

Imagerie ultrasonore ultrarapide du cerveau social

Florian Laszlo

▶ **To cite this version:**

Florian Laszlo. Imagerie ultrasonore ultrarapide du cerveau social. Acoustique [physics.class-ph]. Université Paris sciences et lettres, 2021. Français. ⟨NNT : 2021UPSLS046⟩. ⟨tel-03336354⟩

HAL Id: tel-03336354

https://pastel.hal.science/tel-03336354v1

Submitted on 7 Sep 2021

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

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



HAL Authorization

PSL UNIVERSITÉ PARIS

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à ESPCI Paris

Imagerie ultrasonore ultrarapide du cerveau social

Soutenue par

Florian LASZLO

Le 6 juillet 2021

École doctorale n°391

Ecole Doctorale Sciences Mécaniques, Acoustique, Electronique et Robotique

Spécialité

Acoustique

Composition du jury :

Pierre POUGET CR, Sorbonne Université	*Rapporteur*
Jonathan VAPPOU CR, Université de Strasbourg	*Rapporteur*
Olivier BAUD Pr, Université Paris Diderot	*Examinateur*
Pascal DOURNAUD DR, Université Paris Diderot	*Président du jury*
Mickaël TANTER DR, ESPCI	*Directeur de thèse*
Thomas DEFFIEUX CR, ESPCI	*Co-encadrant*
Sophie PEZET CR, ESPCI	*Invitée*

ESPCI PARIS | PSL

Remerciements

Cette thèse, en plus d'avoir été un voyage scientifique haletant, a également constitué une aventure humaine extraordinaire, à l'intérieur du laboratoire autant qu'à l'extérieur et je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui m'ont accompagné durant ces trois ans, en commençant par mes deux encadrants de thèse, Mickael Tanter et Thomas Deffieux.

Merci Mickael, merci de m'avoir fait confiance et merci pour le cadre exceptionnel que tu nous offres à tous dans le laboratoire Physique pour la Médecine.

Thomas, que ce soit humainement ou scientifiquement, je ne pense pas pouvoir te remercier suffisamment pour tout ce que tu m'as apporté.

Merci à Jonathan Vappou et Pierre Pouget d'avoir accepté la charge de rapporteur pour ces travaux.

Merci à Olivier Baud et Pascal Dournaud d'avoir bien voulu évaluer mon travail, ainsi qu'à Sophie Pezet que je remercie également pour toute son aide et sa vision éclairée lors de mes nombreuses expériences au laboratoire.

Nathalie, je te remercie également pour ton aide précieuse et ta disponibilité pour les manips.

Merci à Benoit Forget de l'institut Pasteur et Cécile Viollet de l'IPNP, ces collaborations auront été un plaisir.

Merci à Patricia, mais aussi à Salima et Hinde, vous faites beaucoup pour nous au laboratoire pour qu'on s'y sente au mieux.

Un merci général à tous mes amis et collègues du laboratoire, j'ai eu beaucoup de plaisir à vous cotoyer pendant ces trois belles années : Momo et ta gentillesse infinie ; Claire, si j'étais à la cantine j'aurais demandé du Rabut ; Olivier, à défaut d'être en ligue des champions avec Porto tu es dans ma thèse ; Noemi et son soutien sans faille ; Jack et nos discussions à propos de Marama Vahiura et Jean-Claude Darcheville ; Laura et ta bienveillance illimitée ; Heiva et ton smile permanent ; Baptiste sans qui je serais encore en train de rallier Lyon depuis Sainte-Catherine ; David mon psychiatre préféré ; Alex désolé pour tes défaites cuisantes en MMA ; Thomas et tes gentils signes de main quand je passe devant ton bureau ; Mai, quand tu veux pour que je te donne des cours de swing ; Adrien, tu es bien plus qu'un jeu de cartes ; Charlie, je me suis démené pour ces quelques mots.

Un grand merci à ma famille, mes parents et mes beaux-parents, c'est grâce à vous que je suis arrivé jusqu'ici. Un immense merci à mon grand frère Hadrien, merci d'être toujours là pour moi.

Merci à mes deux colocs, Guillaume et Manon, pour leur soutien dans cette dernière ligne droite et leur amitié si précieuse.

Enfin, merci infiniment à mes amis, nouveaux ou anciens, de près ou de loin, car vous êtes aussi ma famille.

Summary

Ultrasound imaging is a new emerging tool for neurofunctional imaging. Since 2011 and the first proof of concept, numerous preclinical projects were led on various topics such as pathology studies (Alzheimer and schizophrenia for instance), small animal tonotopy study or else social interactions.

To study social interactions with this technique, awake imaging is needed. Awake brain functional imaging is possible in ultrasound but it comes with difficulties not only with the image generation and the experimental setup but also with the interpretation of the results because of the movement artifacts. Being able to perform awake imaging is also very interesting as it allows to get rid of the anesthesia which is known to alter metabolism.

Most of the work presented in this document consists in the development of experimental techniques and numerical methodologies to perform functional ultrasound brain imaging (fUS) in awake small animals. The leads that are proposed will be applied on concrete examples with the help of the Pasteur institute (study of a model of an autistic trouble) and the Paris institute for neuroscience and psychiatry (social and environmental recognition).

fUS is based on the neurovascular coupling : it allows an indirect measure of brain activity by monitoring blood flow variations in the stimulated brain areas. This hemodynamic response is quite slow and thus this technique cannot depict faster transient physiological phenomena. To address this problem, the neuromechanical coupling, that is the link between cerebral activity and tissue stiffness, is investigated for the first time in ultrasound.

Key words : imaging - ultrasound - neuroscience - brain - signal processing - physics

Résumé

L'imagerie ultrasonore est une modalité émergente d'imagerie fonctionnelle cérébrale. Depuis la première preuve de concept en 2011, de nombreux projets en préclinique ont pu être menés sur des sujets très différents tels que l'étude de pathologies (Alzheimer, schizophrénie, ...), l'étude de la tonotopie chez le petit animal ou encore celle des interactions sociales.

Dans ce dernier cas, il est alors nécessaire de pouvoir faire de l'imagerie éveillée ce qui induit une complexification à la fois de la génération des images et du dispositif expérimental mais aussi de leur interprétation à cause des artefacts liés au mouvement du sujet étudié. Être capable de faire de l'imagerie sans anesthésie est également crucial car cette dernière peut modifier le métabolisme.

La majorité des travaux conduits durant cette thèse consiste au développement de techniques expérimentales et de méthodes numériques au service de l'imagerie neurofonctionnelle ultrasonore chez le petit animal éveillé qui en est encore à ses débuts. Les avancées proposées sont appliquées à des cas concrets en partenariat avec l'institut Pasteur (étude d'un modèle d'autisme) et l'institut de phychiatrie et neurosciences de Paris (reconnaissance sociale et environnementale).

L'imagerie fonctionnelle ultrasonore du cerveau est basée sur le couplage neurovasculaire. Ce couplage permet une mesure indirecte de l'activité du cerveau en imageant les variations des flux sanguins dans les zones cérébrales stimulées. Cette réponse hémodynamique est assez lente et ne permet pas d'accéder aux phénomènes physiologiques rapides. Afin de chercher une solution à ce problème, le couplage neuromécanique, c'est-à-dire le lien entre activité cérébrale et rigidité des tissus, est étudié pour la première fois avec les ultrasons dans ce document.

Mots clefs : imagerie - ultrasons - neurosciences - cerveau - traitement de signal - physique

Table des matières

Remerciements **i**

Résumé (English/Français) **iii**

1 Introduction **1**

1.1 Techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale 3

1.1.1 Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle 3

1.1.2 Imagerie optique 5

1.1.3 Spectroscopie proche infrarouge 6

1.1.4 Imagerie calcique 7

1.1.5 Tomographie par Émission de Positon 8

1.1.6 L'électroencéphalographie 9

1.2 Neuroimagerie fonctionnelle ultrasonore 10

1.2.1 Principes 10

1.2.2 Formation d'images : de l'échographie conventionnelle à l'ultrarapide 16

1.2.3 Imagerie fonctionnelle ultrasonore 22

1.3 Objectifs de la thèse 35

1.3.1 Développement du fUS chez le petit animal éveillé 35

1.3.2 Application du fUS à un contexte social 35

1.3.3 Étude du couplage neuromécanique 36

2 Méthodes pour le fUS chez la souris éveillée **39**

2.1 Le fUS chez la souris éveillée 41

2.1.1 Nécessité de l'imagerie éveillée 41

2.1.2 Les défis de l'imagerie éveillée 43

2.1.3 Dispositifs expérimentaux pour le fUS chez la souris éveillée . . 46

2.2 Méthodes numériques pour séparer les artefacts de mouvement du signal hémodynamique utile 51
2.2.1 Le *censoring* ou suppression d'images 53
2.2.2 Régression de nuisance 56
2.2.3 Filtre à SVD dynamique 59
2.2.4 Analyse en composantes indépendantes 65
2.2.5 La factorisation en matrices non-négatives 77
2.2.6 Résultats des méthodes et comparaison 81

3 Applications du fUS au petit animal éveillé 89
3.1 Caractérisation fonctionnelle d'un modèle d'autisme 90
3.1.1 Présentation du projet 90
3.1.2 Matériel et méthodes 96
3.1.3 Analyse en *resting-state* 97
3.1.4 Étude du film Doppler complet 102
3.2 Étude de la nouveauté sociale et environnementale 108
3.2.1 Présentation du projet 108
3.2.2 Matériel et méthodes 110
3.2.3 Premiers résultats comportementaux 114
3.2.4 Analyse en *resting-state* 116
3.2.5 Étude des films complets 118
3.3 Conclusion du chapitre 127

4 Étude du couplage neuromécanique chez le rat par ultrasons ultrarapides 129
4.1 Couplage neuromécanique 130
4.1.1 Limites du couplage neurovasculaire 130
4.1.2 État de l'art sur le lien entre activité neuronale et rigidité tissulaire 132
4.1.3 Intérêt des ultrasons ultrarapides 134
4.2 Étude simultanée des propriétés mécaniques et des flux sanguins dans le cerveau 136
4.2.1 Élastographie par ondes de cisaillement 136
4.2.2 Séquence ultrasonore ultrarapide couplant fUS et élastographie par ondes de cisaillement 139
4.2.3 Plan de l'étude 141
4.3 Résultats et discussions 146
4.3.1 Imagerie hybride élastographie-fUS 146

4.3.2 Étude aux temps courts 148
4.3.3 Étude aux temps longs 149
4.3.4 Expériences complémentaires et perspectives 152
4.3.5 Conclusion 156

Conclusion générale **159**

Bibliographie **163**

Communications scientifiques **177**

1 Introduction

De par son potentiel et sa complexité, le cerveau a toujours fasciné. Durant l'histoire, de nombreux scientifiques ou penseurs ont essayé de percer les mystères de son fonctionnement, persuadés qu'une meilleure compréhension permettrait de grandes avancées pour l'Homme. Protégé par la boîte crânienne, son accès rend cette étude encore plus ardue. Si bien que jusqu'aux années 1950, seuls des enregistrements de l'activité électrique du cerveau, que l'on connait aujourd'hui sous le nom d'éléctroencéphalogramme (EEG), permettaient de visualiser l'activité du cerveau lorsque l'on ressent, pense ou agit.

L'imagerie fonctionnelle cérébrale a elle débutée, comme dit précédemment, par des tracés de l'activité électrique du cerveau grâce à des électrodes implantés au début des années 1950 mais a connu depuis un essor considérable grâce aux progrès technologiques et à l'investissement massif dans la recherche scientifique. Cela a permis d'aller au delà de l'imagerie anatomique usuelle et d'obtenir les premières images dynamiques du cerveau en action (cf état de l'art de la neuroimagerie fonctionnelle par K. Friston [56]) .

Il existe maintenant de nombreuses techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale comme l'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (fMRI) qui est la plus répandue. Elles diffèrent par leur fonctionnement, par les grandeurs qu'elles permettent de mesurer et constituent une sorte de trousse à outils pour le neuroscientifique ou le médecin qui pourra alors choisir la technique la plus pertinente selon la problématique rencontrée ou même en combiner plusieurs le cas échéant.

Avant l'avènement des techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale, les princi-

pales théories cognitives étaient basées sur l'étude des comportements qui, parfois, pouvait présenter des biais inexpliqués inhérents à la méthode. La neuroimagerie fonctionnelle permet ainsi d'apporter une nouvelle approche (Wilkinson *et al* 2004 [166]) complémentaire à ces études. Lier activité fonctionnelle et comportement devient alors un enjeu crucial qui sera partie intégrante des travaux présentés ici.

Au-delà de l'aspect technologique et du développement de nouvelles machines, il est également primordial de travailler sur les méthodes d'analyse des données issues de ces imageries diverses. L'essor de l'algorithmie et du *machine learning* permet notamment d'extraire des informations supplémentaires à partir des données déjà enregistrées.

L'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) est une technique très récente et est au cœur des travaux présentés dans ce document. Afin d'introduire au mieux cette modalité, il convient d'abord de dresser un rapide état de l'art des techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale et des concepts à la fois technologiques et biologiques sur lesquels elles sont basées. Enfin, les objectifs de la thèse seront détaillés puis seront présentés dans les chapitres suivants.

1.1 Techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale

Il existe de nombreuses modalités d'imagerie fonctionnelle cérébrale et elles ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients : les résolutions spatiales et temporelles des images, la portabilité du dispositif, le coût de l'équipement et de l'entretien, etc. Les techniques et leur concept seront détaillés ci-après.

On peut tout d'abord observer sur le graphique de la figure 1.1 un aperçu qualitatif des caractéristiques des principales modalités de neuroimagerie fonctionnelle : les résolutions temporelles et spatiales, la portabilité et la possibilité ou non d'imager le cerveau dans sa globalité. Nous pouvons voir sur cette figure que l'imagerie fonctionnelle ultrasonore tient une place particulièrement intéressante dans ce paysage des techniques de neuroimagerie.

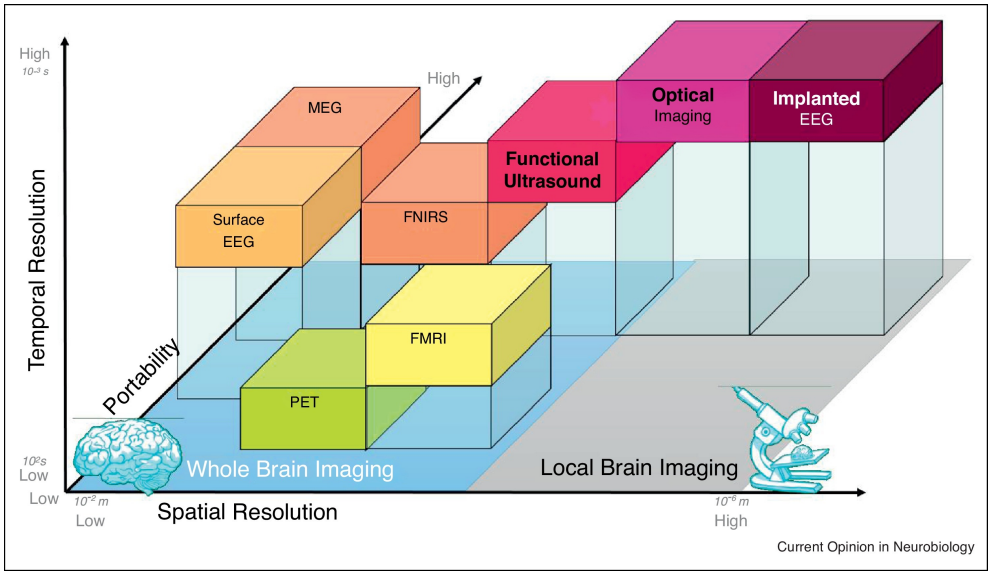


FIGURE 1.1 – Comparaison des caractéristiques des principales techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale (source : Deffieux *et al* 2018 [41]).

1.1.1 Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle

L'IRM, dont on peut voir un schéma du dispositif expérimental sur la figure 1.2 qui est constitué principalement de grandes bobines qui permettent la génération d'un champ magnétique puissant. Certaines molécules possèdent un moment magnétique et, grâce au champ magnétique appliqué, on est alors capable de les localiser pour former *in fine* une image.



FIGURE 1.2 – Dispositif d'IRM.

Depuis son apparition dans le début des années 1990, l'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf) s'est progressivement imposée jusqu'à devenir la technique de référence pour la neuroimagerie fonctionnelle (K. Logothetis 2008 [99]). L'IRMf est une mesure indirecte de l'activité du cerveau basée sur le couplage neurovasculaire.

Le couplage neurovasculaire
On dit qu'une région du cerveau s'active lorsque les neurones la composant déchargent pour envoyer un signal électrique et donc une information. Les neurones sont des organismes cellulaires possédant de faibles réserves énergétiques. Par conséquent, leur activation nécessite un réapprovisionnement assez rapide en nutriments et en oxygène qui sont amenés par le sang. Ainsi, l'activation d'une zone du cerveau résulte d'une augmentation des flux sanguins dans la même zone. C'est ce qu'on appelle le couplage neurovasculaire dont on peut citer une *review* très complète par C. Iadecola [80].

L'IRMf rend compte de l'activation du cerveau en mesurant les variations du signal BOLD (Blood Oxygen Level Dependent) via le couplage neurovasculaire (Frahm *et al* 1992 [83]). Ce signal traduit l'oxygénation locale du sang grâce à l'existence d'une différence de moment magnétique entre l'hémoglobine oxygénée et et l'hémoglobine désoxygénée. La consommation d'oxygène locale, au niveau de la zone activée du cerveau, augmente légèrement la consommation en désoxyhémoglobine. Cette augmentation est suivie d'une diminution due à l'afflux sanguin résultant du couplage

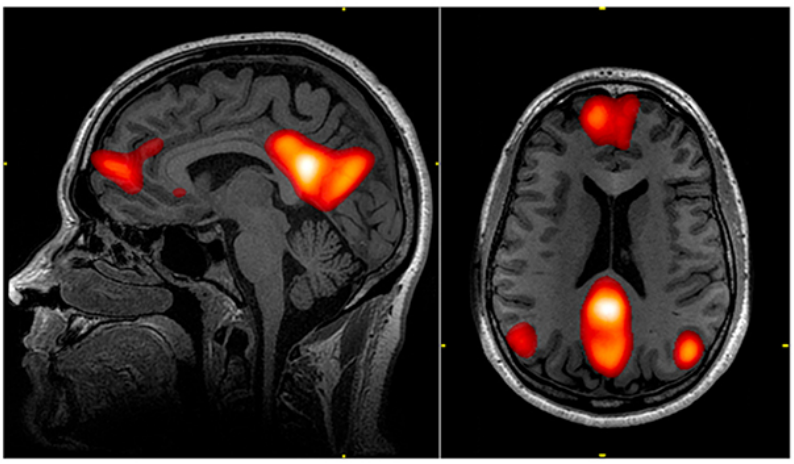


FIGURE 1.3 – Activation fonctionnelle imagée par IRMf : imagerie anatomique IRM superposée de la carte d'activation obtenue par IRMf (source : Edlow *et al 2017 [47]*).

neurovasculaire qui irrigue la zone en excès de sang oxygéné. L'IRMf rend compte de l'activation du cerveau en mesurant les variations de cette concentration.

Cette méthode permet de faire des études à la fois précliniques et cliniques et a permis de grandes avancées en science cognitive. Si elle est non-ionisante et non-invasive, elle présente tout de même certaines limitations comme sa portabilité (cf image de la figure 1.2), son coût à l'achat mais également en maintenance (A. van der Kolk *et al* 2013 [90]). Par ailleurs, le stress induit aux patients ou animaux étudiés dû au bruit des bobines (D. Tomasi *et al* 2005 [159]) peut également avoir une influence sur les résultats obtenus. En terme de performance, la résolution temporelle de l'ordre de la seconde est parfois un frein à certaines études.

L'IRM constitue la technologie de base d'imagerie anatomique et, l'IRMf permet d'obtenir des images dans les trois dimensions. On peut voir un exemple d'images obtenues par IMRf sur la figure 1.3 [1].

1.1.2 Imagerie optique

L'imagerie fonctionnelle cérébrale optique est également une mesure indirecte de l'activité neuronale via le couplage neurovasculaire.

1. https://news.harvard.edu/gazette/story/2017/07/

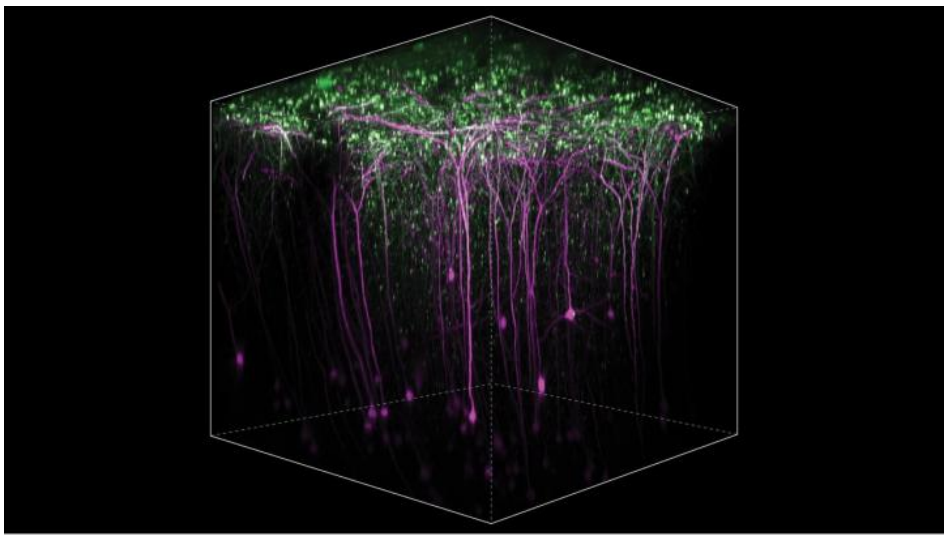


FIGURE 1.4 – Imagerie optique *in vivo* du cerveau chez la souris avec la microscopie à deux photons (Roth *et al* 2020 [138]).

L'imagerie optique est rapide et la résolution de l'image, à la fois spatiale et temporelle, est excellente. Elle donne accès aux variations des flux sanguins à l'échelle du millimètre avec l'Imagerie Optique du Signal Intrinsèque (IOSI) à celle du micromètre avec la microscopie à deux photons dont on peut voir un exemple sur l'image présentée sur la figure 1.4 [1].

Cependant, l'imagerie optique fonctionnelle cérébrale est limitée à la surface du fait que la lumière est diffractée par les tissus : plus on cherche à imager en profondeur, plus on perd en résolution spatiale comme on peut le voir dans l'article de M. Kilmera *et al* de 2001 [87].

1.1.3 Spectroscopie proche infrarouge

La spectroscopie proche infrarouge est une technique assez récente d'imagerie fonctionnelle cérébrale optique (M. Ferrari *et al* 2012[51]) qui elle aussi mesure indirectement l'activité neuronale superficielle (limitée au cortex généralement) via le couplage neurovasculaire.

Elle détecte l'état d'oxygénation du sang grâce au niveau d'absorption ou de

1. https://www.photonics.com/Articles/2-Photon_Microscopy_Shows_Learning_Involves/a65446

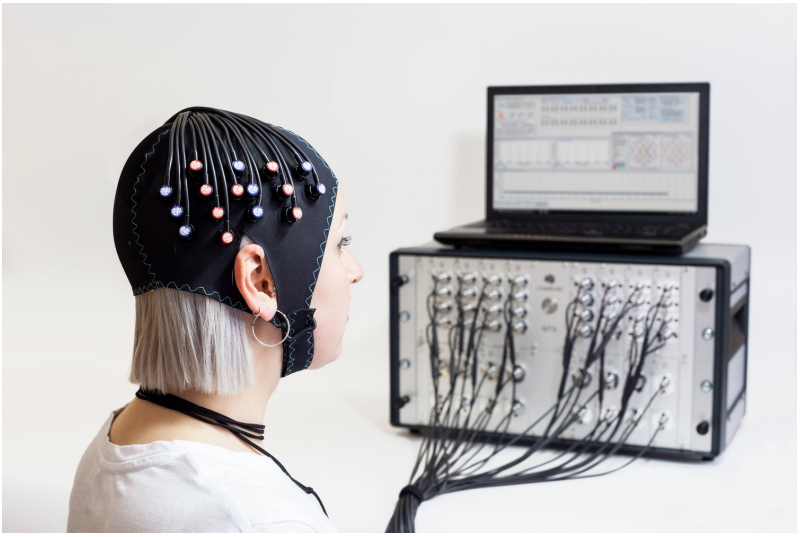


FIGURE 1.5 – Dispositif de spectroscopie proche infrarouge fonctionnelle.

diffusion d'ondes lumineuses dans le domaine des proches infrarouges. Malgré sa faible pénétration et sa résolution spatiale de l'ordre du centimètre, elle est rapide, peu couteuse comparée à certaines autres modalités et portable : il suffit d'un ensemble de capteurs fixés sur la tête et d'une interface munie d'un ordinateur comme on peut le voir sur l'image de la figure 1.5 [1]. Par ailleurs, elle peut être aisément couplée avec d'autres modalités de neuroimagerie fonctionnelle.

1.1.4 Imagerie calcique

L'imagerie fonctionnelle cérébrale calcique est également une mesure indirecte de l'activité neuronale (C. Grienberger *et al* 2012 [64]) reposant sur de l'imagerie optique mais cette fois, ça n'est pas le couplage neurovasculaire qui est utilisé : la décharge d'un neurone entraine l'ouverture des canaux ioniques alentours ce qui entraine notamment la libération de calcium et l'augmentation de sa concentration dans le neurone activé. Des molécules fluorescentes réagissent au contact des ions Ca^{2+} et cela modifie leurs propriétés fluorescentes. L'image provient ensuite d'une imagerie optique et donc, cette technique présente par conséquent les mêmes inconvénients. Cependant, sa précision permet quasiment d'observer l'activation au neurone près comme on peut le voir sur l'image de la figure 1.6 [2].

1. https://en.wikipedia.org/wiki/Functional_near-infrared_spectroscopy
2. https://news.mit.edu/2012/neuron-imaging-calcium-1017

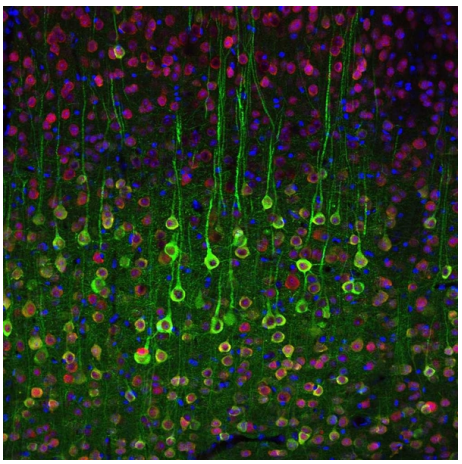


FIGURE 1.6 – Imagerie calcique de cellules pyramidales (neurones) dans le cerveau (source : Chen *et al* 2020 [32]).

Par ailleurs, le développement des miniscopes [1] a permis de fixer directement un objectif miniaturisé sur le crâne d'une souris relié à une fibre optique, ce qui permet de faire de l'imagerie fonctionnelle cérébrale du petit animal éveillé notamment.

1.1.5 Tomographie par Émission de Positon

La Tomographie par Émission de Positon (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle cérébrale qui permet d'observer *in vivo* et de manière quantitative les procédés moléculaires dans le cerveau. Elle nécessite l'injection de marqueurs radioactifs. Cela permet de visualiser en trois dimensions la consommation de glucose due au métabolisme du cerveau (Phelps 1981 [133]). C'est donc aussi une mesure indirecte de l'activité cérébrale. On peut observer sur la figure 1.7 [2] un exemple de machine et d'images pour cette modalité de neuroimagerie fonctionnelle.

La TEP repose sur la détection des deux photons émis lors de la réaction d'annihilation d'un électron avec un positon qui provient de la désintégration β+ d'une molécule marquée par un isotope radioactif injectée au préalable. Cette technique est très sensible mais la résolution spatiale reste limitée. Elle est souvent couplée à une imagerie anatomique comme l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Enfin, le dispositif est assez massif et l'utilisation de produits radioactifs requiert de nombreuses précautions et l'utilisation de locaux sécurisés et dédiés.

1. http://miniscope.org/index.php/Main_Page
2. https://www.petscaninmumbai.com/blog/pet-scan-for-brain/

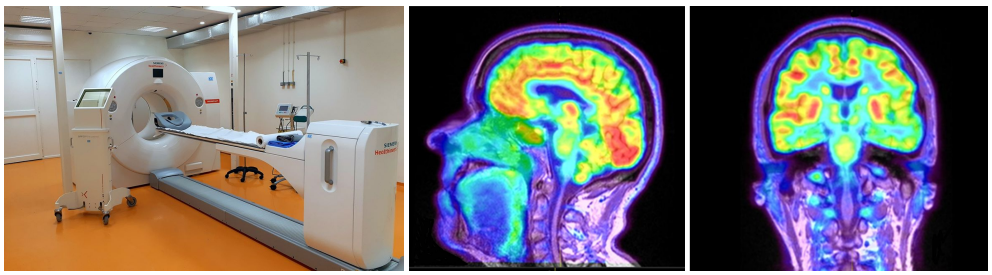


FIGURE 1.7 – Dispositif de Tomographie par Émission de Positon (gauche) et exemple d'images en résultant (droite).

1.1.6 L'électroencéphalographie

Si les méthodes d'imagerie neurofonctionnelle présentées jusqu'à présent sont des mesures indirectes de l'activité cérébrale (via le couplage neurovasculaire ou la consommation de glucose résultant de la décharge des neurones par exemple), il existe également des méthodes de mesure directe, la plus connue étant l'électroencéphalographie ou EEG.

L'EEG mesure l'activité électrique grâce à des électrodes posées à la surface du crâne ou implantées directement dans le cerveau dont on peut mesurer la différence de potentiel deux à deux. Cependant, du fait de la grande longueur d'onde des ondes électromagnétiques par rapport aux dimensions du cerveau, retrouver précisément la position des sources reste complexe. Le développement récent de nouveaux types d'électrodes, les sondes multicanaux, permettent cependant de jalonner la zone voulue avec un grand nombre d'électrodes et on peut ainsi obtenir une carte relativement précise.

Malgré une résolution spatiale moindre comparée à certaines autres modalités d'imagerie fonctionnelle cérébrale, la résolution temporelle de l'EEG est excellente (de l'ordre de la milliseconde).

1.2 Neuroimagerie fonctionnelle ultrasonore

Il existe ainsi de nombreuses méthodes d'imagerie fonctionnelle cérébrale dont certaines qui ne sont pas décrites ici (la magnétoencéphalographie par exemple). Ces techniques sont basées sur des effets physiologiques différents, sur des méthodes de mesures différentes et apportent bien souvent des informations complémentaires.

L'échographie est une technique d'imagerie qui a émergé dans la seconde partie du vingtième siècle et qui s'est progressivement installée dans le milieu médical jusqu'à devenir, en obstétrique par exemple, un examen de référence. Cependant, de très récentes avancées ont pu améliorer grandement la qualité et la sensibilité de l'échographie qui permettent de faire de l'imagerie fonctionnelle cérébrale depuis quelques années.

Comme on pourra le voir tout au long de ce document, les ultrasons fonctionnels, comparés à nombre de techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale (T. Deffieux *et al* 2018 [41]), présentent beaucoup d'avantages, notamment pour observer le fonctionnement du cerveau du petit animal éveillé ou encore celui d'offrir la possibilité de mesurer d'autres grandeurs physiques comme le module d'élasticité qui donne des informations sur les propriétés mécaniques des tissus. Avant de développer ces points, il est nécessaire de présenter en détail l'échographie, ses principes et son fonctionnement.

1.2.1 Principes

L'échographie est une technique d'imagerie qui utilise les ondes mécaniques et, plus particulièrement, les ondes de compression afin de sonder les propriétés mécaniques des matériaux étudiés ou des tissus biologiques dans le cadre de la médecine. Leur propagation dépend des propriétés du milieu qu'elle traverse et c'est ainsi qu'on peut obtenir une image de type morphologique de ce milieu.

Selon la fréquence de ces ondes, leur propagation peut être audible pour un être humain (20 Hz - 20 kHz) et on parle alors d'ondes sonores : c'est le cas de la musique ou de la parole par exemple. Le domaine fréquentiel des ultrasons s'étend de 20 kHz à 200 MHz.

La théorie et les équations régissant la propagation des ondes mécaniques dans le corps humain ne seront que brièvement détaillées dans ce document ; l'ouvrage de R. Cobbold fait référence dans le milieu de l'échographie biomédicale (R. Cobbold 2006 [36]). Cependant, pour pouvoir être à même d'introduire l'échographie et la formation d'image via cette technique, il convient d'expliquer le comportement des ondes mécaniques de compression et leur propagation.

Lorsqu'un être humain parle, il fait vibrer ses cordes vocales qui agissent comme une "source". Cette source vibre et transmet ses vibrations à l'air avoisinant, mettant ainsi en mouvement les molécules qui le composent, créant, selon le mouvement initial de la source, un enchainement de zones de surpression ou de compression qui vont se propager longitudinalement de proche en proche, sans transport de matière, en s'éloignant de la source. Ce phénomène est illustré dans la figure 1.8.

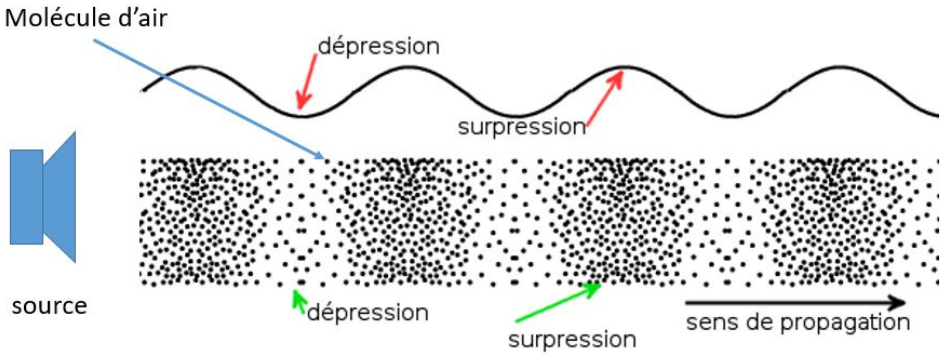


FIGURE 1.8 – Exemple de la propagation dans l'air d'une onde mécanique de compression.

Le corps humain est composé très majoritairement d'eau et les ondes mécaniques de compression se propagent dans l'eau à une vitesse constante de 1540 m/s. C'est un postulat de base de la suite de ce document et nous resterons dans le cadre de cette hypothèse : propagation uniforme des ondes mécaniques de compression dans les tissus mous à la vitesse de 1540 m/s.

Comme cela a été dit précédemment, les ondes mécaniques se propagent dans un milieu en fonction des propriétés mécaniques de ce milieu. Dans le corps humain, il existe, à l'échelle microscopique, de très nombreuses interfaces locales séparant deux milieux de compressibilités différentes et les ondes mécaniques, à leur contact, vont être diffusées.

Cette interface biologique diffuse l'onde mécanique incidente de manière complexe (réflexion, réfraction, diffraction énventuelle,...) mais seule l'onde rétro-diffusée nous intéresse dans le cadre de cette technique. On appelle ici l'onde rétro-diffusée, l'onde mécanique de compression qui résulte de la réflexion sur les multiples interfaces des tissus. On fait ici une hypothèse forte que l'on gardera pour la suite de cette étude qui consiste à considérer qu'il existe qu'une seule onde rétro-diffusée : on se place donc dans le cadre de la diffusion simple et on met de côté la diffusion multiple. Cette hypothèse est raisonnable car la taille des diffuseurs est très faible devant la longueur d'onde ultrasonore (diffuseurs de Rayleigh). À l'inverse, c'est ce qui rend l'imagerie optique compliquée en profondeur, en plus de l'atténuation due à l'absorption.

L'onde rétro-diffusée parcourt ce trajet à la même vitesse mais son amplitude est diminuée en fonction de l'interface rencontrée. La captation de cette onde rétro-diffusée donne donc accès à la position et au "pouvoir réfléchissant», appelé échogénéicité, des objets présents dans le corps humain. L'échogénéicité est fonction de l'impédance acoustique entre les deux milieux que l'interface d'intérêt sépare. Plus l'interface rencontrée est réfléchissante, c'est-à-dire, plus la différence d'impédance acoustique entre les deux milieux est grande, plus l'amplitude de l'onde rétro-diffusée sera importante et, en la captant, on aura la position de l'interface mais aussi son échogénéicité en niveau de gris. En outre, les objets diffusants dont la taille est inférieure à celle de la longueur d'onde entraînent un bruit de speckle propre à ce milieu. Ceci peut donner une information supplémentaire pour connaitre la nature du milieu traversé.

L'échographie médicale consiste donc à la génération d'ondes mécaniques de compression et à la captation des ondes rétro-diffusées dans le corps humain.

Les ondes ultrasonores ont une longueur d'onde allant du mm à la centaine de microns, ils sont donc particulièrement adaptés pour cette application car cela correspond à l'échelle de la plupart des organes. De plus, à l'exception des os et des poumons, le corps humain dans son ensemble permet la propagation des ultrasons. L'échographie médicale a notamment pu être développée grâce à l'essor des matériaux piézoélectriques dont le phénomène a été mis en évidence par les frères Jacques et Pierre Curie en 1880.

Lorsqu'on applique une tension électrique à un matériau piézoélectrique, celui-ci se contracte ou se dilate. Ainsi, si on lui envoie un signal électrique sinusoïdal, il va se déformer au rythme des oscillations de ce signal. Cette déformation périodique va ainsi générer une onde mécanique sphérique centrée sur le cristal piézoélectrique dont on peut contrôler les caractéristiques comme la fréquence : ce phénomène est illustré sur la figure 1.9. Cela fonctionne également dans le sens inverse : si une onde mécanique impacte un matériau piézoélectrique, ce dernier va se déformer en fonction et engendrer un signal électrique.

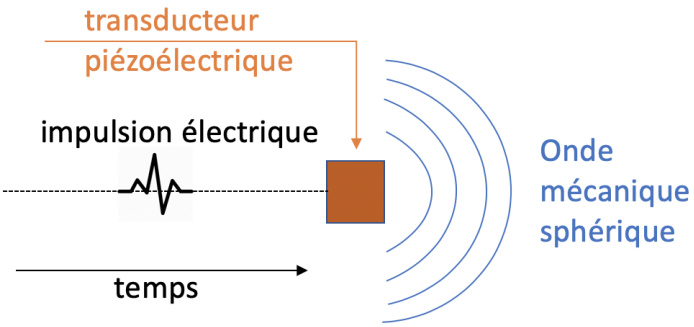


FIGURE 1.9 – Soumis à une impulsion électrique, le transducteur piézoélectrique vibre et génère une onde sphérique au milieu contigu.

Grâce aux progrès en électronique du début du XXème siècle et à ce phénomène, Paul Langevin parvient à mettre au point un dispositif, appelé sonar, permettant l'émission et la réception d'ondes ultrasonores dans l'eau afin de détecter les sous-marins qui sera utilisé pour la première fois pendant la seconde guerre mondiale. Après plusieurs années de développement par Tom Brown et Ian Donald, apparait en 1957 le premier appareil pour l'examen du corps par réflexion des ultrasons : c'est le début de l'échographie médicale.

La sonde utilisée en échographie est constituée d'un alignement de cristaux piézoélectriques, appelés transducteurs, qui forment ainsi une matrice à une dimension. Le plus souvent, elle compte 128 éléments qui sont contrôlables de manière indépendante : pour chacun d'eux, on peut appliquer le signal électrique de notre choix. Ainsi, chaque transducteur piézoélectrique permet la génération d'une onde sphérique centrée sur lui même.

Si l'on applique le même signal électrique à tous les éléments, ils vont alors tous générer une onde qui a exactement les mêmes caractéristiques spatiales et tempo-

relles (du moins à l'émission). Les ondes cohérentes peuvent interférer de manière constructive et destructive. Dans notre cas, l'ensemble des 128 ondes sphériques initiales vont interférer et former une seule et unique onde. De plus, en appliquant une certaine loi de retard aux signaux électriques, on est capable de contrôler la forme de la "nouvelle" onde générée. Appliquer une loi de retard, c'est envoyer exactement le même signal électrique à chaque transducteur mais à des temps différents. Pour visualiser ceci, imaginons une sonde comportant huit éléments et que chaque transducteur piézoélectrique ne génère une onde sphérique centrée sur lui même que dans le plan de la sonde. On applique alors une loi de retard uniforme, c'est-à-dire que chaque élément de la sonde reçoit le même signal électrique au même moment. Les éléments génèrent ensuite chacun la "même" onde et toutes ces ondes interfèrent de manière constructive et destructive pour former une seule et unique onde plane dont le front d'onde est parallèle à la sonde et qui se propage en s'éloignant d'elle. Ceci est illustré sur la figure 1.10.

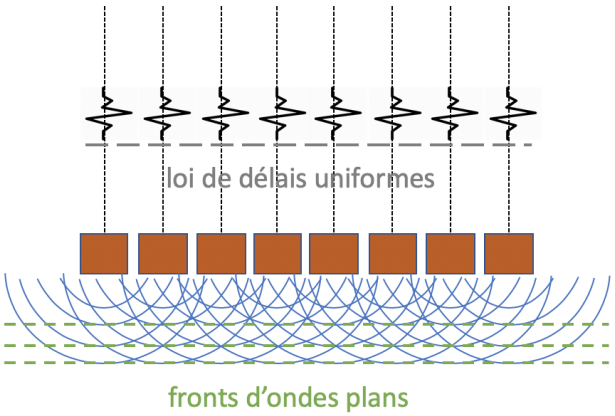


FIGURE 1.10 – Une loi de retards uniformes pour le signal électrique appliqué à un réseau linéaire de transducteurs piézoélectriques entraîne la génération d'ondes planes ultrasonores.

Appliquons maintenant une loi de retard parabolique. Chaque élément de notre sonde reçoit alors le même signal électrique mais décalé dans le temps suivant cette loi. L'onde totale générée aura alors un front d'onde concave et se propage également dans le plan de la sonde en s'éloignant d'elle comme cela est illustré sur la figure 1.11. Cependant, cette onde va alors focaliser. C'est de cette manière qu'on focalise les ultrasons. En jouant sur la concavité de la loi de retard, on peut ainsi focaliser à la profondeur voulue.

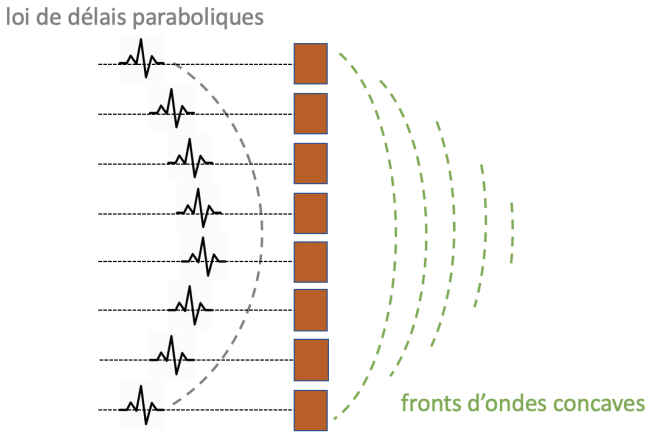


FIGURE 1.11 – Une loi de retard parabolique pour le signal électrique appliqué à un réseau linéaire de transducteurs piézoélectriques entraîne la génération d'ondes concaves ultrasonores qui focalisent.

En pratique, les éléments de la sonde émettent dans tout l'espace. Pour s'affranchir de la propagation dans la direction perpendiculaire à l'axe de la sonde, qu'on appelle élévation (cf figure 1.12), on utilise ce qu'on appelle une "lentille acoustique". Cette lentille est faite d'un matériau qui ralentit l'onde mécanique qui s'y propage sans en modifier ses autres caractéristiques. Ainsi, plus l'épaisseur de la lentille est importante, moins l'onde, qui la traverse, sera rapide à sa sortie. Afin d'expliquer ce phénomène, on se base sur le schéma de la figure 1.11.

On peut modéliser localement chacun de ces cristaux piézoélectriques comme une matrice en deux dimensions de transducteurs élémentaires. Ainsi, lorsqu'on applique un signal électrique au cristal, on transmet le même signal électrique à l'ensemble de ces transducteurs élémentaires avec une loi de retard uniforme.

Plaçons alors une lentille acoustique convexe en élévation et plane en latéral devant le cristal piézoélectrique global. On crée ainsi artificiellement une loi de retard parabolique en élévation tout en gardant une loi de retard uniforme en latéral. Par conséquent, cela nous permet de focaliser l'onde en élévation à une profondeur fixe. La propagation d'une onde générée par ce cristal sera alors confinée dans une tranche quasiment de même épaisseur que le cristal, appelée la tranche acoustique, et alors, dans ce cas, la sonde n'émet que dans un seul plan : on dit alors qu'on est focalisé en élévation. Nous nous placerons dans cette situation pour l'ensemble de la suite de ce document.

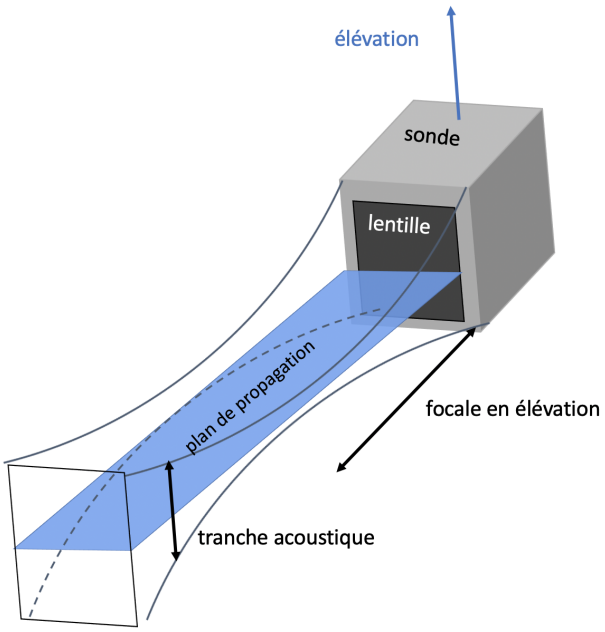


FIGURE 1.12 – Focalisation en élévation d'un faisceau ultrasonore à l'aide d'une lentille acoustique.

1.2.2 Formation d'images : de l'échographie conventionnelle à l'ultrarapide

Depuis les années 1950 et les premières applications médicales de l'échographie, la technologie n'a que très peu évolué. Le principe de l'échographie peut se résumer, comme on l'a vu, à l'émission d'ondes ultrasonores par une matrice de transducteurs piézoélectriques à une dimension et à la réception des échos, ondes rétro-diffusées par le milieu, par cette même matrice et enfin à la formation d'une image de l'échogénéicité du milieu par application d'un algorithme dit de *beamforming* qui permet de calculer la position des diffuseurs composant le milieu.

Nous allons nous intéresser ici à la formation d'image, d'abord de l'échographie conventionnelle qui est la modalité historique et qui prédomine toujours aujourd'hui (pour l'obstétrique par exemple) puis à l'échographie ultrarapide qui a été développée au début des années 2000 qui révolutionne les possibilités offertes par la technique et qui est le sujet de ce travail.

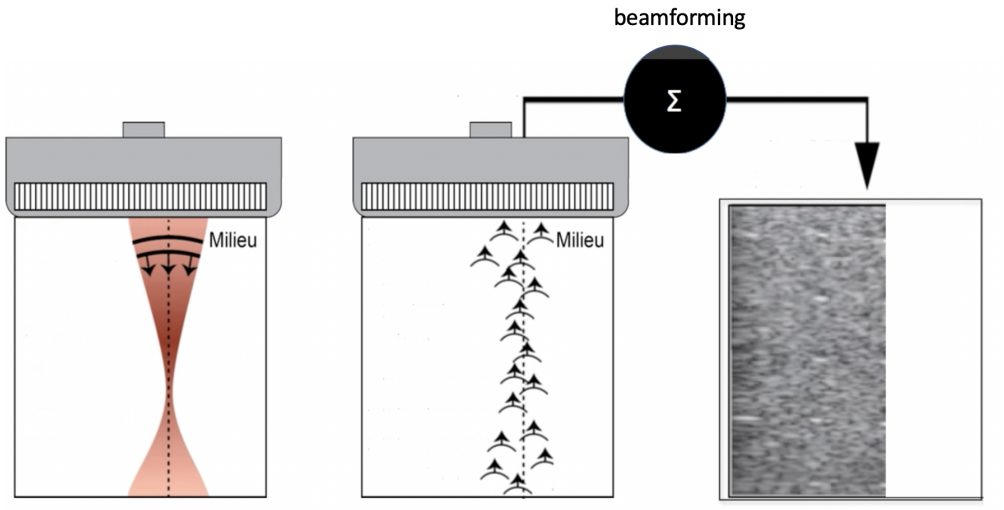


FIGURE 1.13 – Formation d'image par échographie conventionnelle (source : *fusultrasound.eu*).

1.2.2.1 L'échographie conventionnelle

L'image, en échographie conventionnelle, est obtenue ligne par ligne comme on peut le voir sur la figure 1.13. En appliquant une loi de retard parabolique aux voies connectées aux transducteurs piézoélectriques de la sonde échographique, on focalise le faisceau d'ultrasons sur une ligne du milieu afin d'y concentrer l'énergie acoustique. Les ondes rétro-diffusées par les diffuseurs présents dans la zone insonifiée sont alors captées et enregistrées par l'appareil et constituent ce qu'on appelle les signaux Radio-Fréquence (RF). L'image est alors reconstruite par estimation de la distribution d'échogénéicité dans le milieu par *beamforming*. Ce mode d'imagerie est communément appelé B-mode focalisé et constitue la grande majorité des examens échographiques médicaux actuels. Comme on a fait les hypothèses de diffusion simple et de vitesse uniforme de propagation du son dans le corps humain, on a donc l'assurance qu'un écho reçu provient d'un unique diffuseur.

1.2.2.2 Le *beamforming*

L'étape du *beamforming* intervient après que les échos aient été reçus par la sonde et enregistrés par l'appareil ; elle permet de reconstruire l'image, ceci étant fait ligne par ligne. Prenons l'exemple d'une ligne qui est le cas illustré sur la figure 1.13.

Le faisceau ultrasonore est focalisé sur une ligne et, par conséquent, seuls les diffuseurs présents dans cette zone sont susceptibles de renvoyer un écho. Pour un pixel donné de cette zone, chaque transducteur qui a émis puis écouté reçoit de chaque diffuseur un écho unique (diffusion simple et vitesse uniforme de propagation). Par ailleurs, l'écho reçu du pixel d'intérêt arrive à des temps différents sur les transducteurs du fait de sa position et on obtient alors ainsi une loi de retard à la réception. À partir des retards que l'on avait appliqués à l'émission pour focaliser le faisceau, on peut alors recaler l'écho du pixel de l'ensemble des transducteurs et, comme ces ondes sont cohérentes, sommer leurs amplitudes.

On obtient ainsi l'échogénéicité du pixel et, comme ce calcul est fait sur l'ensemble des pixels de la zone insonifiée, on obtient une carte en niveau de gris de l'échogénéicité de la ligne. En balayant l'ensemble des lignes et en juxtaposant ces cartes, on obtient l'image finale que l'on affiche le plus souvent en échelle logarithmique.

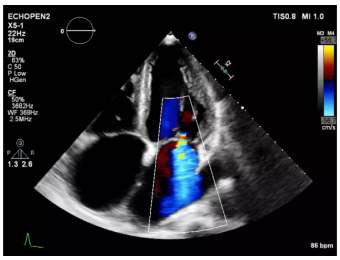
La cadence d'imagerie dans ce cadre est typiquement de quelques dizaines d'images par seconde pour une profondeur d'une dizaine de centimètres : c'est suffisant pour faire de l'imagerie en temps réel comme c'est de l'ordre du nombre d'images maximum que le cerveau humain peut traiter à la seconde.

Par ailleurs, l'échographie conventionnelle, comme elle utilise la focalisation en émission, concentre l'énergie acoustique ligne par ligne ce qui donne un contraste intéressant et ne nécessite que peu de mémoire pour l'appareil car il doit seulement garder en mémoire les échos correspondant à la ligne d'intérêt.

1.2.2.3 Applications

L'imagerie ultrasonore conventionnelle est largement utilisée en clinique dans de nombreux domaines. On peut citer les exemples de l'obstétrique ou de la gynécologie (figure 1.14.b), ou l'oncologie (figure 1.14.d) qui utilise le B-mode décrit précédemment. D'autres modes d'imagerie peuvent aussi le compléter comme on peut le voir sur les figures 1.14.a et 1.14.c [1] qui sont respectivement des exemples d'imagerie cardiaque et artérielle et qui utilisent le Doppler pour rendre compte des écoulements sanguins en plus du B-mode. Le Doppler en échographie sera détaillé ci-après.

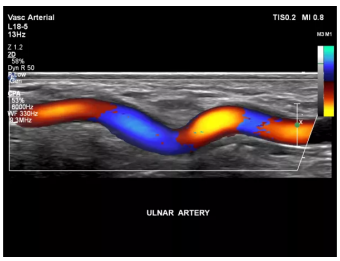
1. https://www.philips.fr/healthcare/resources/landing/ultrasound-article-pages/vascular



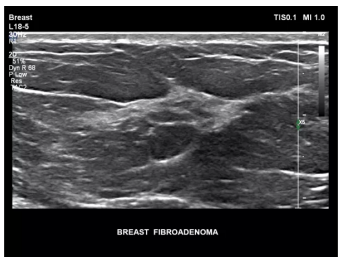
(a) Imagerie cardiaque avec Doppler



(b) Échographie obstétrique



(c) Imagerie de l'artère cubitale avec Doppler



(d) Échographie d'un fibroadénome du sein

FIGURE 1.14 – Exemple d'applications avec l'échographie conventionnelle (source : site Philips).

1.2.2.4 L'échographie ultrarapide

Nous venons de voir comment les images étaient formées avec l'échographie conventionnelle. Ainsi, on atteint des cadences d'imagerie de quelques dizaines d'images par seconde, typiquement cinquante images par seconde. C'est une des importantes limitations de la technique car elle empêche l'observation de phénomènes transitoires plus rapides qui sont nombreux à l'intérieur du corps humain. On peut donner l'exemple de la propagation d'ondes de cisaillement dans les tissus comme celles générées par la contraction cardiaque. Les cadences usuelles sont trop faibles pour suivre la propagation de ce type d'onde dont la mesure de la vitesse est particulièrement intéressante. En effet, la vitesse des ondes de cisaillement, typiquement de l'ordre de 1 à 20 m/s, est proportionnelle à l'élasticité du milieu traversé. Ainsi, imager la propagation de ces ondes permet d'accéder à la dureté des tissus et permet par exemple de détecter une tumeur dans un sein (J. Bercoff *et al* 2003 [17]), la tumeur étant plus rigide que le tissu sain alentour, sans avoir recours à la biopsie. On appelle cette méthode "élastographie par onde de cisaillement" et elle sera développée dans le chapitre 4.

