cette section vise à mettre en application le critère de co-localisation pour déterminer quels enregistrements peuvent être considérés comme provenant du même neurone. Lors de l'ensemble des expérimentations sous ce paradigme (N=13 Rats), 155 neurones électriques et 87 optiques ont été enregistrés. Lors de la détection d'un neurone, trois cas de figure pouvaient survenir : 1- la détection électrique seule (un neurone déchargeant des potentiels d'action), 2- la détection optique seule (un neurone fluorescent ne décharge pas de potentiel d'action), 3- la détection d'un neurone optique et électrique (deux neurones à la suite de l'autre ou le même neurone). Cette section s'intéresse au troisième cas; différents résultats seront analysés en utilisant le critère de co-localisation.

Différents types d'enregistrements sont possibles. La sonde peut enregistrer électriquement n'importe quels neurones dans son champ de détection, dont la plus part ne sont pas fluorescent. Il est aussi possible d'enregistrer des neurones seulement de manière optique. Ceux-ci peuvent être marqués de fluorescence et ne pas répondre aux stimuli de la patte lors de l'enregistrement ; ils peuvent être relié à d'autres régions sensorielles comme la queue, il peuvent être sensibles à d'autres stimuli comme la chaleur ou le froid, ou encore ils peuvent malheureusement être mort et toujours fluorescent. Donc, il arrivait régulièrement d'enregistrer des neurones électriques seuls et optiques seuls, mais régulièrement des réponses optiques et électriques s'enregistraient très près l'une de l'autre. Dans ces cas, en utilisant le critère de co-localisation, certaines réponses étaient considérées comme provenant du même neurone (figure 4.9), tandis que d'autres étaient considérées comme des neurones séparés (figure 4.10).

Dans certains cas, les réponses optiques et électriques étaient considérées comme provenant du même neurone. Le critère de co-localisation fut utilisé pour évaluer si deux enregistrements proviennent du même neurone. Comme présenté précédemment, il est possible d'approximer le maximum de signal optique et du signal électrique, puis de calculer la distance entre les deux. Dans le cas présent, si la distance est plus petite que 16 μm , les deux signaux sont considérés comme provenant du même neurone. À l'aide de ce critère, 12 des 87 neurones optiques détectés ont été identifiés comme déchargeant des potentiels d'action lors de l'enregistrement. Lorsqu'un neurone optique était détecté, un stimulus (toucher et/ou pincer la patte) était appliqué sur la patte pour tenter de faire décharger des potentiels d'action ¹⁵⁰. La figure 4.9 donne trois exemples de ces neurones. Les figures du haut (4.9 A, C et E) représentent les signaux optiques et électriques en fonction du temps alors que la microsonde se déplace. On peut ainsi voir que l'amplitude des potentiels d'actions augmente simultanément avec le signal optique. Les figures du bas (4.9 B, D et F) montrent le signal optique, le signal électrophysiologique et l'amplitude des potentiels d'action détectés en fonction de la position axiale de la sonde. Le déplacement à vitesse constante de la sonde a permis de convertir le temps en position (annexe D). Avec cette représentation spatiale des signaux, il est possible de déterminer la distance entre les maxima. Pour les trois cas présentés à la figure 4.10, la distance intermaximum est entre 1 et 13 μm . Pour chaque cas, il est donc considéré comme hautement probable qu'il s'agisse de l'enregistrement d'un neurone fluorescent déchargeant des potentiels d'action.

Il est à noter qu'il est possible de modifier la distance critique de co-localisation en changeant les critères de sélection du diamètre minimal. Par exemple, si on utilise le diamètre moyen de la population neuronale en cause, soit 24 μm au lieu de 16 μm , 16 neurones optiques au lieu de 12 peuvent être considérés comme déchargeant des potentiels d'action lors de l'enregistrement. Par contre, nous considérons qu'il est préférable d'utiliser un critère plus restrictif afin de minimiser les faux positifs, ce qui a motivé le choix d'établir un diamètre devant inclure 90% des neurones de la population en cause.

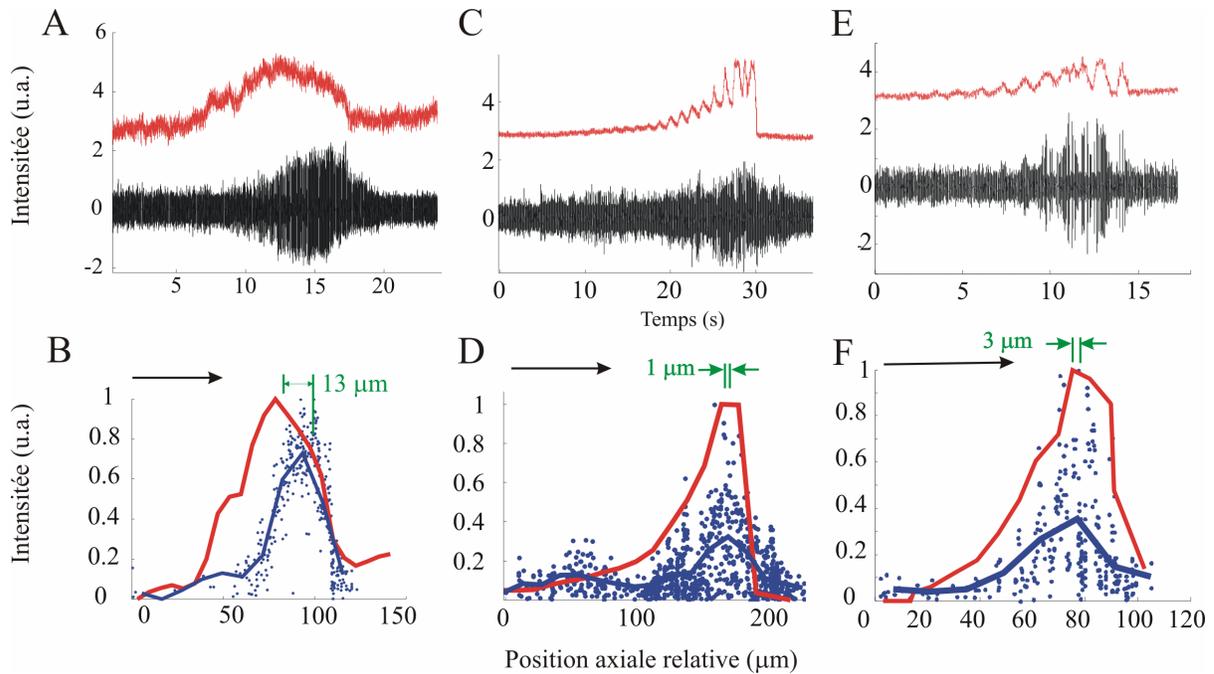


Figure 4.10 Trois cas où les signaux optiques et électrophysiologiques sont détectés simultanément. **A-B, C-D, E-F** Trois enregistrements considérés, selon les critères de co-localisation, comme la détection d'un neurone optique qui émet des potentiels d'action. **A-B** Cas un, la distance entre les maxima est de 13 μm. **C-D** Cas deux, la distance entre les maxima est de 1 μm. **E-F** Cas trois, la distance entre les maxima est de 3 μm. Pour chacun de ces trois cas, il est considéré hautement probable que les signaux proviennent du même neurone. (**Tracé du haut; A-C-E**) Les enregistrements sont présentés de manière temporelle lors du déplacement axial de la microsonde. (Rouge) signal optique (Noir) signal électrophysiologique. (**Tracé du bas; B-D-F**) Les enregistrements sont présentés en fonction de la position à laquelle les signaux ont été enregistrés lors de la descente. (Rouge) signal optique moyenné sur un cycle de respiration. (bleu) Amplitude du signal électrophysiologique (point bleu) amplitude des potentiels d'action enregistrés.

Dans certains cas, la distance entre les maxima est plus grande que le critère proposé. Dans ces cas, les réponses optiques et électriques sont trop éloignées, selon le critère, pour être considérées comme provenant du même neurone. Il y a deux classes de neurones rejetés par le critère de co-localisation : ceux très éloignés qui ne proviennent définitivement pas du même neurone et ceux plutôt rapprochés qui sont potentiellement des faux négatifs (ils sont peut-être le même neurone). Dans le premier cas, la distance entre les maxima est si éloignée qu'il n'est pas raisonnable de croire que ces deux signaux proviennent du même neurone. Par exemple, la figure 4.10 A-B montre un enregistrement optique et électrique où les maxima sont à 66 μm l'un de l'autre. Cette distance est près de 3 fois le diamètre moyen et 1.5 fois le plus gros diamètre mesuré. Dans le deuxième cas, les cas ambigus, la distance

inter-maxima est plus petite que certains diamètres de neurones (le neurone le plus large à $40\ \mu\text{m}$). Prenons par exemple le cas de la figure 4.10 C-D, ces signaux optiques et électriques ne sont pas considérés comme provenant du même neurone par le critère de co-localisation, mais il est possible qu'il s'agisse du même neurone. Ces faux négatifs potentiels ont été volontairement exclus à l'aide d'un critère plus restrictif que moins. Il permet ainsi de minimiser les faux positifs. L'exemple de la figure 4.10 E-F montre bien les enregistrements de trois neurones successifs, un optique et deux électriques. Le critère de co-détection considère que la distance entre les maxima est trop grande pour qu'il soit hautement probable que ces signaux proviennent du même neurone. Mais il est à noter que la distance entre le neurone optique et le premier électrique est plus petite que certains neurones spinothalamiques. Cependant, ces cas sont par mesures restrictives systématiquement rejetés par l'analyse à base du critère de co-détection.

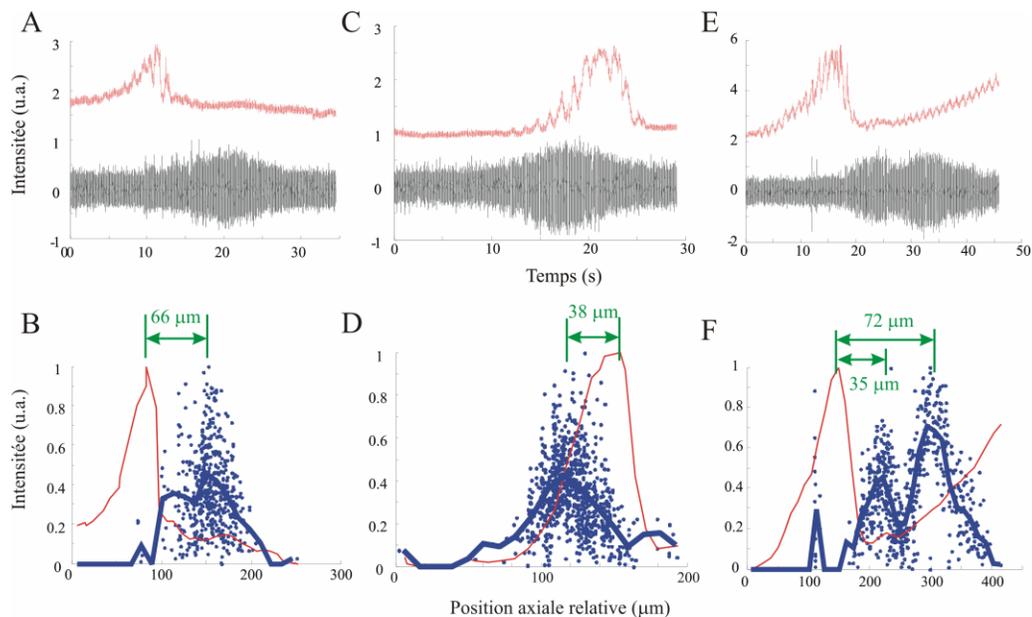


Figure 4.10 Trois cas où les signaux optiques et électrophysiologiques sont détectés non simultanément. **A-B, C-D, E-F** Trois enregistrements considérés, selon les critères de co-localisation, comme la détection de différents neurones. **A-B** Cas un, distance entre les maxima de $66\ \mu\text{m}$. **C-D** Cas deux, distance entre les maxima de $38\ \mu\text{m}$. **E-F** Cas trois, distance entre les maxima optiques et électriques est de $35\ \mu\text{m}$ et $72\ \mu\text{m}$. Pour chacun de ces trois cas, il est considéré improbable que les signaux proviennent du même neurone, car la distance est trop grande entre les maxima. (**Tracé du haut; A-C-E**) Les enregistrements sont présentés de manière temporelle lors du déplacement axial. (Rouge) signal optique (Noir) signal électrophysiologique. (**Tracé du bas; B-D-F**) Les enregistrements sont présentés en fonction de la position auquel ils ont été enregistrés lors de la descente. (Rouge) signal optique moyenné sur un cycle de respiration. (bleu) Amplitude du signal électrophysiologique (point bleu) amplitude des p.a.

Comme il serait redondant de présenter la quarantaine d'enregistrements optiques et électriques en parallèle, la plupart des enregistrements ne seront pas inclus dans cette thèse. Il est cependant intéressant de montrer certains cas spéciaux.

Le premier cas spécial (figure 4.11 C) montre que les enregistrements de la sonde ne subissent peu ou pas d'hystérésis lors de passage dans un sens axial et puis dans le sens inverse. Ainsi, il est possible d'enregistrer dans les deux sens; il faut seulement tenir compte que les enregistrements optiques ne sont pas symétriques selon le sens de déplacement (figure 4.6 C). Cette propriété a été plusieurs fois confirmée lors des expériences. Des enregistrements aller-retour comme ce dernier montrent aussi que le neurone n'est pas trop affecté par le passage de la fibre et celui-ci continue de décharger électriquement. Ce type d'enregistrement multiple montre aussi l'utilité du critère de co-localisation afin de définir si des signaux proviennent ou non du même neurone. Dans ce cas, le critère de co-localisation suggère que les neurones identifiés comme E2 et O2 soient en effet le même neurone.

Le second cas spécial (figure 4.11 A-B) montre un enregistrement électrique qui débute directement lorsque l'enregistrement optique décroît. Cet enregistrement électrique est typique d'une décharge de potentiels d'action survenant lors de la mort d'un neurone ou lorsque ceux-ci sont gravement abîmés. Ce type d'enregistrement porte à croire que la microsonde avançait en face d'un neurone qui ne déchargeait pas électriquement, et puis lorsque le neurone fut déplacé hors du champ de détection optique, celui-ci aurait été malmené et il se serait mis à décharger.

