

# Table des matières

Résumé.....	i
Table des matières .....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Méthodes de mesure non-invasives en neuroscience et biologie .....</b>	<b>2</b>
2.1. Méthodes électrophysiologiques.....	2
2.1.1. Enregistrement à l'échelle cellulaire.....	3
2.1.2. Enregistrement du comportement moyen .....	3
2.2. Étude de l'activité optique intrinsèque .....	9
2.2.1. Principes généraux .....	10
2.2.2. Changements physiologiques.....	11
2.2.3. Applications .....	11
2.2.4. Résultats.....	12
2.3. Études thermiques.....	14
2.3.1. Propriétés physiques du cerveau .....	15
2.3.2. Vitesse de conduction et constante de temps thermique .....	16
2.4. Variations de température dans le cerveau .....	18
2.4.1. Premières études thermiques .....	24
2.4.2. Imagerie infrarouge appliqué à l'imagerie du cerveau.....	25
2.4.3. Bolomètres et dispositif de thermographie par contact.....	28
<b>3. Développement du dispositif de thermographie par contact.....</b>	<b>37</b>
3.1. Spécificités neurobiologiques .....	37
3.2. Spécificités physiques.....	39
3.3. Modélisation 3D .....	39
3.4. Production du capteur et mise en place de procédures .....	46
3.4.1. Choix de l'adhésif et vérification de l'étanchéité .....	46
3.4.2. Collage de la cuve sur le capteur bolométrique .....	48
3.5. Comportement initial du capteur en présence de liquide.....	49
3.6. Dépôt d'une couche mince supplémentaire .....	52
3.6.1. Dépôt de SiO <sub>2</sub> par évaporation.....	52
3.6.2. Dépôt de polyimide par rotation (« spinning ») .....	54
3.6.3. Dépôt d'une couche de Teflon AF .....	54
3.7. Interface d'utilisation: acquisition et traitement des données.....	57
<b>4. Caractérisation du dispositif.....</b>	<b>58</b>
4.1. Méthode .....	58
4.2. Résultats.....	59
4.3. Analyse .....	64
4.3.1. Analyse et traitement du signal.....	66
4.4. Considérations pratiques.....	73
<b>5. Applications du dispositif en neurobiologie .....</b>	<b>74</b>
5.1. Matériel et méthode .....	74
5.1.1. Électrophysiologie .....	74

5.1.2. Solutions.....	75
5.1.3. Tranches.....	75
5.1.4. Imagerie thermique.....	75
5.2. Applications.....	76
5.2.1. La chaleur comme signature de l'activité métabolique.....	76
5.2.2. Étude des changements physiologiques dans un tissu biologique.....	79
<b>6. Ouverture et conclusion .....</b>	<b>86</b>
<b>Références et bibliographie.....</b>	<b>92</b>
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>95</b>
Protocole de collage et d'alignement de la cuve sur le capteur .....	95
<b>Annexe 2 .....</b>	<b>96</b>
Fonctionnement du logiciel.....	96

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Valeurs de conductivité thermique du cerveau et de l'eau (tiré de Duck [30]).	15
<b>Tableau 2.</b> Valeurs de chaleur spécifique du cerveau et de l'eau (tiré de Duck [30]).	15
<b>Tableau 3.</b> Valeurs de densité du cerveau et de l'eau (tiré de Duck [30]).	16
<b>Tableau 4.</b> Taux métabolique cérébral régional de l'oxygène dans le cortex de rat (tiré du livre de Siesjo [34]).	22
<b>Tableau 5.</b> $rCMRO_2$ pour diverses structures d'un cerveau de rat in vivo (tiré de Siesjo [34]).	22
<b>Tableau 6.</b> Taux d'échauffement calculés pour l'hippocampe de rat.	23
<b>Tableau 7.</b> Valeurs du bruit sous diverses conditions d'utilisation, pour un bolomètre de coordonnées (60,80) et sur l'ensemble de la matrice de bolomètres.	60
<b>Tableau 8.</b> Valeurs de la SiTF avec ou sans liquide, pour un bolomètre de coordonnées (60,80) et sur l'ensemble de la matrice de bolomètres.	62
<b>Tableau 9.</b> Valeurs de la NETD sous diverses conditions d'utilisation, pour un bolomètre de coordonnées (60,80) et sur l'ensemble de la matrice de bolomètres à température ambiante.	63
<b>Tableau 10.</b> Valeurs de la NETD au bolomètre (60,80) obtenues suite au moyennage sur un certain nombre de séquences distinctes.	68
<b>Tableau 11.</b> Protocole de collage et d'alignement de la cuve sur le capteur.	95

## Liste des figures

<i>Figure 1. Représentation schématique d'une organisation en champ ouvert</i> .....	4
<i>Figure 2. Représentations schématiques d'une organisation en champs sphériques fermés</i>	5
<i>Figure 3. Représentation schématique d'une organisation en champ ouvert-fermé.</i> .....	5
<i>Figure 4. Représentation schématique d'une tranche d'hippocampe de rat</i> .....	6
<i>Figure 5. Représentation schématique d'une tranche d'hippocampe et du placement des électrodes utilisées pour la stimulation et l'enregistrement</i> .....	7
<i>Figure 6. Allure de l'enregistrement d'un EPSP pour 3 intensités de stimulation différentes.</i> .....	8
<i>Figure 7. Enregistrement de l'EPSP évoqué par un train de stimuli électriques à 20 Hz sur une seconde.</i> .....	9
<i>Figure 8. Schéma du montage pour des études sur la variation d'activité optique intrinsèque en transmission et/ou en réflexion.</i> .....	11
<i>Figure 9. Imagerie de l'effet de l'induction d'une dépression progressive dans une tranche d'hippocampe.</i> .....	13
<i>Figure 10. Représentation du comportement de la constante de temps thermique en fonction de la distance source-capteur.</i> .....	17
<i>Figure 11. Schéma du montage utilisé lors d'études thermiques in vivo à l'aide d'une caméra infrarouge</i> .....	26
<i>Figure 12. Image obtenue en microscopie électronique à balayage représentant la différence entre les bolomètres suspendus utilisés en imagerie infrarouge et les bolomètres non-suspendus développés pour les applications de thermographie par contact.</i> .....	29
<i>Figure 13. Variation du potentiel aux bornes d'un bolomètre en fonction de la température.</i> .....	31
<i>Figure 14. Capteur bolométrique par contact dans son boîtier</i> .....	32
<i>Figure 15. Représentation schématique des empilements dont est composé chaque pixel (bolomètre) du capteur.</i> .....	33
<i>Figure 16. Schéma du montage entourant le dispositif de thermographie par contact.</i> .....	38
<i>Figure 17. Capteur bolométrique dans son boîtier</i> .....	40
<i>Figure 18. Modélisation 3D du capteur bolométrique dans son boîtier</i> .....	41
<i>Figure 19. Vue du dessus de la cuve modélisée</i> .....	41
<i>Figure 20. Vue du dessous de la cuve modélisée et description de l'utilité de certaines spécificités : a) Gouttière pour l'adhésif d'étanchéité, b) espace suffisant à la hauteur des fils, c) rebord empêchant le déplacement latéral entre la cuve et le capteur</i> .....	42
<i>Figure 21. Assemblage cuve-capteur</i> .....	42
<i>Figure 22. Vue latérale de l'assemblage cuve-capteur</i> .....	43
<i>Figure 23. Pièce à la base du dispositif</i> .....	44
<i>Figure 24. Dispositif avec la base et l'assemblage cuve-capteur</i> .....	44
<i>Figure 25. Modélisation complète du dispositif de thermographie par contact</i> .....	45
<i>Figure 26. Dispositif de thermographie par contact</i> .....	46
<i>Figure 27. Image au microscope optique des bordures d'une cuve de test.</i> .....	47
<i>Figure 28. Vue de dessous de la cuve et dimensions des bordures le long de la gouttière.</i>	48
<i>Figure 29. Enregistrement initial au dépôt d'une goutte d'eau.</i> .....	49

<b>Figure 30.</b> Enregistrement subséquent au dépôt d'une goutte d'eau.....	50
<b>Figure 31.</b> Enregistrement au dépôt de diverses substances. ....	50
<b>Figure 32.</b> Fissures observées en microscopie électronique. ....	51
<b>Figure 33.</b> Dégradation des pôles observée en microscopie électronique. ....	52
<b>Figure 34.</b> Éclatement du SiO <sub>2</sub> sous le poids du liquide. Chaque bolomètre (carré) a des dimensions de 52 µm. ....	53
<b>Figure 35.</b> Gravure du Teflon AF selon un patron spécifique. ....	56
<b>Figure 36.</b> Variation dans le temps du signal brut enregistré au bolomètre de coordonnées (60,80) sous diverses conditions d'utilisation. ....	60
<b>Figure 37.</b> Représentation sous forme d'histogramme de la distribution du bruit pour tous les bolomètres de la matrice et sous diverses conditions d'utilisation. ....	61
<b>Figure 38.</b> Représentation sous forme d'histogramme de la distribution de la SiTF pour tous les bolomètres pour une utilisation a) à sec et b) avec un liquide. ....	62
<b>Figure 39.</b> Variation dans le temps de la NETD au bolomètre de coordonnées (60,80) sous diverses conditions d'utilisation. ....	63
<b>Figure 40.</b> Représentation sous forme d'histogramme de la distribution de la NETD pour tous les bolomètres de la matrice et sous diverses conditions d'utilisation. ....	64
<b>Figure 41.</b> Représentation de l'effet du moyennage temporel sur un signal thermique. ....	67
<b>Figure 42.</b> Représentation de l'effet du moyennage du signal thermique sur un certain nombre de séquences distinctes. ....	69
<b>Figure 43.</b> Variation temporelle du signal thermique au bolomètre de coordonnées (60,80) sous perfusion d'un liquide à 33 °C. ....	72
<b>Figure 44.</b> Effet de la soustraction du signal au pixel (50,80), présenté en a), du signal au pixel (60,80). Le résultat de la soustraction est présenté en b). ....	72
<b>Figure 45.</b> Potentiel de champs enregistré dans l'hippocampe en réponse à une stimulation unique.....	77
<b>Figure 46.</b> Potentiel de champs enregistré dans l'hippocampe en réponse à une stimulation à 20 Hz. ....	77
<b>Figure 47.</b> Enregistrement en transmission thermique sur l'hippocampe de rat .....	81
<b>Figure 48.</b> Effet du moyennage de plusieurs images sur la résultante.....	82
<b>Figure 49.</b> Vérification électrophysiologique de la viabilité de la tranche. ....	83
<b>Figure 50.</b> Enregistrements électrophysiologiques dans le CA1 suite à la perfusion de ouabaïne. La perfusion de ouabaïne débutait 30 secondes avant l'enregistrement. ....	84
<b>Figure 51.</b> Interface générale d'utilisation. ....	96
<b>Figure 52.</b> Fenêtre pour la calibration du capteur. ....	97
<b>Figure 53.</b> Menu pour l'enregistrement d'images. ....	98
<b>Figure 54.</b> Exemple de fichier résultant de l'enregistrement. ....	99

# 1. Introduction

Le développement de nouvelles applications en neuroscience et en biologie nécessite le travail conjoint de divers domaines scientifiques. Bien que les connaissances en neurobiologie augmentent à un rythme impressionnant, il reste beaucoup à découvrir et à comprendre. Avec l'avènement de certaines technologies, il est maintenant possible d'exploiter des avenues qui jusqu'à maintenant semblaient impossibles. Des technologies qui jusque là étaient utilisées dans d'autres sphères de la science deviennent maintenant des acteurs d'importance en neurobiologie. C'est avec ces aspirations en tête qu'une collaboration a été mise en place entre l'Institut National d'Optique (INO) et le Centre de Recherche Université Laval Robert-Giffard (CRULRG) à l'automne 2005. Le projet de recherche mis en place au cours de ma maîtrise relève de cette collaboration.

C'est suite à une visite de mon directeur de recherche, le professeur Yves De Koninck, à l'INO que le projet a pris forme. Prenant connaissance qu'un appareil de thermographie par contact permettait de cartographier des variations de température aussi faibles que  $\sim 2$  mK, avec une résolution spatiale de  $52 \mu\text{m}$ , et ce à une vitesse de lecture de 30 Hz, il se demanda si cette technologie pouvait être d'intérêt en neurobiologie. Sachant qu'à toute activité métabolique est associé un dégagement de chaleur, il devenait intéressant de savoir si ces libérations calorifiques pouvaient être détectées et localisées pour des tissus biologiques à l'aide d'un tel dispositif. C'est dans cette veine que s'est inscrit le présent projet de recherche. Étant donné qu'il s'agissait d'un nouveau domaine d'intérêt pour mon groupe de recherche au CRULRG, j'ai d'abord été amené à valider de façon empirique cet intérêt. Le dispositif de thermographie existant à l'INO ne pouvant permettre de travailler avec des fluides, j'ai aussi participé activement au développement et à la caractérisation d'une nouvelle génération de ce capteur. Il importait aussi de s'assurer que cette génération du capteur réponde aux spécifications physiques et biologiques du projet. Du point de vue des études neurobiologiques, j'ai pris en charge le développement d'un montage expérimental et j'ai pu effectuer de premières études *in vitro*. Bien que celles-ci ne soient que préliminaires, elles permettent de tirer certaines conclusions quant à

l'utilisation d'un tel système. Nous reviendrons sur chacune de ces étapes dans le présent mémoire. L'intérêt pour les études thermiques et l'utilisation du dispositif de thermographie par contact seront d'abord mis en relief par rapport aux méthodes déjà utilisées. Le système que nous avons développé au cours de ma maîtrise permet d'effectuer des mesures thermiques tout en permettant de compléter le résultat par l'utilisation d'autres techniques de mesure.

## **2. Méthodes de mesure non-invasives en neuroscience et biologie**

Le fait d'avoir à faire un choix entre un enregistrement à l'échelle cellulaire ou celui du comportement moyen du système est un dilemme courant en neurosciences. La mesure de l'activité à l'intérieur des réseaux neuronaux nécessite à la fois une résolution spatiale de l'ordre de grandeur des cellules, mais se doit aussi de permettre une vue d'ensemble du réseau. Des approches existent afin de permettre l'enregistrement de l'activité dans les réseaux neuronaux. Celles-ci peuvent être séparées en groupe selon qu'elles sont basées sur des techniques optiques, électrophysiologiques ou autres. Chacune de ces méthodes possède ses avantages, mais aussi ses restrictions et limites.

Il est aussi important de noter que certaines méthodes nécessitent l'injection d'agents extérieurs. Comme il s'agit de méthodes invasives, c'est-à-dire qu'elles entraînent une modification de la composition du milieu, celles-ci ne seront pas prises en compte à l'intérieur de la présente étude. Seules les méthodes non-invasives y seront couvertes. Il est aussi important de garder en tête qu'il peut être intéressant d'y aller d'une combinaison de ces méthodes. La combinaison de celles-ci avec le système de thermographie par contact permettra de tirer des conclusions supplémentaires.

### **2.1. Méthodes électrophysiologiques**

Les mesures électrophysiologiques posent le dilemme d'enregistrer à l'échelle cellulaire ou d'enregistrer le comportement moyen du système. Afin d'enregistrer à

l'échelle cellulaire, les enregistrements intracellulaires et l'enregistrement extracellulaire sur une cellule complète peuvent être utilisés. C'est par l'enregistrement extracellulaire de potentiels de champs qu'une vue globale du comportement du système peut être obtenue.

### **2.1.1. Enregistrement à l'échelle cellulaire**

Les enregistrements intracellulaires consistent à enregistrer le courant ou le voltage passant à travers la membrane d'une cellule. Pour ce faire, une microélectrode est introduite à l'intérieur d'une cellule et son potentiel peut être obtenu.

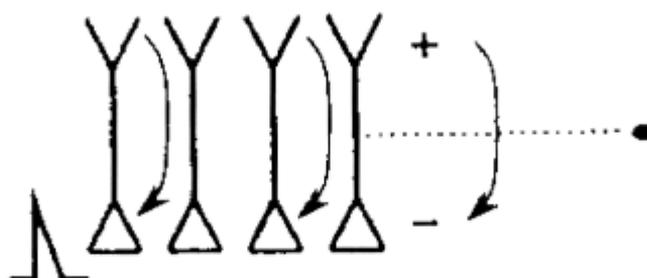
Il est aussi possible de positionner une électrode à l'extérieur de la cellule, c'est alors le cas d'un enregistrement extracellulaire. Si la pointe de l'électrode est petite ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ), alors seulement l'activité électrique du neurone adjacent à l'électrode sera mesurée. Il s'agit ici d'un enregistrement extracellulaire sur une seule cellule. Ces approches permettent d'obtenir le comportement spécifique d'un neurone en particulier.

### **2.1.2. Enregistrement du comportement moyen**

Afin d'enregistrer les signaux électriques d'un réseau, on s'intéresse alors à l'espace extracellulaire. Les champs électriques générés par l'activité des neurones du milieu environnant sont enregistrés. C'est la différence de potentiel entre 2 points de l'espace extracellulaire qui est mesurée. Il s'agit de la mesure des potentiels de champs extracellulaires. Comme il s'agit d'une des méthodes qui a été utilisée expérimentalement au cours du projet de recherche, il importe de mieux décrire les techniques utilisées. On s'intéressera particulièrement à l'enregistrement des potentiels de champs sur l'hippocampe du rat. Les explications proviennent d'ouvrages spécialisés dans le domaine [1, 2].

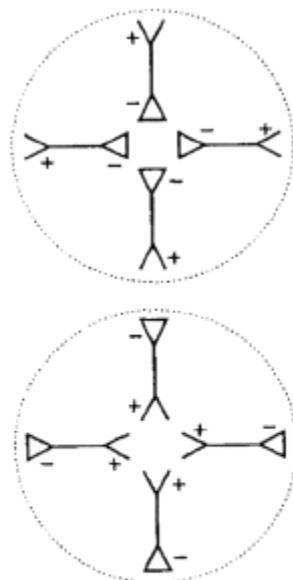
Il est important de souligner qu'il existe 3 principaux arrangements neuronaux qui produisent des potentiels de champs spécifiques distincts : les champs ouverts, fermés et mixtes. La différence est brièvement expliquée ici. Le lecteur qui désirerait de plus amples détails peut se référer au chapitre 14 du livre *Foundations of Cellular Neurophysiology* [1].

Le champ ouvert est rencontré lorsque les neurones sont arrangés selon une ligne et de façon à ce que les dendrites pointent dans une direction alors que les somas pointent dans la direction opposée (voir figure 1). Cet arrangement géométrique neuronal est particulièrement rencontré dans le cervelet, le néocortex et l'hippocampe. Si l'arrangement est activé par la stimulation d'une afférence, entraînant ainsi une activation synchronisée, il y aura l'établissement d'un dipôle entre les dendrites et les somas. C'est ce type d'arrangement qui nous intéressera particulièrement étant donné que nous nous sommes principalement intéressés aux études sur l'hippocampe du rat.



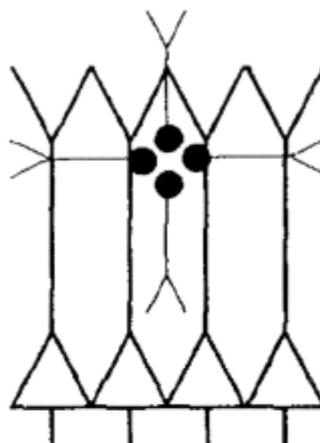
*Figure 1. Représentation schématique d'une organisation en champ ouvert (tiré de Johnston et al [1])*

Si les neurones sont arrangés selon une organisation sphérique de façon à ce que les dendrites pointent vers l'intérieur de la sphère et les somas vers l'extérieur ou vice-versa, alors il sera question de champs fermés (voir figure 2). La stimulation synchronisée d'une telle organisation cellulaire entraînera la production d'un dipôle sphérique (centre positif et extérieur négatif ou l'inverse).



**Figure 2.** Représentations schématiques d'une organisation en champs sphériques fermés (tiré de Johnston et al [1]).

Dans le cas où des neurones suivent une organisation sphérique et que plusieurs de ces organisations sont alignées linéairement, on a alors un champ ouvert-fermé (voir figure 3).

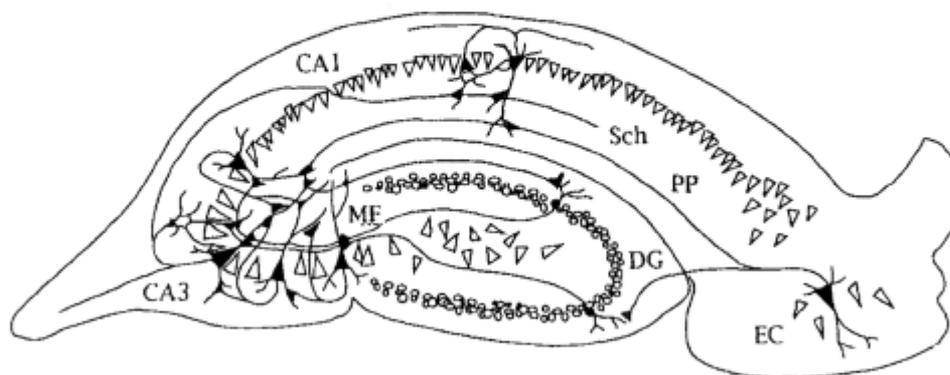


**Figure 3.** Représentation schématique d'une organisation en champ ouvert-fermé (tiré de Johnston et al [1]).

L'enregistrement sur des champs ouverts présente l'avantage de permettre la sommation du signal électrique le long d'un trajet bien précis. Comme les cellules sont alignées, on connaît la provenance du signal, ce qui n'est pas aussi évident dans le cas d'un arrangement sphérique fermé ou d'un champ ouvert-fermé.

### 2.1.2.1. Enregistrement extracellulaire du potentiel de champs dans l'hippocampe de rat

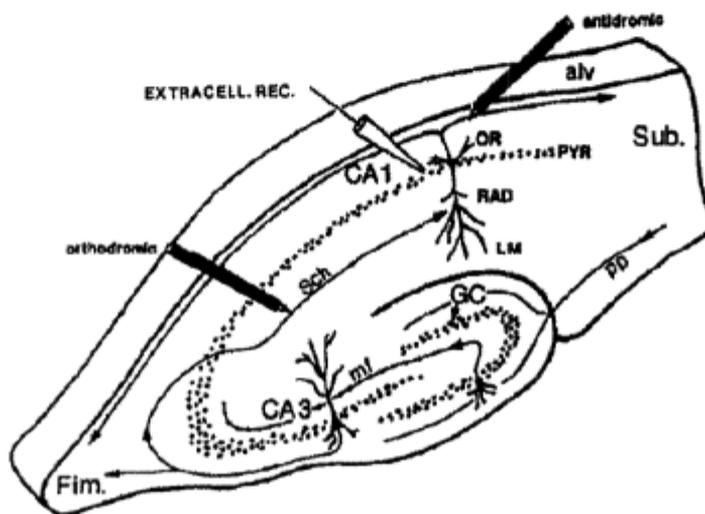
Le fait que les neurones y sont organisés de façon laminaire quasi-parfaite fait de l'hippocampe une structure anatomique de prédilection dans l'étude des champs ouverts. La figure 4 montre les principales parties d'une tranche d'hippocampe. On peut remarquer que les cellules dans le CA1 sont effectivement bien alignées. À cela s'ajoute le fait qu'il est relativement facile de déployer des études *in vitro* en tranche dans un tel type de structure.



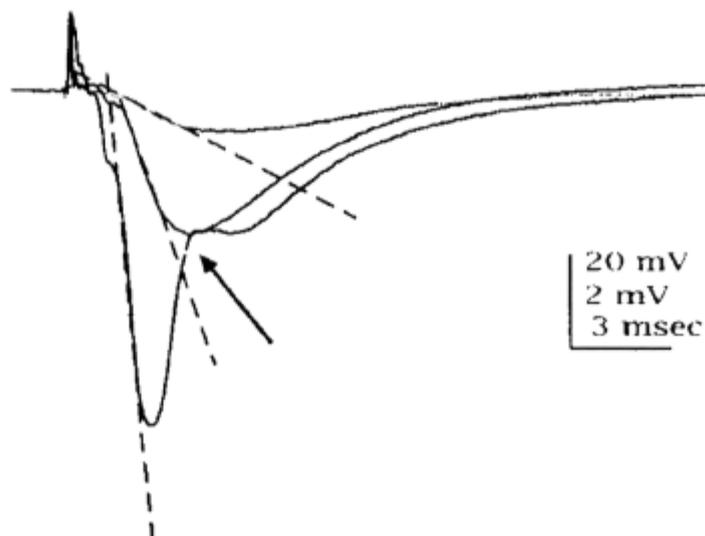
**Figure 4.** Représentation schématique d'une tranche d'hippocampe de rat. Le gyrus denté (DG) et les sous-champs CA1 et CA3 y sont identifiés. Les trajets synaptiques des collatérales de Schaffer (Sch), des fibres moussues (MF) et du chemin perforant (PP) sont aussi identifiés (tiré de Johnston et al [1]).

L'insertion des électrodes pour l'enregistrement de potentiels de champs dans la région du CA1 de l'hippocampe est illustrée à la figure 5. La stimulation des collatérales de Schaffer, la voie synaptique reliant le CA3 au CA1, est ici l'afférence qui produira l'excitation synchronisée dans la zone d'enregistrement [3]. Cette stimulation permettra

l'enregistrement d'un potentiel post-synaptique excitateur (EPSP) dans les dendrites, alors qu'un potentiel d'action peut être induit dans le soma si l'excitation afférente est assez forte. Les enregistrements électrophysiologiques sont présentés à la figure 6. Il est important de noter qu'en pratique, il est difficile d'isoler l'EPSP du potentiel d'action. Ainsi, l'enregistrement de l'EPSP peut être contaminé par un potentiel d'action tel que montré par la flèche à la figure 6. Ce graphique montre aussi le comportement de l'EPSP en fonction de l'intensité d'excitation.



*Figure 5. Représentation schématique d'une tranche d'hippocampe et du placement des électrodes utilisées pour la stimulation (en noir à gauche) et l'enregistrement (en blanc) (tiré de MacVicar et al [3]).*



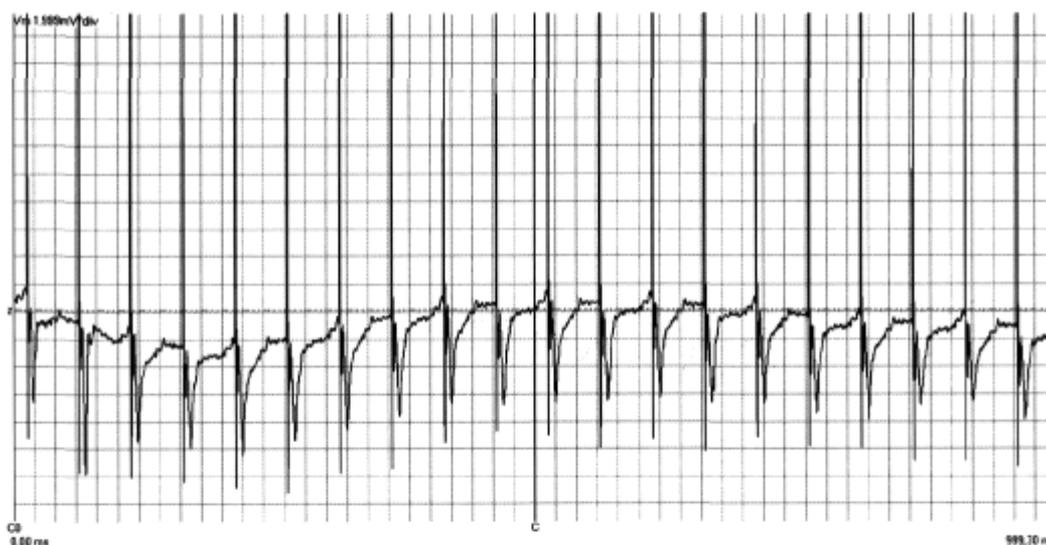
**Figure 6.** Allure de l'enregistrement d'un EPSP pour 3 intensités de stimulation différentes. La flèche représente la contamination de l'EPSP à la plus forte intensité par un potentiel d'action (tiré de Johnston et al [1]).

Dans un but plus quantitatif, il importe de déterminer les valeurs d'intérêt sur les enregistrements électrophysiologiques. La valeur crête de l'EPSP (mV) ou la valeur absolue de la pente initiale (mV/s) sont en général les mesures ciblées. La pente étant proportionnelle à la valeur maximale, les deux valeurs sont en théorie aussi valables l'une que l'autre. Tel que mentionné précédemment, il se peut qu'il y ait une contamination de l'EPSP par le potentiel d'action et ainsi, la valeur maximale peut se retrouver erronée. Dans le cas où on cherche une excellente précision, il est donc plus sécuritaire de mesurer la pente initiale de développement de l'EPSP.

Les protocoles de préparation des tranches et d'enregistrement des potentiels de champs seront détaillés lors de sections ultérieures.

L'enregistrement de potentiels de champs offre uniquement une vue sur le comportement moyen du système. Il est donc très difficile de cartographier l'activité cellulaire par cette technique, comparativement à ce qui est proposé avec le dispositif de thermographie par contact. Il importe aussi de mentionner que la mesure s'intéresse spécifiquement au comportement électrique du système à l'étude. Or, la mesure électrique

n'est pas un reflet direct du métabolisme cellulaire dans la tranche. Le lien entre l'activité électrique et l'activité métabolique cellulaire reste, encore aujourd'hui, un sujet de discussions en neurosciences. Dans le cadre du système que nous avons mis en place lors du projet de recherche, l'enregistrement de potentiels de champs permettra entre autre de vérifier la viabilité de la tranche d'hippocampe lors des mesures thermiques. La complémentarité de ces techniques semble aussi un atout. L'utilisation de différents patrons de stimulation, par exemple à des fréquences plus élevées (voir figure 7), permettra peut-être de faciliter la réponse thermique évoquée, par le biais d'une augmentation de l'activité métabolique. La mise en parallèle de ces techniques lors de mêmes études pourrait aussi aider à mieux définir la relation existant entre les activités électrique et métabolique. La complémentarité du système que nous avons mis en place lors de la présente étude ne s'arrête toutefois pas aux mesures électrophysiologiques.



**Figure 7.** Enregistrement de l'EPSP évoqué par un train de stimuli électriques à 20 Hz sur une seconde.

## 2.2. Étude de l'activité optique intrinsèque

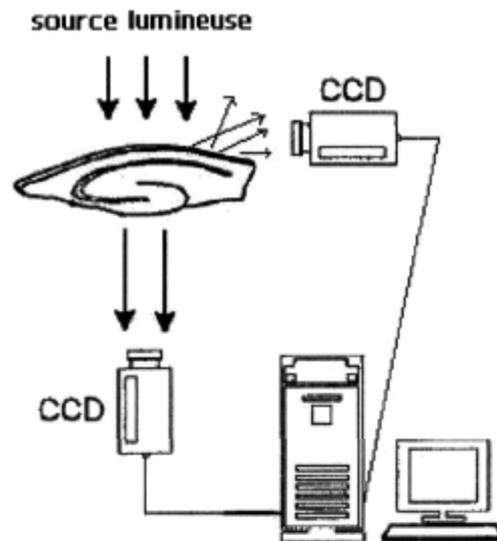
Parmi les méthodes optiques utilisées en neurosciences, il en existe une qui ne nécessite l'injection d'aucun agent externe et qui permet d'observer à la fois le comportement général du réseau tout en permettant une résolution spatiale adéquate: il

s'agit de l'étude de l'activité optique intrinsèque [3-21]. Les méthodes intrinsèques sont basées sur l'étude du changement des propriétés du tissu lui-même, et non sur le changement des propriétés d'un indicateur. Les caractéristiques sur lesquelles repose l'étude de l'activité optique intrinsèque seront ici explicitées.