Afin de lever cette barrière de cadence d'imagerie, une méthode alternative d'insonification du milieu a été trouvée. Plutôt que de balayer l'image en focalisant ligne par ligne, on effectue un tir unique d'une onde plane dans l'ensemble du milieu comme on peut le voir sur la figure 1.15 [1]. Cette technique a été mise au point, à la base, pour faire de l'élastographie par onde de cisaillement.

Pour ce faire, on applique une loi de retard uniforme aux voies qui relient l'appareil échographique à la sonde. L'onde plane se propage alors dans le milieu et est rétro-diffusée par les diffuseurs présents dans le milieu. On a toujours les hypothèses de diffusion simple et de vitesse uniforme de propagation des ultrasons. On enregistre alors les échos sur toutes les voies. Lors de leur propagation dans un milieu, les ondes planes conservent un front d'onde plan donc on peut utiliser exactement le même algorithme de *beamforming* dit de *delay and sum* décrit précédemment pour former une image. Ainsi, avec une seule insonification, on est capable d'obtenir une image de l'échogénéicité du milieu.

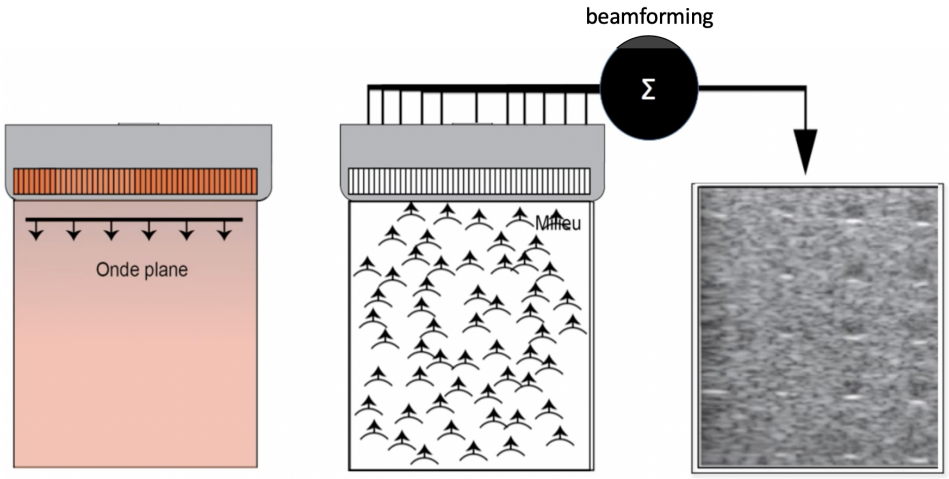


FIGURE 1.15 – Formation d'image par échographie ultrarapide.

Si l'on prend l'exemple d'une sonde échographique de 128 éléments et d'une cadence de 50 images par seconde en imagerie conventionnelle, on peut déjà gagner deux ordres de grandeur sur la cadence d'imagerie en passant à l'échographie par onde plane et arriver autour de 5 000 images par seconde.

L'imagerie par onde plane requiert l'enregistrement des échos sur toutes les voies

1. https://fultrasound.eu/

en simultané et ceci n'a été possible qu'avec le développement de la mémoire des appareils, de l'électronique, comme les convertisseurs analogique-numérique, dans la fin des années 1990 et des processeurs graphiques dans les années 2000.

Enfin, avec l'imagerie ultrasonore par onde plane, on insonifie le milieu une fois. Par conséquent, l'énergie acoustique est répartie dans tout le milieu et on perd donc en amplitude pour les échos enregistrés par rapport à l'échographie avec focalisation à l'émission. De plus, le constraste est significativement diminué du fait que les échos provenant de diffuseurs différents peuvent se superposer et interférer les uns avec les autres. C'est la contrepartie du gain en cadence d'imagerie. Cependant, il existe des moyens pour récupérer du contraste avec cette technique.

Sans rentrer dans le détail des équations, on admettra ici que, dans notre cas, on peut exprimer toute onde ultrasonore comme la somme d'ondes planes. En particulier, l'échographie conventionnelle qui utilise un faisceau focalisé peut être vu comme l'émission d'une somme d'ondes planes spécifiques. On peut alors créer ce qu'on appelle une focalisation synthétique en insonifiant successivement le milieu avec des ondes planes d'inclinaisons différentes.

Comme les inclinaisons des ondes planes sont différentes, les ondes n'arrivent pas au même moment sur un diffuseur (toujours dans le cadre des hypothèses de diffusion simple et de propagation à vitesse uniforme) et les échos enregistrés pour ce diffuseur sont donc propres à chacune de ces ondes planes d'inclinaisons différentes. On peut sommer les signaux obtenus pour chacune de ces ondes après *beamforming* et cela permet de réduire considérablement les interférences pour un même diffuseur et, par conséquent, améliorer le contraste.

Cette méthode, appelée *Plane Wave Compounding*, a été appliquée pour la première fois en imagerie ultrasonore ultrarapide en 2002 pour le domaine de l'élastographie (Tanter *et al* 2002 [154]) puis appliquée à la sommation cohérente (G. Montaldo *et al* [113]) en 2009 : on parle alors de *coherent plane-wave compounding*.

L'amplitude des ondes rétro-diffusées décroit exponentiellement avec la profondeur du fait de l'atténuation ultrasonore. En faisant l'hypothèse que le bruit provient essentiellement de l'électronique de l'appareil, il est uniforme et ceci entraîne que le rapport signal sur bruit (SNR) décroit également exponentiellement avec la profondeur de l'image.

De par sa conception, l'échographie conventionnelle maximise l'amplitude des échos provenant des diffuseurs présents sur la ligne où se fait la focalisation. L'imagerie ultrasonore par onde plane, elle, ne comporte pas de focalisation à l'émission et, par conséquent, on s'attend à observer une forte atténuation et donc un faible SNR. Grâce à la méthode de *coherent compounding* cela n'est pas le cas. En effet, le SNR obtenu via cette méthode peut être équivalent voire meilleur au SNR de l'imagerie ultrasonore focalisée à l'émission. Nous avons même la relation suivante :

$$\frac{SNR_{plan}}{SNR_{foc}} = \sqrt{\frac{L}{2a}} \tag{1.1}$$

Où SNR_{plan} et SNR_{foc} sont respectivement le SNR par imagerie ultrasonore avec ondes planes et *coherent compounding*, et le SNR par échographie focalisée conventionnelle. L représente la longueur de la matrice de transducteurs piézoélectriques et a l'ouverture utilisée, c'est-à-dire la longueur correspondant au nombre d'éléments utilisés pour l'insonification. Ainsi, ce rapport vaut toujours au moins 1 et montre donc que, avec les hypohèses faites, le SNR avec le *coherent compounding* est au moins aussi bon que celui en échographie conventionnelle.

Tout en repoussant la limite de la cadence d'imagerie jusqu'à un facteur 100, on est alors capable d'obtenir des images de qualité au moins équivalente à celles qu'on obtiendrait en échographie conventionnelle. Plus on a d'ondes à inclinaisons différentes, plus la qualité de l'image est bonne mais moins la cadence en imagerie est importante. Il s'agit donc, selon l'application voulue, de trouver le meilleur ajustement de ces paramètres. On appellera et utilisera par la suite imagerie ultrasonore avec ondes planes et *coherent compounding* imagerie ultrasonore ultrarapide.

1.2.3 Imagerie fonctionnelle ultrasonore

Jusqu'à présent, le fonctionnement de l'échographie a été explicité et notamment comment, grâce à cette technique, il était possible d'obtenir des images morphologiques dites "B-mode" traduisant l'échogénéicité du corps humain avec une bonne résolution spatiale (environ 100 µm) et également temporelle (jusqu'à 0.1 ms). Cependant, l'échographe permet également d'autres modes d'imagerie, comme l'élastogra-

phie par onde de cisaillement que l'on a brièvement évoquée mais aussi le Doppler dont on a vu des images sur la figure 1.14. Le Doppler en échographie est essentiel pour imager les flux sanguins et c'est ce qui permet maintenant de faire de l'imagerie fonctionnelle en échographie via le couplage neurovasculaire.

1.2.3.1 L'effet Doppler pulsé

L'effet Doppler le plus connu est l'effet Doppler continu qui décrit le décalage fréquentiel d'une onde monochromatique lorsque la source est en mouvement. Il est utilisé en échographie conventionnelle pour mesurer les flux rapides du corps humain (le sang dans les grosses artères par exemple). Lorsque le faisceau ultrasonore traverse un flux sanguin, la fréquence des ondes qu'il diffuse va être modifiée et la mesure de cette modification donne accès à la vitesse. Pour que ce soit réalisé en continu, la moitié des transducteurs émet tandis que l'autre reçoit, les deux sans interruption. Par conséquent, si cette méthode permet de calculer la vitesse précisément, on n'a plus les informations suffisantes pour faire une image.

L'effet Doppler qui nous intéresse ici est une variante pulsée et non pas monochromatique : il est basé sur le principe qu'un diffuseur en mouvement n'aura pas le même écho entre deux cycles d'émission/réception.

Dans ce cas, on peut montrer que l'écho du diffuseur en mouvement reçu par les transducteurs piézoélectriques oscille à une fréquence $f_{Doppler}$ proportionnelle à la vitesse que l'on appelle fréquence Doppler. On obtient la relation suivante :

$$f_{Doppler} = \frac{2 f_{pulse} v_z}{c_0 PRF} \tag{1.2}$$

Où f_{pulse} est la fréquence de l'impulsion électrique envoyée aux éléments de la sonde échographique, v_z la composante verticale de la vitesse du diffuseur, c_0 la vitesse du son et la PRF, la Pulse Repetition Frequency qui représente le délai entre chaque tir ultrasonore. On a accès ainsi à la vitesse axiale du diffuseur.

Ainsi, on est capable, avec l'imagerie ultrasonore, d'observer mais aussi de quantifier les mouvements qui ont lieu à l'intérieur du corps humain, qu'ils soient tissulaires

ou fluides (le sang par exemple). Par conséquent, si on arrive à imager les flux sanguins dans le cerveau, on peut avoir accès aux activations neuronales via le couplage neurovasculaire. Afin d'accéder à la vitesse des flux sanguins, il faut d'abord réussir à séparer le signal d'intérêt du reste, notamment du mouvement tissulaire.

Il existe différentes méthodes pour mettre en oeuvre ce filtrage. On peut citer par exemple une des plus répandues, le filtrage temporel passe-haut. En effet, il est généralement vérifié que le mouvement tissulaire se fasse à une vitesse moindre par rapport à celle des flux sanguins et donc à une $f_{Doppler}$ plus faible. Un filtre passe-haut avec la fréquence de coupure adéquate permettrait donc bien de garder le signal hémodynamique à partir des données enregistrés. La bonne séparation du signal tissulaire du signal sanguin est primordiale, notamment lorsqu'on commence à faire de l'imagerie éveillée, et certaines pistes d'amélioration seront présentées ultérieurement dans ce document.

Il existe différentes techniques qui permettent, au moyen de l'effet Doppler pulsé qu'on a abordé ci-dessus, d'imager et/ou de quantifier les flux sanguins. Les plus fréquentes sont le Doppler spectral, le Doppler de couleur et le Doppler de puissance.

1.2.3.2 Le Doppler spectral

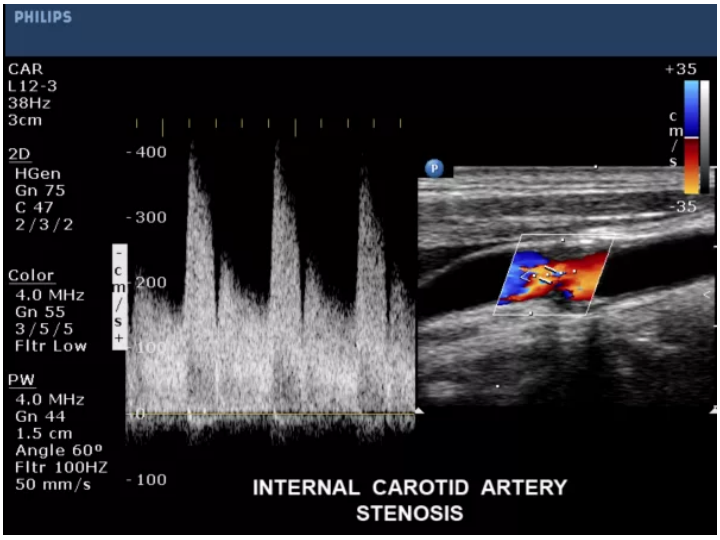


FIGURE 1.16 – Doppler conventionnel spectral de la carotide - accès au profil temporel de variation de la vitesse du sang et mise en évidence de la pulsatilité cardiaque (source : site Philips).

Le Doppler spectral a été développé afin d'avoir une information quantitative absolue. Dans ce cas, on ne délimite plus une zone après avoir fait le B-mode mais on prend un seul point de l'image à la fois pour lequel on va répéter autant de cycles d'émission/réception focalisées sur la ligne que l'on souhaite. Cette accumulation permet de rendre plus performant le filtrage temporel passe-haut pour séparer le signal des tissus du signal sanguin et de faire une analyse de Fourier.

Cette dernière permet de montrer comment évolue la vitesse au cours du temps et on affiche souvent ces informations sous forme de spectrogramme qui est affiché en temps réel comme on peut le voir sur la figure 1.16. La partie droite de la figure est un Doppler couleur.

1.2.3.3 Le Doppler couleur

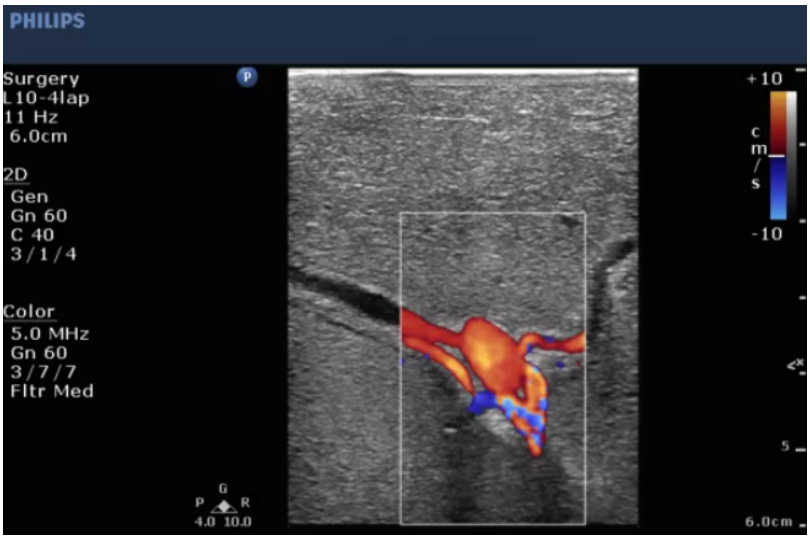


FIGURE 1.17 – Doppler conventionnel couleur de l'artère hépatique en péropératoire - accès à la vitesse des flux sanguins dans la zone choisie (source : site Philips).

Le Doppler couleur est disponible sur la grande majorité des échographes sur le marché et fonctionne bien avec l'échographie conventionnelle. C'est une technique basée sur l'effet Doppler pulsé et se déroule généralement en trois étapes. On donne un exemple sur la figure 1.17 pour illustrer.

1. B-mode en niveau de gris qui donne l'information morphologique de la zone (cf figure 1.17).

2. Choix de la zone (rectangle sur la même figure) dans laquelle on souhaite obtenir la vitesse des flux sanguins pour pouvoir augmenter la PRF et limiter le nombre de focalisations à l'émission.

3. Imagerie focalisée répétant plusieurs cycles d'émission/réception pour chaque ligne de l'image Doppler finale.

On obtient ainsi, pour la sous-zone délimitée, un ensemble de signaux continus dans le temps pour les pixels de cette région. Après le filtrage temporel passe-haut décrit plus haut, les fréquences Doppler sont calculées et traduites en vitesses axiales pour les diffuseurs qui sont ici majoritairement les globules rouges pour être enfin affichées en couleur : le bleu pour les diffuseurs sanguins qui s'éloignent de la sonde et le rouge pour des diffuseurs sanguins qui s'en rapprochent.

Le Doppler couleur donne, en conventionnel, des résultats satisfaisants mais ils sont confinés dans la sous-zone délimitée et, comme on a pour chaque abscisse multiplement focalisée qu'une dizaine de points en général, le filtrage temporel passe-haut ne fonctionne pas de manière optimale et donc on n'est plus certain de la bonne séparation entre les signaux provenant des tissus et ceux provenant des flux sanguins.

1.2.3.4 Le Doppler de puissance

L'échographie conventionnelle permet aussi de faire du Doppler de puissance. C'est une méthode très similaire au Doppler couleur : les trois étapes listées précédemment son également valables ici. La différence arrive après l'enregistrement et le filtrage temporel passe-haut des signaux focalisés plusieurs fois à la même position pour l'ensemble des lignes balayées constituant la sous-zone délimitée.

On ne calcule plus la fréquence Doppler pour remonter à la vitesse axiale des diffuseurs mais on calcule, à la place, la puissance du signal c'est-à-dire l'intégrale de l'amplitude au carré de ces signaux. Cette intégrale est proportionnelle au volume de sang dans chaque pixel de la zone (J.M. Rubin *et al* 1994 [139]). Le Doppler de puissance est beaucoup plus sensible et permet de mieux voir les petits flux par comparaison avec le Doppler couleur (cf figure 1.18). Cependant, le Doppler de puissance ne donne pas d'information quantitative absolue.

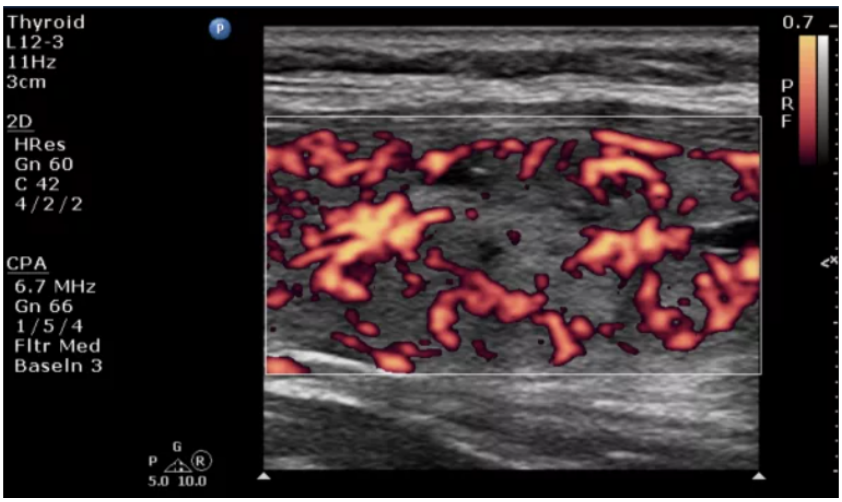


FIGURE 1.18 – Doppler conventionnel de puissance de la thyroïde - accès au volume sanguin dans les pixels de la zone choisie (source : site Philips).

1.2.3.5 Le Doppler ultrasensible

L'échographie conventionnelle utilise la focalisation à l'émission. Par conséquent, pour analyser des signaux correspondants à des échos de cycles d'émission/réception continus, il est nécessaire de focaliser plusieurs fois la même ligne et donc de réduire la zone dans laquelle il est possible d'accéder à l'information sur les flux sanguins.

L'échographie ultrarapide ne focalise elle pas à l'émission, l'insonification se fait par onde plane et donc on a la continuité sur l'ensemble des pixels de l'image ce qui a, en plus d'augmenter au maximum la zone étudiée, l'effet supplémentaire d'accroitre les performances du filtre pour séparer le signal tissulaire du signal sanguin. Par ailleurs, on retrouve l'aspect quantitatif si on effectue une analyse de Fourier à l'image de ce qu'on a vu précédemment pour le Doppler spectral.

Cette différence fondamentale entre échographie conventionnelle (en haut) et ultrarapide (en bas) est illustrée sur la figure 1.19 [1] où un Doppler de puissance a été réalisé pour imager la vasculature d'un cerveau de rat. En plus d'illustrer ceci, on peut également observer que le Doppler de puissance semble de bien meilleure qualité en imagerie ultrarapide qu'en imagerie conventionnelle. Nous allons voir que c'est bien le cas.

1. https://fultrasound.eu/

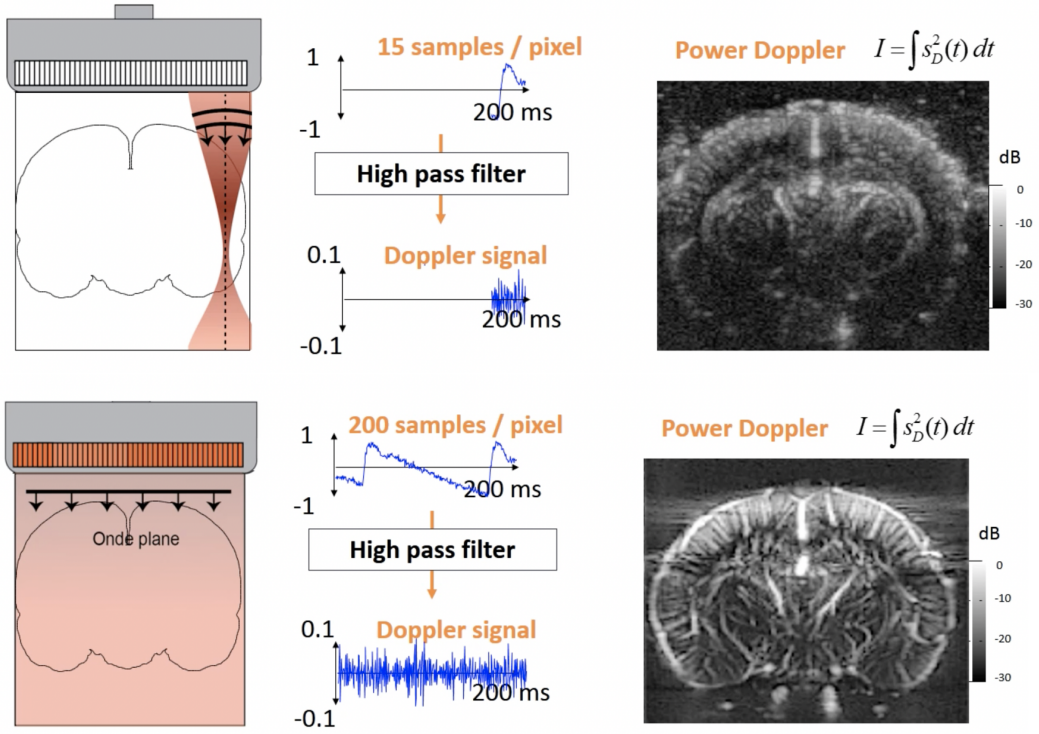


FIGURE 1.19 – Dopplers de puissance conventionnel (haut) et ultrasensible (bas) (source : thèse de doctorat E. Macé 2011).

De même que pour le B-mode, le SNR du Doppler de puissance ultrarapide SNR_{ur} est, à profondeur donnée z et à nombre d'angulations des ondes planes "suffisant" n, meilleur que le SNR_{conv}, celui en échographie conventionnelle (J. Bercoff *et al* 2011 [18]) (L est la longueur de la matrice de transducteurs piézoélectriques) :

$$\frac{SNR_{ur}(z,n)}{SNR_{conv}(z)} = \frac{\sqrt{nz\lambda}}{L} \tag{1.3}$$

Par ailleurs, en plus du gain en SNR, il y a aussi un gain en sensibilité en raison du plus grand nombre d'échantillons temporels disponibles en imagerie ultrarapide par rapport à l'imagerie conventionnelle.

Soit S la sensibilité du Doppler de puissance, il a été montré que (Macé *et al* 2013 [104] ; Macé *et al* 2011 [103]) :

$$\frac{S_{ur}}{S_{conv}} \approx n\sqrt{\frac{N_{ur}}{N_{conv}}} \tag{1.4}$$

Où N_{ur} et N_{conv} sont respectivement les nombres de points temporels pris en compte dans le calcul pour le Doppler de puissance ultrasensible et celui en conventionnel. On a vu que c'était un des atouts majeurs de l'imagerie ultrarapide d'avoir plus de points temporels. Ainsi, sans trop augmenter le nombre d'angles et donc sans trop baisser la cadence d'imagerie, on a un gain en sensibilité. Ce gain en sensibilité peut atteindre typiquement jusqu'à un facteur 50.

Enfin, il existe différentes manières de filtrer le signal issu du tissu du signal issu du sang. Plutôt récemment, il a été proposé (C. Demené *et al* 2015 [43]) une méthode alternative au filtrage temporel passe-haut dont les performances sont bien meilleures, utilisant la Décomposition en Valeurs Singulières (SVD). La SVD est une méthode numérique qui prend en compte les différences entre les mouvements du tissu et celui du sang en termes de cohérence spatiotemporelle. Plutôt que de filtrer uniquement temporellement, le filtre qui utilise la SVD prend en compte jusqu'à quatre dimensions (trois d'espace et une de temps). Cette méthode a même permis de détecter des petits flux sanguins (jusqu'à 1 mm/s), qui n'avaient jamais pu être observés auparavant en échographie.

Le Doppler ultrasensible est certes une modalité assez récente mais elle a déjà permis de nombreuses études sur différents parties du corps humain comme le coeur (B.F. Osmanski *et al* 2014 [124]).

Grâce à ces améliorations multiples, le Doppler de puissance ultrasensible va permettre de faire de l'échographie une modalité de neuroimagerie fonctionnelle.

1.2.3.6 Imagerie ultrarapide ultrasonore fonctionnelle du cerveau

L'imagerie ultrarapide ultrasonore fonctionnelle du cerveau sera appelée fUS dans le reste du document, pour *functional UltraSound*. La première preuve de

concept en fUS a été effectuée en 2011 (Macé *et al* 2011 [103]). Cela a été rendu possible grâce à l'avènement du Doppler ultrasensible décrit précédemment qui a permis de détecter les variations de volume sanguin dans certaines régions du cerveau d'un rat après stimulation des vibrisses comme on peut le voir sur la figure 1.20 [1] .

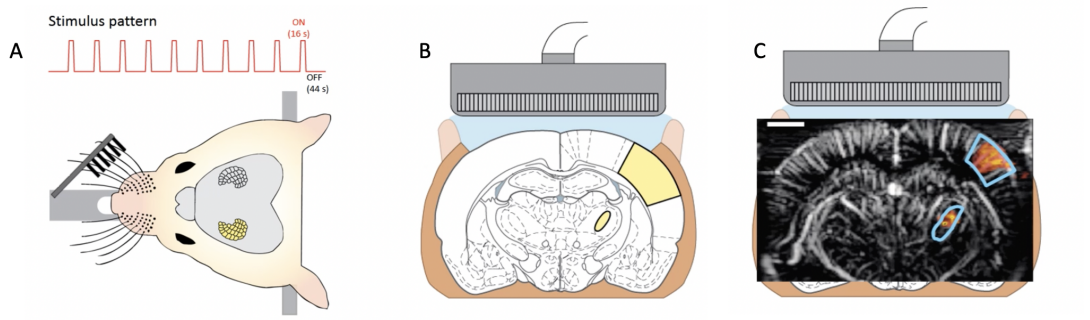


FIGURE 1.20 – Imagerie fonctionnelle ultrarapide ultrasonore après stimulation des vibrisses chez le rat : A) Schéma du stimulus des vibrisses. Un côté est brossé périodiquement selon le signal affiché. B) Schéma du dispositif expérimental où l'on voit la sonde échographique au-dessus du plan coronal d'intérêt dont on a représenté l'atlas anatomique et marqué en jaune les régions du cerveau dont l'activation est attendue avec ce stimulus : une partie du cortex et une partie du thalamus. C) L'atlas de B est remplacé par le résultat avec le fUS où on peut observer le Doppler ultrarapide en niveau de gris et en orange les zones activées, c'est-à-dire les zones dont le volume sanguin des pixels suit le schéma de stimulation (source : Macé *et al* 2011 [103]).

Pour la suite du document, on appellera le volume sanguin dans le cerveau, CBV, pour *Cerebral Blood Volume*.

Dans cette preuve de concept, les variations de CBV qui suivent le schéma des stimuli des vibrisses sont précisément situées dans les zones attendues : le cortex somatosensoriel (S1BF) et le thalamus. La stimulation active les neurones de ces régions cérébrales et le couplage neurovasculaire se met en place. L'afflux sanguin dans ces zones entraine une augmentation locale du CBV et c'est ce que le fUS détecte et révèle.

Depuis cette première preuve de concept en 2011, le fUS a connu un essor considérable et cela à ouvert des nombreuses possibilités d'études précliniques comme le système auditif chez le furet (C. Bimbard *et al* 2018 [23]), encore le système visuel chez le rat (M. Gesnik *et al* 2017 [58]), le décocade des intentions de mouvements

1. https://fultrasound.eu/

chez les primates (Norman *et al* 2020 [120]) ... En utilisant une sonde matricielle à deux dimensions, il est même possible de faire à présent du fUS en 4D (C. Rabut *et al* 2019 [135]). Il y a aussi eu des études chez l'être humain adulte lors d'opérations nécessitant des craniotomies (Imbault *et al* 2019 [81] ; Soloukey *et al* 2020 [151]) ou encore chez le nouveau-né via la fontanelle (Baranger *et al* 2021 [11]).

1.2.3.7 Connectivité fonctionnelle en ultrasons

L'activation neuronale n'est pas restreinte à la réaction à un stimulus : il existe une activité cérébrale spontanée, qui ne nécessite ni de stimulation externe ni la réalisation d'une tâche spécifique. Cet état où les seuls mouvements qui ont lieu sont ceux qui sont essentiels comme la respiration ou encore les battements cardiaques est appelé *resting-state* ou état de repos. Ce phénomène a été observé pour la première fois en IRMf. Il a ainsi été permis de mettre en évidence des fluctuations temporelles basse fréquence (de 0,01 Hz à 0,1 Hz) spontanées des signaux BOLD (Biswal *et al* 1995 [24]) de certaines zones physiologiques cérébrales distinctes spatialement mais ayant des fonctionnements associés qui sont fortement corrélées temporellement (Fox *et al* 2005 [54]) : c'est ce qu'on appelle la connectivité fonctionnelle (Lowe *et al* 1998 [101]). L'étude de ces fluctuations nous renseigne ainsi sur les liens fonctionnels entre différentes régions cérébrales.

La connectivité fonctionnelle a, jusqu'à présent, principalement été étudiée en IRMf. Plusieurs études d'IRMf en *resting-state* ont démontré que le cerveau s'organisait en réseaux récurrents chez le même individu mais également chez les autres individus étudiés (Damoiseaux *et al* 2006 [39]). Chacun de ces réseaux se définit par la présence ou l'absence de liaisons entre zones physologiques du cerveau en termes de connectivité fonctionnelle. Dans le cas de de certaines pathologies affectant le cerveau, commes la dépression, la schizophrénie ou encore la maladie d'Alzheimer, ces réseaux de connectivité sont modifiés (Greicius 2008 [62]). L'étude de la connectivité fonctionnelle permet ainsi de caractériser ces pathologies, d'en permettre une meilleure compréhension et peut-être même le développement de futurs traitements.

Il vient d'être montré que de telles études sont également possibles avec le fUS (Ferrier *et al* 2020[52]) : le *default mode network*, qui est le réseau de connectivité fonctionnelle par défaut au repos, est mis en évidence et se désactive lors d'une tâche chez la souris. La preuve de la présence de ce mode par défaut chez la souris vient

compléter les observations déjà faites chez le rat (Lu *et al* 2012 [102]), le primate (Mantini *et al* 2011 [106]), et l'homme (Greicius *et al* 2003 [63]). Le fUS permet aussi d'étudier la connectivité fonctionnelle comme l'illustre la figure 1.21 (B.F. Osmanski *et al* 2014 [123]). Cette figure est tirée d'une étude sur la connectivité fonctionnelle chez le rat anesthésié.

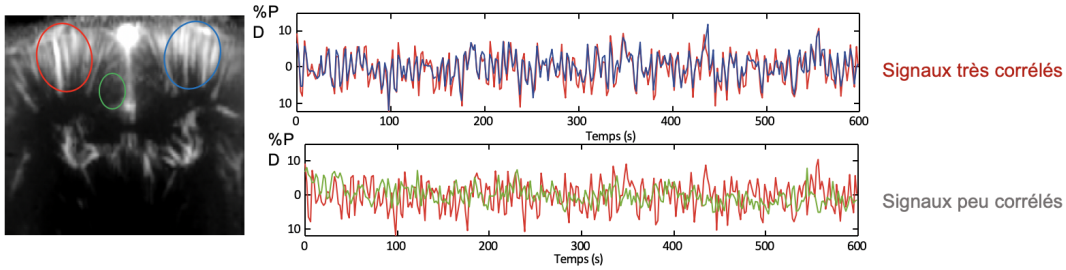


FIGURE 1.21 – Connectivité fonctionnelle chez le rat anesthésié. À gauche, le Doppler ultrarapide avec trois régions entourées en couleur dont sont étudiées la connectivité. À droite, le profil temporel du CBV normalisé et moyenné des trois zones colorées. Les signaux bleu et rouge varient similairement à l'opposé des rouge et vert (source : Osmanski *et al* 2014 [123]).

Pour ce faire, on compare les profils temporels des variations en CBV des zones du cerveau qui nous intéressent et on calcule la corrélation temporelle de ces signaux entre eux. La corrélation rend compte de la similarité des variations de signaux comparés. S'ils varient de la même manière, comme les signaux bleu et rouge sur la figure 1.21, ils auront un fort coefficient de corrélation, c'est-à-dire proche de 1. Ces zones du cerveau sont alors connectées au sens de la connectivité fonctionnelle : elles présentent les mêmes variations de CBV.

Si à l'inverse, leurs variations sont différentes, à l'instar des signaux rouge et vert, on a une faible corrélation et donc un coefficient de corrélation proche de 0 pour les deux signaux comparés. Ces deux zones ne sont donc pas connectées au sens de la connectivité fonctionnelle. On représente souvent la connectivité sous forme de matrice comme celle présentée en figure 1.22 (même étude que la figure précédente [123]) : en abscisses et en ordonnées sont représentées les zones du cerveau d'intérêt et ensuite elles sont comparées deux à deux et les coefficients de corrélation résultants sont renseignés.

Par ailleurs, le fUS a également permis de retrouver des résultats d'études pharmacologiques déjà publiés en IRMf. En effet, la scopolamine, molécule anticholiner-

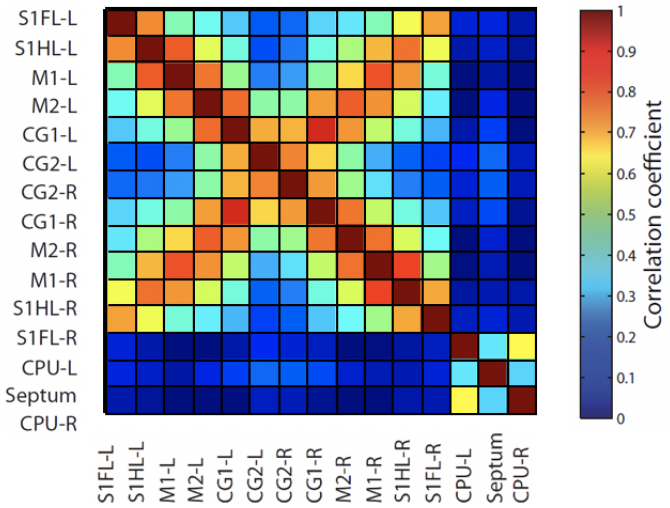


FIGURE 1.22 – Matrice de connectivité fonctionnelle (source : Osmanski *et al* 2014 [123]).

gique utilisée comme modèle de la maladie d'Alzheimer, modifie sensiblement, et de manière réversible, la connectivité fonctionnelle des souris comme Shah *et al* l'ont montré en IRMf en 2015 [63]) et Rabut *et al* l'ont montré en fUS en 2020 [136]).

1.2.3.8 Le fUS en résumé

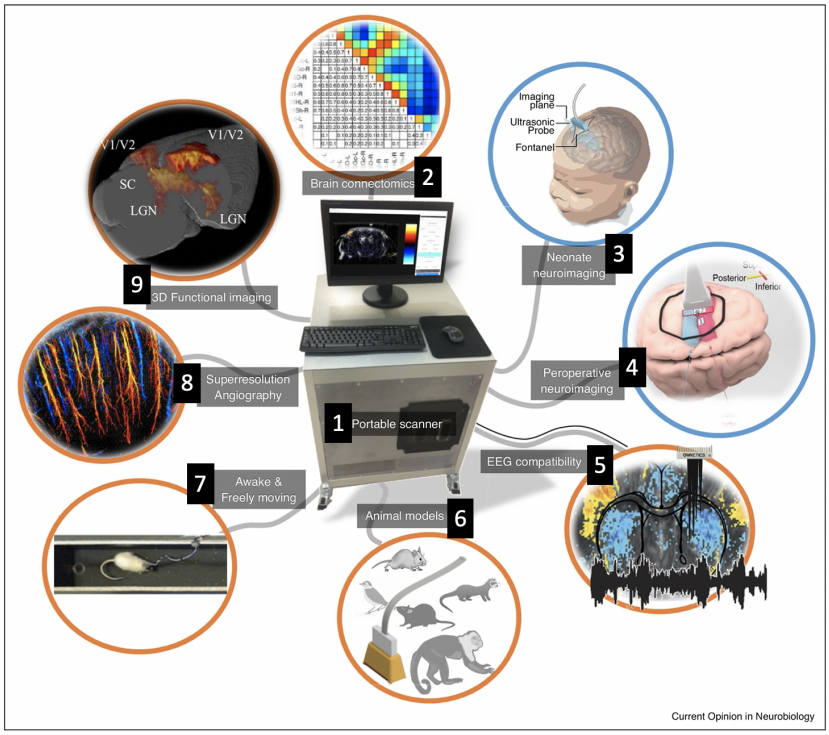


FIGURE 1.23 – Avantages de l'imagerie ultrasonore ultrarapide fonctionnelle : 1) Appareil portable (l'échographe fait 1 mètre cube environ) et relativement peu cher (1 voire 2 ordres de grandeur de moins par rapport au prix d'une machine IRM). 2) Accès à la connectivité fonctionnelle. 3) Imagerie clinique. 4) Imagerie péroparatoire. 5) Compatibilité avec d'autres techniques : EEG, TEP, optogénétique,... 6) Imagerie préclinique. 7) Imagerie éveillée et en mouvement. 8) Excellente résolution spatiale (100 μm voire 10 μm en super-résolution avec agent de contraste ultrasonore (C. Errico *et al* 2015 [49])). 9) Imagerie fonctionnelle cérébrale en 2D et 3D au cours du temps avec une excellente résolution temporelle (0,1 ms).

1.3 Objectifs de la thèse

1.3.1 Développement du fUS chez le petit animal éveillé

Le fUS est devenu en 2011 la première véritable application des ultrasons pour faire de l'imagerie fonctionnelle cérébrale. Il s'agissait à l'époque d'une preuve de concept sur animal anesthésié. C'est le cas aussi d'une grande majorité des études en fUS qui ont suivi. Or, on sait dorénavant que les anesthésies peuvent affecter le comportement du cerveau et modifier la connectivité fonctionnelle (A.G. Hudetz 2012 [74]). Cela a été également prouvé en fUS par Ferrier *et al* en 2020 [52] qui a montré chez la souris que la connectivité fonctionnelle s'estompe avec la profondeur de l'anesthésie. Par conséquent, pour accéder au fonctionnement du cerveau sans biais, il faut pouvoir s'affranchir de l'anesthésie et faire de l'imagerie éveillée.

Le fUS, de par sa simplicité et la petite taille de la sonde échographique, présente des avantages pour faire de l'imagerie fonctionnelle cérébrale éveillée du petit animal. Cependant, cela ajoute un défi technologique supplémentaire pour que ce soit le moins contraignant possible pour l'animal tout en gardant une bonne qualité de transmission de données. L'environnement expérimental alors n'est plus contrôlé comme il peut être sous anesthésie et il faut alors essayer de prévenir toutes les conséquences éventuelles du mouvement de l'animal imagé. Le mouvement du sujet imagé induit des artefacts qui viennent dissimuler l'information hémodynamique recherchée et cela demande donc également de développer des techniques numériques pour nettoyer les données bruitées obtenues.

La partie 2 de ces travaux consistera donc au développement du fUS éveillé chez le petit animal et plus particulièrement chez la souris.

1.3.2 Application du fUS à un contexte social

Les interactions sociales qu'un individu peut avoir sont essentielles pour son développement et sa santé (Umberson *et al* 2010 [164]). Certaines pathologies, comme les troubles autistiques, affectent le comportement social et, par conséquent, peuvent perturber ce développement (Topal *et al* 2018 [160]). L'imagerie fonctionnelle cérébrale pendant des interactions sociales entre sujets serait particulièrement intéressante pour identifier les mécanismes et régions impliqués dans les troubles autistiques

ainsi que leurs liens avec les gènes impliqués.

Les interactions sociales nécessitent naturellement que les sujets imagés soient éveillés, et souvent libres de leurs mouvements. Les développements du fUS éveillé produits pendant cette thèse en plus de l'ensemble des travaux qui avaient déjà été faits sur le sujet permettent alors d'envisager de répondre à certaines questions scientifiques actuelles autour des interactions sociales.

En collaboration avec l'Institut Pasteur et l'Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris (IPNP), on verra dans le chapitre 3 des applications du fUS éveillé et dans un contexte social, notamment de pathologies qui les influencent comme le trouble autistique ou l'étude de la reconnaissance sociale et environnementale.

1.3.3 Étude du couplage neuromécanique

Le fUS donne des informations sur l'activation neuronale via le couplage neurovasculaire qui est un phénomène physiologique particulièrement complexe et dont la compréhension n'est pas complète, encore à ce jour. En plus des variations locales de flux sanguin qu'il induit, le couplage neurovasculaire peut notamment aussi entrainer une modification locale de la rigidité tissulaire. Étudier les propriétés mécaniques lors de l'activité cérébrale pourrait ainsi nous apporter de nouvelles informations sur le fonctionnement du couplage neurovasculaire et ainsi nous aider à comprendre certaines pathologies qui l'affectent comme la maladie d'Alzheimer ou encore la maladie de Parkinson.

À l'origine, l'imagerie ultrasonore ultrarapide a été développée pour des considérations mécaniques, et plus particulièrement pour faire de l'élastographie, c'est-à-dire de la mesure du module d'Young du milieu imagé.

Nous verrons dans le chapitre 4 comment il est possible d'accéder à la valeur de ce module en mesurant la vitesse des ondes de cisaillement dans le corps humain. Comme ces ondes se propagent rapidement (de l'ordre du m/s dans les tissus mous), il faut une cadence d'imagerie élevée pour pouvoir observer sa propagation et en extraire la vitesse.

L'imagerie ultrasonore ultrarapide permet une mesure instantanée du module d'élasticité local. On cherchera à répondre à la question suivante : l'activité neuronale

modifie-t-elle localement les propriétés mécaniques du cerveau ?

On essayera de répondre à cette question dans le chapitre 4, en investiguant ce potentiel couplage neuromécanique qui pourrait, si avéré et instantané, permettre une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques impliqués lors de l'activité cérébrale.

2 Méthodes pour le fUS chez la souris éveillée

Grâce à l'avènement de l'imagerie ultrasonore ultrarapide au début des années 2000, et au développement de l'électronique et de l'informatique, il est désormais possible de faire de l'imagerie fonctionnelle du cerveau avec l'échographie.

Le fUS présente de nombreux avantages par rapport à un certain nombre d'autres techniques de neuroimagerie fonctionnelles comme la portabilité et la relative simplicité du dispositif. Souvent basées sur l'IRMf, les études fonctionnelles du cerveau se retrouvent souvent bloquées par l'encombrement des machines (elles sont chères donc rares et prennent beaucoup de place), ou par les limitations liées à la technique : l'IRMf nécessite notamment que les sujets étudiés soient immobiles, ce qui impose l'anesthésie ou la contrainte chez les petits animaux. L'accès au fUS permet déjà à plusieurs équipes de compléter leur recherche en neurobiologie par une étude fonctionnelle.

C'est le cas de l'équipe de Thomas Bourgeron du laboratoire Génétique Humaine et Fonctions Cognitives de l'Institut Pasteur et aussi de l'équipe de Rebecca Piskorowski et Cécile Viollet du laboratoire Plasticité Synaptique et Réseaux Neuronaux à l'institut de psychiatrie et neurosciences de Paris avec lesquels j'ai eu la chance de travailler afin de faire avancer à la fois leur projet, et la technique du fUS chez le petit animal éveillé. On reviendra en détail sur ces collaborations dans le chapitre 3 qui ont permis de mettre en application les développements du chapitre 2.

Dans ce chapitre 2, à la lumière de tout ce qui a été introduit dans le chapitre 1, il sera discuté du fUS et de la neuroimagerie fonctionnelle chez le petit animal éveillé : être capable de se passer de l'anesthésie permet de s'affranchir des biais qu'elle peut

introduire sur le fonctionnement cérébral. Par sa simplicité et grâce à la petite taille de la sonde échographique, le fUS semble particulièrement adapté à cette utilisation. On en exposera les enjeux et les limites et on essaiera de les repousser à la fois en termes pratiques avec le matériel mais aussi en termes de qualité d'image.

Dans le domaine du médical, la recherche nécessite encore dans certaines situations bien précises l'utilisation de modèles animaux. À l'instar de la culture de cellules ou de la modélisation informatique, de nombreuses méthodes alternatives ont été développées pour éviter cette utilisation. Cependant, elles ne permettent pas de rendre compte entièrement de la complexité du vivant. C'est en combinant toutes ces approches que l'on parvient à la meilleure compréhension possible du fonctionnement de l'être humain mais aussi des mécanismes des pathologies qui l'affectent.

Le génome de la souris est 14 % plus petit que celui de l'être humain mais 99 % du génome de la souris est homologue à celui de l'Homme, c'est-à-dire que les gènes en question sont soit identiques soit extrêmement proches d'une espèce à l'autre. Par ailleurs, la souris a le crâne suffisamment fin pour ne pas détériorer les images de son cerveau obtenues par imagerie ultrasonore ultrarapide. Pour ces deux raisons majeures, la souris est donc un organisme très intéressant pour l'étude avec le fUS de pathologies qui affectent l'Homme.

L'utilisation des modèles animaux est très encadrée. En France, c'est de la directive européenne 2010/63/EU du 22 septembre 2010 dont découle la réglementation appliquée. Elle fixe le cadre des espèces concernées, de l'origine des animaux, des agréments et des contrôles des établissements qu'ils soient éleveur, fournisseur ou utilisateur, de l'évaluation éthique et de l'autorisation des projets de recherches. Par ailleurs, la douleur, le stress et le bien-être des animaux sont au centre des réflexions des chercheurs afin de s'assurer de leur optimisation.

Toutes les expériences animales liées aux travaux présentées dans ce document ont été conduites dans le respect de cette réglementation. Les recommendations ARRIVE (site internet de la NC3Rs [8]) ont été appliquées et l'ensemble des procédures ont été validées et autorisées par les autorités compétentes dont le CEEA-59 (Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale Paris Centre et Sud).

2.1 Le fUS chez la souris éveillée

L'imagerie fonctionnelle d'un sujet anesthésié est une pratique dorénavant courante, quelle que soit la modalité d'imagerie utilisée. Imager un sujet éveillé est souvent plus complexe mais, si on arrive à contourner ces difficultés, la plus-value scientifique est considérable. Le fUS semble particulièrement adapté à cela, notamment pour étudier les petits animaux tels que la souris. Le fUS a déjà été utilisé dans l'étude d'animaux éveillés comme le rat en mouvement (L.A. Sieu *et al* 2015 [149]), le primate effectuant des tâches conscientes (A. Dizeux *et al* 2019 [46]) et la souris éveillée "libre" de ses mouvements (E. Tiran *et al* 2017 [158]) .

2.1.1 Nécessité de l'imagerie éveillée

En préambule, il convient de mentionner une limitation majeure des ultrasons dans l'imagerie du cerveau : le crâne. En effet, le crâne est un os poreux, avec une structure très irrégulière d'un endroit à un autre mais aussi d'un individu à un autre. Cela perturbe l'imagerie et déforme notamment la tâche focale. L'image obtenue n'est alors plus fiable en terme de précision : comme la tâche focale est déformée, l'image résultante l'est aussi et ce qu'on observe n'est pas nécessairement à l'endroit indiqué. Chez les souris par exemple, le crâne est suffisamment fin pour que son influence soit négligeable. Chez le rat ça n'est déjà plus le cas et on peut être amené à en retirer une partie pour réaliser l'imagerie ultrasonore. Chez l'Homme, on peut utiliser la fontanelle chez le nouveau-né (J. Baranger *et al* 2021 [11]) ou passer par la tempe (Demené *et al* 2012 [44]) qui est l'endroit le plus fin du crâne ou enfin en péropératoire quand l'opération nécessite une ablation d'une partie du crâne (Imbault *et al* 2017 [81]). C'est un sujet de recherche très actif dans le domaine.

La souris est un des modèles animaux les plus importants dans la recherche préclinique en neurosciences, notamment grâce aux développements de nombreux modèles génétiques. Cependant, les études comportant de l'imagerie fonctionnelle "cerveau entier" sont particulièrement rares pour cette espèce. En effet, l'IRMf, qui est la modalité de référence, souffre notamment de distorsions d'image, de perte de sensibilité et même de perte de signal dans cette situation (F.A. Nasrallah *et al* 2014 [118]). Par ailleurs, la résolution spatiale de l'IRMf peut atteindre la dizaine de microns, ce qui serait largement suffisant pour faire de la neuroimagerie fonctionnelle chez la

souris. Cependant, plus la résolution spatiale est petite, et plus le temps d'acquisition est long : 6-24h pour 20-50 μm de résolution spatiale (Turnbull *et al* 2007 [162]). Les petits temps d'acquisitions s'accompagnent donc d'une résolution spatiale plus grande, qui ne permet plus nécessairement de décrire les petits vaisseaux du cerveau de la souris.

Du fait de sa résolution temporelle (de l'ordre de la seconde) et de son principe de fonctionnement, l'IRMf requiert également que le sujet étudié soit, en général, immobile. Si chez l'être humain, cette condition est facilement réalisable, cela est plus compliqué chez l'animal : on peut apprendre à rester statique à un primate par exemple mais pour la souris, qui est un animal très mobile, il est presque imposible d'avoir la garantie d'immobilité. Il y a de plus en plus d'études en IRMf chez le petit animal éveillé, mais elles utilisent des moyens de contention pour maintenir l'animal immobile qui induisent du stress dont on sait qu'il modifie les circuits neuronaux dans le cerveau (Nair *et al* 2020 [117]).

En plus de l'IRMf, il existe aussi de l'imagerie fonctionnelle éveillée en optique chez la souris (P.W. Wright *et al* 2017 [167]), en TEP chez le rat (P.K. Thanos *et al* 2013 [157]) mais elles requièrent également l'immobilité du sujet imagé. Cependant, ces modalités offrent bien souvent un champ de vue très restreint et s'accompagnent généralement de procédures très invasives.

L'anesthésie permet de s'affranchir de cette difficulté mais pose deux problèmes majeurs. D'une part, il est connu à présent que les anesthésiques influencent le métabolisme : la fréquence respiratoire et le rythme cardiaque par exemple, mais aussi l'activité neuronale et les flux sanguins dans le cerveau (K.M. Lahti *et al* 1999 [92]). D'autre part, l'utilisation de l'anesthésie ne permet ni l'étude des tâches cognitives conscientes (comme l'étude de la saccade (A. Dizeux *et al* 2019 [46])), ni l'étude de comportements. Par conséquent, il est nécessaire d'être en mesure de pouvoir faire de la neuroimagerie fonctionnelle éveillée et donc de s'affranchir de l'anesthésie.

Contraindre les animaux est une alternative possible à l'anesthésie. Par exemple en IRMf, il a été possible d'imager des rats éveillés en les contraignant physiquement (J.A. King *et al* 2005 [88]) mais ce genre de procédure induit un stress aigu chez les animaux et cela nécessite de les entraîner au préalable.

Une autre alternative possible est l'utilisation de relaxants musculaires qui per-

mettent de paralyser le corps (R.R. Peeters *et al* 2001 [131]) mais là non plus on ne peut étudier certains aspects cognitifs et comportementaux.

Le fUS permet d'imager le fonctionnement du cerveau en temps réel avec de très bonnes résolutions spatiale et temporelle, et que la souris soit éveillée et capable de se mouvoir, grâce à la miniaturisation des sondes échographiques (de l'ordre du centimètre) et de l'utilisation de câbles souples reliant la sonde à l'échographe. Le fUS peut être accompagné d'enregistrements en EEG, par exemple, comme les ultrasons ne perturbent pas le champ électromagnétique généré par l'activité cérébrale. En outre, on peut rappeler ici que le fUS est relativement peu couteux et portable et que chez la souris le crâne est suffisamment fin pour être "transparent" aux ultrasons, ce qui limite le côté invasif. Pour toutes ces raisons, le fUS est une technique d'imagerie fonctionnelle cérébrale intéressante pour faire de l'imagerie éveillée.

2.1.2 Les défis de l'imagerie éveillée

2.1.2.1 Mobilité

L'influence du stress sur le comportement, la psychologie et la physiologie est maintenant bien connue (Schneiderman *et al* 2005 [143]). Pour la minimiser, il faut une approche donnant le maximum de liberté de mouvement à l'animal étudié.

Cependant, la technique du fUS nécessite qu'une sonde échographique soit placée et / ou fixée au-dessus de la tête de l'animal et qui est reliée à l'appareil échographique par un câble. L'imagerie ultrasonore ultrarapide génère une grande quantité de données : par exemple, avec les paramètres usuels pour faire de l'imagerie fonctionnelle du cerveau de la souris, dix minutes d'acquisition correspondent à quasiment 30 Go de données. L'électronique et le débit des connexions sans-fil actuels ne permettent pas encore de pouvoir s'affranchir du câble qui relie chacun des transducteurs piézoélectriques à sa voie dédiée puis à l'ordinateur, par lequel transitent toutes les données liées à l'imagerie et qui est relativement fragile (sensible notamment à la torsion).

Faire du fUS chez le petit animal éveillé requiert donc de faire un compromis entre la liberté donnée à l'animal (et donc le stress induit) et la contrainte physique sur le matériel. C'est dans ce cadre que des méthodes expérimentales ont été développées.

Les deux utilisées dans ces travaux sont détaillées ci-après. Le développement de ces dispositifs expérimentaux s'accompagnent également de sessions d'entrainement pour les souris qui ont été mises au point, généralement sur plusieurs semaines, afin qu'elles s'habituent, et de diminuer le niveau de stress autant que possible.