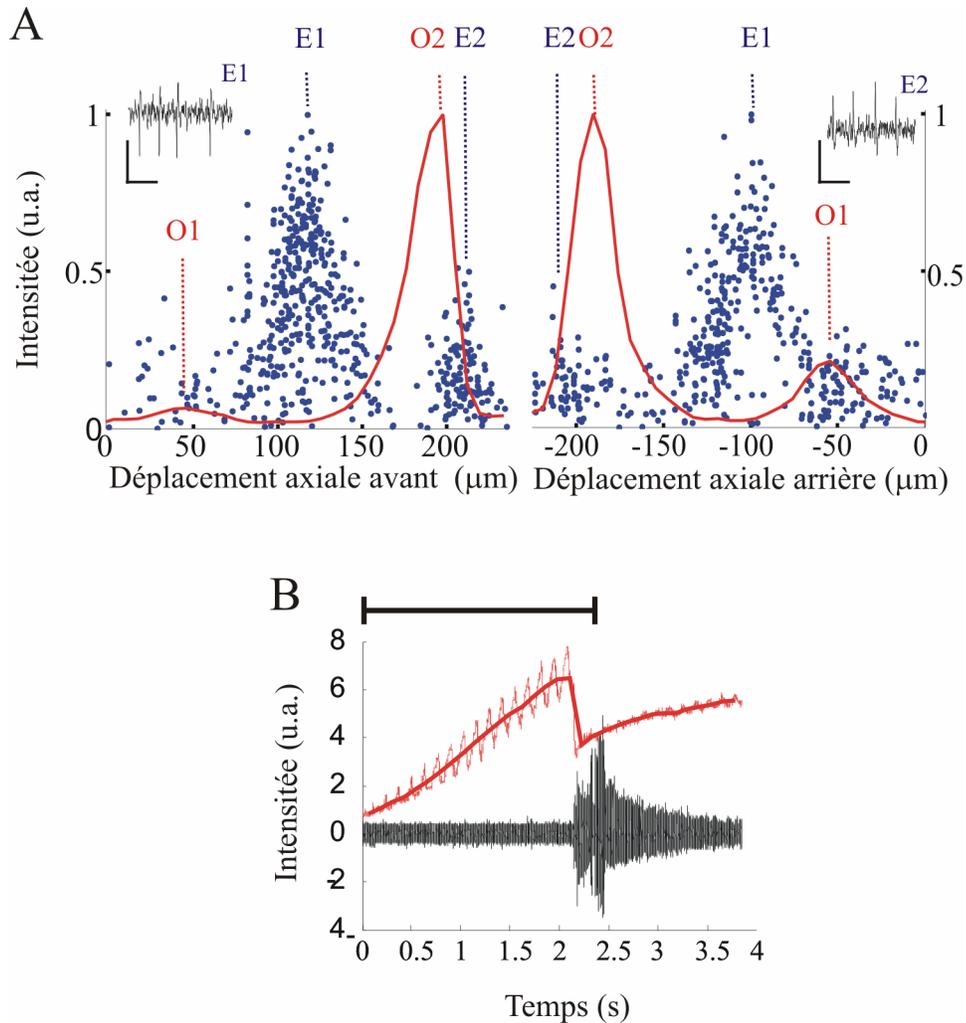


Figure 4.11 **A** Unités successives détectées optiquement et électriquement lors d'un déplacement axial de $225 \mu\text{m}$ vers le bas (**gauche**) et un retour à la position initiale en remontant la microsonde (**droite**). Le patron d'intensité est similaire dans les deux directions de déplacement, indiquant un minimum d'hystérésis. E1 et E2 représentent deux neurones détectés électriquement et O1 et O2 représentent deux neurones détectés optiquement. La distance entre E1 et O1 était de $58 \pm 4 \mu\text{m}$ et celle entre E1 et O2 était de $85 \pm 4 \mu\text{m}$. Le critère de co-localisation suggère donc que ces signaux ne proviennent pas du même neurone. Cependant, la distance entre E2 et O2 est de $16 \mu\text{m}$, ce qui suggère que ces signaux proviennent du même neurone. Les potentiels d'action de E1 et E2 sont présentés dans les coins du haut à droite et à gauche. Les barres d'échelles sont de : 0.1 mV and 4 ms . **B** Détection optique et électrique de signaux indiquant, selon le critère de co-localisation, qu'ils proviennent du même neurone. La barre noire indique un déplacement axial continu de $100 \mu\text{m}$ de la microsonde en direction du neurone. Cet enregistrement porte à croire qu'un neurone optique est détecté et qu'au moment où il dépasse le neurone, celui-ci est abîmé et il se met à décharger des potentiels d'action. Ce type de cas survient rarement.

4.2 RÉSULTATS DANS LE CERVEAU DE SOURIS TRANSGÉNIQUES

Pour faire suite aux enregistrements de neurones dans la moelle épinière, il était intéressant de tester la microsonde dans le cerveau. En utilisant des souris modifiées génétiquement GAD65-EGFP+, cela permettait de tester plusieurs aspects de la détection. Ces souris (annexe C.2) ont environ 70% de leurs cellules GABAergiques qui expriment la protéine EGFP¹⁰³. Cette expérience mettait la microsonde à l'épreuve dans le cerveau tout en testant un autre fluorophore qui était introduit par la technologie génétique. De cette façon, il était possible de montrer que cette méthode était potentiellement utilisable pour une large gamme d'animaux génétiquement modifié afin d'identifier une population cellulaire par fluorescence.

4.2.1 Enregistrement optique et électrique

Afin de tester la microsonde dans un autre paradigme expérimental, une série d'expérience ont été réalisées dans le réticulum thalamique où se trouvait une bonne population de neurone GABAergique exprimant la protéine EGFP. Ces expériences ont été réalisées dans le laboratoire du Pr. Martin Deschênes en collaboration avec Maxime Demerse. Il est à noter que certaines cellules optiques et électriques ont été obtenues indépendamment par Suzie Dufour et Maxime Demerse. Ma contribution dans ces expériences consistait à concevoir les expériences, à fabriquer les microsondes, à régler le système optique et à faire les enregistrements électrophysiologiques. Le diamètre moyen du corps cellulaire de ces neurones étaient de $12.4 \pm 2.3 \mu\text{m}$ (n=41 cellules; **annexe A.2**). Les microsondes utilisées ici avaient un diamètre final entre 6 et 10 μm afin d'être plus petite que les neurones de la population visée.

La première étape était de confirmer que la microsonde pouvait enregistrer des potentiels d'action unicellulaire dans ces conditions. Les résultats ont montrés que la sonde pouvait enregistrer électrophysiologiquement un neurone avec un bon ratio signal sur bruit (figure 4.12 A). Comme pour les enregistrements dans la moelle épinière, un ratio de 4 fut considéré comme le critère minimum de détection. Il est à noter que, les enregistrements montrent une tendance à obtenir plus facilement des neurones unitaires (un seul à la fois) avec des sondes plus petites que 10 μm .

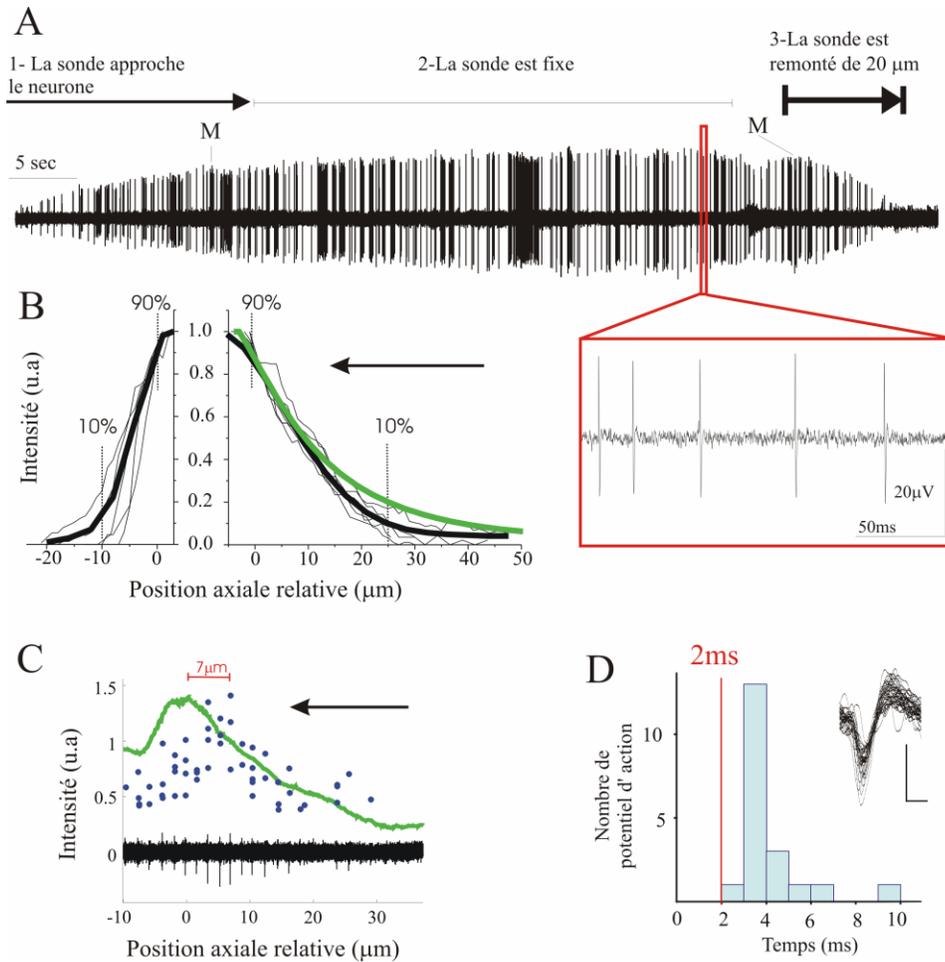


Figure 4.12 Enregistrements *in vivo* dans le cerveau d'une souris GAD-EGFP A Enregistrement électrophysiologique d'un neurone. L'étape 1 montre la détection d'un neurone lorsque la sonde approche celui-ci. En se déplaçant, la sonde détecte un maximum (M) de signal des potentiels d'action et s'y arrête. L'étape 2 montre l'enregistrement lorsque la sonde est fixe au maximum. L'étape 3 montre l'enregistrement lorsque la sonde se redéplace pour optimiser le maximum (M) et s'éloigne du neurone de 20 μm à vitesse constante. La dernière étape montre un profil de détection électrique en fonction de la position relative. B Détection normalisée de la fluorescence en fonction de la position relative de la microsonde (ligne mince noire). La courbe moyenne (ligne noir grosse) et la simulation numérique (ligne verte) concordent. B-droite Lorsque la sonde approche le neurone, le signal passe de 10 à 90% du maximum en $26 \pm 2 \mu\text{m}$ (moyenne \pm SD; $n=6$). B-gauche Lorsque la sonde passe les neurones, le signal optique diminue de 90 à 10 % sur $10 \pm 4 \mu\text{m}$ (moyenne \pm SD; $n=5$). C Signaux optiques et électriques représentés en fonction de la position de la microsonde lors d'une insertion dans le réticulum thalamique. Le maximum des deux courbes est situé à $7 \pm 2 \mu\text{m}$, cette distance est sous le critère de co-localisation. Ceci indique que ces signaux sont considérés comme provenant du même neurone. D L'histogramme de l'intervalle du temps entre deux potentiels d'action (l'intervalle est $< 2 \text{ ms}$) et la forme similaire de 26 p.a. consécutifs confirme que les signaux en C proviennent d'enregistrement unicellulaire. Barre échelle : 20 μV et 0.5 ms.

La deuxième étape était de confirmer qu'il était possible d'enregistrer des neurones fluorescents dans ces conditions. Les résultats optiques ont montré que la sonde permettait de détecter les présents neurones avec un bon ratio signal sur bruit. Comme pour les enregistrements dans la moelle épinière, un ratio de 9 fut considéré comme le critère minimum de détection. Les profils de détection ont été analysés de la même manière que les précédents résultats optiques. Lors que la sonde approchait les neurones, le signal de fluorescence s'élevait de 10 à 90% de la valeur maximale sur une distance de $26 \pm 2 \mu\text{m}$ ($n=6$) et lorsque la microsonde dépassait les neurones le signal décroissait de 90 à 10% sur $10 \pm 4 \mu\text{m}$ ($n=5$) (figure 4.12 B). La distance de détection est réduite par rapport aux enregistrements dans la moelle épinière, ce qui est prévisible, car les neurones et les sondes étaient de plus petits diamètres. Ces résultats concordent avec les prévisions faites à l'aide des simulations numériques (figure 4.12 B). Le critère de détection optique dans le cerveau fut donc établi de la sorte : le signal devait augmenter de 9 fois le bruit de base à l'intérieur d'une distance de $50 \mu\text{m}$, puis redescendre dans les $25 \mu\text{m}$. Il est à noter que, ces signaux enregistrés ne sont pas significativement influencés par les mouvements physiologiques.

La troisième étape était d'enregistrer optiquement et électriquement la même cellule selon le critère de colocalisation (sous-section 4.1.5). Il fallait ainsi définir, dans les présentes conditions, la distance maximale de détection permise par le critère. Soit la distance maximale qui est plus petite que le diamètre de 90% de la population des neurones marqués GFP dans le réticulum thalamique. Ce qui donne un critère de co-localisation de $10 \mu\text{m}$ pour cette population de neurone (annexe A). Les expériences sur les souris GAD65-EGFP+ ont permis d'obtenir $n=10$ enregistrements où les signaux optiques et électriques étaient rapprochés. Cinq de ces cas furent confirmés positifs par le critère de colocalisation. La figure 4.12 C montre un exemple où la distance de $7 \mu\text{m}$ entre les maxima des deux signaux laisse supposer qu'ils proviennent du même neurone. Il est donc possible d'utiliser la microsonde et d'appliquer le même critère de colocalisation pour l'identification unicellulaire de neurone fluorescent provenant d'animaux transgéniques.

Les deux principaux obstacles pour cette série d'expérience étaient que nous avions peu de souris disponibles ($N=4$) et que celles-ci ne survivaient que 2-3 heures lors des expériences. Ce qui fut deux sérieux problèmes qui se cumulaient pour donner la même conséquence : le manque de temps pour expérimenter. Nous avons eu le temps d'effectuer seulement 9 descentes en moyennes par souris. Des conditions qui étaient très difficiles

considérant qu'il fallait : débroussailler les problèmes inhérents à un nouveau type d'expérience, utiliser des sondes plus petites (plus difficile à produire), retrouver à chaque expérience le réticulum thalamique et que les neurones de la zone enregistrée étaient en mode d'autodécharge (ils n'étaient pas stimulés électriquement de manière externe). Malgré tout, il fut possible d'enregistrer des neurones optiquement et électriquement et de montrer qu'il était possible d'obtenir un enregistrement satisfaisant le critère de co-localisation.

Il est à noter qu'en novembre 2009, dû à la disponibilité d'une nouvelle série de souris GAD65-EGFP+, d'autres souris (N=3) ont été enregistrées par Suzie Dufour et Maxime Demers toujours dans le laboratoire du Pr. Matrin Deschênes, ce qui a permis de faire passer le nombre de cellule enregistrées en parallèle de n=3 à n=10.