### **2.2.1. Principes généraux**

Tous les tissus biologiques sont transparents à la lumière jusqu'à un certain degré. Les changements physiologiques internes modifient la façon dont la lumière est diffusée à travers le tissu. Ainsi, en mesurant la différence de quantité de lumière transmise et/ou réfléchi dans le temps, on obtient une représentation des changements physiologiques dans le tissu. La fluctuation du signal se trouve ainsi plus importante que le signal absolu lui-même, bien que celui-ci puisse aussi donner de l'information sur les caractéristiques et propriétés du tissu. Cette mesure nous donne donc indirectement une représentation de l'activité métabolique dans le système.

La figure 8 présente la méthode. Une source lumineuse est dirigée sur le tissu à l'étude. La stabilité de la source lumineuse est ici plus importante que le type de lumière utilisée. La lumière traversant ou étant réfléchi par le spécimen est alors recueillie. Celle-ci était d'abord récoltée par des photodiodes [22], mais cette tâche est maintenant accomplie par des caméras CCD, permettant ainsi une meilleure vue sur l'ensemble du système à l'étude. La résolution spatiale du système permet donc de mettre en relief le comportement d'une zone spécifique du tissu par rapport au comportement général sur tout le tissu. Le signal ainsi obtenu est enregistré dans un ordinateur, sur lequel les données peuvent ensuite être traitées. Certaines des techniques d'optimisation du signal que nous avons mises en place, tel qu'on le verra plus loin, peuvent aussi être utilisées avec cette méthode optique.



*Figure 8. Schéma du montage pour des études sur la variation d'activité optique intrinsèque en transmission et/ou en réflexion.*

### 2.2.2. Changements physiologiques

Les changements physiologiques entraînant les variations d'activité optique intrinsèque ne sont pas connus avec certitude. Par contre, les hypothèses sur le sujet sont fondées sur des principes solides. Plusieurs réfèrent à la variation de l'activité optique intrinsèque comme une conséquence du gonflement cellulaire. Celui-ci étant un aspect critique dans plusieurs syndromes sévères, tels que la dépression progressive (« spreading depression »), un phénomène physiologique retrouvé lors de crises d'épilepsie, et l'empoisonnement à certaines toxines. En fait, le gonflement cellulaire est bien connu. Ce sont plutôt les mécanismes sous-tendant cette expansion qui sont méconnus. Certains soupçonnent la glie, les neurones, l'effet des mitochondries ou des variations internes d'osmolarité [8].

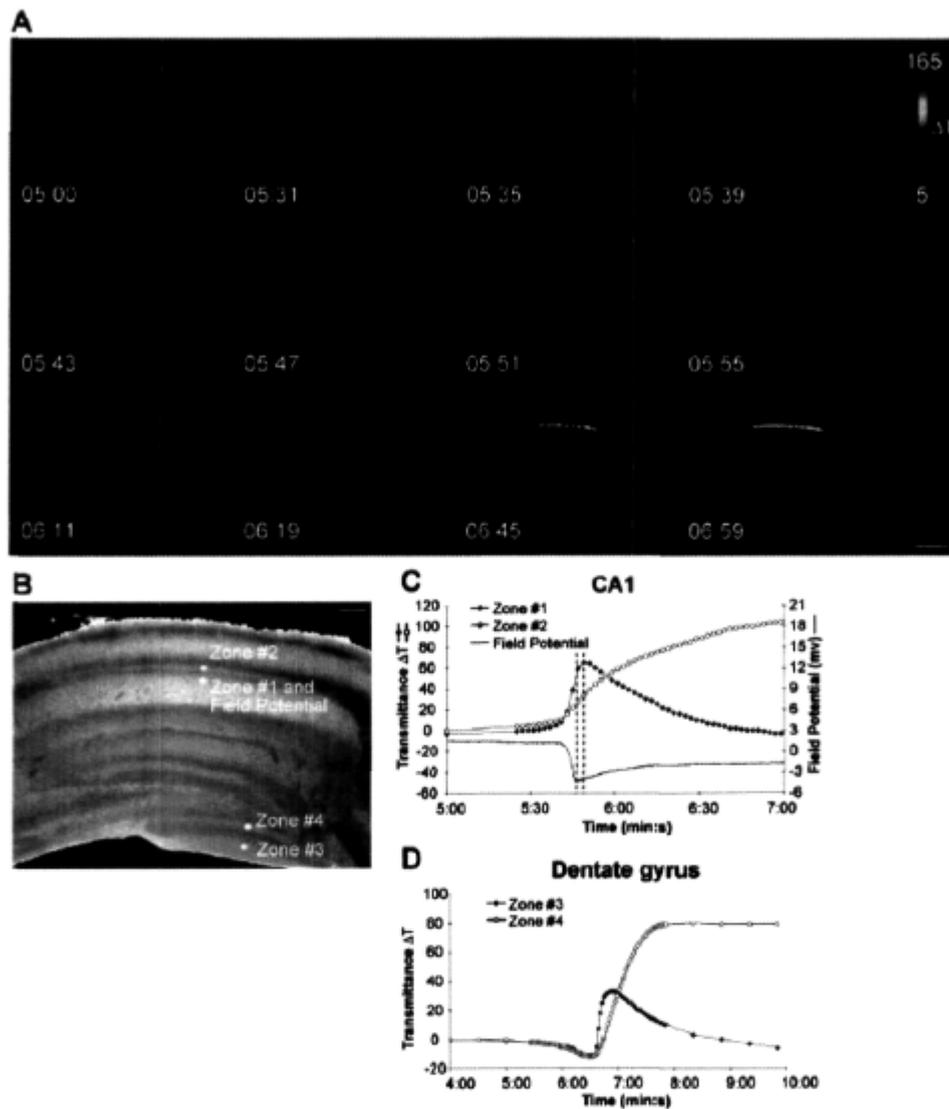
### 2.2.3. Applications

Les études de l'activité optique intrinsèque s'appliquent à des domaines variés. Elles permettent la cartographie du réseau fonctionnel cortical sous certaines conditions

[12]. La modification du comportement du réseau par des agents pharmacologiques peut aussi être observée [11, 18, 23]. Il s'agit aussi d'une méthode rapide et efficace d'étudier la plasticité [9]. Un domaine important d'application pour ce type d'étude est celui des dépressions progressives, impliquées dans les foyers épileptiques ainsi que dans la progression des crises [7, 11, 23]. Comme cet aspect de l'étude des changements physiologiques par une méthode non-invasive sera d'intérêt lors du présent projet de recherche, il est intéressant de présenter les résultats de quelques études.

#### **2.2.4. Résultats**

Les études de Basarsky et al. [23] mettent à l'avant plan certaines techniques pour induire des dépressions progressives lors d'études d'activité optique intrinsèque in vitro dans l'hippocampe de rat. La dépression progressive est caractérisée par la propagation lente d'une onde de dépolarisation, entraînant ainsi une dépression transitoire de la transmission synaptique [23]. Mentionnons ici que l'utilisation de ouabaïne permet l'induction d'une dépression allant du CA1 au gyrus denté. La ouabaïne permet de bloquer les pompes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPases [24], entraînant ainsi un gonflement des cellules. La figure 9 présente les résultats, tirés de Basarsky et al. [23], d'une étude sur le comportement en transmission optique dans le temps sur une section d'une tranche d'hippocampe subissant une dépression progressive. À noter sur cette même figure qu'un enregistrement du potentiel de champs dans le CA1 a été effectué afin de valider l'induction de la dépression progressive par la perfusion avec de la ouabaïne. On peut voir sur le signal électrique une dépolarisation lente suivie d'une certaine repolarisation. La transmission du signal optique est quant à elle augmentée pour ensuite subir une diminution progressive. À noter que les changements optiques et électriques ne sont pas synchronisés de façon parfaite dans le temps, mais une corrélation peut tout de même être établie. Cela représente bien l'avantage d'utiliser des techniques de mesure ayant une certaine complémentarité. La figure 9.C présente le comportement pour une zone précise de la tranche. On peut aussi observer le comportement général en transmission optique (figure 9.A).



**Figure 9.** *Imagerie de l'effet de l'induction d'une dépression progressive dans une tranche d'hippocampe. La partie A présente les enregistrements d'activité optique intrinsèque en transmission sur toute la tranche. La partie B présente les zones sur lesquelles les enregistrements en C et D ont été effectués. Les parties C et D présentent la variation temporelle, dans le CA1 (C) et le gyrus denté (D), de l'activité optique intrinsèque en transmission, dans le temps, suite à l'injection de ouabaïne. La mesure du potentiel de champs extracellulaire y est aussi présentée (tiré de Basarsky et al. [23]).*

La possibilité d'observer à la fois le comportement temporel en une zone donnée et la propagation à l'échelle de la tranche se veut un avantage de la technique. Tel que

mentionné précédemment, cela est beaucoup plus difficile à réaliser pour des mesures électriques. La facilité de déploiement de la technique lui procure un avantage certain sur les techniques extrinsèques, c'est-à-dire celles nécessitant l'injection de marqueurs. Il importe toutefois de mentionner que la mesure effectuée représente un indice indirect de l'activité métabolique dans la tranche, ce qui vient amplifier notre intérêt pour l'enregistrement des signaux thermiques comme signature de l'activité métabolique. Comme nous le verrons plus loin, certaines mesures thermiques ayant un lien indirect avec l'activité métabolique ont aussi été effectuées durant nos études. C'est en se basant sur la méthode utilisée pour l'étude des variations d'activité optique intrinsèque qu'il a été pensé de mettre sur pied cette technique basée sur des mesures thermiques (voir section 5.2.2).

### 2.3. Études thermiques

Bien que l'intérêt pour l'étude de la chaleur libérée par des organismes biologiques existe depuis bon nombre d'années [25-28], les études thermiques en biologie suscitent encore une certaine prudence dans le milieu scientifique. Certaines revues scientifiques très spécialisées existent sur le sujet, tels que le *Journal of Thermal Biology* et *ACTA THERMOGRAPHICA* [29]. Malgré tout, les données quantitatives quant à la chaleur libérée par l'activité cellulaire dans le cerveau sont peu nombreuses. Il nous importait donc, pour la présente étude, d'effectuer une revue de la littérature scientifique sur le sujet. Cela nous a permis de poser des bases théoriques à certaines de nos hypothèses. Ainsi, dans la présente section, les propriétés physiques et le comportement thermique du cerveau seront mis à l'avant-plan. À la lumière de ce que nous avons recueilli et traité, il semble que la chaleur libérée par un système biologique pourrait être utilisée comme signature de l'activité métabolique cellulaire. La mesure de la chaleur, à laquelle font aussi allusion les termes calorimétrie et thermographie, est donc d'un intérêt certain pour l'étude des systèmes biologiques. On verra aussi que le comportement en transmission thermique, une mesure démontrant des similarités et une complémentarité aux mesures d'activité optique intrinsèque, d'un tissu peut s'avérer d'un intérêt marqué.

### 2.3.1. Propriétés physiques du cerveau

Afin de bien cerner les ordres de grandeur en jeu lors d'études neurobiologiques, il importe de déterminer la valeur de certaines propriétés physiques inhérentes au tissu à l'étude. Comme il est question ici d'études thermiques, il est important de définir les valeurs de conductivité thermique, de chaleur spécifique et de densité du milieu à l'étude. La connaissance de ces valeurs permettra de déduire certaines propriétés thermiques du milieu, tel que le temps de réponse thermique, la variation de température et la diffusivité, et de mieux caractériser le comportement thermique du tissu. Les tableaux suivants présentent les valeurs de chacune de ces propriétés physiques pour le cerveau et l'eau. Ces valeurs proviennent du livre *Physical Properties of Tissue* [30], tirant celles-ci à partir de résultats de diverses études distinctes.

	Conductivité thermique $k$ W / m-K
Cerveau humain (37°C)	0,503 – 0,576
Cortex humain	0,515
Eau (20°C)	0,600
Eau (40°C)	0,628
Eau (37°C), par interpolation	0,624

**Tableau 1.** Valeurs de conductivité thermique du cerveau et de l'eau (tiré de Duck [30]).

	Chaleur spécifique $c_p$ J / g-K
Cerveau, matière blanche, humain	3,60
Cerveau, matière grise, humain	3,68
Eau (20°C)	4,182
Eau (40°C)	4,178
Eau (37°C), par interpolation	4,179

**Tableau 2.** Valeurs de chaleur spécifique du cerveau et de l'eau (tiré de Duck [30]).

	Densité g / cm <sup>3</sup>
Cerveau, matière blanche, humain	1,043
Cerveau, matière grise, humain	0,1039
Eau (20°C)	0,9982
Eau (40°C)	0,9922
Eau (37°C), par interpolation	0,9931

**Tableau 3.** Valeurs de densité du cerveau et de l'eau (tiré de Duck [30]).

### 2.3.2. Vitesse de conduction et constante de temps thermique

Cela prend un certain temps pour que la chaleur libérée en un point atteigne l'endroit où la chaleur est supposée être détectée. Ceci met à l'avant-plan le concept de constante de temps thermique ( $\tau$ ) d'un système. Basé sur un modèle cylindrique représentant bien le système in vitro utilisé [31], celle-ci est déterminée par :

$$\tau = \frac{L^2}{\kappa} \quad (1)$$

où  $\kappa$  représente la diffusivité thermique (en m<sup>2</sup>/s) du système et L est la distance (en m) entre la source de chaleur et l'aire de détection.

La diffusivité thermique détermine la façon dont l'onde thermique diffuse dans un milieu. Plus la diffusivité thermique est élevée, plus rapidement la chaleur se propage dans le milieu. Elle est donnée par :

$$\kappa = \frac{k}{\rho c} \quad (2)$$

où k est la conductivité thermique (en W/m-K),  $\rho$  est la densité (en kg/m<sup>3</sup>) et c est la chaleur spécifique du milieu (en J / kg-K). La diffusivité thermique a donc des unités en m<sup>2</sup>/s. Tel qu'on le verra plus loin, la variation locale de la diffusivité thermique suite à un événement donné peut être d'intérêt pour l'étude des changements physiologiques internes du tissu

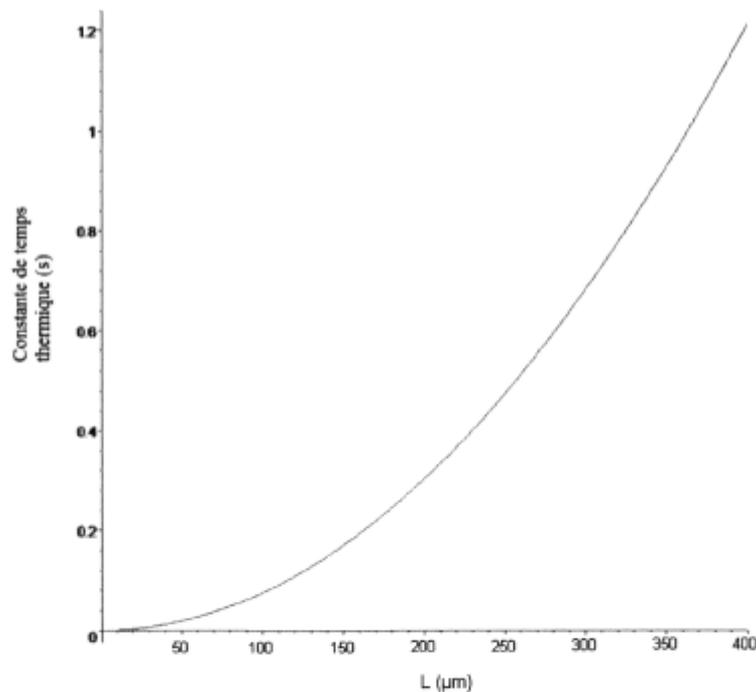
biologique. En prenant les valeurs définies précédemment pour la matière grise (voir tableaux 1, 2 et 3), on obtient :

$$\kappa = \frac{0,503}{1039 * 3680} = 1,316 * 10^{-7} m^2 / s \quad (3)$$

En insérant ensuite (3) dans (1), on obtient :

$$\tau = \frac{L^2}{1,316 * 10^{-7} m^2 / s} \quad (4)$$

La figure 10 donne la valeur de la constante de temps pour une plage de valeurs de L allant de 1 à 400  $\mu\text{m}$ . Pour une distance de 100  $\mu\text{m}$ , la constante de temps thermique est de 72 ms, alors que pour une distance de 400  $\mu\text{m}$ , elle est de 1,15 s. Il importe de considérer ici encore que l'ordre de grandeur est plus important que la valeur finie.



**Figure 10.** Représentation du comportement de la constante de temps thermique en fonction de la distance source-capteur.

## 2.4. Variations de température dans le cerveau

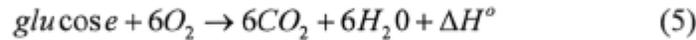
Les variations de température à l'intérieur du cerveau ne sont pas l'effet d'une seule composante physiologique, et c'est ce qui complique grandement son étude. Dans les faits, il existe 3 composantes physiques qui entraînent des variations de température locales dans le cerveau [32] :

- la création de chaleur résultant de l'activité métabolique cellulaire dans le tissu;
- la perte de chaleur par le biais de la convection et la conduction, principalement dominé par le flux sanguin environnant;
- la température d'entrée de ce flux sanguin dans la zone d'intérêt.

En effet, il est connu que le cerveau des êtres vivants ne subit pas d'échauffement exagéré dû au contraste entre les deux mécanismes principaux, c'est-à-dire l'échauffement par activité métabolique et le « refroidissement » (ou perte calorifique) entraîné par la présence d'un flux sanguin de température inférieure. La température du flux sanguin étant en moyenne 0,3°C plus basse que celle du cerveau [33], la chaleur émise par le cerveau se transmet vers le sang, qui lui, est en mouvement continu. Les capillaires sanguins agissent ainsi comme des puits de chaleur. Bien que ce mécanisme soit des plus utiles aux êtres vivants, il rend difficile l'isolement des composantes impliquées lors d'études calorimétrique sur le cerveau. Ainsi, la plupart des études thermiques en neurosciences ne peuvent permettre de tirer des conclusions claires, et il s'agit d'un réel problème. Comme on le verra plus loin, l'avantage des études *in vitro* sur cet aspect est marqué. Il importe maintenant de préciser cet équilibre énergétique à l'intérieur du cerveau. Une fois cela effectué, il nous sera possible de simplifier la situation dans le cas d'études *in vitro*. Il nous a ainsi été possible, au cours du présent projet de recherche, de poser des bases quantitatives à la libération de chaleur dans le cerveau à partir de données et publications sur le sujet.

#### 2.4.1.1. Balance énergétique dans le cerveau

La majorité de l'énergie nécessaire à l'activité cérébrale est générée de la réaction chimique d'oxydation du glucose [33] :



L'enthalpie d'une telle réaction est  $\Delta H^\circ = 470$  kJ par mole de  $O_2$  à  $37^\circ\text{C}$  [34].

33% de cette énergie est directement libérée sous forme de chaleur. Le reste sert d'abord à la production de 38 molécules d'ATP qui serviront au bon fonctionnement des activités cérébrales. Après l'hydrolyse de l'ATP, la quasi-totalité de ce qui reste de  $\Delta H^\circ$  se verra aussi libéré sous forme de chaleur [34]. Seulement une petite partie de cette énergie ( $\Delta H_b$ ) sera utilisée pour retirer l'oxygène de l'hémoglobine. Ainsi, la quantité de chaleur générée dans le cerveau ( $Q_+$ ) par gramme de tissu et par minute est donnée par :

$$Q_+ = (\Delta H^\circ - \Delta H_b) * rCMRO_2 \quad (6)$$

où  $rCMRO_2$  représente le taux métabolique cérébral régional de l'oxygène. Il s'agit de la composante principale ayant un impact sur l'énergie libérée. Nous reviendrons plus loin sur les valeurs numériques que peut prendre cette composante.

Comme la diffusivité thermique du tissu cérébral est très élevée, la chaleur produite atteint rapidement le capillaire sanguin le plus près. La quantité de chaleur qui est retirée ( $Q_-$ ) est donnée par :

$$Q_- = rCBF * \rho_B * C_B * (T - T_{Cap.}) \quad (7)$$

où  $rCBF$  est le flux sanguin cérébral régional,  $\rho_B$  est la densité du sang,  $C_B$  est la capacité calorifique du sang,  $T$  est la température du tissu et  $T_{Cap.}$  représente la température du sang lors de son arrivée.

Il est ensuite possible de relier la différence entre la chaleur produite et celle retirée avec la variation de température ainsi induite :

$$C_{tissu} * \dot{T} = Q_+ - Q_- \quad (8)$$

$$C_{tissu} * \dot{T} = (\Delta H^o - \Delta H_b) * rCMRO_2 - rCBF * \rho_B * C_B * (T - T_{Cap.}) \quad (9)$$

où  $C_{tissu}$  est la capacité calorifique du tissu.

En examinant l'équation (9), on peut voir que le flux sanguin a un impact important sur les variations thermiques du tissu. Ainsi, si le débit sanguin ou sa température n'est pas constante, des variations de température pourraient être observées dans le temps. La variation de température observée pourrait à tort être interprétée comme une hausse de l'activité métabolique. Cela représente une des difficultés majeures lors des études in vivo.

L'avantage que possèdent les études in vitro repose sur le fait que l'effet du flux sanguin peut être éliminé. Les termes reliés au flux sanguin peuvent être remplacés par des termes semblables pour le liquide de perfusion. Le contrôle de la perfusion est par contre beaucoup plus facile que dans le cas du flux sanguin. De plus, en laissant l'équilibre thermique se mettre en place, le terme relié à la perfusion, dans l'équation (9), disparaît. En effet, étant donné que les termes  $T$  et  $T_{Cap.}$  sont maintenant égaux, la différence est nulle et le terme de perfusion aussi. À noter que le terme  $\Delta H_b$  est aussi éliminé.

Ainsi,

$$C_{tissu} * \dot{T} = (\Delta H^o) * rCMRO_2 \quad (10)$$

$$\Rightarrow \dot{T} = \frac{(\Delta H^o) * rCMRO_2}{C_{tissu}} \quad (11)$$

La variation de température dans un tissu in vitro, avec une perfusion contrôlée, est donc proportionnelle à l'enthalpie de la réaction d'oxydation du glucose et au taux métabolique cérébral régional de l'oxygène. Elle est aussi inversement proportionnelle à la

chaleur spécifique du tissu. Tel qu'on le verra à la section suivante, c'est  $rCMRO_2$  qui démontre la plus grande variabilité et qui possède ainsi l'influence la plus importante sur le changement en température du tissu. L'échauffement de la tranche dépendra aussi du temps sur lequel a lieu la réaction métabolique.

#### 2.4.1.2. Évaluation quantitative de la variation de température du tissu

Il importe maintenant d'évaluer de façon quantitative l'échauffement entraîné par l'activité cellulaire dans le cerveau. Pour ce faire, on se référera à certaines valeurs présentées à la section 2.3.1 et d'autres seront définies ici. L'intérêt principal dans cette section est d'évaluer les ordres de grandeur impliqués.

Tel que vu à la section précédente, la valeur de  $\Delta H^0$  est inhérente à la réaction d'oxydation du glucose et a une valeur de 470 kJ par mole d'oxygène. La capacité calorifique du tissu a été définie à la section précédente. Bien qu'elle ait été définie pour la matière grise chez l'humain, on peut s'attendre à ce que cette valeur soit similaire pour d'autres organismes vivants tel que le rat. La valeur de  $C_{\text{tissu}}$  utilisée ici sera de 3,68 J/g-K [30]. La valeur qu'il reste à déterminer afin d'obtenir le taux de variation de température dans le cerveau est le taux métabolique cérébral régional de l'oxygène ( $rCMRO_2$ ).

#### *Taux métabolique cérébral régional de l'oxygène ( $rCMRO_2$ )*

Contrairement à l'enthalpie d'oxydation du glucose et à la capacité calorifique du tissu, le taux métabolique cérébral régional de l'oxygène dépend grandement des conditions expérimentales et du type de tissu. À l'intérieur de la présente section, on fera un survol des diverses valeurs d'intérêt pour cette variable, qui rappelons-le, participe au calcul de l'échauffement du tissu par l'activité métabolique cellulaire.

Selon que l'expérimentation est de type in vivo ou in vitro, les valeurs du  $rCMRO_2$  diffèrent pour une même structure cérébrale. Le tableau 4 montre les valeurs du  $rCMRO_2$  dans le cortex du rat in vivo et in vitro, avec ou sans stimulation électrique [34].

	rCMRO <sub>2</sub> μmol / g-min
in vivo	4,5
in vitro, sans stimulation électrique	1,7
in vitro, avec stimulation électrique	3

**Tableau 4.** Taux métabolique cérébral régional de l'oxygène dans le cortex de rat (tiré du livre de Siesjo [34]).

Le rCMRO<sub>2</sub> varie aussi entre les espèces. Le cortex humain présente un rCMRO<sub>2</sub> d'environ 1,5 μmol / g-min alors que celui d'un rat est de 4,5 μmol / g-min. Il existe aussi des variations du rCMRO<sub>2</sub> entre les diverses structures d'un même cerveau. Le tableau 5 présente les valeurs du rCMRO<sub>2</sub> pour différentes structures lors d'études chez le rat in vivo [34].

	rCMRO <sub>2</sub> μmol / g-min
Cortex visuel	6,7
Cortex auditif	9,5
Cortex pariétal	6,4
Cortex sensori-moteur	7,1
Hypothalamus	3,9
Hippocampe	5,9
Colliculus inférieur	11,9
Colliculus supérieur	6,0
Cortex cérébelleux	4,0
Noyau cérébelleux	6,4
Corps calleux	2,5
Matière blanche cérébelleuse	2,1

**Tableau 5.** rCMRO<sub>2</sub> pour diverses structures d'un cerveau de rat in vivo (tiré de Siesjo [34]).

Ne possédant pas les données pour le rCMRO<sub>2</sub> in vitro dans l'hippocampe de rat, cette valeur sera interpolée à partir des données présentées auparavant. La valeur pour l'hippocampe in vivo étant de 5,9 μmol / g-min (voir tableau 5), on utilise le rapport entre les valeurs in vitro et la valeur in vivo du tableau 4 pour obtenir des valeurs in vitro avec et

sans stimulations. La valeur sans stimulation est ainsi de  $2,2 \mu\text{mol} / \text{g}\cdot\text{min}$  alors que celle avec stimulation est de  $3,9 \mu\text{mol} / \text{g}\cdot\text{min}$ .

Finalement, en insérant les valeurs déterminées au cours de la présente section dans l'équation 11, on obtient les taux d'échauffement présentés au tableau 6.

	Taux d'échauffement mK / s
in vitro, sans stimulation	4,7
in vitro avec stimulation	8,3

**Tableau 6.** Taux d'échauffement calculés pour l'hippocampe de rat.

Tel que mentionné auparavant, l'échauffement dépendra du temps sur lequel la réaction métabolique a lieu. Les études in vivo par imagerie infrarouge effectuées par Gorbach [35] rapportent une élévation de température maximale entre 5 et 7 secondes après le stimulus. Bien que cette élévation de température ne soit pas uniquement causée par l'activité métabolique, mais aussi par la réponse sanguine cérébrale, on peut supposer que les temps où il y a implication de la réponse métabolique sont du même ordre de grandeur. La résolution thermique du dispositif de thermographie par contact étant supposé être  $\sim 2\text{mK}$ , on peut espérer enregistrer la chaleur libérée à l'intérieur d'une tranche d'hippocampe, venant ainsi renforcer nos aspirations de départ. De plus, ces valeurs sont reliées au comportement moyen de la tranche, et on peut espérer obtenir des valeurs plus élevées à l'intérieur de foyers d'activité cellulaire. Il a d'ailleurs été démontré par Gottstein et al. [36] que le  $r\text{CMRO}_2$  pouvait être augmenté de 60% en cas d'épisodes épileptiques, mettant à l'avant-plan les avantages d'effectuer des études sur l'induction d'une dépression progressive (« spreading depression ») à l'aide du dispositif développé au cours de notre projet de recherche. Cette avenue sera discutée plus loin.

Il est maintenant intéressant de jeter un regard aux études thermiques qui ont été effectuées dans le passé tout en faisant ressortir les techniques utilisées.

### 2.4.2. Premières études thermiques

Tel que mentionné précédemment, l'intérêt pour les études thermique dans les différentes structures du cerveau n'est pas récent [25-28, 37, 38]. Étant donné les moyens technologiques existant, il était alors seulement possible d'effectuer des mesures en un seul point. Ainsi, la température était obtenue par l'insertion d'une ou plusieurs électrode-thermistors au point d'intérêt. La sensibilité thermique de telles mesures était très bonne. Par exemple, les instruments utilisés lors des expériences de McElligott et al. [28] ont permis d'atteindre une résolution aussi basse que 0,3 mK. Le temps de réponse était de 0,5 seconde. On peut toutefois supposer que l'insertion du senseur dans le milieu à l'étude venait modifier son comportement. Il s'agissait aussi d'une mesure de température très locale, c'est à-dire en un point. La pointe de la sonde utilisée avait un diamètre de 75  $\mu\text{m}$ .

Des études in vivo ont permis d'enregistrer une augmentation de température de 15mK suite à la stimulation visuelle chez le chat [25]. McElligott et al. [28] ont aussi fait mention d'échauffement de l'ordre de 10 mK. Lors de stimulations corticales chez le rat, La Manna et al. [39] ont enregistré des fluctuations transitoires de température de l'ordre de quelques centaines de mK. Moser et al. [40, 41] lors d'études sur l'hippocampe de rat in vivo, ont fait état de fluctuations de température de l'ordre de 100 à 500 mK . Il importe toutefois de garder à l'esprit l'effet du flux sanguin lors des études in vivo. La mesure effectuée dans cette situation n'est donc pas représentative de l'activité métabolique dans la tranche. Les variations thermiques à l'intérieur du flux sanguin en réponse à l'activité métabolique viennent perturber la mesure. Toutes ces mesures sont toutefois encourageantes dans l'optique d'enregistrer un réseau d'activité cellulaire avec un appareil de haute sensibilité. L'utilisation d'électrodes-thermistors ont permis, grâce à leur résolution thermique, d'enregistrer des fluctuations de température suite à l'activité dans le cerveau. Malgré tout, leur utilisation ne nous permet qu'une mesure du comportement moyen du système et renseigne difficilement sur la différence des chaleurs émises en plusieurs points rapprochés. D'un point de vue physiologique, l'utilisation de plusieurs électrodes rapprochées insérées simultanément serait nocive pour le tissu. Une méthode d'enregistrement thermique moins destructrice sera présentée à la prochaine section.

### **2.4.3. Imagerie infrarouge appliqué à l'imagerie du cerveau**

L'évolution des techniques d'imagerie infrarouge lors des dernières décennies a permis le développement de techniques pour étudier la réponse thermique cérébrale. Les études ont principalement porté sur la réponse thermique dynamique de certaines parties du cortex suite à diverses sortes de stimuli [35, 42-48]. La réponse thermique corticale a suscité un intérêt par le fait qu'elle semble être une signature de l'activité fonctionnelle [35].