2.1.2.2 Traitement du signal

Faire du fUS chez le petit animal éveillé nécessite donc des conditions expérimentales spécifiques. Une fois l'imagerie réalisée, l'appareil enregistre le même type de données que si l'animal était anesthésié. Cependant, les mouvements de l'animal introduisent des artefacts dans le signal récupéré qui rendent difficile, voire quasiment impossible, l'interprétation des données.

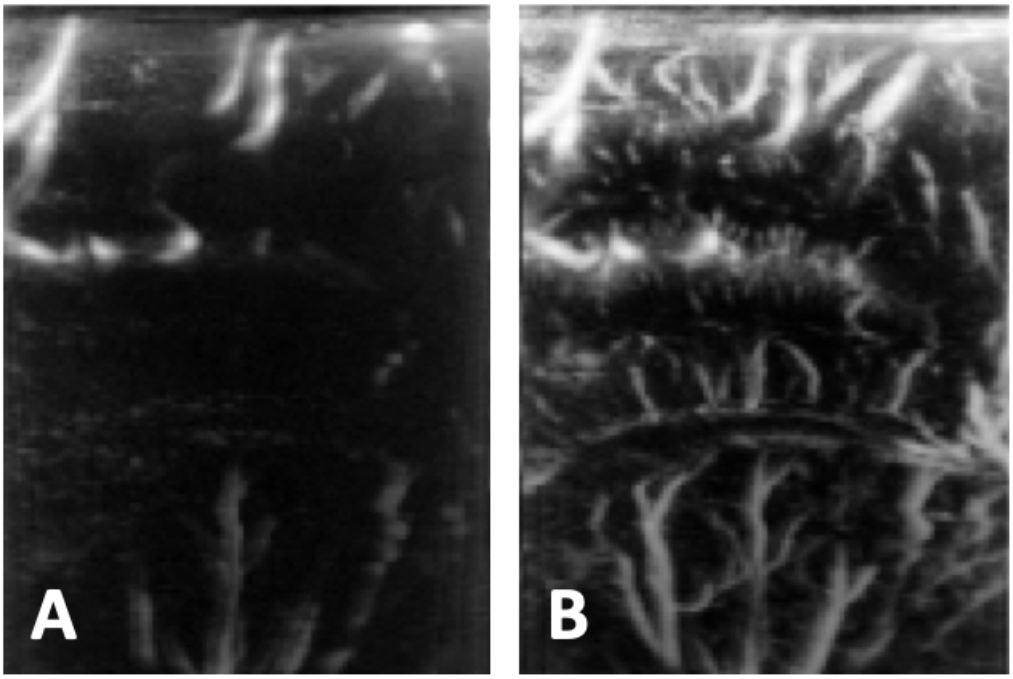


FIGURE 2.1 – Doppler de puissance ultrasensible avec séparation des signaux tissulaires et sanguins avec filtrage temporel passe-haut Butterworth à 250 Hz (A) et avec filtrage SVD avec un seuil fixe à 80 (B). Le gain en contraste et la meilleure description des petits vaissaux avec la SVD sont incontestables.

Faire du fUS, même en anesthésié, nécessite de séparer le signal issu du mouvement des tissus du signal du mouvement issu du sang. Les mouvements tissulaires sous anesthésie sont par exemple la pulsatilité cardiaque et la pulsatilité respiratoire.

La technique majoritairement utilisée jusqu'en 2015 pour faire cela était le filtrage temporel passe-haut. Depuis, le filtrage utilisant la SVD (Demené *et al* 2015 [43]) s'est progressivement imposé. On peut voir une comparaison des images obtenues avec les deux approches sur la figure 2.1 (images tirées de l'article cité précédemment).

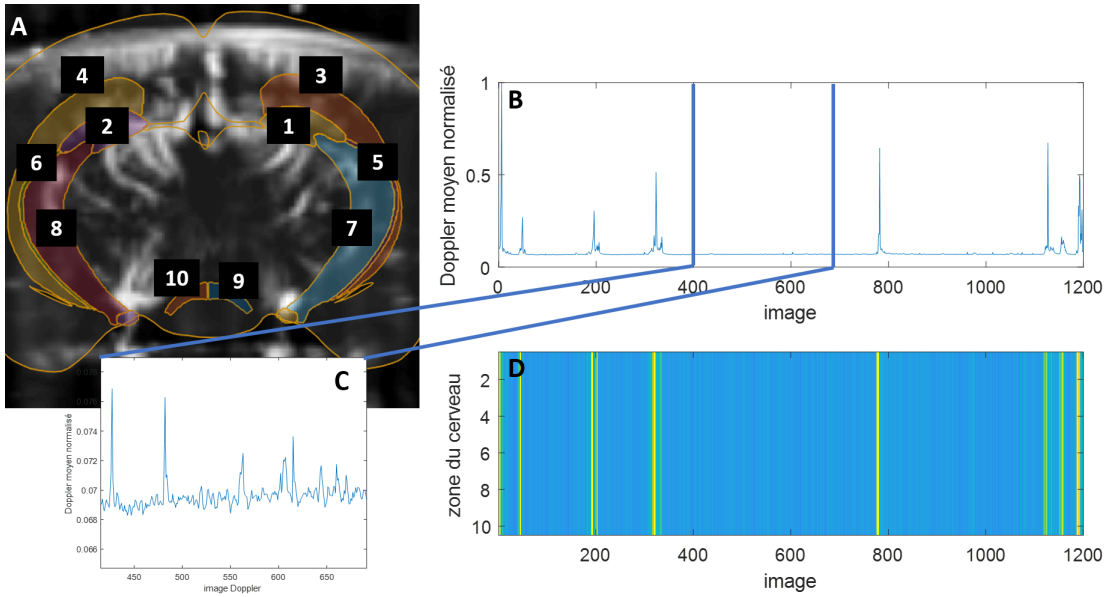


FIGURE 2.2 – Mise en évidence des artefacts de mouvements pour le fUS chez la souris éveillée : A) Doppler ultrasensible de puissance d'un plan coronal d'une souris éveillée moyenné sur 10 minutes d'acquisition sur lequel est superposé la coupe correspondante de l'atlas Allen où seules les régions d'intérêt sont représentées et numérotées (Gyrus denté, CA1, CA2,CA3 et noyau supramammillaire). B) Même Doppler ultrasensible de puissance moyenné spatialement et normalisé (1200 images à 2 Hz pour 10 minutes). Les grands pics correspondent aux moments où l'animal bouge et masquent le signal utile dont l'amplitude normale correspond à la *baseline*. C) Zoom temporel sur le Doppler moyenné spatialement de B) mettant en évidence le signal de CBV intéressant et ses petites variations sans influence du mouvement. D) De même qu'en B) mais le moyennage est fait pour chaque zone délimitée en A). On visualise ainsi le fait que les mouvements de l'animal sont présents dans toutes les zones alors que leur signal hémodynamique n'a *a priori* aucune raison de se ressembler.

La SVD (décomposition en valeurs singulières) permet de décomposer le film Doppler obtenu en fUS (une image 2D au cours du temps) en modes spatiaux et temporels orthogonaux et de classer ces modes par "intensité" décroissante, par portion de la variance décroissante. En principe, le mouvement des tissus et le mouvement sanguin n'ont pas les mêmes origines physiologiques donc les modes correspondants doivent être orthogonaux dans le sens de la SVD. Par ailleurs, les tissus ont, par essence,

une échogénéicité plus importante et sont donc plus "intenses" que le sang et, comme la SVD classe par "intensité" les modes et que leur orthogonalité garantit une certaine séparation des modes, en fixant un seuil d'intensité, on les sépare correctement. Sous anesthésie, ce filtrage suffit amplement. En éveillé, il ne permet pas en général de s'affranchir complètement des mouvements de l'animal étudié ; la figure 2.2 illustre ce phénomène sur un exemple de fUS de souris éveillée. Si la tête bouge, par exemple, le mouvement introduit est commun à la fois pour les tissus et le sang. C'est la raison pour laquelle la séparation avec la SVD comme expliquée ci-dessus fonctionne en anesthésié mais moins en éveillé. La majeure partie du chapitre 2 de cette thèse vise à trouver des solutions numériques afin d'extraire ces artefacts de mouvement pour récupérer un signal hémodynamique "propre".

2.1.3 Dispositifs expérimentaux pour le fUS chez la souris éveillée

Être capable de faire de la neuroimagerie fonctionnelle chez la souris éveillée présenterait un grand intérêt pour le développement des neurosciences.

Si le fUS présente de nombreux avantages par rapport aux autres modalités d'imagerie fonctionnelle cérébrale, il ne demeure pas moins complexe de travailler chez la souris éveillée sans trop contraindre l'animal. Le fUS date de 2011 (Macé *et al* 2011 [103]) et la preuve de concept en fUS chez la souris éveillée date de 2017 (Tiran *et al* 2017 [158]) alors qu'il avait été possible de le faire chez le rat dès 2015 (L.A. Sieu *et al* 2015 [149]). Nous allons voir ici deux méthodes expérimentales qui permettent de faire du fUS chez la souris éveillée et qui ont été utilisées pour obtenir certaines données présentées dans ce document : le dispositif dit de *hybrid freely-moving*, développé au laboratoire Physique pour la Médecine, et la Mobile Home Cage, dispositif commercialisé par l'entreprise finlandaise Neurotar (site internet Neurotar [112]).

2.1.3.1 Le *hybrid freely-moving*

L'échographe est relié à la tête de l'animal par un câble qui comporte à son extrémité la sonde, matrice de transducteurs piézoélectriques. Faire du fUS chez la souris éveillée signifie donc qu'il faut que la sonde soit fixée sur la tête de la souris afin que la sonde soit complètement immobile et que le plan imagé soit toujours le

même au cours du temps des expériences conduites. Cette méthode a notamment été rendue possible par la miniaturisation des sondes et leur allègement.

Par conséquent, il faut pouvoir venir fixer la sonde sur la tête de la souris. Pour ce faire, une plaque métallique comme celle que l'on peut voir sur la figure 2.3 est vissée dans le crâne de la souris qu'on veut imager. La procédure de fixation de cette plaque métallique est réalisée une dizaine de jours avant les sessions d'imagerie fUS.

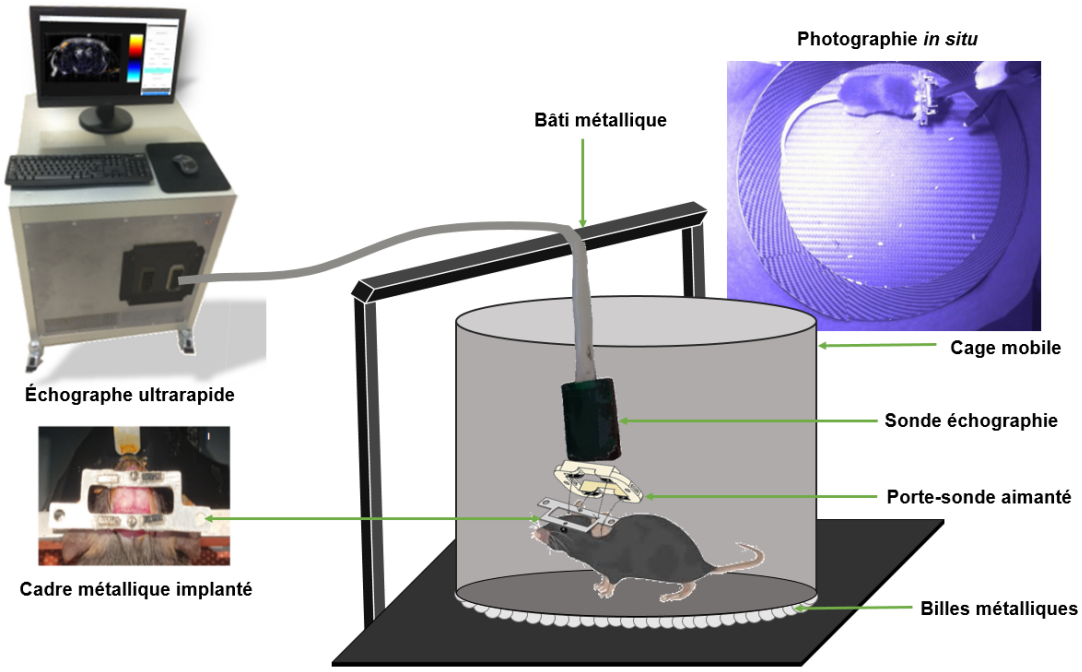


FIGURE 2.3 – Dispositif expérimental de *hybrid freely-moving*.

Pendant la chirurgie d'implantation de la plaque métallique, les souris ont été anesthésiées avec un mélange de ketamine (100 mg/kg) et de medetomidine (1 mg/kg) injectées en intrapéritonéale puis placées sur un cadre stéréotaxique. Après vérification de la perte du réflexe ipsilatéral de flexion, la peau et le périoste sont retirés afin d'accéder au crâne. La plaque métallique est alors fixée sur le crâne avec deux vis chirurgicales et avec l'ajout de ciment dentaire (Superbond) au niveau de la jonction crâne-vis-plaque. Pour protéger le crâne dégagé, de la colle chirurgicale Vetbond est utilisée. Le réveil de la souris est ensuite provoqué par injection sous-cutanée d'atipamezole Antisedan (1 mg/kg). Pour éviter toute douleur post-opératoire, les souris reçoivent alors en sous-cutanée une injection de meloxicam Metacam (5 mg/kg/jour) et une injection prophylactique d'antibiotiques (Borgal 24 % à 0,6 ml/kg/jour) pour éviter les infections. La plaque métallique et les deux vis font en tout 4 g, poids que la

souris doit porter sur la tête après chirurgie qui ne perturbe pas l'activité normale de la souris outre mesure.

La plaque métallique est aimantée et permet de fixer à l'aide d'aimants le porte-sonde dans lequel vient se loger la sonde échographique. Le porte-sonde, aimanté lui aussi, comporte un système de vis qui permet de modifier légèrement l'orientation de la sonde au cas où le plan n'est pas exactement celui voulu. Le câble relie alors la barrette de transducteurs piézoélectriques à l'échographe ultrarapide. la souris est un petit animal d'une vingtaine de grammes donc elle ne peut porter elle même le poids de la sonde et du câble, par conséquent, on attache le câble sur un bâti métallique comme illustré sur la figure 2.3.

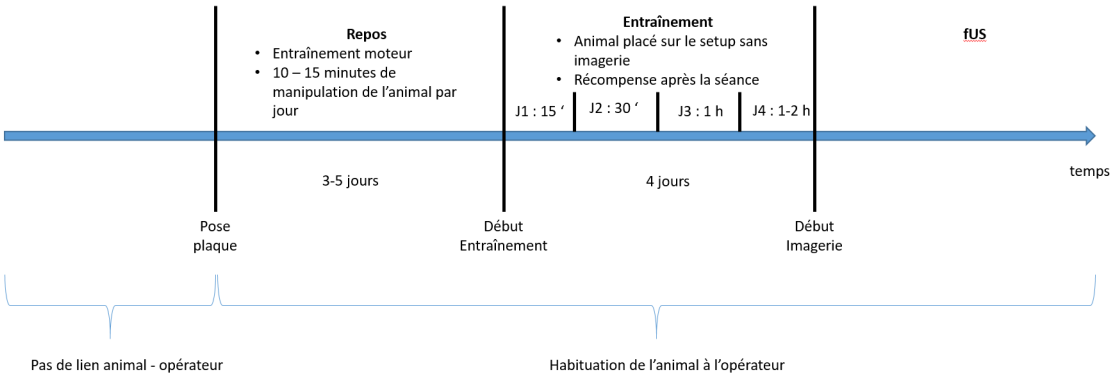


FIGURE 2.4 – Protocole d'habituation de la souris au dispositif expérimental.

La souris, qui a alors la sonde fixée sur la tête grâce au système précédemment décrit, est placée dans une cage cylindrique en fibres de carbone qui repose sur un lit de billes métalliques. Ainsi, lorsque la souris se met en mouvement, la cage bouge et permet d'offrir à la souris une plus grandre marche de manœuvre sans que son déplacement absolu soit grand : la souris fait quasiment du sur-place à la verticale du point du bâti métallique où le câble reliant l'échographe à la sonde a été attaché. Cela permet toutefois de réduire les contraintes sur ce câble qui est relativement fragile, notamment par rapport à la torsion. Le mouvement de la souris est alors possible bien que légèrement restreint du fait que le câble soit fixé. Cette restriction peut être facteur de stress pour les animaux étudiés mais on a pu observer qu'en les habituant à ce système, le niveau de stress est faible, sans comparaison possible avec le stress lié à une constriction complète de l'animal. La procédure d'habituation optimisée mise au point pendant ces travaux de thèse est détaillée sur la figure 2.4.

Il est ainsi possible de faire du fUS en temps réel avec un animal éveillé et mobile. La principale limitation de cette approche est qu'on ne peut imager qu'un plan du cerveau à la fois.

2.1.3.2 La Mobile Home Cage

Un autre système peut être utilisé pour faire du fUS éveillé chez la souris : la Mobile Home Cage de Neurotar que l'on peut voir sur la figure 2.5 [1].



FIGURE 2.5 – Dispositif expérimental de Mobile Home Cage.

On peut voir le système dans son ensemble sur la photographie de gauche et un zoom sur le mécanisme de pinces qui permet de fixer la souris au dispositif sur la droite. Dans ce cas également, une plaque métallique est fixée sur la tête de la souris qui va permettre à une pince (cf image de droite) de fixer la tête de la souris. La souris est placée dans une cage cylindrique légère posée sur un socle métallique qui envoie de l'air comprimé. De manière analogue, la souris, quand elle bouge, met en mouvement la cage plutôt qu'elle. Grâce à l'utilisation d'air comprimé, le frottement est moindre par rapport au roulement de la cage du *hybrid freely-moving* sur les billes et, par conséquent, le mouvement est plus fluide.

Ce système induit généralement plus de stress que le système de *hybrid freely-moving* comme la souris a la tête fixée. Avec habituation, cela devient toutefois acceptable pour conduire des expériences mais l'habituation est sensiblement plus longue. Le protocole d'habituation avec le Mobile Home Cage est similaire à celui schématisé sur la figure 2.4 sauf que la partie entrainement, considérablement plus progressive, est rallongée, et peut durer jusqu'à trois semaines.

1. https://www.neurotar.com/product/mobile-homecage/

Ceci étant dit, le système, comme la tête est fixe, n'a pas besoin que la sonde échographique soit attachée directement à l'animal et, par conséquent, on peut approcher la sonde via un bras motorisé qui permettra d'imager plusieurs plans.

Enfin, le dispositif de la Mobile Home Cage présente aussi l'intérêt d'être accompagné d'un système de *tracking* de l'animal ; cela sera très intéressant lorsque dans le chapitre 3 on essaiera de relier le comportement au fUS.

2.2 Méthodes numériques pour séparer les artefacts de mouvement du signal hémodynamique utile

L'influence du mouvement sur les signaux enregistrés en fUS a été illustrée dans la partie 2.1.2.2 : lorsque l'animal se met en mouvement, le signal Doppler de chaque pixel de l'image reçoit une contribution beaucoup plus élevée que l'amplitude moyenne constatée des variations de CBV et cela dissimule ainsi le signal utile. Être capable de faire du fUS éveillé, c'est pouvoir retirer cette contribution de bruit dû aux mouvements des tissus cérébraux afin de ne garder que l'information pertinente (le flux sanguin) ; ce sujet de la réjection d'artefacts est un domaine également très actif en IRMf (Caballero-Gaudes *et al* 2017 [27]).

Pendant les travaux de cette thèse, nous avons développé plusieurs méthodes numériques dans cette optique dont on présente ici le principe. Un des grands avantages de l'échographie ultrarapide, c'est que l'on a accès au film Doppler mais également aux signaux bruts, données *post-beamforming*, qui permettent notamment de caractériser le mouvement d'un point de vue dynamique et énergétique. Enfin, on présentera les résultats donnés par ces méthodes et on tentera de les comparer afin de choisir la plus robuste et la plus efficace parmi :

1. le *censoring*, ou suppression d'images : retirer les images Doppler pendant lesquelles il y a du mouvement à partir des informations du film Doppler et des données brutes,
2. une approche de régression de nuisance qui permet de retirer la contribution de nuisances définies et connues du film Doppler,
3. une approche physique sur le traitement des données brutes pour reconstruire le film Doppler (filtre à SVD dynamique),
4. deux approches non-supervisées d'analyse de données pour décomposer le film Doppler (l'analyse en composantes indépendantes et la factorisation en matrices non-négatives).

Pour illustrer la capacité de ces méthodes à extraire les artefacts du mouvement de données fUS, il sera utilisé, dans toute la suite de ce chapitre, le même exemple d'acquisition d'expériences conduites au cours de la thèse par Cécile Viollet de l'IPNP (elles seront détaillées dans la partie 3 de ce document). Il s'agit de l'enregistrement

en fUS avec le Mobile Home Cage de chez Neurotar d'une souris sur laquelle a été fixée une casquette métallique pour fixer la tête au bâti métallique et qui a été entraînée et habituée afin de réduidre au maximum son stress. L'enregistrement dure dix minutes avec une sonde à 15 MHz de 128 transducteurs espacés de 0,11 mm Vermon [1] connectée à un échographe ultrarapide de recherche Vantage 128 [2].

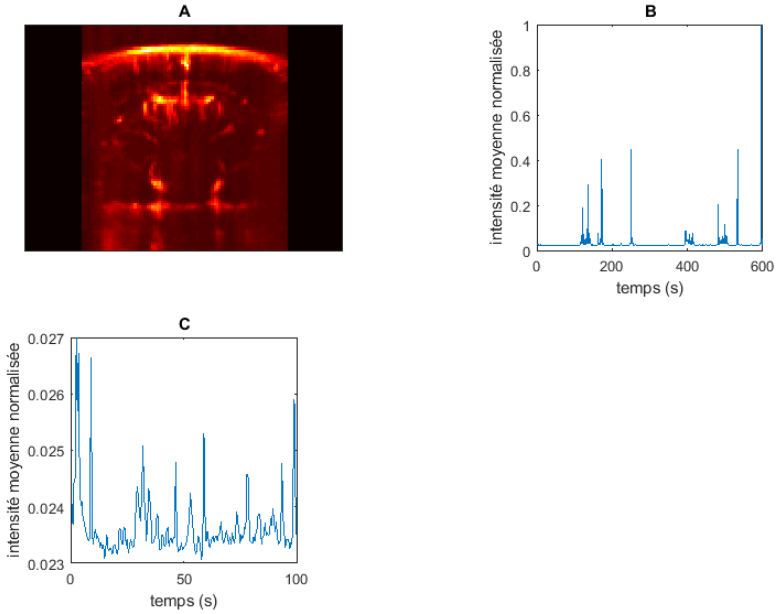


FIGURE 2.6 – Acquisition fUS de 10 minutes en tête fixée d'une souris : A) film Doppler moyenné temporellement. B) Intensité des pixels normalisée moyennée spatialement au cours du temps. C) Zoom temporel de B) montrant une plage temporelle sans grosse variation induite par le mouvement constituant le signal hémodynamique pertinent.

Le fUS transcranien en temps-réel était alors réalisé à l'aide du programme de neuroimagerie Neuroscan [3] développé au laboratoire *Physics for Medicine Paris*. Chaque image Doppler, acquise à une cadence de 500 Hz, est formée à partir de 200 images générées par 11 ondes planes angulées (-10°,-8°,-6°,-4°,-2°, 0°, 2°, 4°, 6°, 8°,10°) à 5500 Hz. L'image Doppler correspond, par conséquent, à ces acquisitions de blocs de 400 ms en continu, entrecoupées d'une pause de 100 ms. Par ailleurs, afin de s'affranchir de l'influence des mouvements de la machoire de la souris, les voies périphériques de la sonde ne sont pas utilisées : on peut le voir sur la sous-

1. https://www.vermon.com/
2. https://verasonics.com/vantage-systems/
3. https://iconeus.com/

image A de la figure 2.6 où la fenêtre d'imagerie est rognée latéralement pour ne pas prendre en compte les muscles maxillaires. Un filtre SVD à seuil fixe (comme expliqué précédemment), permet une première séparation du signal tissulaire de celui du sang. On obtient finalement, un film Doppler constitué de 1200 images dont on peut voir la moyenne temporelle sur la figure 2.6 ainsi que l'intensité normalisée moyennée sur l'espace au cours du temps. On peut voir sur la sous-figure B les pics qui correspondent à des artefacts de mouvement ; le signal hémodynamique intéressant, pour la connectivité fonctionnelle par exemple, constitue des petites variations autour de la *baseline*. On voit bien, malgré la normalisation, que le mouvement dissimule de l'information utile : les variations de CBV dues à une activation fonctionnelle sont typiquement de l'ordre de 20-30 % de la *baseline* (Osmanski *et al* 2014 [123]). Les pics introduits par le mouvement peuvent, dans l'exemple montré, faire varier le signal de 1000 % par rapport à la baseline. Le film Doppler est stocké matriciellement dans **D** de taille $n_z \times n_x \times n_t$.

2.2.1 Le *censoring* ou suppression d'images

Le *censoring* permet de faire du fUS éveillé sans que les artefacts de mouvements corrompent les variations de CBV enregistrées : il consiste à ne garder que les données pour lesquelles l'animal est immobile. Il s'agit d'une méthode classiquement utilisée en IRMf pour s'affranchir des points temporels comportant trop d'informations liées au mouvement (Siegel *et al* 2014 [148]). Afin d'identifier si les données sont relatives à des plages de mouvement, on utilise notamment les signaux bruts, données *post-beamforming*.

2.2.1.1 La vitesse tissulaire pour discriminer les plages de mouvement

L'échographie ultrarapide permet de faire de l'imagerie fonctionnelle cérébrale en utilisant le couplage neurovasculaire et en mesurant les variations locales du CBV. Le CBV n'est pas la seule information que l'on peut tirer des données fUS : on peut extraire une information sur le mouvement des tissus à partir des données après *beamforming* mais avant le filtrage SVD et l'intégration pour construire une carte de déplacement (Kasai *et al* 1985 [86]).

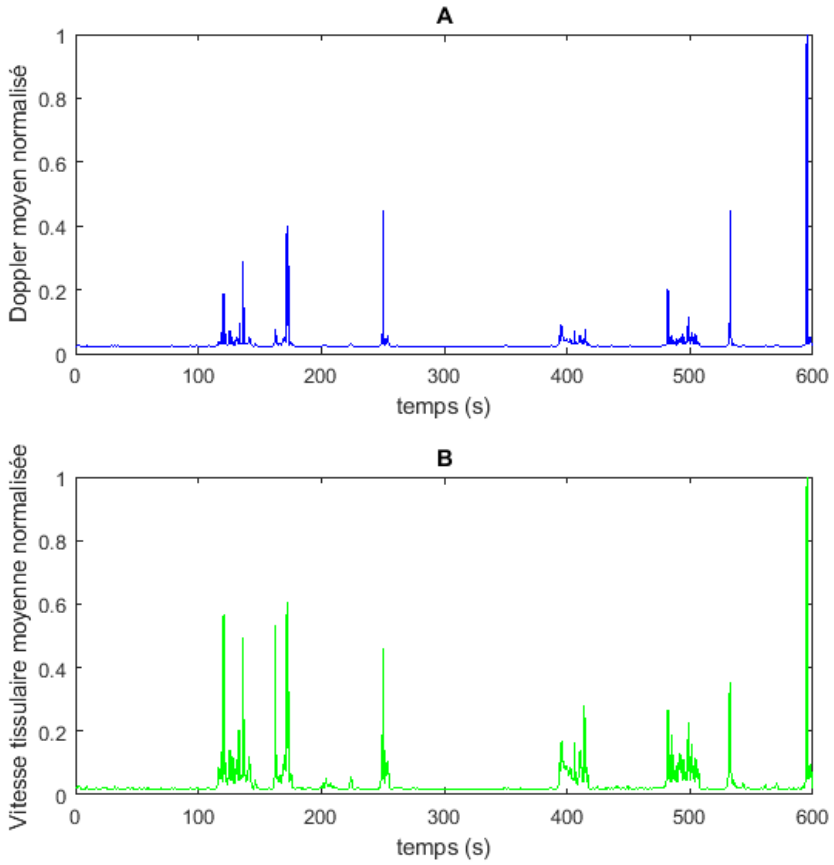


FIGURE 2.7 – A) Doppler moyenné sur tous les pixels normalisé au cours du temps et B) Valeur absolue de la vitesse tissulaire moyennée sur tous les pixels et normalisée au cours du temps.

En effet, la corrélation d'une image *post-beamforming* avec la suivante est reliée à la vitesse tissulaire. En calculant cette autocorrélation pour chacun des pixels au cours du temps, on obtient un film dont chaque image traduit la vitesse de déplacement des pixels. La vitesse tissulaire d'un pixel du cerveau varie peu au repos ; seuls les mouvements de l'animal vont produire des grandes variations dans ces signaux. On peut voir sur la figure 2.7 ce signal rendant compte du mouvement pour l'exemple étudié et mis au regard du signal Doppler moyen au cours du temps. On peut observer que les pics artefactuels du Doppler sont synchones avec les grandes variations de vitesse tissulaire. Ce phénomène permet d'établir un critère de tri des images Doppler : en seuillant les images retenues selon la vitesse tissulaire, on peut identifier les points temporels où les mouvements sont trop importants.

2.2.1.2 Identification des plages calmes

Pour identifier les plages calmes, c'est-à-dire les points temporels pour lesquels les mouvements sont réduits, on va prendre en compte le signal de vitesse tissulaire moyenné spatialement et le signal Doppler moyenné spatialement sur lequel on aura au préalable effectué une étape de *detrending*[1] permettant de corriger la dérive lente éventuelle de la *baseline* (cela peut être le cas suite à une hausse de température due à l'imagerie en continue sur une durée longue comme 10 minutes) pour fixer un seuil (typiquement la moyenne temporelle à laquelle on additionne l'écart interquartile). On ne garde que les points temporels qui sont à la fois sous ce seuil pour le Doppler et la vitesse tissulaire. On a ainsi un critère discriminant si une image Doppler correspond ou non à un état de repos ou de *resting-state*.

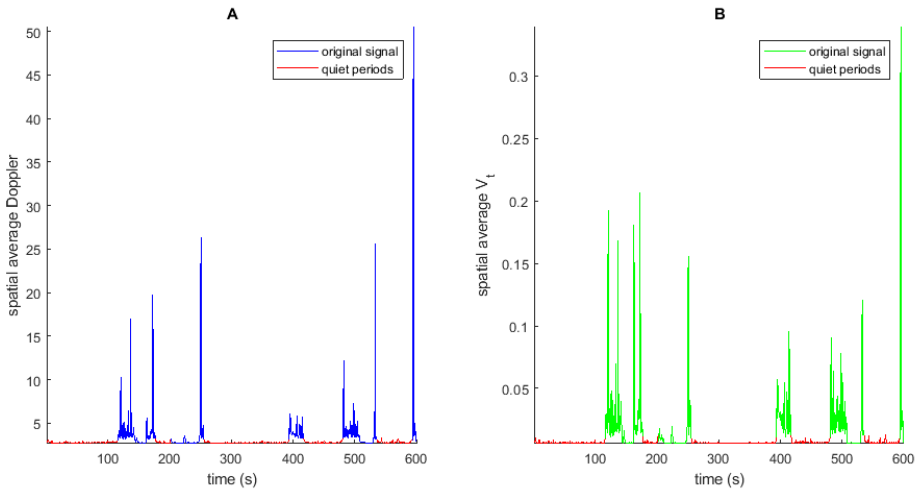


FIGURE 2.8 – Identification des images Doppler en *resting-state* : A) Doppler moyenné spatialement (non normalisé) et B) Vitesse tissulaire V_t moyennnée spatialement (normalisée par rapport aux nombres de pixels de l'image) : les points temporels vérifiant les deux critères sont marqués en rouge.

Par ailleurs, la connectivité fonctionnelle est calculée en fUS en évaluant la corrélation entre le signal des variations de CBV de deux zones cérébrales. Faisons l'hypothèse que ces variations soient sinusoïdales, il est alors nécessaire d'avoir deux périodes consécutives pour pouvoir comparer ces signaux. On sait que les oscillations dues à la connectivité sont basse-fréquence, typiquement de l'ordre de 0,1 Hz. Il faut donc 10 secondes pour avoir une période donc 20 s pour deux périodes ce qui

1. https://www.investopedia.com/terms/d/detrend.asp

fait qu'on a besoin de 50 points temporels successifs pour une cadence d'imagerie Doppler de 500 Hz. On a labelisé, sur la figure 2.8, les points temporels du film Doppler découpés comme "repos" ou "agité" et on garde alors seules les fenêtres temporelles labelisées "repos" continument pendant au moins 50 points.

Le *censoring* permet ainsi de faire du fUS éveillé sans que le mouvement ne soit problématique en construisant un film Doppler réduit en termes de points temporels. On verra des exemples d'application dans le chapitre 3 ; il a permis également de faire la première étude pharmacologique en fUS éveillé en *resting-state* par Rabut *et al* en 2020 [136]. Cette méthode est toutefois très conservatrice et supprime une partie importante de périodes qui pourraient s'avérer contenir des informations utiles : 20 % des données initiales sont conservées typiquement.

2.2.2 Régression de nuisance

Afin d'extraire les artefacts du mouvement du signal Doppler, on peut partir du film Doppler complet pour soustraire les contributions liées au mouvement sans supprimer d'images. Nous allons voir ici un autre type d'approche, la régression de nuisance, qui consiste à faire une régression linéaire de signaux définis et connus de bruits identifiés puis de les soustraire du signal global initial du film Doppler. C'est une approche classique en IRMf (Charest *et al* 2020 [29]), pour enlever les artefacts de mouvements mais aussi des nuisances d'origines différentes.

2.2.2.1 Principes de la régression de nuisance

Soit $\mathbf{X}$ la matrice en deux dimensions qui décrit les profils temporels de chaque pixel du film Doppler étudié, à $n_z \times n_x$ lignes (nombre de pixels d'une image) et n_t colonnes (nombre de points temporels). Un régresseur de $\mathbf{X}$ est un signal temporel dont on souhaite que $\mathbf{X}$ soit combinaison linéaire afin de le soustraire. Supposons qu'on ait k régresseurs.

Appliquer une régression de nuisance à $\mathbf{X}$ revient à écrire cette équation :

$$\mathbf{X} = \mathbf{ZU} + \mathbf{V} \tag{2.1}$$

Où **U** est une matrice connue à k lignes n_t colonnes qui représente le profil temporel des k régresseurs, **Z** une matrice à $n_z \times n_x$ lignes et k colonnes qui contient les coefficients à estimer et **V** est une matrice de la même taille que **X** qui contient le signal de **X** qui n'est pas combinaison linéaire des k régresseurs. La régression linéraire consiste alors à estimer numériquement la matrice **Z** tout en minimisant l'erreur faite. Cette équation s'appelle le GLM, pour *General Linear Model*.

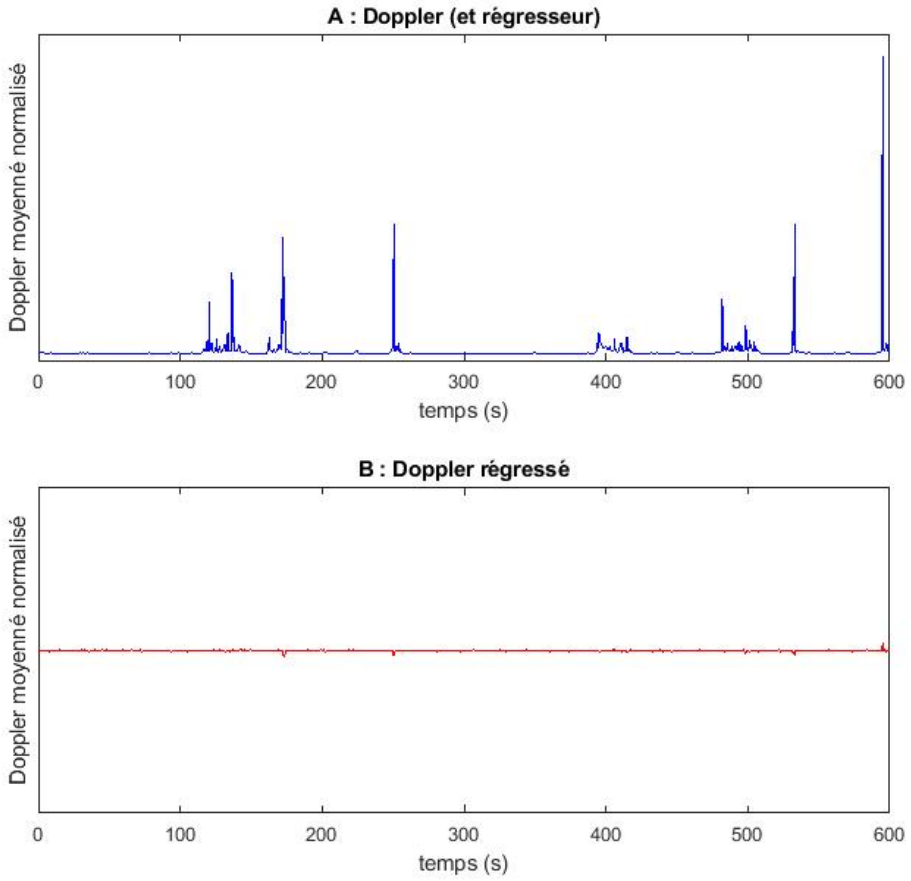


FIGURE 2.9 – Réduction de l'influence des artefacts de mouvement en fUS éveillé avec une régression de nuisance avec comme régresseur le signal Doppler moyenné spatialement (A) et B) Doppler moyenné spatialement après régression de nuisance.

Cette méthode peut s'appliquer à l'extraction des artefacts dus aux mouvements des signaux fUS en prenant comme régresseurs, des profils temporels connus d'artefacts comme la vitesse tissulaire introduite précédemment (figure 2.7). Elle est très utilisée en IRMf (Monti 2011 [115]).

2.2.2.2 Exemple de régression de nuisance en fUS éveillé

Il s'agit ici de l'application stricte de ce qui vient d'être expliqué. On cherche à écrire chaque ligne de **X**, les profils temporels de l'ensemble des pixels, comme une combinaison de profils temporels artefactuels, les régresseurs, et de profils temporels traduisant les variations de CBV. Pour un résultat plus visuel, on reprend l'exemple commun à cette partie jusqu'à maintenant. On se place dans le cas où on ne connait qu'un seul régresseur r. En résolvant l'équation 2.1, c'est-à-dire en estimant numériquement **Z** avec la pseudo inversion de matrice de Moore-Penrose [1], on peut alors soustraire la contribution de **X** proportionnelle au régresseur r.

Soit **A** une matrice dont les colonnes sont linéairement indépendantes (ce qui est le cas pour **X**), on définit sa pseudo inverse **P** au sens de Moore-Penrose comme :

$$\mathbf{P} = (\mathbf{A}^T\mathbf{A})^{-1}\mathbf{A}^T \tag{2.2}$$

Dans ce cadre, l'équation 2.1 a pour solution **Z** suivante :

$$\mathbf{Z} = \Upsilon\mathbf{X} \tag{2.3}$$

Où Υ est la la pseudo inverse de Moore-Penrose de **U**. Dans le cas particulier où il y a un unique régresseur r, **U** est un vecteur à une dimension contenant le profil temporel de r. Ayant estimé **Z**, nous avons accès à **V** qui représente le film Doppler qui n'est pas combinaison linéaire de signal artefactuel.

Pour améliorer la performance de cette régression de nuisance simple, il est intéressant d'utiliser comme régresseurs les $f_i(r)$ où, pour tout i, f_i est une fonction comme la fonction $\sqrt{}$ appliquée à r pour laquelle on peut penser que les lignes de X puissent être une combinaison linéaire. C'est ce qu'on appelle utiliser la famille de fonction associée à r. Les f_i composent les lignes de **U** et ainsi, on résout l'équation 2.1 de manière analogue à celle montrée pour un régresseur.

1. https://fr.mathworks.com/help/matlab/ref/pinv.html

Dans l'exemple présenté ici, on utilise comme régresseur, le signal Doppler moyenné spatialement qui est montré sur la sous-image B de la figure 2.6. Il est possible d'observer sur la figure 2.9 la disparition des grandes variations que l'on impute aux mouvements de l'animal.

2.2.3 Filtre à SVD dynamique

Nous proposons ici une approche physique traitant les données brutes afin de garder l'ensemble des points temporels, qu'il y ait du mouvement ou non. Jusqu'à présent, la première séparation entre le signal sanguin et le signal tissulaire n'a pas été remise en question : une fois l'étape du *beamforming* passée, le Doppler de puissance est calculé bloc par bloc en utilisant un filtre SVD à seuil fixe introduit par Demené *et al* en 2015 [43], chaque bloc correspondant ensuite, après intégration, à une image Doppler.

Cette méthodologie fonctionne très bien pour le fUS avec le *censoring* (Rabut *et al* 2020 [136]) ou sous anesthésie (Rahal *et al* 2020 [137]) mais montre des limites lorsque l'on souhaite étudier les variations de CBV dans le cerveau lorsque l'animal est en mouvement, car le mouvement induit des modifications des signaux communes au sang et aux tissus, comme on a pu le voir sur la figure 2.2.

La décomposition en valeurs singulières (SVD) est intéressante car elle décompose chaque bloc en sous-espaces temporels et spatiaux classés avec un critère d'orthogonalité et les classe de manière unique en "intensité" ou portion de la variance décroissante. Nous appelons U les modes spatiaux et V les modes temporels. Un exemple de décomposition pour une acquition en Doppler ultrasensible d'un cerveau de rat anesthésié est donné sur la figure 2.10.

Comme il est possible de le voir sur la figure 2.10, plus l'intensité est élevée, et plus le mode temporel associé voit la fréquence de ses variations baisser. En comparant les modes spatiaux et temporels associés à la même intensité, nous pouvons voir que qu'un mode temporel basse fréquence est associé à un mode spatial cohérent.

Comme le sang est surtout présent dans l'arbre vasculaire, le signal de variations de CBV n'est pas supposé avoir une grande cohérence spatiale, d'autant plus si nous considérons le réarrangement permanent des globules rouges dans le plasma sanguin.

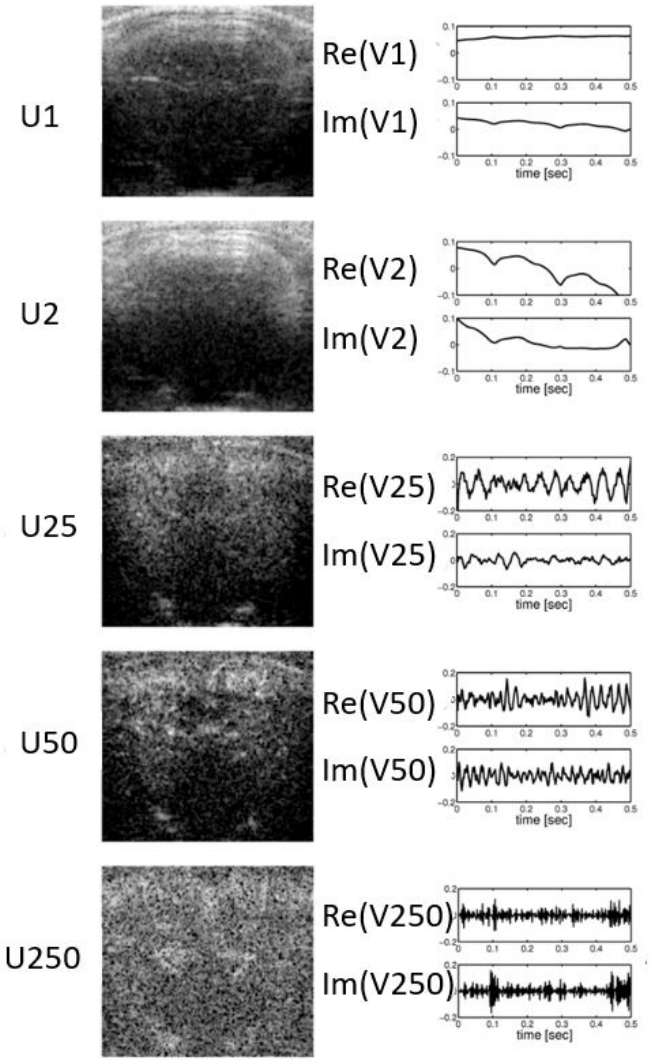


FIGURE 2.10 – Exemples de modes spatiaux U (carte spatiale) et de modes temporels V (représentation de la partie réelle et de la partie imaginaire) pour une acquisition de Doppler ultrasensible d'un cerveau de rat anesthésié. L'indice correspond à l'intensité, 1 correspondant à la plus élevée (source : thèse de doctorat de C. Demené 2015).

Au contraire, les signaux tissulaires sont très cohérents car communs à de nombreux pixels de l'image. Comme il est possible de le voir sur la figure 2.10, plus l'intensité du mode est grande, moins on observe de cohérence spatiale.

Par conséquent, les sous-espaces correspondant au signal provenant des tissus cérébraux sont alors associés à des valeurs en "intensité" plus élevées que celles associées au signal hémodynamique et sont donc au début de la décomposition. Fixer un seuil fixe revient alors à déterminer la valeur en "intensité" où les valeurs

supérieures correspondent au mouvement tissulaire, et les valeurs inférieures au mouvement du sang. Les sous-espaces dont l'indice correspondant à la valeur en "intensité" est supérieur à celui de la valeur seuil sont tronqués et on reconstruit ensuite l'image Doppler "nettoyée". Ceci fonctionne correctement pour l'anesthésie ou le *resting-state* comme ce cadre assure une *baseline* à peu près constante pour les enregistrements fUS. Les artefacts du mouvement augmentant le nombre de modes de mouvements tissulaires, il parait raisonnable de penser que la valeur seuil en "intensité" n'est alors plus la même d'un bloc à l'autre.

Pour essayer de prendre en compte cette variabilité, on propose ici de fixer un seuil pour chacun des blocs et non pas un seuil pour l'ensemble des blocs. Une méthode pour faire ceci a été proposée en 2018 par Baranger *et al* [10] : pour chaque bloc, on étudie la similarité en terme de corrélation entre les modes spatiaux étudiés et un cas idéal de bonne séparation des signaux tissulaires des signaux sanguins. Cette technique s'est montrée efficace pour trouver le seuil en "intensité" pour chaque bloc mais a ausi permis d'augmenter le rapport signal sur bruit en diminuant la *baseline* du bruit. Cependant, cette méthode, en pratique, ne s'applique pas au transcranien. Nous proposons ici une méthode alternative de filtre dynamique SVD pour la détermination de seuil pour chacun des blocs correspondant, après intégration à une image Doppler. On appellera cette algorithme filtre à SVD dynamique.

2.2.3.1 Principes du filtre à SVD dynamique

Pour la grande majorité des études en fUS en *resting-state* ou en anesthésié chez la souris, on peut prendre le même seuil fixe du filtre SVD simple décrit précédemment qu'on notera n_0 qui correspond à l'indice au-dessus duquel on tronque les données pour s'affranchir des mouvements tissulaires.

Un schéma des principes de cette méthode de filtrage est donné sur la figure 2.11. La première étape de l'algorithme consiste à faire une première décomposition en valeurs singulières SVD bloc par bloc et de garder en mémoire la valeur en "intensité" λ_0 correspondant à n_0 pour chacun des blocs. Nous présentons le résultat de cette première étape sur le graphique de l'étape 1 de la figure 2.11. En comparant avec la sous-figure B de la figure 2.8, on observe que plus la vitesse tissulaire est élevée pour un bloc, et donc plus il y a du mouvement, plus la valeur en "intensité" λ_0 correspondant à n_0 est élevée et on observe également une certaine stabilité en dehors des blocs

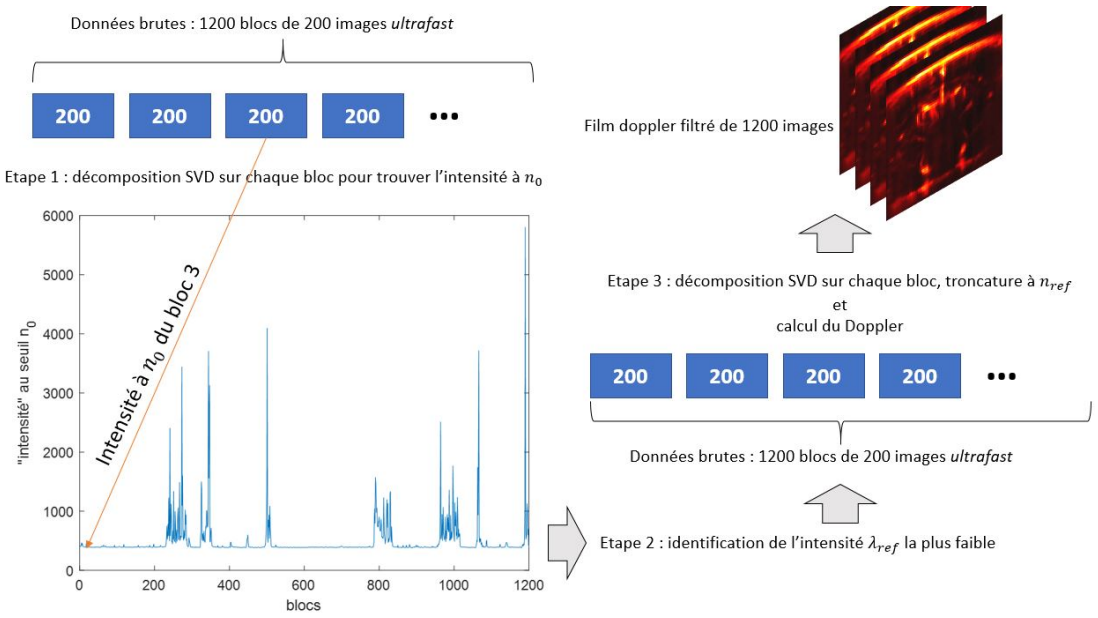


FIGURE 2.11 – Étapes du filtre à SVD dynamique.

où il y a du mouvement. Nous savons, de manière empirique, que la valeur de n_0 est pertinente dans le cas où le sujet étudié est immobile. On détermine alors la valeur λ_0 la plus petite qui correspond à ce qu'on peut appeler au bloc dont l'énergie est la plus faible, et qui se rapproche le plus du *resting-state* ou de l'anesthésié. On notera cette valeur λ_{ref} qui correspond à l'énergie de la *baseline* du graphique de l'étape 1 de la figure 2.11.

Pour la deuxième étape, nous conduisons une nouvelle décomposition en valeurs singulières bloc par bloc et on effectuera, comme expliqué précédemment, à une troncature des données avant de calculer l'image Doppler correspondant au bloc. Dans le cas du filtre à SVD dynamique, les données sont tronquées à l'indice correspondant à la valeur en "intensité" la plus proche de λ_{ref}, noté n_ref. Le filtre à SVD dynamique permet donc de filtrer les données fUS sur un critère "énergétique". Si un bloc est plus "intense", on tronquera d'avantage de sous-espaces que s'il l'est moins.

2.2.3.2 Le filtre à SVD dynamique sur un exemple de fUS éveillé

Nous travaillons toujours sur le même exemple : une acquisition de dix minutes sur une souris dans le Mobile Home Cage. Il est montré sur la figure 2.12 l'analogue de

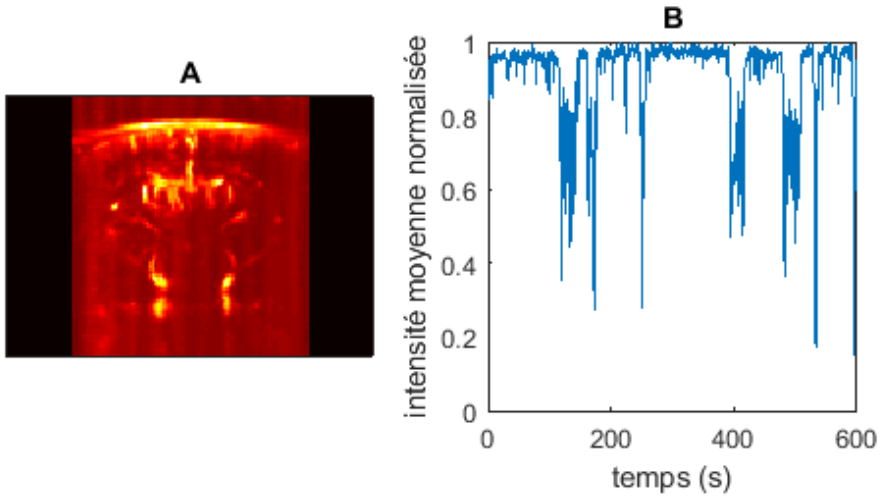


FIGURE 2.12 – Acquisition fUS de 10 minutes en tête fixée d'une souris après l'utilisation du filtre à SVD dynamique : A) film moyenné temporellement. B) Intensité des pixels normalisée moyennée spatialement au cours du temps.

la figure 2.6 où est donné le film Doppler de la même acquisition avant l'utilisation de ce filtre. Bien que le Doppler moyenné spatialement sur le sous-figure B de la figure 2.12 soit normalisé, on peut observer les variations de la *baseline* montrant ainsi une réduction importante des pics dus aux mouvements de l'animal (jusqu'à 1000 % avant filtrage à 60 % maximum après filrage à SVD dynamique).

2.2.3.3 La régression de nuisance après la SVD dynamique

La sous-image B de la figure 2.12 montre que si les pics relatifs au mouvement ont été largement réduits, ils restent encore visibles. Pour aller plus loin, il peut être intéressant d'appliquer la régression de nuisance au Doppler filtré avec la SVD dynamique.