4.3 CONCLUSIONS

Le premier objectif des enregistrements *in vivo* fut atteint en montrant que la microsonde est capable d'enregistrer des signaux électrophysiologiques extracellulaires de manière unicellulaire. Ces enregistrements sont parfaitement acceptables pour des études électrophysiologiques avec un ratio signal sur bruit moyen de 7.6. Nous avons utilisé trois types de critères afin d'identifier si un enregistrement est unicellulaire. Ces critères sont fonction de la forme, de l'amplitude et du délai entre les potentiels d'action détectés. Les signaux électrophysiologiques provenant d'un seul neurone possèdent un patron de détection qui varie en fonction de la position de la microsonde par rapport à la cellule. Ce patron est symétrique et donne systématiquement un seul maximum. Nous considérons la position de ce maximum d'intensité comme un indicateur permettant de localiser en profondeur des neurones enregistrés. Les résultats ont montrés que la microsonde permet la détection électrophysiologique de neurones de gros diamètres dans la moelle épinière et de neurones de plus petits diamètres dans le cerveau.

Le second objectif était de détecter optiquement des neurones *in vivo* et de caractériser leur détection. Des neurones ont bel et bien été détectés et une analyse quantitative des profils de détection a permis d'établir un critère de détection optique selon la variation de l'amplitude du signal détecté. L'amplitude doit minimalement augmenter et redescendre de 9 fois le bruit de base et cette amplitude doit avoir un profil de variation spatiale spécifique, qui est dépendant de la population de neurones enregistrés. Les distances de détection sont établies selon les populations neuronales, car le diamètre des neurones et des sondes utilisées font varier les profils de détection. Pour les neurones spinothalamiques, le

signal optique devait augmenter à l'intérieur d'une distance de 100 μm , puis redescendre dans les 50 μm . Tandis que, pour les neurones du réticulum thalamique le signal optique devait augmenter à l'intérieur d'une distance de 50 μm , puis redescendre dans les 25 μm . Ce signal a donc un maximum lorsque la sonde est directement collée sur le neurone, ce qui fait de ce maximum une excellente approximation de la position axiale du neurone fluorescent. Le critère optique a permis d'obtenir une référence permettant d'identifier optiquement des neurones *in vivo*.

Certains points se sont révélés importants à prendre en compte lors de la détection de neurones *in vivo*. Le profil du signal optique est asymétrique, car il augmente et diminue différemment en fonction du sens de détection. Ceci est dû aux propriétés directionnelles de détection de la microsonde. Les mouvements physiologiques de l'animal peuvent influencer l'enregistrement des signaux. Ce type d'artefact est principalement retrouvé dans les enregistrements de la moelle épinière. Ils sont dus à la respiration et aux battements cardiaques. Il y a aussi une faible augmentation du signal de fluorescence de base au fil de la descente de la microsonde, cette augmentation est probablement due à la faible contribution du signal optique ne provenant pas directement en face de la pointe.

Le troisième objectif de ce chapitre était de détecter en parallèle des neurones optiques et électriques, puis de trouver un moyen permettant d'associer les potentiels d'action enregistrés à un neurone fluorescent. Il fut montré, que ce type d'enregistrement était possible ; plusieurs résultats optiques et électriques ont été obtenus. Un critère spatial fut proposé comme moyen d'évaluer si deux enregistrements proviennent d'un même neurone. Ce critère quantitatif est basé sur la distance entre les maxima des profils d'enregistrements optiques et électriques. Comme ces maxima sont supposés se situer au corps cellulaire du neurone, la distance entre ces maxima ne devrait pas être plus grande que le diamètre d'un neurone. Comme le diamètre des neurones est variable, nous proposons d'utiliser une distance plus petite que 90% des diamètres de neurone de la population recherchée. Ceci implique une caractérisation optique et histologique de la population en cause. Ce critère de co-localisation a été appliqué à l'ensemble des résultats où les deux types d'enregistrement étaient retrouvés en parallèle. Dans ces conditions, 12 neurones fluorescents sur 87 ont été identifiés comme émettant des potentiels d'action dans la moelle épinière de rat et 5 neurones fluorescents sur 10 l'ont été dans le cerveau de souris génétiquement modifiées. Nous croyons que ce critère est assez restrictif et qu'il minimise les faux positifs. Il est cependant impossible d'assurer qu'il s'agit du même neurone, c'est pour cette raison que nous considérons qu'il est hautement probable que les

enregistrements répondant au critère proviennent de la même cellule. Le meilleur moyen d'augmenter la certitude de la corrélation serait d'utiliser des systèmes de détection optique et électrique qui ont une dynamique qui est interreliée, comme les marqueurs fonctionnels^{35,55-58} ou encore les canaux ioniques photoactivables²⁶.

Le quatrième objectif était d'utiliser la microsonde sous un autre paradigme pour tester ces propriétés dans d'autres conditions. Il fut donc choisit de travailler dans le cerveau de souris transgéniques GAD65-EGFP+. Cette nouvelle série d'expérience apportait principalement quatre nouveaux aspects expérimentaux. Il s'agissait de souris en non plus de rats, les enregistrements étaient faits dans le cerveau au lieu de la moelle, le fluorophore utilisé était de la EGFP à la place du DiI et la technique de marquage était une méthode génétique visant une population cellulaire très spécifique qui ne nécessite pas d'intervention chirurgicale. Malgré ces changements importants, il fut possible d'adapter la microsonde et le système de détection pour obtenir des résultats similaire à ceux obtenus dans la moelle épinière. Ceci montre que cette technique est adaptable à diverses expériences, ce qui ouvre la porte à toute la gamme des animaux génétiquement modifiés pour être fluorescent.

CHAPITRE 5

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVE DE RECHERCHE

Ce chapitre est une discussion rétrospective du projet de recherche présenté dans cette thèse et présente une perspective sur les améliorations potentielles et sur les expériences réalisables afin de poursuivre ce travail.

5.1 CONCLUSIONS

Une caractérisation efficace de chaque type cellulaire *in vivo* est un défi, car les neurones d'intérêts sont souvent dispersés à l'intérieur d'une population cellulaire hétérogène. Les populations neuronales ont chacune leurs propriétés fonctionnelles, morphologiques, biochimiques et physiologiques. En électrophysiologie, il importe donc de développer des moyens pour d'identifier le type cellulaire enregistré, mais les façons d'y parvenir sont limitées. Les trois techniques traditionnelles sont : l'activation antidromique^{99,100}, l'activation orthodromique¹⁰¹ et le marquage cellulaire *a posteriori*¹⁰². La récente venue des marqueurs neuronaux fluorescents a ouvert une nouvelle porte à l'identification cellulaire^{45,52-54,60,103-107}. Cette technique est indépendante des connexions, très spécifique aux populations, et permet plus d'un type de marquage par cellule. Elle est déjà utilisée pour l'identification des cellules lors d'enregistrement électrophysiologique *in vitro*¹¹⁰ et *in vivo*⁷⁸. Par contre, les applications *in vivo* en profondeur sont optiquement limitées. Une avenue est proposée pour outrepasser cette limitation.

Cette thèse propose une nouvelle technologie de microsonde et vise à démontrer deux habiletés *in vivo* de cette-ci. La microsonde peut enregistrer la fluorescence provenant d'un seul neurone et elle peut parallèlement enregistrer les potentiels d'actions provenant d'un neurone unitaire. Cette thèse présente aussi un critère de colocalisation des signaux optiques et électrophysiologiques permettant de supposer que deux signaux proviennent du même neurone ou non. Cette habileté permet de relier, avec une haute probabilité, des signaux électrophysiologiques à un neurone marqué de fluorophore.

Voici les principales conclusions par rapport à chacun des trois principaux points abordés, soit : la méthodologie de fabrication des microsondes, les propriétés optiques de la microsonde et la preuve de concept de l'enregistrement optique et électrophysiologique *in vivo*.

5.1.1 Méthodologie

Le présent travail expose une méthode permettant de produire des microsondes optiques et électrophysiologiques. Ces microsondes sont basées sur une fibre optique originale ayant deux cœurs : l'un optique pouvant guider la lumière et l'autre creux pouvant être remplis d'électrolyte pour servir d'électrode. Une extrémité de la sonde est en forme de pointe ayant un diamètre final de l'ordre de grandeur du corps cellulaire de neurones (5 et 25 μm) et l'autre extrémité est relié à un montage d'acquisition des données optiques et électriques. Un montage optique permet d'injecter une lumière laser (532 et 488 nm) dans la microsonde servant à l'illumination locale des fluorophores (DiI et GFP) situés dans les neurones. Cette fluorescence peut être récoltée par la microsonde en parallèle avec des signaux électrophysiologiques.

La fabrication des fibres à deux cœurs fut faite en collaboration avec l'INO, car ils possédaient l'expertise essentielle à la production d'une telle fibre non traditionnelle. Trois générations de tirage de fibre ont été nécessaires afin d'obtenir la fibre désirée. Une quatrième génération fut aussi produite, ce qui a permis de montrer que le procédé était reproductible et qu'il était possible de faire des ajustements fins sur les différents paramètres.

La méthodologie présentée ici permet de produire de manière reproductible ces microsondes. Pour chacune des étapes de la fabrication, un protocole expose clairement les différentes techniques de fabrication utilisées. La fibre à deux cœurs est coupée en courte section (6-7 cm) puis étirée à l'aide d'une tireuse laser, ce qui permet d'obtenir une pointe submicrométrique. Suite à cela, une surface abrasive en rotation polit la pointe pour obtenir un diamètre de l'ordre de 5 à 25 μm . La pointe est plongée dans un électrolyte (1-3 M NaCl) pour en remplir le cœur creux. Un fil de 50 μm , inséré par l'autre extrémité, fait la jonction électrique entre l'électrolyte et le système d'acquisition électrique. Le cœur optique est aligné avec une fibre de jonction pour connecter la section de fibre à deux cœurs avec un montage optique. Le montage permet d'injecter la lumière nécessaire à l'excitation des fluorophores jusqu'au bout de la pointe et de collecter la fluorescence guidée depuis le bout

de la pointe jusqu'à un détecteur. Ce chapitre montre qu'il est possible de produire des microsondes ayant les paramètres désirés pour enregistrer des signaux optiques et électriques *in vivo*.

5.1.2 Propriétés optiques de la microsonde

Il était essentiel de caractériser les propriétés optiques de cette microsonde avant de la tester *in vivo*. Pour se faire, il a fallu : caractériser les propriétés de propagation lumineuse tout au long du trajet optique, identifier les sources de bruits optiques puis établir la preuve de concept, démontrer que la microsonde a assez de résolution et de sensibilité pour détecter un seul neurone fluorescent. Un modèle numérique fut aussi créé pour calculer le champ de détection de la fibre. Il simule l'illumination d'un corps cellulaire d'un neurone et évalue la quantité de fluorescence collectée par la fibre en fonction de sa position.

L'évaluation des pertes lors de la propagation de la lumière excitatrice a montré que des pertes surviennent principalement au niveau de la pointe. Lors de l'illumination, les pertes entre l'entrée de la sonde et la pointe sont évaluées à environ 20%, alors que les pertes induites par l'étranglement et la tige de la pointe sont de l'ordre de 75%. Ces dernières sont très considérables. Toutefois, ces pertes de puissance sont réparties sur toute la longueur, ce qui fait que l'illumination devant la pointe reste tout de même plus intense. Lors de la collection, les pertes induites le long de la pointe sont pratiquement incalculables, mais elles devraient être beaucoup moindres dû à l'élargissement du cœur optique au lieu d'un rétrécissement. Les pertes de collections à travers la jonction optique donnent une transmission d'environ 60%, ce qui fut jugé acceptable pour la poursuite du projet.

Les principales sources de bruits optiques générés ont été identifiées et minimisées. Les résultats montrent que le bruit est linéairement relié à la puissance d'excitation, mais encore plus intéressant, il est linéairement relié à la longueur de la fibre de jonction. Une étude spectroscopique de ce bruit a permis de montrer que les principaux bruits provenaient de l'autofluorescence et du signal Raman émis par la fibre de jonction. L'autofluorescence semble principalement due à la gaine de plastique recouvrant la fibre alors que le signal Raman semble provenir de la silice et de l'eau résiduelle présente dans la fibre. Il est cependant possible de bien aligner l'injection dans la fibre pour minimiser l'impact du bruit sur la détection. Ces résultats montrent qu'il serait important de minimiser les pertes lors de l'excitation, car plus la propagation est efficace, plus le ratio signal sur bruit sera élevé.

Le point principal de la caractérisation était de faire la preuve de concept qu'il est possible de détecter des neurones avec la microsonde, puis de s'assurer que la résolution axiale et transversale est suffisante pour détecter un seul neurone. Les expériences ont été faites *in vitro* pour avoir un contrôle visuel. Les résultats ont montré qu'il était possible de détecter et de résoudre spatialement : des microbilles fluorescentes de 15 μm , des neurones marqués avec de la GFP en culture et des neurones marqués aux DiI et à la GFP en tranches. Ceci confirmait que la microsonde avait assez de sensibilité pour détecter des neurones et qu'il était possible de le faire dans des conditions similaires à celle retrouvée *in vivo*. Le petit diamètre de la pointe permettait effectivement d'obtenir assez de résolution transverse pour détecter des neurones côte à côte et de différencier axialement deux neurones qui se succèdent l'un à la suite de l'autre. Les résultats sur des neurones provenant du cortex de souris génétiquement modifiées ont aussi montré que le profil de détection axiale des neurones est similaire pour une population de neurones semblables; la distance entre laquelle la détection optique passe de 10% à 90% est similaire. Il fut aussi montré que ce profil de détection n'est pas dépendant de l'intensité d'excitation. Bien que l'intensité de fluorescence varie, le profil de détection axial reste constant.

L'ensemble des résultats expérimentaux de ce chapitre a permis de conclure que le design de la microsonde et du montage est acceptable pour la détection optique de neurones fluorescents. Malgré les pertes importantes qui rendent la microsonde moins efficace lors de l'illumination, ce défaut est compensé par le fait que la puissance d'excitation n'est pas réellement limitée. Cette puissance est en pratique limitée par le bruit optique qui lui est associé (autofluorescence et signal Raman). Par contre, l'excellent ratio signal sur bruit obtenu lors de la détection des neurones montre que l'impact des pertes en excitation peut être minimisé. Il fut conséquemment jugé acceptable d'utiliser cette microsonde pour entreprendre les expériences *in vivo*.

Pour obtenir un point de vue plus théorique, un modèle numérique fut mis sur pied. Ce modèle vise à approximer le champ de détection d'une microsonde face à un neurone. Le principe de base consiste à propager la lumière sortant du cœur optique, de calculer l'intensité pour différentes zones illuminées du corps cellulaire (modélisé en sphère), puis de calculer la puissance de fluorescence qui est émise puis collectée par la microsonde. Le modèle prend en compte les conditions optiques *in vivo*. Il calcule l'illumination-collection dans un environnement en trois dimensions sur la base d'une série de plans en deux dimensions situées à différentes positions sur l'axe optique. Ce modèle permet de varier différents paramètres (comme l'ouverture numérique, le diamètre de la microsonde et le

diamètre du neurone) et d'observer leur influence respective sur le champ de collection. Ainsi, il fut possible de comparer les résultats obtenus expérimentalement *in vitro* et *in vivo* à un modèle de détection établi selon les conditions biologiques d'enregistrement. Les résultats du modèle concordent avec les résultats expérimentaux, ce qui permet de renforcer les prévisions faites par celui-ci. Selon le modèle, l'impact de diamètre de la microsonde influence beaucoup plus le profil de détection axiale que le diamètre du corps cellulaire. Pour ce qui est de la détection transverse, c'est le contraire, le diamètre du neurone influence majoritairement le profil de détection. Il semble qu'une ouverture numérique de l'ordre de 0.2 soit un bon compromis entre la résolution axiale et la puissance de détection.