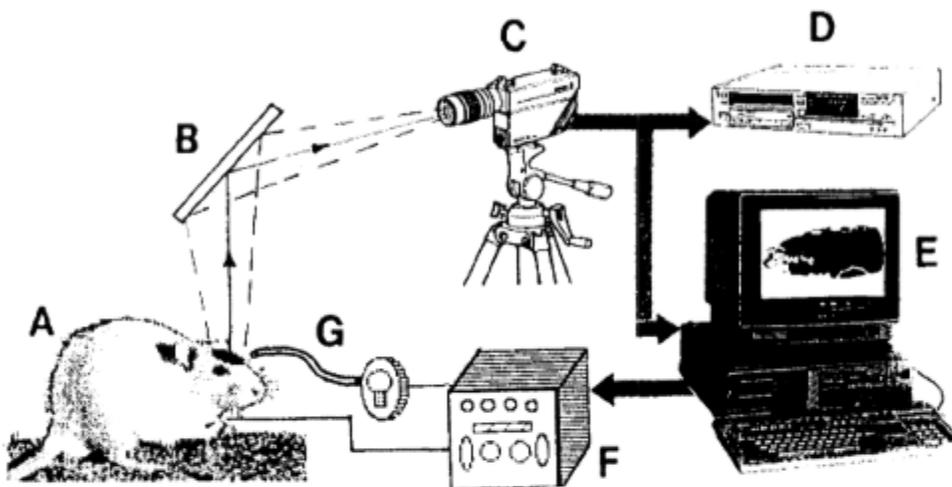
#### **2.4.3.1. Principes physiques**

Tout corps chaud, y compris le cerveau, émet de l'énergie dans la bande des longueurs d'onde infrarouges. Les longueurs d'onde entre 3 et 5  $\mu\text{m}$  ainsi que celles entre 7 et 12  $\mu\text{m}$  présentent une absorption faible dans l'atmosphère sur de courtes distances. C'est donc pour ces longueurs d'onde que les dispositifs d'imagerie infrarouge sont conçus. Bien que la transmission dans l'air soit bonne, l'absorption par l'eau est très élevée. Il suffit d'une couche de 100 $\mu\text{m}$  d'eau pour bloquer la quasi-totalité de la radiation infrarouge. La chaleur émise à des sites plus profonds peut toutefois être transférée jusqu'à la surface par conduction thermique. Ce qui est détecté est alors la radiation infrarouge émise par la surface du corps.

#### **2.4.3.2. Description de la technique**

Le système expérimental utilisé diffère selon les études, mais le fondement reste le même, soit celui d'utiliser un détecteur infrarouge pour mesurer les variations d'émission infrarouge par la surface. La figure *II* présente la configuration utilisée lors des études de Gorbach [43]. La caméra infrarouge est mise au focus à la surface d'étude, tout en passant par une réflexion par un miroir infrarouge. Le signal à la sortie de la caméra est numérisé à l'aide d'une carte d'acquisition et reliée à un ordinateur. Le signal y est ensuite traité, pour finalement être affiché à l'écran. L'ordinateur peut aussi être utilisé afin de contrôler la stimulation. L'analyse et le traitement post-acquisition des données peuvent aussi être effectués à l'aide de l'ordinateur. Tel qu'il sera présenté plus loin, le système d'acquisition de ce type d'étude est très similaire à celui utilisé avec le dispositif de thermographie par

contact que nous avons développé dans notre projet de recherche, étant donné que le capteur développé est basé sur une dérivation des technologies utilisées en imagerie infrarouge. La résolution spatiale du système est déterminée par le détecteur infrarouge utilisé dans la caméra, l'optique utilisée et la distance entre la caméra et le cortex. Bien que le système présenté soit similaire pour les diverses études infrarouges, les résolutions spatiales et thermiques dépendent grandement des caractéristiques du capteur et des conditions expérimentales.



*Figure 11. Schéma du montage utilisé lors d'études thermiques in vivo à l'aide d'une caméra infrarouge (tiré de Gorbach [43]).*

#### 2.4.3.3. Résultats

L'utilisation d'un système basé sur des caméras infrarouges a permis à Gorbach [43] d'enregistrer des cartes thermiques corticales à la surface d'un cerveau de rat. Le système utilisé avait une résolution spatiale maximale de  $100\ \mu\text{m}$  et une sensibilité thermique de  $15\ \text{mK}$ . Les fluctuations thermiques étaient alors enregistrées à la surface du crâne. Pour une stimulation optique du cortex visuel, une augmentation entre  $30$  et  $100\ \text{mK}$  a été enregistrée. Lors d'une stimulation cutanée, le foyer d'activité corticale a atteint un maximum de  $70\ \text{mK}$  d'augmentation de température. L'effet de l'induction d'une dépression progressive (« spreading depression ») a permis de mettre à l'avant-plan la présence d'une onde thermique entraînant un échauffement de  $500\ \text{mK}$ . Cette onde thermique aurait par contre une forte composante due à la circulation sanguine, tel que soulevé précédemment pour les études in vivo. L'application des caméras infrarouges a été

étendue des études animales aux études chez l'humain [35, 44, 45]. Il a été demandé à des patients qui devaient subir une intervention chirurgicale pour des lésions cérébrales d'accomplir certaines tâches afin de voir l'effet thermique à la surface de leur cortex. Ainsi, un échauffement entre 40 et 90 mK a été enregistré chez ces patients suite à une stimulation du nerf médian et lors de mouvements répétitifs des doigts et des mains. La résolution thermique du système utilisé était alors de 20 mK et la résolution spatiale maximale de 100 $\mu$ m. D'un point de vue temporel, il est important de noter que l'échauffement maximal était enregistré de 5 à 7 secondes après la stimulation. L'augmentation de température vers ce sommet était progressive dans le temps.

Comme il s'agit d'un processus relativement lent, on pourra envisager d'effectuer un moyennage sur un certain nombre d'images, au lieu d'effectuer les mesures à fréquence maximale, augmentant ainsi le rapport signal sur bruit et les possibilités d'isoler le signal d'intérêt.

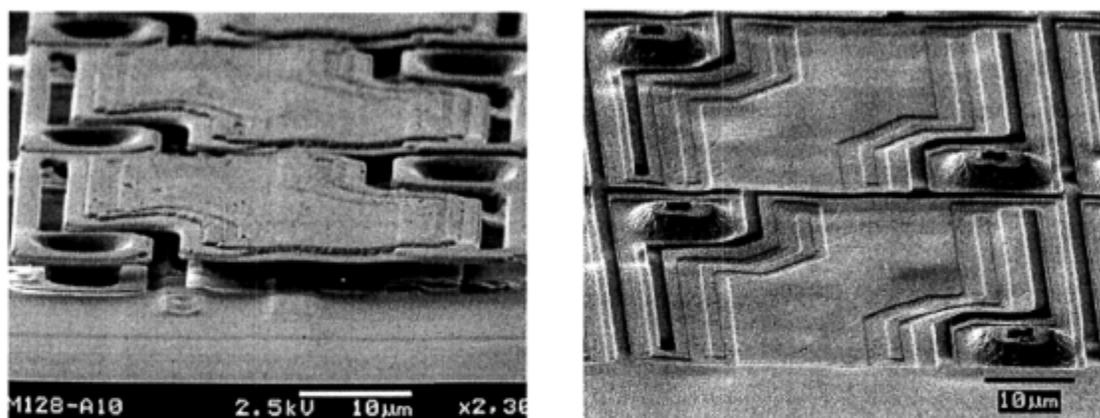
Étant donné qu'il s'agissait de mesures *in vivo* et que la composante reliée au flux sanguin cérébral venait cacher les effets d'échauffement reliés à l'activité métabolique cellulaire, on ne peut se baser sur la valeur des données enregistrées afin de tirer des conclusions sur la faisabilité de la mesure à l'aide du dispositif de thermographie que nous avons développé. Par contre, les ordres de grandeur en jeu viennent consolider nos hypothèses. On peut supposer que l'échauffement que vient contrebalancer le flux sanguin soit d'un ordre de grandeur similaire aux échauffements enregistrés *in vivo*. La résolution thermique du dispositif de thermographie par contact étant de  $\sim 2$  mK, ce qui est nettement inférieur aux diverses mesures *in vivo* présentées dans cette section, on peut ainsi espérer enregistrer un signal thermique d'intérêt, c'est-à-dire relié directement à l'activité métabolique cellulaire.

À la lumière de ce qui a été présenté dans les dernières sections, le développement du dispositif de thermographie par contact, proposé lors du présent projet de recherche, pose ses bases sur des motivations bien établies.

#### **2.4.4. Bolomètres et dispositif de thermographie par contact**

Tel que mentionné précédemment, la technologie utilisée dans le développement d'un dispositif de thermographie par contact est issue de la technologie infrarouge. Les bolomètres, qui représentent la technologie au centre du dispositif développé dans la présente étude, sont la pierre angulaire des dispositifs d'imagerie infrarouge développés à l'INO. Il s'agit de caméras infrarouges non-refroidies dont la sensibilité est optimisée pour les longueurs d'onde entre 8 et 12  $\mu\text{m}$ .

Le passage de l'imagerie sans contact à l'imagerie par contact est basé sur un procédé de renforcement mécanique développé à l'INO par Francis Picard et pour lequel un brevet a été obtenu [49]. La différence principale entre les deux technologies réside dans le fait que les bolomètres utilisés en imagerie infrarouge sont suspendus alors que ceux utilisés en imagerie par contact ne le sont pas. La figure *12* présente les bolomètres suspendus et non-suspendus. Le même procédé de fabrication est utilisé, mais la libération d'une couche de polyimide n'est pas effectuée pour les capteurs par contact. Au lieu de mesurer la radiation infrarouge incidente, c'est plutôt la chaleur transmise par conduction qui est ainsi la composante principale du signal enregistré. Le couplage entre le milieu à l'étude et le détecteur se fait par un contact physique. Il y a ainsi équilibre initial entre la substance en contact et le bolomètre. La sensibilité thermique ( $\sim 2$  mK) et spatiale (52  $\mu\text{m}$ ) d'un tel capteur représente un avantage évident sur la technologie sans contact ( $\sim 70$  mK). La constante de temps thermique du bolomètre, c'est-à-dire le temps pour que la chaleur soit détectée, est  $< 1$  ms, ce qui est plus faible que la constante de temps thermique d'une tranche d'hippocampe (voir section 2.3.2) et permet ainsi d'envisager enregistrer le signal d'intérêt. Les bolomètres utilisés ont des dimensions de 50  $\mu\text{m}$  X 50  $\mu\text{m}$  avec un espacement sur la matrice de 2  $\mu\text{m}$  entre chacun. La limite pratique envisageable pour la taille d'un bolomètre non-suspendu est de quelques  $\mu\text{m}$ . Les principes physiques derrière le fonctionnement des bolomètres font l'objet de la prochaine section.



Suspendus (imagerie infrarouge)

Non-suspendus (thermographie par contact)

*Figure 12. Image obtenue en microscopie électronique à balayage représentant la différence entre les bolomètres suspendus utilisés en imagerie infrarouge et les bolomètres non-suspendus développés pour les applications de thermographie par contact.*

#### 2.4.4.1. Principes physiques

Le matériel avec lequel la partie sensible du bolomètre est fabriquée est un matériau thermistor, c'est-à-dire dont la résistivité varie en fonction de sa température. Celui-ci est en fait un oxyde de vanadium dont la recette a été développée à l'INO.

Le signal enregistré est la différence de potentiel ( $V$ ) aux bornes du bolomètre lorsqu'un courant ( $I$ ) constant est appliqué.

$$V = RI \quad (12)$$

où  $V$  est la différence de potentiel (en  $V$ ),  $R$  la résistance (en  $\Omega$ ) et  $I$  le courant (en  $A$ ).

Comme le capteur est opéré à courant fixe (entre 10 et 50  $\mu A$ ), la différence de potentiel est proportionnelle à la résistance du bolomètre. La figure 13 présente la variation du potentiel en fonction de la température pour un bolomètre donné. Ce graphique a été obtenu suite à la mesure du potentiel aux bornes des bolomètres composant la surface de détection pour différentes températures. À noter que le comportement de la différence de

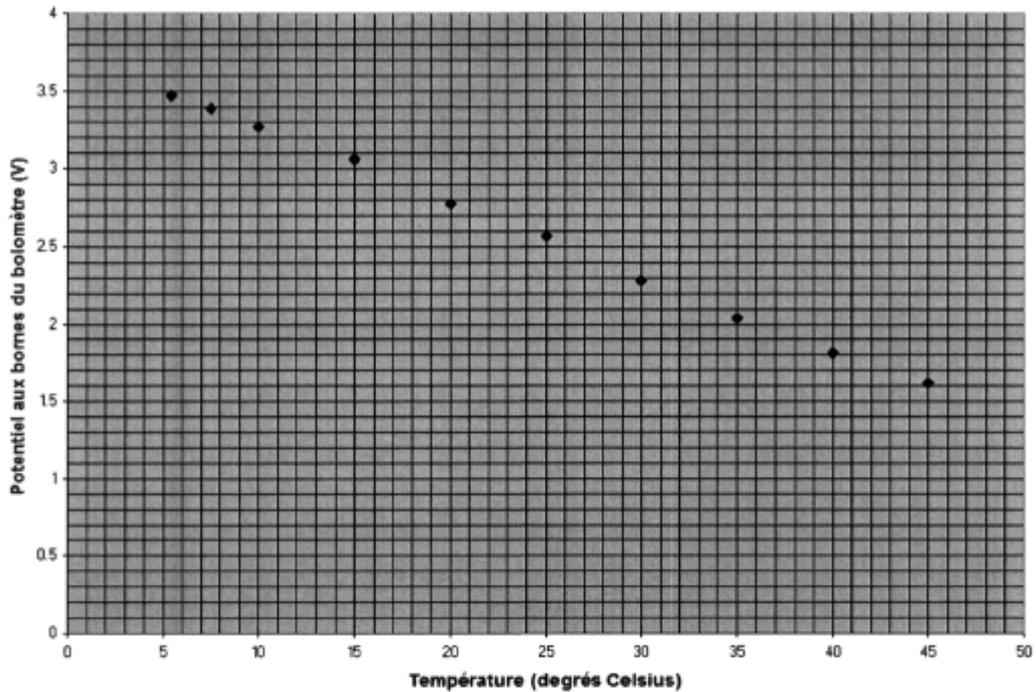
potentiel avec la température est spécifique à chaque bolomètre. Ainsi, cette courbe doit être déterminée pour chacun des bolomètres composant la surface de détection. L'étalonnage permettra une compensation des non-uniformités et d'établir la fonction de transfert du signal électrique au signal thermique. On s'intéressera à la pente associée à un potentiel donné. L'enregistrement du voltage aux bornes de chacun des bolomètres permet ainsi de calculer la température du bolomètre à ce moment.

La source principale de bruit inhérente à un tel capteur est le bruit Johnson. Il s'agit du bruit généré par l'agitation thermique des particules chargées. Il est donnée par :

$$\langle V_J \rangle = \sqrt{4k_B TR \Delta f} \quad (13)$$

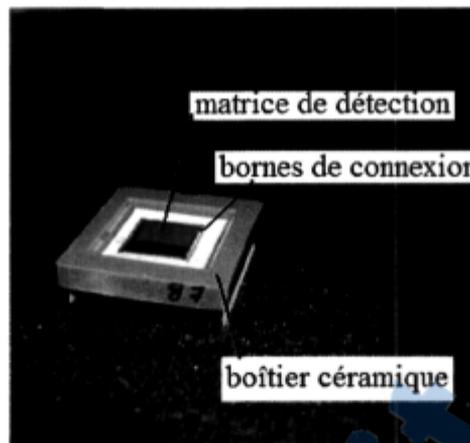
où  $k_B$  est la constante de Boltzmann ( $=1,3806 \times 10^{-23}$  J/K), T la température en K, R la résistance et  $\Delta f$  la largeur de bande. Le bruit Johnson a été évalué théoriquement à 11,3  $\mu$ V. Cela correspond, en se référant à la figure 13, à un bruit thermique d'environ 0,23 mK, soit inférieur à la résolution thermique attendue du capteur.

Ayant expliqué le fonctionnement d'un bolomètre en particulier, il importe maintenant de s'attarder à la composition et au fonctionnement du capteur en son entier, c'est-à-dire à la matrice de bolomètres, aux diverses couches minces qui entourent les bolomètres ainsi qu'à l'électronique derrière le capteur.



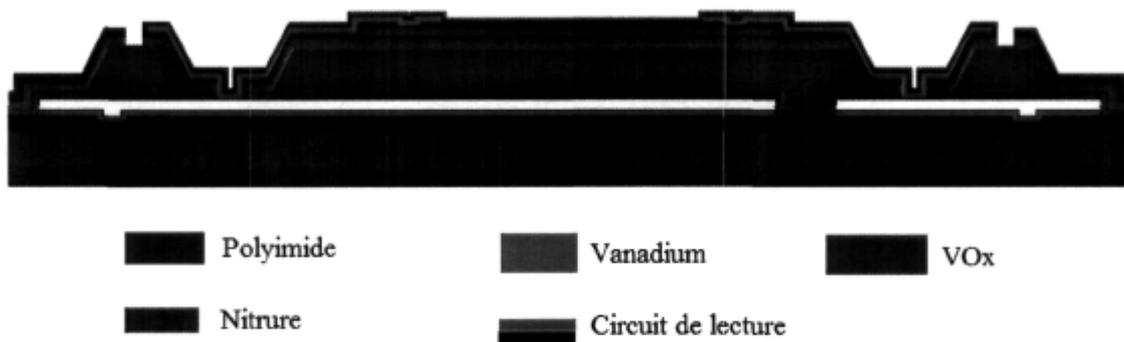
**Figure 13.** Variation du potentiel aux bornes d'un bolomètre en fonction de la température.

La figure 14 présente le capteur sans son électronique d'acquisition. On y voit au centre la matrice de détection. Celle-ci est composée de bolomètres organisés sur 120 lignes et 160 colonnes, pour un total de 19 200 bolomètres. Il y a une distance de 2  $\mu\text{m}$  entre chacun de ces bolomètres. La surface de détection est donc de 6,2 mm X 8,3 mm. Le capteur peut opérer à une vitesse de lecture de 30 Hz, c'est-à-dire qu'il prend environ 33 ms pour effectuer la lecture aux bornes des 19 200 bolomètres. Ceci est en fait limité par la vitesse de lecture aux bornes d'un unique bolomètre qui est de 1,7  $\mu\text{s}$ .



**Figure 14.** Capteur bolométrique par contact dans son boîtier  
(30,2mm X 26,4mm X 4,5mm)

Il importe aussi de mentionner que le bolomètre n'est pas seulement composé de l'oxyde de vanadium. Il s'agit en fait d'un empilement de couches minces. La figure 15 représente schématiquement cet empilement. Tel que mentionné précédemment, il y a une couche de polyimide sous le bolomètre qui n'a pas été libérée afin d'assurer une certaine résistance mécanique du capteur à la pression. À la surface du capteur on retrouve du titane. Celui-ci est relié à la masse du circuit de lecture afin d'éviter des décharges électrostatiques vers l'électronique. Il faut aussi noter la présence d'électrodes de vanadium qui relient chaque bolomètre au circuit de lecture. Des couches de nitrure ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) viennent renforcer mécaniquement le capteur et isoler électriquement les diverses couches les unes des autres. Cet empilement était suffisant pour la détection d'empreintes digitales, mais n'est pas valide pour les applications avec des liquides, tel qu'on le verra plus loin (voir section 3.6). Le dépôt d'autres couches minces afin d'assurer le bon fonctionnement du capteur lors de la présence de fluides a donc été effectué.



**Figure 15.** Représentation schématique des empilements dont est composé chaque pixel (bolomètre) du capteur.

À noter aussi que la température du capteur est contrôlée à l'aide d'un contrôleur thermique (TEC) et d'un circuit de régulation électronique. Un potentiomètre permet à l'utilisateur de fixer la température d'opération. L'acquisition des données est discutée ultérieurement dans le présent document (voir section 3.7).

La technologie bolométrique associée à la thermographie par contact avait jusqu'alors été utilisée pour des applications où aucun fluide n'était impliqué. Le développement d'une nouvelle génération de capteurs permettant l'utilisation de fluides a représenté l'un des enjeux de la présente recherche. Étant donné les dimensions en jeu et les risques associés au contact entre le liquide et l'électronique, il fallait donc s'assurer de protéger l'électronique de tout contact fluide afin d'éviter une détérioration du capteur. Nous reviendrons plus loin aux diverses étapes par lesquelles le développement du dispositif s'est effectué avec ces objectifs en vue.

#### **2.4.4.2. Applications du capteur aux domaines des neurosciences et de la biologie**

À la lumière de ce qui a été présenté dans les dernières sections, il s'avère que l'élaboration d'un dispositif de thermographie par contact permettrait d'entrevoir des applications dans le domaine des neurosciences et de la biologie. Le fait que son utilisation ne nécessite l'injection d'aucun agent externe pour effectuer la lecture est un atout. Que ce

soit pour la mesure de la chaleur libérée par une activité cellulaire donnée ou pour l'étude de changements physiologiques à l'intérieur d'un tissu par le biais du transfert thermique, l'utilisation d'un tel dispositif est de choix. Ses résolutions thermique, spatiale et temporelle en font un bon outil pour des études en biologie et en neuroscience.

La résolution thermique du capteur étant de quelques mK, il semble possible de mesurer les variations de température générées par l'activité métabolique dans le cerveau. En effectuant des études *in vitro* sur des tranches d'hippocampe de rat, on peut ainsi viser à mesurer les variations thermiques causées par l'activité cellulaire à l'intérieure de la tranche, qui sont entre 4,7 et 8,3 mK/s (voir section 2.4.1.2). Comme il n'y aura aucune composante thermique reliée au flux cérébral sanguin, les variations de signal mesurées seront reliées directement à l'activité métabolique de la tranche, ce qui confère un avantage à cette technique comparativement aux techniques déployées *in vivo*. Le choix de l'hippocampe pour l'étude de faisabilité est basé sur son organisation structurée. Tel qu'on peut le voir à la figure 4, c'est dans cette structure que l'on retrouve les collatérales de Schaffer, une voie synaptique d'organisation cellulaire laminaire allant du CA3 au CA1. La complémentarité des enregistrements thermiques avec les études électrophysiologiques permettra de vérifier et stimuler l'activité dans la tranche, en plus d'amplifier l'activité métabolique, tel que discuté précédemment. Il est aussi possible d'envisager déployer des mesures thermiques suite à l'induction d'une dépression progressive par la perfusion de ouabaïne [23]. La dépression pourra être validée par l'utilisation d'enregistrement du potentiel de champs extracellulaire. La matrice de détection (6,2 mm X 8,3 mm) a des dimensions telles qu'il est possible de cartographier la totalité de l'hippocampe, peu importe l'âge du rat (5 mm X 7 mm au maximum). La résolution de 52  $\mu\text{m}$  permet quant à elle une résolution près de l'échelle cellulaire. On pourra donc enregistrer à la fois le comportement thermique local et général. Comparativement aux systèmes d'imagerie infrarouges développés, il y a un avantage tant sur la résolution thermique du système que sur la résolution spatiale. Les études à l'aide de caméras infrarouges ayant été faites *in vivo*, la composante inhérente au flux sanguin cérébral venait inévitablement masquer l'effet de la composante métabolique et cela confère un autre avantage à la technique développée. Il est aussi important de répéter qu'il s'agit d'une mesure reliée directement à l'activité

métabolique cérébrale. Mentionnons ici que des techniques de mesure par résonance magnétique, basées sur la mesure du flux sanguin, permettent l'enregistrement de mesures directement reliées à l'activité métabolique, mais que leur compatibilité avec d'autres techniques de mesure est limitée. Les coûts reliés au déploiement de telles techniques militent aussi en faveur de la technique proposée dans le présent projet de recherche. La compatibilité du système que nous proposons avec d'autres techniques de mesures, telles que des mesures électrophysiologiques et optiques, permettra de tirer des conclusions plus précises et d'effectuer certaines corrélations. À noter aussi la complémentarité du système développé avec les mesures par fluorescence, qui pourrait entre autre aider à corréler l'activité calcique à l'activité métabolique, tout en passant par une comparaison avec l'activité électrique.

Au-delà des mesures thermiques directement reliées à l'activité métabolique, le dispositif de thermographie par contact pourra aussi être utilisé afin d'étudier les changements physiologiques à l'intérieur d'un tissu. Une technique similaire à celle utilisée en transmission optique lors des études sur l'activité optique intrinsèque (voir section 5.2.2) pourra être mise en place. Ne posant pas ses bases sur la transmission d'un signal optique, mais plutôt sur le transfert d'une onde thermique à travers le tissu, il sera possible de relier les variations de transmission thermique dans la tranche aux changements physiologiques internes. En effectuant des études similaires à ce qui a été effectué dans le cas de l'activité optique intrinsèque, il sera permis de tirer certaines conclusions complémentaires. La méthode utilisée sera détaillée ultérieurement, mais disons ici qu'une onde thermique sera transmise à travers la tranche et que le comportement temporel de cette transmission sera étudié. Tel que vu précédemment, la diffusivité thermique varie en fonction de la densité, de la conductivité et de la chaleur spécifique du tissu. Ainsi, la variation du signal récolté pourra être mise en lien avec la variation de l'un ou plusieurs de ces facteurs. Les principes à la base des transmissions thermique et optique étant différents, les deux techniques ne se veulent pas opposées, mais présentent plutôt une certaine complémentarité. Nous pourrons à nouveau effectuer des études basées sur l'induction d'une dépression progressive dans une tranche d'hippocampe suite à la perfusion de ouabaïne. Le dispositif de thermographie

par contact qui a été développé démontre ainsi une certaine flexibilité quant à ses applications dans le domaine de la neurobiologie.

Comme le but de la présente maîtrise était d'abord de développer le dispositif de thermographie par contact selon les spécificités recherchées, pour ensuite mettre en place son utilisation pour des applications neurobiologiques, c'est dans cet ordre que seront présentées les étapes poursuivies. Tout ce qui touche à l'élaboration du dispositif sera d'abord présenté. La caractérisation du système sera aussi détaillée. Par la suite, c'est ce qui touche aux études neurobiologiques qui le sera. Les premiers résultats seront alors exposés et discutés. Les études prospectives à la présente maîtrise seront finalement discutées.

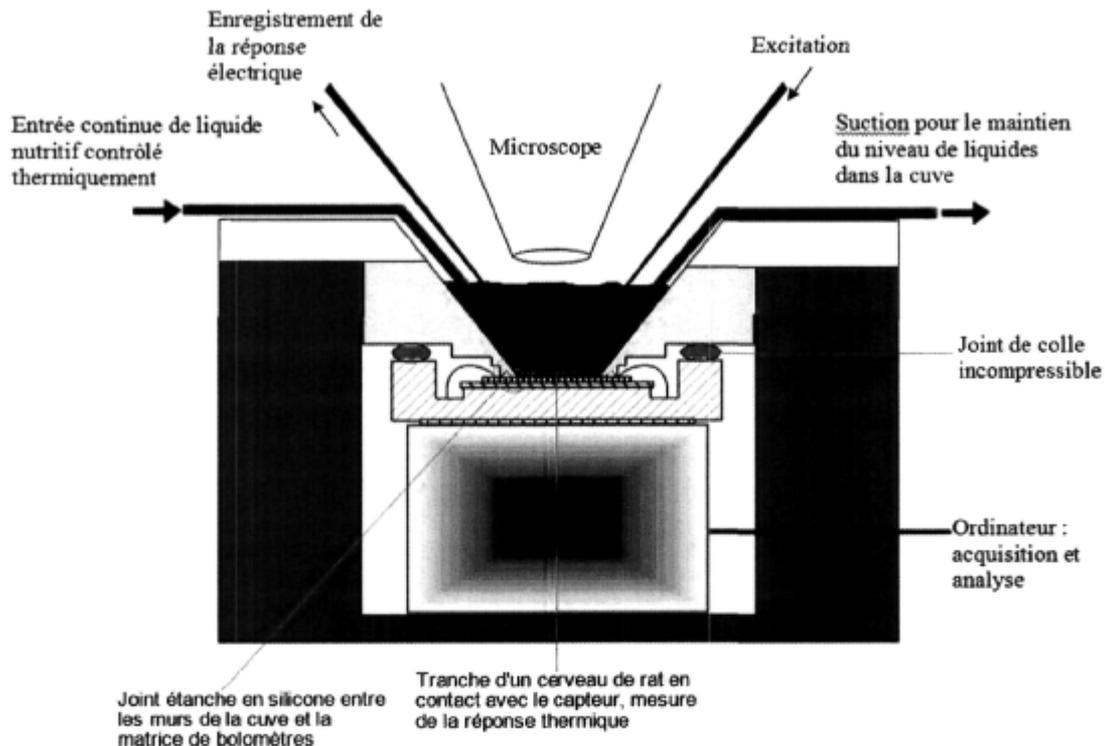
### **3. Développement du dispositif de thermographie par contact**

Le développement du dispositif de thermographie par contact se devait de tenir compte de certaines spécificités. Le développement du capteur prenait comme point de départ une première génération de capteurs par contact développée à l'INO. Or, ceux-ci ne pouvaient pas permettre la présence de liquide à la surface du détecteur, et il importait aussi de protéger l'électronique d'acquisition de tout contact avec les fluides utilisés. Vu les dimensions en jeu, la conception de solutions se devait de tenir compte des limites associées aux procédés de micro-fabrication. Il importait aussi de tenir compte, dès la conception, des nécessités associées aux mesures neurobiologiques qui seront effectuées avec le dispositif.

#### **3.1. Spécificités neurobiologiques**

Parmi les aspects à considérer lors du développement du capteur, il y a principalement ce qui touche au fait qu'un système de perfusion fluide doit être présent, ainsi que les considérations physiques se rapportant à l'introduction d'électrodes de stimulation et d'enregistrement.

Il a été retenu comme solution de mettre en place une chambre de perfusion qui vient se poser sur les rebords de la matrice de détection (voir figure 16). Celle-ci empêchera l'eau de se diriger vers l'extérieur de la matrice de détection et ainsi entrer en contact avec les bornes et les fils de connexion. L'étanchéité entre la chambre et la matrice de détection est assurée par l'utilisation d'un silicone spécialisé. L'étanchéité et l'adhésion de cette dernière ont été vérifiées en suivant la procédure décrite à la section 3.4.1. À noter que le silicone est retenu sous la cuve par une gouttière prévue à cet effet. Les détails physiques liés à la conception de cette cuve d'enregistrement seront présentés à la section suivante, particulièrement en ce qui touche aux dimensions en jeu.



**Figure 16.** Schéma du montage entourant le dispositif de thermographie par contact.

On a aussi prévu l'utilisation d'un binoculaire extérieur au capteur afin d'aider au placement des électrodes et à la visualisation des composantes structurales biologiques. Tel qu'on peut le voir à la figure 16, les électrodes doivent être insérées à angle dans la tranche, qui a une épaisseur de 250 à 400  $\mu\text{m}$ . Afin d'assurer la perfusion la plus homogène possible, les rebords internes de la cuve devaient avoir la hauteur la plus faible possible. Les restrictions associées à la mise en forme mécanique des pièces et des tolérances associées ont dû être prises en considération lors de la modélisation de la pièce. Afin de permettre la plus grande maniabilité des électrodes par l'utilisateur, l'angle d'ouverture de la cuve se doit d'être le plus grand possible, c'est-à-dire que la cuve doit être suffisamment évasée. L'angle maximal d'ouverture est limité par l'angle maximal de la concavité nous assurant la retenue du silicone pour l'étanchéité.