Le signal "stabilité", qui provient de l'utilisation du filtre à SVD dynamique,

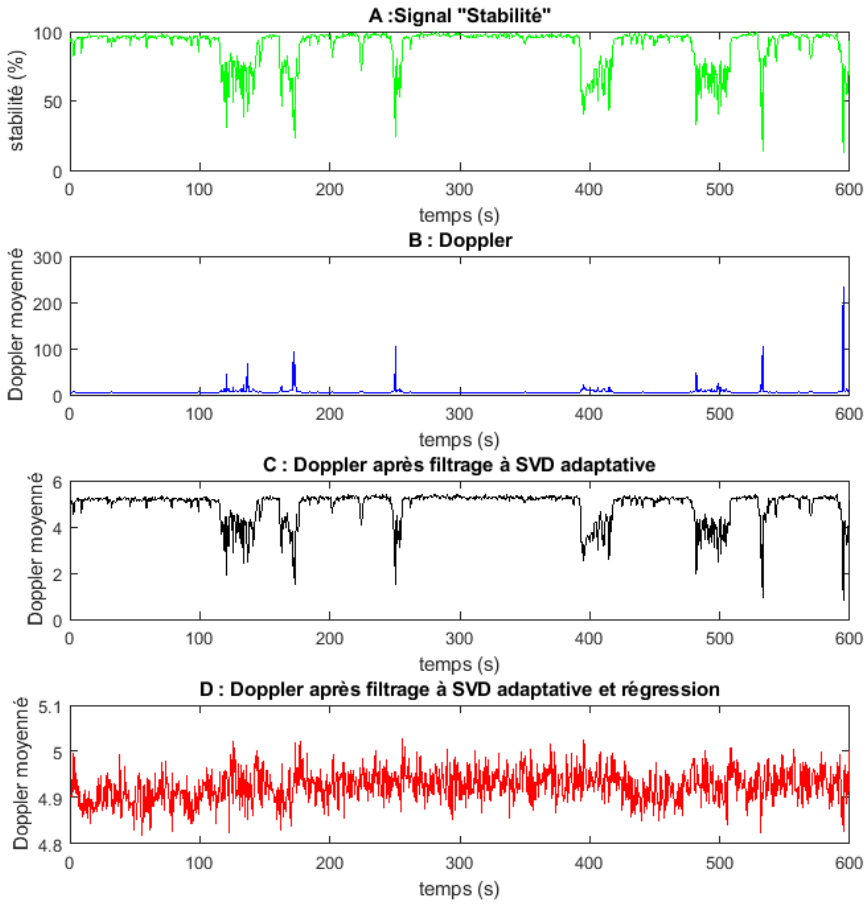


FIGURE 2.13 – Réduction de l'influence des artefacts de mouvement en fUS éveillé avec le filtrage à SVD dynamique suivie d'une régression de nuisance avec comme régresseurs une famille de fonctions du signal "stabilité" (A) : B) Doppler moyenné spatialement (non normalisé). C) Doppler moyenné spatialement après filtrage à SVD dynamique (non normalisé) et D) Doppler moyenné spatialement après filtrage à SVD dynamique et régression de nuisance (non normalisé).

est utilisé ici comme régresseur. Lors du filtrage dynamique, on tronque plus ou moins pour chaque bloc les composantes selon l'indice qui correspond en termes "énergétiques" λ_{ref}. On coupe à l'indice n_{ref} pour le bloc de plus faible énergie. Pour un bloc donné, et donc une image Doppler, on calcule le rapport entre l'indice de troncature de ce bloc et n_{ref} et ce sera la valeur du signal "stabilité" pour ce bloc. On représente ce signal sur la figure 2.13. Par ailleurs, la famille de fonctions du signal

"stabilité" S suivantes est utilisée comme famille de régresseurs :

$$S \quad ; \quad \sqrt{S} \quad ; \quad \sqrt[3]{S}; \quad 1-\frac{S}{100} \qquad 1-\left(\frac{S}{100}\right)^2 \tag{2.4}$$

La figure 2.13 illustre la la disparition des grandes variations que l'on impute aux mouvements de l'animal. L'amélioration du rapport signal sur bruit, suggérée par Baranger *et al* en 2018 [10] avec l'utilisation de ce genre de méthode, est également retrouvée ici.

2.2.4 Analyse en composantes indépendantes

Afin d'extraire les artefacts du mouvement du signal Doppler, on peut également partir du film Doppler et utiliser une approche d'analyse de données non-supervisée qui permet de décomposer ce film en composantes "utiles" et "artefactuelles". Nous proposons ici de nous intéresser à l'analyse en composantes indépendantes ou ICA.

L'ICA est une méthode numérique qui a été introduite pour la première fois en 1984 (Hérault *et al* 1984 [68]). Elle a été imaginée pour permettre de résoudre le problème de séparation de sources(cf figure 2.14 tirée de Tahir *et al* 2015 [153]), c'est-à-dire, décomposer un signal enregistré donné en estimant les sous-signaux dont il est originaire. Elle présente l'avantage de ne pas nécessiter de faire des hypothèses sur les solutions trouvées, *a contrario* de techniques très répandues comme le General Linear Model qui fonctionnent très bien lorsqu'on a une idée de ce que l'on cherche (réponse à un stimulus en IRMf ou en fUS par exemple).

Depuis son introduction au milieu des années 1980, l'ICA a été assez peu utilisée, principalement à cause du fait qu'il soit nécessaire de disposer d'une grande puissance de calcul pour faire tourner les algorithmes. Finalement, à partir des années 2000, cette technique a été approfondie et son utilisation s'est répandue, particulièrement pour l'analyse des données en IRMf (Hyvärinen 2013 [77]). Dorénavant, l'ICA est, à l'époque du *machine learning* et de l'essor de la *data science*, un incontournable en IRMf pour extraire des données (Calhoun *et al* 2008 [28]) ou aussi pour enlever le bruit du signal BOLD utile (Griffanti *et al* 2015 [66] et 2017 [65]).

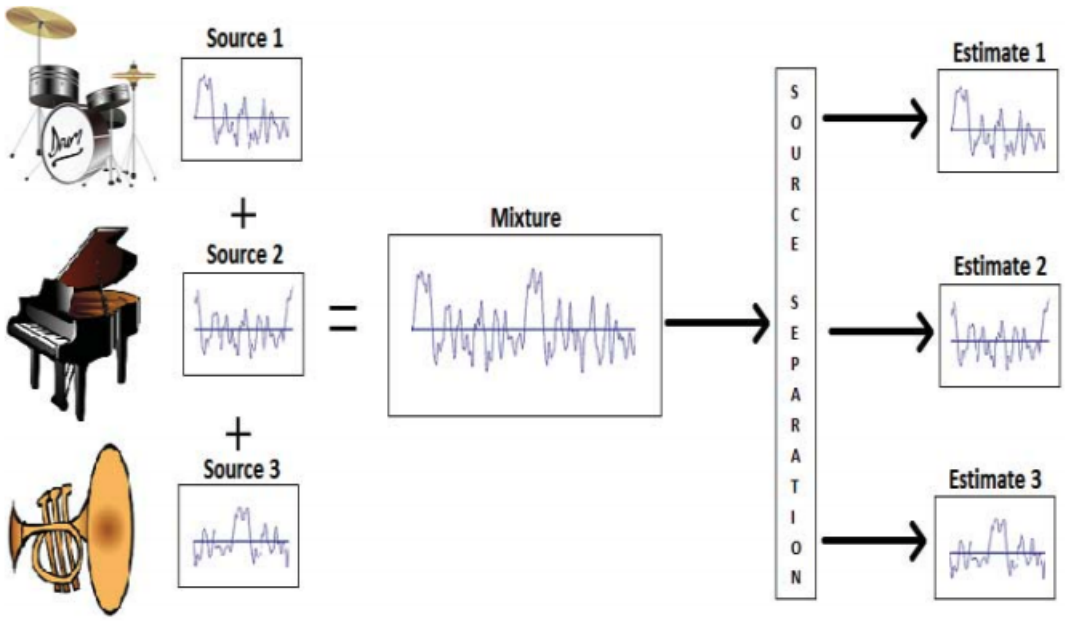


FIGURE 2.14 – Problème de séparation de sources : on enregistre avec un seul microphone une batterie (Source 1), un piano (Source 2) et une trompette (Source 3) qui jouent en simultané. On obtient alors un signal unique (Mixture) qui est un mélange des signaux de chacun des enregistrements. Résoudre le problème des séparation des sources, c'est être capable de retrouver les signaux des 3 sources à partir du signal Mixture.

Dans le cas du fUS en deux dimensions d'un animal éveillé en mouvement, on obtient, après acquisition, un film Doppler. Le filtrage avec la SVD à seuil fixe permet une première séparation des signaux tissulaires des signaux sanguins. Il reste, comme montré dans la partie précédente, des artefacts dus au mouvement dans le signal hémodynamique utile. L'utilisation de l'ICA pour effectuer cette séparation suppose alors l'hypothèse suivante : le signal traduisant les variations spontanées de CBV constituant la connectivité fonctionnelle et le signal du mouvement sont statistiquement indépendants.

Deux signaux s_1 et s_2 sont dits statistiquement indépendants si leur densité de probabilité jointe $p(s_1, s_2)$ est égale au produit de leurs densités de probabilité $p(s_1)$ et

$p(s_2)$. Donc, pour n signaux, ils sont indépendants s'ils vérifient l'équation suivante :

$$p(s_1, ..., s_n) = \prod_{i=1}^{n} p(s_i) \tag{2.5}$$

De par leur nature comme ils proviennent de phénomènes physiques différents, les signaux hémodynamiques n'ont aucune raison d'être statistiquement dépendants des signaux dus aux mouvements. Cette hypothèse parait donc raisonnable.

2.2.4.1 Principes de l'ICA

L'ICA peut être vue comme une généralisation d'une résolution du problème de séparation de trois sources présentés sur la figure 2.14. L'ouvrage de référence sur le sujet a été publié par Hyvärinen *et al* en 2001 [78].

Soit $x_i(t)$ les variables observées avec $i \in [\![1 : n]\!]$ où n est le nombre de variables observées (le nombre de pixels d'une image en deux dimensions par exemple) et $t \in [\![1 : T]\!]$ où T est le nombre de points temporels acquis pour chaque variable. Supposons qu'on ait m sources indépendantes générant les signaux s_j où $t \in [\![1 : m]\!]$. Résoudre dans ce cas le problème de séparation des sources revient à trouver les coefficients a_{ij} tels que :

$$\forall i \in [\![1 : n]\!], \qquad x_i(t) = \sum_{j=1}^{m} a_{ij} s_j(t) \tag{2.6}$$

Pour trouver les coefficients a_{ij} avec l'ICA, il faut que les x_i soient statistiquement indépendants et aient des distributions non-gaussiennes (deux variables dont les distributions suivent des lois normales sont nécessairement statistiquement dépendantes). On peut réécrire matriciellement l'équation précédente comme suit :

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}\,\mathbf{S} \tag{2.7}$$

Où **X** est une matrice à n lignes et T colonnes, **A** une matrice à n lignes et m colonnes, et **X** une matrice à m lignes et T colonnes.

Il existe de nombreux algorithmes pour effectuer l'analyse en composantes indépendantes de la matrice **X** qui a généralement été centrée et réduite au préalable (cela améliore la performance des algorithmes). La plupart d'entre eux commencent par une étape dite de *whitening* qui permet de restreindre la résolution d'une équation comme celle de 2.7 à l'espace des matrices orthogonales en effectuant une analyse en composantes principales (PCA) à partir des données **X**. Dans un deuxième temps, l'algorithme extrait les composantes en maximisant une fonction spécifique reliée à la non-normalité de ces composantes indépendantes qui permet d'apporter une estimation de la solution à l'équation étudiée.

Les principaux algorithmes utilisés en ICA sont : l'algorithme HJ, la maximisation de contraste, l'algorithme JADE, Fast-ICA, qui sera celui utilisé principalement dans ces travaux, et Infomax (Correa *et al* 2007 [38]).

2.2.4.2 ICA et artefacts de mouvements en fUS

Les mouvements du sujet imagé introduisent des variations dans le signal de CBV que le fUS permet de mesurer. En utilisant l'analyse en composantes indépendantes, nous faisons l'hypothèse que les variations provenant du mouvement sont statistiquement indépendantes par rapport au signal hémodynamique. Si c'est le cas, certaines composantes indépendantes seront strictement artefactuelles et, par conséquent, on peut reconstruire le film Doppler en annulant les coefficients reliés à ces composantes et ainsi obtenir une acquisition "nettoyée". Pour montrer comment l'ICA permet d'extraire les artefacts du mouvement de données fUS, nous utiliserons le même exemple d'acquisition que précédemment. Le film Doppler est stocké matriciellement dans **D** de taille $n_z \times n_x \times n_t$. L'ICA peut être, dans le cas présent, spatiale ou temporelle. Dans le cas où l'on souhaite m composantes indépendantes :

— ICA spatiale : les images Doppler sont des combinaisons linéaires des m composantes indépendantes qui sont des cartes spatiales de taille $n_z \times n_x$ (image analogue à la sous-figure A de la figure 2.6).
— ICA temporelle : les profils temporels de chacun des $n_z \times n_x$ pixels sont des combinaisons linéaires des m composantes indépendantes qui sont des pro-

fils temporels de longueur n_t.

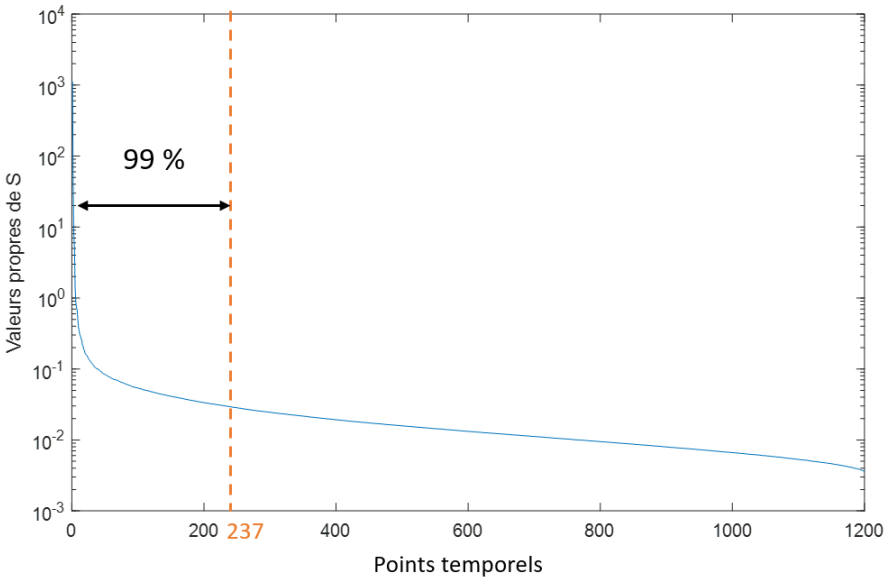


FIGURE 2.15 – Valeurs propres de **S** en échelle logarithmique selon l'ordre donné par la SVD comprise dans la réduction de dimension préalable à l'ICA. Garder $m = 237$ composantes indépendantes revient à garder 99 % de la variance, en garder $m = 3$ pour 95 %.

Prenons l'exemple de l'ICA spatiale. Par concaténation spatiale, **D** est transformée en **X** qui est en deux dimensions avec $n_z \times n_x$ lignes et n_t colonnes. **X** contient ainsi, de manière verticale, les profils temporels de chaque pixel. Afin d'améliorer la vitesse d'exécution de l'algorithme, quel qu'il soit, les $n_z \times n_x$ vecteurs de **X** sont centrés puis réduits au sens de la norme 2. Nous passons alors à l'étape de *whitening* via une PCA [1]. Le *whitening* s'accompagne, ici, d'une réduction de dimension car décomposer le film Doppler original en autant de composantes qu'on a de points temporels n'a pas de sens et, en pratique, à partir d'un certain ordre, les composantes indépendantes sont quasiment nulles partout. Ce qui est souhaité ici, c'est identifier des composantes artefactuelles et donc de pouvoir différencier ces composantes de celles qui sont pertinentes biologiquement (Kairo *et al* 2017 [85]). Réduire la dimension permet également de réduire grandement le temps de calcul. Il convient alors de trouver un critère pour déterminer m, le nombre de composantes indépendantes ; la valeur de m peut avoir une grande influence sur les résultats et leurs interprétations (Abou-Elseoud *et al* 2010 [2]).

1. http://ufldl.stanford.edu/tutorial/unsupervised/PCAWhitening/

Pour déterminer m, on peut fixer un seuil de variance conservée lors de la SVD de la PCA. Pour simplifier, il est montré sur la figure 2.15 les valeurs propres de **S**, matrice diagonale, telle que, après décomposition en valeurs singulières :

$$\mathbf{X}\mathbf{X}^{\mathbf{T}} = \mathbf{USV} \tag{2.8}$$

Où $\mathbf{X}^T$ représente la matrice transposée de **X** et $\mathbf{X}\mathbf{X}^{\mathbf{T}}$ la matrice de covariance de **X**.

Cette méthode est efficace si l'on a des informations sur le bruit, ce qui n'est pas forcément le cas dans notre situation (Cordes *et al* 2006 [37]). Si m est trop grand, nous pouvons observer une sur-séparation de composantes qui auraient dû être associées, de l'overfitting et une baisse du rapport signal sur bruit. À l'inverse, si m est trop petit, les composantes peuvent être diffuses, c'est-à-dire pas suffisamment séparées.

La détermination de m est cruciale, et pourtant il est souvent complexe de justifier rigoureusement la valeur choisie. Afin de prendre la meilleure décision possible à ce sujet, nous prenons également en compte la stabilité des composantes d'une application de l'algorithme à une autre (l'ICA est un procédé stochastique dépendant forcément de son initialisation et donne des résultats différents à chaque fois), la conservation des composantes quand on fait varier m et enfin, si nous avons accès à plusieurs jeux de données différents pour un même protocole expérimental, nous pouvons également comparer les composantes indépendantes données dans chaque cas.

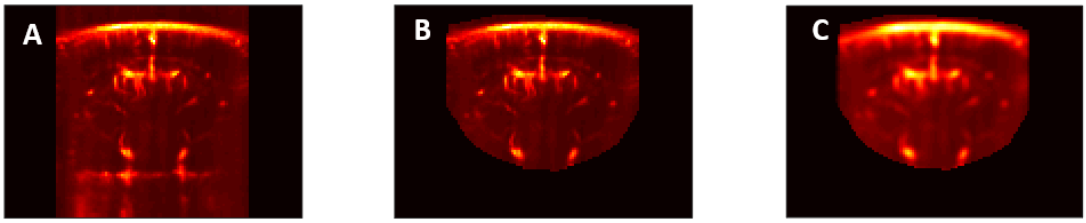


FIGURE 2.16 – Pré-traitements des données pour l'ICA, exemple d'une image Doppler : A) image originale. B) image coupée. C) image coupée dont chaque pixel est moyennée avec ses 8 voisins immédiats

À ce stade, nous pouvons appliquer l'algorithme aux données normalisées et

whitened. Pour accroitre d'avantage sa rapidité d'exécution, il peut être intéressant de réduire, avant ces opérations, la taille du film en découpant le film autour du cerveau. Cela réduit le nombre de pixels étudiés. Il est également utile de moyenner les pixels de chaque image avec ses voisins à l'aide d'un filtre convolutif à deux dimensions ce qui permet d'améliorer le rapport signal sur bruit (les pixels voisins ont a priori le même fonctionnement local physiologiquement parlant) : il s'agit ici d'un compromis à faire avec la résolution spatiale. L'exemple d'une image Doppler dans notre cas est montré sur la figure 2.16. Nous utilisons ici l'algorithme Picard (Ablin *et al* 2018 [1]) qui est un des plus performants dans le cas d'une ICA spatiale simple, notamment car il permet une convergence robuste et rapide vers les solutions de l'équation 2.7. L'ICA, d'une application d'un algorithme à une autre, ne donne pas exactement les mêmes résultats : les composantes indépendantes peuvent plus ou moins différer. Afin de réduire cette variabilité, le logiciel Icasso a été développé (Himberg *et al* 2003 [71]) : il applique l'ICA de nombreuses fois en utilisant des initialisations différentes à chaque fois et effectue du *clustering* sur les composantes indépendantes estimées. Le *clustering*, ou partitionnement de données, est une méthode d'analyse de données qui permet ici de regrouper les composantes indépendantes qui sont similaires selon un critère de distance donné. Cela permet donc d'obtenir des composantes indépendantes plus robustes. Faire du *clustering* sur les solutions issues de différentes ICA sur les mêmes données est possible car la réduction de dimension faite par SVD garantit une unique solution dont les valeurs propres sont ordonnées par "intensité décroissante" (ou portion de la variance décroissante). L'algorithme d'ICA utilisé par le software Icasso est celui du FastICA (Hyvärinen 1999 [76]). C'est un des algorithmes les plus répandus et il est possible de spécifier certains paramètres selon les données sur lesquelles on souhaite l'appliquer. Dans le cas présent, l'approche symétrique est à priviliégier car elle estime toutes les composantes indépendantes en parallèle et la fonction non-linéraire utilisée pour maximiser l'indépendance statistique est la tangente hyperbolique car elle est la plus générale (Hyvärinen 1999 [76]).

Après application du programme Icasso avec les paramètres mentionnés précédemment pour le FastICA, un nombre de répétitions de l'algorithme de 100 et un nombre de composantes indépendantes m de 10, nous obtenons les composantes indépendantes présentées sur la figure 2.17 pour l'exemple étudié dans cette partie jusqu'à présent. Les composantes indépendantes sont classées par "indice de stabilité" (plus il est proche de 1, plus la composante est stable), les premières étant les plus

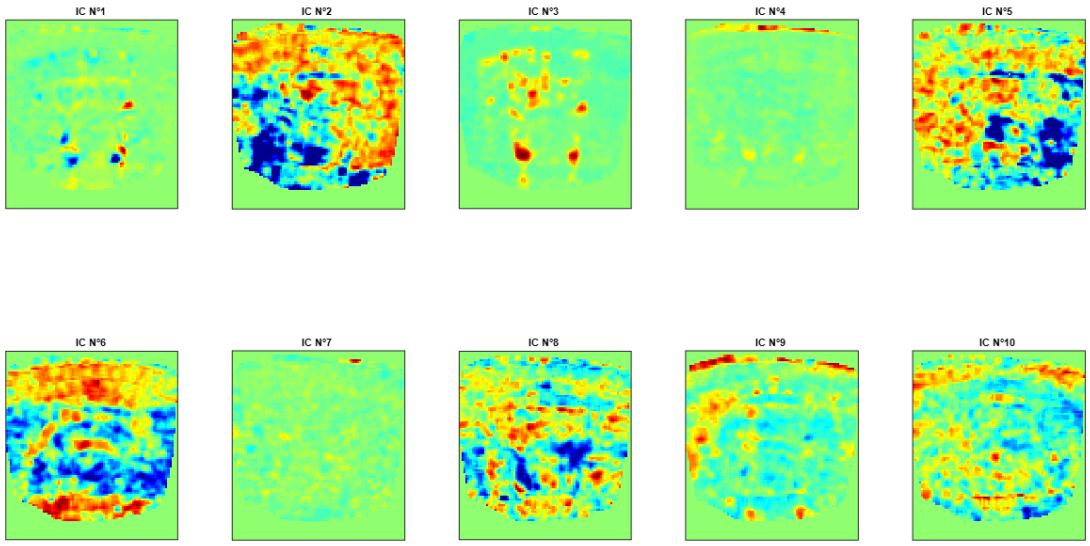


FIGURE 2.17 – Composantes indépendantes (IC) sur l'exemple après Icasso (ICA spatiale).

stables. La figure 2.18 montre que la stabilité des composantes indépendantes décroit assez rapidement. Par ailleurs, sur la droite de la figure, nous nous attendrions à 100 estimations par cluster (composante indépendante type trouvée par *clustering* sur l'ensemble des composantes données par toutes les itérations de l'algorithme) si la séparation était parfaite : la différence s'explique par des clusters qui sont joints. Une représentation de ces clusters est donnée sur la figure 2.19. Les représentations des figures 2.18 et 2.19, ainsi que les informations qu'elles donnent, permettent d'obtenir des critère supplémentaires pour optimiser le nombre de composantes indépendantes voulu notamment mais aussi les autres paramètres des algorithmes utilisés.

Les composantes indépendantes sont ici des cartes spatiales qui permettent d'écrire une estimation du film Doppler initial en effectuant des combinaisons linéaires de ses cartes à chaque instant. Une fois arrêté le choix de l'ensemble des paramètres de la procédure montrée jusqu'à présent, il faut ensuite trier les composantes indépendantes. Ce tri peut se faire en utilisant des arguments différents.

Nous cherchons ici à isoler les composantes qui proviennent des mouvements du sujet étudié. Par exemple, les composantes indépendantes n° 2 et n° 5 montrées sur la figure 2.17 montrent une participation globale des pixels du cerveau et, nous pouvons donc faire l'hypothèse que si le signal est global, c'est à cause du mouvement, le signal hémodynamique fonctionnel n'a aucune raison d'être commun dans tout le

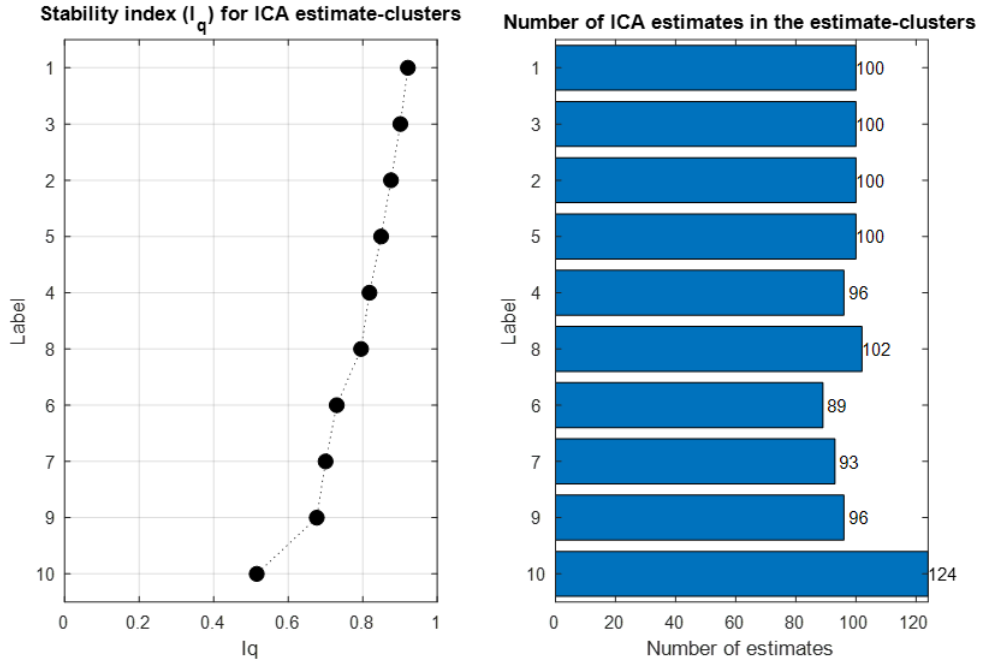


FIGURE 2.18 – Indice de stabilité (Iq) des clusters produits par Icasso (à gauche) et répartition des composantes indépendantes estimées par toutes les itérations de l'algorithme FastICA aux clusters (à droite).

cerveau. La composante n° 4 affiche uniquement les pixels du crâne qui perturbe le fUS et donc semble aussi être une composante artefactuelle. À l'inverse, les composantes indépendantes n°3 et n° 6 montrent des structures cérébrales potentiellement connectées et pourraient participer au signal pertinent.

L'utilisation d'un algorithme de machine learning (réseau de neurones par exemple) permettrait alors d'effectuer un tri automatique des composantes indépendantes après qu'il ait été entraîné suffisamment sur différents jeux de données pour lesquels chaque composante est marquée comme artefactuelle, ou pertinente. Nous pouvons, dans ce cas, utiliser un modèle pré-entrainé sur des images disponible sur internet de type RESNEST50 qui est un réseau de neurones à convolutions successives. Ce modèle donne une représentation vectorielle finale à N catégories. Il suffit alors de couper cette dernière étape et de la remplacer par une représentation à deux dimensions. Nous refaisons tourner cette fois le modèle sur les cartes spatiales pour déterminer si une composante indépendante est, ou non, artefactuelle.

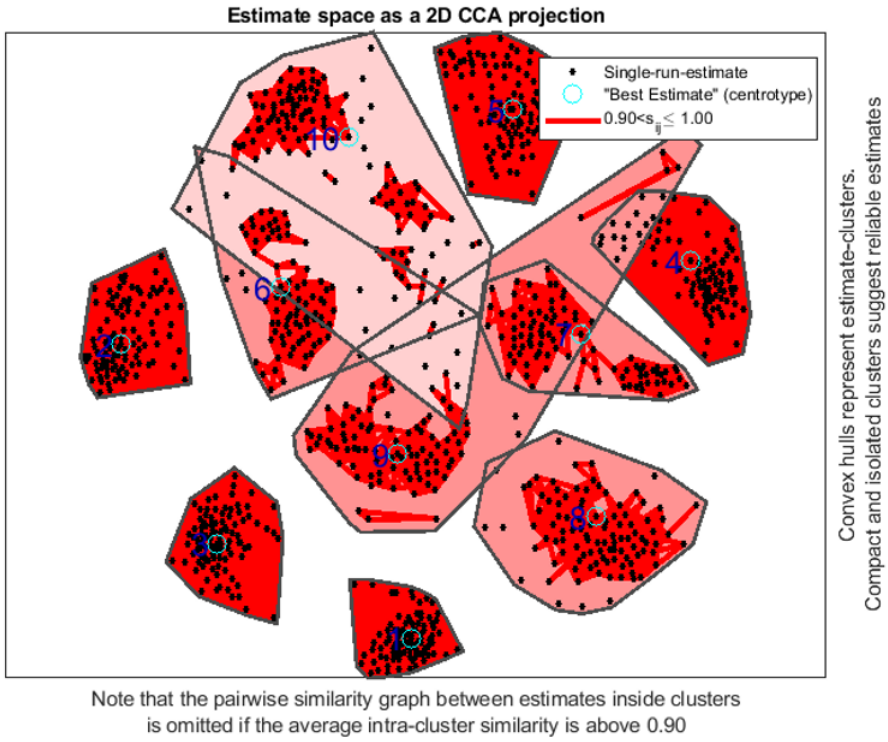


FIGURE 2.19 – Représentation des clusters de composantes indépendantes issus du programme Icasso. Plus le polygone représentant le cluster d'une composante indépendante est compact et isolé, plus l'estimation de cette composante est dite "fiable".

Une fois le tri effectué, il suffit de revenir à l'équation introduite précédemment :

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}\,\mathbf{S} \tag{2.9}$$

Nous avons obtenu une estimation de **A** et de **S** et nous avons identifié les composantes indépendantes qui sont des artefacts : en annulant la contribution de ces composantes indépendantes, nous pouvons remonter à une estimation corrigée de **X** qui nous permet de construire finalement un film Doppler "nettoyé". Ainsi, l'ICA spatiale permet de réduire l'influence des artefacts de mouvement sur les données du fUS. L'ICA temporelle peut également fonctionner.

L'ICA temporelle suit quasiment la même procédure que l'ICA spatiale présentée ici. La différence se fait sur les signaux dont l'indépendance statistique est maximisée : les composantes indépendantes sont des profils temporels qui combinées linéaire-

ment permettent d'estimer **X**. Ces composantes, obtenues sur le même jeu de données et avec les mêmes paramètres, sont montrées sur la figure 2.20.

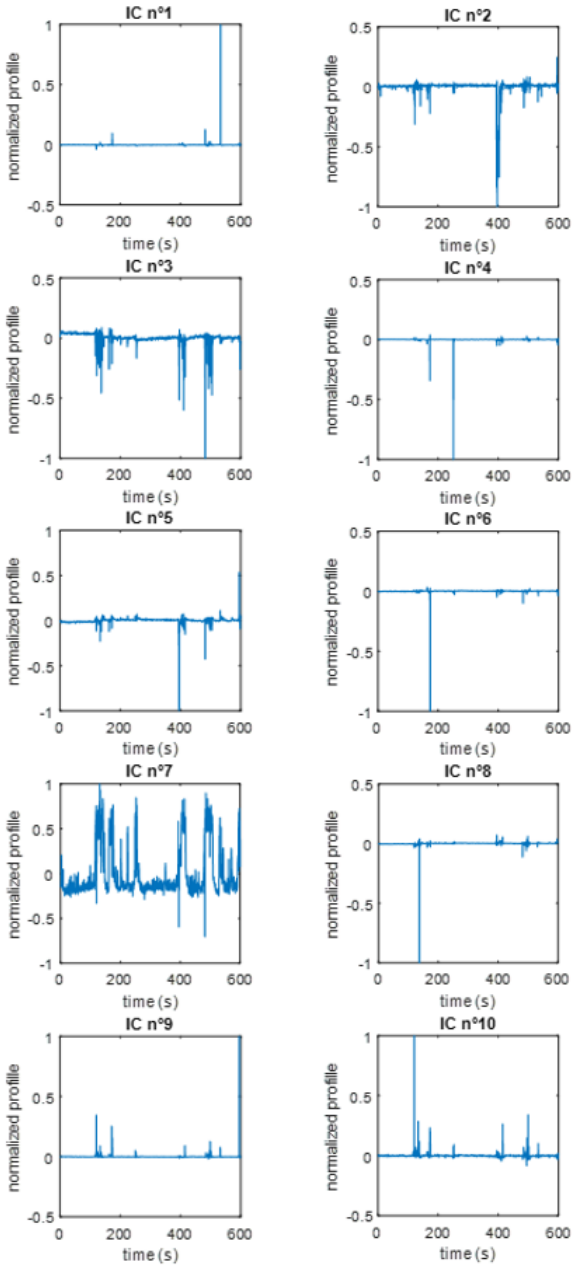


FIGURE 2.20 – Composantes indépendantes (IC) sur l'exemple après Icasso (ICA temporelle).

Les pics de variations du signal de vitesse tissulaire marquant les mouvements de l'animal sont synchrones avec les pics artefactuels du signal Doppler (cf figure 2.7). Ce phénomène permet d'établir un critère de tri des composantes indépendantes : en

seuillant la corrélation temporelle des composantes indépendantes avec le signal de la vitesse tissulaire, il est possible d'identifier les composantes qui sont principalement dues aux mouvements. Sur la figure 2.7, il s'agit du signal correspondant au mouvement d'une image mais il peut être calculé localement pour extraire plusieurs signaux de vitesses issus du mouvement : un hors du crâne, un au niveau de la carotide, un au niveau des muscles maxillaires, etc. De la même manière que précédemment, nous pouvons annuler la contribution de ces composantes, comme la composante indépendante n°10 qui a un coefficient de corrélation de Pearson r = 0,66 avec le signal de vitesse tissulaire, et reconstruire un film Doppler "nettoyé".

2.2.4.3 Les limites de l'ICA

L'analyse en composantes indépendantes permet d'envisager une extraction des artefacts de mouvement du fUS mais cette méthode montre toutefois quelques limitations (Hyvärinen *et al* 2000 [79]) :

1. Il faut choisir à l'avance le nombre de composantes indépendantes. Afin d'effectuer l'étape dite de *whitening*, la PCA (Jolliffe 2002 [84]) réduit la dimension du problème initial. Le plus souvent, cette nouvelle dimension est déterminée en fixant un seuil de variance sur les "intensités" des valeurs propres de la SVD appliquée lors de cette étape. Si typiquement 95 % de la variance est conservée par exemple, il n'est pas impossible que le signal hémodynamique utile était contenu dans les 5 % écartés, compte tenu de la petite amplitude des variations du signal du CBV pour le fUS ou du BOLD pour l'IMRf dans le cadre d'études sur la connectivité fonctionnelle.
2. Il n'y a pas d'information absolue sur la valeur des coefficients des composantes indépendantes. En effet, l'ICA peut se résumer simplement à une factorisation de deux matrices sous certaines conditions. Cette factorisation implique une compensation possible de la valeur de n'importe quel coefficient d'un terme par celui de l'autre terme. Ainsi, les coefficients sont, à l'intérieur d'une même composante, comparables mais les coefficients de deux composantes différentes ne le sont pas.
3. Il n'y a pas d'information sur l'ordre des composantes indépendantes. Comme dans la factorisation, **A** et **S** sont deux matrices inconnues, les composantes ont un ordre interchangeable.

4. L'ICA est un algorithme stochastique et le résultat dépend fortement de son initialisation. Par conséquent, en plus des limitations précédentes, l'ICA ne donne pas les même résultats d'une application à l'autre du même algorithme.

5. Les composantes indépendantes ne doivent pas avoir de distribution normale. Le bruit gaussien ne peut donc être retiré des composantes indépendantes (McKeown *et al* 2003 [111]).

6. Le signal BOLD étudié en IRMf peut prendre des valeurs négatives (il s'agit de moments magnétiques) alors que le CBV ne peut prendre que des valeurs positives : les solutions trouvées par l'ICA n'ont alors pas forcément de signification physique et / ou physiologique.

2.2.5 La factorisation en matrices non-négatives

Il existe une autre approche non-supervisée en analyse de données similaire à l'ICA qui permet une décomposition différente du film Doppler dans l'optique de retirer les artefacts de mouvement : la factorisation en matrices non-négatives ou NMF pour *Non-negative Matrix Factorization* qui a émergé dans les années 1990. Elle permet notamment de s'affranchir d'une des limitations de l'ICA évoquées ci-dessus car elle tient compte de la positivité des signaux de CBV et des signaux artefactuels.

La NMF est utilisée dans une multitude de domaines comme l'analyse automatisée de textes (Barman *et al* 2006 [12]) ou l'astronomie (Hurley *et al* 2014 [75]) et est présente dans le domaine de la neuroimagerie fonctionnelle depuis quelques années en IRMf (Anderson *et al* 2013 [5]) et en EEG par exemple (C. Damon *et al* 2013 [40]).

2.2.5.1 Principes de la NMF

L'ICA, comme l'indique l'équation 2.7, est également une méthode de factorisation en deux matrices avec un critère d'indépendance statistique. Nous reprenons la notation précédente $\mathbf{X}$ à $n_z \times n_x$ lignes et n_t colonnes pour la matrice en deux dimensions qui décrit les profils temporels de chaque pixel du film Doppler étudié.

Appliquer la NMF [1] à **X** revient à écrire :

$$\mathbf{X} = \mathbf{W}\,\mathbf{H} \tag{2.10}$$

Où **W** est une matrice où tous les éléments sont positifs (dite matrice positive) à $n_z \times n_x$ lignes et m colonnes, et **H** une matrice positive de m lignes et n_t colonnes.

La NMF permet ainsi de décomposer **X** en m modes temporels stockés dans **H** et m modes spatiaux stockés dans **W**. Cette méthode parait particulièrement adaptée au fUS comme le CBV mesuré est de signe positif. Dans ces conditions, l'équation 2.10 n'a pas de solution exacte : la NMF donne une estimation numérique de la solution. La contrainte de non-négativité est pertinente dans la situation présentée ici : seules les combinaisons linéaires additives sont autorisées, les combinaisons linéaires négatives sont proscrites. Reprenons l'exemple d'acquisition présenté précédemment pour l'ICA (Lee *et al* 1999 [97]). La figure 2.6 montre que les artefacts de mouvements créent des pics sur le Doppler moyenné spatialement sur l'ensemble des pixels. Les artefacts s'ajoutent ainsi de manière positive aux signaux des variations du CBV. La décomposition numérique résultant de la NMF prend bien compte de cette singularité. Elle pourrait permettre aussi la séparation des réseaux de connectivité fonctionnelle. Le nombre de modes m sous-entend, de même que pour l'analyse en composantes indépendantes, une réduction de dimension.

À l'instar de l'ICA, il existe plusieurs algorithmes pour réaliser une NMF (Lee *et al* 2001 [96]). Nous utilisons ici la fonction *nnmf* présente dans le logiciel Matlab [2]. Elle est basée sur la minimisation de l'écart quadratique moyen entre **X** et le produit matriciel **W H** et utilise une méthode itérative qui s'initialise avec des matrices **W** et **H** aléatoires. Il n'y a pas de solution unique à l'équation 2.10. De plus, cet algorithme peut converger sur un minimum local et par conséquent, si la factorisation est répétée plusieurs fois, il est très probable d'obtenir des estimations différentes pour **W** et **H**.

1. https://web.stanford.edu/~hastie/Papers/ESLII.pdf
2. https://fr.mathworks.com/help/stats/nnmf.html

2.2.5.2 Application de la NMF au fUS éveillé

Afin de voir comment appliquer cette technique sur la réjection d'artefacts de mouvement du fUS, reprenons les données de l'exemple utilisé jusqu'à maintenant : dix minutes de film Doppler d'une souris éveillée dans le Mobile Home Cage.

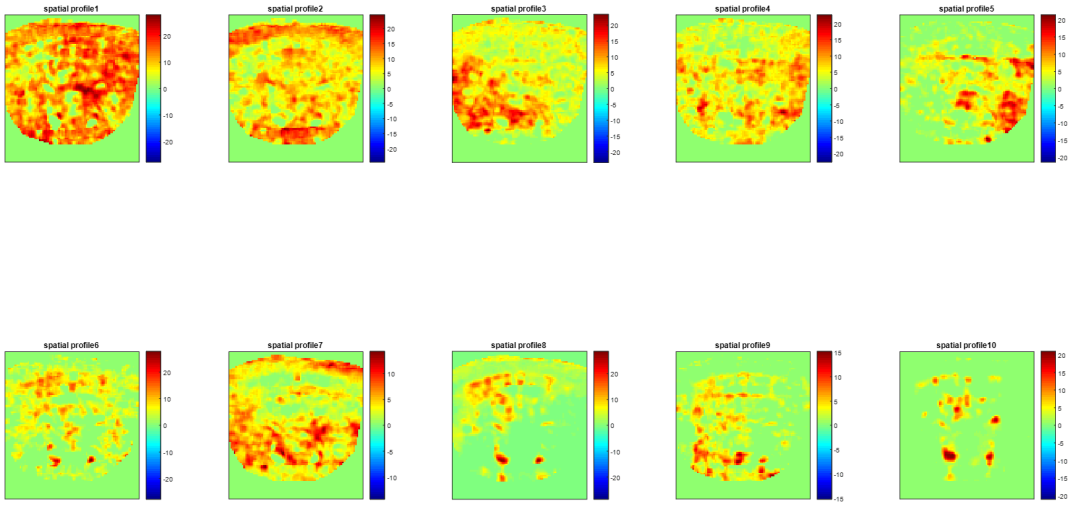


FIGURE 2.21 – Modes spatiaux obtenus par NMF.

Concernant le pré-traitement des données, la NMF requiert une normalisation temporelle du signal de chaque pixel, c'est-à-dire de chacune des lignes de $\mathbf{X}$. Pour accélérer l'algorithme, il est également possible, comme cela a été illustré sur la figure 2.16, de réduire la taille de chaque image en dessinant un masque autour de la zone du cerveau qui nous intéresse. Pour améliorer le rapport signal sur bruit des solutions, nous pouvons effectuer un moyennage spatial de chaque pixel avec ses 8 plus proches voisins avec un filtre convolutif de *kernel* 3.

Les modes spatiaux obtenus sont donnés sur la figure 2.21 tandis que les modes temporels sont donnés sur la figure 2.22. La valeur absolue des pixels des modes spatiaux ou des pics des profils des modes temporels n'a pas de sens comme il s'agit d'une factorisation matricielle. À la différence avec l'ICA, nous ne pouvons pas regrouper les solutions de plusieurs factorisations des mêmes données car la réduction de dimension utilisée par l'algorithme de NMF n'a pas de solution unique : il est impossible de comparer des objets qui ne font pas partie d'un même espace. Par conséquent, il n'est pas possible d'itérer l'algorithme plusieurs fois pour stabiliser les solutions comme le programme Icasso le permettait en ICA.

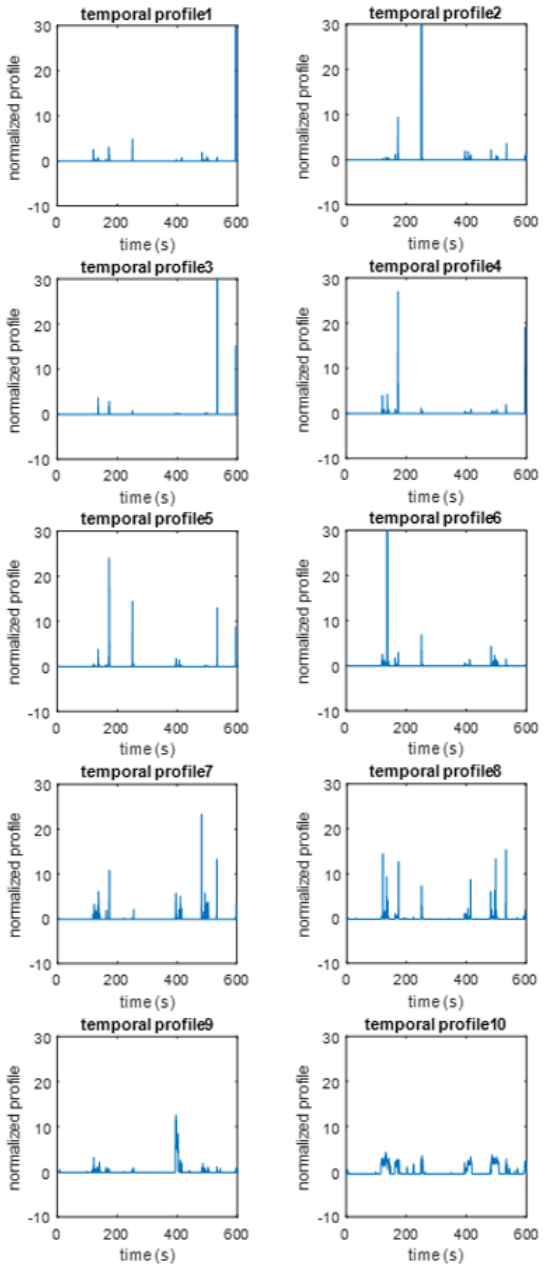


FIGURE 2.22 – Modes temporels obtenus par NMF.

Une fois les modes obtenus, il convient de les trier en fonction de leur origine artefactuelle. Les modes spatiaux peuvent l'être via un modèle de réseau de neurones analogue à celui proposé pour trier les composantes indépendantes données par l'ICA : le mode n° 1 où quasiment tout le cerveau est "activé" peut être considéré comme provenant des mouvements de l'animal.

Les modes temporels peuvent être également triés selon leur corrélation avec le signal de vitesse tissulaire décrit précédemment. Une fois les modes labelisés, la contribution de ceux qui sont considérés comme des artefacts est annulée pour reconstruire un film Doppler ainsi "nettoyé", que l'on appelle $\mathbf{X_{rec}}$.

Le nombre m de modes est choisi en fixant un seuil sur l'erreur de reconstruction ϵ définie par l'équation suivante :

$$\epsilon = \frac{\sum\sum \|\mathbf{X_{rec}} - \mathbf{X}\|^2}{\sum\sum \|\mathbf{X}\|^2} \tag{2.11}$$

2.2.6 Résultats des méthodes et comparaison

Nous avons présenté et expliqué les méthodes numériques suivantes, développées pendant cette thèse pour s'affranchir des artefacts de mouvement pour le fUS éveillé chez la souris :

1. le *censoring*,
2. la régression de nuisance,
3. le filtre à SVD dynamique,
4. l'ICA,
5. la NMF.

Il convient maintenant de montrer les résultats que donnent chacune des méthodes et de comparer leur performance. Le *censoring* est gardé à part, car il permet déjà robustement de sélectionner les plages temporelles calmes du film Doppler en retirant les images impactées par le mouvement : les autres conservent l'ensemble des images Doppler.

Pour comparer ces dernières, nous utilisons un exemple d'acquisition de 30 minutes d'une souris éveillée dans le dispotif expérimental de *hybrid freely-moving*. Les autres paramètres d'imagerie ainsi que le matériel utilisé est le même que celui présenté dans les expériences de *resting-state* décrite dans le chapitre 3 pour le projet en collaboration avec l'institut Pasteur.

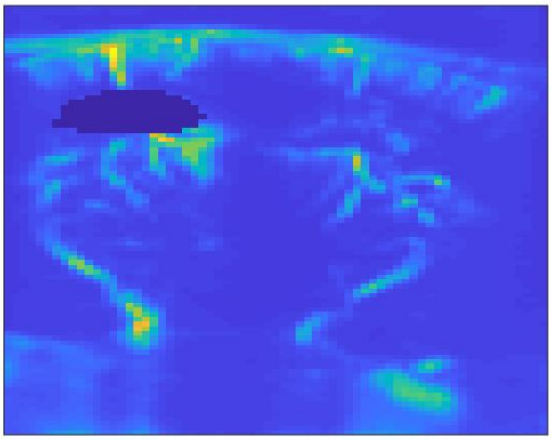


FIGURE 2.23 – Film Doppler moyenné temporellement avec affichage de la zone de l'hippocampe utilisé pour l'analyse *seed-based* en bleu foncé.

Pour comparer ces méthodes, nous avons étudié la corrélation de l'hippocampe gauche en effectuant une analyse *seed-based* : la carte du maximum de corrélation temporelle entre le signal moyen normalisé du CBV de l'hippocampe gauche avec le signal normalisé de tous les pixels du film considéré est construite. La figure 2.23 montre la zone de l'hippocampe gauche choisie comme référence ici. Nous avons effectué cette analyse pour le film Doppler complet, une fenêtre temporelle de *resting-state* (plage calme trouvée par *censoring* et une fenêtre où la souris est en mouvement (plage agitée trouvée par *censoring*) pour les cas suivants :

1. film Doppler brut (Brut),
2. film Doppler brut avec régression de nuisance et le signal Doppler global moyenné comme régresseur (Reg)
3. film Doppler après filtre à SVD dynamique et régression de nuisance avec le signal "stabilité" et la famille de l'équation 2.4 comme régresseurs (Filtre SVD dynamique + Reg),
4. ICA,
5. NMF.

Les résultats de ces analyses sont rapportés dans la figure 2.24. Nous attendons de l'analyse *seed-based* avec l'hippocampe gauche de montrer un maximum de corrélation avec lui-même et la zone contralatérale, l'hippocampe droit et potentiellement

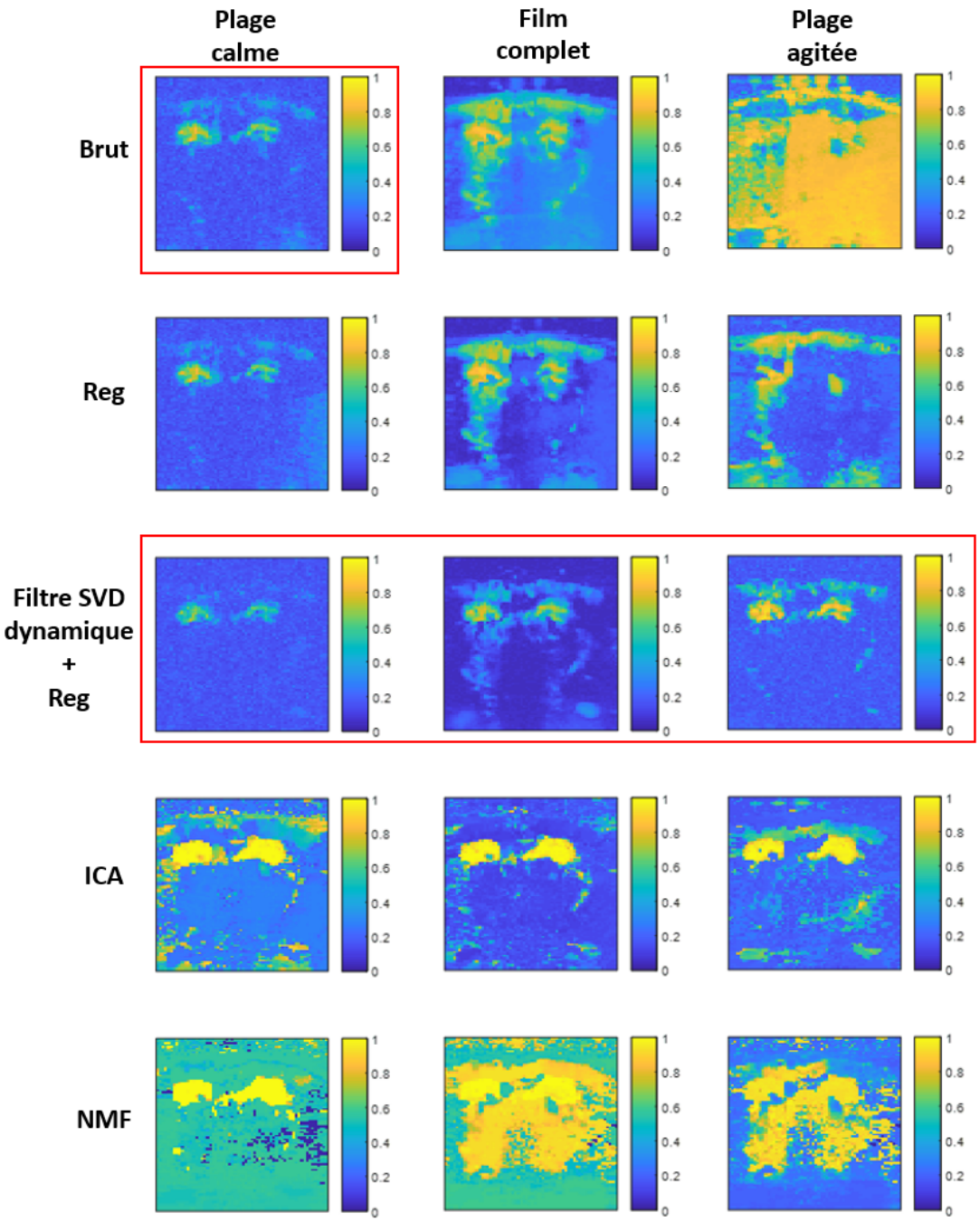


FIGURE 2.24 – Comparaison des méthodes numériques de réjection d'artefacts de mouvement : étude de la corrélation de l'hippocampe gauche d'une souris pendant une acquisition.

d'autres zones du cerveau comme nous pouvons l'observer pour le Doppler brut dans le cas de la plage calme (cf encadré en rouge sur la figure 2.24).

Pour le film complet et la plage agitée, l'hippocampe gauche corrèle avec quasiment tous les pixels du cerveau lorsqu'on regarde le film complet ce qui montre l'influence des artefacts de mouvement qui introduisent des variations du signal de CBV communes à toute l'image, enfin pour la plage agitée, nous observons même une corrélation avec des pixels qui ne sont pas dans le cerveau.

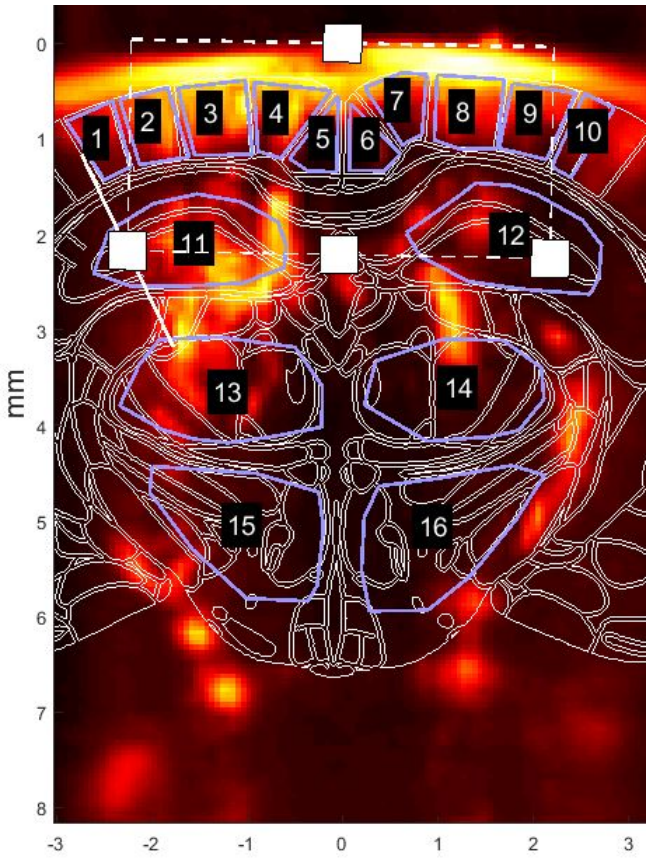


FIGURE 2.25 – Superposition de l'image Doppler de l'atlas Paxinos du plan 49 (cf partie 3.1.1.3) mettant en évidence les zones cérébrales étudiées : 1-10 : Cortex / 11-12 : Hippocampes / 13-14 : Thalamus / 15-16 Hypothalamus.