5.1.3 Enregistrements *in vivo*

Les expériences *in vivo* ont montré que la microsonde y est capable d'enregistrer des neurones de manière optique et électrique. Les résultats ont confirmé que le cœur creux rempli d'électrolyte se comporte bel et bien comme une électrode et qu'il permet d'enregistrer des potentiels d'action de manière extracellulaire (S/B de 7.6). L'amplitude de ces potentiels est dépendante de la position d'enregistrement et il est montré que lors d'un enregistrement unicellulaire l'amplitude augmente et diminue de manière symétrique. Cette variation d'amplitude est utilisée pour localiser la source des potentiels d'action et pour estimer de la position axiale du corps cellulaire du neurone enregistré. Les résultats ont aussi confirmé que le cœur optique permet de détecter la fluorescence provenant d'un seul neurone fluorescent *in vivo*. Les profils de détections *in vivo* sont similaires au profil de détection *in vitro* et aux profils simulés numériquement. Ces profils montrent une augmentation et une diminution du signal de manière non symétrique; l'augmentation du signal optique détectée se fait sur une plus longue distance que la décroissance. Cette propriété est due à la propriété non directionnelle de la détection optique; il y a un maximum de signal face au corps cellulaire et le signal chute abruptement lorsque la microsonde dépasse celui-ci. Ce profil optique permet aussi d'estimer la position axiale du corps cellulaire du neurone. Ainsi, le signal électrique et le signal optique permettent chacun d'estimer la position axiale d'un neurone. Nous utilisons donc cette propriété d'enregistrement pour établir un critère permettant d'approximer si les signaux optiques et électriques proviennent du même neurone. Nous croyons que si la distance entre le maximum du signal optique et le maximum de signal électrique est inférieure au diamètre du corps cellulaire d'un neurone, il y a une forte probabilité que ces signaux proviennent du même neurone. Comme le diamètre du neurone est inconnu lors de l'enregistrement, une étude histologique quantitative est faite sur chaque population de neurones fluorescents

étudiés afin de déterminer la plage des diamètres de ceux-ci. Suite à cela, nous proposons un critère de co-localisation : la distance intermaxima doit être plus petite que le diamètre de 90% de la population neuronal étudié pour que les signaux soient considérés comme provenant du même neurone. À l'aide de ce critère, il devient possible d'identifier optiquement un neurone et d'estimer si des potentiels d'action enregistrée proviennent de ce neurone.

Les enregistrements ont été principalement faits dans la moelle épinière de rats alors que les neurones de projection spinothalamiques avait été marqués de manière rétrograde par du DiI. Afin de tester la microsonde dans d'autres conditions expérimentales, une série d'enregistrements ont aussi été fait dans le cerveau de souris génétiquement modifiées GAD65-EGFP+. Les résultats ont montré qu'il était possible d'utiliser la microsonde optiquement et électriquement dans ces deux paradigmes. Dans les deux conditions, le critère de co-localisation a permis de relier des enregistrements de potentiels d'action à des neurones unitaires provenant d'une population spécifique.

5.1.4 Conclusion générale de la thèse

Les récentes avancées des marqueurs fluorescents et leurs applications aux souris génétiquement modifié, pour l'identification de populations neuronales, est en train de transformer les neurosciences. Plus spécifiquement, ces découvertes ouvrent la porte à la reconnaissance individuelle de neurones identifiés dans un tissu vivant. Ceci est d'une importance critique considérant que les neurones sont les cellules les plus actives à transcrire leur ADN et que ces programmes de transcription permettent de produire des phénotypes hautement spécialisés qui leur confère une identité propre. Il est donc essentiel de développer des systèmes de détection permettant de suivre et de tirer profit de l'ensemble des possibilités offert par ces avancés en identification par fluorescence.

Cette thèse propose une solution visant à actualiser la technique d'enregistrement électrophysiologique classique en y intégrant un senseur optique capable d'identifier par fluorescence des neurones de manière unicellulaire. Cette solution prend la forme d'une microsonde permettant l'enregistrement unicellulaire en parallèle avec des signaux électrophysiologiques et optiques, et ce dans les profondeurs du système nerveux *in vivo*. En plus, cette thèse propose une technique d'analyse quantitative permettant d'estimer si les signaux électrophysiologiques et optiques proviennent du même neurone ou non.

Cette thèse montre le développement d'une microsonde optique et électrique, partant d'une idée originale jusqu'à la démonstration la preuve de concept *in vivo*. Les différentes étapes permettant la production de la microsonde ont donc été présentées afin de détailler et de transmettre la méthodologie permettant la reproductibilité de la microsonde. La microsonde a préalablement été développée et testée *in vitro* pour bien comprendre et faciliter la caractérisation les différents aspects de la détection de fluorescence unicellulaire. Ceci a permis de démontrer que la microsonde possède une résolution spatiale suffisante pour détecter et identifier optiquement un seul neurone. Un modèle numérique fut aussi développé, permettant une étude plus théorique des propriétés de détection optique. Par la suite, des études *in vivo* ont montré qu'il était possible d'enregistrer des potentiels d'action unicellulaires comme le font les sondes électrophysiologiques traditionnelles. Il fut aussi montré, à maintes reprises, qu'il est possible d'enregistrer des potentiels d'action unicellulaires en parallèle avec un signal optique identifiant la présence d'un neurone profondément *in vivo*. Afin d'associer cette identification optique à des signaux électrophysiologiques, un critère quantitatif de colocalisation spatiale fut proposé pour estimer si les deux signaux proviennent du même neurone ou non. En conséquence, cette nouvelle microsonde permet d'étendre les possibilités des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* en offrant l'accès aux technologies de fluorescences unicellulaires.

5.1.5 Originalité et avantages:

Cette étude apporte un type de microsenseur original permettant d'ouvrir de nouveaux horizons en neurosciences. Il s'agit de la première microsonde ayant assez de résolution spatiale pour permettre l'enregistrement optique et électrique unicellulaire en parallèle. Cette propriété apporte une solution à l'identification cellulaire en profondeur pour électrophysiologie *in vivo*. De plus, l'idée de regrouper les deux types de microsenseur dans une monostructure à base de fibre optique est en soit originale. Il s'agit de la première utilisation d'une fibre optique ayant un cœur liquide servant à l'enregistrement électrophysiologique.

Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet d'identifier optiquement des neurones, car pour bien comprendre le fonctionnement du système nerveux, il est nécessaire d'étudier le comportement de neurones identifiés individuellement. Cette identification optique ne nécessite pas une exposition prolongée des cellules, ce qui minimise l'impact de la phototoxicité. En plus, l'excitation et la collection locale ne limite

pas la profondeur de l'enregistrement, ce qui permet d'enregistrer des signaux optiques beaucoup plus profondément que la microscopie actuels (la microscopie deux-photon est limitée à environ 1000 μm). Cette sonde rend possible l'identification de cellules sans un stimulus physiologique de recherche (stimulation antidromique ou orthodromique ou la stimulation des neurones afférents), ce qui minimise les altérations physiologiques causées par ces protocoles de stimulation.

L'utilisation d'une pointe en verre, comme pour la technique d'enregistrement électrophysiologique traditionnelle par micropipette, est un autre avantage de cette microsonde. Cette monostructure offre la possibilité d'être aisément manipulable; à la manière des micropipettes, il est possible de modifier la forme et la grosseur des différentes parties de la pointe. Cette approche est aussi potentiellement compatible avec les techniques de micro injections comme l'iontophorèse ou l'injection par pression.

5.2 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Comme il faut reconnaître ses limites pour pouvoir les dépasser, il est important de faire une évaluation des limites actuelles. Cette section présente donc les différents problèmes et limites de chaque partie du projet. Suite à cela, des suggestions, des idées et des avenues intéressantes sont présentées. Il est aussi question des expériences pertinentes qui pourraient être faites à court, moyen et long terme à l'aide de la microsonde.

5.2.1 Limites et améliorations

Cette sous-section est une évaluation des limites de la méthode présentée dans cette thèse, suivie des propositions qui permettraient d'éventuelles améliorations. Lors de cet exercice, les éléments majeurs proposés dans cette thèse seront détaillés un à un.

La fibre à deux cœurs n'est pas simple à réaliser et son coût de production est important. La collaboration avec l'INO est une bonne avenue pour la production de la fibre et devrait être maintenue. Il serait cependant très intéressant d'établir une collaboration avec les responsables de la nouvelle tour à fibre optique qui sera prochainement disponible au COPL. Une avenue simple pour minimiser les coûts engendrés par la production de la fibre est d'optimiser le volume de fibre produite par préforme. Une fibre à deux cœurs ayant un plus petit diamètre permettrait des économies comme le montre la fibre de quatrième génération de 400 μm (figure 2.4), les de guidage dans la pointe. Il serait aussi

intéressant de produire des fibres avec différentes ouvertures numériques; une fibre avec petite ouverture numérique serait particulièrement intéressante à tester. L'amélioration de la capillarité dans le cœur creux en y ajoutant un filament ou un angle aigu serait toujours pertinente malgré que les essais passés se soient soldés par des échecs.

Actuellement, la clive de la pointe se fait sans contrôle visuel et elle n'est pas fait à sec. Idéalement, il faudrait implanter un système de contrôle visuel lors de la clive, ce qui permettrait d'avoir plus de précision sur le diamètre de la pointe. Il serait bien aussi de pouvoir faire une clive à sec; ceci permettrait d'emplir le cœur creux au moment désiré plutôt qu'être obligé de le faire tout de suite après la clive. Un système de clive par laser femtoseconde permettrait de regrouper ces deux propositions. Comme présenté au chapitre 2.2.2 (figure 2.7) il semble possible de faire de belles clive avec un système femtoseconde de haute puissance, mais il faudrait approfondir les expériences. Le clivage par faisceau ionique est aussi une avenue très intéressante pour coupé pratiquement parfaitement et pour sculpter (faire des trous) directement le bout de la pointe. Le polissage en biseau de la pointe des microsondes pourrait aussi être à considérer.

Le diamètre des pointes est important pour les enregistrements électriques et optiques. Optiquement, plus le diamètre est petit, meilleure est la résolution axiale et transversale mais plus la collection est faible. Électriquement, le diamètre devient important lors de l'enregistrement de petits neurones. Il semble que dans des conditions où les neurones sont petits et densément peuplés, les plus petites sondes permettent d'enregistrer plus facilement des potentiels d'action unicellulaire. Il est donc important de trouver un diamètre ayant un juste milieu pour optimiser le signal optique et électrique. D'après les expériences, ce diamètre semble être situé entre 5 et 10 μm .

Il y a d'importantes pertes optiques lors de l'excitation. La forme actuelle des pointes semble être en bonne partie responsable de ce problème. Pour améliorer cet aspect, il faudrait optimiser le profil des pointes en utilisant (il faudrait la créer) une tireuse ayant : un contrôle visuel, une meilleure reproductibilité et de meilleurs paramètres de contrôle. Comme un contrôle dynamique de la puissance, de la longueur et la vitesse de balayage ainsi que de la force de tirage. Pour éliminer ces pertes, il est aussi possible de couvrir la fibre avec un revêtement métallique, ce qui aiderait pour les situations de marquage optique très dense.

La détection optique est principalement limitée lorsque le marquage est très dense, car il y a un risque d'enregistrer des neurones situés un peu plus loin. Le critère de colocalisation permet de minimiser le problème de multiples enregistrements axiaux et une pointe de petit diamètre minimise grandement la possibilité de codétection transverse. Dans des conditions où que le marquage fluorescent est dense ou encore lorsque que le milieu environnant la pointe est aussi fluorescent, l'illumination-collection par le côté de la fibre peut devenir significatif. Bien que ce type de détection soit faiblement efficace, il peut devenir nuisible si la pointe est entourée d'éléments fluorescents. Pour éliminer ce problème, un revêtement métallique serait très efficace (figure 3.4). Le type de détection optique proposé demande une évaluation histologique du marquage pour calculer le diamètre des neurones marqués et pour s'assurer que les corps cellulaires sont majoritairement marqué afin de minimiser les détections de dendrites. Ce contrôle histologique est cependant nécessaire au bon contrôle des expériences.

Le bruit optique provient majoritairement de l'autofluorescence et de l'excitation Raman. Il serait possible d'éliminer ce bruit en utilisant une source d'excitation impulsionnelle et en filtrant temporellement les signaux indésirables ¹³⁹. En utilisant une longue fibre optique, il serait possible d'ajouter un délai aux signaux provenant du bout de la fibre (les signaux désirés) et de ne pas enregistrer les signaux rapides (provenant de la fibre). Plus simplement, il est possible de minimiser le bruit : en minimisant la longueur de la fibre de jonction et en utilisant moins de puissance d'excitation (en minimisant les pertes). Il serait intéressant de faire de plus amples essais avec les fibres de cuivre en tentant d'optimiser le ratio signal sur bruit. Aussi, l'utilisation de fluorophores ayant un décalage de Stokes élevé permettrait de minimiser le signal Raman.

En ce qui concerne la détection électrique, un gros diamètre nuit aux enregistrements électriques, probablement à cause de la difficulté d'approcher les cellules. Cette tendance est présente dans le cerveau et non dans la moelle, peut-être parce que les neurones enregistrés dans le cerveau étaient plus petits que ceux dans la moelle. Les fibres de moins de 10 μm semblent plus efficaces pour l'enregistrement unitaire dans le cerveau. Une plus petite surface de pointe semble moins pousser sur le tissu. Bien que les résultats dans la moelle épinière n'ont pas montré de corrélation significative entre le diamètre des sondes et le ratio signal sur bruit (figure 4.5), il serait intéressant de répéter ce même type d'étude dans le cerveau. Dans un autre ordre d'idée, il pourrait être bien de créer une fibre ayant de multiples électrodes (2 ou 4 trous). Une fibre un peu plus grosse 20-30 μm avec un cœur optique central de 10 μm , permettrait peut-être de voir des différences dans les amplitudes

des enregistrements électriques et permettre de mieux localiser la source. De plus, ce pourrait être une bonne idée de produire des électrodes à partir du revêtement métallique pour enregistrer des signaux unicellulaires ou pour une détection locale du champ.