## 3.2. Spécificités physiques

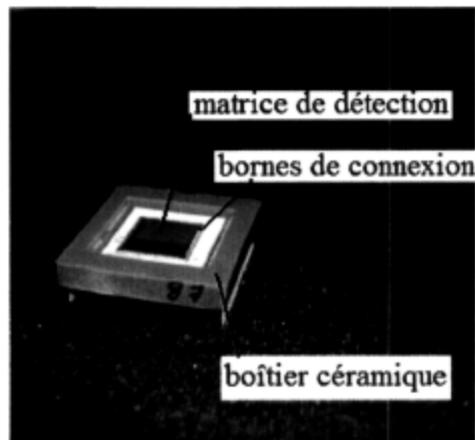
Tel que mentionné précédemment, les dimensions en jeu sont critiques dans le développement du design de la cuve. L'espace disponible entre le bord de la matrice de détection et les bornes de connexion à l'électronique était respectivement de 1160  $\mu\text{m}$ , 940  $\mu\text{m}$ , 740  $\mu\text{m}$  et 4170  $\mu\text{m}$  pour les côtés gauche, haut, centre et bas de la matrice de détection. Il fallait donc concevoir la cuve de façon à s'assurer que celle-ci ne viendrait pas en contact avec les fils. Il était aussi primordial de penser à un système permettant d'aligner le plus précisément possible l'ouverture de la cuve avec la matrice de détection. Ces considérations quant à l'alignement seront présentées à la section sur la modélisation ainsi que dans la section portant sur la procédure à suivre lors du collage de la cuve avec le capteur. Afin de s'assurer que le collage de la cuve sur le capteur bolométrique ne vienne pas mettre une pression exagérée sur le capteur, ce dernier étant composé d'un empilement de couches minces, un protocole menant à l'utilisation de séparateurs a été développée.

## 3.3. Modélisation 3D

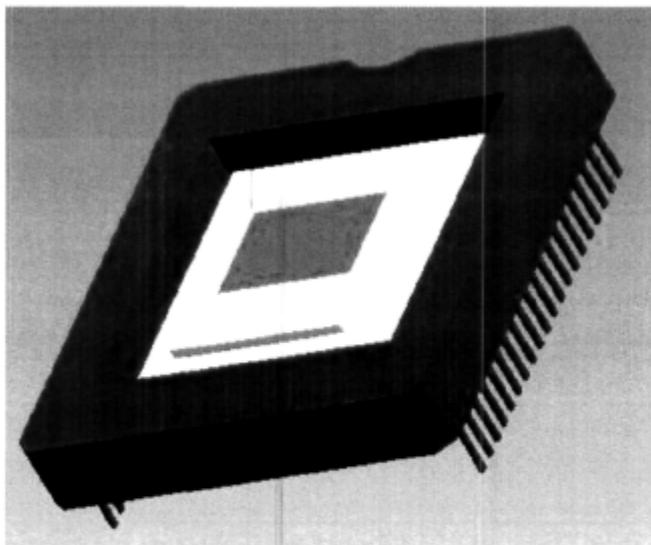
La modélisation des différentes pièces du capteur a été effectuée à l'aide du logiciel ProEngineer. Il était important de prendre connaissance des limitations liées à l'usinage. Les aspects considérés lors de la modélisation des pièces sont présentés, tout en faisant ressortir les fonctions de chacune. À noter qu'étant donné que le dispositif se veut une évolution d'une technologie existante, l'emphase sera particulièrement mise sur les pièces qui ont été modifiées ou ajoutées.

Les figures *17* et *18* montrent le capteur bolométrique et sa modélisation tridimensionnelle. Le boîtier a des dimensions de (30,2 X 26,4 X 4,5) mm alors que la surface de détection est de 6,2 mm X 8,3 mm. L'élaboration de la cuve permettant de retenir les liquides (voir figures *19* et *20*), a été basée sur les dimensions du capteur. Afin de minimiser la pression exercée sur la surface de détection, il a été prévu que la bordure

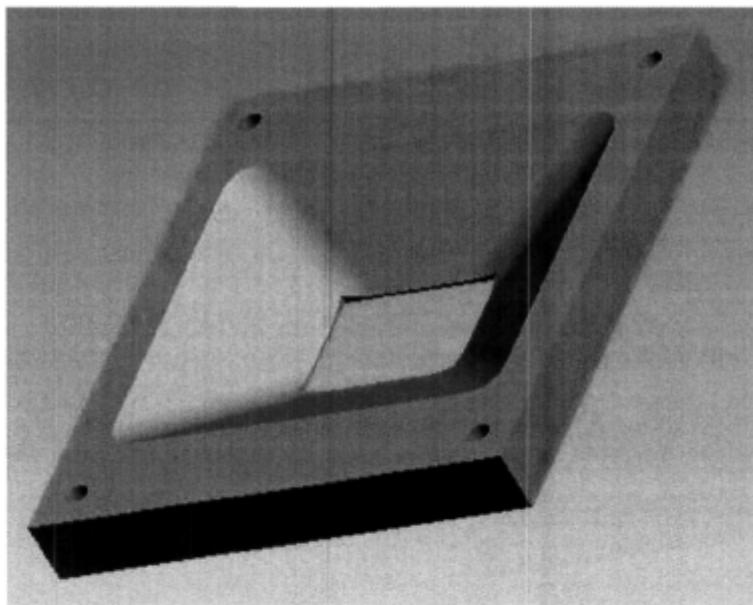
extérieure sous la cuve se pose simultanément sur les rebords du boîtier, en utilisant des feuillets séparateurs d'épaisseur appropriée. Les figures 21 et 22 présentent l'assemblage cuve-capteur. Des rebords externes sous la cuve ont aussi été prévus afin que celle-ci, une fois mise en place, ne puisse plus se déplacer latéralement sur une grande plage, c'est à dire sur une plage d'au maximum quelques centaines de microns. On peut voir à la figure 20 la gouttière dont il était question précédemment. C'est à l'intérieur de celle-ci que l'adhésif de scellage est inséré. Comme les fils reliant la matrice de détection à l'électronique ont une certaine hauteur, on peut observer que le dessous de la cuve est plus creux tout de suite après la gouttière. Le dessous de la cuve a été recouvert de nitrure afin d'isoler électriquement cette pièce du capteur.



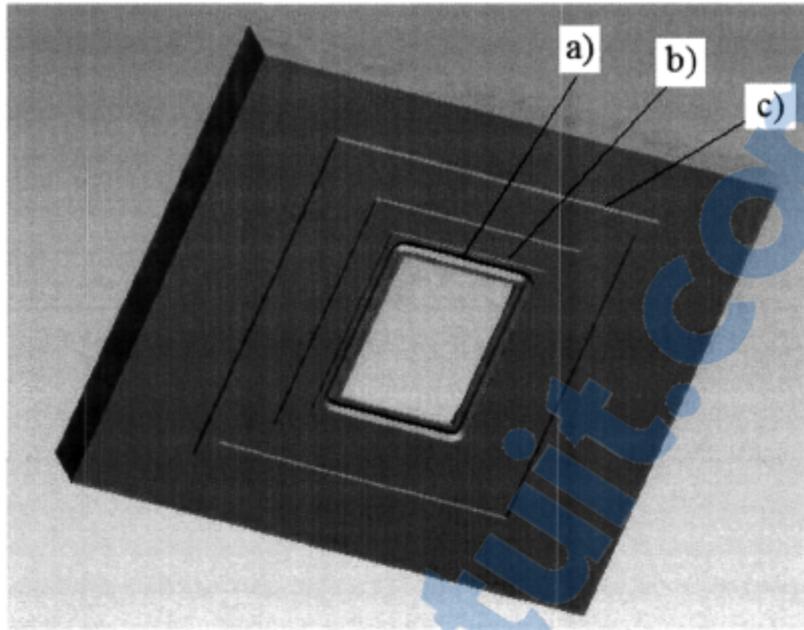
**Figure 17.** Capteur bolométrique dans son boîtier (30,2mm X 26,4mm X 4,5mm).



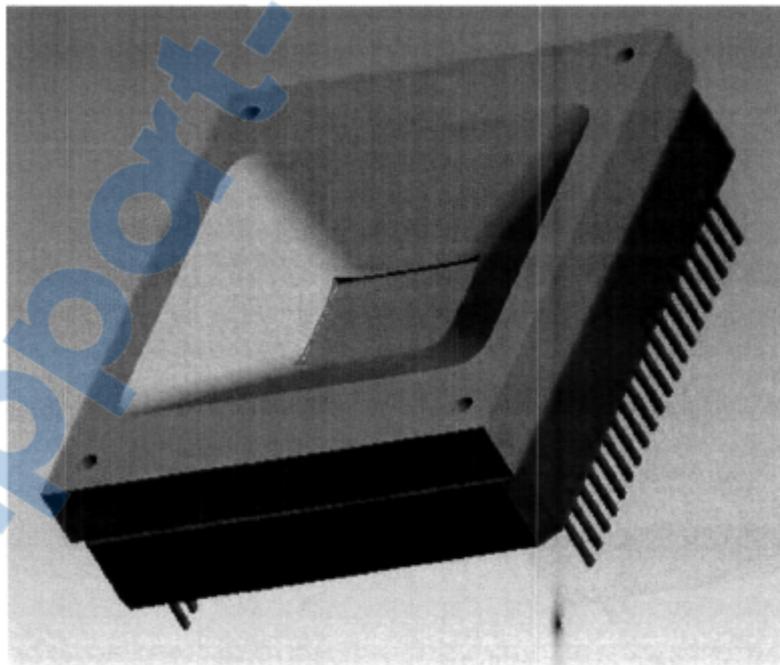
*Figure 18. Modélisation 3D du capteur bolométrique dans son boîtier  
(30,2mm X 26,4mm X 4,5mm).*



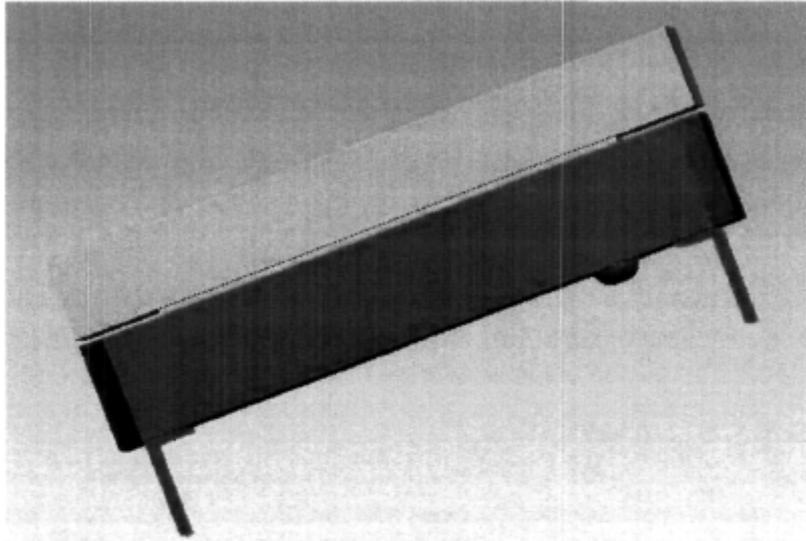
*Figure 19. Vue du dessus de la cuve modélisée  
(30,2mm X 26,4mm X 3,2mm).*



**Figure 20.** Vue du dessous de la cuve modélisée et description de l'utilité de certaines spécificités : a) Gouttière pour l'adhésif d'étanchéité, b) espace suffisant à la hauteur des fils, c) rebord empêchant le déplacement latéral entre la cuve et le capteur. (Dimensions de la cuve : 30,2mm X 26,4mm X 3,2mm).

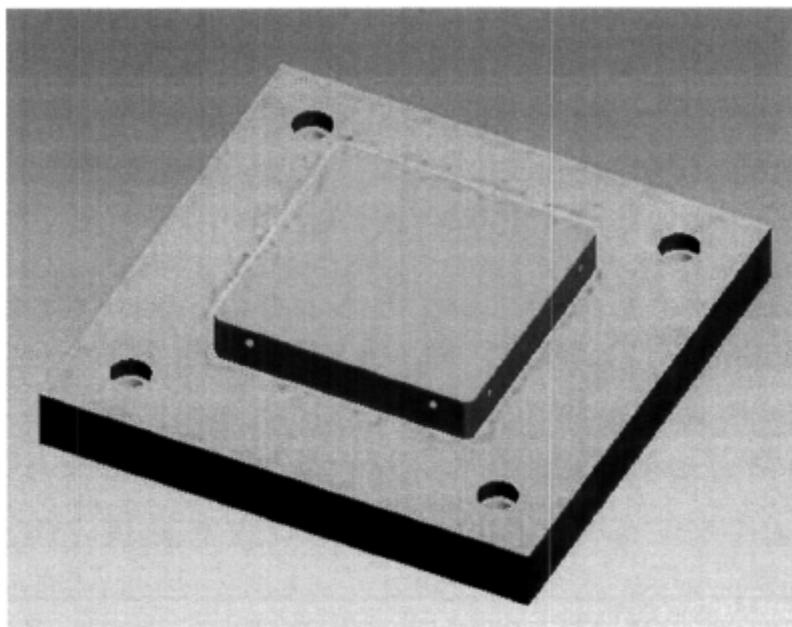


**Figure 21.** Assemblage cuve-capteur (30,2mm X 26,4mm X 8,7mm).

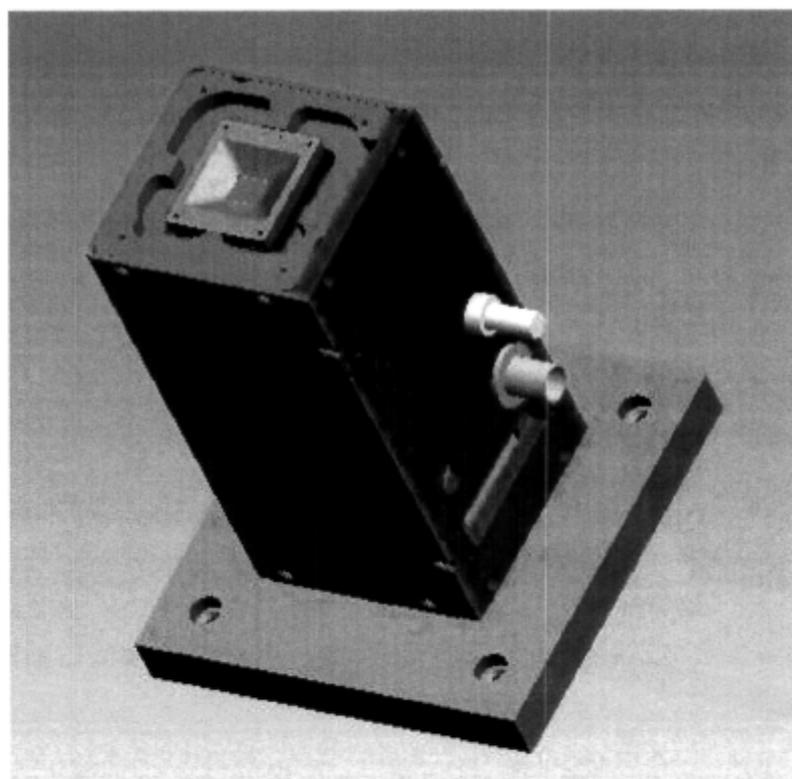


*Figure 22. Vue latérale de l'assemblage cuve-capteur (30,2mm X 26,4mm X 8,7mm).*

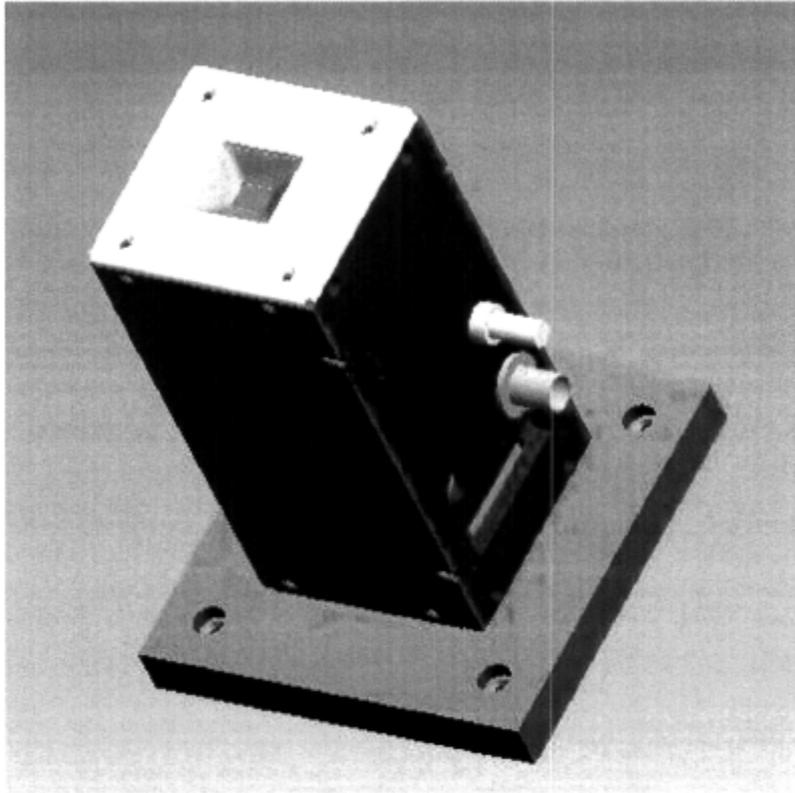
La pièce présentée à la figure 23 a été pensée de façon à permettre de fixer le dispositif complet sur une table optique. Une représentation du dispositif avec sa base, le capteur et la cuve est présentée à la figure 24. Toute l'électronique se retrouve à l'intérieur du boîtier et on peut voir les espaces prévus pour l'alimentation, le potentiomètre, le câble de raccordement et la sortie BNC pour la lecture du voltage. On peut finalement remarquer à la figure 25 qu'une pièce avec une ouverture centrale vient refermer le tout. L'intérieur de cette pièce vient se déposer sur les rebords externes plats de la cuve. Un adhésif a été utilisé pour bien sceller le tout et protéger l'électronique de l'infiltration de liquide. La figure 26 présente l'allure finale, une fois produit, du dispositif de thermographie par contact permettant une utilisation de liquide. La section suivante permet de jeter un regard sur les étapes et difficultés rencontrées lors de la mise en place des diverses parties, ainsi que les solutions qui ont été retenues.



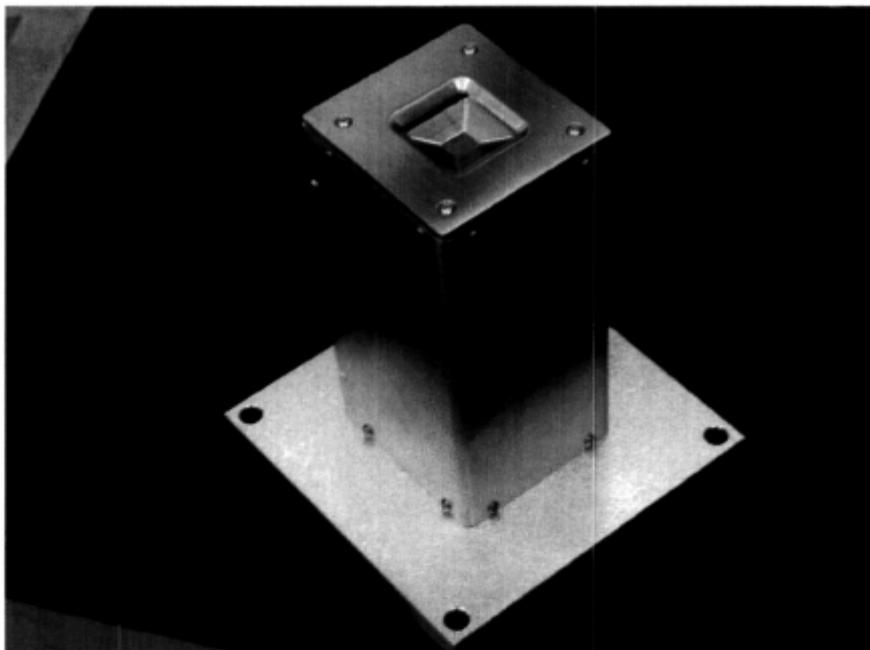
*Figure 23. Pièce à la base du dispositif (4'' X 4'' X 0,5'').*



*Figure 24. Dispositif avec la base et l'assemblage cuve-captteur  
(5,9 cm X 5,3 cm X 13,7 cm).*



*Figure 25. Modélisation complète du dispositif de thermographie par contact  
(5,9 cm X 5,3 cm X 14 cm).*



*Figure 26. Dispositif de thermographie par contact (5,9 cm X 5,3 cm X 14 cm).*

### **3.4. Production du capteur et mise en place de procédures**

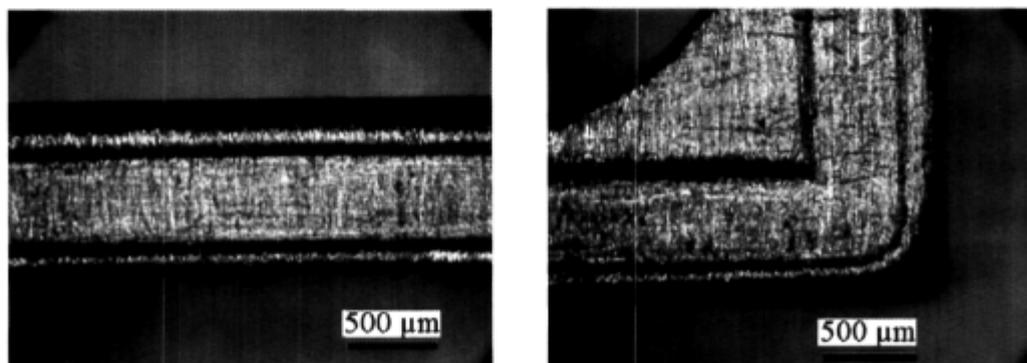
#### **3.4.1. Choix de l'adhésif et vérification de l'étanchéité**

Tel que mentionné précédemment, l'étape initiale consistait à trouver un adhésif adéquat pour faire le joint entre la cuve et les bords de la matrice de détection. Il fallait aussi déterminer les dimensions que pouvait avoir la gouttière dans laquelle est retenu l'adhésif.

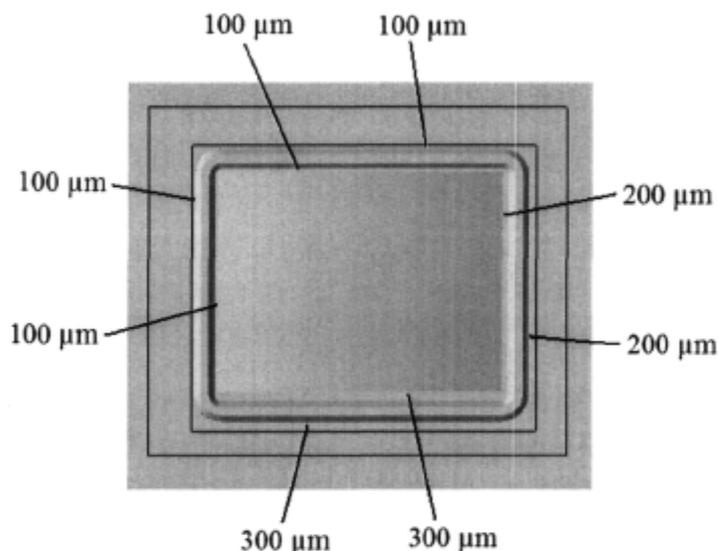
Dans cet ordre d'idée, nous avons fait construire différentes pièces simples afin de valider le choix à effectuer. Trois blocs d'aluminium, avec au centre une ouverture aux dimensions de la matrice de détection, ont été construits, avec en dessous des gouttières à angle de 90, 100 et 120 degrés. Pour des considérations mécaniques, il était impossible d'aller à un angle plus élevé que 120 degrés. Il a été décidé d'utiliser un silicone de type R-2186-2 comme adhésif entre la cuve et le capteur. Ses propriétés en faisaient un choix adéquat. Tout d'abord il s'agit d'un adhésif très étanche, même aux fluides gazeux. Il démontre une bonne adhérence à la plupart des surfaces, en plus de pouvoir être cuit à température ambiante en moins de 24 h. Il peut aussi être cuit plus rapidement à des

températures raisonnables pour ne pas abîmer le capteur (15 minutes à 115°C). Sa flexibilité, une fois cuit, est avantageuse par le fait que cela empêche la cuve d'exercer une trop grande pression sur la matrice de détection. C'est plutôt le boîtier céramique qui recevra la plus grande pression, l'adhésion de ce dernier avec la cuve étant effectuée à l'aide d'un adhésif beaucoup plus rigide. Il a été décidé d'utiliser la colle DP-190 de la compagnie 3M à cet effet, étant donné sa cuisson rapide à température ambiante, sa rigidité et sa durabilité.

À l'aide des blocs d'aluminium produits, nous avons pu vérifier l'adhérence du silicone sur des gaufres recouvertes de titane et de silicium, soient les matériaux sur lesquels la cuve, fabriquée en aluminium, sera en contact sur le capteur. Nous avons aussi vérifié l'étanchéité. Peu importe l'angle de gouttière utilisé, l'adhésion était excellente et l'étanchéité parfaite. Ainsi, dans la conception de la cuve, un angle de 120 degrés a été utilisé afin de permettre l'ouverture la plus évasée possible. Les rebords de la gouttière lorsque les pièces ont été produites avaient à l'origine une largeur de 300  $\mu\text{m}$ . Cette épaisseur a été amincie manuellement jusqu'à une épaisseur minimale de 100  $\mu\text{m}$  afin de maintenir l'étanchéité de la cuve. La mesure des bordures a été effectuée au microscope optique et les images obtenues étaient semblables à celles présentées à la figure 27. Ainsi, sur les côtés où l'espace est plus restreint, on a pu minimiser l'espace occupé par la cuve entre les fils et le bord de la matrice de détection. La figure 28 présente les dimensions des bordures de la gouttière sous la cuve telle qu'elle a été produite.



*Figure 27. Image au microscope optique des bordures d'une cuve de test.*



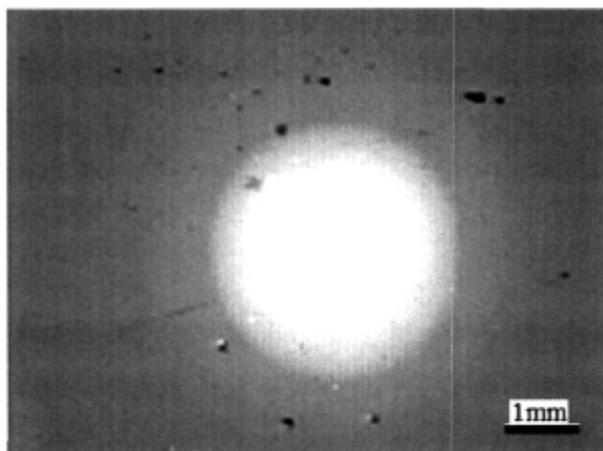
*Figure 28. Vue de dessous de la cuve et dimensions des bordures le long de la gouttière.*

### 3.4.2. Collage de la cuve sur le capteur bolométrique

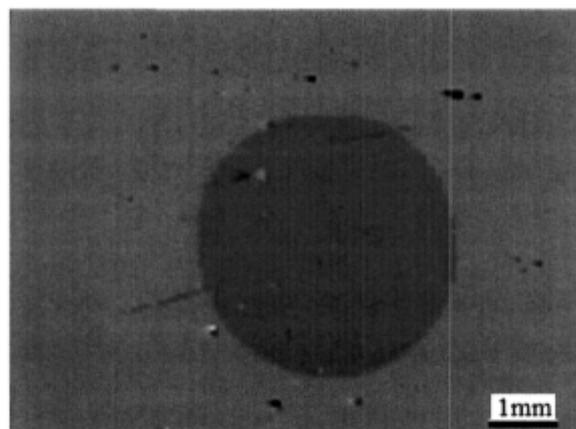
Afin d'assurer le meilleur alignement possible entre la cuve et le capteur, certaines précautions ont été prises. Suite aux divers essais effectués, une procédure pour le collage de la cuve sur le capteur a été développée (voir Annexe 1). Premièrement, tel que mentionné à la section sur la modélisation du capteur, la bordure la plus externe sous la cuve a été conçue de façon à empêcher la cuve de se déplacer par rapport au capteur (voir figure 20). Cette bordure venant s'appuyer contre les rebords du boîtier céramique, le déplacement de la cuve est ainsi limité à des distances de quelques centaines de microns. La procédure est basée sur l'utilisation d'un système de déplacement micrométrique dans les 3 dimensions afin de préciser l'alignement de la cuve. Des feuillets d'espacement ont été utilisés afin de contrôler l'épaisseur d'adhésif solide entre la cuve et le boîtier céramique. La partie supérieure du dispositif (voir figure 25) pouvait ensuite mise en place. Celle-ci adhère sur la partie externe du dessus de la cuve à l'aide d'un silicone. Le dispositif était alors prêt pour une utilisation avec des liquides. Tel qu'on le verra à la prochaine section, cela n'a pas été aussi simple qu'anticipé.