Pour la régression seule, le maximum de corrélation correspond aux deux hippocampes dans les cas de la plage calme. Pour le film complet, nous pouvons constater une légère amélioration par rapport au Doppler brut. Par ailleurs, la corrélation est grandement amélioré dans le cas de la plage agitée par rapport au Doppler brut : la corrélation avec l'extérieure du cerveau a quasiment disparu mais semble persister au niveau des carotides.

Dans le cas de l'utilisation du filtre à SVD dynamique suivie de la régression

de nuisance avec la famille de signaux "stabilité" comme régresseurs, les cartes de corrélation obtenues sont satisfaisantes car semblables à celle de la référence, le Doppler brut en plage calme ; c'est, à ce stade, la méthode la plus efficace (encadrée en rouge également).

Pour l'ICA, nous pouvons voir une très forte corrélation de l'hippocampe gauche avec le droit ce qui est pertinent ici même si d'autres corrélations, sensiblement plus faibles, sont présentes dans d'autres zones non pertinentes.

Dans le cas de la NMF, les résultats données par l'analyse *seed-based* ne sont pas concluants dans le cas de la plage agitée car la corrélation est maximale quasiment partout.

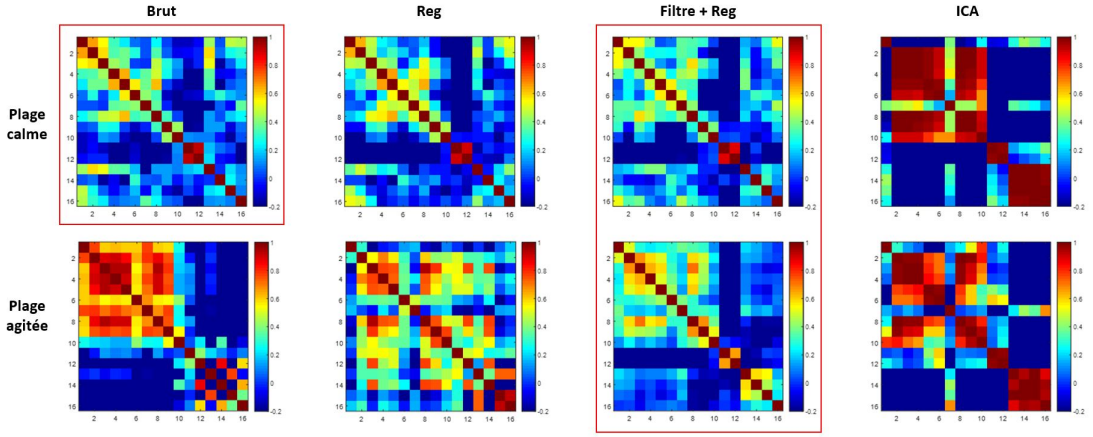


FIGURE 2.26 – Comparaison des méthodes numériques de réjection d'artefacts de mouvement : étude de la corrélation de l'hippocampe gauche d'une souris pendant une acquisition.

À la lumière de cette première comparaison, le filtre à SVD dynamique suivi de la régression de nuisance avec la famille de signaux "stabilité" comme régresseurs apparait comme la plus robuste, suivie de l'ICA et de la régression de nuisance simple avec le signal Doppler moyenné global comme régresseur.

Pour aller plus loin dans la comparaison, nous avons calculé des matrices de connectivité sur les plages calmes et agitées pour ces méthodes à partir des zones cérébrales montrées sur le schéma de la figure 2.25.

L'examen de ces matrices de connectivité, affichées sur la figure 2.26, nous permet d'obtenir d'autres renseignements sur la performance de chacune de ces 3 méthodes.

L'ICA, qui était la une des plus robustes pour l'analyse *seed-based* de l'hippocampe gauche, ne permet pas de retrouver la matrice de connectivité du Doppler brut de la plage calme, qui fait référence (encadrée en rouge). Il est probable que les composantes indépendantes retenues contenaient les signaux relatifs aux hippocampes mais que le reste du signal ait été perdu. La régression de nuisance simple et le filtre avec régression s'en approchent. Quant à la plage agitée, on peut remarquer que le filtre suivi de la régression est la méthode qui permet de retrouver au mieux la connectivité du Doppler brut en plage calme. On encadre les matrices de filtre à SVD dynamique suivi de régression car là aussi, il s'agit de la méthode de réjection d'artefacts de mouvement la plus robuste.

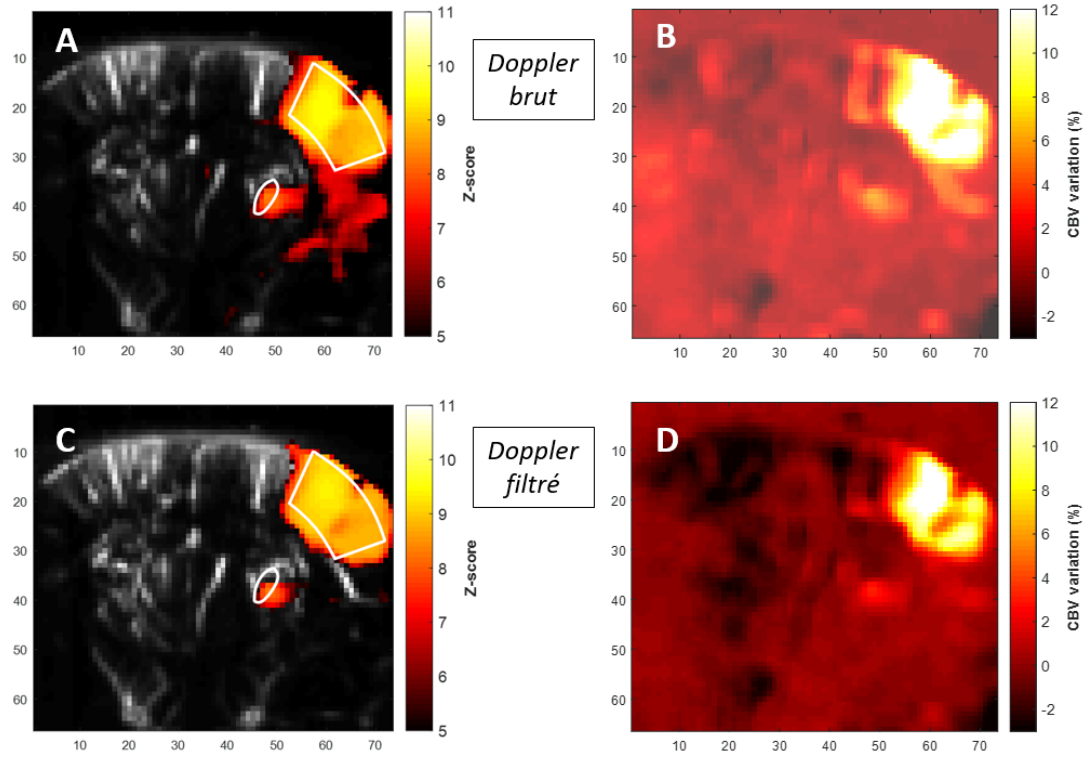


FIGURE 2.27 – Activation du S1BF droit attendue dans la zone de l'atlas Allen dessinée en blanc sur (A et C) : (A et C) Superposition de la vasculature (échelle de gris) et de la carte des z-scores (échelle de couleur) de la réponse du cerveau à la stimulation répétée des vibrisses gauche et (B et D) Variations de CBV dues au stimulus. Doppler brut pour A et B et Doppler après filtrage à SVD dynamique pour C et D.

Par ailleurs, on montre sur la figure 2.27 les résultats d'une expérience de stimulation fonctionnelle éveillée chez la souris de 6 minutes dans le Mobile Home Cage dont les données ont été filtrées puis régressées (les conditions expérimentales

et matérielles sont les mêmes que celles décrites dans l'introduction de la partie 2.2). La stimulation répétée des vibrisses gauche active normalement le cortex somatosensoriel S1BF et le thalamus. Cette méthode conserve également bien l'activité fonctionnelle et le résultat est encore meilleur que pour le Doppler brut car la zone de stimulation y est vraiment confinée dans les zones attendues du S1BF et du thalamus.

Le filtre à SVD dynamique suivie de la régression de nuisance avec la famille de signaux "stabilité" comme régresseurs parait donc, la méthode la plus performante pour minimiser les effets du mouvement pour faire du fUS éveillé chez la souris.

Par ailleurs, son application apparait, aujourd'hui, plus simple et plus argumentée que celles des méthodes non-supervisées d'analyse de données que sont l'ICA et la NMF qui restent relativement aveugles pour l'instant. Ces dernières, avec des développements ultérieurs pourraient donner des résultats et, quand elles seront matures, on pourra peut-être penser à les combiner avec la SVD dynamique, comme elles traitent le film Doppler à l'instar de la régression de nuisance et que le filtre à SVD dynamique utilise les données *post-beamforming*.

Ainsi, nous retiendrons pour la suite de ces travaux, pour la réjection d'artefacts de mouvement du fUS éveillé chez la souris que nous verrons dans le chapitre 3, le filtre à SVD dynamique suivie de la régression de nuisance avec la famille de signaux "stabilité" comme régresseurs.

Cette méthode a été utilisée pour montrer un exemple de stimulation fonctionnelle chez la souris éveillée par Bertolo *et al* début 2021 [22]. Elle permettra d'étudier les interactions sociales notamment dans le chapitre 3.

Enfin, le *censoring*, ou suppression d'images, permet également de faire du fUS éveillé sans que les mouvements n'introduisent d'artefacts dans les variations de CBV mesurées comme seules les plages temporelles calmes sont conservées. Cette approche est également intéressante et sera également utilisée par la suite. Cependant, elle est assez contraignante car les critères permettant de "labeliser" une image de Doppler "calme" font qu'on obtient un film Doppler final comportant typiquement 20 % du film initial. Cela peut entrainer une perte de certaines informations fonctionnelles, liées à des tâches sociales par exemple qui sous-entendent bien souvent du mouvement.

3 Applications du fUS au petit animal éveillé

Après avoir introduit le fUS dans le chapitre 1, nous avons montré dans le deuxième chapitre l'importance de pouvoir imager des animaux éveillés en mouvement et comment y parvenir avec les ultrasons, dont l'utilisation est particulièrement pertinente pour cette application.

Le projet qui a motivé les travaux initiaux était de pouvoir faire de l'imagerie fonctionnelle cérébrale du petit animal lors de ses interactions sociales. Tous les développements présentés jusqu'à maintenant ont été réalisés dans cette optique dans un travail collaboratif avec l'équipe de Thomas Bourgeron de l'institut Pasteur et celle de Rebecca Piskorowski et Cécile Viollet de l'Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris (IPNP) pendant lequel ils ont pu être mis en application pour répondre à des problématiques scientifiques qui sont respectivement la caractérisation fonctionnelle d'un modèle d'autisme chez la souris et l'investigation des nouveautés sociale et environnementale, également chez la souris.

3.1 Caractérisation fonctionnelle d'un modèle d'autisme

3.1.1 Présentation du projet

Ce projet est une collaboration entre notre laboratoire dirigé par Mickael Tanter *Physics for Medicine Paris*[1] de l'ESPCI Paris et celui de Thomas Bourgeron à l'institut Pasteur, *Human Genetics and Cognitive Functions*[2] financée par la région Île-de-France et le projet DIM ELICIT[3] avec notamment Élodie Ey et Benoit Forget. En combinant les savoir-faires des deux équipes, nous avons cherché à conduire une analyse fonctionnelle de la communication sociale et des comportements stéréotypiques dans un modèle d'autisme chez la souris, le modèle SHANK3.

L'autisme (cf figure 3.1 tirée de Klinger *et al* 2014 [89]) est un trouble du neurodéveloppement qui se caractérise notamment par un déficit d'interactions sociales associé à des comportements stéréotypiques et des intérêts restreints[4] et qui touche quasiment un enfant sur cinquante.

Par ailleurs, les troubles autistiques semblent avoir une forte origine génétique (Abrahams *et al* 2013 [3]). Comme on l'a vu précédemment, la souris est le modèle animal le plus adapté pour faire des études génétiques et c'est pourquoi l'étude qui suit est basée sur ce modèle. Le génome de la souris comporte une une majorité de gênes en commun avec le génome humain, ce qui permet généralement d'obtenir des informations chez l'être humain, malgré la différence d'espèce. La famille SHANK (Monteiro *et al* 2017 [114]) contient trois gènes dont 1 % des patients autistes présentent au moins une mutation (Leblond *et al* 2014 [95]), ce qui est plutôt fréquent par rapport à d'autres origines génétiques. Le gène SHANK 3 code pour des protéines en partie responsables de l'échafaudage de la synapse et sa mutation est le sujet principal de ce projet : les souris mutées ont notamment des comportements répétitifs et présentent des problèmes d'interaction sociale (Leblond *et al* 2014 [95]).

Les traitements comportementaux visant à réduire les comportements stéréotypiques et le manque d'interaction sociale ne sont pas encore matures et c'est la raison pour laquelle il est important d'investiguer les circuits neuronaux impliqués. Les

1. https://www.physicsformedicine.espci.fr/
2. https://research.pasteur.fr/fr/team/human-genetics-and-cognitive-functions/
3. https://dim-elicit.fr/
4. https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/hcp-dsm.html

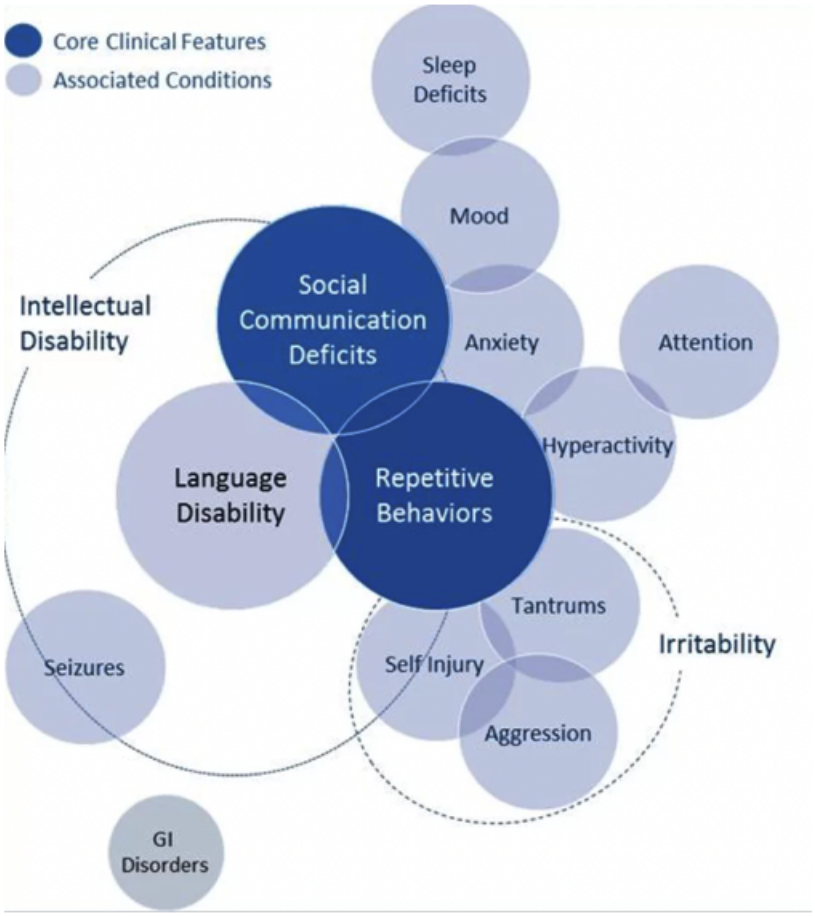


FIGURE 3.1 – Les troubles du spectre autistique.

régions cérébrales activées lors des comportements liés à la communication sociale sont, toujours de nos jours, méconnues et c'est également le cas pour les comportements stéréotypiques. Chez la souris mutée SHANK 3, on observe un toilettage, ou *grooming*, compulsif. Le but, ici, est donc de caractériser ce modèle de trouble autistique afin de mieux en comprendre les mécanismes cérébraux, et possiblement évaluer une solution thérapeutique le cas échéant avec le lithium (Serret *et al* 2015 [146]) ou le zinc (Fourie *et al* 2018 [53]).

Établir un lien entre ces troubles comportementaux et la connectivité fonctionnelle est un défi actuel : il existe peu d'études qui ont réussi à obtenir des résultats. Nous allons alors ici essayer de poser les bases de l'identification des circuits neuronaux impliqués dans la communication sociale et les comportements répétitifs afin de comprendre les origines fonctionnelles de ces symptômes dans un modèle

d'autisme chez la souris.

Pour ce faire, il convient de commencer par caractériser la connectivité cérébrale des souris SHANK 3 en *resting-state* en les comparant avec des souris *wild-type* dans le dispositif expérimental dit de *hybrid freely-moving* puis, dans un deuxième temps, de relier le fUS à des phénomènes comportementaux associés à des interactions sociales ou des comportements stéréotypiques pour mettre en évidence les perturbations des connexions entre les zones du cerveaux dues à la mutation, si elles existent.

Le fUS éveillé reste, pour le moment, une imagerie en deux dimensions. Par conséquent, il a fallu au préalable identifier les régions du cerveau connues pour avoir un rôle dans la communication sociale et dont le fonctionnement est différent lors des comportements répétitifs pour sélectionner finalement des plans coronaux à imager.

3.1.1.1 Circuits neuronaux impliqués dans la communication sociale

La communication sociale implique des circuits neuronaux liés à la perception sensorielle, aux émotions, à la motivation, à la prise de décision et au contrôle exécutif. La perception sensorielle prend place notamment dans le cortex visuel, les cortex auditifs primaire et secondaire, le bulbe olfactif et le bulbe olfactif accessoire. Ces régions sont reliées à l'amygdale et à différents cortex sensoriels qui envoient l'information au cortex préfontal, chargé d'apporter la réponse appropriée. Après l'intégration du stimulus social, l'amygdale est activée pour évaluer la valence de l'interaction puis projette dans l'hypothalamus, qui projette en retour à l'amydgale pour choisir le type de réponse, affiliative ou aversive (Maren *et al* 2003 [107]).

L'hippocampe joue lui un rôle majeur dans la mémoire sociale et les émotions (Hitti *et al* 2014 [72]).

En outre, le "circuit de la récompense" est crucial dans les communications sociales, la motivation et les interactions (Chevallier *et al* 2012 [34]). Il est composé notamment du cortex ventromédial préfrontal, le noyau acumbens et l'aire tegmentale ventrale.

Les souris utilisent principalement l'odorat pour interagir socialement (Brennan *et al* 2006 [25]) et il convient donc de s'intéresser aux aires cérébrales impliquées. Elles utilisent également les vocalisations ultrasonores pour communiquer dont l'émission

semble être initiée depuis l'amygdale et le cortex cingulaire antérieur puis l'information se propage dans la substance grise périaqueducale et parvient au noyau ambigu, qui innerve alors jusqu'au larynx (Arriaga *et al* 2013 [7]). Le type de vocalisations ultrasonores émis serait davantage contrôlé par l'amygdale et le cortex préfrontal dorsomédian, siège de l'éveil et des émotions. La perception auditive commence elle dans la cochlée puis le signal est transmis via le nerf auditif au noyau cochléaire. L'assimilation de l'information auditive se poursuit ensuite dans le complexe olivaire supérieur ainsi que dans le colliculus inférieur, qui projette vers le thalamus et rejoint le cortex auditif. Il existe une boucle de rétroaction qui consiste en la projection, par l'amygdale basolatérale, du signal auditif provenant du thalamus et qui arrive ensuite à l'hippocampe et au colliculus inférieur (Barnstedt *et al* 2015 [13]).

3.1.1.2 Circuits neuronaux impliqués dans les comportements répétitifs

Le ganglion basal, incluant le striatum, le pallidum, le pallidum ventral, le noyau sous-thalamique et la substance noire est impliqué dans la modulation des comportements répétitifs et stéréotypiques (Ellegood *et al* 2018 [48]). Ces structures sont reliées au cortex via des boucles corticostriatales (Alexander *et al* 1986 [4]) et jouent un rôle dans le contrôle des mouvements et la coordination motrice. Le striatum est lui directement lié à la substance noire via l'activation de projections thalamo-corticales et indirectement au pallidum via l'inactivation de projections thalamocorticales. Ce premier lien permet le mouvement tandis que le deuxième l'inhibe (Lanen *et al* 2011 [94]).

3.1.1.3 Plans coronaux choisis

À la lumière de ce qui a été expliqué précédemment sur les circuits neuronaux impliqués dans la communication sociale et dans les comportements répétitifs, plusieurs plans coronaux ont été identifiés afin d'y placer la sonde pour les sessions d'imagerie. Ces plans coronaux sont illustrés dans les figures qui suivent depuis l'atlas Paxinos (Paxinos *et al* 2019 [129]).

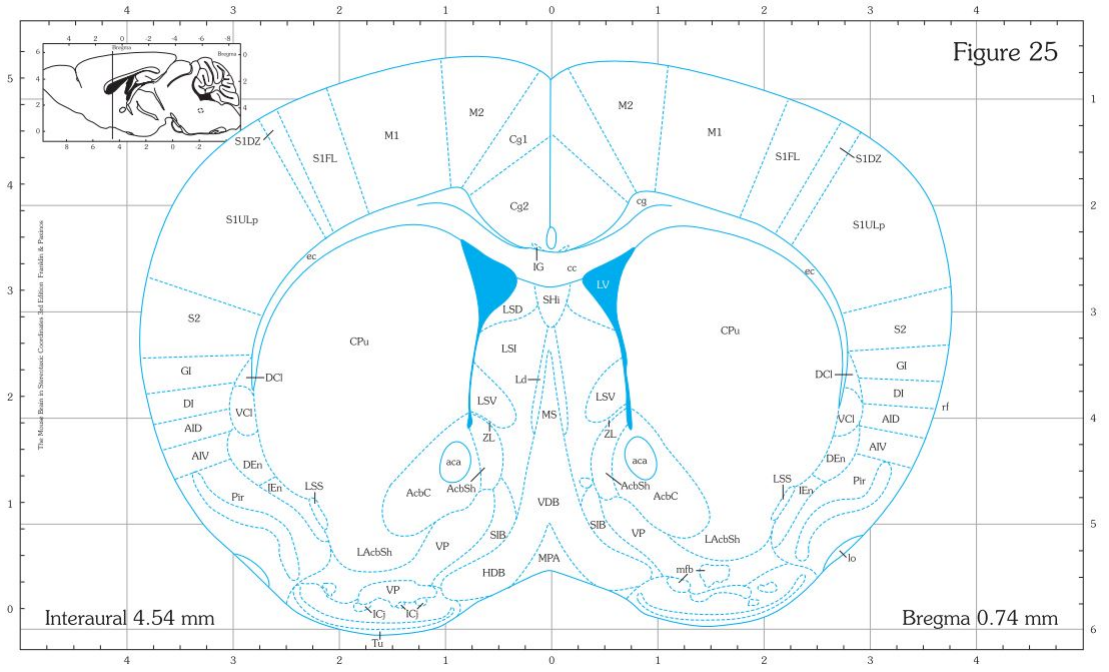


FIGURE 3.2 – Plan 25 de l'atlas coronal de la souris (Paxinos)

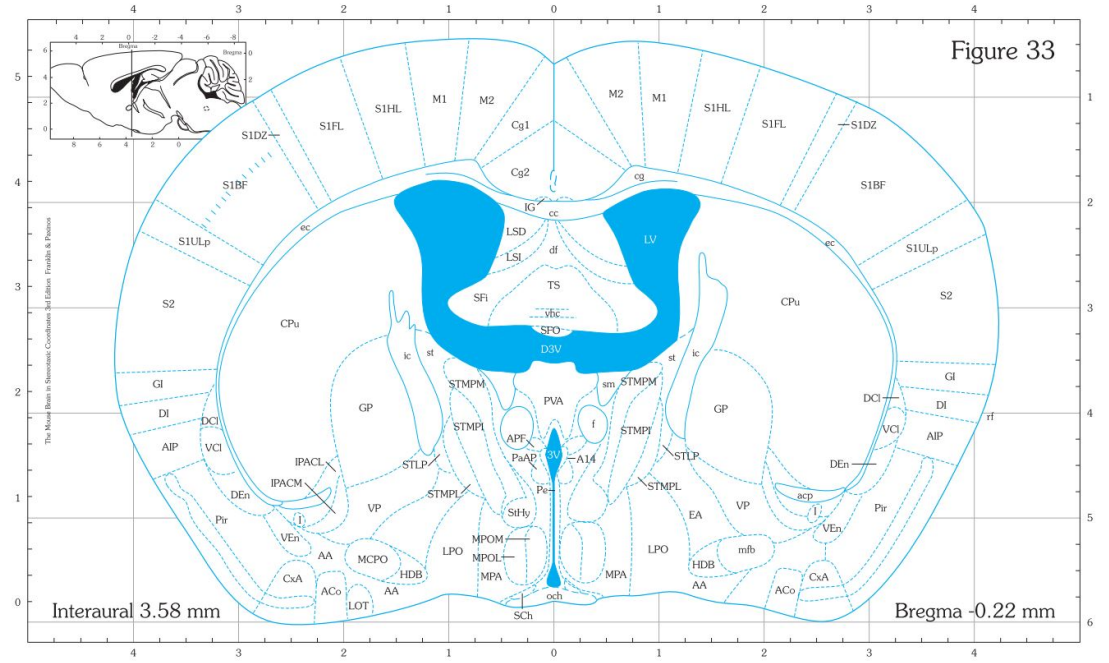


FIGURE 3.3 – Plan 33 de l'atlas coronal de la souris (Paxinos)

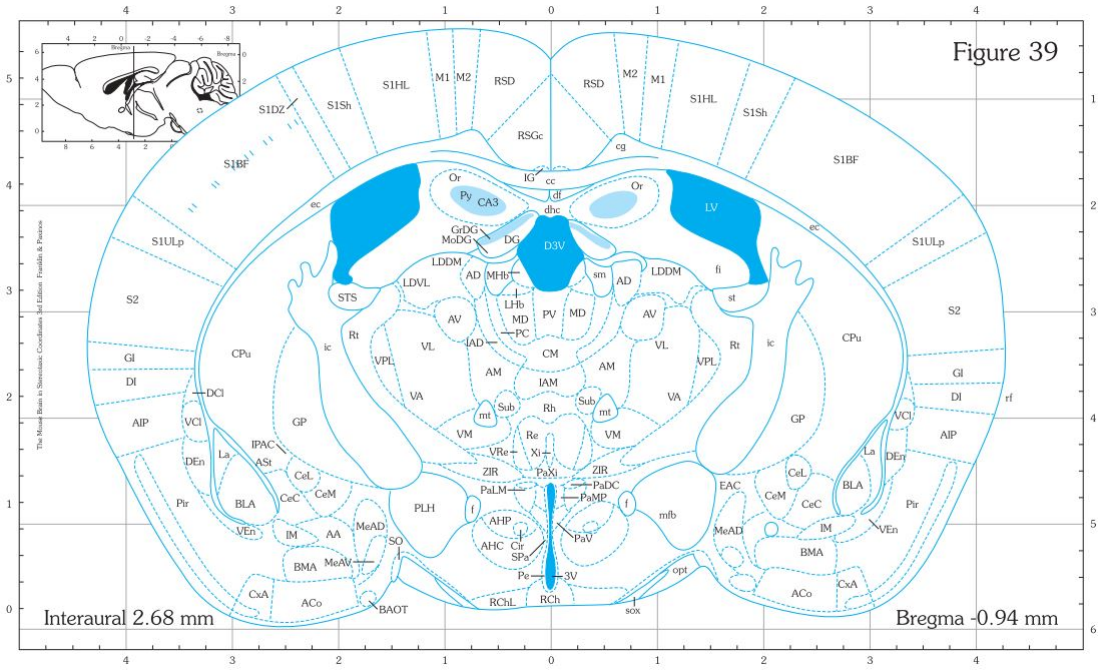


FIGURE 3.4 – Plan 39 de l'atlas coronal de la souris (Paxinos)

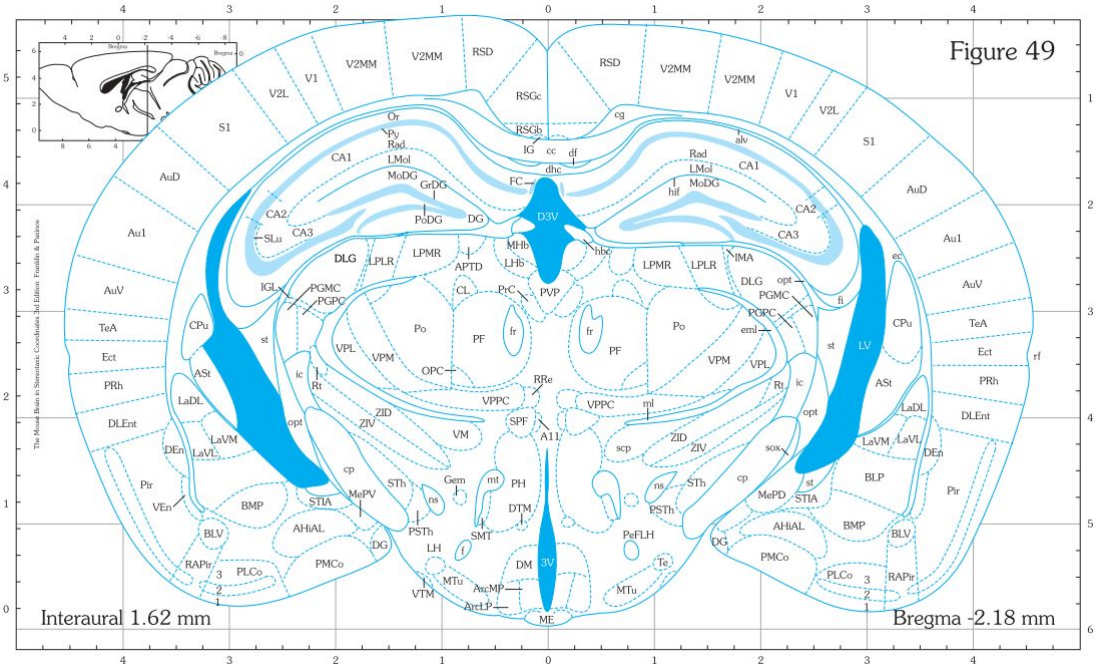


FIGURE 3.5 – Plan 49 de l'atlas coronal de la souris (Paxinos)

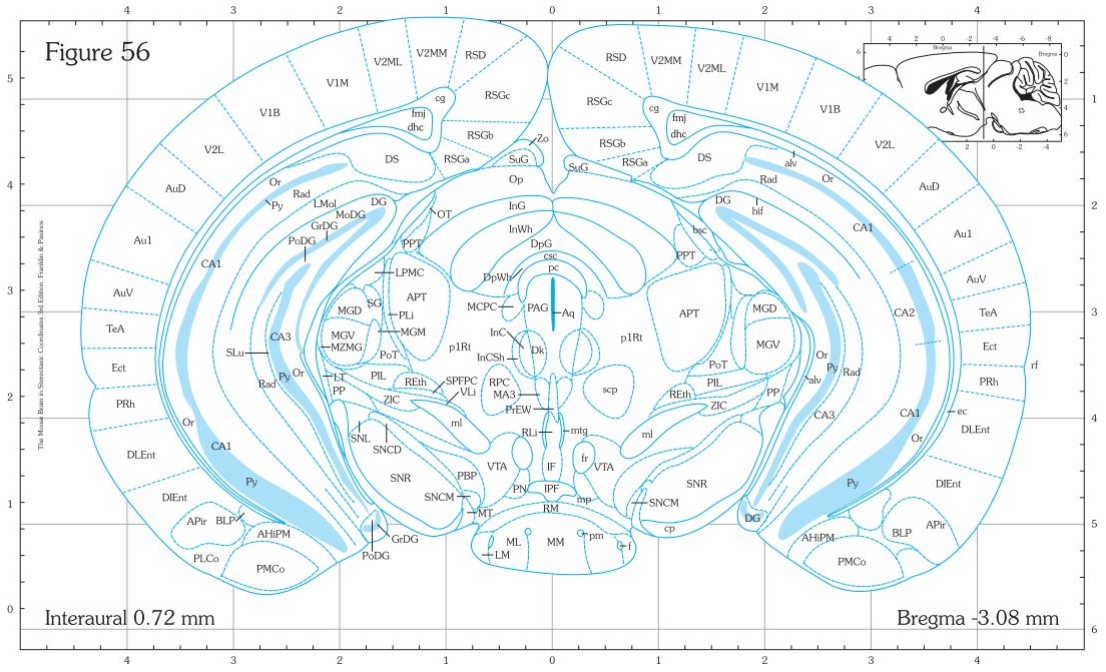


FIGURE 3.6 – Plan 56 de l'atlas coronal de la souris (Paxinos)

3.1.2 Matériel et méthodes

On utilise ici le dispositif expérimental de *hybrid freely-moving* décrit dans le chapitre 2. On utilise un échographe de recherche Verasonics [1] Vantage 128 sur lequel est connecté une sonde échographique à 15 MHz Vermon [2] de 64 éléments espacés de 0,11 mm. L'échographe est piloté par le logiciel de neuro-imagerie en temps réel Neuroscan [3] et permet de faire du fUS transcranien chez la souris éveillée étudiée, sur la tête de laquelle a été fixée au préalable un cadre métallique aimanté permettant de venir clipser la sonde via le porte-sonde décrit précédemment.

Les souris ont été entraînées dix jours pour s'habituer au dispositif expérimental après avoir récupéré de la chirurgie (Rabut *et al* 2020 [136]). Le protocole d'habituation a été donné sur la figure 2.4. Chaque souris a été imagée pendant trente minutes en fUS à 500 Hz. Chaque image Doppler est issue de blocs continus de 200 images *post-beamforming* utilisant 11 ondes planes angulées (-10°,-8°,-6°,-4°,-2°, 0°, 2°, 4°, 6°, 8°,10°) à 5500 Hz. Les signaux tissulaires ont été séparés de ceux du sang avec le filtre SVD à seuil fixe (Demené *et al* 2015 [43]).

1. https://verasonics.com/vantage-systems/
2. https://www.vermon.com/
3. https://iconeus.com/

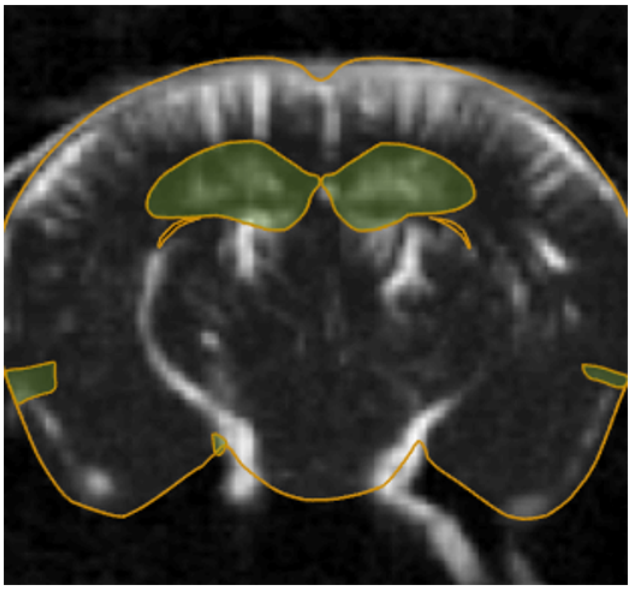


FIGURE 3.7 – Exemple d'utilisation du logiciel de neuronavigation : image Doppler ultrasonore ultrasensible d'une souris avec le dispositif précédent. Vasculature recalée avec l'atlas physiologique Allen : on affiche les hippocampes.

Le porte-sonde, à l'aide de vis miniatures, est alors réglé afin que la sonde soit placée de manière à imager le plan souhaité grâce à un logiciel de neuronavigation développé par Iconeus en collaboration avec l'accélérateur de recherche technologique de l'INSERM et publié par Nouhoum *et al* en 2021 [121] qui permet de recaler une vasculature obtenue par Doppler ultrasonore ultrasensible avec un atlas de cerveau de souris anatomique, l'atlas Allen [1] en l'occurence. Il permet également, une fois le recalage effectué, d'obtenir un masque des zones cérébrales qui nous intéressent et dont on pourra extraire le signal hémodynamique. Un exemple illustre ceci sur la figure 3.7.

3.1.3 Analyse en *resting-state*

Ce projet Pasteur commence par une caractérisation de la connectivité fonctionnelle en *resting-state* de souris mutées SHANK 3 par comparaison avec des souris *wild-type*. En effet, l'analyse des interactions entre les zones du cerveaux pour ce modèle d'autisme sont encore méconnues et une telle étude permettrait d'apporter des premières informations sur des différences potentielles entre les deux génotypes. Cer-

1. https://mouse.brain-map.org/

tains plans coronaux ont été choisis car contenant des régions du cerveau jouant un rôle dans la communication sociale et les comportements répétitifs et stéréotypiques (cf partie 3.1.1.3).

La méthode expérimentale a été décrite précédemment, lors de l'introduction du projet. Les données traitées ici sont des acquisitions de 30 minutes pour des souris *wild-type* et des souris mutées SHANK3. Les plages temporelles calmes des films Doppler correspondants ont été identifiées par *censoring*, technique expliquée dans la partie 2.2.1.

3.1.3.1 Connectivité fonctionnelle

Pour commencer la caractérisation du modèle murin SHANK3 à partir des films Doppler de *resting-state*, il convient d'étudier la connectivité fonctionnelle au repos entre certaines zones cérébrales identifiées dont on sait qu'elles jouent un rôle dans le phénotype associé à ce modèle (asociabilité et comportements stéréotypiques).

Ainsi, pour chacun des plans coronaux montrés en partie 3.1.1.3, il a été construit, pour l'ensemble des plages temporelles labelisées "calmes" de toutes les acquisitions, des matrices de connectivité. Dans le cas présent, les images Doppler comportant des artefacts de mouvement ont été retirées. C'est la raison pour laquelle le filtre à SVD fixe suffit pour construire le film Doppler étudié. Dans chaque cas, les filtres suivants ont été appliqués à chacune de ces plages temporelles de *resting-state* avant de calculer la corrélation des signaux de chaque zone du cerveau utilisée et construire une carte de connectivité :

1. un filtre passe-bas comme les oscillations hémodynamiques de connectivité fonctionnelle sont basse-fréquence pour éviter l'effet des pulsatilités cardiaque et respiratoire (fréquence de coupure typique : 0,08 - 0,1 Hz),
2. un filtre polynomial pour faire le *detrending* et éviter les dérives lentes du signal,
3. un filtre spatial pour moyenner chaque pixel avec ses voisins pour ainsi augmenter le rapport signal sur bruit,
4. une normalisation temporelle pour éviter les effets d'échelle entre le signal d'une zone très intense et un signal d'une zone qui l'est beaucoup moins,

5. un filtre de SVD où on tronque le premier mode, associé aux mouvements des tissus.

Le tableau suivant résume les cohortes de souris étudiées, *wild-type* (WT) et SHANK3, pour chacun des cinq plans coronaux montrés en partie 3.1.1.3 :

Génotype	plan 25	plan 33	plan 39	plan 49	plan 56
WT	7	3	6	11	3
SHANK3	10	6	9	12	2

Nous cherchons ici à identifier des différences en connectivité fonctionnelle pour les plans cérébraux identifiés et on s'intéresse en particulier aux zones physiologiques impliquées dans la communication sociale et le comportement que l'on sait altérés chez les souris mutées SHANK3. À ce jour, il n'y a pas d'information à disposition sur ce sujet.

Par ailleurs, les différences en connectivité fonctionnelle sont souvent assez subtiles et cela demande donc, pour les metttre en évidence, d'avoir une quantité de données assez importante. Ces expériences sont actuellement toujours en cours à l'institut Pasteur et conduites par Benoit Forget. Parmi les cinq plans étudiés, le 49 est celui pour lequel nous disposons du plus de données à ce jour.

Les résultats préliminaires sont illustrés sur la figure 3.8 à partir de la matrice de connectivité en *resting-state* pour chacune des 11 souris *wild-type* et des 12 souris SHANK3 dont les différences sont étudiées. Rien que pour ce plan, les données représentent environ douze heures d'acquisition cumulées. Les régions cérébrales étudiées sont celles de la figure 2.25 :

1. zones 1-10 : Cortex (cortex visuel primaire, zone médiomédiale du cortex visuel secondaire, cortex rétrosplénial dysgranulaire et granulaire ; gauche et droite pour toutes ces zones corticales)
2. zones 11-12 : Hippocampes,
3. zones 13-14 : Thalamus,
4. zones 15-16 : Hypothalamus.

Afin de comparer de manière statistique les matrices de connectivités obtenues pour les souris SHANKS3 et les souris *wild-type*, la procédure suivante, validée par la statisticienne Isabelle Rivals, a été utilisée :

1. tranformée de Fischer des matrices de connectivité afin de faire tendre la distribution de leurs coefficients vers une distribution normale,

2. test statistique de Wilcoxon qui permet de tester de manière non-paramétrique l'hypothèse selon laquelle les médianes de chacun des deux groupes sont proches comme les échantillons ne sont pas tous suffisamment grand pour utiliser le test de Welch,

3. correction post-hoc de Benjamini-Hochberg du seuil de significativité pour des comparaisons multiples.

Il n'y a pas, à ce stade, de différence statistiquement significative après correction *post-hoc* pour le plan 49 en *resting-state* et les zones cérébrales étudiées. Cependant, la sous-figure C de la figure 3.8 montre qu'avant correction de Benjamini-Hochberg, des différences sont présentes, notamment pour la zone du thalamus qui montre une baisse de connectivé inter-hémisphérique (entre l'hippocampe gauche et l'hippocampe droit) entre les souris *wild-type* et le souris SHANK3, dont la p-valeur est, en l'état des données disponibles actuellement, juste au-dessus du seuil de significativité après correction de Benjamini-Hochberg. Or, le thalamus joue un rôle dans les troubles autistiques : le circuit neuronal entre le thalamus et le cortex est affecté (Brumback *et al* 2018 [26]). En outre, il est également impliqué spécifiquement dans le modèle d'autisme SHANK3 en connectivité fonctionnelle : Zhou *et al* ont pu montrer en 2019 [168] que des primates mutés SHANK3 présentaient une baisse de connectivité fonctionnelle inter-hémisphérique dans le thalamus. Ce résultat corrobore la tendance observée dans notre étude et inclure des animaux supplémentaires permettra probablement de confirmer cette tendance d'un point de vue statistique.

Ce dernier point est valable également pour les quatre autres plans coronaux étudiés (cf partie 3.1.1.3) pour lesquels nous avons moins de données disponibles et n'avons pas encore de significativé statistique après correction de comparaisons multiples.

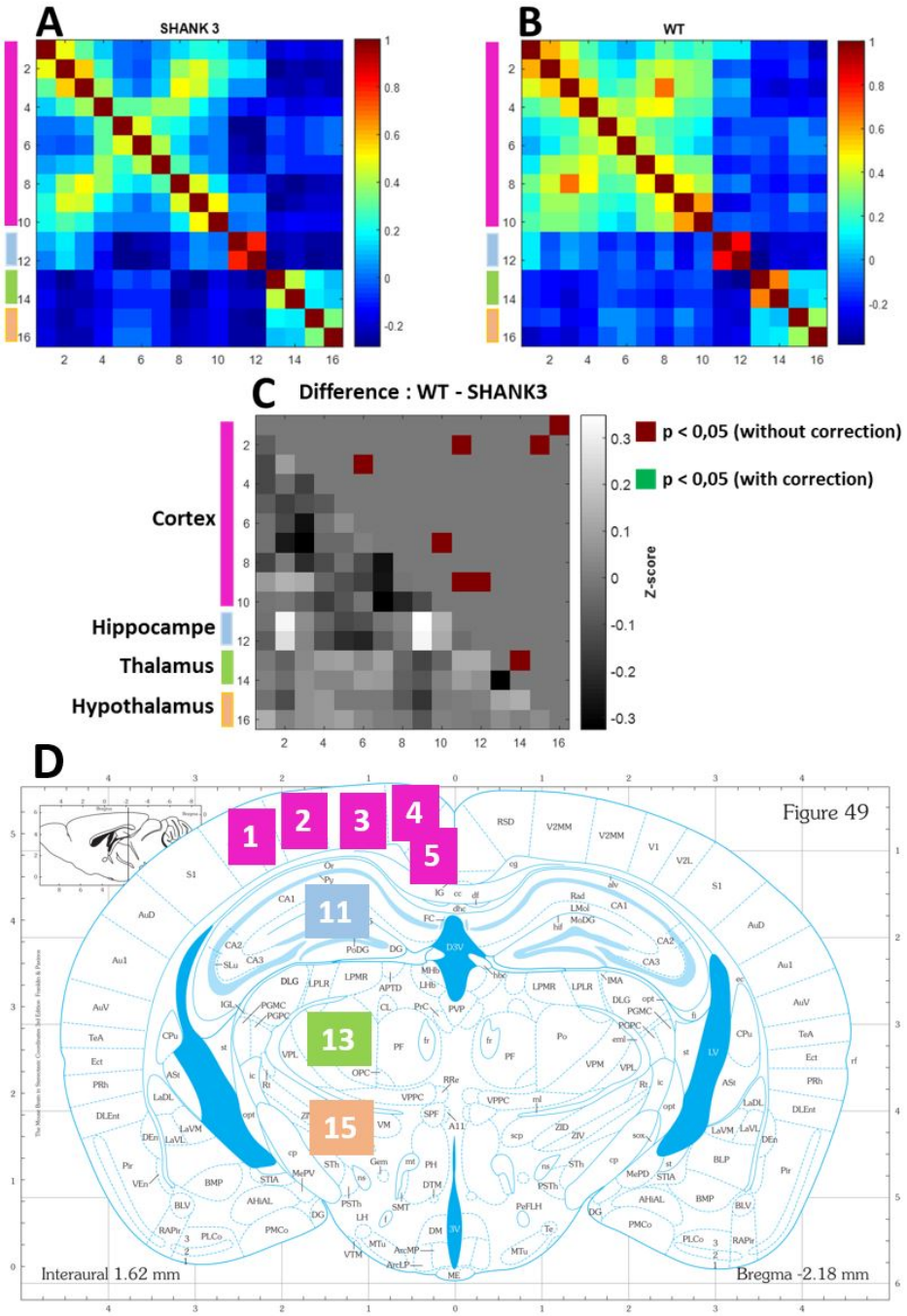


FIGURE 3.8 – Étude de la différence en connectivité fonctionnelle en *resting-state* (RS) entre les souris *wild-type* (WT) et les souris SHANK3 à Bregma - 2,18 mm (plan 49) : A) Matrice de connectivité moyenne en RS des souris mutées SHANK3, B) Matrice de connectivité moyenne en RS des souris WT, C) Affichage des différences en z-score et test de différence statistique entre les matrices WT et SHANK3 et D) Plan coronal (Paxinos).

3.1.4 Étude du film Doppler complet

À la lumière de la méthodologie développée dans le chapitre 2, nous sommes à présent en mesure de considérer le film Doppler dans son intégralité grâce à l'utilisation du filtre à SVD dynamique suivie d'une régression de nuisance qui permettent de limiter l'impact des artefacts de mouvement sur le signal de CBV enregistré en fUS tout en gardant l'information utile comme la connectivité fonctionnelle.

Nous allons utiliser cette méthodologie pour étudier le lien entre l'activité cérébrale et le comportement afin de caractériser le modèle murin de l'autisme SHANK3.

L'étude en *resting-state*, bien que prometteuse, n'a pas encore permis d'identifier des critères statistiquement significatifs après correction de Benjamini-Hochberg pour caractériser ce modèle d'autisme. Nous allons tenter ici d'étudier les aspects sociaux et comportementaux qui sont typiques de ce génotype. Le *censoring*, qui permet de ne sélectionner que les plages temporelles calmes du film Doppler, est performant dans l'étude en *resting-state* mais parait trop restrictif pour étudier le comportement : en effet, le *censoring* supprime typiquement 80 % de l'acquisition globale et il y a donc un risque assez élevé que les informations comportementales intéressantes soient dans la partie de l'acquisition qui est mise de côté par cette méthode.

Au regard des films Doppler complets des acquisitions décrites précédemment, il sera étudié, en premier lieu, le *grooming*, ou toilettage, qui est particulièrement intense et répété chez les souris mutées SHANK3, puis, dans un deuxième temps, la réponse de la souris à une stimulation auditive (vocalisation ultrasonique de congénères) sur des acquisitions légèrement différentes qui seront décrites ci-après.

3.1.4.1 Grooming : méthodes et résultats

Les souris mutées SHANK3 peuvent avoir des comportements stéréotypiques et le *grooming*, ou toilettage, en fait partie. Un comportement est dit stéréotypique lorsqu'il est composé de gestes répétitifs, rythmés sans but apparent, mais qui n'ont cependant pas le caractère compulsif des tics. L'idée, ici, est de caractériser cette différence comportementale entre les génotypes SHANK3 et *wild-type* en imagerie fonctionnelle.

Sur certaines des acquisitions obtenues lors de l'étude en *resting-state* (enregistrements de 30 minutes en fUS de souris dans le dispositif dit de *hybrid freely-moving*), le *grooming* a été quantifié, c'est-à-dire que l'on a à disposition les plages temporelles où chacune de ces souris se toilettent. Nous voulons alors vérifier si les animaux étudiés ont des zones cérébrales préférentielles qui s'activent lors de ces sessions de *grooming*. Le *grooming* excessif est un phénotype des souris mutées SHANK3 et cela s'accompagne d'un dysfonctionnement striatal (Peça *et al* 2011 [130]). C'est la raison principale pour laquelle il a été choisi d'étudier les acquisitions correspondant au plan 25 de l'atlas Paxinos (cf partie 3.1.1.3) et les zones qui nous intéressent spécifiquement seront numérotées comme suit :

1. 1 & 8 : cortex somatosensoriel primaire (gauche & droite)
2. 2 & 7 : cortex moteur primaire (gauche & droite)
3. 3 & 6 : cortex moteur secondaire (gauche & droite)
4. 4 & 5 : cortex cingulaire (gauche & droite)
5. 9 & 10 : striatum dorsal (gauche & droite)
6. 11 & 12 : noyau accumbens (gauche & droite)
7. 13 & 14 : septum latéral (gauche & droite)

L'hypothèse que l'on souhaite vérifier est donc : existe-t-il des zones cérébrales parmi celles détaillées ci-dessus dont le fonctionnement est synchrone avec le *grooming* ? Afin de répondre à cette question, il a été calculé, pour chacune des acquisitions ($n_{SHANK3} = 4$ et $n_{WT} = 4$), la corrélation de ces 14 zones cérébrales deux à deux pour construire une matrice de connectivité sur le film global mais également calculer la corrélation de chaque zone avec le signal de *grooming*, qui vaut 1 quand l'animal se toilette et 0 sinon au cours du temps. Ces coefficients composent une quinzième ligne de la matrice de connectivité, formant ainsi une matrice de connectivité augmentée. Si les variations du CBV d'une zone corrèlent temporellement avec le signal de *grooming*, on saura alors que cette zone est activée pendant ce comportement ; nous pourrons en outre étudier la comparaison entre les deux génotypes. Les matrices augmentées moyennes sont montrées sur la figure 3.9.

Le plan 25 de l'atlas Paxinos étudié se trouve très en avant sur le crâne d'une souris, à Bregma + 0,74 mm, endroit où l'os est plus épais ce qui limite l'intensité du signal fUS et abaisse généralement les coefficients de corrélation composant les

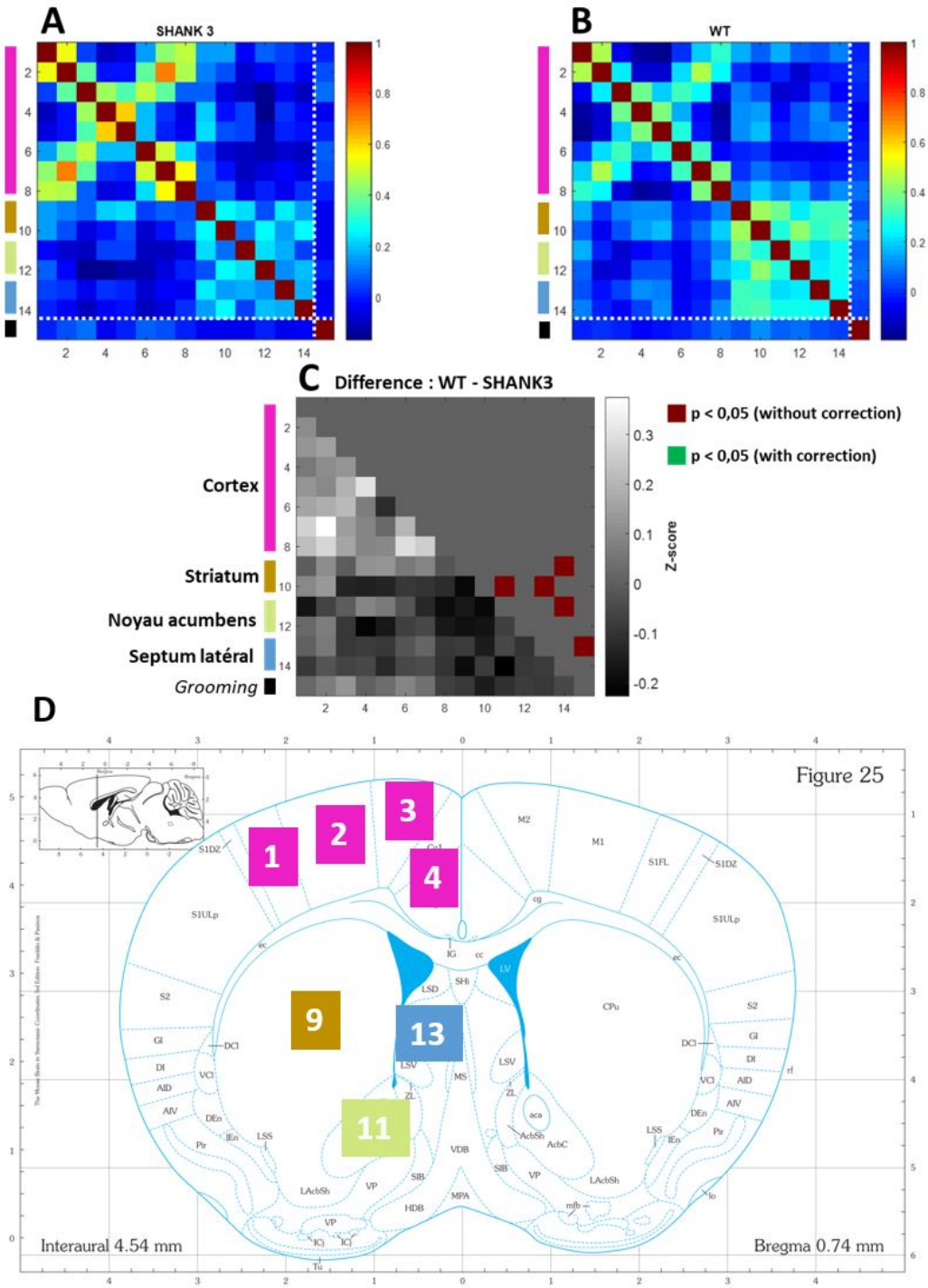


FIGURE 3.9 – Connectivité augmentée du *grooming* à Bregma + 0,74 mm (plan 25) : A) Matrice de connectivité augmentée moyenne des souris mutées SHANK3, B) Matrice de connectivité augmentée moyenne des souris WT, C) Différence en z-score et test de différence statistique entre les matrices WT et SHANK3 et D) Plan coronal (Paxinos).

matrices de connectivité. S'il y a pas de différence statistiquement significative après correction post-hoc, nous pouvons voir certaines différences avant : la corrélation entre la zone 13, septum latéral gauche, avec le signal de *grooming* baisse entre les souris *wild-type* et les souris SHANK3. Au delà du lien avec le mouvement, quelques liens entre le striatum (zones 9 & 10) s'affaiblissent également entre les souris *wild-type* et les souris SHANK3, ce qui est cohérent avec la littérature. Ces résultats sont encourageants et cette méthodologie pourrait peut-être permettre de conclure avec plus de données.