Le critère de colocalisation ne permet pas de discriminer les neurones électriques situés dans l'axe transverse et on doit dépasser le neurone pour le localiser. Il est donc raisonnable de croire que ce critère est plus efficace lors des enregistrements de gros neurone et pour des populations peu denses. Il est donc idéal de bien connaître le type de population et les zones d'enregistrements. On doit cibler la population en faisant une histologie pour chaque population. Il serait donc très pertinent d'arriver à faire une identification post-expérience. Il serait probablement possible de le faire à l'aide de marqueur introduit dans l'électrolyte ou encore en injectant massivement du courant pour abîmer les tissus locaux. Afin d'établir une corrélation directe entre la cellule optique et électrique il serait particulièrement intéressant d'utiliser des systèmes où il existe une dynamique entre l'optique et l'électrique. Comme pour les marqueurs fonctionnels^{35,55-58} ou l'utilisation de l'optogénétique²⁶.

Le présent modèle numérique est limité par les approximations de base et la structure numérique de programmation. Ce modèle fut développé et implémenté petit à petit, ce qui a nuit à certains aspects lors de la complexification du modèle, par exemple l'espace restreint de la position de la fibre et la normalisation de la puissance pour différentes ouvertures numériques. Certaines limitations pourraient aisément être améliorées en refaisant le modèle avec une meilleure vue d'ensemble. Il serait possible : d'améliorer la résolution et la zone de détection, de modéliser plusieurs neurones, de modéliser une excitation provenant de l'ensemble du diamètre final de la microsonde.

Le montage et système d'acquisition actuelle est bien, mais il pourrait être amélioré en y ajoutant certaines fonctionnalités nouvelles. L'ajout de plusieurs longueurs d'onde offrirait une sélectivité optique entre plusieurs marquages, comme les souris multicolores « brainbow »¹⁵⁵ ou des neurones comarqués. Il pourrait aussi être possible de faire de la détection de temps de vie de fluorescence *in vivo*. Lors de la recherche en milieu faiblement marqué, il peut s'avérer long et parfois pénible de détecter les neurones optiques. Pour cette raison, il serait faisable d'automatiser le système de détection afin qu'un logiciel reconnaisse les signaux optiques spécifiques au profil de détection des neurones à partir de critères fixés par l'utilisateur. Il serait certainement possible de faire un code favorisant les détections plus ou moins spécifiques pour ne pas omettre de neurones. Il pourrait aussi y

avoir un traitement en temps réel pour l'application du critère de colocalisation afin de savoir directement si une codétection de signaux est jugée comme provenant du même neurone.

5.2.2 Expériences en continuation directe (court et moyen terme)

Voici une série de propositions d'expériences qui pourraient compléter le travail présenté dans cette thèse. Ces expériences sont directement en continuité et permettraient d'approfondir certaines facettes de la thèse. Il serait pertinent de faire une étude plus approfondie sur les enregistrements électriques dans le cerveau. Le peu de souris génétiquement modifiées disponibles au moment des expériences a limité l'exploration des enregistrements cérébraux. Étant donné que seules les expériences sur les souris GAD⁺-GFP ont été faites dans le cerveau, plusieurs expériences électriques et optiques pourraient être faites pour poursuivre le présent travail. Plus précisément, il serait intéressant de voir l'impact du diamètre des microsondes sur le ratio signal sur bruit électrique et sur la capacité des microsondes à isoler des enregistrements unitaires. Il serait aussi important d'augmenter le nombre des enregistrements optiques et électriques dans ces conditions. Une comparaison entre les sondes de la 3^e génération et de la 4^e génération pourrait aussi apporter des indices sur l'impact du diamètre de cœur électrique. Pour finir, une analyse plus systématique visant à comparer l'efficacité des électrodes conventionnelles à celle des microsondes en fonction de la résistance et du diamètre des électrodes permettrait de mieux situer les performances de la sonde.

5.2.3 Expériences potentielles (moyen et long terme)

La mise au point de la microsonde optique et électrique présentée dans cette thèse ouvre la porte à plusieurs expériences intéressantes pour le champ des neurosciences. Il devient possible de mettre en commun les nouvelles possibilités qu'offre cette sonde avec les plus récents outils de la biologie cellulaire. Voici quelques propositions d'expériences possiblement réalisables à moyen ou à long terme.

La venue de l'optogénétique ouvre d'immenses possibilités pour le contrôle et l'exploration des réseaux neuronaux ²⁶. Les canaux photo activable ou photo inhibiteur permettent d'exciter optiquement les neurones pour qu'ils déclenchent des potentiels d'actions. Ces neurones sont généralement couplés avec des fluorophores pour permettre de les identifier. Il est donc possible de modifier génétiquement des neurones pour les faire

décharger sous un contrôle lumineux tout en pouvant les repérer par fluorescence ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Ce type d'enregistrement est généralement utilisé pour exciter des régions de neurones. Avec la microsonde, il pourrait devenir possible d'exciter optiquement un neurone, d'enregistrer la réaction électrophysiologique et de capter sa fluorescence. Cette expérience permettrait non seulement de contrôler individuellement des neurones *in vivo*, mais offrirait une dynamique optique-électrique permettant de corrélérer directement des enregistrements optiques et électriques.

Les marqueurs fonctionnels permettent aussi d'obtenir une dynamique observable entre les enregistrements optiques et électriques. En injectant *in vivo* de tels marqueurs localement ou par différents types de virus, il peut devenir possible d'enregistrer optiquement les fluctuations fonctionnelles associées aux potentiels d'actions. De cette manière, il pourrait devenir encore plus facile de corrélérer le signal optique et celui électrique. En combinant l'utilisation de ces marqueurs à la place des marqueurs simplement fluorescents, avec des microsondes recouvertes de métal, il deviendrait possible d'obtenir une technique fortement robuste pour enregistrer électrophysiologiquement des neurones identifiés.

Il pourrait aussi être possible de transférer ce type de technologie pour faire des expériences comportementales. Si la sonde permet d'identifier un petit noyau du système nerveux ou encore un type de neurone précis, il pourrait être possible de fixer l'électrode sur le crâne de l'animal et d'étudier son comportement en mouvement libre. La corrélation entre le comportement et des enregistrements avec des fibres optiques effectuées chez des animaux mobiles est déjà possible ³³, alors il serait plus qu'intéressant de pouvoir le faire avec cette microsonde.

Les applications de cette nouvelle microsonde optique et électrique sont nombreuses, alors cet outil pourrait ouvrir plusieurs avenues de recherches en neurosciences.

ANNEXE A

CALCUL DU DIAMÈTRE DES CORPS CELLULAIRES DES NEURONES

Pour permettre l'enregistrement unitaire de neurones *in vivo*, la pointe de la microsonde devait être plus petite que le diamètre des neurones ciblés. Pour connaître les dimensions visées, un calcul du diamètre de la population de neurones recherchés a été fait. La sous section A.1 montre les mesures du diamètre des neurones spino-thalamiques marqués rétrogradement et la sous section A.2 montre les mesures faites sur les neurones du réticulaire thalamique de souris génétiquement modifiée GAD65-EGFP+. Il fut ainsi possible d'évaluer le diamètre des neurones des populations ciblées.

A.1 DIAMÈTRE DES NEURONES SPINO-THALAMIQUES

Après des expérimentations *in vivo* (N=5), la section de moelle épinière sondée a été fixée *in situ* pendant 30 minutes à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde 4%. Le segment L5-S1 a été retiré et trempé dans une solution semblable pour la nuit, puis rincé dans une solution tampon de phosphate 0.1%. La moelle a été coupée (Leica VT 1000S) en tranches (100 μm) et chacune d'elles a été montée sur lame. Les neurones marqués ont été photographiés en épi-fluorescence par une camera CCD (Spot TR slider, Diagnostic instrumentation) alors qu'ils étaient sous un objectif à l'air 10x (Olympus UPlanFI) monté sur un microscope Olympus AX70 (ensemble de filtres Olympus U-MWIG). Pour n=155 neurones au focus, les deux axes principaux ont été mesurés à l'aide d'un logiciel de National Instruments (Vision assistant 7.0) et moyennés pour approximer un diamètre moyen (Figure A.1 A). Les résultats donnent un diamètre moyen de 24.2 μm avec une déviation standard de 6.2 μm et une erreur à la moyenne de 0.5 μm . La Figure A.1 B montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les différents rats (N=5). La répartition du nombre de neurones en fonction de leur diamètre est aussi présentée (Figure A.1 C). Ces mesures permettent d'évaluer la plage de diamètre permis pour l'extrémité des

microsondes. Cette étape était indispensable pour la mise en place du critère de co-détection présenté dans la section 4.1.4

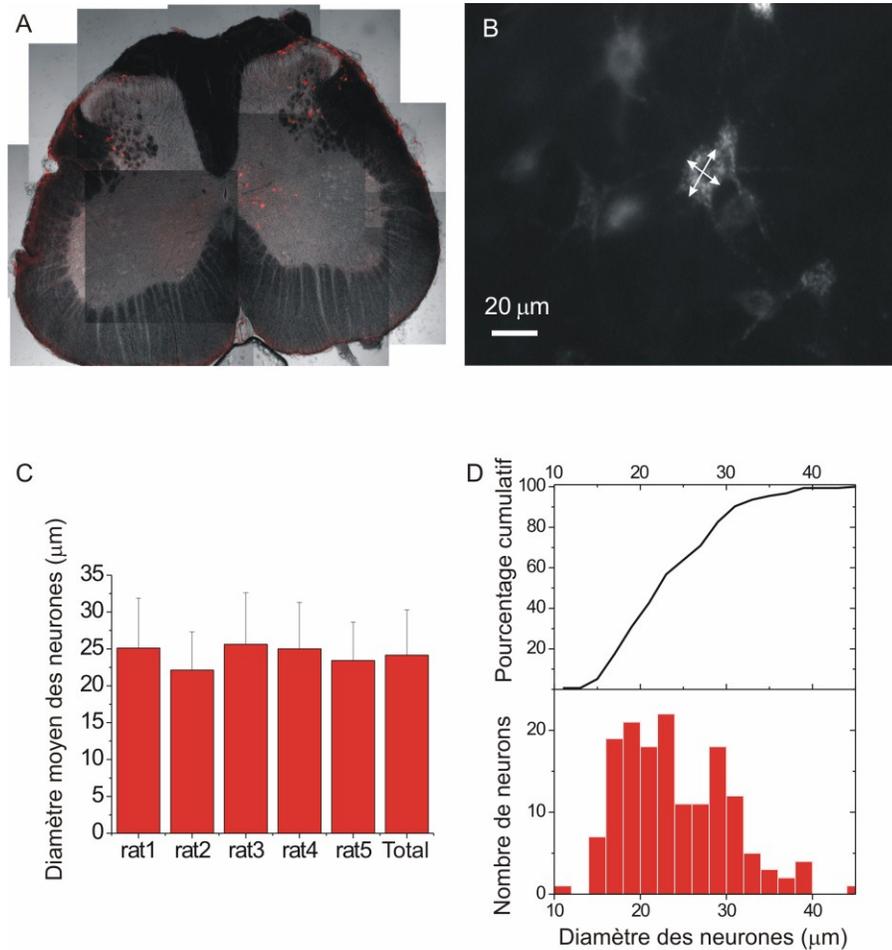


Figure A.1 **A** Reconstruction photographique d'une tranche de moelle épinière où les neurones spino-thalamiques marqués rétrogradement au DiI sont identifiés en rouge à l'aide de la microscopie confocale. **B** Photographie de neurones spino-thalamiques marqués au DiI. Exemple de la prise de mesure du diamètre sur deux axes. **C** Histogramme du diamètre moyen des neurones spino-thalamiques marqués en fonction des 5 rats utilisés. Il n'y a pas de différence significative entre les rats. Seul les neurones des couches III à VII ont été considérés. **D** Pourcentage cumulé et histogramme du nombre de neurones spino-thalamiques fluorescents en fonction de leur diamètre. (n=155 neurones). Le diamètre moyen est de 24.2 µm (D. S. 6.2 µm) et 90% des neurones ont plus de 16 µm.

A.2 DIAMÈTRE DES NEURONES DU RÉTICULAIRE TALAMIQUE MARQUÉ À LA GFP, DES SOURIS GAD-GFP+

Après la mort d'une des souris, le site d'enregistrement fut marqué et le cerveau fut rapidement extrait et placé dans une solution de paraformaldéide 4% pour une nuit. Suite à cela, le cerveau fut coupé en tranches de 80 μm (Leica VT 1000S). Les tranches correspondantes au site d'enregistrement furent montées sur une lame de microscope et ont été photographiées à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 510 en utilisant une raie spectrale à 488 nm, provenant d'un laser à ion d'argon, comme source d'excitation (figure A.2 A). La fluorescence résultante fut collectée par un objectif de 40x (Zeiss Achroplan, NA=0.8) et détecté par un tube PMT suite à un passage par un filtre passe haut à 505 nm. Une série de 37 images, ayant chacune une profondeur de champ de 1.5 μm , ont été prise. Afin de s'assurer que la mesure du diamètre est bien représentative de chaque neurone, le diamètre fut calculée à partir de l'image où le corps cellulaire du neurone était le plus large. De cette façon, le diamètre des deux principaux axes du corps cellulaire ont été moyennés pour n=41 neurones fluorescents du réticulaire thalamique (figure A.2 B). La moyenne des diamètres est de 12.4 μm avec une déviation standard de 2.3 μm .

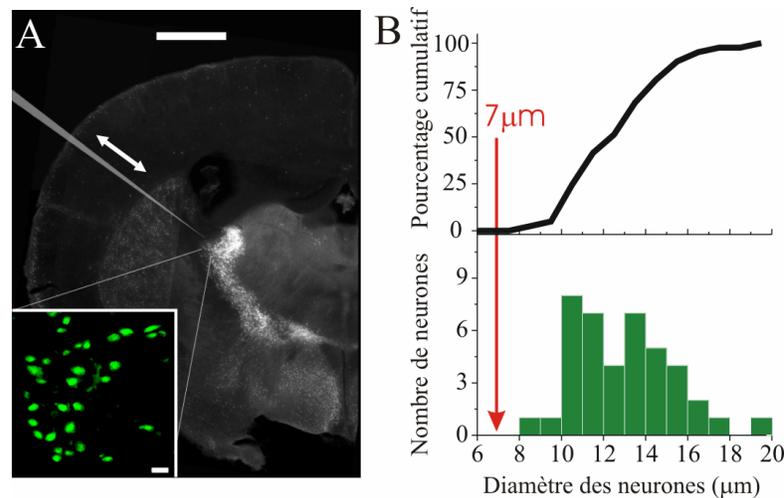


Figure A.2 A Photographie d'une tranche de cerveau de 80 μm d'épaisseur d'une souris GAD65-EGFP+. La zone agrandie en bas à gauche montre des neurones marqués EGFP du réticulaire thalamique enregistrés par microscopie confocale. La sonde est représentée en gris et l'axe de déplacement est représenté par la flèche blanche. B Pourcentage cumulatif et histogramme du nombre de neurones du réticulaire thalamique fluorescents en fonction de leur diamètre (n=41 neurones). Le diamètre moyen est de 12.4 μm (D. S. 2.3 μm) et 90% des neurones ont plus de 10 μm .