### 3.5. Comportement initial du capteur en présence de liquide

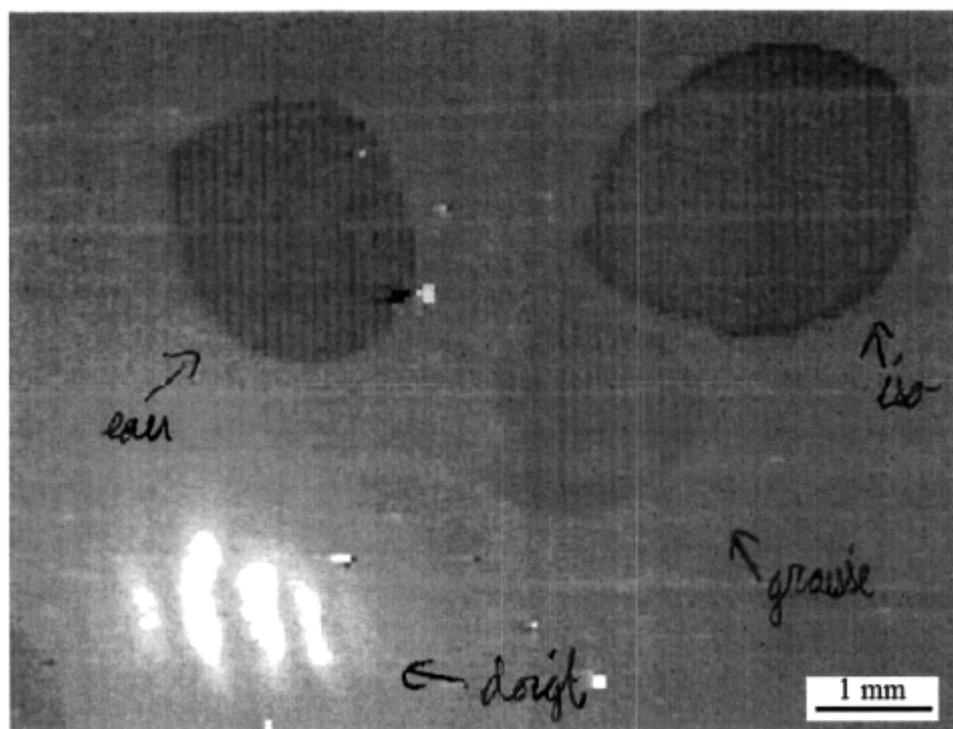
Le premier capteur produit, c'est-à-dire avec comme couche externe une couche de titane, a montré un comportement particulier lorsqu'on a déposé un liquide à sa surface pour la première fois. En choisissant une température au contrôleur de température plus basse que la température ambiante, on pouvait s'attendre à ce que le dépôt d'une goutte d'eau à température de la pièce démontre une température plus chaude que le détecteur, pour ensuite se stabiliser graduellement vers une température d'équilibre. Ce qui a été observé était bien différent. Le dépôt d'une goutte d'eau a d'abord montré un signal plus chaud (blanc à l'écran), tel qu'attendu (voir figure 29), mais après une fraction de seconde, l'image de la goutte a tourné au noir (plus froid!) et des lignes verticales étaient alors apparentes (voir figure 30). Outre de l'eau, le comportement a par la suite été observé avec de l'isopropanol ainsi que de la graisse à vide. On peut voir à la figure 31 que le comportement était similaire, et que seulement une différence dans la teinte était remarquée. On peut remarquer sur cette figure que le signal enregistré en appuyant un doigt enrobé d'un film de polyéthylène démontre un comportement plus normal. Des tests ont aussi été effectués avec un doigt nu et des effets de lignes verticales étaient aussi observés.



*Figure 29. Enregistrement initial au dépôt d'une goutte d'eau.*



*Figure 30. Enregistrement subséquent au dépôt d'une goutte d'eau.*



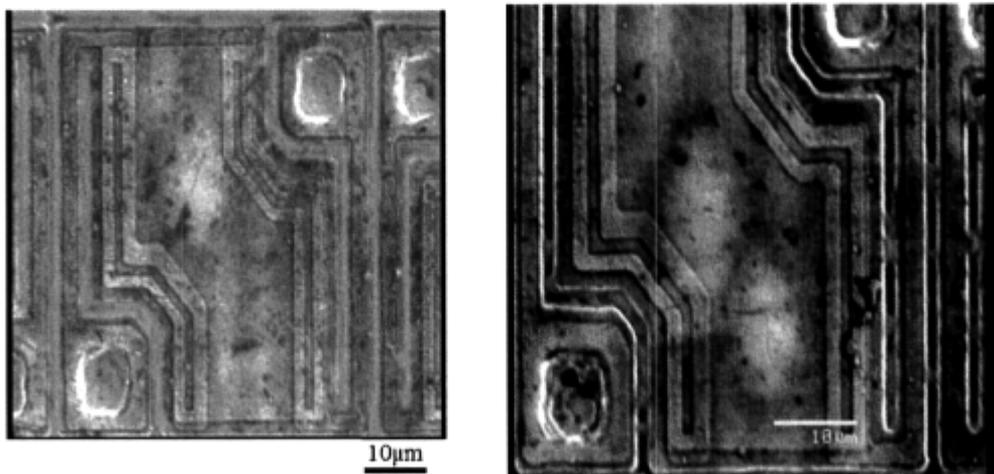
*Figure 31. Enregistrement au dépôt de diverses substances.*

Soupçonnant un effet voltaïque quelconque à la surface entre le liquide et le titane, nous avons vérifié l'effet de la polarité des molécules composant le liquide à la surface. Même en utilisant des liquides non-polaires (hexane), le même effet était observé. Comme cet effet semblait minimisé lors de l'utilisation d'une couche de polyéthylène, il a donc été

décidé d'évaluer les possibilités d'effectuer le dépôt d'une couche protectrice supplémentaire.

À noter aussi que le capteur a subi une dégradation marquée et rapide de son fonctionnement lorsqu'on a placé une quantité d'eau à l'intérieur de la cuve et que nous l'avons laissé pendant quelques heures. Il ne permettait plus d'enregistrer de façon adéquate le signal. Nous avons inspecté l'état de la surface de détection au microscope électronique afin de déterminer les causes de ce mauvais fonctionnement. Il semblerait que des fissures à la surface des bolomètres auraient pu permettre au liquide de s'infiltrer et ainsi entraîner une dégradation de l'électronique de lecture intégrée (voir figure 32). Les pôles semblent aussi avoir été atteints (voir figure 33). L'adhésion du titane sur la couche inférieure de nitrure a aussi été mise en doute.

Il était donc devenu impératif de déposer une couche, imperméabilisante et stable au contact de liquide, à la surface du capteur et cela en tenant compte des limites physiques de fabrication.



*Figure 32. Fissures observées en microscopie électronique.*



*Figure 33. Dégradation des pôles observée en microscopie électronique.*

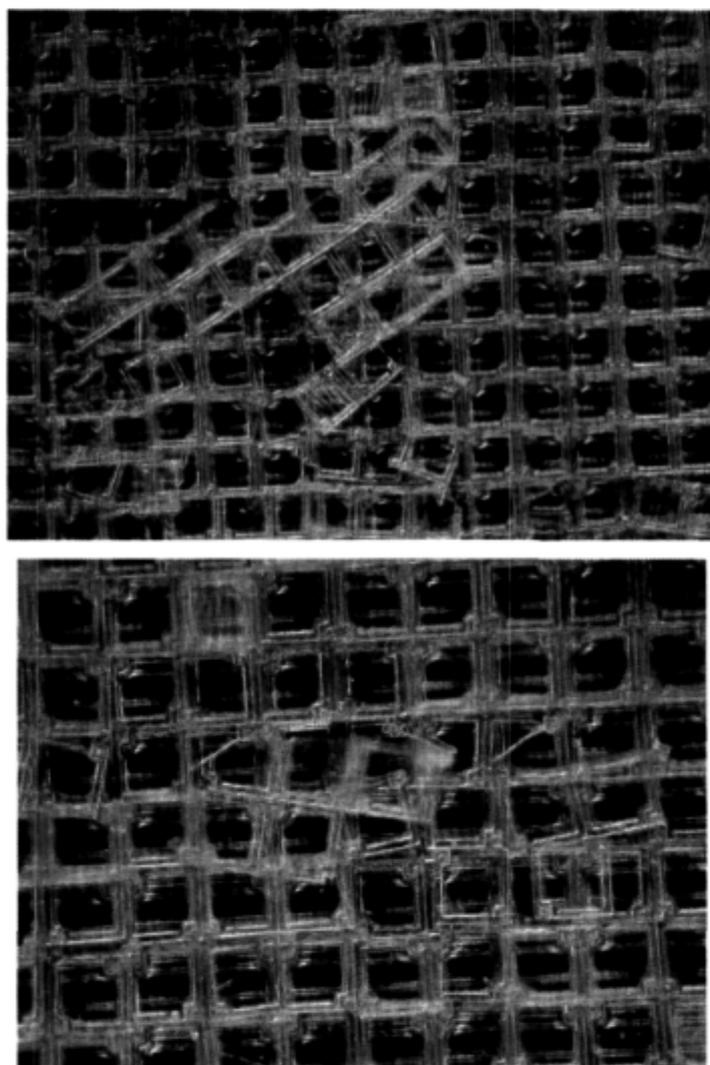
### 3.6. Dépôt d'une couche mince supplémentaire

Comme la gaufre avec les matrices de détection était déjà produite et découpée, il a fallu envisager des techniques permettant d'effectuer un dépôt sur une matrice seule, c'est-à-dire juste avant son insertion dans un boîtier. Il était plus convenable d'envisager une solution qui ne nécessiterait pas le développement d'une nouvelle procédure de dépôt, mais plutôt l'utilisation de procédés connus et maîtrisés, si cela était possible. Il était nécessaire que le dépôt ne recouvre pas les bornes de connexions, en plus d'être imperméable et résistant. Le premier matériau qu'il a été tenté de déposer était du  $\text{SiO}_2$ .

#### 3.6.1. Dépôt de $\text{SiO}_2$ par évaporation

Comme celui-ci pouvait se déposer selon un procédé déjà maîtrisé à l'INO, soit par évaporation, cela semblait une avenue intéressante. Comme le  $\text{SiO}_2$  est une sorte de verre, son imperméabilité ne faisait pas de doute. Afin d'affecter le moins possible la sensibilité thermique du détecteur, la couche devait être la plus mince possible. Il a donc été décidé de déposer une couche de 300 nm de  $\text{SiO}_2$  à la surface du détecteur. Suite au développement d'un nouveau capteur avec  $\text{SiO}_2$  à sa surface, nous avons vérifié son comportement en

présence d'eau. On peut voir à la figure 34 que cette solution devait être rejetée. Le  $\text{SiO}_2$  déposé par évaporation démontrait une fragilité. On a pu observer au microscope optique des cristaux de verre cassés à la surface du capteur. Comme il y a un creux d'une largeur d'environ  $2\ \mu\text{m}$  entre des bolomètres adjacents, il semble que le  $\text{SiO}_2$  déposé par évaporation se montre trop fragile dans ces zones. Il semble hypothétiquement valable d'affirmer que le  $\text{SiO}_2$  se retrouve en trop faible épaisseur à certains endroits dans ce creux, et que c'est ce qui entraîne sa cassure. Il est aussi possible que l'adhérence sur le titane soit trop faible. Il a donc fallu envisager d'autres solutions.



*Figure 34. Éclatement du  $\text{SiO}_2$  sous le poids du liquide. Chaque bolomètre (carré) a des dimensions de  $52\ \mu\text{m}$ .*

### 3.6.2. Dépôt de polyimide par rotation (« spinning »)

Afin d'éviter les faiblesses dans la zone creuse entre les bolomètres, il importait alors d'utiliser un procédé qui permettrait un dépôt relativement plan et uniforme à la surface du détecteur. C'est en quoi la méthode de dépôt par rotation (ou « spinning ») s'est avérée des plus utiles. Il était important de ne pas déposer de matériau sur les bornes de connexion des fils. Il a donc fallu protéger celles-ci lors du dépôt. La mise en place d'une procédure efficace pour le dépôt a demandé un certain temps, mais suite à quelques itérations, nous avons obtenu deux capteurs avec 1  $\mu\text{m}$  de polyimide à la surface. L'utilisation du polyimide comme surface externe s'est avérée bénéfique, et c'est ce type de capteur qui a été utilisé au cours du projet de recherche. Ce type de capteur s'est montré beaucoup plus résistant aux liquides, et les effets étranges décrits précédemment n'apparaissent pas. Bien qu'il se montre beaucoup plus résistant, il importe de dire qu'à long terme, il y a tout de même une dégradation progressive du capteur. Comme le polyimide ne démontre pas une imperméabilité parfaite, et qu'une dégradation à long terme est observée, le développement d'un capteur avec du Teflon à la surface a été entamé.

### 3.6.3. Dépôt d'une couche de Teflon AF

S'agissant d'un dépôt méconnu à l'INO, le développement d'une procédure pour le dépôt du Teflon AF en solution s'est avéré plus long. Il s'agit d'un matériau provenant de la compagnie *Dupont* et reconnu pour son caractère hydrophobe. Il fallait valider chacune des étapes effectuées, et c'est pourquoi la production d'un premier capteur avec du Teflon AF à sa surface ne pourra être effectuée que lors de travaux futurs. Bien que le développement de la procédure pour le dépôt de Teflon ait connu des avancées importantes durant les derniers mois de la maîtrise, il reste tout de même quelques étapes avant d'en arriver à la production d'un premier capteur avec Teflon AF. Selon ce qui a été observé, on peut par contre espérer que la résistance aux liquides sera améliorée par rapport aux autres capteurs développés jusqu'à maintenant.

Du Teflon AF en solution a d'abord été déposé par rotation sur une gaufre de titane afin de vérifier son adhésion et son imperméabilité. Une goutte d'eau déposée en surface avait une forme sphérique quasi-parfaite et le mouillage de la surface était faible. En fait, la surface, dès l'eau retirée, était déjà sèche. En regardant au microscope optique l'état de la

surface avec le dépôt de Teflon AF, on a vu que le dépôt n'était pas parfaitement plan, mais il ne fait aucun doute que toute la surface était recouverte. Tout cela laisse présumer que le Teflon est imperméable. Rappelons aussi que le Teflon est reconnu pour être adéquat pour une utilisation avec des produits biologiques et pour démontrer une bonne résistance aux produits chimiques. On peut donc s'attendre à ce que la surface ne se dégrade pas, peu importe la composition du liquide de perfusion.

Rappelons qu'il est important de laisser les bornes de connexions ouvertes suite au dépôt. Comme le Teflon est reconnu pour que rien n'adhère à sa surface, il faut aussi que la surface pour le collage du silicone soit exempte de Teflon. Sa présence se limite donc à l'endroit où se retrouvent les bolomètres. Comme le Teflon recouvre totalement la surface du capteur parce qu'il est déposé par rotation, il faut le supprimer en dehors de la zone des bolomètres. Ceci est réalisé par des techniques de microfabrication de surface. Une résine photosensible est déposée par rotation sur le Teflon, puis mise en forme par lithographie pour exposer le Teflon en dehors des bolomètres.

La stratégie adoptée est la suivante : il s'agit d'effectuer le dépôt de Teflon AF en solution liquide sur l'ensemble du capteur. On cherche ensuite à développer une certaine épaisseur d'une résine de lithographie à la surface du Teflon. Il faut précédemment graver légèrement la surface du Teflon afin de faciliter l'adhésion de la résine. Une fois la résine en place, on utilise un masque de chrome afin de graver tout ce qu'il y a à l'extérieur de la matrice de bolomètres. Il y a gravure jusqu'à ce que toute la résine et le Teflon soient disparus. Il ne reste alors que du Teflon AF et de la résine à la surface de la matrice de bolomètres. La résine est ensuite nettoyée et il reste uniquement du Teflon à la surface de détection. Afin que ce processus soit possible, il importait d'être capable de déposer l'épaisseur désirée de Teflon et de résine, ainsi que de connaître les vitesses de gravure respectives. Cette partie a été effectuée en salle blanche à l'INO par un technologue spécialisé dans ce domaine. Il a dû caractériser l'épaisseur de Teflon AF en solution déposée par rotation en fonction de la vitesse de rotation et de la composition de la solution, c'est-à-dire le pourcentage de partie solide dans la solution utilisée. Avec les solutions et les technologies dont on dispose, il est alors possible d'effectuer un dépôt d'une épaisseur

de allant de 50 nm à 3,4  $\mu\text{m}$ . Il reste comme étape à effectuer avant d'obtenir un premier capteur avec Teflon, à confirmer expérimentalement la procédure complète, composée des divers dépôts et gravures. La figure 35 montre que la gravure du Teflon AF selon un patron précis est possible. Un masque approprié pour le dépôt sur une matrice de bolomètres doit aussi être fabriqué. La caractérisation de ce nouveau capteur pourra ensuite être effectuée et les qualités attendues de ce dernier vérifiées. Nous reviendrons à cela dans la partie sur les développements futurs du projet de recherche.



*Figure 35. Gravure du Teflon AF selon un patron spécifique.*

Étant donné le comportement surprenant et les défauts associés au fait d'utiliser le capteur avec du titane comme surface externe, on se devait de déposer une couche protectrice à la surface. Le dépôt de  $\text{SiO}_2$  s'est avéré très peu efficace, mais le dépôt de polyimide a été nettement plus bénéfique. Ce sont d'ailleurs avec des capteurs avec du polyimide que les études préliminaires ont été effectuées. Malheureusement, une dégradation progressive a été observée, menant au mauvais fonctionnement des capteurs. Comme il était impossible d'en fabriquer un autre rapidement, certaines expérimentations ont dû être mises en attente. L'utilisation de ces capteurs a tout de même permis une première optimisation et mise au point du montage expérimental utilisé et l'obtention de

premiers résultats expérimentaux préliminaires. Le développement d'un capteur avec du Teflon AF à la surface s'avère prometteur, mais le développement du procédé de dépôt demande un certain temps.

### **3.7. Interface d'utilisation: acquisition et traitement des données**

Commençons d'abord par expliquer comment fonctionne le transfert des données entre le dispositif et l'ordinateur portable. Le dispositif de thermographie communique avec l'ordinateur par le biais d'un câble « camera link » et d'une carte d'acquisition (Framelink d'*Imperx*). L'acquisition et la visualisation des données provenant du dispositif se fait à l'aide d'un logiciel qui a été développé à l'INO et modifié au cours du présent projet de recherche. Le fonctionnement détaillé du logiciel est présenté en annexe. Bien que quelques générations du logiciel d'acquisition existaient déjà, j'ai été amené à participer à la modification du logiciel afin qu'il corresponde aux besoins du projet et se veule ainsi mieux adapté. Certaines parties du logiciel ont aussi été optimisées afin d'accélérer les temps d'acquisition et de traitement. L'acquisition et la visualisation en direct à 30 Hz a donc été rendue possible, ce qui procure une plus grande flexibilité en ce qui a trait aux mesures qu'il est possible d'effectuer. Le logiciel permet d'effectuer un moyennage temporel lors de l'acquisition. Tout dépendant de la dynamique des phénomènes à étudier, cela peut s'avérer utile. Il est aussi possible d'effectuer une soustraction d'une image moyenne, cela permettant de mieux observer les fines variations du signal. Une calibration du capteur permet de déterminer la présence de pixels défectueux et de les remplacer par la valeur d'un pixel voisin fonctionnel. Il y a aussi à ce moment la construction d'une table de gain qui permet une compensation du signal afin que les bolomètres, lors de la construction de l'image, présentent le même niveau de gris pour une même température à leurs bornes. La valeur brute enregistrée est une valeur en nombre de comptes sur 16 bits, correspondant à un voltage donné pour chacun des bolomètres de la matrice. C'est sur cette valeur que l'analyse et le traitement post-acquisition sont effectués.

## 4. Caractérisation du dispositif

Lors de l'élaboration d'un nouveau système de mesure, il est important d'évaluer les caractéristiques de celui-ci. C'est pourquoi nous avons procédé à la caractérisation du système afin de déterminer son comportement sous certaines conditions. La caractérisation complète du dernier capteur utilisé a été effectuée. Comme le système d'acquisition permettait alors un enregistrement à 30 Hz, c'est à ce taux que les enregistrements ont été effectués. La caractérisation a été effectuée sous diverses conditions d'opération : soient le capteur sans liquide, le capteur avec un liquide stagnant à la surface, le capteur avec une perfusion continue de liquide et finalement, le système complet composé d'une tranche à la surface du capteur, perfusée par le liquide approprié. À moins d'indication contraire, ce qui est présenté dans cette section a été obtenu à température ambiante afin de minimiser les fluctuations thermiques.

### 4.1. Méthode

Nous nous sommes d'abord intéressés au bruit du dispositif de thermographie par contact. Tel que mentionné antérieurement, les valeurs à la sortie du dispositif, et acquises par l'ordinateur, sont des valeurs de potentiel exprimées en nombre de comptes. C'est à partir de ces valeurs que l'on peut construire l'image. Une variation du nombre de comptes peut être traduite en une variation de température par la fonction de transfert déterminée lors de l'étalonnage. Nous allons montrer ici le cheminement à suivre afin d'obtenir le bruit du dispositif de thermographie par contact en terme de température.

Le bruit à chacun des bolomètres est déterminé comme étant l'écart-type de la variation du signal brut, en nombre de comptes, dans un temps donné lorsque la température des bolomètres est stable. Le bruit d'un bolomètre, ou d'un pixel, est donné par l'équation suivante :

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (14)$$

où  $n$  représente le nombre d'image sur lequel le bruit a été évalué. Comme le comportement du potentiel aux bornes d'un bolomètre peut être considéré linéaire avec la température autour d'un certain point d'opération, c'est la pente de cette relation que l'on utilise pour exprimer la fonction de transfert du signal (SiTF). Cette dernière, exprimée en comptes/°C, permet de déduire le bruit du système. Il importe aussi de noter qu'à partir de la SiTF, on peut déduire l'impact qu'a la discrétisation du signal (à l'aide d'un numériseur 16 bits = 65 536). L'inverse de la SiTF nous donne en fait la plage de température contenue par un compte (exprimée en °C/compte). Ainsi, si la SiTF est de 500 comptes/°C, la valeur discrète obtenue convertie en température a une incertitude de  $\pm 0,001^\circ\text{C}$ .

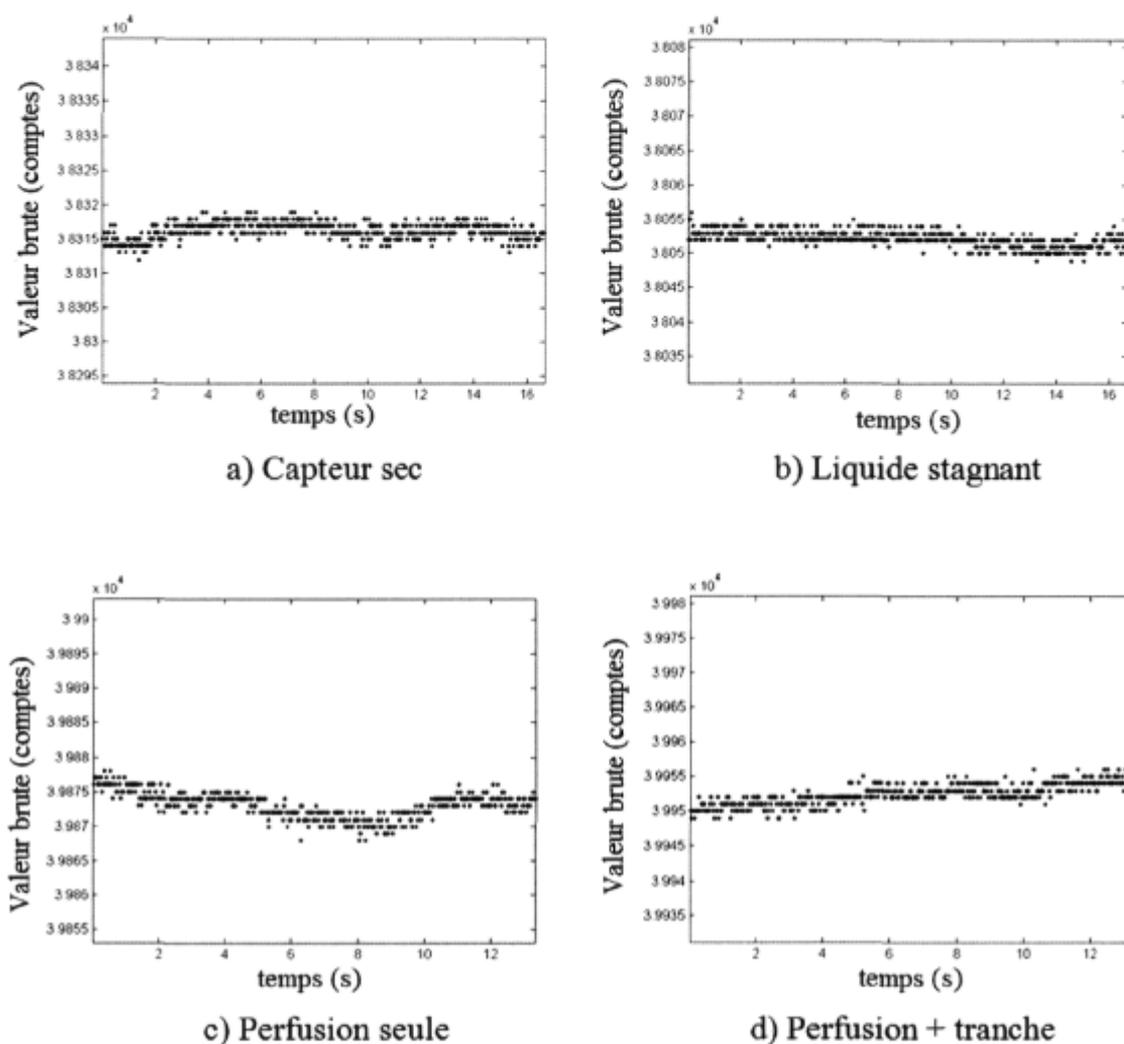
En effet, la différence de température équivalente au bruit (NETD) est définie de la façon suivante :

$$NETD = \frac{\sigma}{SiTF} \quad (15)$$

Le bruit étant en comptes et la SiTF en comptes/°C, la NETD est ainsi exprimée en °C. Nous avons donc étudié ces caractéristiques pour les bolomètres ainsi que pour l'ensemble de la matrice de bolomètres, composée de 19 200 pixels. Nous avons procédé à cette étude pour les diverses conditions mentionnées précédemment.

## 4.2. Résultats

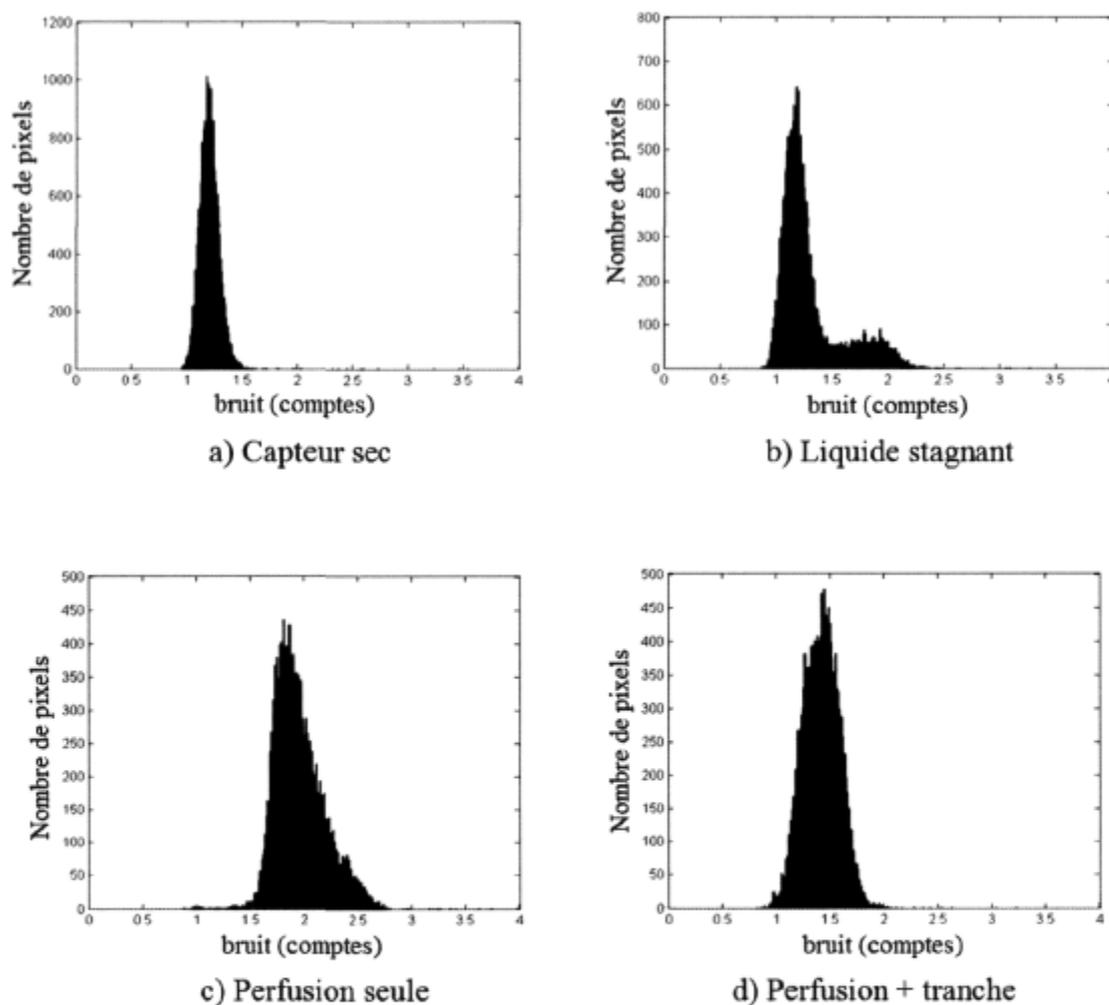
La figure 36 présente le signal brut enregistré à un bolomètre donné, de coordonnées (60,80), sous les diverses conditions d'utilisation. Le bruit pour ce pixel et ces conditions a été déterminé et est présenté dans le tableau 7. Le bruit a en fait été déterminé pour tous les bolomètres de la matrice de détection et la distribution des valeurs obtenues, pour les diverses conditions, est présentée sous forme d'histogramme pour chaque condition d'utilisation (voir figure 37). Le tableau 7 présente aussi la valeur moyenne du bruit sur les 19 200 bolomètres avec l'écart-type de celle-ci.



**Figure 36.** Variation dans le temps du signal brut enregistré au bolomètre de coordonnées (60,80) sous diverses conditions d'utilisation.

	$\sigma_{60,80}$ comptes	$\sigma_{\text{moyen}}$ comptes
Sec	1,2574	$1,21 \pm 0,17$
Liquide stagnant	1,1651	$1,31 \pm 0,34$
Perfusion	1,8802	$1,96 \pm 0,27$
Perfusion + tranche	1,5717	$1,42 \pm 0,20$

**Tableau 7.** Valeurs du bruit sous diverses conditions d'utilisation, pour un bolomètre de coordonnées (60,80) et sur l'ensemble de la matrice de bolomètres.



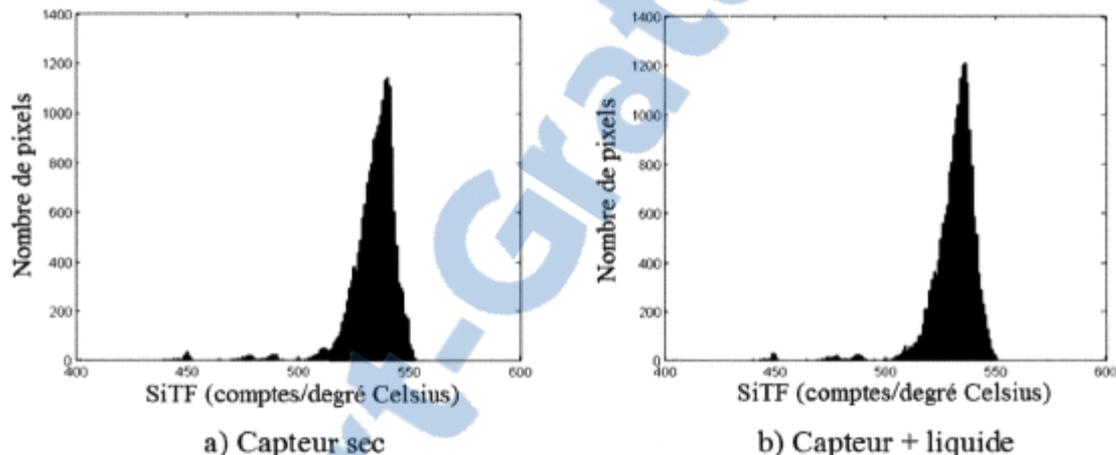
**Figure 37.** Représentation sous forme d'histogramme de la distribution du bruit pour tous les bolomètres de la matrice et sous diverses conditions d'utilisation.