3.1.4.2 Stimulation sociale : méthodes et résultats

Les souris présentant un trouble autistique de type SHANK3 présentent un déficit en communication sociale. Un des vecteurs de communication sociale chez la souris est la vocalisation ultrasonore. De plus, il a été observé (Frick *et al* 2015 [55]) que les interactions mâle-femelle, à cause des hormones, déclenchaient l'activation de plus de zones cérébrales que celles entre deux mâles. Par conséquent, il a été choisi de jouer des vocalisations de poursuite mâle-femelle à la souris imagée pour, ainsi, obtenir des informations sur le fonctionnement du cerveau suite à cette stimulation auditive. Enfin, il sera aussi étudié l'effet de sons artificiels, construits à partir des sons de poursuites, pour lesquels l'information a été mélangée aléatoirement tout en gardant la même signature spectrale : cela permet ici de pouvoir évaluer si la réponse fonctionnelle est différente suite à la vocalisation de congénères que suite à la vocalisation de sons similaires mais d'une autre origine. Les acquisitions utilisées sont légèrement différentes que celles présentées pour ce projet jusqu'à ce stade.

Les vocalisations de poursuite mâle-femelle utilisées ont été tirées de la plateforme *MouseTube*[1] initiée par Élodie Ey et le logiciel Avisoft[2] pour les jouer, à l'aide d'un microphone, à la souris imagée. Cette dernière est placée dans le dispositif expérimental dit de *hybrid freely-moving*. Les conditions expérimentales et les paramètres du fUS sont les mêmes que ceux utilisés pour l'étude précédente en *resting-state*. Pendant une vingtaine de minutes, la souris entend un signal ultrasonore qui joue soit le signal de poursuite soit le signal artificiel similaire entrecoupé de plages temporelles silencieuses de manière répétée (cf figure 3.10). De plus, le choix du signal, entre social et non-social, est rendu aléatoire pour ne pas que l'animal étudié s'habitue à la

1. https://mousetube.pasteur.fr/
2. http://www.avisoft.com/

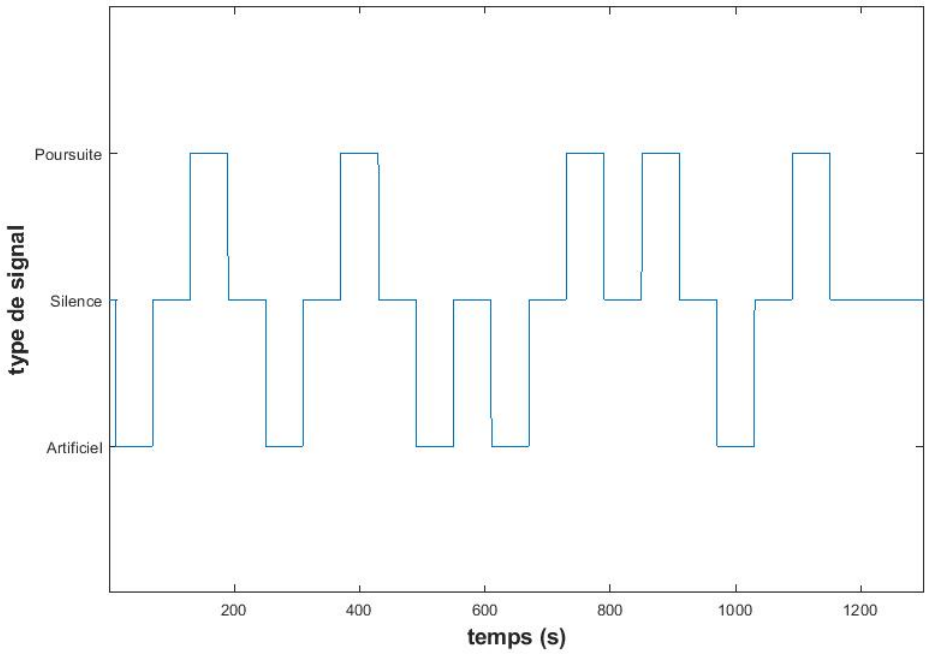


FIGURE 3.10 – Signal de stimulation auditive sociale et non-sociale.

présentation d'un même schéma et ainsi nous tentons de maximiser la réponse au stimulus. Le plan coronal étudié est le plan 49 (cf partie 3.1.1.3).

Pour l'instant, les expérimentations sont encore en cours et seulement deux souris de chaque génotype, *wild-type* et SHANK3, ont été enregistrées jusqu'à présent. Afin d'étudier l'influence des sons joués, une approche de *General Linear Model* (GLM) a été utilisée. Cela permet de décomposer le signal Doppler en fonction du signal de stimulation et d'accéder à la significativé statistique de cette régression linéaire, pixel par pixel. On affiche l'activation pour une souris de chaque génotype sous la forme de z-scores sur la figure 3.11 suite au stimulus présenté sur la figure 3.10. Dans le cadre du modèle de GLM utilisé ici, le paramètre du contraste doit être défini. Le contraste permet de choisir quel effet, ici quel stimulus, on souhaite isoler en termes de combinaison linéaire. Avec le même modèle, il est alors possible d'étudier la réponse seule au signal de poursuite (A de la figure 3.11), au signal artificiel (B de la figure 3.11) ou la différence entre les deux réponses (A-B).

Il s'agit d'expériences préliminaires, qui sont amenées à être poursuivies. Les cartes montrées sur la figure 3.11 suggèrent qu'il est possible de trouver une diffé-

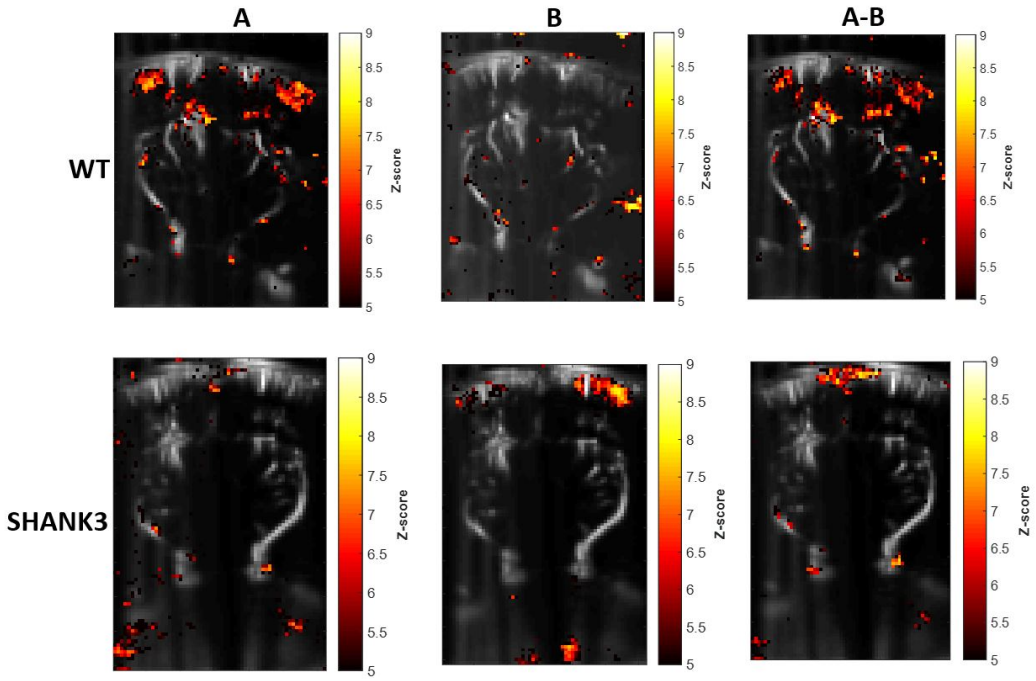


FIGURE 3.11 – Superposition des images Doppler et des cartes d'activation en z-score de la réponse pour le stimulus social (A), le stimulus non-social (B), et la différence entre les deux stimuli (C)) pour une souris de chaque génotype.

rence de réaction à un stimulus social ou non-social. En effet, dans le cas de la souris *wild-type*, le cortex auditif et une partie de l'hippocampe s'active, ce qui est cohérent avec les circuits neuronaux présentés dans la littérature pour l'assimilation des vocalisations, en réponse au signal de poursuite (sous-image A) contrairement à la souris SHANK3. Lors de l'étude de la réponse au signal artificiel, l'activité n'est pas présente chez la souris *wild-type*, possiblement à cause du fait que cet signal n'a pas d'effet sur elle, alors qu'on observe une activation dans le cortex somatosensoriel et le cortex visuel pour la souris SHANK3. La différence entre les deux stimuli est assez claire pour la souris *wild-type* comme il n'y avait pas de réponse au signal artificiel. Pour la souris SHANK3, cela fait apparaitre une activation du cortex rétrosplénial. Les activations de la souris SHANK3 ne sont pas facilement interprétables et l'enregistrement de plus de données permettrait d'avoir des résultats plus robustes.

Par ailleurs, d'autres tests similaires vont être également conduits, avec notamment la présentation d'odeurs sociales (urine par exemple) et d'odeurs non-sociales (benzaldéhyde par exemple) mais aussi, la présentation de congénères dans la même cage.

3.2 Étude de la nouveauté sociale et environnementale

3.2.1 Présentation du projet

C'est un projet de collaboration entre notre laboratoire *Physics for Medicine Paris* et l'équipe de Rebecca Piskorowski [1] de l'IPNP, Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris, avec plus particulièrement Cécile Viollet, dont le thème général est la plasticité synaptique et les réseaux neuronaux. Ce projet vise à approfondir la compréhension des mécanismes des reconnaissances sociale et environnementale d'un point de vue fonctionnel avec le fUS chez la souris, afin de compléter ce qui est déjà connu, en électrophysiologie par exemple.

L'hippocampe joue un rôle majeur dans la mémoire, processus englobant les mécanismes de stockage et de rappel des aspects spatiaux, temporels, contextuels et sociaux de notre vie passée. Parmi les différents types de mémoire, la mémoire sociale est primordiale dans la vie de tous les jours : être capable de se souvenir des autres est nécessaire pour créer des relations et également pour qu'on se considère en tant que personne. L'altération de la cognition est un symptôme précoce courant dans de nombreuses neuropathologies et sa détection permet souvent d'anticiper la gravité et la nature de la pathologie qui se développe. La compréhension de l'implication des circuits neuronaux de l'hippocampe dans la mémoire sociale et la plasticité induite est encore, de nos jours, incomplète. Apporter de nouvelles informations dans ce domaine serait donc particulièrement intéressant.

La région de l'hippocampe se décompose en plusieurs sous-régions anatomiques et fonctionnelles différentes : le gyrus denté, le CA1, le CA2, et le CA3. Les neurones du CA2 sont particulièrement importants dans le cas de la mémoire sociale : Hitti *et al* ont montré en 2014 [72] que des lésions à cet endroit pouvaient être à l'origine d'un déficit de création de mémoire sociale (Stevenson *et al* 2014 [152]). En particulier, bloquer la transmission synaptique depuis les neurones principaux du CA2 empêche les animaux de reconnaitre un individu familier conspécifique comme l'illustre la figure 3.12. De plus, il a été montré que cette région hippocampale subit des changements cellulaires dans des troubles psychiatriques affectant la mémoire sociale comme la schizophrénie (Benes *et al* 1999 [15]), avec notamment une réduction en interneurones à parvalbumine, protéine fixant le calcium. Ce même phénomène a été observé

1. https://ipnp.paris5.inserm.fr/recherche/equipes-et-projets/16-equipe-chevaleyre-piskorowski

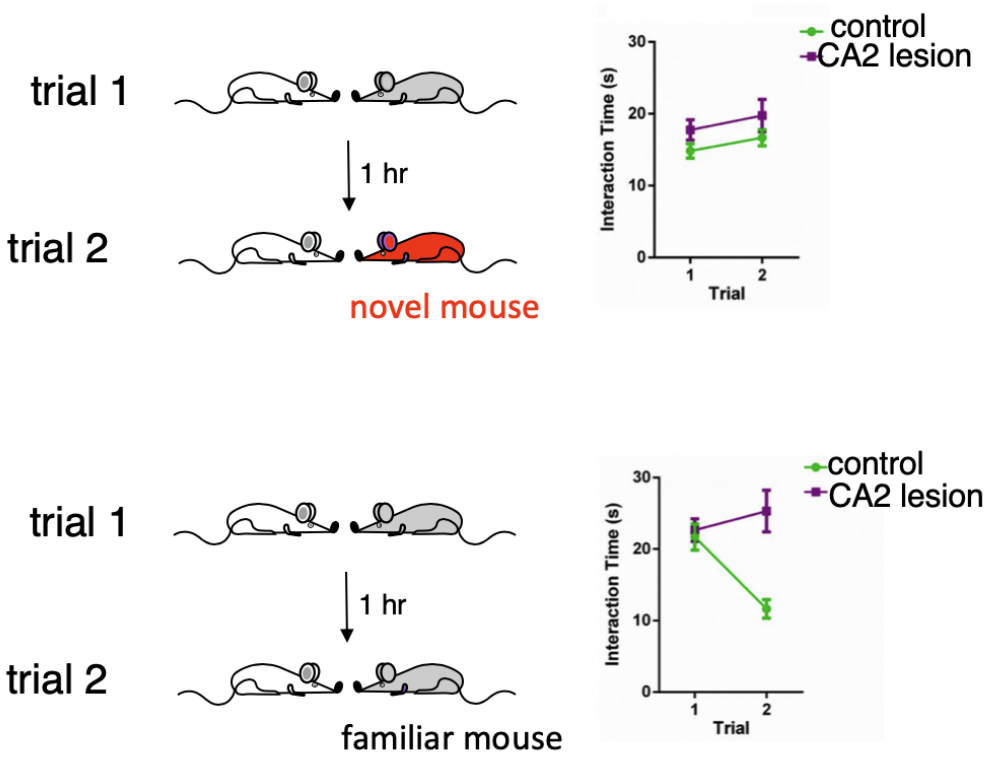


FIGURE 3.12 – Importance du CA2 dans la mémoire sociale : les souris présentant une lésion au niveau de cette région hippocampale ne reconnaissent pas une congénère avec laquelle elle a déjà intéragi (inspirée de [72] et [152]).

dans un modèle de souris pour la schizophrénie (Piskorowski *et al* 2016 [134]), associé à d'autres altérations physiologiques et un déficit en mémoire sociale. Les cellules à parvalbumine sont essentielles au bon fonctionnement du CA2 : elles modulent l'information qui en sort vers les autres sous-régions hippocampales (Nasrallah *et al* 2019 [119]). Elles sont également les cibles prioritaires des signaux provenant de l'hypothalamus depuis le noyau supramammilaire ; cette connexion entre le noyau supramammilaire et le CA2 est primordiale dans la détection de la nouveauté sociale (Chen *et al* 2020 [33]). Nous allons étudier comment ces régions interagissent pendant l'exploration sociale.

Ainsi, nous allons ici essayer d'investiguer ce phénomène avec le fUS sur des souris, modèle animal encore préférentiel ici, comme la plupart des connaissances sur le lien entre le CA2 et le noyau supramammilaire ont été étudiées dessus. Ces souris sont exposées à des stimuli sociaux et non-sociaux afin d'étudier la connectivité

combinée au comportement lors de l'exploration sociale et non-sociale (modification de l'environnement). Toutes les expériences de ce projet on été réalisées à l'IPNP par Cécile Viollet et j'ai assuré le développement des méthodes d'analyse de données.

3.2.2 Matériel et méthodes

La sonde utilisée dans ce projet est une sonde à 15 MHz à 128 éléments séparés de 0,11 mm Vermon [1] de 8 mm en profondeur d'élévation et 400 μm en largeur. Cette sonde est connectée à un échographe ultrarapide de recherche (machine ART Inserm – Accélérateur de Recherche en Technologie « Ultrasons biomédicaux »).

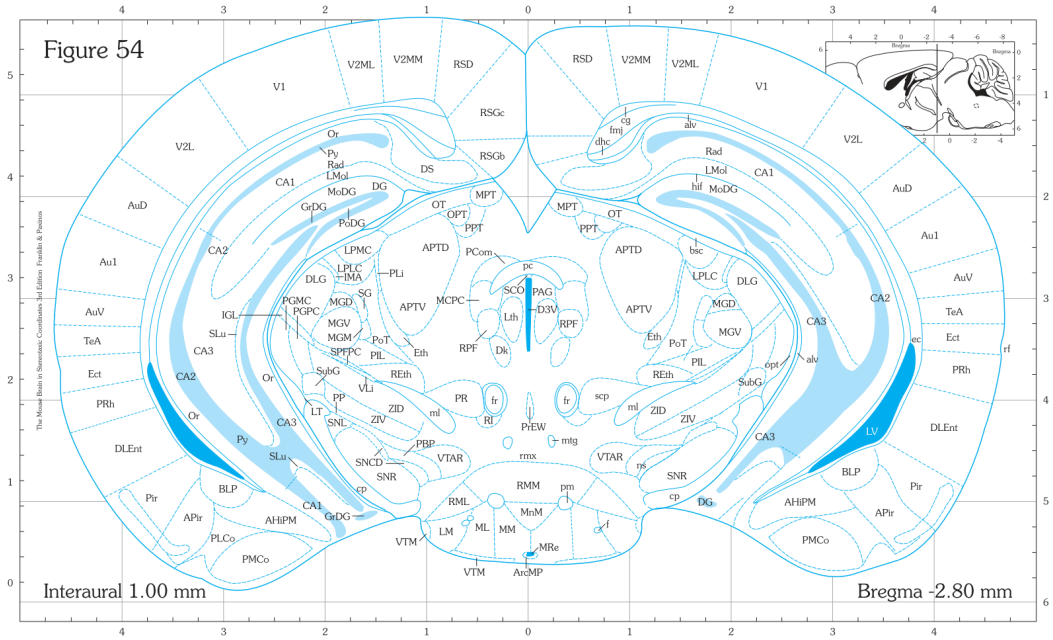


FIGURE 3.13 – Atlas coronal de la souris à Bregma - 2,80 mm (Paxinos).

L'imagerie Doppler ultrasonore ultrasensible a été réalisée à partir de l'utilisation de Neuroscan, logiciel d'Iconeus [2] de neuroimagerie en temps-réel. Chaque image de Doppler transcranien est obtenue à partir de 400 images *post-beamforming* à une cadence de 500 Hz chacune formée à partir de 11 ondes planes angulées séparées de 2° (-10°, -8°, -6°, -4°, -2°, 0°, 2°, 4°, 6°, 8°, 10°) acquises à 5500 Hz. Deux blocs successifs sont séparés d'une pause de 100 ms dans l'acquisition. Le signal sanguin est séparé de celui des tissus cérébraux en utilisant le filtrage spatiotemporel SVD à seuil fixe. Une

1. https://www.vermon.com/
2. https://iconeus.com/

apodisation des voies de l'échographe a été appliquée pour ne pas avoir de signal au niveau des muscles maxillaires qui perturbent les acquisitions : leur mouvement est très échogène et introduit des artefacts de mouvements dans le signal des variations de CBV pertinent. Le dispositif de Mobile Home Cage de Neurotar [1], introduit dans le chapitre 2, a été utilisé pour ces expériences car il permet le suivi des mouvements des souris imagées. Les souris ont subi une chirurgie pour fixer la plaque métallique permettant à ce dispositif de maintenir immobile leur tête. Après récupération de cette chirurgie, elles ont été entrainées pendant 3 semaines afin de réduire au maximum le stress induit (entrainement sensiblement plus long que pour le *hybrid freely-moving* car le stress est plus important). Cette habituation est analogue à celle présentée sur la figure 2.4, mais elle est plus progressive.

Une plate-forme motorisée à 4 axes sur laquelle est fixée la sonde échograhique permet de placer cette dernière afin d'imager le plan coronal souhaité, grâce à l'utilisation du logiciel de neuronavigation introduit précédemment (cf figure 3.14). Jusqu'à présent, un seul plan a été imagé afin d'étudier la connexion entre le CA2 et le noyau supramammilaire via les autres sous-régions hippocampales (CA1, CA3 et gyrus denté) situé à Bregma - 2,80 mm dont on peut voir la représentation de l'atlas anatomique de Paxinos (Paxinos *et al 2019* [129]) sur la figure 3.13.

Enfin, toutes les acquisitions font dix minutes, soit 1200 images Doppler (comme l'exemple utilisé tout le long du chapitre 2).

3.2.2.1 Paradigme expérimental

Le but du projet est donc de créer des mises en situation de nouveauté sociale et de nouveauté environnementale pour les souris étudiées, à l'aide du matériel décrit précédemment.

Le Mobile Home Cage est constitué, en partie, d'une cage cylindrique dans laquelle se trouve la souris. Cette cage repose sur un lit d'air comprimé qui permet à la cage de flotter avec peu de frottement lorsque la souris se met en mouvement. Cette cage comporte également des éléments magnétiques et des capteurs présents sur le bâti sur lequel elle repose permettent d'enregistrer la position et les mouvements de la cage et, par conséquent, la position et les mouvements de la souris.

1. https://www.neurotar.com/product/mobile-homecage/

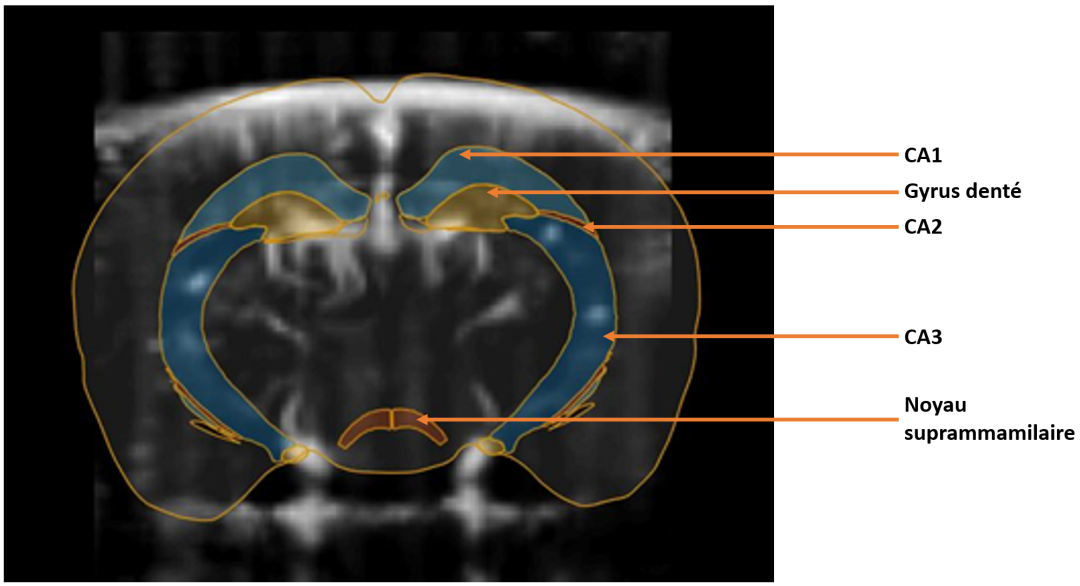


FIGURE 3.14 – Exemple d'utilisation du logiciel de neuronavigation : image Doppler ultrasonore ultrasensible d'une souris avec le dispositif précédent. Vasculature recalée avec l'atlas physiologique Allen : on affiche les régions cérébrales qui nous intéressent : CA1, CA2, CA3, gyrus denté et noyau supramammilaire.

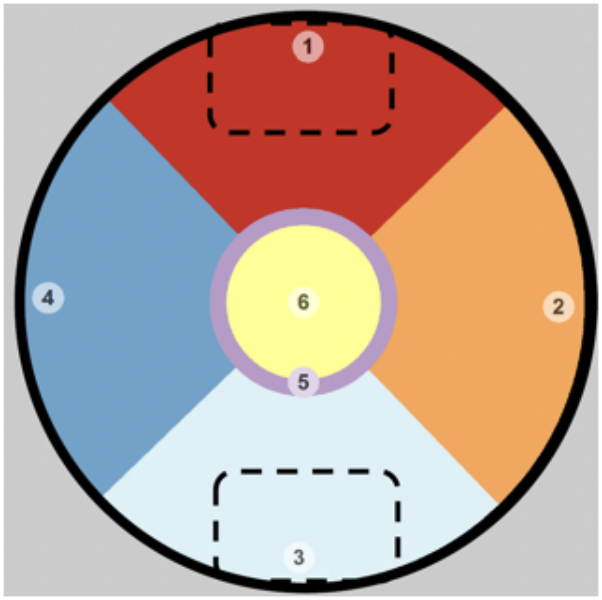


FIGURE 3.15 – Délimitations des zones de la cage du Mobile Home Cage (paniers en pointillés).

Afin d'étudier la réalisation des tâches par les animaux avec le Mobile Home Cage, l'opérateur peut définir des zones de la cage et nous avons alors ainsi accès au

temps passé par la souris dans chacune des zones. Le découpage de zones choisi est présenté sur la figure 3.15, avec une vue schématique du dessus de la cage.

Dans les zones 1 et 3, des rectangles en pointillés marquent la présence de paniers amovibles. Une souris inconnue sera présentée dans un des paniers pour tester la nouveauté sociale ou un panier sera retiré, de la zone 3, pour modifier l'environnement de la cage.

Le paradigme expérimental proposé pour répondre à la question scientifique détaillée auparavant s'inspire du *three-chamber test*[1] qui fait référence pour l'étude de la sociabilité et de la nouveauté sociale. Le paradigme choisi se découpe en quatre acquisitions qui se suivent, espacées chacune de quatre minutes : il est illustré sur la figure 3.16.

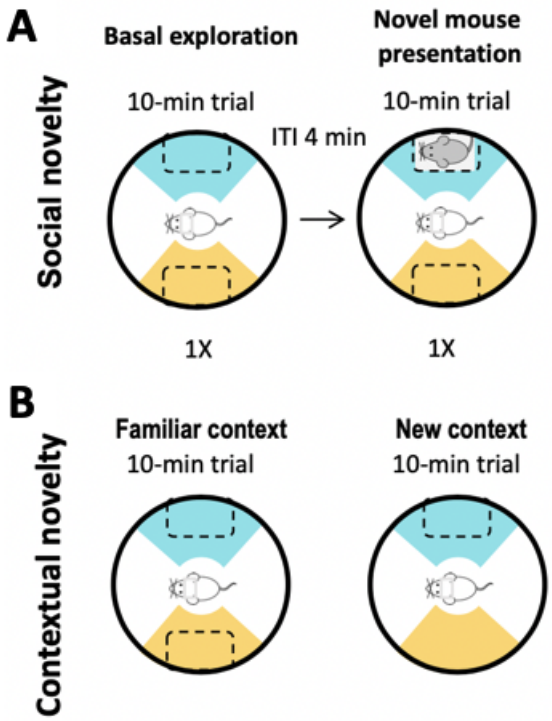


FIGURE 3.16 – Schéma du paradigme expérimental : A) expérience de nouveauté sociale et B) expérience de nouveauté environnementale.

1. Basal1 : 10 minutes d'acquisition avec la souris imagée seule et les deux paniers présents.

1. https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/si/three-chamber.html

2. M1 : 10 minutes d'acquisition avec une souris inconnue de la souris imagée présente dans le panier 1 - test de la nouveauté sociale.

3. Basal2 : 10 minutes d'acquisition avec la souris imagée seule et les deux paniers présents.

4. Context : 10 minutes d'acquisition avec la souris imagée seule et seul le panier 1 présent - test de la nouveauté environnementale.

3.2.3 Premiers résultats comportementaux

Les expériences décrites ont été conduites sur n = 10 souris et les premiers résultats comportementaux sont montrés sur la figure 3.17. Le code couleur est le même que celui de la figure 3.16, à savoir le bleu clair pour la zone 1 où sera présentée la souris inconnue pour le test de nouveauté sociale et le jaune pour la zone 3 d'où sera retiré le panier pour le test de nouveauté environnementale.

Dans le cas de l'expérience de nouveauté sociale, nous pouvons observer sur les sous-images A de la figure 3.17 que les souris, lors des acquisitions M1 où une souris inconnue est présente dans le panier de la zone 1, passent plus de temps dans la zone 1 où est présente la souris que dans la zone 3 à l'opposé et donc explorent d'avantage la zone où se trouve la souris ($p < 0,05$ - test de Wilcoxon). Le temps passé dans les zones 1 et 3 est différent entre les états Basal et M1 : nous avons comparé pour ce faire la différence entre le temps passé dans la zone 3 et le temps passé dans la zone 1 pour les acquisitions Basal et M1 ($p < 0,01$) . La longueur de la trajectoire diminue ($p < 0,05$) entre les acquisitions Basal et M1, ce qui laisse penser que les souris sont plus présentes dans la zone où se trouve la souris inconnue et interagissent sans déplacement (*sniffing* ou vocalisations par exemple).

Pour l'expérience de nouveauté environnementale, nous pouvons observer sur les sous-images B de la figure 3.17 que les souris, lors des acquisitions Context où on retire le panier de la zone 3, passent plus de temps dans la zone 1 que dans la zone 3 et donc explorent d'avantage la zone opposée à celle où on a retiré le panier ($p < 0,001$ - test de Wilcoxon). Le temps passé dans les zones 1 et 3 est différent entre les états Basal2 et Context : nous avons comparé pour ce faire la différence entre le temps passé dans la zone 3 et le temps passé dans la zone 1 pour les acquisitions Basal2 et Context ($p < 0.001$). Par ailleurs, les souris ont tendance à parcourir plus de distance ($p < 0,001$)

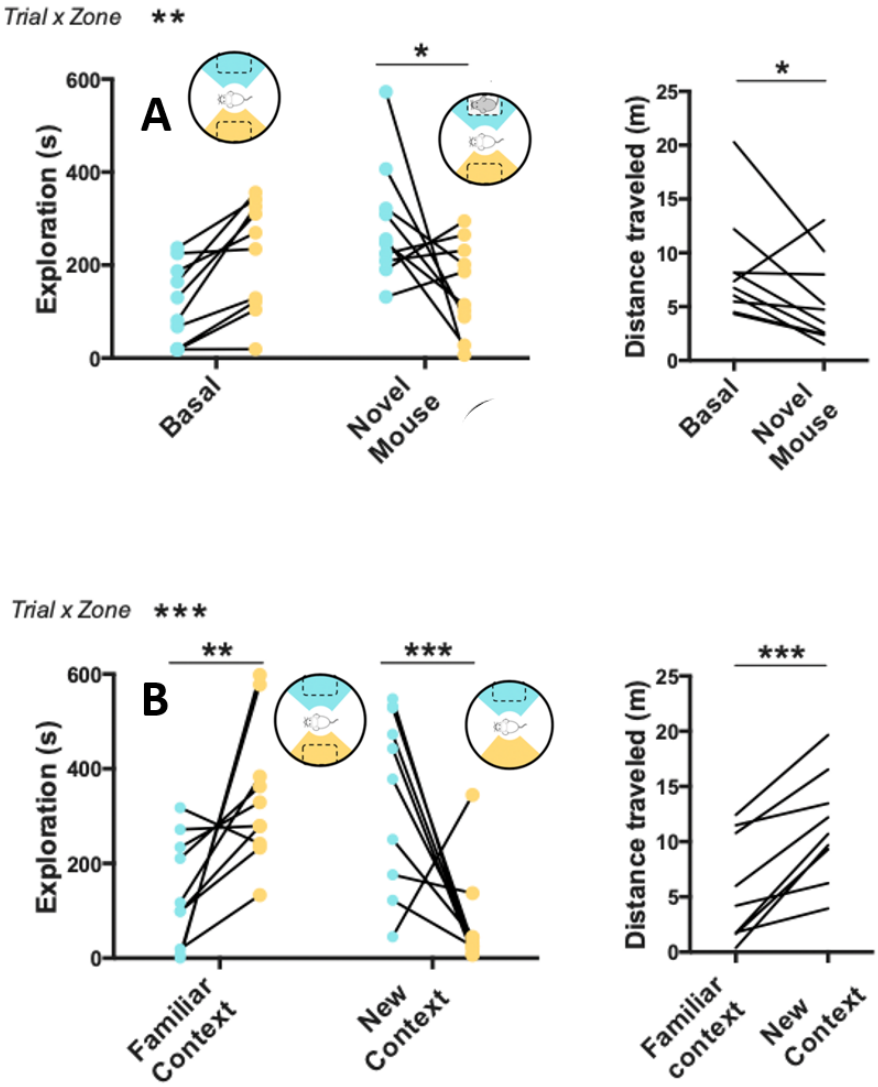


FIGURE 3.17 – Premiers résultats comportementaux pour n = 10 souris (zone 1 en bleu clair et zone 3 en jaune). A) Expérience de nouveauté sociale : temps passé dans les zones 1 et 3 pour les acquisitions Basal et M1 (gauche) et distance de déplacement pendant les acquisitions Basal et M1 (droite). B) Expérience de nouveauté environnementale : temps passé dans les zones 1 et 3 pour les acquisitions Basal2 et Context (gauche) et distance de déplacement pendant les acquisitions Basal2 et Context (droite).

si l'on compare les acquisitions Basal2 et les acquisitions Context : la modification de l'environnement des souris semble déclencher une exploration de la "nouvelle" cage.

Ces premiers résultats comportementaux obtenus sur n = 10 souris sont encourageants et permettent de valider le paradigme expérimental choisi : il permet

bien de recréer des tests de nouveauté sociale et de nouveauté environnementale. Il convient à présent d'essayer de voir avec le fUS si ces situations s'accompagnent de phénomènes remarquables en termes de fonctionnement cérébral, notamment sur la connexion entre les régions du CA1, du CA2, du CA3, du gyrus denté et du noyau supramammilaire.

Afin d'essayer de comprendre les interactions cérébrales lors de ces expériences, les données fUS en *resting-state* ont été d'abord étudiées, c'est-à-dire en ne regardant que les plages temporelles sans mouvement dans le but d'obtenir des informations sur la connectivité fonctionnelle dans cette situation puis les films complets ont été considérés afin de tenter de lier le fUS au comportement des souris imagées.

3.2.4 Analyse en *resting-state*

Il convient d'abord d'étudier si, pendant les plages temporelles sans mouvement de l'animal étudié, les interactions entre les zones cérébrales du gyrus denté, du CA1, du CA2, du CA3 et du noyau supramammilaire sont modifiées dans un contexte de nouveauté sociale et de nouveauté environnementale.

Les expériences ont été introduites à la partie 3.2.2 ainsi que le matériel utilisé. La procédure de traitements des acquisitions en *resting-state* est le même que celui présenté pour le projet Pasteur. On dispose de n = 9 souris pour lesquelles on a les quatre acquisitions successives : Basal, M1, Basal2 et Context. Par ailleurs, les traitements statistiques sont également similaires et conformes à ceux utilisés pour ce genre de données (Rahal *et al* 2020 [137]) : transformée de Fischer, test statistique de Wilcoxon et correction *post-hoc* de comparaisons multiples de Benjamini-Hochberg.

Les résultats obtenus en *resting-state* sont présentés sous la forme de matrices de connectivité sur la figure 3.18. Les zones du cerveaux considérées sont celles présentées sur la figure 3.14 et sont numérotées de la sorte :

— 1-2 pour le gyrus denté (gauche-droite),
— 3-4 pour le CA1 (gauche-droite),
— 5-6 pour le CA2 (gauche-droite),
— 7-8 pour le CA3 (gauche-droite),
— 9-10 pour le noyau supramammilaire (gauche-droite).

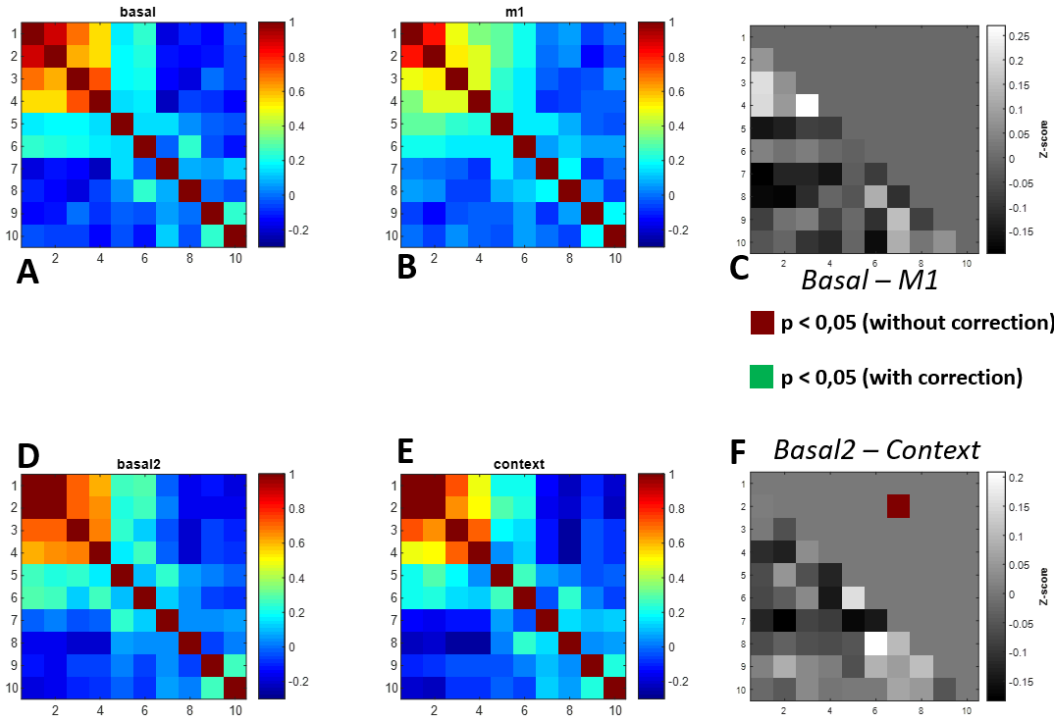


FIGURE 3.18 – Résultats en *resting-state* pour les n = 9 souris : A) Matrice de connectivité moyenne des acquisitions Basal, B) Matrice de connectivité moyenne des acquisitions M1, C) Différence en z-score et test de différence statistique entre Basal et M1, D) Matrice de connectivité moyenne des acquisitions Basal2, E) Matrice de connectivité moyenne des acquisitions Context, F) Différence en z-score et test de différence statistique entre Basal2 et Context.

La comparaison entre les acquisitions Basal et M1 permet d'évaluer une situation de nouveauté sociale tandis que la comparaison entre les acquisitions Basal2 et Context traduit une nouveauté environnementale.

Comme le montre la figure 3.18, les résultats actuels ne permettent pas de conclure, après correction de comparaisons statistiques multiples. Les sous-figures C et F qui montrent la différence statistique à $p < 0,05$ avant correction pour les deux expériences effectuées suggèrent qu'il y a peu de différence, en dehors d'une baisse de corrélation entre le gyrus denté droit et le CA3 gauche entre les acquisitions Basal2 et Context. Afin d'aller plus loin dans ce travail, il pourrait être intéressant d'inclure de nouveaux animaux afin de voir si cette tendance se confirme.

Cette étude en *resting-state* ne montre pas, pour l'instant, de différences en connectivité moyenne pour les zones du gyrus denté, du CA1, du CA2, du CA3 et du

noyau supramammilaire dans des situations de nouveauté sociale et de nouveauté environnementale.

3.2.5 Étude des films complets

Ainsi, l'étude des plages calmes, avec les données disponibles jusqu'à présent, ne permet pas, avec les données disponibles à ce stade, de tirer des conclusions quant aux interactions entre le gyrus denté, le CA1, le CA2, le CA3 et le noyau supramammilaire dans un contexte de nouveauté sociale ou de nouveauté environnementale. Nous allons à présent étudier le film Doppler dans son intégralité, une fois les artefacts de mouvements retirés grâce au filtre à SVD dynamique suivi de la régression de nuisance expliqués dans le chapitre 2 (on utilise le signal de "stabilité" et la famille de fonctions présentées à l'équation 2.4 comme régresseurs). L'étude du film complet est pertinente car, dans un contexte de nouveauté sociale ou environnementale, les interactions ont souvent lieu pendant le mouvement. C'est l'étude du lien entre les signaux hémodynamiques enregistrés dans les zones du cerveau et le comportement des souris qui sera investigué ici. Les données utilisées ici représentent quasiment sept heures d'acquisition cumulées.

3.2.5.1 Identification d'un signal comportemental pertinent

Présenté en détails dans le chapitre 2, le Mobile Home Cage permet un *tracking* de la souris dont la tête est fixée et enregistre plusieurs grandeurs au cours du temps : la position, la vitesse, la zone dans laquelle se trouve l'animal (cf figure 3.15), etc. Cette dernière donnée est particulièrement intéressante dans le cadre expérimental qui a été choisi pour ce projet. En effet, le test de nouveauté sociale consiste en l'insertion d'une souris inconnue dans le panier de la zone 1 tandis que le test de nouveauté environnementale consiste au retrait du panier de la zone 3.

Les premiers résultats comportementaux, présentés dans la partie 3.2.3, montrent que les changements dans la cage de la souris étudiée ont une influence sur le temps passé dans les zones où ces changements ont lieu et l'activité qu'elle y fait : *sniffing* de la souris inconnue par exemple. Il est alors raisonnable de faire l'hypothèse que le fonctionnement du cerveau est différent selon la zone du Mobile Home Cage dans laquelle la souris se trouve car elle est un marqueur d'interaction sociale, ou

environnementale.

Ainsi, les données correspondantes à la présence ou non de l'animal dans les zones 1 à 4 du Mobile Home Cage ont été extraites et recalées au film Doppler comme la figure 3.19 l'illustre sur l'exemple d'une souris pour les zones 1 et 3. Il est ainsi possible, en comparant les signaux hémodynamiques avec ces signaux-là, d'étudier le lien entre activité fonctionnelle et comportement.

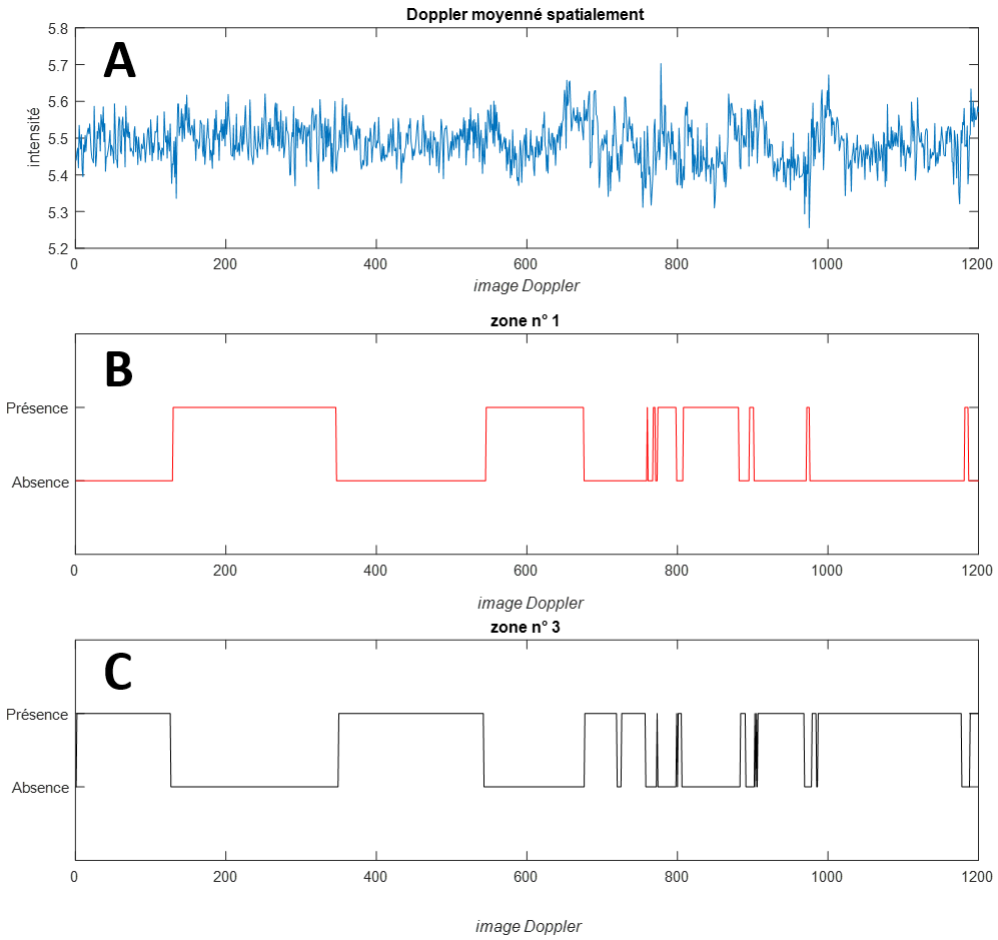


FIGURE 3.19 – Doppler moyenné spatialement au cours du temps (A) sur lequel ont été recalés les signaux correspondants à la présence ou l'absence de la souris imagée dans les zones 1 (B) et 3 (C) du Mobile Home Cage au cours du temps.

Pour aller plus loin, d'autres signaux liés au comportement peuvent être envisagés : à l'image du *grooming*, ou toilettage, étudié dans le projet avec l'institut Pasteur, on pourrait identifier les plages temporelles de *sniffing* (recherche active d'échantillons d'odeur via la cavité nasal dans un but d'acquérir de l'information) marqueur légitime pour la reconnaissance sociale mais également environnementale,

à partir des enregistrements vidéo des acquisitions avec un logiciel de type *Live Mouse Tracker*[1] ou encore *DeepLabCut* (Mathis *et al* 2018 [110]).

3.2.5.2 Matrices de connectivité augmentées

Il a été montré dans la partie 2.2.6 que le filtrage à SVD dynamique suivie d'une régression de nuisance, avec la famille de signaux de "stabilité" présentée à l'équation 2.4, permettaient de retrouver pendant les fenêtres temporelles la connectivité fonctionnelle ainsi que la stimulation fonctionnelle. Par conséquent, il est possible, avec cette méthode de réjection des artefacts de mouvement, de faire une étude de la connectivé sur la globalité du film Doppler d'une acquisition.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons étudier le lien éventuel entre le gyrus denté, le CA1, le CA2, le CA3 et le noyau supramammilaire dans une situation de nouveauté sociale et de nouveauté environnementale. La présence dans une zone du Mobile Home Cage est un marqueur de ces situations. L'hypothèse que la connectivité fonctionnelle est différente selon dans quelle zone se trouve la souris parait alors raisonnable.

Pour tenter de mettre ceci en évidence, on a étudié la corrélation temporelle entre le signal de CBV des zones du cerveau qui nous intéresse et les quatre signaux marquant la présence ou l'absence de la souris imagée dans les zones 1 à 4 présentés précédemment. Si, par exemple, la corrélation entre le CA1 et la présence dans la zone 1 est élevée pour une acquisition M1, cela voudrait dire que le fonctionnement de cette zone cérébrale est lié à la proximité de la souris imagée avec la souris inconnue présentée.

Pour montrer visuellement les résultats de cette étude, des cartes de connectivité augmentée sont construites. Elles rapportent les coefficients de corrélations entre les signaux de CBV des dix zones du cerveau suivantes ainsi que des 4 signaux marquant la présence ou l'absence dans les zones du Mobile Home Cage précédemment décrits :

— 1-2 pour le gyrus denté (gauche-droite),
— 3-4 pour le CA1 (gauche-droite),
— 5-6 pour le CA2 (gauche-droite),
— 7-8 pour le CA3 (gauche-droite),

1. https://livemousetracker.org/

— 9-10 pour le noyau supramammilaire (gauche-droite),
— 11-14 pour les signaux de présense ou d'absence dans les zones 1 à 4.

Afin de pouvoir calculer les corrélations temporelles, les différents signaux ont été normalisés temporellement, permettant ainsi d'éviter des problèmes d'échelle. Les résultats sont présentés sur la figure 3.20 pour les données disponibles correspondant à n = 7 souris moyennées pour chaque type d'acquisition : Basal, M1, Basal 2 et Context. La procédure pour les tests statistiques est la même que précédemment : transformée de Fischer, test statistique de Wilcoxon puis test de comparaisons multiples de Benjamini-Hochberg.

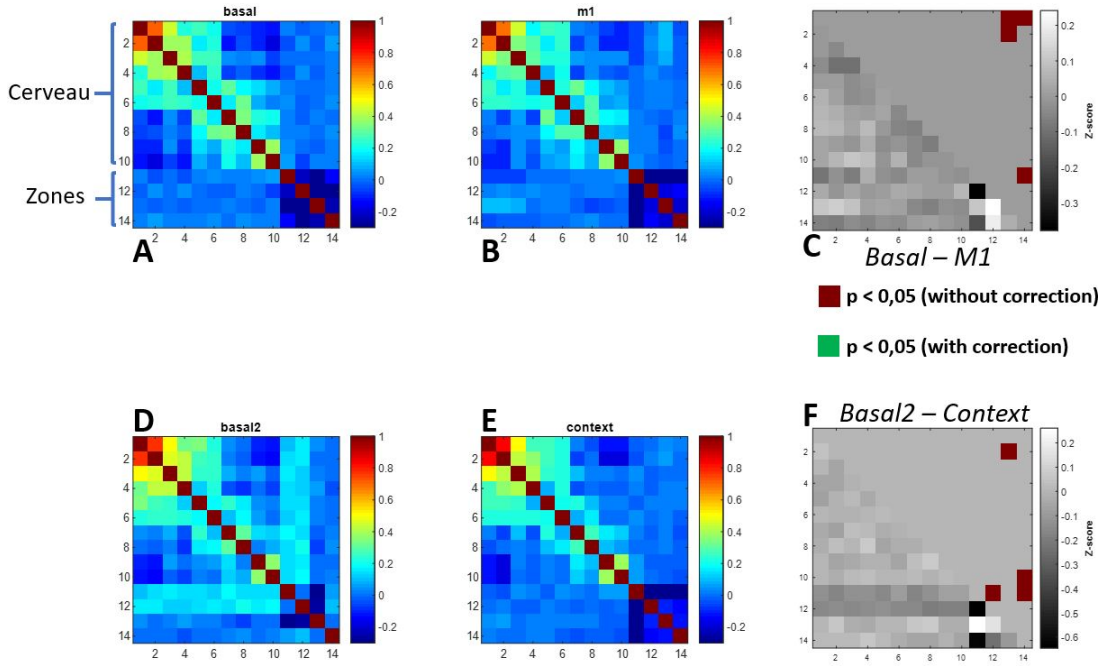


FIGURE 3.20 – Connectivité augmentée : A) Matrice de connectivité augmentée moyenne des acquisitions Basal, B) Matrice de connectivité augmentée moyenne des acquisitions M1, C) Différence en z-score et test de différence statistique entre Basal et M1, D) Matrice de connectivité augmentée moyenne des acquisitions Basal2, E) Matrice de connectivité augmentée moyenne des acquisitions Context, F) Différence en z-score et test de différence statistique entre Basal2 et Context.

Nous pouvons observer sur la figure 3.20 qu'après correction, il n'y a pas de différence significative entres les matrices moyennes de connectivité augmentée pour l'expérience de nouveauté sociale, différence entre les acquisitions Basal et M1, ni pour l'expérience de nouveauté environnementale, différence entre les acquisitions Basal2 et Context. Sur la globalité du film Doppler, nous pouvons observer que même

avant correction, il n'y a pas de différence pour les zones cérébrales entre elle.

Cependant il est possible de voir des différences avant correction pour certaines comparaisons entre zones du cerveau et la présence ou non de la souris dans une zone. Dans le contexte de nouveauté sociale, nous pouvons donner l'exemple du signal de la zone 3, zone opposée à celle où se trouve la souris inconnue présentée, avec le gyrus denté gauche et le gyrus denté droit; dans le contexte de nouveauté environnementale, le signal du gyrus denté droit et le signal de la zone 3, zone d'où le panier a été retiré. Si ces résultats ne sont pas encore significatifs, cela montre toutefois que cette méthode pourrait permettre de conclure en ajoutant des données supplémentaires. En liant ainsi le comportement et le fonctionnement cérébral, il serait possible de caractériser fonctionnellement la nouveauté sociale et la nouveauté environnementale.

3.2.5.3 Connectivité dynamique et *clustering*

Afin d'étudier le CA1, le CA2, le CA3, le gyrus denté et le noyau supramammilaire et leurs interactions dans un contexte de nouveauté sociale et de nouveauté environnementale il a d'abord été étudié, pour relier le mouvement et le fUS, la corrélation entre les variations de CBV de ces régions du cerveau avec les signaux marquant la présence ou l'absence de la souris imagée dans chaque zone du Mobile Home Cage sur l'ensemble des acquisitions.