ANNEXE B

MÉTHODOLOGIE RELATIVE AUX TRANCHES *IN VITRO*

Pour permettre la caractérisation de la microsonde, des expériences ont été faites en tranche *in vitro* (des tranches de moelles ou de cerveaux sous observation par un microscope). Les enregistrements *in vitro* ont été faits pour caractériser la résolution spatiale de la détection de fluorescence. Des tranches de cerveaux, où des neurones étaient marqués rétrogradement au Dil, furent préparées, ce qui permit l'enregistrement de la fluorescence de ces neurones. Toutes les procédures furent effectuées en accord avec le Conseil Canadien de protection des animaux. Il est aussi à noter que toutes les expériences *in vitro* furent faite en partenariat avec Cyril Bories.

B.1 Préparation des tranches cérébrales

Les rats furent anesthésiés avec de la kétamine et de la xylazine avant d'être décapités. Les cerveaux furent rapidement retirés (<60 s) et placés dans une solution glacée contenant (en mM) 210 sucrose, 3.0 KCl, 0.75 CaCl₂, 3.0 MgSO₄, 1.0 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, et 10 glucose, saturée avec 95% O₂-5% CO₂. Les tranche corticale, en incluant la région prélimbique, furent coupées à 400 µm sur une trancheuse par vibration (VT 1000s, Leica) et maintenues en vie dans un fluide cérébral spinal artificiel (ACSF) contenant (in mM) 124 NaCl, 3.0 KCl, 1.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 1.0 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, et 20 glucose, saturé avec 95% O₂-5% CO₂ à la température de la pièce.

Pour l'observation et l'expérimentation *in vitro*, une tranche était transférée dans une chambre à submersion où la tranche fut exposée de manière continue à de l'ACSF à 30-32 C saturé avec 95% O₂-5% CO₂ et perfusée à un taux de 2.0-2.5 ml/min. Les tranches on été observées par un microscope (Axioscop, Zeiss) avec un objectif 10x (Achromplan, Olympus). La région prélimbique du cortex préfrontale fut localisée comme la région entre le forceps minor corpus callosum et la médiane¹⁵⁹. Les neurones de la couche II-III de la région prélimbique ont été observés sous une illumination infrarouge par un objectif de microscope 40x à immersion (IR-ACHROPLAN, 40X/0.80W, Zeiss) et une caméra CCD (CCD-KP-

M1AN, Hitachi). Les neurones pyramidaux contenant du DiI furent ainsi localisés par épifluorescence.

ANNEXE C

MÉTHODOLOGIE RELATIVE AUX EXPÉRIENCES *IN VIVO*

Le but même de la conception de la microsonde était de pouvoir l'utiliser chez des animaux vivants pour permettre de localiser directement les neurones dans leurs milieux naturels et d'enregistrer leurs signaux extracellulaires. Il était donc primordial de pouvoir tester et caractériser la sonde de manière *in vivo*. Il fut décidé d'effectuer les premiers essais chez le rat, plus particulièrement dans les couches I à V de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces conditions expérimentales donnaient accès à des neurones spino-thalamiques de projections. Ces neurones avaient comme avantage de pouvoir être marqués rétrogradement par le thalamus, ils possèdent un large diamètre de corps cellulaire (12 à 36 μm , voir annexe A), ils étaient situés profondément dans le tissu (0 - 2000 μm), et finalement, la localisation et l'enregistrement de neurones de projection permettaient d'effectuer une preuve de concept quant à l'application de la microsonde. Il est à noter que les expériences chez le rat *in vivo* furent faites en partenariat avec Guillaume Lavertu, du laboratoire du Pr. Yves De Koninck au CRULRG.

En second lieu, des expériences ont été faites chez la souris dans le but de montrer la reproductibilité du concept dans les conditions expérimentales propres au cerveau. Des souris génétiquement modifiées, exprimant de la fluorescence chez 70-80% de neurones GABAergiques (Souris GAD65-EGFP+), offraient en plus un modèle ayant un autre type de fluorophore (EGFP) et qui ouvraient la porte à l'utilisation de cette microsonde pour tous les autres types de souris fluorescentes. Il est à noter que les expériences chez la souris *in vivo* furent faites en partenariat avec Maxime Demers, du laboratoire du Pr. Martin Deschênes au CRULRG.

C.1 EXPÉRIMENTATION *IN VIVO* CHEZ LE RAT

C.1.1 Marquage rétrograde

La localisation des neurones spino-thalamiques *in vivo* par une détection de leur fluorescence demande que ces neurones soient spécifiquement marqués pour pouvoir les distinguer des autres neurones environnants. La technique de marquage rétrograde à partir du thalamus offrait la certitude que seuls les neurones ayant une projection au thalamus pouvaient être munis du marqueur fluorescent. Cette technique est préalablement décrite dans l'annexe B. La seule différence est que les neurones de projections recherchés ici sont des neurones spino-thalamiques (ils sont situés dans la moelle épinière).

L'injection du marqueur fut donc faite selon le protocole suivant. Des rats Sprague-Dawley male et adulte (200-250 g) ont été anesthésiés avec 4% d'isoflurane puis soutenus à 2% quand l'animal était pleinement anesthésié. Par la suite, 4 injections de 1 μ l de DiI 2.5% d'Invitrogen ont été faites dans la zone du noyau ventro pariétal latéral (VPL) et du noyau ventro pariétal médian (VPM) du thalamus afin de marquer les neurones corticaux thalamiques. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées sont: AP= -3.14, ML=+3.0, DV= -6.0 pour le VPL et AP= -3.14, ML=+2.5, DV= -5.5 pour le VPM. Le marqueur fut laissé 7 à 10 jours pour permettre l'entrée dans les terminaisons axonales et la diffusion jusqu'aux corps cellulaires dans le cortex.

C.1.2 Chirurgie et préparation des rats

Pour préparer l'animal pour les enregistrements, le même protocole d'anesthésie qu'à la sous-section précédente était appliqué. Par la suite, les segments spinaux L5 à S1 furent exposés par laminectomie et stabilisés à l'aide de deux pinces pressées sur les vertèbres les plus rapprochées. Une chambre d'enregistrement fut construite sur le dos de l'animal avec de l'agar (3%) et cette chambre était perfusée avec un tampon de NaCl 0.9 M maintenu à 37°C. Pour réduire les mouvements de la moelle épinière induits par la respiration, l'animal était ventilé. Pour ce faire, une trachéotomie et une canulation de la veine jugulaire étaient faites avec une injection de pancuronium bromide (Sigma, 5 mg/ml ; 0.05 ml/heure). L'animal était maintenu à une température de 37.5°C et son taux de CO₂ expiré était maintenu à 4%.

C.1.3 Protocole d'enregistrement

La microsonde était placée sur un micromanipulateur (Burleigh,6000) à l'aide d'un support adapté. L'approche de la surface était faite lentement jusqu'à ce que la pointe touche la solution tampon. À ce point, la conduction électrique entre la microsonde et la mise à la terre devait se faire. Il est à noter que la mise à la terre de l'amplificateur était plongée dans la solution tampon de la chambre d'enregistrement pour mettre l'animal à la terre. Par la suite, la microsonde était descendue à une vitesse constante (entre 4 et 8 $\mu\text{m/s}$) dans la moelle épinière selon l'axe dorsal-ventral. Les enregistrements ont été effectués entre la surface et une profondeur maximale de 2200 μm . Lorsque la sonde parvenait à la profondeur maximale désirée, elle était remontée à la surface pour être déplacée afin d'effectuer une autre descente. Le nombre de descentes effectuées lors d'une expérience variait entre 12 et 26.

C.2 EXPÉRIMENTATION *IN VIVO* CHEZ LA SOURIS

C.2.1 Souris GAD65-EGFP+

Le modèle expérimental choisi pour tester la microsonde fut des souris génétiquement modifiées GAD65-EGFP^{+103,104,160}. Ces souris ont la propriété que leurs cellules GABAergiques expriment une protéine fluorescente verte («green fluorescent protein», GFP). Dans le cerveau, la synthèse du GABA (un neurotransmetteur) se fait à partir du glutamate et dépend de l'enzyme glutamate décarboxylase (GAD). Deux isoformes distinctes de GAD sont décrites: la forme 67kDa (GAD67) et la forme 65 kDa (GAD65). Il est généralement admis que la plupart des cellules GABAergiques expriment les deux formes de GAD. Ainsi, une modification au génome de la souris GAD65-EGFP⁺ est produite pour ajouter une construction, ayant le promoteur de GAD65, qui exprime la GFP. De cette façon, la plupart des cellules GABAergiques de cette souris produisent aussi de la GFP.

C.2.2 Chirurgie et préparation des souris

Les souris GAD65-EGFP⁺ ont été anesthésiées avec une solution de kétamine-xylazine (0.4 ml d'une solution de 25 mg/ml de kétamine et 2.5 mg/ml de xylazine) et l'anesthésie était soutenue avec 0.33 ml d'une solution de 100 mg/ml de kétamine toutes les 30 minutes. Par la suite l'animal était maintenu par des barres d'oreilles sur un cadre stéréotaxique ou par un support fixé au crâne par un ciment dentaire et l'accès au cerveau se faisait par un

trou de 3 mm de diamètre dans le crâne, celui-ci était situé à -1 mm du bregma et à 4 mm latéralement.

C.2.3 Protocole d'enregistrement

La microsonde était placée sur un micromanipulateur (controller 8200, Nchworm) et descendu dans le cerveau avec un angle de 30° pour rejoindre les cellules marquées par le EGFP dans le réticulum thalamique (2200-2500 µm de profondeur). Le signal extracellulaire était amplifié (Neurodate IR183, Cygnus technology) et filtré (passe bande 300-3000 Hz, Model 440, Brown lee precision Co.) avant d'être enregistré par un système d'acquisition (Powerlab/8sp, ADInstrument).

ANNEXE D

POSITIONNEMENT AXIAL DE LA MICROSONDE

Le positionnement spatial de la microsonde est basé sur une technique de conversion du signal temporel à spatial. Elle est basée sur les artéfacts d'enregistrement générés lors du déplacement de la microsonde (figure D.1 A et B). Lors d'un déplacement, le micromanipulateur (Burleigh, 6000, précision $\pm 0.1 \mu\text{m}$) produit des perturbations électriques ; lorsque la vitesse du déplacement est constante, l'intervalle de temps entre les artéfacts est constant à 2% près (figure D.1 A). Nous utilisons donc ces perturbations comme un avantage.

Pour calculer le déplacement (Δx) de la microsonde correspondant à l'enregistrement de deux artéfacts consécutifs, il suffit de calculer la distance entre la position x_1 de la microsonde au temps t_1 (premier artéfact) et la position x_2 au temps t_2 (artéfact suivant);

$$\Delta x = x_2 - x_1, \quad (\text{D.1})$$

$$\Delta t = t_2 - t_1, \quad (\text{D.2})$$

$$x_2 = x_1 + v \cdot \Delta t \quad (\text{D.3})$$

Si la vitesse de descente est constante ($v = cte$) et que les intervalles de temps inter-artéfact sont égaux ($\Delta t = cte$), alors le déplacement Δx entre deux artéfacts sera invariant ;

$$\Delta x = x_2 - x_1 = (x_1 + v \cdot \Delta t) - x_1 = v \cdot \Delta t = cte \quad (\text{D.4})$$

Pour calibrer le tout, nous avons déplacé la microsonde à vitesse constante dans le tissu à plusieurs reprises ($M = 8$). Les différents essais étaient faits à différentes vitesses, et chaque essai générait un minimum de 50 artéfacts ($N_a \geq 50$). Le déplacement inter-artéfact moyen sur l'ensemble des essais ($\overline{\Delta x}$) est calculé à l'aide des positions initiales (x_i) et

finales (x_f) de la microsonde, et du nombre d'artéfact généré lors du déplacement (N_a), ceci pour l'ensemble des essais (M) ;

$$\overline{\Delta x} = \frac{\sum_M \left(\frac{\sum_{N_a-1} \Delta x}{N_a} \right)}{M} \quad (\text{D.5})$$

Le déplacement moyen entre deux artéfacts est de $\overline{\Delta x} = 2.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (D.S. = $0.05 \mu\text{m}$) et il n'est pas dépendant de la vitesse de déplacement (la D.S. est très faible par rapport à la moyenne sur M). Cette technique permet d'estimer la position de la sonde à moins de 5% près.

Sur cette base, nous avons converti l'information temporelle en information spatiale, ce qui permet de connaître l'intensité du signal en fonction de la position de la sonde. Les signaux initiaux furent filtrés à l'aide d'une routine Matlab pour en retirer les artéfacts et transformer ceux-ci en une série de zéro (figure D.1 C et D). Dès lors, les séquences de zéro ont pu être utilisées comme référence spatiales. La figure D.1 A montre l'enregistrement d'un neurone où les artéfacts sont filtrés, les amplitudes crête-à-crête des potentiels d'actions sont par la suite mesurées (figure D.1 B) et mises en graphique selon la position relative de la sonde (figure D.1 C). Cette technique de référence spatiale permet de calculer l'amplitude enregistrée des p.a. d'un neurone *in vivo* en fonction de la position de la microsonde.