La fonction de transfert du signal (SiTF), a été déterminée pour chacun des bolomètres de la matrice et pour deux conditions distinctes, soient lorsqu'il y a présence d'un liquide ou non. La valeur discrète pour le pixel de coordonnées (60,80) et la valeur moyenne de la SiTF est présentée au tableau 8 pour les 2 conditions. L'incertitude sur une mesure de température obtenue avec le capteur, tel qu'expliqué précédemment, est donnée par la moitié de l'inverse du SiTF. Pour le capteur sec et le capteur avec liquide, cette valeur est de  $0,00094^{\circ}\text{C}$ . La résolution thermique maximale du système sans post-

traitement des données est donc de 1,8 mK. La figure 38 présente quant à elle la distribution des valeurs de SiTF obtenues pour chacun des bolomètres.

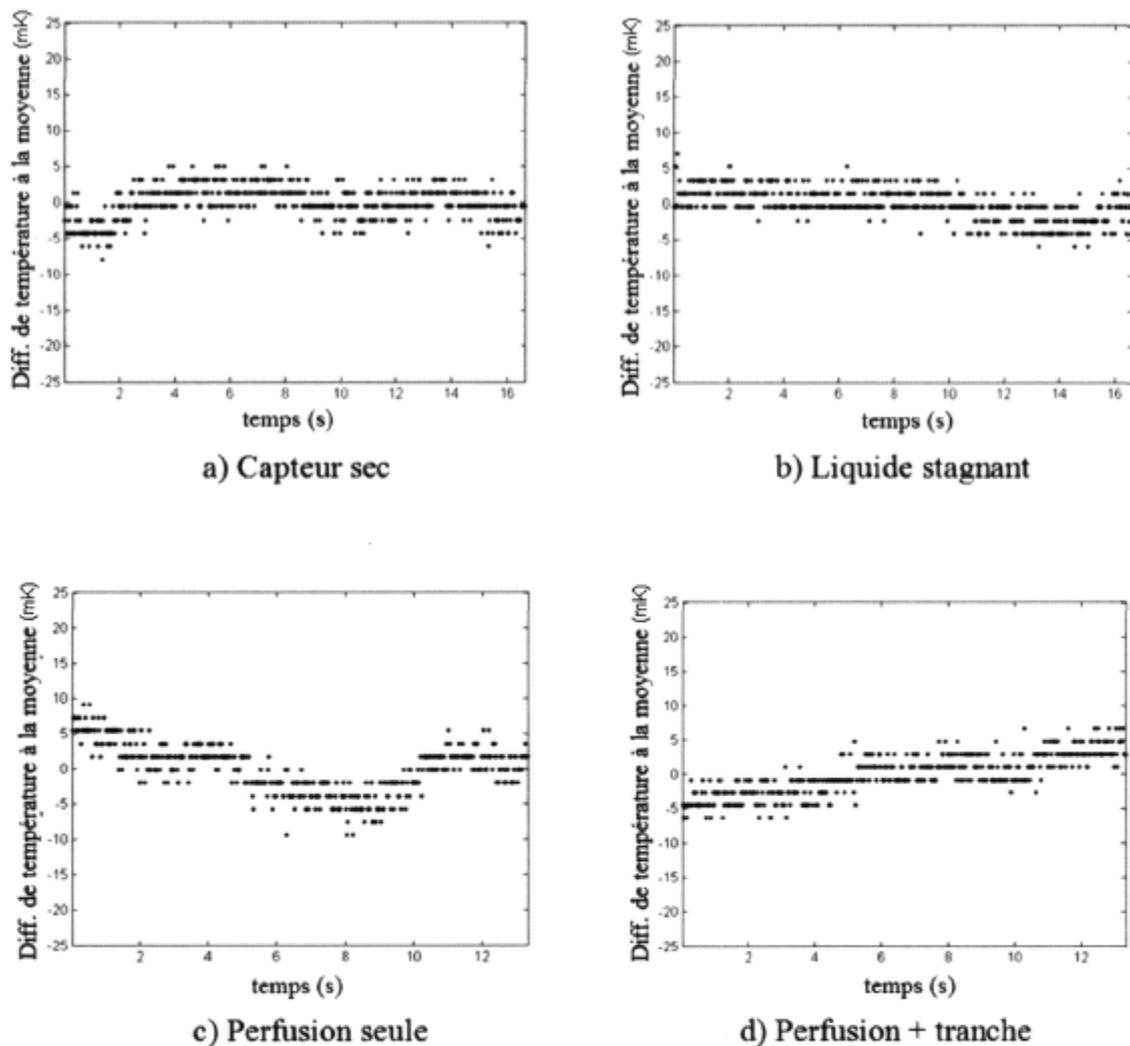
	SiTF <sub>60,80</sub> comptes/°C	SiTF <sub>moyen</sub> comptes/°C
Capteur sec	542,4	533 ± 18
Capteur + liquide	538,3	530 ± 17

**Tableau 8.** Valeurs de la SiTF avec ou sans liquide, pour un bolomètre de coordonnées (60,80) et sur l'ensemble de la matrice de bolomètres.



**Figure 38.** Représentation sous forme d'histogramme de la distribution de la SiTF pour tous les bolomètres pour une utilisation a) à sec et b) avec un liquide.

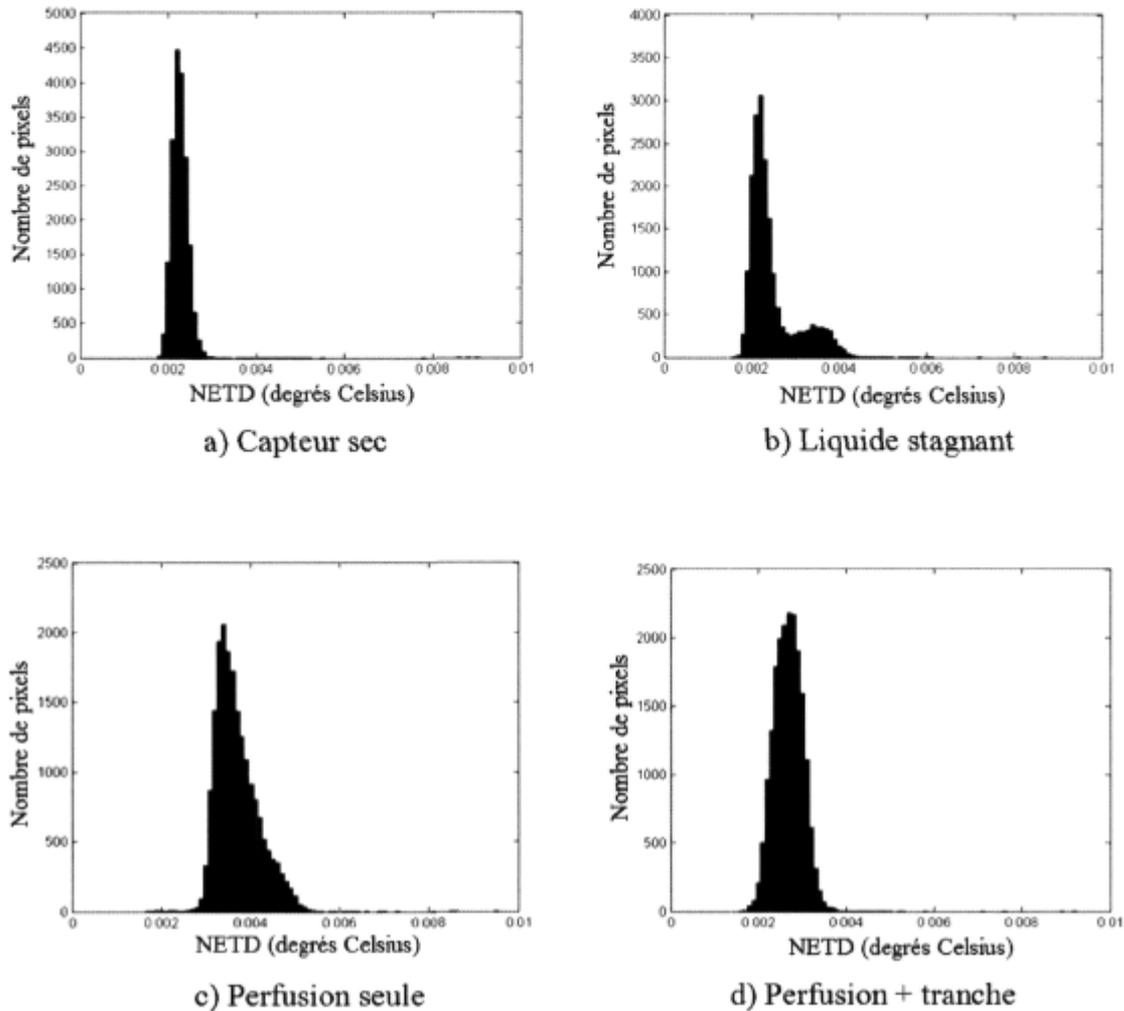
En divisant le bruit mesuré par la SiTF pour chacun des bolomètres on obtient ainsi la différence de température équivalente au bruit (NETD). La figure 39 présente le comportement temporel de la variation en température du signal (en mK) par rapport à la valeur moyenne de celui-ci pour le bolomètre (60,80). Le tableau 9 résume les valeurs de NETD obtenues sur ce pixel et la moyenne sur l'ensemble de la matrice. La figure 40 présente quant à elle la distribution des NETD pour l'ensemble des bolomètres. La résolution thermique du dispositif correspond donc aux NETD moyennes présentées dans le tableau.



**Figure 39.** Variation dans le temps de la NETD au bolomètre de coordonnées (60,80) sous diverses conditions d'utilisation.

	NETD <sub>60,80</sub> mK	NETD <sub>moyen</sub> mK
Sec	2,3	2,3 ± 0,5
Liquide stagnant	2,2	2,5 ± 0,8
Perfusion	3,5	3,7 ± 0,6
Perfusion + tranche	2,9	2,7 ± 0,4

**Tableau 9.** Valeurs de la NETD sous diverses conditions d'utilisation, pour un bolomètre de coordonnées (60,80) et sur l'ensemble de la matrice de bolomètres à température ambiante.



**Figure 40.** Représentation sous forme d'histogramme de la distribution de la NETD pour tous les bolomètres de la matrice et sous diverses conditions d'utilisation.

### 4.3. Analyse

Il était intéressant de s'attarder au bruit du dispositif de thermographie par contact sous diverses conditions d'utilisation afin d'en déterminer la résolution thermique. À la lumière de ce qui est présenté, la résolution thermique à température ambiante pour des études sur des tranches sous perfusion est de  $(2,7 \pm 0,4)$  mK. En tenant compte de ce qui a été présenté précédemment (voir section 2.4.1.2), on peut supposer que ce système a la résolution thermique adéquate pour enregistrer des fluctuations thermiques causées par

l'activité métabolique cellulaire. On verra plus loin qu'il existe de plus des techniques qui permettent d'augmenter le rapport signal sur bruit de systèmes d'imagerie.

Avant de comparer les valeurs d'intérêt entre elles, il y a un élément des distributions présentées que je crois important de mentionner. Dans le cas du système avec un liquide stagnant à la surface de détection, la distribution du bruit, et ainsi de la NETD, semble bimodale, c'est-à-dire qu'il existe deux sommets distincts dans la distribution (figures 37 et 40). Ce comportement est aussi discernable dans le cas de la perfusion seule. En s'y attardant, nous avons vu que le second pic provenait en fait du bruit sur les 12 premières lignes de bolomètres des 120 lignes composant la matrice de détection. Il s'agissait d'un endroit où le silicone permettant l'étanchéité entre la cuve et le capteur a légèrement débordé lors du collage.

Par le biais d'une étude statistique, c'est-à-dire le test-t de Student [50], nous avons pu déterminer si les moyennes obtenues entre les diverses conditions étaient distinctes ou non en fonction de leur valeur et de l'écart-type associé. Il s'est avéré que les toutes les moyennes étaient distinctes entre elles dans un intervalle de confiance de plus de 99,9%, même dans le cas des valeurs de SiTF. On peut ainsi tirer certaines conclusions en comparant les valeurs obtenues entre elles.

En se référant au tableau 9, on voit que la meilleure résolution thermique est obtenue avec le système à sec, alors que la pire est obtenue avec le système avec uniquement la perfusion. Il semble que la présence de la tranche vienne diminuer les fluctuations de signal causées par la perfusion. Ce système est toutefois plus bruyant que lorsque le liquide est stagnant à la surface. Ces diverses observations peuvent être confirmées à partir des distributions de bruit de la figure 37 (bruit sous perfusion unique plus élevé de 0,5 mK).

La résolution thermique du dispositif est inversement proportionnelle à la SiTF. La SiTF du capteur sec étant plus élevée que lorsqu'un liquide est présent on peut ainsi affirmer

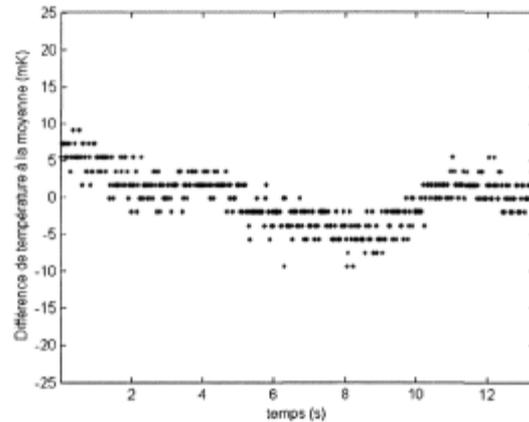
que l'utilisation de liquide, du point de vue de la fonction de transfert, entraîne une dégradation de la résolution thermique de 0,6%.

On peut voir sur les représentations du signal enregistré (voir figures 36 et 39), que le bruit thermique semble être le résultat de diverses fluctuations, certaines étant plus rapides et/ou plus prononcées que d'autres. On verra à la section suivante certaines façons de minimiser le bruit, sous certaines considérations.

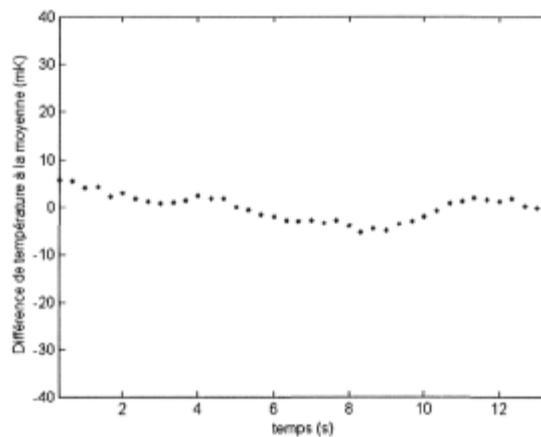
### **4.3.1. Analyse et traitement du signal**

#### **4.3.1.1. Moyennage temporel**

L'utilisation du moyennage temporel est pratique courante en imagerie et en neurobiologie. Cela peut permettre d'abaisser le bruit, au dépit d'une réduction de la fréquence. En effet, le bruit ayant une nature aléatoire, la sommation de valeurs d'une part et d'autre de la moyenne aura pour effet de diminuer l'écart-type. Ainsi les valeurs successives sont sommées et moyennées. La figure 41 présente l'effet du moyennage temporel sur le signal enregistré au bolomètre (60,80) du système sous perfusion. On peut voir sur cette figure que les fluctuations thermiques plus rapides sont ainsi minimisées. En fait elles sont minimisées en suivant le théorème central limite qui stipule que le bruit, si les statistiques répondent à une distribution normale, diminue de façon inversement proportionnelle au nombre de mesures sur lesquelles on moyenne. Ce qui est présenté est le résultat du moyennage sur des groupes de 10 images successives. La NETD enregistrée à ce bolomètre passe de 3,5 mK à 2,8 mK. La diminution de bruit est plus faible que l'inverse de la racine de 10 étant donné que les fluctuations du système ne sont uniquement le résultat de la nature aléatoire du bruit. On peut aussi remarquer que la fréquence d'acquisition est passée de 30 Hz à 3 Hz, rendant impossible d'observer des phénomènes plus rapides qu'à une fréquence de 3 Hz. Ainsi, plus le phénomène à observer est lent, plus cette méthode est adéquate.



a) sans moyennage temporel



b) avec moyennage temporel

**Figure 41.** Représentation de l'effet du moyennage temporel sur un signal thermique. Le graphique en a) présente le signal thermique sans moyennage temporel (à 30 Hz) et le graphique en b) présente le résultat du moyennage temporel sur 10 images successives (à 3Hz).

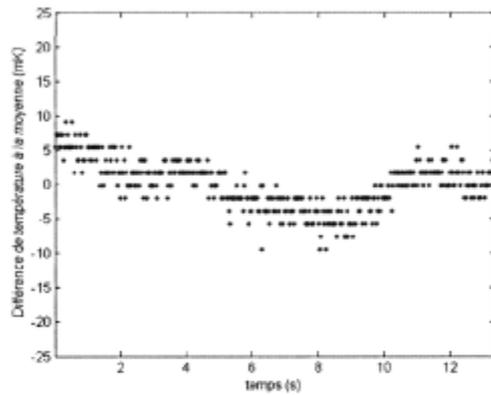
#### 4.3.1.2. Moyennage de séquences complètes entre elles

Dans le cas où un événement peut être déclenché et répété de façon précise dans le temps, il peut être intéressant d'effectuer un moyennage sur des séquences complètes. Cette fois sans perte de fréquence d'acquisition, il est possible d'améliorer le bruit thermique (la NETD), mais cette technique est déployable uniquement pour des expérimentations bien précises. La figure 42 présente l'effet du moyennage, pour le bolomètre (60,80), de respectivement 1 (sans moyennage), 2, 5, 10 et 20 séquences. Les NETD calculées pour

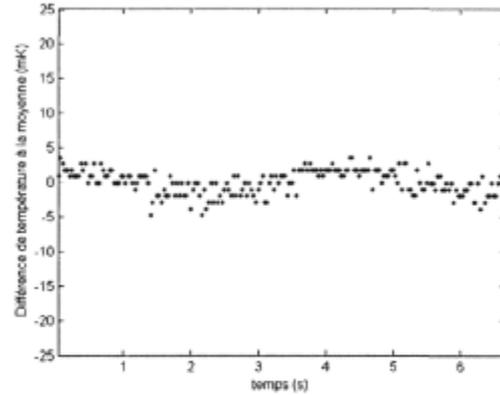
chacun de ces traitements sont présentées au tableau 10. On peut voir qu'il y a une nette amélioration de la résolution thermique avec l'augmentation du nombre de séquences. Le moyennage de 20 séquences permet de diminuer la NETD à 0,38 mK.

Nombre de séquences	NETD <sub>60,80</sub> mK
1 (sans moyennage)	3,5
2	1,7
5	0,75
10	0,55
20	0,38

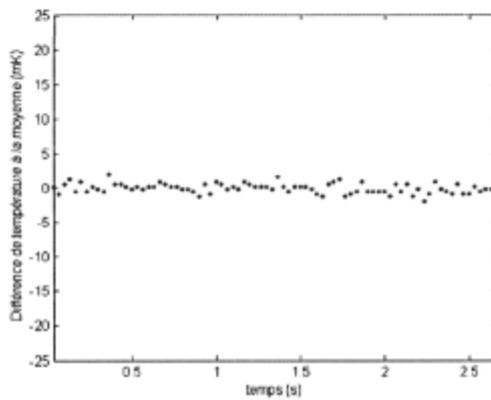
**Tableau 10.** Valeurs de la NETD au bolomètre (60,80) obtenues suite au moyennage sur un certain nombre de séquences distinctes.



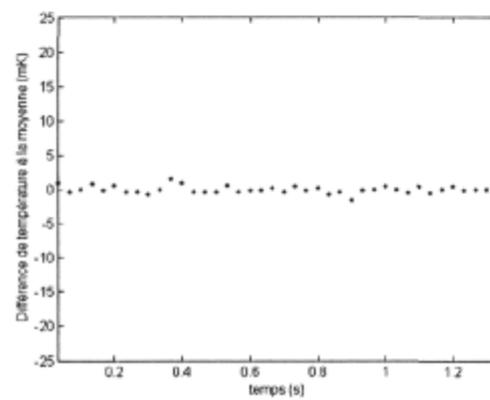
a) sans moyennage



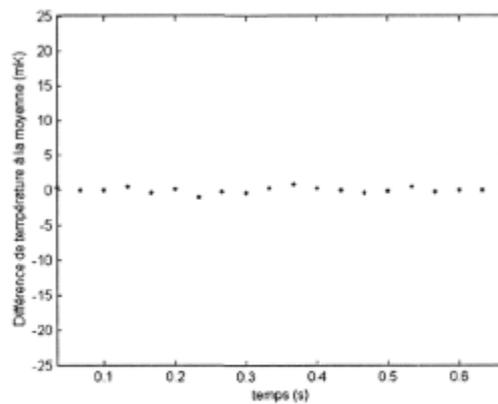
b) 2 séquences



c) 5 séquences



d) 10 séquences



e) 20 séquences

**Figure 42.** Représentation de l'effet du moyennage du signal thermique sur un certain nombre de séquences distinctes. Sont représentés les signaux thermiques a) sans moyennage et avec le moyennage sur b) 2 séquences, c) 5 séquences, d) 10 séquences et e) 20 séquences.

#### 4.3.1.3. Retour sur les méthodes

La mise en oeuvre du moyennage temporel sur des images successives ou le moyennage de séquences entières dépend fortement de l'application et de la vitesse des phénomènes à observer.

Pour ce qui est du moyennage temporel, on peut penser aux études suite à l'induction d'une dépression progressive dans l'hippocampe par la perfusion avec de la ouabaïne. Tel que vu à la section 2.2.4, un tel phénomène se déploie à l'échelle des secondes et même des dizaines de secondes. Il serait donc envisageable de sacrifier une partie de la résolution temporelle de nos mesures au profit d'une augmentation du rapport signal sur bruit.

Comme la réponse maximale lors des études infrarouges in vivo déclenchées par un stimulus était enregistrée 5 à 7 secondes après l'application de celui-ci [35], on peut envisager faire usage du moyennage temporel sur un certain nombre d'images afin d'augmenter le rapport signal sur bruit et ainsi espérer enregistrer l'échauffement thermique relié à la composante métabolique lors d'études in vitro.

Dans le cas du moyennage sur des séquences distinctes, son intérêt est marqué pour une application précise. Le déclenchement de l'activité cellulaire par l'induction dans la tranche d'hippocampe d'une impulsion électrique, ou d'un train d'impulsion, pourrait permettre la mise en place de cette technique. On pourrait ainsi effectuer le même protocole de stimulation électrique à plusieurs reprises successives, en prenant soin de laisser le temps à l'équilibre du système de reprendre place. Tel que mentionné plus haut, on peut s'attendre à ce que la réponse maximale soit déployée après quelques secondes. En supposant que nous laissions 20 secondes entre les stimulations, on peut supposer que l'équilibre thermique dans la tranche est rétabli. Ainsi, en répétant la procédure pendant 30 minutes, on accumulera 90 séquences distinctes acquises à 30 Hz. La NETD pourrait ainsi être améliorée de façon significative, c'est-à-dire d'un facteur près de 10, et un signal qui jusqu'à maintenant était caché dans le bruit thermique pourra ainsi être mis à l'avant-plan.

Il est aussi intéressant de garder en tête que les techniques de moyennage temporel sur des images successives et sur des séquences distinctes pourraient aussi être combinées au besoin. On peut s'attendre à ce que l'effet bénéfique sur la NETD de l'application conjointe de ces méthodes ne serait qu'amplifié comparativement à leur utilisation unique.

On pourrait aussi effectuer un moyennage spatial sur de petites régions, permettant ainsi de maintenir la résolution temporelle intacte. On pourrait par exemple moyenner le signal sur des carrés de 2 détecteurs X 2 détecteurs. La résolution spatiale serait affaiblie d'un facteur 2 (matrice passant de 160 X 120 à 80 X 60), mais le rapport signal sur bruit thermique par pixel serait ainsi augmenté et le signal pourrait devenir discernable du bruit de fond, pour autant que le signal thermique soit présent sur plusieurs pixels lors du moyennage spatial (source de chaleur étendue sur plus d'un pixel). La combinaison de ces diverses techniques de moyennage spatial et temporelles sont une avenue intéressante afin de cibler le signal d'intérêt, soit la signature thermique du métabolisme cellulaire.

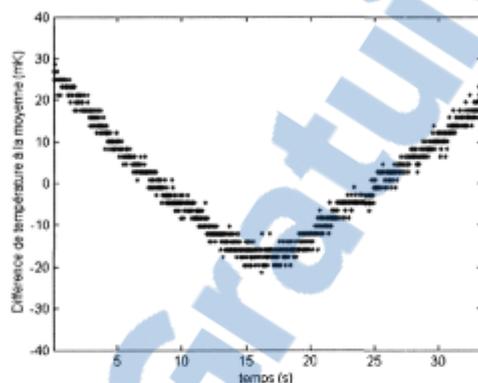
#### **4.3.1.4. Soustraction d'une référence thermique**

Dans le cas où les fluctuations thermiques enregistrées à un bolomètre ou une zone donnée dans le temps sont importantes, il peut être intéressant de soustraire la valeur enregistrée dans une zone à proximité. En effet, on peut s'attendre à ce que les fluctuations thermiques dans le temps de deux zones rapprochées soient semblables. On peut de plus effectuer un moyennage spatial sur une zone de référence composée de plusieurs pixels afin d'en diminuer le bruit thermique. Nous allons appliquer la soustraction d'une référence thermique à l'utilisation d'une perfusion à température plus élevée.

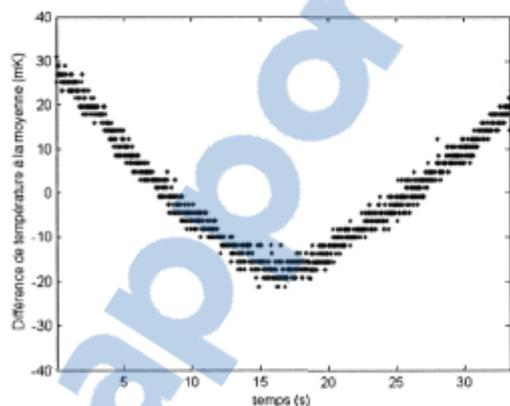
##### *Perfusion à plus haute température*

Nous avons effectué des enregistrements en perfusant un liquide à environ 33°C à la surface du capteur. La figure 43 présente le signal thermique aux bornes d'un bolomètre de coordonnées (60,80). La NETD est alors de 12,4 mK. Tel qu'on pouvait s'y attendre, cette valeur est nettement plus élevée que les mesures effectuées à température ambiante. La figure 44 présente quant à elle le signal enregistré au bolomètre de coordonnées (50,80) et

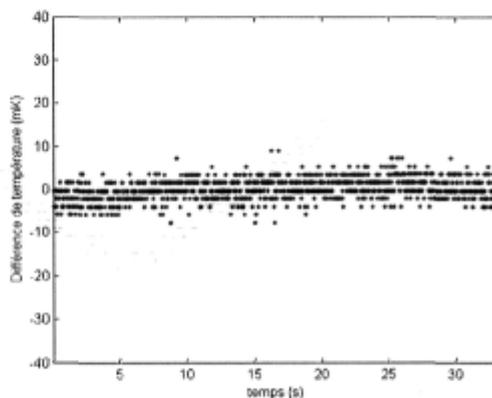
le résultat de la soustraction de ce signal à celui du bolomètre (60,80). On peut voir que l'application de cette technique permet de diminuer considérablement les fluctuations thermiques. De façon plus quantitative, la NETD du signal obtenu suite à ce traitement est alors de 2,5 mK, soit une valeur plus rapprochée des limites physiques du dispositif de thermographie par contact que nous avons développé au cours du présent projet de recherche. Il semble donc impératif de mettre en place un tel traitement afin d'envisager l'utilisation de perfusion à plus hautes températures que la température ambiante.



**Figure 43.** Variation temporelle du signal thermique au bolomètre de coordonnées (60,80) sous perfusion d'un liquide à 33 °C.



a) pixel voisin



b) soustraction d'un pixel voisin

**Figure 44.** Effet de la soustraction du signal au pixel (50,80), présenté en a), du signal au pixel (60,80). Le résultat de la soustraction est présenté en b).

#### **4.4. Considérations pratiques**

À la lumière de ce qui a été présenté lors des dernières sections, les aspirations initiales de réussir à enregistrer les variations de température reliées à l'activité métabolique cellulaire semblent de plus en plus fondées. La résolution thermique du capteur, sous perfusion d'une tranche d'hippocampe à température ambiante est de  $(2,7 \pm 0,4)$  mK. Cette valeur est de l'ordre de grandeur des échauffements que l'on peut s'attendre à enregistrer. Par l'utilisation d'une technique de réduction du bruit, ou d'une combinaison de ces techniques, il semble que cette résolution peut être améliorée de façon significative, permettant ainsi d'enregistrer des variations plus faibles. Nous avons présenté ici des applications d'intérêt avec ces techniques de traitement du signal, et nous les expliciterons un peu plus ultérieurement (voir section 6).

## 5. Applications du dispositif en neurobiologie

Les derniers mois de la maîtrise ont été utilisés à la mise au point du montage pour des applications en neurobiologie. Il s'agissait pour moi de l'apprentissage de diverses techniques utilisées en neurobiologie. La préparation de tranches, de solutions de perfusion et les techniques utilisées en électrophysiologie sont parmi les connaissances que j'ai pu acquérir. C'est aussi à moi que revenait la responsabilité de mettre sur pied le montage permettant d'effectuer les mesures de potentiel de champs et tout ce qui entoure le projet de recherche. Bien que tout cela demandait du temps, il s'agissait d'une expérience très formatrice pour moi dans le domaine de la biologie et des neurosciences, étant donné ma formation d'ingénieur physicien. À l'intérieur de la présente section, nous commencerons d'abord par présenter le montage mis sur pied en vue d'applications neurobiologiques, pour ensuite présenter les protocoles utilisés et dont l'utilisation sera nécessaire lors de développements futurs. Nous présenterons finalement les résultats préliminaires obtenus suite aux premières manipulations.

### 5.1. Matériel et méthode

#### 5.1.1. Électrophysiologie

Des techniques standard d'enregistrement extracellulaire de potentiels de champs ont été utilisées. Les microélectrodes étaient fabriquées à partir de capillaires de verre de 1,5 mm de diamètre extérieur. Leur résistance était généralement entre 6 et 12 M $\Omega$  lorsque remplies avec la solution de perfusion. Les potentiels étaient mesurés à l'aide d'un amplificateur extracellulaire ER-1 de *Cygnus Technology*. Le signal était enregistré en configuration différentielle avec une électrode métallique dans le bain et celle de verre dans la tranche. Le signal pouvait être filtré à même l'amplificateur. Ce dernier était relié à une carte d'acquisition *National Instruments* PCI-6024E. Cette carte, reliée à un ordinateur (logiciel *WinWCP*), contrôlait à la fois l'enregistrement et la stimulation. La carte *National Instruments* permettait de contrôler le moment auquel la stimulation était émise alors que le

générateur de signaux (*WPI* 1831) déterminait la stimulation envoyée à l'unité d'isolation de stimulus (*WPI* A360) et dans la tranche par une électrode bipolaire métallique (*FHC* CBAPC 75). Le placement des électrodes dans la tranche était facilité par l'utilisation d'un binoculaire surplombant le montage.