Les expériences conduites dans le cadre de ce projet consistent en un enchainement de tests comportementaux successifs : Basal et M1 pour la nouveauté sociale, Basal2 et Context pour la nouveauté environnementale. Ces deux tests comportementaux n'ont, même si les zones cérébrales engagées peuvent être les mêmes, pas de raison d'avoir une empreinte commune en terme de connectivité fonctionnelle. Comme ces acquisitions sont rapprochées dans le temps, il est possible que les signaux des deux tests interfèrent, notamment quand on prend le signal de variations de CBV sur l'ensemble d'une acquisition comme cela a été fait pour construire les cartes de connectivité augmentée. Pour éviter cela, il a alors été décidé de changer d'approche et d'étudier la connectivité dynamique combinée à du *clustering*.

L'idée ici est, au lieu de travailler sur un film Doppler comme cela a été fait jusqu'à présent, de travailler plutôt sur un film de matrices de connectivité qui représentent,

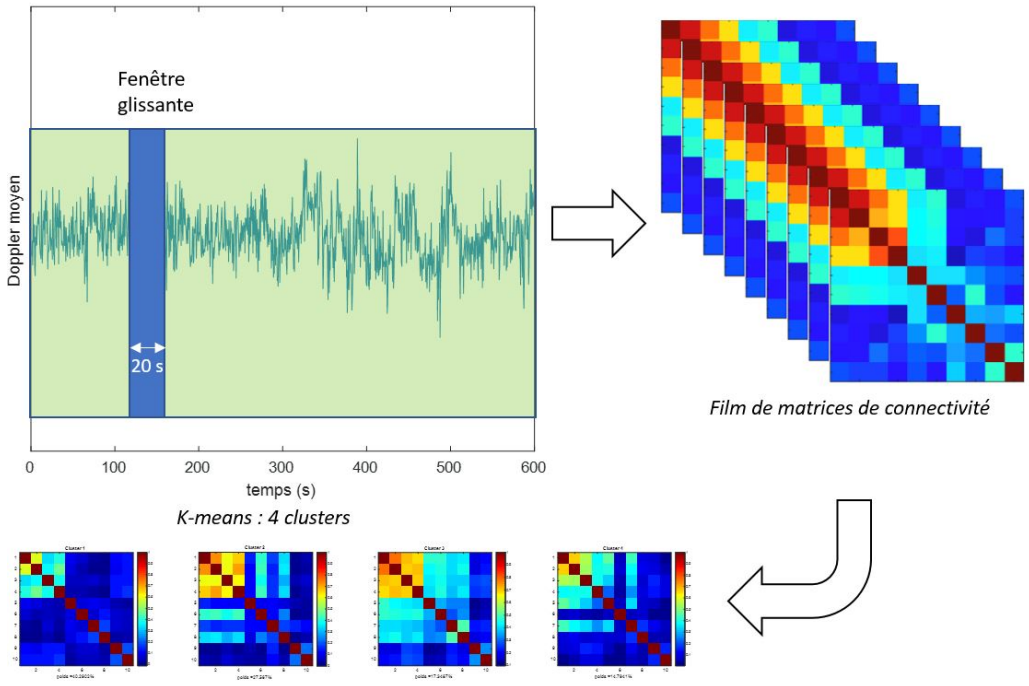


FIGURE 3.21 – Principes de la connectivité dynamique avec *clustering* K-means pour le fUS éveillé chez la souris : constitution d'un film de matrices de connectivité à partir du film Doppler complet en calculant chaque matrice tous les p points temporels sur une fenêtre glissante de 20 s et utilisation de l'algorithme de *clustering* K-means pour obtenir une base de 4 clusters du film de matrices.

au cours du temps, l'état de connectivité de la souris étudiée. La connectivité dynamique, c'est, par conséquent, pour un film Doppler, choisir un pas temporel p et de venir calculer une matrice de connectivité tous les p points afin d'obtenir le film de matrices de connectivité.

Le *clustering*, ou partitionnement de données, est une méthode d'analyse de données qui permet de regrouper les données en groupes, les *clusters*, dont les éléments sont similaires entre eux pour un critère donné, comme la distance au sens de la norme euclidienne par exemple.

Barttfel *et al* [14] ont eu l'idée d'associer ces deux concepts en 2015 sur une étude en IRMf chez le primate en *resting-state*. Ils ont pu mettre ainsi en évidence des réseaux de connectivité. Les animaux passent d'un état à un autre, sans superposition (contrairement à l'analyse en composantes indépendantes), et le répertoire d'états de connectivité observé, représentables sous la forme de matrices de connectivité, est un

marqueur permettant de savoir si le sujet étudié est conscient ou non, la conscience étant caractérisée par un répertoire beaucoup plus riche. Le schéma mis en place est montré sur la figure 3.21.

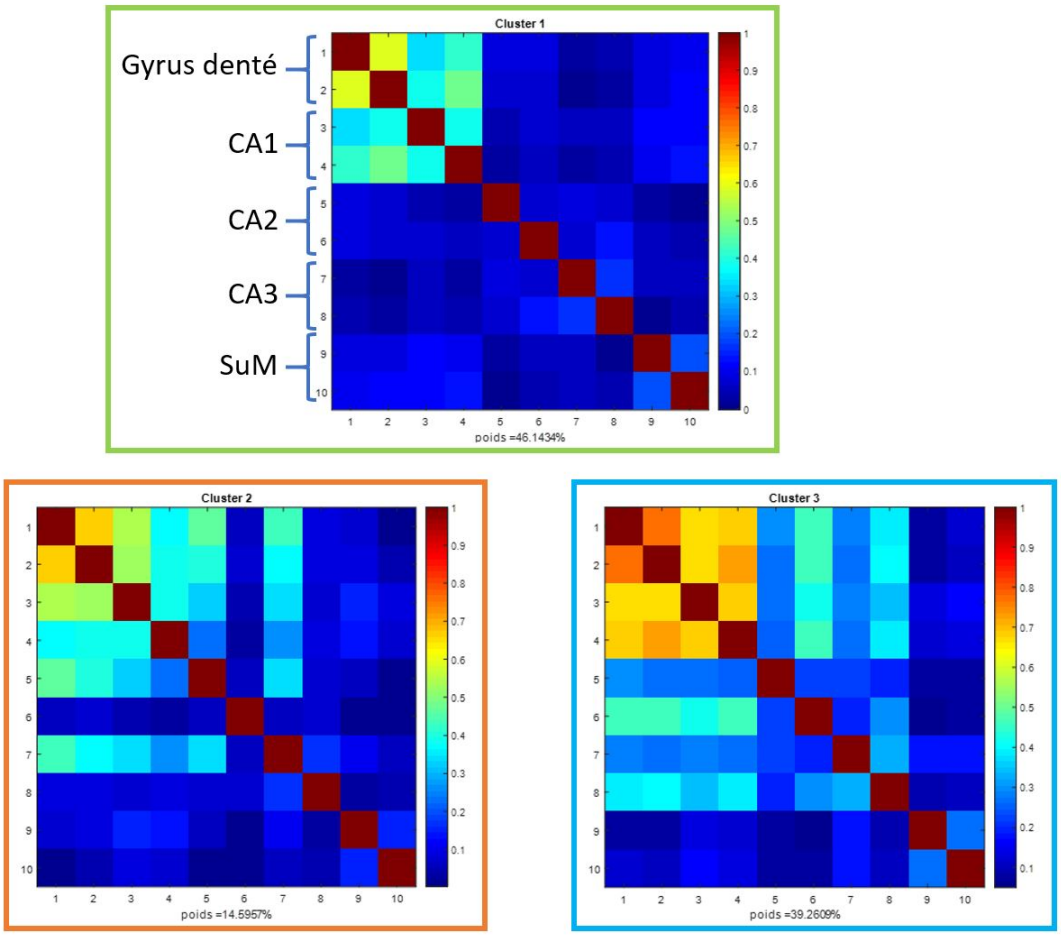


FIGURE 3.22 – Matrices de connectivité constituant la base du film de matrices après K-means *clustering* avec 3 centroïdes et poids correspondants.

La méthode a été adaptée au fUS ici : en fixant $p = 4$, une matrice de corrélation est calculée pour tous les p points temporels en prenant en compte les 25 points précédents et les 25 points suivants afin d'avoir les 50 points temporels requis pour faire de la corrélation temporelle (cf méthode d'identification des plages calmes). Pour chaque calcul de matrice de connectivité, les signaux ont été normalisés temporellement. L'algorithme *k-means* de *clustering* est alors utilisé pour organiser le film de matrices de connectivité obtenu en trois groupes ce qui permet d'avoir trois matrices de connectivité type. Il a été choisi de considérer une base de trois matrices type en considérant qu'il y ait un état de connectivité par situation expérimentale :

une matrice basale, une matrice de nouveauté sociale et une matrice de nouveauté environnementale. Pour avoir cette base commune à toutes les acquisitions de tous les animaux, l'ensemble des données disponibles de toutes les souris ont été concaténées (environ 7 h d'acquisition en cumulé) et la base des matrices de connectivité type est donnée sur la figure 3.22.

La numérotation sur les matrices des zones cérébrales étudiées est donnée sur la figure 3.23.

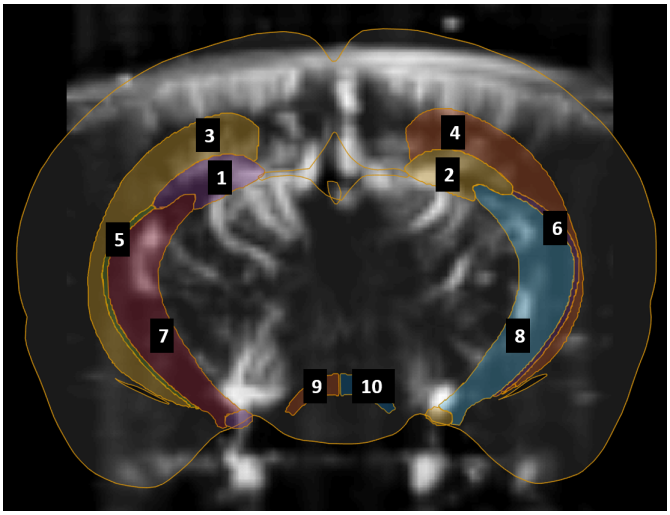


FIGURE 3.23 – Zones du cerveau étudiées.

— 1-2 pour le gyrus denté (gauche-droite),
— 3-4 pour le CA1 (gauche-droite),
— 5-6 pour le CA2 (gauche-droite),
— 7-8 pour le CA3 (gauche-droite),
— 9-10 pour le noyau supramammilaire (SuM ; gauche-droite),

L'algorithme utilisé associe chaque matrice du film de matrices de connectivité à un cluster, ou centroïde, de cette base. Ainsi, on a accès à une clef de répartition des matrices constituant la base qui donne leur poids respectif en temps passé dans l'état de connectivité (cf figure 3.22). Cette base représente trois états de connectivité distincts et on souhaite alors évaluer si la répartition de chacune des matrices la composant est différente suivant le type d'acquisition, c'est-à-dire selon un état basal, soit une situation de nouveauté sociale ou soit une situation de nouveauté environnementale, mais également selon la zone du *Mobile-Home Cage* dans lequel la souris imagée se trouve.

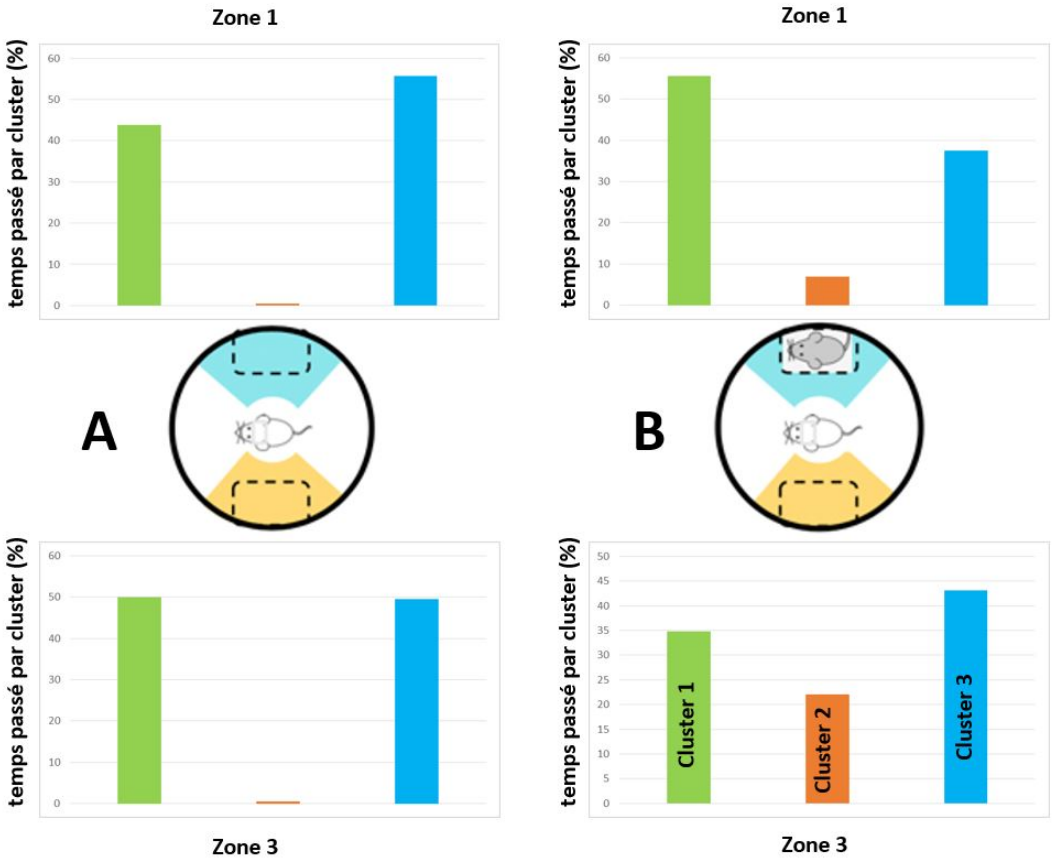


FIGURE 3.24 – Pourcentage du temps passé dans chaque cluster cérébral de la base dans les zones 1 (où est présentée la souris inconnue) et 3 (zone opposée) du *Mobile-Home Cage* pour l'expérience de nouveauté sociale : A) Basal et B) M1 (présentation de la souris).

Sur la figure 3.24, est illustrée la comparaison des acquisitions Basal et M1, présentant le pourcentage temporel de chaque clusters de la base selon la zone du Mobile-Home Cage, en gardant le code couleur de la figure 3.22.

En Basal, le cluster 2 n'est quasiment pas présent et cet état diffère donc des acquisitions M1, lors desquelles une souris inconnue a été présentée alors que la répartition pour les deux autres clusters semble similaire. **L'étude des clusters composant la base montrée sur la figure 3.22 suggère que la nouveauté sociale implique plus d'interactions dans le cerveau entre le CA1, le CA2, le CA3 et le gyrus denté**.

3.3 Conclusion du chapitre

Les méthodes développées dans le chapitre 2 pour permettre de faire de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore du cerveau chez la souris éveillée ont été appliquées pour tenter de caractériser un modèle d'autisme, en collaboration avec l'équipe de Thomas Bourgeron de l'institut Pasteur, et d'étudier les nouveautés sociale et environnementale, en collaboration avec l'équipe de Rebecca Piskorowski.

Pour les deux projets, les expérimentations sont toujours en cours. Les données analysées jusqu'à maintenant montrent des résultats encourageants, comme la baisse de connectivité dans l'hippocampe chez la souris mutée SHANK3 en *resting-state*, et l'ajout de nouvelles données pourraient permettre de valider statistiquement certains résultats.

La méthodologie proposée dans l'ensemble des travaux de thèse présentée jusqu'à maintenant semble être en mesure de lier l'activité fonctionnelle avec des comportement sociaux ou non-sociaux. Certaines méthodes d'analyse alternatives pourraient être envisagées pour apporter un nouveau regard sur les données actuelles, comme l'ICA de groupe (Salman *et al* 2019 [140]) qui est basée sur la même idée que la connectivité dynamique suivie du *clustering* utilisé ici mais en considérant que les états de connectivité soient superposables au cours du temps.

Enfin, il a été étudié ici le *grooming*, ou la position de la souris, pour faire le lien avec l'activité fonctionnelle : l'utilisation d'autres signaux du comportement pourrait également compléter cette étude, avec par exemple l'aide du logiciel *Live Mouse Tracker*[1].

1. https://livemousetracker.org/

4 Étude du couplage neuromécanique chez le rat par ultrasons ultrarapides

Le couplage neurovasculaire est un phénomène physiologique qui est à la base de très nombreuses méthodes de neuroimagerie fonctionnelle avec différentes méthodes comme l'IRMf et le fUS qui rendent compte indirectement de l'activité cérébrale en mesurant les variations locales de flux sanguins.

Dans ce chapitre, on étudiera *in vivo* chez le rat, en plus de l'augmentation locale des flux sanguins résultant de l'activation du cerveau, les changements locaux des propriétés mécaniques des tissus cérébraux à différentes échelles temporelles à la recherche d'un couplage analogue au couplage neurovasculaire, un couplage neuromécanique.

Afin d'investiguer cet éventuel couplage neuromécanique, nous avons mis au point la première séquence ultrasonore hybride permettant de combiner simultanément le fUS et l'élastographie par ondes de cisaillement, ou *Shear Wave Elastrography* (SWE), qui permet de mesurer la rigidité locale des tissus en accédant au module d'Young.

Cette méthodologie a été appliquée *in vivo* chez des rats qui étaient stimulés visuellement et a permis d'obtenir des films Doppler à haute sensibilité donnant accès simultanément aux variations de CBV et aux mesures locales quantitatives d'élasticité.

4.1 Couplage neuromécanique

4.1.1 Limites du couplage neurovasculaire

Le couplage neurovasculaire est un phénomène physiologique qui consiste à l'augmentation de l'afflux sanguin dans les zones du cerveau où l'activité neuronale se déroule. La compréhension du phénomène de couplage neurovasculaire, bien que permettant de faire de l'imagerie fonctionnelle du cerveau, est, encore aujourd'hui, incomplète (Denfiel *et al* 2016 [45]). Un résumé de son fonctionnement est donné sur la figure 4.1 [1]. Nous ne savons pas encore exactement comment l'activité neuronale induit des modifications de l'activité hémodynamique du cerveau (Logothetis 2008 [99]) notamment à cause du fait que de très nombreux paramètres sont impliqués (Arthurs *et al* 2002 [9]).

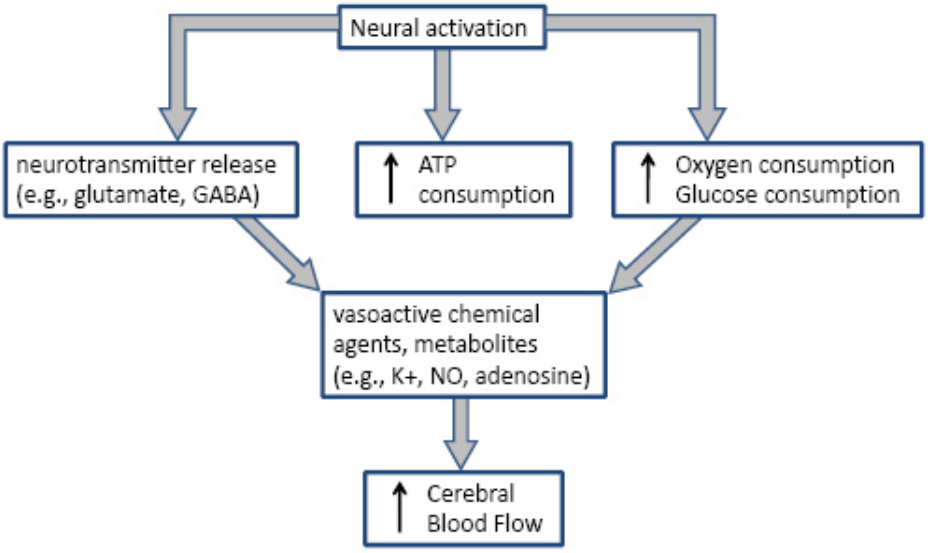


FIGURE 4.1 – Résumé des changements physiologiques reliant l'activité neuronale et la réponse vasculaire.

L'activité synaptique se traduit par les potentiels de champs locaux (LFP), qui peuvent être considérés commes les signaux d'entrée des neurones. Les potentiels d'actions, signaux de sortie, permettent la communication entre les neurones. Certaines études suggèrent (Gandhi *et al* 1999 [57] et Mathiesen *et al* 1998 [109]) que

1. http://www.scholarpedia.org/article/Neurovascular_coupling

lorsque les activité afférentes et efférentes sont corrélées, la réponse vasculaire traduit à la fois les LFP et les potentiels d'actions. Cependant, lorsqu'elles sont dissociées, la réponse vasculaire rend plus compte de l'activité synaptique et ne permet plus de traduire l'effet des potentiels d'action de la population de neurones locale.

Par ailleurs, O'Herron *et al* ont montré en 2016 [122] que l'architecture fonctionnelle du couplage neurovasculaire était hétérogène selon les espèces mais aussi les régions cérébrales considérées. Cela remet en question, dans certains cas, la transversalité des découvertes effectuées utilisant ce couplage. Malgré cette réserve, le couplage neurovasculaire permet bien souvent de rendre compte de l'activité neuronale, notamment lorsque l'échelle spatiale du couplage est similaire à celle de la zone activée.

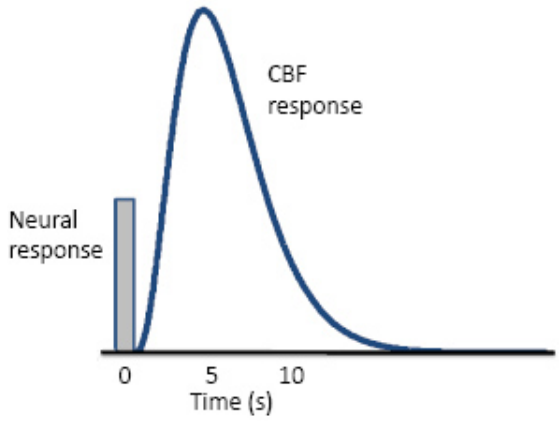


FIGURE 4.2 – Schéma de l'afflux sanguin type (CBF) en réponse à une brève activation neuronale.

En terme d'amplitude, les variations de flux sanguins évoluent généralement linéairement avec l'activité neuronale (Li *et al* 2007 [98] mais il peut arriver que l'activité neuronale sature sans que la réponse vasculaire ne cesse d'augmenter (Sheth *et al* 2004 [147]).

La limitation principale du couplage neurovasculaire est la réponse temporelle lente du couplage. L'afflux sanguin local résultant d'une brève activation neuronale est retardé de 1 s à 2 s et atteint son maximum 4 s à 6 s après la réponse neuronale (cf figure 4.2). À cause de ce phénomène, la réponse vasculaire ne permet donc pas de décrire les modulations rapides de l'activité neuronale.

Pour toutes ces raisons, trouver une alternative au couplage neurovasculaire pour traduire l'activité neuronale est particulièrement intéressant. C'est la motivation première de cette étude, notamment depuis que Patz *et al* ont évoqué un couplage neuromécanique rapide en 2019 en IRM [127], afin de vérifier cette hypothèse en ultrasons.

Enfin, il existe des altérations du couplage neurovasculaire, à cause de l'âge (Lourenço *et al* 2017 [100]) ou de pathologies (Girouard *et al* 2006 [60]) par exemple. L'étude du couplage neuromécanique pourrait servir de biomarqueurs dans ces situations.

4.1.2 État de l'art sur le lien entre activité neuronale et rigidité tissulaire

Depuis plusieurs années, notamment grâce à l'essor des méthodes d'imagerie fonctionnelle du cerveau et de celles des techniques d'élastographie permettant d'évaluer l'élasticité des tissus, établir un lien entre l'activité neuronale et la rigidité tissulaire est devenu possible et un champ d'exploration en neurosciences, notamment pour pallier les limitations du couplage neurovasculaire pour l'imagerie fonctionnelle et pour la compréhension fondamentale.

Le cerveau est un organe sensible mécaniquement et les mécanismes physiques du système nerveux sont essentiels pour l'homéostasie cérébrale, l'activité cérébrale et le neurodéveloppement. Par exemple, il a été montré que la rigidité du cerveau est réduite chez les patients souffrant d'Alzheimer (Murphy *et al* 2011 [116]) et que la maladie de Parkinson pouvait être détectée avant l'apparition des symptômes de motricité en s'intéressant à l'hyperéchogénéicité de la substance noire (Berg *et al* 2005 [21]). Il est aujourd'hui connu que des forces endogènes au cerveau sont responsables de réguler plusieurs aspects de la fonction neuronale. Chaque battement cardiaque, à l'origine de la pulsatilité tissulaire, génère notamment des forces qui peuvent induire des déplacements des tissus du cerveau de l'ordre de la dizaine de microns (Kucewicz *et al* 2007[91]). Une modification nanoscopique des contraintes mécaniques et de la tension appliquées à la membrane plasmique peut également influencer l'activité des canaux ioniques (Arnadottir *et al* [6]) ou la diffusion de neurotransmetteurs (Chen *et al* 1999 [31]). Les forces mécaniques jouent aussi un rôle prépondérant dans le développement du cerveau (Smith *et al* 1988 [150]).

L'activité neuronale implique généralement une vasodilatation et une augmentation locale de l'afflux sanguin. Ces conséquences de l'activité neuronale semblent avoir un effet sur la rigidité tissulaire du cerveau dont la compréhension est encore incomplète et les recherches à ce sujet donnent parfois des résultats contradictoires.

Bien que ces deux études aient été conduites avec la même technique d'élastographie par résonance magnétique (MRE) et l'utilisation du même paradigme de stimulation fonctionnelle, Fehlner *et al* ont mis en évidence en 2014 [50] un ramollissement tissulaire suite à une stimulation visuelle alors que Lan *et al*, en 2020 [93], décrivent une augmentation de rigidité dans le cortex visuel. Cette différence se retrouve également chez Patz *et al* 2015 [126] (durcissement suite à une stimulation auditive) et Holub *et al* 2015 [73] (ramollissement suite à une stimulation du toucher) et une explication à ces différences pourraient être l'utilisation de paramètres de MRE et de paradigmes de stimulations différents.

Cependant, Patz *et al* ont montré, en 2018 [128] et 2019 [127], sur deux études distinctes utilisant exactement les mêmes techniques et les mêmes paramètres, qu'une stimulation électrique de la patte arrière chez la souris pouvaient à la fois mener à un durcissement et un ramollissement tissulaire. Ceci questionne la validité des paradigmes et des hypothèses utilisées.

Par ailleurs, l'élastographie par résonance magnétique (MRE) et l'IRMf n'ont pu être conduites en simultané sur la plupart des études, à l'exception de celle de Lan *et al* en 2020 [93]. Ainsi, les deux types d'acquisitions doivent être donc réalisés séparément, potentiellement avec des conditions d'anesthésie ou physiologiques différentes, risques amplifiés par la longueur nécessaire des acquisitions avec cette technique.

En outre, d'autres phénomènes, comme l'hypercapnie (augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone dans le sang), modifient la rigidité des tissus cérébraux et son étude en MRE mais aussi en ultrasons montrent également des résultats qui s'opposent (Hetzer *et al* 2019 [69], Schregel *et al* 2017 [144] et Tzschätzsch *et al* 2018 [163]).

Les phénomènes affectant la perfusion sanguine du cerveau ont également une influence sur la rigidité du cerveau mais le signe de la variation d'élasticité est encore à déterminer : Hetzer *et al* ont montré en 2018 [70] que l'augmentation de la perfusion

du cerveau avait pour conséquence un durcissement local tandis que Hatt *et al* ont mis en évidence en 2015 [67] un durcissement résultant d'une baisse de la perfusion à cause d'une compression de la jugulaire. L'hypothèse dans le premier cas est alors que la vasodilatation appliquerait une pression sur les tissus alentours ce qui crée un durcissement dû à l'augmentation de la perfusion par non-linéarité (Parker 2017 [125]), dans le deuxième cas, une contraction des muscles lisses enveloppant les petits vaisseaux et en grande partie responsables de la vasodilatation expliquerait le durcissement ((Schregel *et al* 2017 [145]) dans le cas d'une diminution de la perfusion (Schregel *et al* 2017 [145]).

Ce large nombre d'études montre l'importance des propriétés mécaniques lors du fonctionnement du cerveau et la controverse de leurs résultats alimente une discussion scientifique récente et particulièrement intéressante qui pourrait amener à une grande avancée en neuroimagerie fonctionnelle, une alternative au couplage neurovasculaire.

4.1.3 Intérêt des ultrasons ultrarapides

Jusqu'aujourd'hui, les propriétés viscoélastiques du cerveau ont surtout été étudiées en IRM avec la MRE, *Magnetic Resonance Elastography*, qui permet d'imager la propagation dans le cerveau d'ondes basse fréquence de cisaillement générées par des vibrateurs externes (Mariappan *et al* 2010 [108] et Vappou 2012 [165]).

À l'origine, l'échographie ultrarapide a été développée afin de faire de l'élastographie par ondes de cisaillement. La vitesse de propagation de ces ondes étaient trop importantes pour qu'elles soient visualisées avec la cadence d'imagerie de l'échographie conventionnelle. L'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement (SWE), consiste à générer une onde de cisaillement en utilisant la force de radiation acoustique (Sarvazyan *et al* 1998 [142]) puis à imager sa propagation à une cadence de plusieurs milliers d'images par seconde (Tanter *et al* 2002 [156]). La vitesse locale de propagation de cette onde de cisaillement permet d'accéder à une mesure directe de la rigidité à cet endroit (Bercoff *et al* 2004 [16]).

La SWE du cerveau a été démontrée chez le rat trépanné, permettant notamment de cartographier le cerveau en termes de module d'élasticité (Macé *et al* 2011 [105]) mais également de mettre en évidence l'anisotropie de la vitesse de propagation des

ondes de cisaillement dans le cerveau, pour une même structure. Cette technique a aussi permis de discriminer les tumeurs au cerveau selon leur gravité chez l'être humain en péropératoire (Chauvet *et al* 2016 [30]).

Un intérêt la SWE, c'est qu'il nécessite exactement le même matériel que pour faire du fUS, c'est-à-dire un échographe et une sonde échographique. Nous avons ainsi programmé l'échographe afin qu'il puisse faire des acquisitions de Doppler ultrasensible (Bercoff 2011 [19]) et des mesures de rigidité (Sandrin *et al* 2002 [141] et Tanter *et al* 2008 [155]) en simultané dans le cerveau afin d'étudier le lien entre l'activité cérébrale et les propriétés mécaniques des tissus.

4.2 Étude simultanée des propriétés mécaniques et des flux sanguins dans le cerveau

4.2.1 Élastographie par ondes de cisaillement

Nous allons rappeler ici le principe de l'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement ou SWE. La SWE consiste à la génération d'une ondes de cisaillement et à l'imagerie de sa propagation dont la vitesse permet d'accéder à la mesure d'élasticité locale du milieu propagatif. L'ensemble de la méthode est résumée sur la figure 4.3.

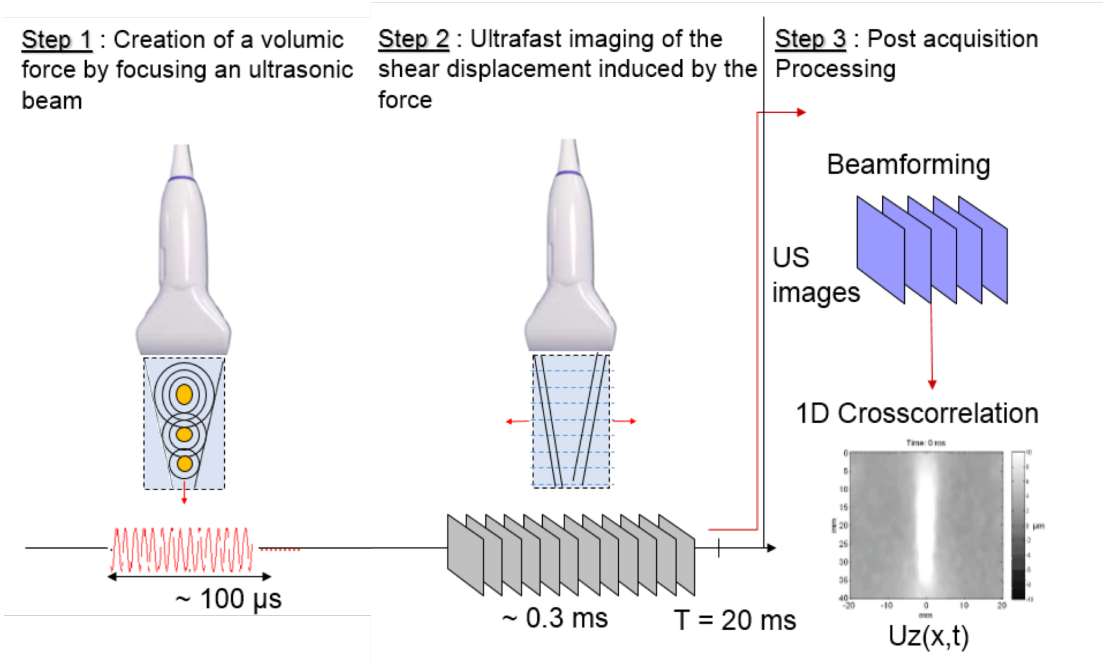


FIGURE 4.3 – Principes de l'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement : 1) génération d'une onde plane de cisaillement par force de radiation acoustique créée par une succession de focalisations pendant 100 μs chacune du faisceau ultrasonore à différentes profondeurs, 2) imagerie ultrasonore ultrarapide de la propagration de l'onde de cisaillement et 3) *beamforming* et calcul du champ de vitesse tissulaire axial U_z qui permet de visualiser l'onde de cisaillement.

4.2.1.1 Génération de l'onde de cisaillement

La pression de radiation acoustique est le phénomène physique à la base de la génération de l'onde de cisaillement. Elle consiste à focaliser le faisceau ultrasonore sur un point ce qui entraine un transfert de quantité de mouvement entre ces ondes

et le point focal du milieu. Il en résulte une force volumique, ou surfacique, qui génère un déplacement dans le milieu.

Il est possible ainsi, avec un échographe et une sonde seuls, de générer une force localisée à distance, proportionnelle au carré de l'amplitude des ultrasons, pilotée principalement par la durée de la focalisation (typiquement 100 μs).

Le déplacement du milieu induit par la force de radiation acoustique génère la propagation de cette déformation sous la forme d'ondes mécaniques de compression et de cisaillement. On peut ensuite mesurer la vitesse de cette onde de cisaillement c_s localement. La vitesse de l'onde de cisaillement c_s est reliée au module d'Young E du milieu de masse volumique ρ :

$$E = 3\rho {c_s}^2 \tag{4.1}$$

Afin d'obtenir une onde plane de cisaillement, Bercoff *et al* ont eu l'idée en 2002 [20] de focaliser les ultrasons successivement à différentes profondeurs qui permet des interférences constructives entre les ondes de cisaillement générées à chaque profondeur (cf figure 4.3). Ces interférences constructives permettent également d'augmenter sensiblement l'amplitude de l'onde plane de cisaillement générée comparée à l'amplitude obtenue pour une focalisation simple.

4.2.1.2 Imagerie de la propagation de l'onde de cisaillement

La vitesse de propagation dans le cerveau humain est de l'ordre de 1 m.s^{-1}. La boîte crânienne d'un rat est elle de l'ordre de 1 cm. Ainsi, en 10 ms maximum, l'onde est déjà sortie du champ de vue. Il convient donc d'être capable d'imager la propagation de cette onde de cisaillement avec une très haute cadence d'imagerie, typiquement de plusieurs milliers d'images par seconde. Il s'agit de l'étape 2 présentée sur la figure 4.3.

4.2.1.3 Calcul de la vitesse de l'onde de cisaillement

Une fois l'onde de cisaillement générée et sa propagation imagée, nous allons construire le film de déplacement tissulaire à l'aide des données brutes enregistrées *post-beamforming*, déjà utilisées dans la partie 2.2.1. Il s'agit de l'étape 3 présentée sur la figure 4.3.

Pour chacune des images, l'estimateur de Kasai avec un pas de 1 (Kasai *et al* 1985 [86]), qui consiste à calculer la corrélation entre deux images successives obtenues par échographie ultrarapide, permet d'obtenir une estimation du champ de vitesse tissulaire axial U_z. On obtient ainsi un film de la propagation de l'onde de cisaillement dont est montré une image 1 ms après la génération de l'onde de cisaillement sur la sous-image A de la figure 4.4 [1].

On utilise ensuite un algorithme de temps de vol déjà décrit dans la littérature (Tanter *et al* 2008 [155] et Macé *et al* 2011 [105]) qui estime le temps de propagation de l'onde de cisaillement dans le plan d'imagerie entre un pixel et son voisin en utilisant la corrélation croisée pour obtenir finalement une estimation de la vitesse locale de l'onde de cisaillement c_s.

Afin de ne pas prendre en compte les éventuelles ondes provenant de réflexions qui peuvent se produire proche du crâne ou d'autres structures rigides dans le cerveau, qui peuvent introduire des artefacts, un filtre directionnel a été appliqué sur ce film (Deffieux *et al* 2011 [42]).

L'algorithme de temps de vol à une dimension est appliqué au film de déplacement tissulaire sur les pixels qui nous intéressent : en calculant la corrélation croisée temporelle entre le profil de vitesse tissulaire de deux pixels voisins, on peut estimer le temps qu'a mis l'onde pour se propager de l'un à l'autre et, par conséquent, la vitesse de l'onde de cisaillement à cet endroit (cf figure 4.4).

Pour améliorer les performances de l'algorithme utilisé, le champ de vitesse, pour un pixel, est moyenné avec celui au-dessus de lui et celui en-dessous en termes de profondeur d'imagerie afin d'améliorer le rapport signal sur bruit.

Par ailleurs, nous avons conduit plusieurs estimations pour chaque pixel. Soit (x, z) les coordonnées du pixel : la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement

1. https://tel.archives-ouvertes.fr/pastel-00005573/

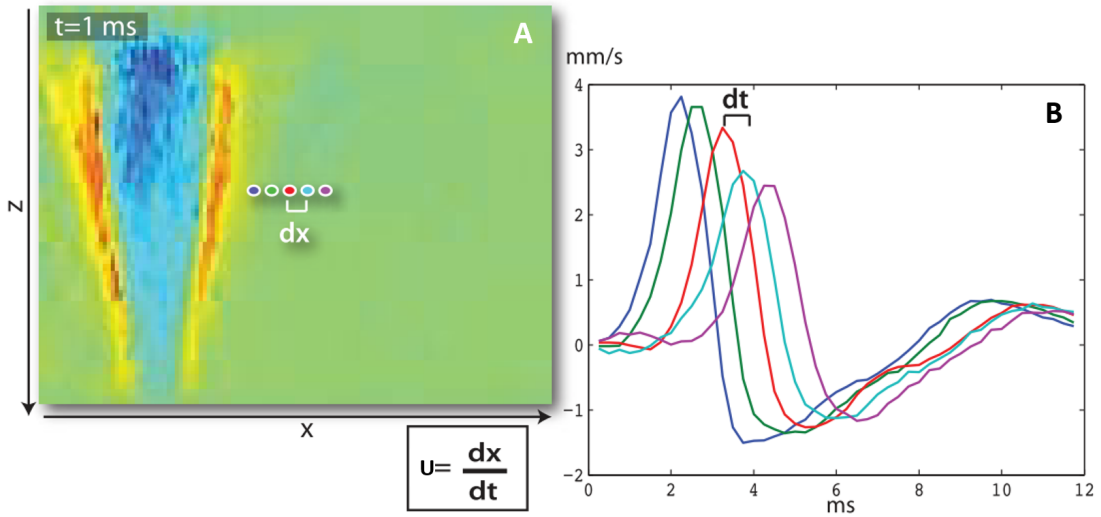


FIGURE 4.4 – Principes de l'estimation de la vitesse de l'onde de cisaillement U par calcul du temps de vol dt : A) image du film de la propagation de l'onde de cisaillement 1 ms après l'excitation du milieu par force de radiation et B) profils temporels de la vitesse tissulaire des 5 pixels voisins séparés de dx deux à deux montrés en A. La corrélation temporelle croisée de ces profils permet d'accéder au temps de vol dt nécessaire à la propagation de l'onde pour arriver d'un pixel à l'autre.

est alors estimée pour toutes les paires de points de coordonnées $(x - k \times dx, z)$ et $(x + k \times dx, z)$ où dx correspond à la distance entre deux points consécutifs dans la direction x parallèle à la propagation de l'onde plane de cisaillement (z correspond à la direction perpendiculaire à la propagation de l'onde) et k une valeur entière comprise entre 1 et 4. On obtient ainsi quatre estimations de la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement pour le pixel de coordonnées (x, z) pour lesquels est utilisé l'écart interquartile afin d'éliminer les valeurs artefactuelles. Les valeurs en module d'Young E sont alors déduites de cette valeur de vitesse finale c_s : $E = 3\rho {c_s}^2$. Afin que ce raisonnement fonctionne, l'hypothèse d'un milieu purement élastique a été faite, c'est-à-dire qu'on néglige les effets de la viscosité, et que la linéarité est vérifiée : faibles déformations et isotropie.

4.2.2 Séquence ultrasonore ultrarapide couplant fUS et élastographie par ondes de cisaillement

Les ultrasons peuvent être utilisés pour mesurer précisément les variations de CBV avec le Doppler ultrasensible (400 ms de résolution temporelle et 100 microns

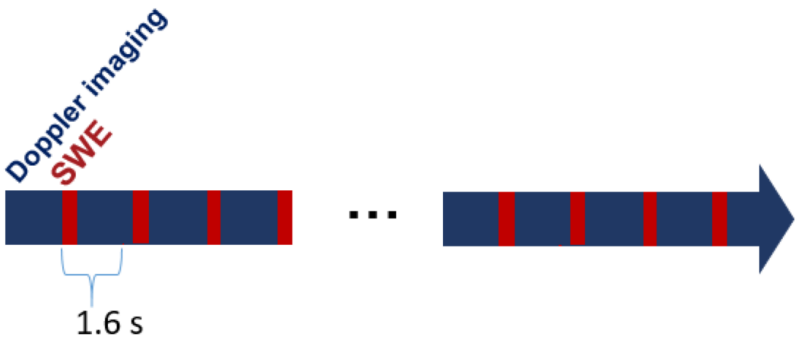


FIGURE 4.5 – Schéma de la séquence ultrasonore permettant le fUS et le SWE en simultané : succession de blocs de Doppler ultrasensible pour le fUS et de SWE pour mesurer les propriétés mécaniques locales des tissus.

de résolution spatiale typiquement) et également pour effectuer des estimations quantitatives de dureté sans avoir recours à un vibrateur externe avec la SWE. Nous avons combiné ces deux techniques pour former une séquence ultrasonore qui permet de donner de manière simultanée et indépendante des informations locales sur le CBV et les propriétés mécaniques des tissus afin d'étudier l'éventuel couplage neuromécanique introduit précédemment.

Cette séquence a été conçue pour fonctionner avec un échographe de recherche Vantage 256 [1] et une sonde Vermon [2] 13 MHz dont les 192 transducteurs sont espacés de 0,14 mm. Elle consiste en l'enchainement successif à 0,625 Hz d'un bloc de Doppler ultrasensible pour faire du fUS et d'un bloc de SWE pour estimer le module d'Young du milieu imagé comme cela est illustré sur le schéma de la figure 4.5.

4.2.2.1 Paramètres du bloc de SWE

1. Génération de l'onde de cisaillement :
   - Fréquence : 7,8125 MHz
   - Durée d'impulsion : 100 μs
   - Voltage : 36 V
   - 3 profondeurs de focalisation
   - 6 abscisses de push

1. https://verasonics.com/vantage-systems/
2. https://www.vermon.com/index.php

2. Imagerie de la propagation de l'onde de cisaillement
   — Fréquence : 12,5 Hz
   — *Pulse Repetion Frequency* : 20 000 Hz
   — Nombres d'angles : 4
   — Ouverture angulaire : 8°
   — Cadence d'imagerie : 5 000 Hz
   — Voltage : 36 V

4.2.2.2 Paramètres du bloc de Doppler ultrasensible

— Fréquence : 12,5 Hz
— *Pulse Repetion Frequency* : 20 000 Hz
— Nombres d'angles : 12
— Ouverture angulaire : 20°
— Cadence d'imagerie : 500 Hz
— Voltage : 36 V

4.2.3 Plan de l'étude

La séquence ultrasonore hybride fUS-SWE conçue, il convient alors de l'appliquer *in vivo* chez le rat pour étudier le lien éventuel entre les variations locales de CBV et celles du module d'Young dans le cerveau. Les variations de CBV seront induites par stimulation fonctionnelle.

4.2.3.1 Préparation des animaux

Cette étude a été conduite sur des rats *Sprague-Dawley* mâles d'environ 250-300 g. Le crâne du rat altère la propagation du faisceau ultrasonore aux fréquences utilisées et peut donc gêner à la fois l'imagerie Doppler et la génération de l'onde de cisaillement nécessaire pour faire de la SWE. Par conséquent, les rats utilisés ont subi une trépanation centrée sur Bregma - 6,2 mm (cf figure 4.6) sous anesthésie profonde provoquée par une injection intrapéritonéale d'un mélange de medetomidine (Domitor, 0,3 mg.kg^{-1}) et de ketamine (Imalgene, 40 mg.kg^{-1}) et réalisée sur un cadre stéréotaxique [1]. L'anesthésie est maintenue en sous-cutanée après la chirurgie avec

1. https://kopfinstruments.com/

un débit réduit du mélange de medetomidine et de ketamine. Du gel échographique était ensuite placé au-dessus de la fenêtre d'imagerie pour assurer le couplage avec la sonde qui était elle pilotée avec des moteurs. La stabilité des paramètres vitaux [1] (température, rythmes respiratoire et cardiaque) des animaux était vérifiée en permanence pendant l'ensemble des procédures.

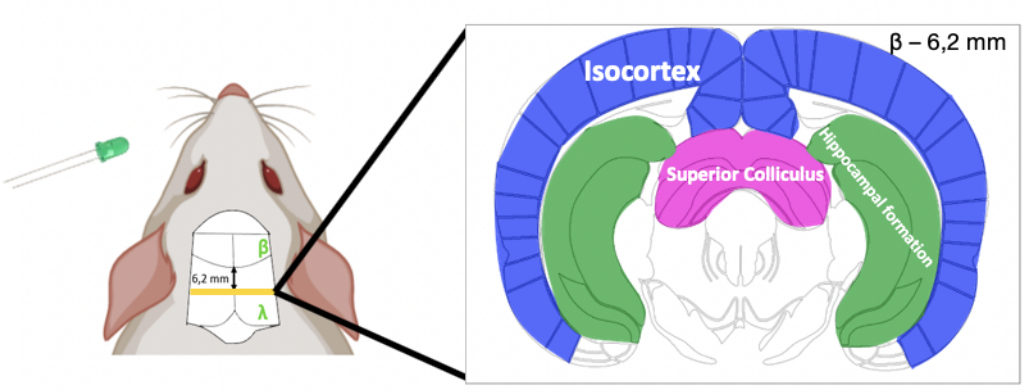


FIGURE 4.6 – Vue schématique du rat pendant une acquisition avec la LED verte et la fenêtre de trépanation centrée sur Bregma - 6,2 mm.

4.2.3.2 Paradigme de stimulation fonctionnelle

Nous avons choisi d'induire des variations de CBV dans le cerveau par stimulation fonctionnelle. Les types de stimuli les plus fréquents chez le rat sont la stimulation des vibrisses, la stimulation électrique et la stimulation visuelle. Les deux premières induisent principalement des activations dans des zones du cortex qui sont, soit proches d'interfaces avec l'air ou le crâne, soit proches des ventricules (les ondes de cisaillement ne se propagent pas dans les liquides), qui peuvent perturber la bonne propagation des ondes de cisaillement utilisées pour les mesures d'élasticité. C'est la raison pour laquelle a été choisie, pour cette étude, d'effectuer une stimulation fonctionnelle visuelle et un plan coronal d'imagerie contenant le colliculus supérieur (SC ; cf figure 4.6), ce qui permet d'éviter ces contraintes tout en garantissant une large zone d'activation neuronale. Le paradigme de stimulation consiste en la répétition de 30 s d'illumination précédées et suivies de 30 s de pénombre pour un temps total d'expérience de trois minutes. Les illuminations ont été réalisées avec une LED verte clignotant à la fréquence de 3 Hz et placées à 10 mm de l'œil (Gesnik *et al* 2017 [59]).

1. http://www.kdinstruments.com.au/

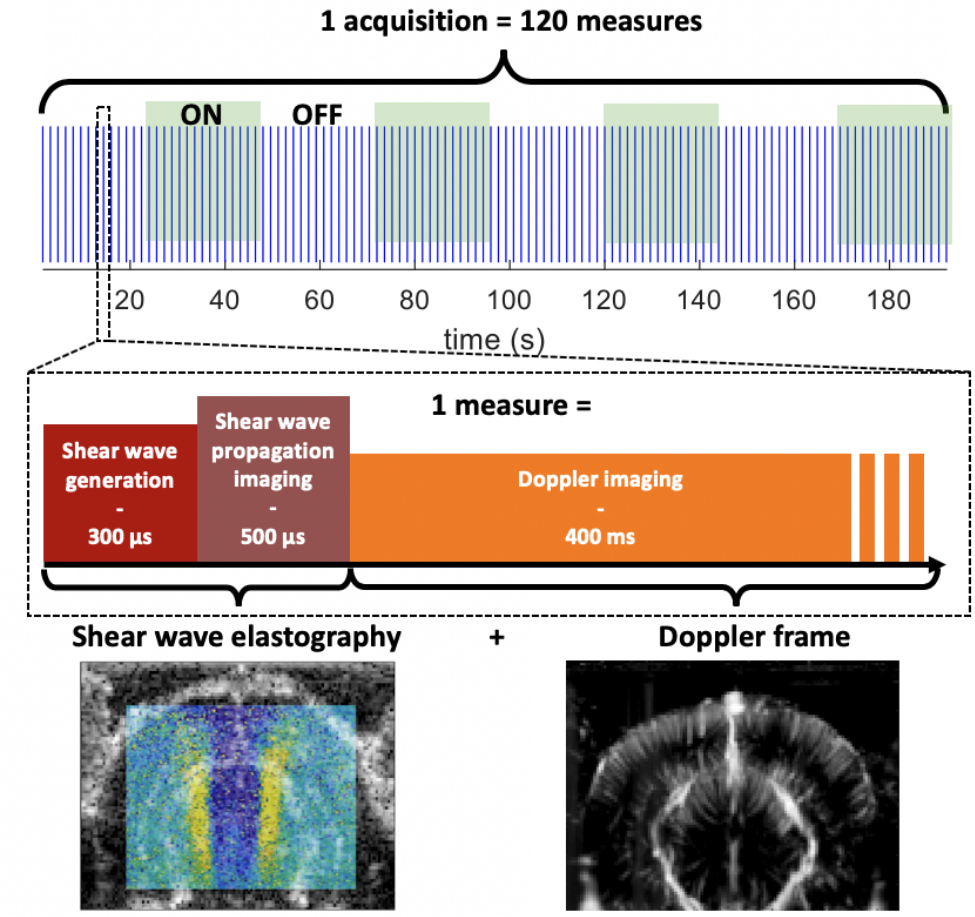


FIGURE 4.7 – Détails d'une acquisition qui alterne 15 mesures avec stimulation visuelle (ON) et 15 mesures sans (OFF).

La séquence ultrasonore présentée ici est un enchainement successif toutes les 1,6 s d'un bloc de Doppler ultrasensible pour faire du fUS et d'un bloc de SWE pour mesurer l'élasticité des tissus (cf figure 4.5. Chacune des paires de ces blocs constitue un point de mesure. Par conséquent, chaque acquisition dure trois minutes et contient 120 mesures qui sont séparées en ensembles de 15 mesures illuminées et de 15 mesures dans la pénombre, schéma répété quatre fois, comme cela est illustré sur la figure 4.7. Un total de douze acquisitions a été enregistré pour chaque rat étudié et les expérimentations étaient conduites dans une pièce sombre.

4.2.3.3 Données enregistrées

Chaque acquisition comporte 120 mesures constituées chacune d'une image Doppler, et d'une mesure de la vitesse de l'onde de cisaillement.

Chaque image Doppler est formée à partir de 200 images ultrarapides (résultant des 12 ondes planes angulées) dont on sépare le signal tissulaire du signal hémodynamique en utilisant le filtre SVD à seuil fixe (Demené *et al* 2015 [43]). Une acquisition correspond à un film Doppler de 120 images : les vasculatures montrées sur la figure 4.8 correspondent au film moyen pour l'acquisition du rat étudié. Afin de faire de la stimulation fonctionnelle, nous avons utilisé une lampe clignotant selon le schéma décrit sur la figure 4.7. Ce schéma de stimulation couplé au film Doppler permet de construire une carte SPM [1] avec le *General Linear Model* (GLM) pour identifier les zones du cerveau pour lesquelles les variations de CBV corrèlent temporellement avec le schéma de stimulation. Le GLM permet d'exprimer les variables observées, les variations de CBV des pixels au cours du temps, sous la forme de combinaisons linéaires du profil temporel du schéma de stimulation et d'une constante qui inclut également l'erreur résiduelle. L'écart quadratique moyen est utilisé pour déterminer l'ensemble de ces coefficients. Des tests de Student simples sont alors réalisés sur chacun des pixels et sont aussi calculés les z-scores et les p-valeurs correspondantes. Comme chaque pixel est analysé séparément, on a utilisé une correction pour comparaison multiple de Bonferonni. La cartes des z-scores de la réponse vasculaire du cerveau au stimulus ont ainsi été seuillées en tenant compte des p-valeurs corrigées par le nombre de pixels (cf sous-image A de la figure 4.8). Pour compléter, les cartes de CBV relatif ont également été calculées comme on peut le voir sur la sous-image B de la figure 4.8.

Chacun des 120 blocs de SWE est constitué d'un film de 26 images ultrarapides de la propagation de l'onde de cisaillement dont le traitement, afin d'aboutir à une mesure de la vitesse de l'onde de cisaillement SWS (pour *Shear Wave Speed*), a été détaillé dans la partie 4.2.1 avec l'utilisation d'un algorithme de temps de vol unidimensionnel.

Chaque acquisition correspond à 120 mesures d'élasticité et 120 images Doppler qu'il est possible de les comparer de manière instantanée, c'est-à-dire étudier la

1. https://imaging.mrc-cbu.cam.ac.uk/imaging/PrinciplesStatistics

corrélation temporelle des signaux de CBV et de SWS en chaque point, ou à une échelle de temps plus longue, où est étudiée la tendance sur le temps total d'acquisition.