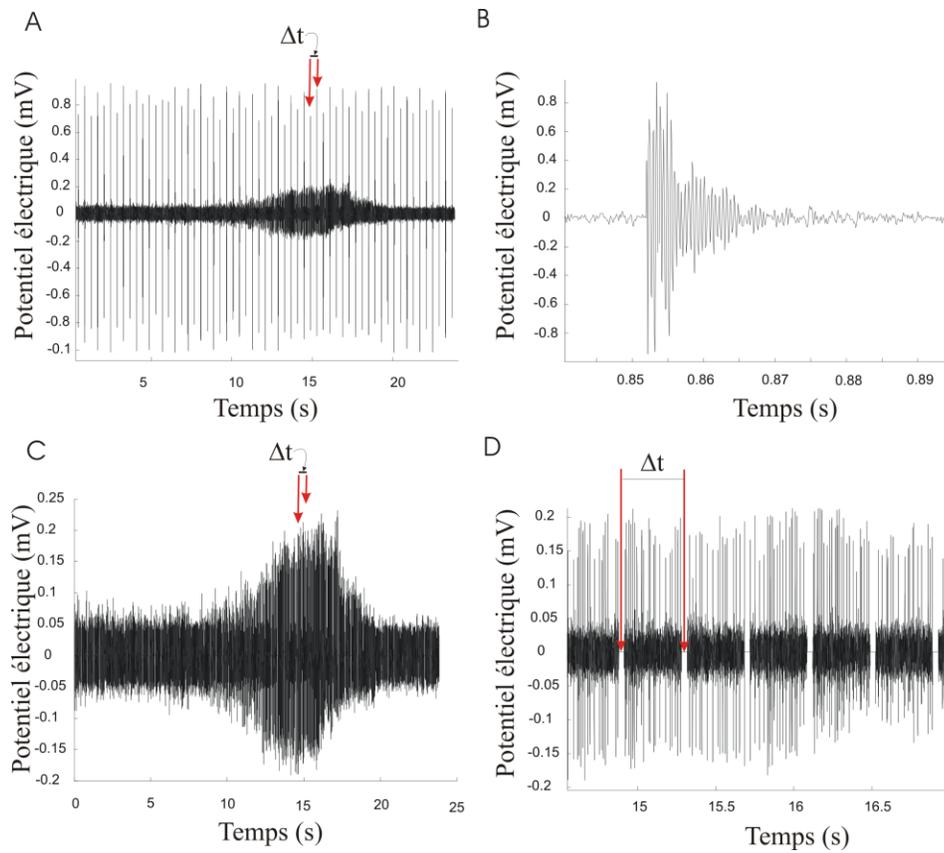


Figure D.1 **A** Exemple d'un enregistrement électrophysiologique d'un neurone lorsque la microsonde est descendue dans le tissu à vitesse constante. Cet enregistrement comporte une série d'artéfacts périodiques typiquement induits par le micromanipulateur lors d'un déplacement de $2.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (exemples pointés par des flèches rouges). **B** Agrandissement d'un artéfact induit par le micromanipulateur. **C** Même enregistrement en qu'en **A**, mais les artéfacts ont été transformés en des séries de zéro par une routine Matlab. **D** Agrandissement de **C** pour montrer des séries de zéro (exemples pointés par des flèches rouges).

BIBLIOGRAPHIE

1. Ray-Debove,J., Robert,P., & Rey,A. Le nouveau petit Robert. (dictionaires Le Robert, Paris; 2002).
2. Prasad,P.N. Introduction to biophotonics. (Hoboken, New Jersey; 2003).
3. Gordon,M.S. Neurobiology. (Oxford University Press,1994).
4. Parent,A. Histoire du cerveau: De l'Antiquité aux neurosciences. (PU Laval,2009).
5. Betzig,E., Patterson,G.H., Sougrat,R., Lindwasser,O.W., Olenych,S., Bonifacino,J.S., Davidson,M.W., Lippincott-Schwartz,J., & Hess,H.F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642-1645 (2006).
6. Rust,M.J., Bates,M., & Zhuang,X.W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods* **3**, 793-795 (2006).
7. Klar,T.A., Jakobs,S., Dyba,M., Egner,A., & Hell,S.W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8206-8210 (2000).
8. Lee,K.J., Park,C.H., & Rhyu,I.J. Efficient three-dimensional reconstruction of synapse with high-voltage electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* **54**, 139-141 (2005).
9. Lakowicz,J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. (Springer,2006).
10. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/info.pdf. The Nobel Prize in Chemistry 2008. The Royal Swedish Academy of Sciences . 2009.
type de référence: Communication internet
11. Kandel,E.R., Schwartz,J.H., & Jessell,T.M. Principles of neural science. (McGraw-Hill, 2000).
12. Johnston,D. & Wu M.S. Foundation of Cellular Neurophysiology. (MIT Press,1995).
13. Richard,D. & Orsal,D. Neurophysiologie organisation et fonctionnement du système nerveux. (Dunod, 2001).

14. Baumann,N. & Pham-Dinh,D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews* **81**, 871-927 (2001).
15. Nedergaard,M., Ransom,B., & Goldman,S.A. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences* **26**, 523-530 (2003).
16. Newman,E.A. New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission. *Trends in Neurosciences* **26**, 536-542 (2003).
17. Ransom,B., Behar,T., & Nedergaard,M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends in Neurosciences* **26**, 520-522 (2003).
18. Slezak,M. & Pfrieger,F.W. New roles for astrocytes: Regulation of CNS synaptogenesis. *Trends in Neurosciences* **26**, 531-535 (2003).
19. Jessen,K.R. & Mirsky,R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews Neuroscience* **6**, 671-682 (2005).
20. Biber,K., Neumann,H., Inoue,K., & Boddeke,H.W.G.M. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends in Neurosciences* **30**, 596-602 (2007).
21. van Rossum,D. & Hanisch,U.K. Microglia. *Metabolic Brain Disease* **19**, 393-411 (2004).
22. Raivich,G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends in Neurosciences* **28**, 571-573 (2005).
23. Hodgkin,A.L. & Huxley,A.F. A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve. *Journal of Physiology-London* **117**, 500-544 (1952).
24. Richardson,T.L., Turner,R.W., & Miller,J.J. Action-Potential Discharge in Hippocampal Cal Pyramidal Neurons - Current Source-Density Analysis. *Journal of Neurophysiology* **58**, 981-996 (1987).
25. Hodgkin,A.L. & Huxley,A.F. Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature* **144**, 710-711 (1939).
26. Scanziani,M. & Hausser,M. Electrophysiology in the age of light. *Nature* **461**, 930-939 (2009).
27. Tsien,R.Y. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 509-544 (1998).
28. Shimomura,O., Johnson,F.H., & Saiga,Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, A Bioluminescent Protein from Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**, 223-& (1962).
29. Chalfie,M., Tu,Y., Euskirchen,G., Ward,W.W., & Prasher,D.C. Green Fluorescent Protein As A Marker for Gene-Expression. *Science* **263**, 802-805 (1994).
30. Cubitt,A.B., Heim,R., Adams,S.R., Boyd,A.E., Gross,L.A., & Tsien,R.Y. Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 448-455 (1995).

31. Heim,R., Prasher,D.C., & Tsien,R.Y. Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12501-12504 (1994).
32. Shaner,N.C., Steinbach,P.A., & Tsien,R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* **2**, 905-909 (2005).
33. Adelsberger,H., Garaschuk,O., & Konnerth,A. Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nature Neuroscience* **8**, 988-990 (2005).
34. Hirase,H., Qian,L., Bartho,P., & Buzsaki,G. Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *Plos Biology*. **2**, E96 (2004).
35. Kerr,R., Lev-Ram,V., Baird,G., Vincent,P., Tsien,R.Y., & Schafer,W.R. Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of C-elegans. *Neuron* **26**, 583-594 (2000).
36. Stosiek,C., Garaschuk,O., Holthoff,K., & Konnerth,A. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. U. S. A* **100**, 7319-7324 (2003).
37. Funk,K., Woitecki,A., Franjic-Wurtz,C., Gensch,T., Mohrlen,F., & Frings,S. Modulation of chloride homeostasis by inflammatory mediators in dorsal root ganglion neurons. *Molecular Pain* **4**, 32 (2008).
38. Kaneko,H., Nakamura,T., & Lindemann,B. Noninvasive measurement of chloride concentration in rat olfactory receptor cells with use of a fluorescent dye. *American Journal of Physiology* **280**, C1387-C1393 (2001).
39. Kuner,T. & Augustine,G.J. A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **27**, 447-459 (2000).
40. Meuwis,K., Boens,N., De Schryver,F.C., Gallay,J., & Vincent,M. Photophysics of the fluorescent K⁺ indicator PBF1. *Biophysical Journal*. **68**, 2469-2473 (1995).
41. Prasad,N.P. Nanophotonics. (Wiley-interscience,2009).
42. Huang,S., Heikal,A.A., & Webb,W.W. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophysical Journal*. **82**, 2811-2825 (2002).
43. Laiho,L.H., Pelet,S., Hancewicz,T.M., Kaplan,P.D., & So,P.T. Two-photon 3-D mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra. *Journal of Biomedical Optics* **10**, 024016 (2005).
44. Honig,M.G. & Hume,R.I. Dil and diO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends in Neurosciences*. **12**, 333-1 (1989).
45. Quattrochi,J.J., Mamelak,A.N., Madison,R.D., Macklis,J.D., & Hobson,J.A. Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol-fluorescent microspheres. *Science* **245**, 984-986 (1989).

46. Kreitzer, A.C., Gee, K.R., Archer, E.A., & Regehr, W.G. Monitoring presynaptic calcium dynamics in projection fibers by in vivo loading of a novel calcium indicator. *Neuron* **27**, 25-32 (2000).
47. Wachowiak, M., Denk, W., & Friedrich, R.W. Functional organization of sensory input to the olfactory bulb glomerulus analyzed by two-photon calcium imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9097-9102 (2004).
48. Judkewitz, B., Rizzi, M., Kitamura, K., & Hausser, M. Targeted single-cell electroporation of mammalian neurons in vivo. *Nature Protocols* **4**, 862-869 (2009).
49. Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., & Tank, D.W. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* **385**, 161-165 (1997).
50. Waters, J., Larkum, M., Sakmann, B., & Helmchen, F. Supralinear Ca²⁺ influx into dendritic tufts of layer 2/3 neocortical pyramidal neurons in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience* **23**, 8558-8567 (2003).
51. Molitoris, B.A. & Sandoval, R.M. Intravital multiphoton microscopy of dynamic renal processes. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **288**, F1084-F1089 (2005).
52. Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., & Sanes, J.R. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* **28**, 41-51 (2000).
53. Kissa, K., Mordelet, E., Soudais, C., Kremer, E.J., Demeneix, B.A., Brulet, P., & Coen, L. In vivo neuronal tracing with GFP-TTC gene delivery. *Molecular and Cellular Neuroscience* **20**, 627-637 (2002).
54. Spergel, D.J., Kruth, U., Shimshek, D.R., Sprengel, R., & Seeburg, P.H. Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter, anatomical, and physiological studies. *Progress in Neurobiology* **63**, 673-686 (2001).
55. Hasan, M.T., Friedrich, R.W., Euler, T., Larkum, M.E., Giese, G., Both, M., Duebel, J., Waters, J., Bujard, H., Griesbeck, O., Tsien, R.Y., Nagai, T., Miyawaki, A., & Denk, W. Functional fluorescent Ca²⁺ indicator proteins in transgenic mice under TET control. *Plos Biology* **2**, 763-775 (2004).
56. Wang, J.W., Wong, A.M., Flores, J., Vosshall, L.B., & Axel, R. Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell* **112**, 271-282 (2003).
57. Miesenbock, G. Genetic methods for illuminating the function of neural circuits. *Current Opinion in Neurobiology* **14**, 395-402 (2004).
58. Reiff, D.F., Ihring, A., Guerrero, G., Isacoff, E.Y., Joesch, M., Nakai, J., & Borst, A. In vivo performance of genetically encoded indicators of neural activity in flies. *Journal of Neuroscience* **25**, 4766-4778 (2005).
59. Bousso, P. Real-time imaging of T-cell development. *Current Opinion in Immunology* **16**, 400-405 (2004).

60. Callaway,E.M. Transneuronal circuit tracing with neurotropic viruses. *Current Opinion in Neurobiology* **18**, 617-623 (2008).
61. Lichtman,J.W. & Conchello,J.A. Fluorescence microscopy. *Nature Methods* **2**, 910-919 (2005).
62. Yuste,R. Fluorescence microscopy today. *Nature Methods* **2**, 902-904 (2005).
63. Minsky, M. Microscopy apparatus. [US 3 013 463]. 1961.
Type de référence: Brevet
64. Conchello,J.A. & Lichtman,J.W. Optical sectioning microscopy. *Nature Methods* **2**, 920-931 (2005).
65. Branzan,A.L., Landthaler,M., & Szeimies,R.M. In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology. *Lasers in Medical Science* **22**, 73-82 (2007).
66. Chiou,A.G.Y., Kaufman,S.C., Kaufman,H.E., & Beuerman,R.W. Clinical corneal confocal microscopy. *Survey of Ophthalmology* **51**, 482-500 (2006).
67. Dunbar,K. & Canto,M. Confocal endomicroscopy. *Current Opinion in Gastroenterology* **24**, 631-637 (2008).
68. Guy,S. Confocal laser endomicroscopy for diagnosis. *Expert Review of Medical Devices* **5**, 415 (2008).
69. Kaufman,S.C. & Kaufman,H.E. How has confocal microscopy helped us in refractive surgery? *Current Opinion in Ophthalmology* **17**, 380-388 (2006).
70. Kim,P., Puoris'haag,M., Cote,D., Lin,C.P., & Yun,S.H. In vivo confocal and multiphoton microendoscopy. *Journal of Biomedical Optics* **13**, (2008).
71. Svoboda,K. & Yasuda,R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* **50**, 823-839 (2006).
72. Dufour,P., Dufour,S., Castonguay,A., McCarthy,N., & De Koninck,Y. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy for functional cellular imaging: advantages and challenges or One photon is good... but two is better! *MS-Medecine Sciences* **22**, 837-844 (2006).
73. Helmchen,F., Svoboda,K., Denk,W., & Tank,D.W. In vivo dendritic calcium dynamics in deep-layer cortical pyramidal neurons. *Nature Neuroscience* **2**, 989-996 (1999).
74. Svoboda,K., Helmchen,F., Denk,W., & Tank,D.W. Spread of dendritic excitation in layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex in vivo. *Nature Neuroscience* **2**, 65-73 (1999).
75. Theer,P., Hasan,M.T., & Denk,W. Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *Optic Letters* **28**, 1022-1024 (2003).
76. Helmchen,F. & Denk,W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods* **2**, 932-940 (2005).

77. Margrie,T.W., Brecht,M., & Sakmann,B. In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **444**, 491-498 (2002).
78. Komai,S., Denk,W., Osten,P., Brecht,M., & Margrie,T.W. Two-photon targeted patching (TPTP) in vivo. *Nature Protocols* **1**, 648-6U5 (2006).
79. Margrie,T.W., Meyer,A.H., Caputi,A., Monyer,H., Hasan,M.T., Schaefer,A.T., Denk,W., & Brecht,M. Targeted whole-cell recordings in the mammalian brain in vivo. *Neuron* **39**, 911-918 (2003).
80. Flusberg,B.A., Cocker,E.D., Piyawattanametha,W., Jung,J.C., Cheung,E.L., & Schnitzer,M.J. Fiber-optic fluorescence imaging. *Nature Methods* **2**, 941-950 (2005).
81. Jung,J.C., Mehta,A.D., Aksay,E., Stepnoski,R., & Schnitzer,M.J. In vivo mammalian brain imaging using one- and two-photon fluorescence microendoscopy. *Journal of Neurophysiology*. **92**, 3121-3133 (2004).
82. Levene,M.J., Dombeck,D.A., Kasischke,K.A., Molloy,R.P., & Webb,W.W. In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *Journal of Neurophysiology*. **91**, 1908-1912 (2004).
83. Barretto,R.P.J., Messerschmidt,B., & Schnitzer,M.J. In vivo fluorescence imaging with high-resolution microlenses. *Nature Methods* **6**, 511-U61 (2009).
84. Hebert,N.C., Lavalley,M., & Schanne,O. Microelectrodes. *Science* **160**, 333-& (1968).
85. Lo,F.S., Lu,S.M., & Sherman,S.M. Intracellular and Extracellular In vivo Recording of Different Response-Modes for Relay Cells of the Cats Lateral Geniculate-Nucleus. *Experimental Brain Research* **83**, 317-328 (1991).
86. Humphrey,D.R. & Schmidt,E.M. in Neurophysiological Techniques. ed. SpringerLink 1-64 (Humana press,1991).
87. Schanne,O.F., Lavalley,M., Laprade,R., & Gagne,S. Electrical Properties of Glass Microelectrodes. *Proceedings of the Institute of Electrical and Electronics Engineers* **56**, 1072-& (1968).
88. Lavalley,M., Schanne,O.F., & Hébert,N.C. glass microelectrodes. (Wiley,1969).
89. Dold,G.M. & Burke,R.E. Joystick Operated Microforge for Fabrication of Glass Micropipet Electrodes. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. **33**, 232-& (1972).
90. Brown,K.T. & Flaming,D.G. Beveling of Fine Micropipet Electrodes by A Rapid Precision Method. *Science* **185**, 693-695 (1974).
91. Bianchi,G. Electronic Filter Simulation & simulation. (McGraw-Hill,2007).
92. Frank,K. & Beggs,S. Microelectrodes for recording and stimulation. *Physical Techniques in Biological Research* 23-84 (1964).
93. Cheng,D.K. Field and wave electromagnetics. (Addison-Wesley,1992).