### **5.1.2. Solutions**

La solution de perfusion aCSF régulière contenait 124 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1,25 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 26 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM de glucose et 1,5 mM de CaCl<sub>2</sub>. La solution utilisée pour induire des dépressions progressives dans la tranche était composé de la solution aCSF régulière et de 100 µM de ouabaïne.

### **5.1.3. Tranches**

Les tranches d'hippocampe, d'une épaisseur de 250 à 400 µm étaient préparées quotidiennement à partir de rats âgés de 2 à 4 semaines. Les tranches étaient maintenues dans une solution d'aCSF aérée avec du carbogène (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) pendant au moins une heure à température ambiante avant les expérimentations. Les tranches étaient perfusées lors des expérimentations avec du aCSF à partir d'un système par gravité. Au besoin, le liquide de perfusion était chauffé à température contrôlée tout juste avant l'entrée dans la chambre (*Warner Instruments* TC-324B, SH-27B). La température à la surface du capteur était contrôlée par le potentiomètre du dispositif de thermographie. Les tranches étaient tenues en place par des platines prévues à cette fin.

### **5.1.4. Imagerie thermique**

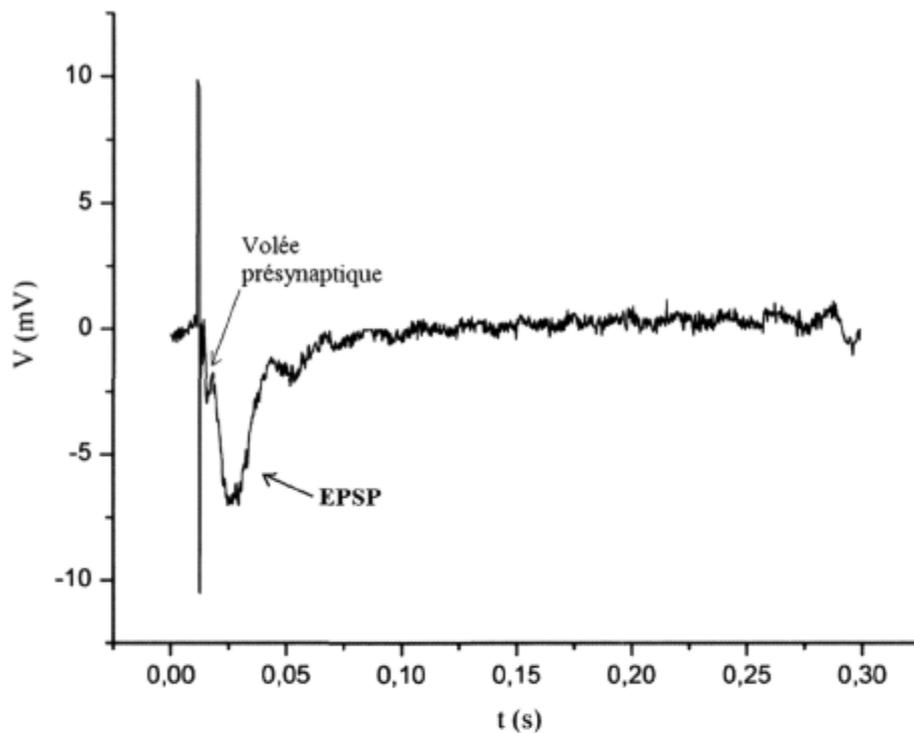
L'imagerie thermique s'effectuait à l'aide du dispositif de thermographie par contact développé au cours du présent projet de recherche. Les données en sortie du dispositif de thermographie par contact sont transmises à un ordinateur portable. Cela s'effectue par le biais d'un câble camera-link et d'une carte Framelink de la compagnie *Imperx*.

## 5.2. Applications

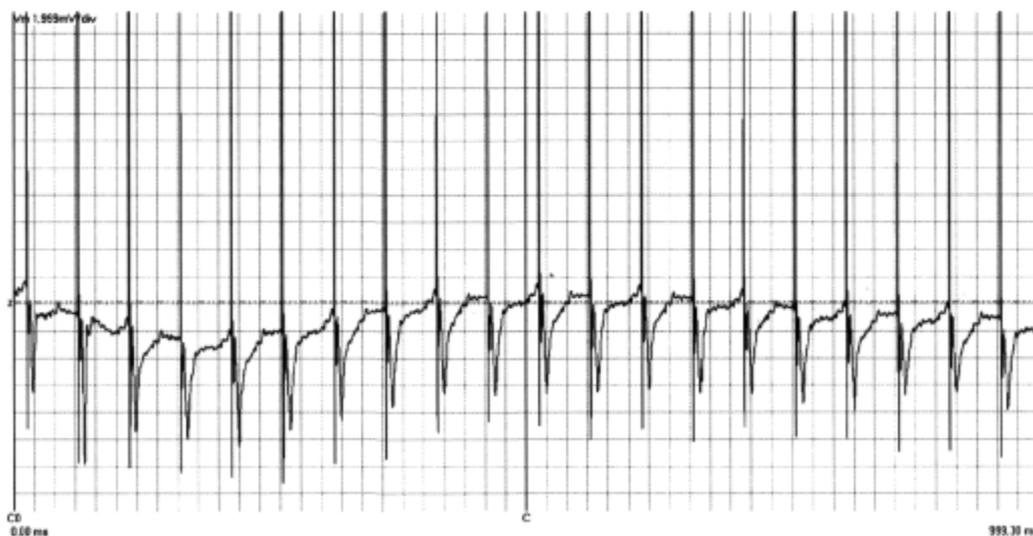
### 5.2.1. La chaleur comme signature de l'activité métabolique

La première application qui a été pensée et mise en oeuvre consistait à utiliser la chaleur comme un indice de l'activité métabolique. Tel qu'expliqué précédemment, l'activité cellulaire libère de la chaleur, et c'est cette chaleur qu'on a tenté d'enregistrer. Malheureusement, il nous a jusqu'à maintenant été impossible d'enregistrer un signal thermique directement relié à l'activité cellulaire. Or cela ne veut pas dire que c'est impossible, mais plutôt que le système utilisé se devait de subir quelques modifications. Il sera aussi important de mettre en place les techniques d'amélioration du rapport signal sur bruit discutées à la section 4.3.1. Bien qu'aucune conclusion ne puisse être tirée des résultats obtenus jusqu'à maintenant, nous ferons ressortir les techniques utilisées et les modifications qui ont été apportées au montage expérimental afin d'optimiser la mesure.

L'enregistrement de potentiels de champs extracellulaires dans la tranche permet d'en vérifier la viabilité. Cela permet aussi de confirmer l'induction d'activité et d'enregistrer le comportement moyen des cellules. La figure 45 montre un potentiel de champs extracellulaire en réponse à une stimulation unique. On peut y remarquer de façon distincte la forme de la volée pré synaptique et du potentiel exciteur post synaptique (EPSP). La figure 46 montre l'enregistrement effectué lors d'induction de stimulations à 20 Hz. La volée pré synaptique et l'EPSP y sont encore présents. En parallèle à ces enregistrements électrophysiologiques, nous avons tenté d'enregistrer le signal thermique. Les activités électrique et métabolique des cellules n'étant pas directement reliées, on s'attend à ce que le comportement temporel thermique soit bien différent de celui électrique. On peut supposer, tel que discuté précédemment (voir section 2.4), que la réponse métabolique est plus lente que la réponse électrique. Des échauffements cérébraux sur des secondes ont été enregistrés in vivo par d'autres groupes de recherche [41].



**Figure 45.** *Potentiel de champs enregistré dans l'hippocampe en réponse à une stimulation unique.*



**Figure 46.** *Potentiel de champs enregistré dans l'hippocampe en réponse à une stimulation à 20 Hz.*

Afin d'induire et enregistrer une émission de chaleur dans la tranche, nous avons effectué diverses stimulations. Nous avons effectué des stimulations simples ou des trains de stimulation de diverses fréquences et séparés de délais différents (généralement autour de 20 secondes). Nous avons aussi mis de l'avant les protocoles de stimulation utilisés par Moser et Mathiesen [41] lors d'études sur l'hippocampe de rat. Il s'agissait de stimuler à 5 Hz, 10 Hz ou 20 Hz pendant quelques minutes à l'aide de stimuli d'une période de 100  $\mu$ s et d'amplitude  $\sim$ 1 mA. Les expérimentations ont été effectuées à température de la pièce afin de minimiser les fluctuations de température dans le liquide de perfusion. Il nous a par contre été impossible jusqu'à maintenant d'enregistrer un signal thermique d'intérêt. C'est suite aux premières expérimentations que le logiciel d'acquisition a dû être modifié pour permettre une visualisation du signal et un enregistrement à 30 Hz. C'est aussi avec ces premières expérimentations que le montage a été mis au point.

Nous avons tout de même émis certaines hypothèses qui pourraient permettre d'optimiser nos chances d'enregistrer un signal. Comme il s'agit d'un système de détection par contact, nous en sommes venu à la conclusion qu'il fallait utiliser un flux de perfusion de l'ordre de 1 à 2 mL/minute afin de minimiser la création d'un filet d'eau sous la tranche. Dans le même ordre d'idée, il est important que le niveau de liquide dans le dispositif soit à peine plus élevé que l'épaisseur de la tranche, facilitant ainsi le contact entre la tranche et la surface de détection. L'utilisation d'une platine courbée avec un filet de nylon a aussi été mise en place afin d'assurer le contact. Il est impératif de porter attention à chacune de ces stratégies afin d'assurer le contact entre la tranche et le capteur. Il s'agit d'une étape cruciale pour permettre l'enregistrement de la chaleur émise par l'activité cellulaire. C'est de façon expérimentale que ces diverses considérations ont posé leurs bases lors de la mise au point du montage.

On ne peut donc pas tirer de conclusions claires quant à la libération de chaleur lors de ces expérimentations. On croit plutôt que les conditions d'expérimentations n'étaient pas assez contrôlées. Le nombre d'expérimentations effectuées a de plus été restreint par la défektivité du dernier capteur et l'impossibilité d'en obtenir un autre rapidement. Il est aussi impératif de mettre en place les techniques d'amplification du rapport signal sur bruit.

Nous y reviendrons plus loin, mais il serait intéressant de sommer les réponses à un stimulus donné (impulsion seule ou un train). Il serait par contre important d'attendre un temps suffisamment long entre les stimuli afin de permettre à l'équilibre de départ de se remettre en place. Nous proposons, à titre indicatif ici, un délai de 20 secondes entre les stimulations, mais cette valeur se devra d'être validée. Ainsi, les stimulations s'effectueraient à un rythme de 3 stimulations par minute. Un enregistrement sur 7 minutes permettrait donc un moyennage temporel sur 21 séquences, entraînant ainsi, en tenant compte de ce qui a été présenté à la section 4, une diminution du bruit d'un facteur d'environ 10. Le rapport signal sur bruit se verrait augmenté du même facteur, car on peut s'attendre à ce que la réponse cellulaire reste la même sur cette plage de temps. Il sera très intéressant d'évaluer le nombre de stimulations successives pouvant être effectuées tout en maintenant une viabilité des cellules dans la tranche. Cela aura des conséquences sur la résolution thermique maximale du système avec l'ajout du post-traitement. Il sera aussi intéressant d'améliorer le système de contrôle thermique afin de permettre une perfusion de liquide à des températures physiologiques, soit à plus de 30°C. La dynamique à l'intérieur de la tranche se voulant différente en fonction de la température, il sera intéressant d'étendre la gamme des températures d'opération. Par contre, il est important de noter qu'il a été vérifié au cours de cette étude, à l'aide des méthodes électrophysiologiques, qu'une activité existe à température ambiante et qu'il est ainsi valable de tenter d'effectuer les premières mesures thermiques à cette température, étant donné que les fluctuations thermiques y sont moindres. Une autre application du dispositif de thermographie a aussi été pensée et mise en place lors des dernières semaines d'expérimentation de ma maîtrise.

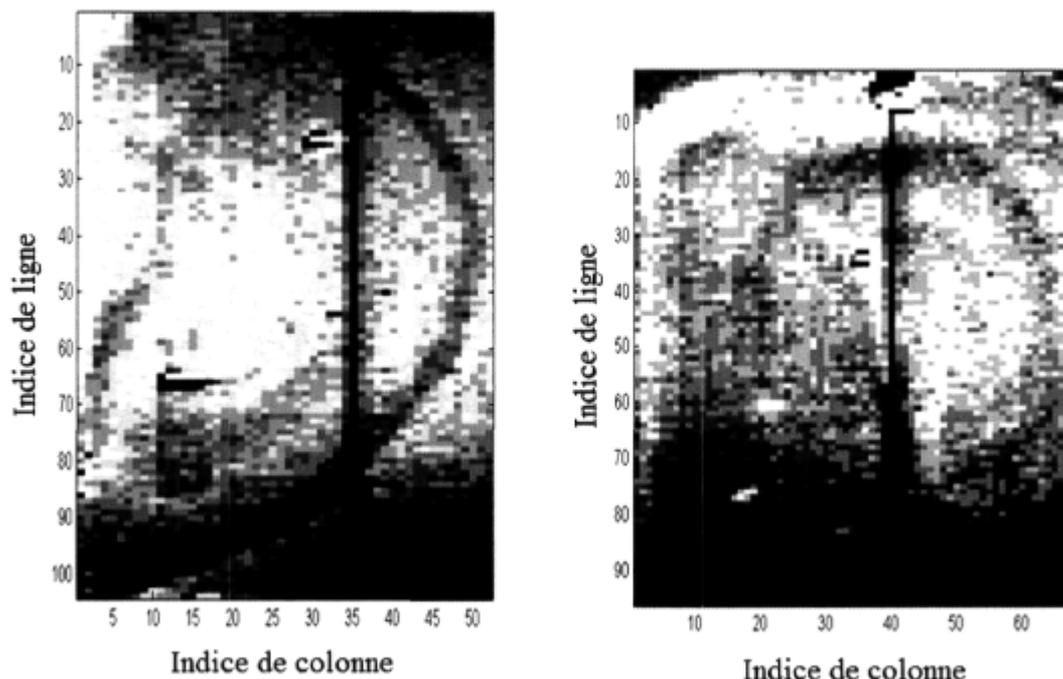
### **5.2.2. Étude des changements physiologiques dans un tissu biologique**

Basé sur les études portant sur la variation de l'activité optique intrinsèque à l'intérieur de tranches d'hippocampe de rat [3-7, 16, 23], il a été décidé d'effectuer des études similaires, mais cette fois-ci basées sur la transmission thermique dans la tranche. On produit de la chaleur sur le dessus de la tranche, et on enregistre au-dessous de celle-ci les variations thermiques occasionnées. Comme la composition de la tranche est

hétérogène, on peut s'attendre à ce que le flux thermique soit différent en divers points de celle-ci. La diffusivité thermique varie en fonction de la densité, la conductivité et la chaleur spécifique dans la tranche (voir section 2.3.2). Les variations de composition se répercutant sur certains de ces facteurs, c'est pourquoi on peut s'attendre à obtenir une image représentative de la composition de la tranche.

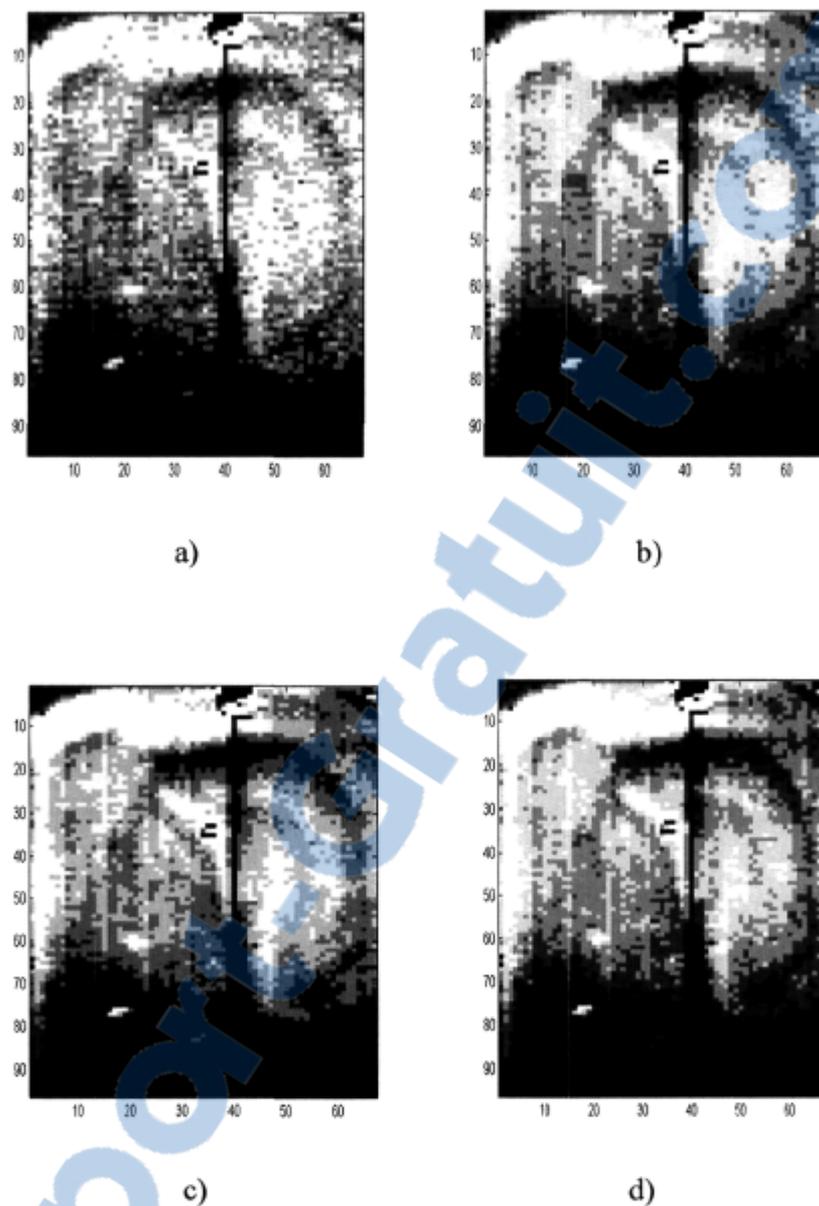
La chaleur au-dessus de la tranche a été induite par une diode électroluminescente (LED) placée à proximité. Celle-ci était contrôlée par l'utilisation d'un ordinateur et d'un générateur de fonction, tel que pour la stimulation électrique. La tranche pouvait ainsi être chauffée durant un temps donné, puis laisser au repos afin qu'elle retrouve l'équilibre. La stratégie adoptée était d'abord de valider cette technique en effectuant des enregistrements sur des tranches d'hippocampe de rat. Par la suite, on voulait induire des changements physiologiques dans la tranche par l'induction d'une dépression progressive (« spreading depression »), tel que dans les études d'activité optique intrinsèques effectuées par Basarsky et al. [23]. La dégradation du dernier capteur disponible et l'impossibilité d'en développer un autre rapidement a par contre dû mettre un terme à cette procédure avant de l'avoir complétée. On présentera ici les premiers résultats.

Les études ont été effectuées sur des tranches d'hippocampe d'une épaisseur de 250 à 400  $\mu\text{m}$ . La figure 47 présente des images enregistrées lors d'un échauffement de 250 ms. On peut discerner sur cette image certaines structures de l'hippocampe, tel que les collatérales de Schaffer. À noter que les lignes verticales noires correspondent à un défaut du capteur.



**Figure 47.** Enregistrement en transmission thermique sur l'hippocampe de rat. La ligne verticale noire correspond à un défaut du capteur. (Chaque ligne et colonne a une dimension réelle de  $52 \mu\text{m}$ ).

Les images étaient enregistrées à 30 Hz tout au long de l'expérimentation. Cet enregistrement était répété de façon continue, avec un délai d'une seconde entre chaque échauffement. En enregistrant plusieurs images similaires, on a pu effectuer le moyennage de celles-ci afin d'augmenter le contraste entre le signal et le bruit de fond, tel que décrit précédemment. La figure 48 présente l'effet sur l'image qu'a le moyennage. Des moyennages sur 1, 12, 24 et 47 images y sont présentés. On peut voir que le moyennage sur un plus grand nombre d'images permet d'obtenir une image résultante plus claire, avec moins de granularités. Certaines structures spécifiques y sont ainsi mieux définies. Ces diverses images démontrent donc que l'on peut observer les différences de composition à l'intérieur de la tranche par l'imagerie thermique par contact. On s'est ensuite intéressé à l'induction de changements physiologiques à l'intérieur de cette structure.

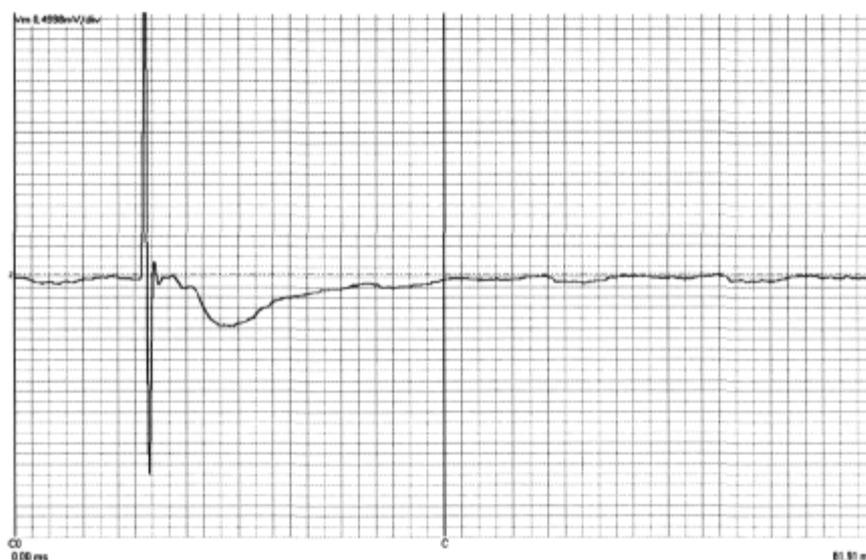


**Figure 48.** Effet du moyennage de plusieurs images sur la résultante  
 ( a)1 image, b)12 images, c)24 images, d)47 images ).  
 (Chaque ligne et colonne a une dimension réelle de  $52 \mu\text{m}$  ).

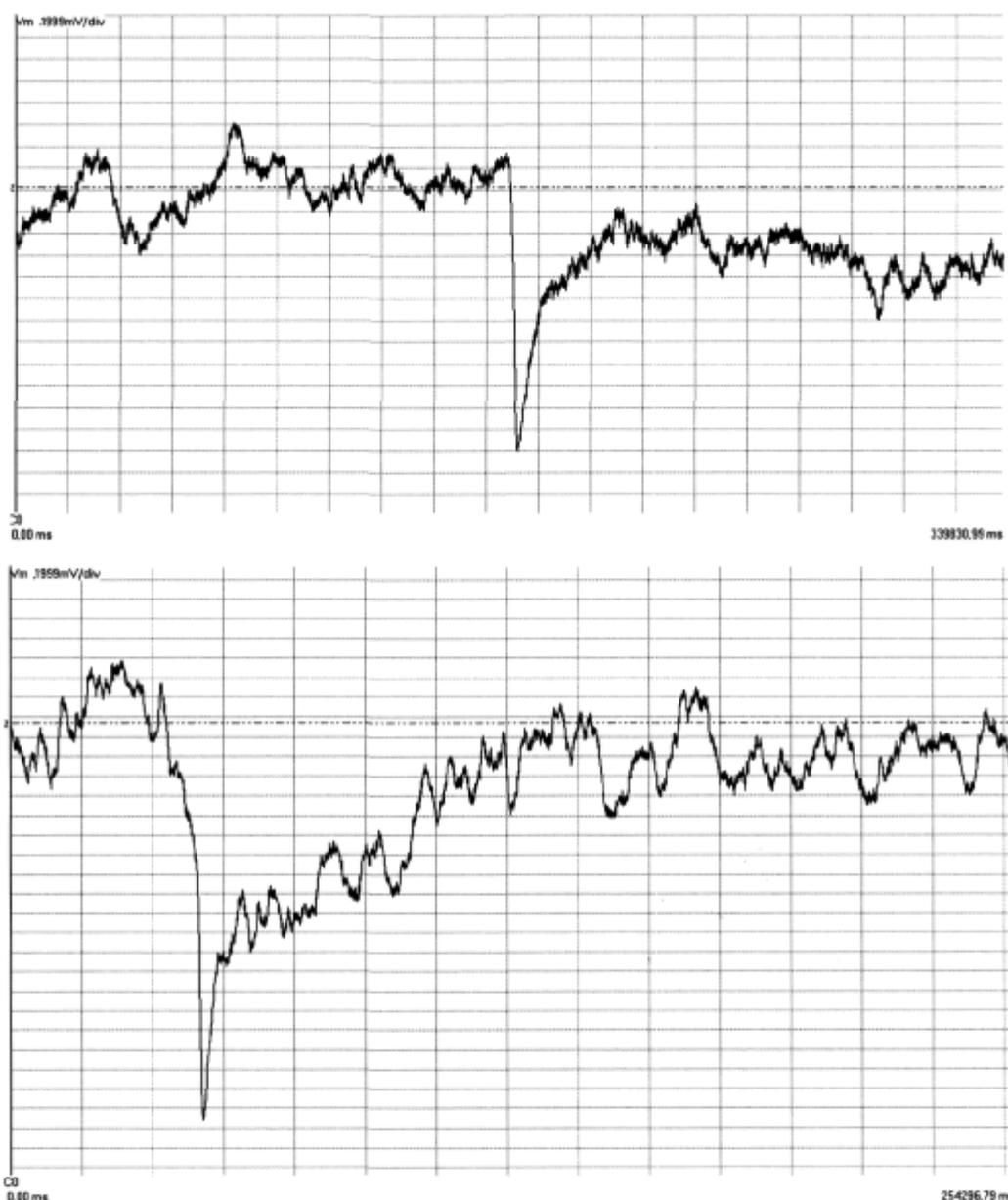
Pour ce faire, on a tenté d'induire une dépression progressive par l'ajout de ouabaïne à une concentration de  $100 \mu\text{M}$  à l'intérieur du liquide de perfusion, tel que décrit dans la littérature scientifique [23, 24]. La dépression progressive entraînant des gonflements cellulaires, on pouvait s'attendre à ce que ces changements physiologiques se

répercutent sur la transmission thermique des cellules touchées. On pourrait ainsi étudier l'effet de l'induction de dépression progressive dans le temps.

Avant de procéder aux enregistrements thermiques, il importait de valider l'effet de la ouabaïne dans la tranche d'hippocampe. Pour ce faire, on a inséré une électrode d'enregistrement dans le CA1 avant de procéder à la perfusion du liquide avec la ouabaïne. On a vérifié la viabilité de la tranche en enregistrant un potentiel de champs extracellulaire suite à une stimulation unique (voir figure 49). En filtrant le signal à 1 kHz uniquement (l'autre filtre étant en DC) on a enregistré le potentiel de champs extracellulaire dans cette structure suite à la perfusion avec de la ouabaïne. La figure 50 présente quelques enregistrements. Après un certain temps (quelques minutes), on peut observer une dépolarisation rapide et importante. Bien que le potentiel remonte progressivement, un certain niveau de dépolarisation reste toutefois soutenu. En effet, le potentiel ne revient pas à son niveau initial. Les autres fluctuations sont inhérentes au bruit électrique. Comme aucun filtre passe-bas n'était utilisé, il est normal que le bruit soit difficile à éliminer. Ces diverses observations sont semblables à celles effectuées par Basarsky et Balestrino [23, 24] pour décrire l'effet de la dépression progressive par la perfusion de ouabaïne. Cela vient donc confirmer que l'induction de la dépression progressive dans la tranche par la ouabaïne avec notre système est efficace.



**Figure 49.** Vérification électrophysiologique de la viabilité de la tranche.



**Figure 50.** Enregistrements électrophysiologiques dans le CA1 suite à la perfusion de ouabaïne. La perfusion de ouabaïne débutait 30 secondes avant l'enregistrement.

Malheureusement, c'est lorsqu'on a tenté d'effectuer des mesures de variation thermique avec le dispositif de thermographie par contact que le dernier capteur disponible s'est dégradé et qu'il est devenu inutilisable. Comme il était impossible d'en obtenir un autre dans les délais désirés, nous avons dû mettre un terme à cette expérience. Lorsqu'un

nouveau capteur sera disponible, lors de travaux futurs, on pourra effectuer les dernières manipulations restantes afin de valider cette nouvelle application du dispositif de thermographie par contact. On verra, à la section suivante, après avoir fait un retour sur tout ce qui a été accompli dans la présente maîtrise, les travaux de recherche futurs qui sont envisagés à l'aide du dispositif de thermographie par contact développé au cours de ma maîtrise, en fonction de ce qui a été observé jusqu'à maintenant.

## 6. Ouverture et conclusion

Le présent projet de maîtrise avait pour but le développement et la mise en place d'un dispositif de thermographie par contact dans le but d'envisager son utilisation pour des études en neurobiologie. S'agissant d'un sujet nouveau pour le groupe de recherche du professeur Yves De Koninck, on a dû, au cours du projet de recherche, poser les bases théoriques à certaines de nos hypothèses de départ.

À partir de fondements théoriques, on a été capable de déterminer le taux d'échauffement moyen envisagé dans une tranche d'hippocampe. L'échauffement attendu est de 4,7 à 8,3 mK/s, selon la présence ou non d'une stimulation électrique. En effet, il semble que la stimulation électrique facilite la réponse thermique d'un système biologique [34]. Il s'agit d'un échauffement pour une activité cellulaire moyenne, et il semble raisonnable d'envisager un échauffement plus élevé dans les foyers d'activité cellulaire. L'induction de certains phénomènes physiologiques, tel que l'épilepsie (ou l'induction de dépressions progressives), devrait permettre d'augmenter l'activité métabolique dans la tranche. Rappelons qu'il a été rapporté dans le passé une élévation de l'activité métabolique de 160 % à l'intérieur de foyers épileptiques [34, 36].

Le dispositif de thermographie développé au cours de la présente étude est évolué de capteurs infrarouges. Un procédé de renforcement mécanique a permis de construire un capteur par contact [49]. Il a fallu modifier celui-ci de façon à ce qu'il permette l'utilisation de liquides, car les études *in vitro* en neurobiologie nécessitent une perfusion de liquide à travers la tranche. Il a fallu s'assurer que l'électronique d'acquisition était bien protégée des liquides utilisés. Il a aussi été nécessaire de procéder au dépôt d'une couche supplémentaire d'un matériau imperméable et permettant une réponse stable du capteur. Les capteurs utilisés pour effectuer les premières études présentées dans ce mémoire ont reçu à la surface de détection le dépôt d'une couche de 1  $\mu\text{m}$  de polyimide. Ceux-ci permettaient un fonctionnement adéquat, mais ont présenté une dégradation à plus long terme. C'est suite à l'observation de cette dégradation que le dépôt d'une couche de Teflon AF a commencé à

être évalué. Les caractéristiques observées du Teflon semblent adéquates pour les besoins du projet. Les spécifications pour le dépôt de Teflon étant méconnues, il a fallu mettre sur pied et caractériser un procédé de fabrication et de dépôt. Ces travaux sur le Teflon seront poursuivis ultérieurement à la présente maîtrise.

Le capteur avec du polyimide a donc été caractérisé afin d'en évaluer les caractéristiques et performances à l'intérieur du dispositif de thermographie, et sous certaines conditions. Ainsi, une étude du bruit, de la fonction de transfert (SiTF) et de la différence de température équivalente au bruit (NETD) a été réalisée sous diverses conditions. Dans le cas où une tranche en contact avec le capteur était perfusée par un liquide à température ambiante, la NETD obtenue sur la moyenne des bolomètres constituant la matrice de détection était de  $(2,7 \pm 0,4)$  mK. Le taux d'échauffement calculé théoriquement dans la tranche était entre 4,7 et 8,3 mK/s. C'est donc l'aspect temporel de la réponse métabolique cellulaire qui définit si on peut s'attendre ou non à pouvoir enregistrer un signal thermique d'intérêt à l'aide de notre dispositif. Lors d'études in vivo [35], des hausses de température progressives ont été enregistrées suite à l'application d'un stimulus fonctionnel. La température maximale était enregistrée de 5 à 7 secondes après celui-ci. Bien que cet échauffement soit fortement influencé par les fluctuations thermiques inhérentes à la réponse sanguine, on peut supposer que l'aspect temporel de l'échauffement dû à l'activité métabolique est de l'ordre des secondes, la variation du flux sanguin étant une conséquence de l'échauffement causé par l'activité métabolique. Il semble donc, en vertu des ordres de grandeur en jeu, que l'utilisation d'un système de mesure thermique de la résolution thermique de celui développé durant la présente maîtrise devrait être assez sensible pour enregistrer les échauffements lors d'études in vitro, reliés uniquement à l'activité métabolique cellulaire.

Les premières études thermiques à l'aide du capteur n'ont toutefois pas permis d'enregistrer un signal d'intérêt. Or, on ne peut tirer de conclusions claires à partir de cela, car ces premières expérimentations ont surtout servi à optimiser le montage et mettre au point les techniques. La dégradation du dernier capteur utilisé et l'impossibilité d'en produire rapidement un autre a de plus limité le nombre d'expérimentations effectuées.

Parmi les aspects du montage auxquels il faut porter une attention particulière, il y a le taux de perfusion et l'utilisation d'une platine. La perfusion à un taux plus faible semble être avantageuse afin de minimiser les possibilités d'intrusion d'un filet d'eau entre la tranche et le capteur. C'est dans ce même ordre d'idée qu'une platine avec des fils de nylon doit être utilisée, c'est-à-dire pour maintenir la tranche à plat. Ces études m'ont aussi permis de me familiariser avec les mesures électrophysiologiques. L'enregistrement de potentiels de champs extracellulaire permet de vérifier la viabilité de la tranche ainsi que l'efficacité de la stimulation électrique. La réponse métabolique différant de l'activité électrique, on peut tout de même supposer qu'une cellule active électriquement devrait être aussi plus active du point de vue de son métabolisme. La stimulation électrique pouvant être contrôlé dans le temps, on peut envisager la mise en place de protocoles permettant le déploiement des techniques d'optimisation du rapport signal sur bruit présentées dans le présent document (voir section 4.3.1).

En répétant un même protocole de stimulation dans le temps, la réponse thermique pourra ensuite être sommée. Il importe toutefois de laisser le temps au système de revenir à l'équilibre thermique. Nous proposons ici un délai de 20 secondes entre les stimulations si celles-ci sont relativement courtes ou sur un délai plus long dans le cas d'impulsions ou de trains de stimulation sur un temps plus important (de l'ordre de la minute tel que proposé par Moser et Matthiesen [41]). Prenons l'exemple ici d'une stimulation électrique unique (1mA, 150  $\mu$ s) répétée aux 20 secondes. La stimulation et l'enregistrement sur une période de 10 minutes permettra alors la sommation de 30 séquences distinctes dont on peut supposer que le comportement thermique sera similaire. Ce moyennage sur des séquences distinctes permettra de diminuer de façon significative le bruit du signal résultant par rapport au signal d'intérêt. Permettant ainsi l'amplification du rapport signal sur bruit par un facteur d'au moins 10 (voir tableau 10). Les valeurs proposées ici sont à titre indicatif seulement. Il semble raisonnable d'envisager un nombre de séquences plus grand. Étant donné la compatibilité et la complémentarité du dispositif de thermographie avec les mesures électrophysiologiques, l'enregistrement des potentiels de champs extracellulaires permettra de vérifier la présence d'activité cellulaire et la viabilité de la tranche. Tant et aussi longtemps que l'activité cellulaire est présente et de même amplitude, nous pourrons

continuer à acquérir des séquences qui pourront être moyennées lors du post-traitement. Comme on peut s'attendre à ce que les effets observables aient une fréquence plutôt faible, le moyennage temporel pourra aussi être mis en place en parallèle au moyennage sur des séquences complètes. Comme il s'agit d'une hypothèse sur la fréquence, je propose toutefois que les travaux ultérieurs mettent d'abord uniquement en place le moyennage sur des séquences afin de ne pas perdre l'information reliée à des signaux métaboliques qui seraient plus rapides qu'anticipé. Dans le cas où on utiliserait un train de stimulation à 20 Hz sur quelques minutes, tel que proposé par Moser et Matthiesen [41] lors d'études *in vivo*, le temps entre l'induction de chacun des protocoles de stimulation devrait être allongé. Supposons que nous stimulions pendant une minute, nous proposons ici, à titre indicatif, d'attendre 9 minutes entre chacune des stimulations. Il ne serait ainsi possible que de sommer 6 séquences sur un enregistrement d'une heure. Or, il se peut que la réponse thermique à ces taux de stimulation soit plus importante. Il s'agit donc de 2 méthodes distinctes que nous proposons d'utiliser lors d'études ultérieures à la présente maîtrise.

Il serait aussi intéressant d'étudier les effets sur l'enregistrement thermique de l'induction d'une dépression progressive dans la tranche d'hippocampe. Nous avons proposé et vérifié au cours des premières études expérimentales l'induction d'une onde de dépression progressive par la perfusion de la tranche d'hippocampe avec de la ouabaïne, mais d'autres protocoles d'induction existent [23].

En plus de sa complémentarité avec d'autres méthodes de mesures, le dispositif de thermographie démontre une certaine polyvalence quant à ses applications. Inspirés par les études optiques effectuées en transmission et en réflexion (voir section 2.2), nous avons mis en place un système pour étudier les changements physiologiques par le biais de la différence en diffusivité thermique des structures de composition différente. La diffusivité thermique étant fonction de la conductivité thermique, de la densité et de la chaleur spécifique, on peut s'attendre à ce que la chaleur dans la tranche soit transmise selon une dynamique différente pour des compositions distinctes. C'est par l'induction sans contact d'une onde thermique au-dessus de la tranche et par l'enregistrement au bas de celle-ci de la variation de température, dans le temps, que la différence spatiale de transmission

thermique peut être étudiée. Cela a été vérifié au cours de nos premières études (voir section 5.2.2). Nous avons tenté d'étudier les changements temporels de diffusivité thermique suite à l'induction d'une dépression progressive (« spreading depression »), mais la détérioration du dernier capteur disponible a rendu impossible cette mesure. Il a été vérifié qu'une dépression progressive a été induite par l'enregistrement du potentiel de champs. La dépression progressive est un phénomène relativement lent dont l'effet majeur se produit sur des dizaines de secondes [23, 24]. Le moyennage temporel sera donc tout indiqué pour l'étude d'un tel phénomène, tant du point de vue des études physiologiques que métaboliques.

Pour la poursuite du projet de recherche suite à la présente maîtrise, il sera impératif de produire un nouveau capteur. Comme le capteur avec du polyimide montre une dégradation progressive avec le temps, il pourra être intéressant de finaliser le développement du capteur avec Teflon AF, qui devrait démontrer de bonnes résistance et imperméabilité. Comme le procédé de production d'un capteur avec polyimide est déjà maîtrisé, il sera peut-être plus efficace d'un point de vue temporel d'en produire un en attendant la finalisation du développement de capteurs avec Teflon AF. Par contre, si l'on tient compte de l'aspect financier, il pourra être plus approprié d'attendre la production d'un premier capteur avec Teflon AF avant de procéder à la poursuite des études neurobiologiques avec le montage mis au point durant la présente étude.

Au terme de la présente maîtrise, il nous a donc été possible de produire un dispositif de thermographie par contact permettant l'utilisation de liquides, et dont la résolution thermique est de 2,7 mK lorsqu'utilisé pour des applications sur des tranches perfusées à température ambiante. Le dispositif permet l'acquisition et l'enregistrement d'images thermiques à un taux de 30 Hz et avec une résolution spatiale de 52  $\mu\text{m}$  X 52  $\mu\text{m}$ . Sa compatibilité avec d'autres systèmes de mesure (électrophysiologie, optique, autres) est un atout. Le déploiement de telles mesures n'entre pas en compétition avec les autres techniques, mais démontre plutôt une complémentarité. En fonction des considérations effectuées, il semble que le système développé ait des résolutions adéquates pour cartographier l'activité métabolique cellulaire sur une tranche de tissu et on a fait une

première démonstration qu'il peut être utilisé pour représenter la physiologie de la tranche. Les mises au point effectuées et la mise en place de techniques d'amélioration du rapport signal sur bruit devraient augmenter les chances d'observer un signal thermique d'intérêt lors d'expérimentations futures.

La présente étude s'est limitée aux méthodes non-invasives, c'est-à-dire celles ne nécessitant l'injection d'aucun agent externe. Il pourrait par contre être intéressant, étant donné la complémentarité des méthodes, de mettre en place des mesures par fluorescence afin de relier le comportement des ondes calciques au métabolisme cellulaire et à l'activité électrique. D'autre part, nous avons étudié l'activité cellulaire dans l'hippocampe, mais il pourrait être d'intérêt, lors d'études futures, de s'intéresser à la chaleur émise par les graisses brunes dans le corps, la thermogénèse étant leur fonction principale [37, 38, 51-54]. La présente maîtrise ayant permis de développer un capteur thermique par contact dont les caractéristiques permettent son utilisation pour des études biologiques, les applications potentielles avec celui-ci sont nombreuses.

## Références et bibliographie

1. Johnston, D. and S. Miao-Sin Wu, *Foundations of Cellular Neurophysiology*. 1994. 710.
2. Kandel, E.R., J.H. Schwartz, and T.M. Jessel, *Principles of Neural Science*. 3rd ed. 1991: Elsevier. 1137.
3. MacVicar, B.A. and D. Andrew, *Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice*. *Neuroscience*, 1994. **62**(2): p. 371-383.
4. Aitken, P.G., et al., *Use of Intrinsic Optical Signals to Monitor Physiological Changes in Brain Tissue Slices*. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 1999. **18**: p. 91-103.
5. Andrew, D., C. Jarvis, and A. Obeidat, *Potential Sources of Intrinsic Optical Signals Imaged in Live Brain Slices*. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 1999. **18**: p. 185-196.
6. Andrew, D. and B.A. MacVicar, *Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice*. *Neuroscience*, 1994. **62**(2): p. 371-383.
7. Buchheim, K., et al., *Intrinsic Optical Imaging Reveals Regionally Different Manifestation of Spreading Depression in Hippocampal and Entorhinal Structures in vitro*. *Experimental Neurology*, 2002. **175**: p. 76-86.
8. Buchheim, K., et al., *Processes and components participating in the generation of intrinsic optical signal changes in vitro*. *European Journal of Neuroscience*, 2005. **22**: p. 125-132.
9. Cang, J., et al., *Optical imaging of the intrinsic signal as a measure of cortical plasticity in the mouse*. *Visual Neuroscience*, 2005. **22**: p. 685-691.
10. Cerne, R. and M. Haglund, *Electrophysiological correlates to the intrinsic optical signal in the rat neocortical slice*. *Neuroscience Letters*, 2002. **317**: p. 147-150.
11. Chen, S., et al., *Time-varying spreading depression waves in rat cortex revealed by optical intrinsic optical signals*. *Neuroscience Letters*, 2005.
12. Grinvald, A., et al., *Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals*. *Nature*, 1986. **324**: p. 361-364.
13. Hill, D.K. and R.D. Keynes, *Opacity Changes in Stimulated Nerve*. *Journal of Physiology*, 1949. **108**: p. 278-281.
14. Holthoff, K. and O. Witte, *Intrinsic Optical Signals in Rat Neocortical Slices Measured with Near-Infrared Dark-Field Microscopy Reveal Changes in Extracellular Space*. *The Journal of Neuroscience*, 1996. **16**(8): p. 2740-2749.
15. MacVicar, B.A., et al., *Intrinsic Optical Signals in the Rat Optic Nerve: Role for K<sup>+</sup> uptake via NKCC1 and Swelling of Astrocytes*. *GLIA*, 2002. **37**: p. 114-123.
16. MacVicar, B.A. and D. Hochman, *Imaging of Synaptically Evoked Intrinsic Optical Signals in Hippocampal Slices*. *The Journal of Neuroscience*, 1991. **11**(5): p. 1458-1469.
17. Peixoto, N.L.V., V.M. Fernandes de Lima, and W. Hanke, *Correlation of the electrical and intrinsic optical signals in the chicken spreading depression phenomenon*. *Neuroscience Letters*, 2001. **299**: p. 89-92.

18. Polischuk, T.M. and D. Andrew, *Real-time imaging of intrinsic optical signals during early excitotoxicity evoked by domoic acid in the rat hippocampal slice*. Canadian Journal of Physiological Pharmacology, 1996. **74**: p. 712-722.
19. Ribot, J., et al., *Online analysis method for intrinsic signal optical maging*. Journal of Neuroscience Methods, 2005.
20. Sheth, S., et al., *Evaluation of coupling between optical intrinsic signals and neuronal activity in rat somatosensory cortex*. NeuroImage, 2003. **19**: p. 884-894.
21. Weimer, M.S. and W. Hanke, *Correlation between the durations of refractory period and intrinsic optical signal of retinal spreading depression during temperature variations*. Experimental Brain Research, 2004. **161**: p. 201-208.
22. Lipton, P., *Effects of Membrane Depolarization on Light Scattering by Cerebral Cortical Slices*. Journal of Physiology, 1973. **231**: p. 365-383.
23. Basarsky, T.A., et al., *Imaging Spreading Depression and Associated Intracellular Calcium Waves in Brain Slices*. The Journal of Neuroscience, 1998. **18**(18): p. 7189-7199.
24. Balestrino, M., J. Young, and P. Aitken, *Block of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase with ouabain induces spreading depression-like depolarization in hippocampal slices*. Brain Research, 1999. **838**(1-2): p. 37-44.
25. Serota, H.M. and R.W. Gerard, *Localized Thermal Changes in the Cat's Brain*. J.Neurophysiol, 1938. **1**: p. 115-124.
26. Abrams, R. and H.T. Hammel, *Hypothalamic temperature in unanesthetized albino rats during feeding and sleeping*. Am.J.Physiol., 1964. **206**: p. 641-646.
27. Delgado, J. and T. Hanai, *Intracerebral temperature in free-moving cats*. Am.J.Physiol., 1966. **211**: p. 755-769.
28. McElligott, J.G. and R. Melzack, *Localized Thermal Changes Evoked in the Brain by Visual and Auditory Stimulation*. Experimental Neurology, 1966. **17**: p. 293-312.
29. Jones, B. and F. Ring. *A database of archival infrared thermal imaging in medicine papers*. in *19th International Conference IEEE/EMBS*. 1997. Chicago,IL,USA.
30. Duck, F.A., *Physical properties of tissue, a comprehensive reference book*. 1990, London: Academic Press.
31. Carslaw, H.S. and J.C. Jaeger, *Conduction of Heat in Solids*. 2 ed. 1986: Oxford University Press. 520.
32. Zeschke, G. and V.G. Krasilnikov, *Decreases of local brain temperature due to convection (local brain blood flow) and increases of local brain temperature due to activity*. Acta biol. med. germ., 1976. **35**: p. 935-941.
33. Yablonskiy, D.A., J.J.H. Ackerman, and M.E. Raichle, *Coupling between changes in human brain temperature and oxidative metabolism during prolonged visual stimulation*. PNAS, 2000. **97**(13): p. 7603-7608.
34. Siesjo, B., *Brain Energy Metabolism*. 1978, New York: Wiley.
35. Gorbach, A.M., *Local alternated temperature gradients as footprints of cortical functional activation*. Journal of Thermal Biology, 2004. **29**: p. 589-598.
36. Gottstein, U. and K. Helk, *Acta Neurol. Scand.*, 1979. **60**(Suppl 72): p. 54.
37. Donhoffer, S., F. Sardy, and G. Szegvari, *Brown Adipose Tissue and Thermoregulatory Heat Production in the Rat*. Nature, 1964. **203**(4946): p. 765-766.
38. Hull, D. and M.M. Segall, *The contribution of brown adipose tissue to heat production in the new-born rabbit*. Journal of Physiology, 1965. **181**: p. 449-457.

39. LaManna, J., et al., *Stimulus-Activated Changes in Brain Tissue Temperature in the Anesthetized Rat*. *Metabolic Brain Disease*, 1989. **4**(4): p. 225-237.
40. Moser, E., I. Mathiesen, and P. Anderson, *Association Between Brain Temperature and Dentate Field Potentials in Exploring and Swimming Rats*. *Science*, 1993. **259**: p. 1324-1326.
41. Moser, E.I. and I. Mathiesen, *Relationship between neuronal activity and brain temperature in rats*. *Neuroreport*, 1996. **7**: p. 1876-1880.
42. George, J.S., et al., *IR Thermal Imaging of a Monkey's Head: Local Temperature Changes in Response to Somatosensory stimulation*, in *Optical Imaging of Brain and Metabolism*, U.D.e. al., Editor. 1993, Plenum Press.
43. Gorbach, A.M., *Infrared Imaging of Brain Function*, in *Optical Imaging of Brain Function and Metabolism*, P. Press, Editor. 1993. p. 95-123.
44. Gorbach, A.M., et al., *Intraoperative Infrared Functional Imaging of Human Brain*. *Annals of Neurology*, 2003. **54**(3): p. 297-309.
45. Gorbach, A.M., et al., *Intraoperative infrared imaging of brain tumors*. *Journal of Neurosurgery*, 2004. **101**: p. 960-969.
46. Shevelev, I.A., *Temperature Topography of the Brain Cortex: Thermoencephaloscropy*. *Brain Topography*, 1992. **5**(2): p. 77-85.
47. Shevelev, I.A., *Functional Imaging of the Brain by Infrared Radiation (Thermoencephaloscropy)*. *Progress in Neurobiology*, 1998. **56**: p. 269-305.
48. Zhang, D., S. Wang, and W. Fu, *Infrared thermography display of cortical temperature in cats*. *Chinese Medical Journal*, 2002. **115**(11): p. 1670-1674.
49. Picard, F., *Microthermistor based fingerprint sensor*, in <http://www.freepatentsonline.com/6633656.html>, INO, Editor. 2003.
50. Deacon, J. *Student's t-test for comparing the means of two samples*. [cited; Available from: <http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/statistics/tress4a.html#Student's%20t-test>.
51. Bottcher, H., et al., *Thermogenesis of white adipocytes: a novel method allowing long-term microcalorimetric investigations*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1991. **23**: p. 181-187.
52. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance*. *Physiological Review*, 2004. **84**: p. 277-359.
53. Hansen, E.S. and J. Knudsen, *Parallel Measurements of Heat Production and Thermogenin Content in Brown Fat Cells during Cold Acclimatation of Rats*. *Bioscience Reports*, 1986. **6**(1): p. 31-38.
54. Trayhurn, P., *Brown adipose tissue: from thermal physiology to bioenergetics*. *Journal of Bioscience*, 1993. **18**(2): p. 161-173.

## Annexe 1

### Protocole de collage et d'alignement de la cuve sur le capteur

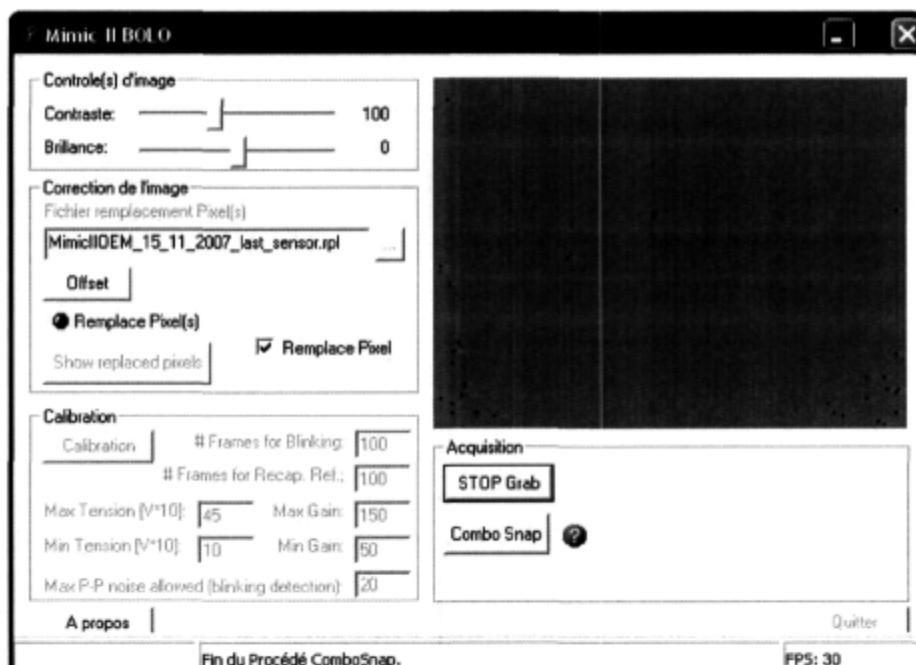
1. Visser le guide d'aluminium sur la plaque optique en poussant vers le haut-gauche afin d'assurer une reproductibilité du placement de cette pièce;
2. Placer un ruban adhésif 2 faces au centre de la partie basse du bloc;
3. Placer la cuve au centre du ruban;
4. Insérer le capteur à l'endroit prévu dans le système de déplacement en x-y-z;
5. Placer le capteur le plus parallèle possible au plan horizontal à l'aide de la vis permettant un jeu sur l'angle du bras;
6. Aligner en x-y le capteur par rapport à la cuve à l'aide du dispositif automatisé de déplacement;
7. Descendre le capteur près de la cuve à l'aide du déplacement automatisé en z;
8. Revérifier le parallélisme cuve-capteur puis visser fermement la vis de l'angle;
9. Mettre en place les feuillets d'espacement de l'épaisseur appropriée;
10. Dévisser la vis permettant une maniabilité sur la hauteur et en rotation x-y;
11. Insérer manuellement le capteur sur la cuve en prenant soin que la rotation dans le plan x-y est maintenant rendue impossible par la bordure sous la cuve;
12. Serrer fermement la vis;
13. Remonter le capteur à l'aide du déplacement en z;
14. Dévisser les 3 vis du bloc et retirer soigneusement ce dernier de dessous le capteur;
15. Déposer l'adhésif DP-190 et la silicone R2186-2 sur la cuve;
16. Replacer le bloc d'aluminium en prenant soin de pousser à nouveau vers le haut-gauche afin d'assurer le placement adéquat lors de la mise en place des vis;
17. Descendre le package sur la cuve à l'aide du déplacement en z jusqu'à la position désirée;
18. Laisser en place pendant 24 heures (premier durcissement de la silicone);
19. Retirer le groupe cuve-capteur du montage;
20. Mettre au four à 115°C pendant 15 à 20 minutes.

*Tableau 11. Protocole de collage et d'alignement de la cuve sur le capteur.*

## Annexe 2

### Fonctionnement du logiciel

L'interface générale d'utilisation se retrouve à la figure 51. La raison d'être et les fonctionnalités de chacune des composantes seront ici expliquées. Lorsque le premier bouton à gauche de la section Acquisition est activé, l'image des valeurs mesurées au dispositif est construite en temps réel, à un taux de 30 Hz. Le taux est affiché complètement en bas et à droite de l'interface graphique (FPS : 30 sur la figure 51).



*Figure 51. Interface générale d'utilisation.*

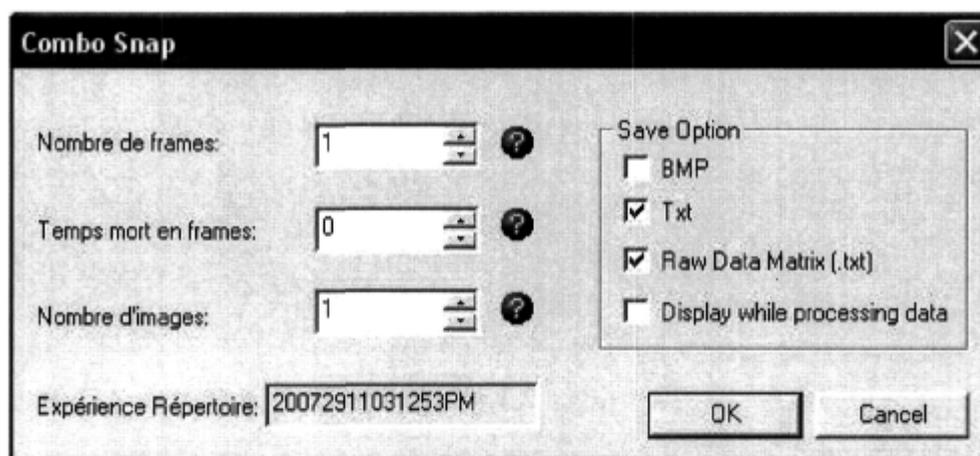
L'image est construite à partir d'un traitement sur les données brutes ramenant la valeur à un niveau de gris représentatif de la température du bolomètre. L'utilisateur a le contrôle, dans la section « Contrôle(s) d'image » sur le contraste et la brillance de l'image. Cette fonctionnalité peut permettre d'observer des variations sur l'image qui auraient pu passer inaperçues.

La section correction de l'image offre à l'utilisateur plusieurs possibilités. Le bouton « Offset » permet la soustraction instantanée d'une image moyenne. Ainsi, une image bien définie deviendra momentanément grise, la valeur du fond sur chacun des pixels étant différente entre elles. Il s'agit d'un procédé qui permet de soustraire l'arrière-plan du signal afin de mieux visualiser le signal d'intérêt. Il s'agit d'une pratique courante en imagerie. L'utilisateur peut aussi décider s'il veut ou non utiliser la table de remplacement de pixel et de correction de gain. Cette table provient du fichier avec une extension « .rpl ». Les pixels remplacés peuvent être visualisés au besoin en appuyant sur le bouton approprié (« Show replaced pixels »). Le fichier de remplacement peut être changé en tout temps. C'est dans celui-ci que sont retrouvés le gain de chacun des pixels déterminé lors d'un étalonnage préalable, ainsi que le pixel de remplacement s'il y a lieu (par exemple remplacer la valeur du pixel 3 par la valeur du pixel 4 lorsque le pixel 3 est défectueux). Cette table de correction est construite à partir de la partie « Calibration » de l'interface.

La figure 52 montre les différents paramètres qui doivent être ajustés pour effectuer l'étalonnage. Ces valeurs déterminent généralement les seuils pour lesquels les pixels doivent être rejetés ou remplacés, ainsi que le nombre d'images qui doit être pris en compte lors de cette calibration.

Calibration	
Calibration	# Frames for Blinking: 100
	# Frames for Recap. Ref.: 100
Max Tension [V*10]: 45	Max Gain: 150
Min Tension [V*10]: 10	Min Gain: 50
Max P-P noise allowed (blinking detection): 20	

*Figure 52. Fenêtre pour la calibration du capteur.*



*Figure 53. Menu pour l'enregistrement d'images.*

L'enregistrement des données et images associées se fait à l'aide du bouton « Combo Snap ». En appuyant sur celui-ci, un menu s'ouvre (voir figure 53). C'est à l'intérieur de celui-ci que sont définies les conditions d'enregistrement. La première valeur donne le nombre de captures sur lesquelles on veut moyenner l'image et l'enregistrer. Par exemple, une valeur de 30 dans cette case correspond à un moyennage sur une seconde étant donné que le capteur opère à 30 Hz. La case suivante est le temps entre deux images. Finalement, c'est le nombre d'image à enregistrer qui détermine la durée totale de l'enregistrement. Par exemple, l'enregistrement de 30 images distinctes à 30 Hz (moyennage = 1 et temps mort = 0) s'effectuera sur une seconde, alors que l'acquisition de 30 images à 1 Hz (moyennage=30 et temps mort=0) prendra 30 secondes. Le répertoire dans lequel les images sont enregistrées y est aussi indiqué. Celui-ci correspond à la date d'enregistrement à la seconde près, évitant ainsi l'écrasement des données précédentes lors d'enregistrements successifs. Cette section donne aussi le choix à l'utilisateur d'enregistrer une image (.bmp), les données complètes (données brutes, gain, remplacement pour chacun des pixels) sous forme de liste, les données brutes sous forme d'une matrice 160 X 120 et/ou s'il veut voir apparaître les images à l'écran lors de l'acquisition de celles-ci.

L'exemple d'un fichier de sortie (.txt) contenant toutes les données est représenté à la figure 54. La première colonne correspond au numéro du pixel. Les deux colonnes suivantes représentent respectivement la valeur brute en nombres de comptes et la valeur

retirée de l'image lors du dernier offset (aussi en nombre de comptes). Le numéro du pixel correspondant lors de la construction de l'image se retrouve dans la 4<sup>e</sup> colonne. Dans le cas où il y a un remplacement, ce numéro sera différent de celui de la 1<sup>re</sup> colonne. La 5<sup>e</sup> colonne correspond au gain. L'image représentée en tons de gris peut donc être reconstruite directement à partir de ce fichier. C'est aussi ce fichier qui est le plus utile lors du post-traitement. À cet effet, le logiciel Matlab a été utilisé pour effectuer la majorité du post-traitement, particulièrement lors de la caractérisation du dispositif de thermographie par contact.

Line	Pixel ID	Pixel ID	Gain	Offset
0	41057	41085	0	1.224667
1	40096	40127	1	1.129128
2	39771	39803	2	1.081616
3	39229	39261	3	1.053139
4	39192	39228	4	1.033073
5	39287	39321	5	1.052740
6	39453	39489	6	1.053779
7	39123	39160	7	1.041523
8	38102	38140	8	1.034922
9	38900	38938	9	1.050032
10	39264	39305	10	1.048604
11	39042	39083	11	1.038406
12	39064	39106	12	1.024155
13	39136	39176	13	1.044030
14	39326	39366	14	1.047180
15	39000	39040	15	1.037087
16	37984	38023	16	1.032535
17	38806	38842	17	1.049159
18	39194	39231	18	1.049001
19	38935	38971	19	1.038406
20	38840	38876	20	1.017697
21	39014	39049	21	1.037863
22	39166	39201	22	1.039728
23	38949	38983	23	1.035076
24	37849	37883	24	1.032843
25	38636	38665	25	1.043914
26	39032	39061	26	1.040274
27	38792	38819	27	1.028633
28	38740	38768	28	1.011173
29	38716	38741	29	1.025972
30	38928	38954	30	1.030007
31	38757	38785	31	1.026427
32	38510	38536	32	1.014944
33	38856	38885	33	1.035771
34	39057	39086	34	1.033843
35	38834	38867	35	1.024457
36	38811	38845	36	1.008821
37	38960	38993	37	1.030542

Figure 54. Exemple de fichier résultant de l'enregistrement.