94. Fatt,P. Electric Potentials Occurring Around A Neurone During Its Antidromic Activation. *Journal of Neurophysiology* **20**, 27-60 (1957).
95. Frank,K. & Fuortes,M.G.F. Potentials Recorded from the Spinal Cord with Microelectrodes. *Journal of Physiology-London* **130**, 625-& (1955).
96. Nelson,P.G. & Frank,K. Extracellular Potential Fields of Single Spinal Motoneurons. *Journal of Neurophysiology* **27**, 913-& (1964).
97. Irvine,D.R.F. Electrophysiological Analysis of Synaptic Transmission - Hubbard,Ji, Llinas,J and Quastel,Dmj. *Australian Journal of Psychology* **23**, 338 (1971).
98. Humphrey,D.R. & Corrie,W.S. Properties of Pyramidal Tract Neuron System Within A Functionally Defined Subregion of Primate Motor Cortex. *Journal of Neurophysiology* **41**, 216-243 (1978).
99. MacLean,J.N., Fenstermaker,V., Watson,B.O., & Yuste,R. A visual thalamocortical slice. *Nature Methods* **3**, 129-134 (2006).
100. Swadlow,H.A. Neocortical efferent neurons with very slowly conducting axons: strategies for reliable antidromic identification. *Journal of Neuroscience Methods* **79**, 131-141 (1998).
101. Goldberg,S.J. & Mcclung,J.R. Orthodromic Activation of Juxta-Abducens Neurons Following 6Th Nerve-Stimulation in the Cat. *Brain Research* **443**, 350-354 (1988).
102. Dekoninck,Y., Ribeiro dasilva,A., Henry,J.L., & Cuello,A.C. Spinal Neurons Exhibiting A Specific Nociceptive Response Receive Abundant Substance-P-Containing Synaptic Contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5073-5077 (1992).
103. Lopez-Bendito,G., Sturgess,K., Erdelyi,F., Szabo,G., Molnar,Z., & Paulsen,O. Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons. *Cerebral Cortex* **14**, 1122-1133 (2004).
104. Luo,L., Callaway,E.M., & Svoboda,K. Genetic dissection of neural circuits. *Neuron* **57**, 634-660 (2008).
105. Macchesn,J.B., Oconnor,P.B., & Presby,H.M. New Technique for Preparation of Low-Loss and Graded-Index Optical Fibers. *Proceedings of the Ieee* **62**, 1280-1281 (1974).
106. Mottin,S., Laporte,P., & Cespuglio,R. Inhibition of NADH oxidation by chloramphenicol in the freely moving rat measured by picosecond time-resolved emission spectroscopy. *Journal of Neurochemistry* **84**, 633-642 (2003).
107. Vo-Dinh T. Biomedical Photonics handbook. (CRC Press,2003).
108. Ikeda,H., Heinke,B., Ruscheweyh,R., & Sandkuhler,J. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science* **299**, 1237-1240 (2003).

109. Labrakakis,C. & MacDermott,A.B. Neurokinin receptor 1-expressing spinal cord neurons in lamina I and III/IV of postnatal rats receive inputs from capsaicin sensitive fibers. *Neuroscience Letters* **352**, 121-124 (2003).
110. Labrakakis,C., Lorenzo,L.E., Bories,C., Ribeiro-Da-Silva,A., & De Koninck,Y. Inhibitory coupling between inhibitory interneurons in the spinal cord dorsal horn. *Molecular Pain* **5**, (2009).
111. Agrawal,G.P. Nonlinear fiber optics. (Wiley,2009).
112. Saleh,B.E.A. & teich,C.T. Fundamentals of photonics. (Wiley,1991).
113. Tanaka,S., Yoshida,K., Kinugasa,S., & Ohtsuka,Y. Birefringent side-hole fiber for use in strain sensor. *Optical Review* **4**, 92-95 (1997).
114. Xie,H.M., Dabkiewicz,P., Ulrich,R., & Okamoto,K. Side-Hole Fiber for Fiberoptic Pressure Sensing. *Optics Letters* **11**, 333-335 (1986).
115. Jacobs,S.A., Temelkuran,B., Weisberg,O., Ibanescu,M., Johnson,S.G., & Soljacic,M. in Specialty optical fibers handbook 315-360 (Elsevier,2006).
116. Knight,J.C. & Russett,P.S. Applied optics: New ways to guide light. *Science* **296**, 276-277 (2002).
117. Knight,J.C. Photonic crystal fibres. *Nature* **424**, 847-851 (2003).
118. Russell,P. Photonic crystal fibers. *Science* **299**, 358-362 (2003).
119. Ogilvie,G.J., Kidd,G.P., & Esdaile,R.J. Transmission Loss of Tetrachloroethylene-Filled Liquid Core-Fiber Light Guide. *Electronics Letters* **8**, 533-& (1972).
120. Payne,D.N. & Gambling,W.A. New Low-Loss Liquid-Core Fiber Waveguide. *Electronics Letters* **8**, 374-& (1972).
121. Stone,J. Optical Transmission Loss in Liquid-Core Hollow Fibers. *Ieee Journal of Quantum Electronics* **QE 8**, 386-& (1972).
122. Stone,J. Optical Transmission in Liquid-Core Quartz Fibers. *Applied Physics Letters* **20**, 239-& (1972).
123. Stone,J. Measurements of Absorption of Light in Low-Loss Liquids. *Journal of the Optical Society of America* **62**, 327-& (1972).
124. Hernandez-Cordero,J. in Specialty optical fibers handbook 599-617 (Elsevier,2006).
125. Jasapara, J., Bise, R., and Windeler, R. Chromatic dispersion measurements in a photonic bandgap fiber. . 70. 2002. OSA Trends in Optics and Photonics. Optical Fiber Communication Conference. Sawchuk, A.
Type de référence: Conference Proceeding
126. Welker,D.J., Tostenrude,J., Garvey,D.W., Canfield,B.K., & Kuzyk,M.G. Fabrication and characterization of single-mode electro-optic polymer optical fiber. *Optics Letters* **23**, 1826-1828 (1998).

127. Lee, K., Hu, P.F., Blows, J.L., Thorncraft, D., & Baxter, J. 200-m optical fiber with an integrated electrode and its poling. *Optics Letters* **29**, 2124-2126 (2004).
128. Fokine, M., Nilsson, L.E., Claesson, A., Berlemont, D., Kjellberg, L., Krummenacher, L., & Margulis, W. Integrated fiber Mach-Zehnder interferometer for electro-optic switching. *Optics Letters* **27**, 1643-1645 (2002).
129. Shen, Z. & Lin, S. Fiberoptic-based multisensor to brain neurons in awake animals. *SPIE* **2331**, 156-163 (1994).
130. Kraly, J., Fazal, M.A., Schoenherr, R.M., Bonn, R., Harwood, M.M., Turner, E., Jones, M., & Dovichi, N.J. Bioanalytical applications of capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **78**, 4097-4110 (2006).
131. Bowmaster, T.A., Davis, C.C., & Krauthamer, V. Excitation and detection of action potential-induced fluorescence changes through a single monomode optical fiber. *Biochimica et Biophysica Acta* **1091**, 9-14 (1991).
132. Duff, D.M. & Schmidt, J.J. In vivo spectrometric calcium flux recordings of intrinsic Caudate-Putamen cells and transplanted IMR-32 neuroblastoma cells using miniature fiber optrodes in anesthetized and awake rats and monkeys. *Journal of Neuroscience Methods* **99**, 9-23 (2000).
133. Kudo, Y., Takeda, K., Hicks, T.P., Ogura, A., & Kawasaki, Y. A new device for monitoring concentrations of intracellular Ca²⁺ in CNS preparations and its application to the frog's spinal cord. *Journal of Neuroscience Methods* **30**, 161-168 (1989).
134. Kudo, Y., Akita, K., Nakamura, T., Ogura, A., Makino, T., Tamagawa, A., Ozaki, K., & Miyakawa, A. A single optical fiber fluorometric device for measurement of intracellular Ca²⁺ concentration: its application to hippocampal neurons in vitro and in vivo. *Neuroscience* **50**, 619-625 (1992).
135. Nakamura, T., Minamisawa, H., Katayama, Y., Ueda, M., Terashi, A., Nakamura, K., & Kudo, Y. Increased intracellular Ca²⁺ concentration in the hippocampal CA1 area during global ischemia and reperfusion in the rat: a possible cause of delayed neuronal death. *Neuroscience* **88**, 57-67 (1999).
136. Neunlist, M., Zou, S.Z., & Tung, L. Design and use of an "optrode" for optical recordings of cardiac action potentials. *Pflugers Arch.* **420**, 611-617 (1992).
137. Bradley, P.M., Murphy, D., Kasparov, S., Croker, J., & Paton, J.F. A micro-optrode for simultaneous extracellular electrical and intracellular optical recording from neurons in an intact oscillatory neuronal network. *Journal of Neuroscience Methods* **168**, 383-395 (2008).
138. Mottin, S., Laporte, P., Jouvét, M., & Cespuglio, R. Determination of NADPH in the rat brain during sleep-wake states with an optic fibre sensor and time-resolved fluorescence procedures. *Neuroscience* **79**, 683-693 (1997).
139. Dufour, S., Dufour, P., Amzika, F., and Vallée, R. Neurobiological use of a micro-optrode using UV excitation light and signal-to-noise ratio optimization. Nikiforos Kollias, Bernard Choi Haishan Zeng Reza S. Malek Brian Jet-Fei Wong Justus F. R. Ilgner Kenton W. Gregory Guillermo J. Tearney Laura Marcu Henry Hirschberg

- Steen J. Madsen. 7161. 2009. Proceeding of SPIE. Photonic Therapeutics and Diagnostics V.
Type de référence: Conference Proceeding
140. Paton,J.F.R. The ventral medullary respiratory network of the mature mouse studied in a working heart-brainstem preparation. *Journal of Physiology-London* **493**, 819-831 (1996).
 141. Wang,X., Lou,N., Xu,Q., Tian,G.F., Peng,W.G., Han,X., Kang,J., Takano,T., & Nedergaard,M. Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nature Neuroscience* **9**, 816-823 (2006).
 142. Grellier,A.J.C., Zayer,N.K., & Pannell,C.N. Heat transfer modelling in CO₂ laser processing of optical fibres. *Optics Communications* **152**, 324-328 (1998).
 143. Dimmick,T.E., Kakarantzas,G., Birks,T.A., & Russell,P.S. Carbon dioxide laser fabrication of fused-fiber couplers and tapers. *Applied Optics* **38**, 6845-6848 (1999).
 144. Chichkov,B.N., Momma,C., Nolte,S., vonAlvensleben,F., & Tunnermann,A. Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. *Applied Physics A-Materials Science & Processing* **63**, 109-115 (1996).
 145. Buck,J.A. Fundamentals of optical fibers. (John Wiley & Sons, 2004).
 146. Banwell,C. Fundamentals of Molecular Spectroscopy. (MCGRAW-HILL COLLEGE,2008).
 147. Kyoto,M., Ohoga,Y., Ishikawa,S., & Ishiguro,Y. Characterization of Fluorine-Doped Silica Glasses. *Journal of Materials Science* **28**, 2738-2744 (1993).
 148. Carey,D.M. & Korenowski,G.M. Measurement of the Raman spectrum of liquid water. *Journal of Chemical Physics* **108**, 2669-2675 (1998).
 149. Hudmon,A., Lebel,E., Roy,H., Sik,A., Schulman,H., Waxham,M.N., & De Koninck,P. A mechanism for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association. *Journal of Neuroscience* **25**, 6971-6983 (2005).
 150. Keller,A.F., Beggs,S., Salter,M.W., & De Koninck,Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Molecular Pain* **3**, 27 (2007).
 151. Craig,A.D. Retrograde analyses of spinothalamic projections in the macaque monkey: input to ventral posterior nuclei. *Journal of Comparative Neurology*. **499**, 965-978 (2006).
 152. Giesler,G.J., Jr., Menetrey,D., & Basbaum,A.I. Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. **184**, 107-126 (1979).
 153. Torsney,C. & Fitzgerald,M. Spinal dorsal horn cell receptive field size is increased in adult rats following neonatal hindpaw skin injury. *Journal of Physiology*. **550**, 255-261 (2003).

154. Barnard,R.J., Corre,K., & Cho,H. Effect of Training on Resting Heart-Rate of Rats. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **35**, 285-289 (1976).
155. Livet,J., Weissman,T.A., Kang,H.N., Draft,R.W., Lu,J., Bennis,R.A., Sanes,J.R., & Lichtman,J.W. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* **450**, 56-+ (2007).
156. Airan,R.D., Thompson,K.R., Fenno,L.E., Bernstein,H., & Deisseroth,K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* **458**, 1025-1029 (2009).
157. Tamminga,C.A., Schneider,M.B., Gradinaru,V., Zhang,F., & Deisseroth,K. Controlling neuronal activity. *American Journal of Psychiatry* **165**, 562 (2008).
158. Tonnesen,J., Sorensen,A.T., Deisseroth,K., Lundberg,C., & Kokaia,M. Optogenetic control of epileptiform activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 12162-12167 (2009).
159. Paxinos,G. & Watson,C. The rat brain in stereotaxic coordinates. (New York: Academic.,1998).
160. Brager,D.H., Luther,P.W., Erdelyi,F., Szabo,G., & Alger,B.E. Regulation of exocytosis from single visualized GABAergic boutons in hippocampal slices. *Journal of Neuroscience*. **23**, 10475-10486 (2003).

Le numero 1 mondial du memoires



www.rapport-gratuit.com

clubmemoire@gmail.com