4.3 Résultats et discussions

4.3.1 Imagerie hybride élastographie-fUS

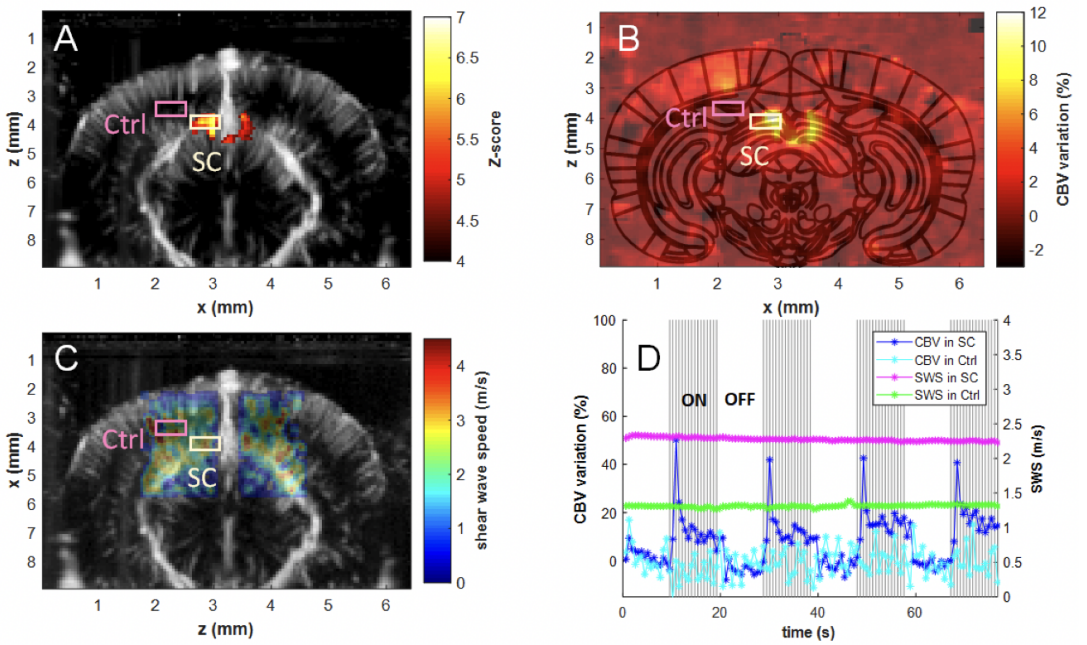


FIGURE 4.8 – Premiers résultats pour un rat (une acquisition) : A) Superposition de la vasculature à Bregma - 6,2 mm (niveau de gris) et carte des z-scores de la réponse vasculaire cérébrale au stimulus (échelle de couleurs) pour la zone contrôle (en rose) et la zone stimulée (en beige), B) Superposition des variations de CBV induites par le stimulus (en échelle de couleurs) et le l'atlas Paxinos (en noir) à Bregma - 6,2 mm, C) Superposition de la vasculature (niveau de gris) à Bregma - 6,2 mm et de la carte (échelle de couleurs) de vitesses de l'onde de cisaillement (SWS), et D) Variations de CBV et de SWS dans la zone de contrôle et dans la zone activée.

Chaque acquisition est composée de 120 mesures d'élasticité et de 120 mesures du CBV séparées dans le temps de 1,6 s. Les mesures d'élasticité sont illustrées sur l'exemple d'une acquisition pour un rat sur la sous-image D de la figure 4.8. Ces mesures sont reproductibles pour l'ensemble des n = 6 rats étudiés sur l'expérience décrite précédemment dans la partie 4.2.3 : l'écart-type ne dépasse pas les 9 % pour la mesure de la vitesse de cisaillement pour chaque rat. Par ailleurs, si l'on considère le groupe, l'erreur standard reste en-dessous de 5 %. Les mesures trouvées pour la SWS sont très similaires à celles données par la littérature (Macé *et al* 2010 [105]) : de 0,9 m.s^{-1} à 2,9 m.s^{-1} dans le cerveau d'un rat, ce qui correspond à un module d'Young dans compris entre 2 et 25 kPa (moyenne de 12 kPa).

Nous avons également pu construire des cartes d'élasticité comme le montre l'exemple d'un rat donné sur la sous-image C de la figure 4.8.

Ces cartes sont partielles car l'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement (SWE) ne fonctionne pas dans les deux cas suivants : à la jonction entre les deux hémisphères du cerveau, il semble que les ondes de cisaillement ne traversent pas cet espace, et au niveau des points focaux où l'onde est générée car le calcul de la vitesse n'y est pas défini (Sandrin *et al* [141]).

La carte montre des différences de rigidité pour des structures distinctes du cerveau et la distribution spatiale des propriétés élastiques est cohérente, que l'on prenne chaque rat séparément, ou le groupe entier, et les valeurs de SWS sont, là aussi, cohérente avec celles données dans la littérature.

Bien que la qualité des cartes d'élasticité, ou de vitesse ici, n'était pas prioritaire dans cette étude, nous avons pu, notamment grâce à l'augmentation de la fréquence d'imagerie, améliorer leur résolution spatiale (par rapport à Macé *et al* 2010 [105]) : nous avons pu obtenir, avec la méthode de calcul détaillée précédemment, une résolution spatiale de 700 μm × 240 μm (largeur × profondeur) avec une fréquence d'imagerie de 12,5 MHz et une sonde dont l'espace inter-transducteurs vaut 0,14 mm.

Pour les mesures de CBV, les résultats sont très similaires à ceux que l'on pourrait obtenir avec une séquence dédiée au fUS uniquement (comme celle utilisée pour le chapitre 3 par exemple), notamment en termes de rapport signal sur bruit et en résolution : le Doppler de la séquence hybride a une résolution temporelle de 10 ms et une résolution spatiale de 140 μm (cf sous-image A de la figure 4.8). Nous avons pu ainsi construire des cartes de z-scores robustes et reproductibles en réponse à la stimulation fonctionnelle : pour le groupe de n = 6 rats, nous avons pu observé une augmentation moyenne de 18 % ± 4 % dans le colliculus supérieur (SC).

Enfin, la sous-image D de la figure 4.8 permet de montrer, pour la zone contrôle, que la force de radiation ultrasonore ne perturbe pas l'activité cérébrale : la SWE ne modifie pas le CBV.

Ainsi, la séquence ultrasonore combinant fUS et SWE, qui a été conçues pour ce projet, donnent des mesures de CBV et d'élasticité robustes et reproductibles. Cela permet d'avoir un outil sûr afin d'étudier l'éventuel lien qu'il pourrait y avoir entre

les variations de CBV dues à la stimulation fonctionnelle et la rigidité des tissus. Au delà de ce projet, cette technique constitue une nouvelle modalité de neuroimagerie à disposition des neuroscientifiques.

4.3.2 Étude aux temps courts

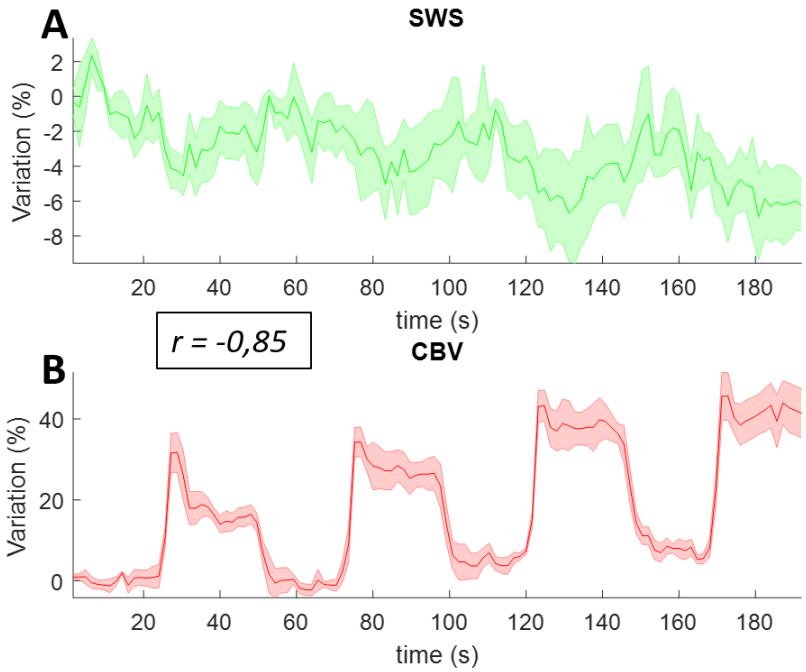


FIGURE 4.9 – Exemple d'un rat présentant un lien entre CBV et SWS aux temps courts : A) variations de CBV par rapport à la *baseline* dans le SC et B) variations de SWS par rapport à la *baseline* dans le SC.

Il est donné sur la figure 4.9 les profils temporels normalisés du CBV et de la SWS moyennés sur les douze acquisitions dans la zone activée pour un rat pour lequel une corrélation est visible. Le coefficient de corrélation de Pearson des deux signaux est de r = -0,85 : cette anticorrélation indiquerait, sur ce cas particulier, que la zone activée se ramollit lors de la stimulation. Par ailleurs, ces variations de la SWS observée ici sont très faibles, autour de 4 %, soit de l'ordre du kPa, de l'ordre de grandeur de la marge d'erreur de cette technique de mesure. Ce pourrait être la raison pour laquelle nous ne sommes pas parvenus, avec ces expériences, à trouver un effet global sur l'ensemble des rats, comme la figure 4.10 le montre.

En effet, si l'on prend en considération les profils temporels moyens des n =

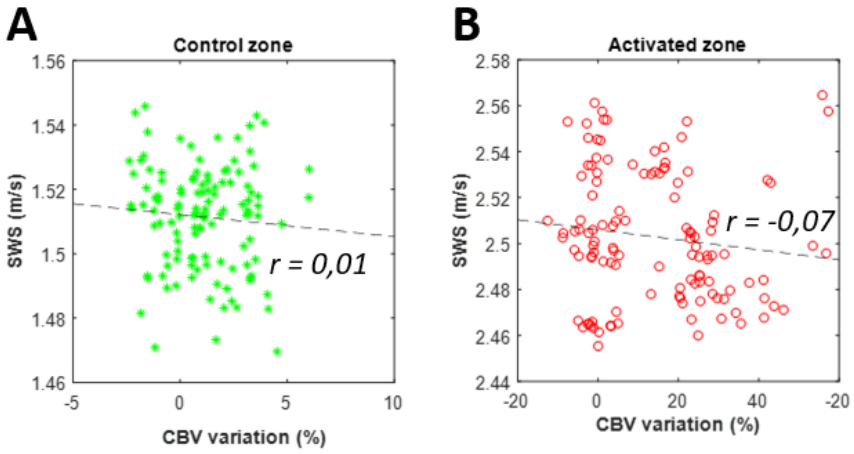


FIGURE 4.10 – Étude aux temps courts du lien entre le CBV et la SWS. La représentation des variations moyennes (pour le groupe de rats) de CBV en fonction des variations de SWS pendant une acquisition pour la zone contrôle (A) et la zone stimulée (B) ne met pas en évidence de corrélation entre ces grandeurs.

6 rats pour le CBV et la SWS (cf sous-image B de la figure 4.11), les coefficients de corrélation de Pearson sont de r = -0,07 et r = 0,01, respectivement pour la zone activée, le colliculus supérieur (SC), et la zone de contrôle.

4.3.3 Étude aux temps longs

4.3.3.1 Résultats

Les résultats obtenus montrent que l'activation cérébrale aurait tendance à ramollir localement les tissus sur une échelle de temps longue. En effet, comme il est possible de le voir sur la sous-image A de la figure 4.11 qui montre le profil temporel des variations de CBV et de SWS au cours d'une acquisition moyenné pour les n = 6 rats, la vitesse de l'onde de cisaillement (SWS) est à peu près constante au cours du temps dans la zone contrôle tandis qu'elle décroit significativement dans le colliculus supérieur(SC) : pendant les trois minutes d'acquisition, la zone stimulée du cerveau se ramollit de 6 % (p = 0,0018).

Afin de comparer la zone controle et le SC, nous avons étudié les variations en SWS au cours du temps dans ces deux zones pour les n = 6 rats et réalisé un test statistique de Welch : ces résultats sont donnés sur la figure 4.11, sous-image B (boîtes vertes et rouges). On peut observer un retour à la *baseline* pour les valeurs de SWS dans

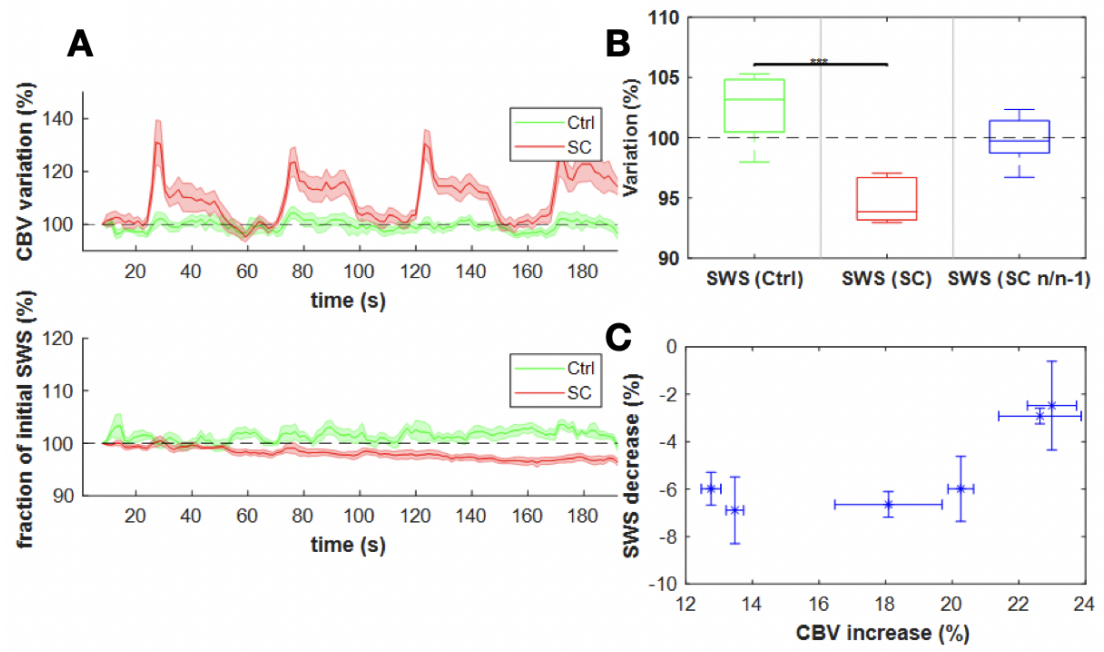


FIGURE 4.11 – Étude aux temps longs du lien entre le CBV et la SWS : A) Les variations moyennes du CBV et de la SWS pendant une acquisition montrent une variation du CBV selon le schéma de stimulation fonctionnelle et une diminution lente de la SWS uniquement dans la zone activée, B) La zone contrôle, en vert, et la zone stimulée, en rouge, montrent une différence pour leurs variations respectives en SWS pendant une acquisition. Les variations de SWS dans le SC entre deux acquistions successives, en bleu, met en évidence un retour à la *baseline* en SWS, et C) Représenter les variations de CBV en fonction des variations de SWS pour les 6 rats montre que plus la décroissance en SWS est importante, moins l'augmentation de CBV due à la stimulation l'est.

le SC. Afin de le quantifier, on a comparé les valeurs en SWS de début d'acquisition pour une acquisition et les valeurs en SWS de début d'acquisition pour l'acquisition suivante : après trois minutes d'acquisition et deux minutes de pause inter-acquisition, on constate l'absence de différence statistiquement significative (boîte bleue) via un test de Student montrant qu'on ne pouvait rejeter l'hypothèse nulle avec p = 0,99.

Enfin, la sous-image C de la figure 4.11 représente le pourcentage de la décroissance lente en SWS dans le SC au cours d'une acquisition en fonction du pourcentage d'augmentation moyen du CBV dans le SC due à la stimulation fonctionnelle pour les n = 6 rats et il semblerait qu'il y ait une anti-corrélation : plus la décroissance en SWS est importante et moins l'augmentation de CBV est grande. Le coefficient de corrélation de Pearson pour ces deux quantités est de r = 0,79 avec p = 0,063.

4.3.3.2 Discussion

La décroissance lente de la vitesse de l'onde de cisaillement dans la zone stimulée fonctionnellement n'est pas encore décrite dans la littérature. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées afin de comprendre les mécanismes de ce ramollissement localisé, lent et réversible.

Les mécanismes responsables de l'activité du cerveau sont extrêmement complexes et l'un d'entre eux, la vasodilatation, est particulièrement importante car elle permet l'augmentation de l'afflux sanguin. Parker a suggéré en 2017 [125] que les vaisseaux sanguins dilatés pourraient appliquer une pression sur les tissus alentours et, ainsi, par non-linéarité, on devrait constater un durcissement. Cela ne permet donc pas d'expliquer le phénomène décrit ici.

Toutefois, la vasodilatation reste intéressante car elle entraine d'autres conséquences physiologiques, comme la modification du tonus vasculaire. Dans le cerveau, les muscles lisses enveloppent les petits vaisseaux et jouent un rôle prépondérant dans le couplage neurovasculaire. En effet, l'activation fonctionnelle induit une augmentation des flux sanguins dans les zones stimulées. Pour aller dans ce sens, plusieurs mécanismes rentrent en jeu, dont les muscles lisses qui se relâchent pour permettre aux petits vaisseaux de se dilater puis se contractent à nouveau lorsque les flux sanguins retrouvent leur niveau basal. Ce phénomène a été illustré en 2020 par Chow *et al*[1] [35] et cela suggère que ce phénomène de contraction et de dilatation successives est quasiment instantané. La vasodilatation est alors, en partie, pilotée par le tonus des petits vaisseaux et il a été montré que cela entraine une diminution de la rigidité du cerveau (Schregel *et al* 2017 [145]).

La répétition des stimuli pourraient provoquer un phénomène de fatigue des muscles lisses enveloppant les petits vaisseaux : en répétant la stimulation fonctionnelle intense, les muscles lisses pourraient avoir une difficulté à se recontracter pour atteindre l'état basal dans l'attente du stimulus suivant et ainsi ils pourraient rester relâchés. Le retour à la *baseline* observé va également dans le sens de cette hypothèse.

Le gonflement en eau, ou *swelling*, des cellules associé à l'activation neuronale pourrait également expliquer la décroissance en rigidité observée. Iwasa *et al* ont montré en 1980 [82] que les potentiels d'action s'accompagnaient d'un gonflement en

1. https://hms.harvard.edu/news/right-place-right-time

eau des fibres nerveuse : la répétition des stimuli pourraient empêcher la vidange de ces cellules. Le gonflement des cellules en eau entraîne (Tsurugizawa *et al* 2013 [161]), par diffusion, une onde lente qui pourrait affecter la rigidité des tissus par synérèse : il s'agit de la diffusion d'un fluide dans un étroit réseau d'un milieu plus dense.

Le gonflement en eau des cellules pourrait non seulement expliquer la décroissance lente de la rigidité dans la zone du cerveau activée, mais aussi le résultat présenté sur la sous-image C de la figure 4.11 : plus l'augmentation en CBV due à l'activation est petite, plus le ramollissement du SC est grand. En effet, la stimulation fonctionnelle répétée pourrait avoir comme conséquence un gonflement ininterrompu en eau des cellules qui, comme leur taille a augmenté, pourraient induire une dilatation des tissus de la région stimulée qui exerceraient une contrainte sur les vaisseaux qu'ils entourent, limitant ainsi la vasodilatation et donc également l'augmentation en CBV due à l'activation fonctionnelle.

4.3.4 Expériences complémentaires et perspectives

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la décroissance lente de la rigidité d'une zone cérébrale stimulée, nous avons imaginé des expériences complémentaires. Cela permettrait de confirmer ou d'infirmer les hypothèses qui ont pu être avancées.

4.3.4.1 Étude du rôle des muscles lisses

Comme cela a été discuté précédemment, les muscles lisses, par leur rôle prépondérant dans la vasodilatation des petits vaisseaux, sont particulièrement intéressants dans le cadre de notre problématique. À notre sens, la baisse de tonus entrainée par les stimuli répétés est, à ce jour, l'hypothèse la plus sérieuse. C'est la raison pour laquelle il a été décidé de faire de nouvelles expériences pour étudier la vasodilatation et, plus spécifiquement, le rôle des muscles lisses.

Pour établir le rôle sous-jacent de la vasodilatation sur le ramollissement local observé dans le cerveau lors d'une stimulation fonctionnelle, nous avons choisi d'utiliser des molécules dont on sait qu'elles agissent sur ce phénomène : le nitroprusside de sodium comme vasodilatateur (Pérez-Vizcaíno *et al* 1999 [132]) et la noradrénaline comme vasoconstricteur (Gluud *et al* 2010 [61]). Lors des expériences préliminaires,

l'utilisation du nitroprusside de sodium a causé systématiquement la mort de l'animal donc le choix a été fait de le remplacer par de l'isoflurane qui, lui aussi, possède un effet vasodilatateur. Ainsi, si l'utilisation d'un vasodilatateur induit un ramollissement et l'utilisation d'un vasocontricteur induit un durcissement, on saura que la vasodilatation est, du moins en partie, responsable de la décroissente lente en rigidité avancée ici.

Par ailleurs, nous avons pu voir sur la sous-image B de la figure 4.11 la mise en évidence du retour à la *baseline* de la vitesse de l'onde de cisaillement (SWS) dans la zone stimulée mais nous n'avons pas d'information disponible sur la dynamique de ce phénomène : nous savons seulement à ce stade qu'il est effectif au bout des deux minutes de pause qu'il y a entre chaque acquisition. Les expériences complémentaires ont été conçues pour suivre plus précisément ce retour à la *baseline*.

Enfin, sur la sous-image C de la figure 4.11, il est montré qu'il semblerait que la décroissance en rigidité de la zone stimulée soit inversement proportionnelle à l'augmentation de CBV moyenne, dans cette même zone, suite à l'activation neuronale. Il serait intéressant de vérifier également que l'élasticité des tissus ne varie pas si le CBV est constant (point de coordonnées $(0,0)$ sur la sous-image C de la figure 4.11).

4.3.4.2 *Design* des expériences complémentaires

Le *design* des expériences complémentaires est illustré sur un schéma sur la figure 4.12. Il a été décidé notamment d'allonger le schéma de stimulation par rapport à celui utilisé précédemment et présenté sur la figure 4.8 : il y a un bloc de stimulation supplémentaire, cela permettrait de voir si la décroissance en rigidité dans la zone activée suite à la stimulation continue de décroître après trois minutes ou s'il y a un plateau.

Ces expériences comprennent, pour chaque rat, trois blocs : un bloc sous anesthésie usuelle, ketamine/medetomidine, un où est rajouté l'isoflurane et le troisième où l'isoflurane est arrêté et où est injectée de la noradrénaline.

Chacun de ces trois blocs est divisé en cinq sous-blocs qui sont des acquisitions de huit minutes, espacées l'une par rapport à l'autre d'une minute. La première acquisition est la *baseline* en ketamine, qui nous permet d'accéder au point $(0,0)$ du graphique C de la figure 4.11. Pour les deux autres blocs, cela permet d'obtenir,

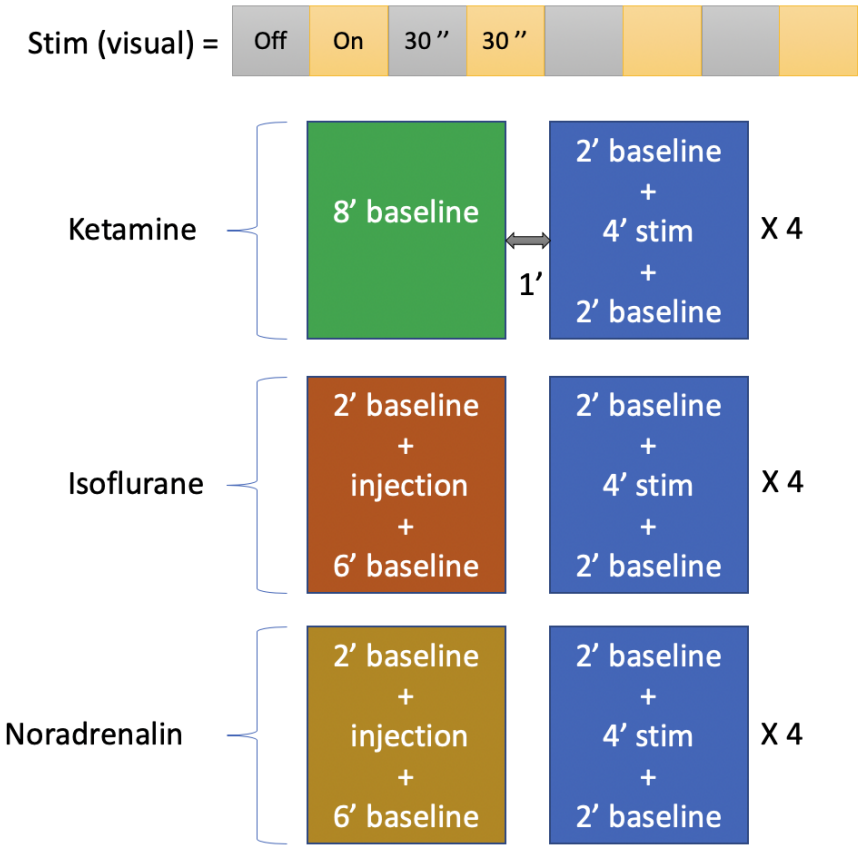


FIGURE 4.12 – *Design* des expériences complémentaires.

s'il y a un effet observé sur la rigidité, d'en avoir la cinétique. Après cette première acquisition, pour chacun des trois blocs, il y a quatre fois la même acquisition qui consiste en deux minutes sans stimulation, quatre minutes avec stimulation suivant le schéma montré sur la figure 4.12, puis encore deux minutes sans stimulation. Ces périodes sans stimulation pourrait permettre d'obtenir la dynamique du retour à la *baseline* de la rigidité de la zone stimulée lorsqu'on arrête la stimulation.

Toutes les expériences ont été conduites sur n = 4 rats et un suivi de pression artérielle a été effectué durant l'ensemble des manipulations. À part les paramètres présentés ici, le reste, notamment les conditions d'imagerie, est analogue aux expériences conduites et présentées précédemment.

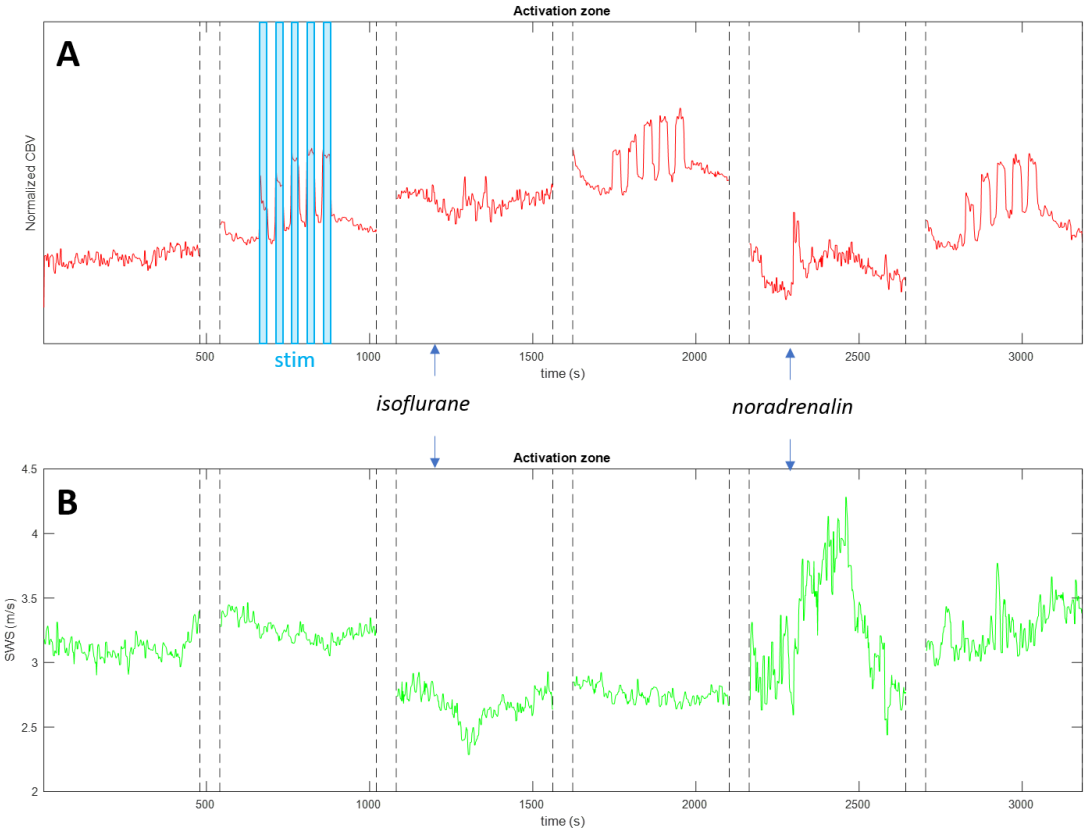


FIGURE 4.13 – Résultats préliminaires dans la zone activée (n = 4 rats) : A) CBV moyen normalisé au cours du temps et B) SWS moyenne au cours du temps.

4.3.4.3 Résultats préliminaires

Les premiers résultats de ces expériences sont donnés sur la figure 4.13 où sont représentés les profils temporels moyens pour les n = 4 rats des acquisitions adjointes avec les pauses de 1 minute, dans la zone stimulée du colliculus supérieur (SC), du CBV moyen et de la SWS moyenne.

La rigidité moyenne, en isoflurane (vasodilatateur), est inférieure à celle en kétamine. Celle en noradrénaline (vasoconstricteur) est supérieure à celle de la kétamine et celle de l'isoflurane. Par ailleurs, le coefficient de corrélation de Pearson des courbes A et B de la figure 4.13 vaut r = -0,41. Ces résultats préliminaires vont donc dans le sens des résultats des premières expériences : la vasodilatation serait synonyme de ramollissement local. Il reste cependant à comprendre certains aspects de ces résultats, notamment le saut en valeurs que l'on peut observer au début de chacun des blocs décrits sur la figure 4.12.

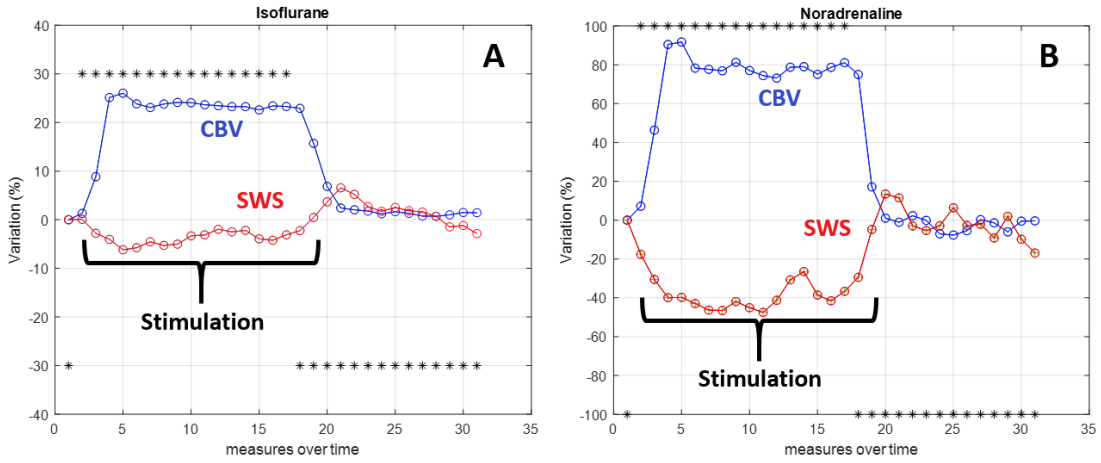


FIGURE 4.14 – Résultats préliminaires dans la zone activée pour 1 rat dont les acquisitions et les 4 périodes de stimulation/repos de 30 s/30 s ont été moyennées. Profil temporel de la variation en SWS par rapport à la *baseline* (rouge) et profil temporel de la variation de CBV par rapport à la *baseline* (bleu) pour le bloc d'acquisitions en isoflurane (A) et celui en noradrénaline (B).

Par ailleurs, il a été possible, durant ces expériences complémentaires, d'observer pour un rat un lien entre le CBV et la SWS dans la zone activée aux temps courts, comme le montre la figure 4.14. Pour le rat considéré, il a été observé une baisse moyenne légèrement inférieure à 10 % de la rigidité du colliculus supérieur pendant la stimulation fonctionnelle dans le bloc d'acquisitions en isoflurane et une baisse moyenne de 40 % pour le bloc en noradrénaline. Le ramollissement observé dans ce cas particulier est clair et nous conforte dans l'idée que les variations éventuelles de SWS induites par une variation de CBV suite à une stimulation fonctionnelle peuvent être observées via notre technique.

4.3.5 Conclusion

Cette étude montre qu'il est possible de faire simultanément du fUS et de la SWE avec la même séquence ultrasonore permettant d'accéder à des films Doppler de qualité et des mesures d'élasticité stables et précises. Cela nous a permis d'étudier *in vivo* le lien entre le CBV et la rigidité dans le cerveau du rat et de mettre en évidence une décroissance lente et réversible de la rigidité tissulaire dans la zone activée suite à des stimuli fonctionnels visuels répétés.

Il est possible que le CBV et la SWS soient liés aux temps courts, et les variations

induites en rigidité lors d'une stimulation fonctionnelle pourraient être de l'ordre du kPa (12 kPa de rigidité moyenne dans le cerveau du rat Macé *et al* 2010 [12]), soit très proches du niveau de bruit.

L'hypothèse privilégiée à ce stade est la perte de tonus des muscles lisses enveloppant les petits vaisseaux suite à la stimulation répétée et les résultats préliminaires des expériences complémentaires semblent le confirmer.

La deuxième, celle du gonflement en eau des cellules, ou *swelling*, devrait être aussi testée en procédant, par exemple, l'injection de furosemide tout en gardant le protocole présenté dans la partie 4.2.1 ou à l'injection d'une solution hypotonique, liquide céphalo-rachidien artificiel, afin de saturer les cellules de la zone stimulée. Ainsi, les mouvements d'eau sont annihilés de même que le gonflement et la vidange des cellules : les hypothèses du *swelling* et de la synérèse pourraient donc être vérifiées.

Conclusion générale

L'objectif initial de cette thèse était de mettre en place les approches et les outils pour permettre d'étudier les interactions sociales chez la souris d'un point de vue fonctionnel dans le cerveau à l'aide de l'imagerie ultrarapide par ultrasons. Cette méthode d'imagerie, bien qu'assez récente, a connu un essor particulier depuis une vingtaine d'années, notamment grâce aux travaux du laboratoire de Mickael Tanter. Le travail, qui a été présenté ici, s'inscrit dans cette continuité avec, toujours en ligne de mire, une meilleure compréhension du corps humain.

Dans un premier temps, les recherches ont été conduites sur le développement de méthodes pour faire de l'imagerie foncionnelle ultrasonore (fUS) chez le petit animal éveillé. En effet, l'étude des interactions sociales demande la plupart du temps que les sujets impliqués dans ces interactions soient éveillés et libres de leurs mouvements. Le premier défi à relever était expérimental : il fallait trouver le dispositif expérimental optimal en termes de qualité d'imagerie en fUS tout en garantissant la plus grande liberté de mouvements et en maintenant le niveau de stress de l'animal étudié le plus bas possible. C'est dans cette optique que les dispositifs du Mobile Home Cage et du *hybrid freely-moving* ont été utilisés et leur utilisation optimisée, en développant notammant un protocole d'habituation pour minimiser le stress induit aux animaux. L'ensemble de ces travaux nous a permis d'avoir à notre disposition des données de fUS éveillé de qualité, bien que les signaux mesurés montrent une influence certaine des mouvements de l'animal. Cet effet des artefacts de mouvements sur les données constitue le deuxième défi du fUS chez le petit animal éveillé. Afin de s'en affranchir, plusieurs pistes ont été suivies : de l'adaptation de méthodologies appliquées pour d'autres modalités de neuroimagerie fonctionnelle, comme l'analyse en composantes indépendantes en IRMf, à l'utilisation d'approches propres aux ultrasons, en travaillant sur les données brutes. Plusieurs méthodes ont été proposées pour la réjection d'artefacts du mouvement des données en fUS et ces travaux ont

permis d'identifier deux d'entre elles qui sont, actuellement, les plus robustes : le *censoring*, ou suppression d'images, qui permet de faire des analyses en *resting-state*, et le filtre à SVD dynamique avec régression de nuisance qui permet de faire des études fonctionnelles sur une grande partie de l'ensemble des données disponibles.

Le développement de la méthodologie, à la fois expérimentale et numérique, pour faire du fUS éveillé chez le petit animal a permis, dans un second temps, d'apporter une composante fonctionnelle sur deux études en neurobiologie et en comportement : la caractérisation du modèle SHANK3 d'autisme chez la souris en collaboration avec l'équipe de Thomas Bourgeron de l'institut Pasteur, et l'étude de la nouveauté sociale et la nouveauté environnementale avec l'équipe de Rebecca Piskorowski et Cécile Viollet de l'institut de psychiatrie et de neurosciences de Paris. Si dans le cadre de ces deux projets, les expériences sont encore en cours, les résultats préliminaires obtenus restent très encourageants : il semblerait notamment qu'il y ait bien des différences en termes de connectivité fonctionnelle entre la souris mutée SHANK3 et la souris *wild-type* en *resting-state* avec une baisse de connectivité inter-hémisphérique de l'hippocampe, déjà documentée sur ce modèle d'autisme. Par ailleurs, il a été établi des manières de faire le lien entre des signaux comportementaux et le fonctionnement du cerveau qui pourront aider à mieux comprendre la façon dont les souris interagissent avec des congénères ou avec leur environnement. Cela permet de valider les méthodes développées dans cette thèse ainsi que les protocoles expérimentaux conçus afin de répondre aux questions scientifiques initiales.

Dans une dernière partie, nous sommes revenus à un des phénomènes de base de l'imagerie fonctionnelle du cerveau : le couplage neurovasculaire. Ce phénomène permet de rendre compte indirectement de l'activité du cerveau en mesurant les flux sanguins mais il présente des limitations, dont sa lenteur qui empêche d'avoir accès aux phénomènes transitoires rapides. La richesse des ultrasons nous a permis ici de concevoir pour la première fois une séquence permettant de faire de l'élastographie et du fonctionnel en simultané afin d'étudier les changements de la rigidité des tissus et des variations de flux sanguins. Si nous avons pu observer chez des animaux isolés un couplage neuromécanique sans parvenir à conclure sur un groupe d'animaux plus large, nous avons pu identifier un phénomène nouveau, avec le ramollissement lent et réversible de la zone stimulée fonctionnellement du cerveau de l'ordre de 6 % dont la cause la plus probable est la perte de tonus des muscles lisses mais dont nous cherchons encore l'origine. Ce ramollissement, au delà de la connaissance fondamentale

autour du couplage neuromécanique, pourrait être un nouveau marqueur de l'activité cérébrale et possiblement éclairer les dysfonctionnements et altérations du couplage neurovasculaire associés à certaines pathologies cérébrales.

Cette thèse a permis à la fois d'avancer les ultrasons fonctionnels vers des approches sophistiquées adaptées à son utilisation en mouvement et au comportement sur des modèles de souris y compris pour des mesures de la connectivité fonctionnelle pendant les interactions sociales mais aussi de s'intéresser de manière plus fondamentale au fondement de l'imagerie fonctionnelle IRMf et fUS à travers le couplage neurovasculaire et l'étude d'un nouveau couplage neuromécanique encore mal compris.

Bibliographie

[1] P. ABLIN, J.F. CARDOSO et A. GRAMFORT. « Faster independent component analysis by preconditioning with Hessian approximations ». In : *IEEE Transactions on Signal Processing* (2018).

[2] A. ABOU-ELSEOUD et al. « The effect of model order selection in group PICA ». In : *Hum Brain Mapp* (2010).

[3] B.S. ABRAHAMS et al. « SFARI Gene 2.0 : a community-driven knowledgebase for the autism spectrum disorders (ASDs) ». In : *Molecular Autism* (2013).

[4] Garrett E ALEXANDER, Mahlon R DELONG et Peter L STRICK. « Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex ». In : *Annual review of neuroscience* 9.1 (1986), p. 357-381.

[5] A. ANDERSON et al. « Non-negative Matrix Factorization of Multimodal MRI, fMRI and Phenotypic Data reveals Differential Changes in Default Mode Subnetworks in ADHD ». In : *Neuroimage* (2013).

[6] Jóhanna ÁRNADÓTTIR et Martin CHALFIE. « Eukaryotic mechanosensitive channels ». In : *Annual review of biophysics* 39 (2010), p. 111-137.

[7] Gustavo ARRIAGA et Erich D JARVIS. « Mouse vocal communication system : are ultrasounds learned or innate? » In : *Brain and language* 124.1 (2013), p. 96-116.

[8] *ARRIVE guidelines*. NC3Rs. 21 mar. 2021. URL : https://arriveguidelines.org/.

[9] Owen J ARTHURS et Simon BONIFACE. « How well do we understand the neural origins of the fMRI BOLD signal? » In : *TRENDS in Neurosciences* 25.1 (2002), p. 27-31.

[10] J. BARANGER et al. « Adaptive Spatiotemporal SVD Clutter Filtering for Ultrafast Doppler Imaging Using Similarity of Spatial Singular Vectors ». In : *IEEE Trans Med Imaging* (2018).

[11] J. BARANGER et al. « Bedside functional monitoring of the dynamic brain connectivity in human neonates ». In : *Nature Communications* (2021).

[12] Paresh Chandra BARMAN, Nadeem IQBAL et Soo-Young LEE. « Non-negative matrix factorization based text mining : feature extraction and classification ». In : *International Conference on Neural Information Processing*. Springer. 2006, p. 703-712.

[13] Oliver BARNSTEDT et al. « Functional microarchitecture of the mouse dorsal inferior colliculus revealed through in vivo two-photon calcium imaging ». In : *Journal of Neuroscience* 35.31 (2015), p. 10927-10939.

[14] Pablo BARTTFELD et al. « Signature of consciousness in the dynamics of resting-state brain activity ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.3 (2015), p. 887-892.

[15] Francine M BENES. « Evidence for altered trisynaptic circuitry in schizophrenic hippocampus ». In : *Biological psychiatry* 46.5 (1999), p. 589-599.

[16] J. BERCOFF, M. TANTER et M. FINK. « Supersonic shear imaging : a new technique for soft tissue elasticity mapping ». In : *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* (2004).

[17] J. BERCOFF et al. « In vivo breast tumor detection using transient elastography ». In : *Ultrasound Med Biol* (2003).

[18] J. BERCOFF et al. « Ultrafast compound Doppler imaging : providing full blood flow characterization ». In : *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* (2011).

[19] Jeremy BERCOFF. « Ultrafast ultrasound imaging ». In : *Ultrasound imaging-Medical applications* (2011), p. 3-24.

[20] Jeremy BERCOFF et al. « Ultrafast imaging of beamformed shear waves induced by the acoustic radiation force. Application to transient elastography ». In : *Proceedings of the 2002 IEEE ultrasonics symposium*. T. 2. 2002, p. 1899-1902.

[21] Daniela BERG et al. « Five-year follow-up study of hyperechogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease ». In : *Movement disorders* 20.3 (2005), p. 383-385.

[22] A. BERTOLO et al. « Whole-Brain 3D Activation and Functional Connectivity Mapping in Mice using Transcranial Functional Ultrasound Imaging ». In : *Journal of Visualized Experiments* (2021).

[23] C. BIMBARD et al. « Multi-scale mapping along the auditory hierarchy using high-resolution functional UltraSound in the awake ferret ». In : *eLife* (2018).

[24] B. BISWAL et al. « Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI ». In : *Magn Reson Med* (1995).

[25] Peter A BRENNAN et Keith M KENDRICK. « Mammalian social odours : attraction and individual recognition ». In : *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences* 361.1476 (2006), p. 2061-2078.

[26] Audrey C BRUMBACK et al. « Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior ». In : *Molecular psychiatry* 23.10 (2018), p. 2078-2089.

[27] César CABALLERO-GAUDES et Richard C REYNOLDS. « Methods for cleaning the BOLD fMRI signal ». In : *Neuroimage* 154 (2017), p. 128-149.

[28] V. CALHOUN, J. LIU et T. ADALI. « A review of group ICA for fMRI data and ICA for joint inference of imaging, genetic, and ERP data ». In : *Neuroimage* (2008).

[29] Ian CHAREST, Nikolaus KRIEGESKORTE et Kendrick N KAY. « GLMdenoise improves multivariate pattern analysis of fMRI data ». In : *NeuroImage* 183 (2018), p. 606-616.

[30] D CHAUVET et al. « In vivo measurement of brain tumor elasticity using intraoperative shear wave elastography ». In : *Ultraschall in der Medizin-European Journal of Ultrasound* 37.06 (2016), p. 584-590.

[31] Bo-Ming CHEN et Alan D GRINNELL. « Integrins and modulation of transmitter release from motor nerve terminals by stretch ». In : *Science* 269.5230 (1995), p. 1578-1580.

[32] Qian CHEN et al. « Dysfunction of cortical GABAergic neurons leads to sensory hyper-reactivity in a Shank3 mouse model of ASD ». In : *Nature neuroscience* 23.4 (2020), p. 520-532.

[33] Shuo CHEN et al. « A hypothalamic novelty signal modulates hippocampal memory ». In : *Nature* 586.7828 (2020), p. 270-274.

[34] Coralie CHEVALLIER et al. « The social motivation theory of autism ». In : *Trends in cognitive sciences* 16.4 (2012), p. 231-239.

[35] Brian W CHOW et al. « Caveolae in CNS arterioles mediate neurovascular coupling ». In : *Nature* 579.7797 (2020), p. 106-110.

[36] Richard S. C. COBBOLD. *Foundations of biomedical ultrasound*. OUP USA, 2006.

[37] D. CORDES et R.R. NANDY. « Estimation of the intrinsic dimensionality of fmri data ». In : *Neuroimage* (2006).

[38] Nicolle CORREA, T. ADAL et V.D. CALHOUN. « Performance of blind source separation algorithms for fMRI analysis using a group ICA method ». In : *Magnetic Resonance Imaging* (2007).

[39] J.S. DAMOISEAUX et al. « Consistent resting-state networks across healthy subjects ». In : *PNAS* (2006).

[40] C. DAMON et al. « Non-negative matrix factorization for single-channel EEG artifact rejection ». In : *2013 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing* (2013).

[41] T. DEFFIEUX et al. « Functional ultrasound neuroimaging : a review of the preclinical and clinical state of the art ». In : *Current opinion in neurobiology* (2018).

[42] Thomas DEFFIEUX et al. « On the effects of reflected waves in transient shear wave elastography ». In : *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control* 58.10 (2011), p. 2032-2035.

[43] C. DEMENÉ et al. « Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast ultrasound data highly increases Doppler and fUltrasound sensitivity ». In : *IEEE transactions on medical imaging* (2015).

[44] Charlie DEMENÉ et al. « Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients ». In : *Nature Biomedical Engineering* 5.3 (2021), p. 219-228.

[45] George H DENFIELD et al. « Investigating the limits of neurovascular coupling ». In : *Neuron* 91.5 (2016), p. 954-956.

[46] A. DIZEUX et al. « Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates ». In : *Nature Communications* (2019).

[47] Brian L EDLOW et al. « Early detection of consciousness in patients with acute severe traumatic brain injury ». In : *Brain* 140.9 (2017), p. 2399-2414.

[48] Jacob ELLEGOOD et Jacqueline N CRAWLEY. « Behavioral and neuroanatomical phenotypes in mouse models of autism ». In : *Neurotherapeutics* 12.3 (2015), p. 521-533.

[49] C. ERRICO et al. « Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging ». In : *Nature* (2015).

[50] Andreas FEHLNER et al. « The viscoelastic response of the human brain to functional activation detected by magnetic resonance elastography ». In : *Proc ISMRM*. 2014, p. 871.

[51] Marco FERRARI et Valentina QUARESIMA. « A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application ». In : *Neuroimage* (2012).

[52] J. FERRIER et al. « Functional imaging evidence for task-induced deactivation and disconnection of a major default mode network hub in the mouse brain ». In : *PNAS* (2020).

[53] Chantelle FOURIE et al. « Dietary zinc supplementation prevents autism related behaviors and striatal synaptic dysfunction in Shank3 exon 13–16 mutant mice ». In : *Frontiers in cellular neuroscience* 12 (2018), p. 374.

[54] M.D. FOX et al. « The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks ». In : *PNAS* (2005).

[55] Karyn M FRICK et al. « Sex steroid hormones matter for learning and memory : estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents ». In : *Learning & Memory* 22.9 (2015), p. 472-493.

[56] Karl J FRISTON. « Modalities, modes, and models in functional neuroimaging ». In : *Science* 326.5951 (2009), p. 399-403.

[57] Sunil P GANDHI, David J HEEGER et Geoffrey M BOYNTON. « Spatial attention affects brain activity in human primary visual cortex ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96.6 (1999), p. 3314-3319.

[58] M. GESNIK, K. BLAIZE et M. TANTER. « 3D functional ultrasound imaging of the cerebral visual system in rodents ». In : *Neuroimage* (2017).

[59] Marc GESNIK et al. « 3D functional ultrasound imaging of the cerebral visual system in rodents ». In : *NeuroImage* 149 (2017), p. 267-274.

[60] Helene GIROUARD et Costantino IADECOLA. « Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease ». In : *Journal of applied physiology* 100.1 (2006), p. 328-335.

[61] Lise L GLUUD et al. « Systematic review of randomized trials on vasoconstrictor drugs for hepatorenal syndrome ». In : *Hepatology* 51.2 (2010), p. 576-584.

[62] M. GREICIUS. « Resting-state functional connectivity in neuropsychiatric disorders ». In : *Curr Opin Neurol* (2008).

[63] M.D. GREICIUS et al. « Functional connectivity in the resting brain : A network analysis of the default mode hypothesis ». In : *PNAS* (2003).

[64] Christine GRIENBERGER et Arthur KONNERTH. « Imaging Calcium in Neurons ». In : *Neuron* (2012).

[65] L. GRIFFANTI et al. « Hand classification of fMRI ICA noise components ». In : *Neuroimage* (2017).

[66] L. GRIFFANTI et al. « ICA-based artefact and accelerated fMRI acquisition for improved Resting State Network imaging ». In : *Neuroimage* (2015).

[67] A HATT et al. « MR elastography can be used to measure brain stiffness changes as a result of altered cranial venous drainage during jugular compression ». In : *American Journal of Neuroradiology* 36.10 (2015), p. 1971-1977.

[68] J. HÉRAULT et B. ANS. « Neuronal network with modifiable synapses : decoding of composite sensory messages under unsupervised and permanent learning ». In : *C.R. Acad. Sc. Paris* (1984).

[69] Stefan HETZER et al. « Hypercapnia increases brain viscoelasticity ». In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 39.12 (2019), p. 2445-2455.

[70] Stefan HETZER et al. « Perfusion alters stiffness of deep gray matter ». In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 38.1 (2018), p. 116-125.

[71] J. HIMBERG et A. HYVÄRINEN. « Icasso : software for investigating the reliability of ica estimates by clustering and visualization ». In : *IEEE XIII Workshop on Neural Networks for Signal Processing* (2003).

[72] Frederick L HITTI et Steven A SIEGELBAUM. « The hippocampal CA2 region is essential for social memory ». In : *Nature* 508.7494 (2014), p. 88-92.

[73] O HOLUB et al. « Finger Tapping Experiment Observed by Brain Magnetic Resonance Elastography ». In : ISMRM 23rd Annual Meeting. 2015.

[74] A.G. HUDETZ. « General anesthesia and human brain connectivity ». In : *Brain connect* (2012).

[75] PD HURLEY et al. « Learning the fundamental mid-infrared spectral components of galaxies with non-negative matrix factorization ». In : *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 437.1 (2014), p. 241-261.

[76] A. HYVÄRINEN. « Fast and robust fixed-point algorithms for independent component analysis ». In : *IEEE Transactions on Neural networks* (1999).

[77] A. HYVÄRINEN. « Independent Component Analysis : recent advances ». In : *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* (2013).

[78] A. HYVÄRINEN, J. KARHUNEN et E. OJA. *Independent Component Analysis*. Wiley–Blackwell, 2001.

[79] A. HYVÄRINEN et E. OJA. « Independent Component Analysis : Algorithms and Applications ». In : *Neural Networks* (2000).

[80] Costantino IADECOLA. « The Neurovascular Unit Coming of Age : A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease ». In : *Neuron* (2017).

[81] Marion IMBAULT et al. « Intraoperative functional ultrasound imaging of human brain activity ». In : *Scientific reports* 7.1 (2017), p. 1-7.

[82] Kunihiko IWASA, Ichiji TASAKI et Robert C GIBBONS. « Swelling of nerve fibers associated with action potentials ». In : *Science* 210.4467 (1980), p. 338-339.

[83] J.FRAHM et al. « Dynamic MR imaging of human brain oxygenation during rest and photic stimulation ». In : *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (1992).

[84] I.T. JOLLIFFE. *Principal Component Analysis*. Springer, 2002.

[85] U. KAIROV et al. « Determining the optimal number of independent components for reproducible transcriptomic data analysis ». In : *BMC Genomics* (2017).

[86] C. KASAI et al. « Real-time two-dimensional blood flow imaging using an autocorrelation technique ». In : *IEEE Trans Sonics Ultrason* (1985).

[87] Misha E. KILMERA et al. « Imaging the Body with Diffuse Optical Tomography ». In : *IEEE Signal Processing Magazine* (2001).

[88] J.A. KING et al. « Procedure for minimizing stress for fMRI studies in conscious rats ». In : *Journal of Neuroscience Method* (2005).

[89] Laura Grofer KLINGER et al. « Autism spectrum disorder. » In : (2014).

[90] Anja G. van der KOLK et al. « Clinical applications of 7 T MRI in the brain ». In : *European journal of radiology* (2013).

[91] John C KUCEWICZ et al. « Functional tissue pulsatility imaging of the brain during visual stimulation ». In : *Ultrasound in medicine & biology* 33.5 (2007), p. 681-690.

[92] K.M. LAHTI et al. « Comparison of evoked cortical activity in conscious and propofol-anesthetized rats using functional MRI ». In : *Magnetic Resonance in Medicine* (1999).

[93] Patricia S LAN et al. « Imaging brain function with simultaneous BOLD and viscoelasticity contrast : fMRI/fMRE ». In : *NeuroImage* 211 (2020), p. 116592.

[94] Marieke LANGEN et al. « The neurobiology of repetitive behavior :... and men ». In : *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35.3 (2011), p. 356-365.

[95] C.S. LEBLOND et al. « Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders : a gradient of severity in cognitive impairments ». In : *PLoS Genet* (2014).

[96] D.D. LEE et H.S. SEUNG. « Algorithms for Non-negative Matrix Factorization ». In : *Advances in Neural Information Processing Systems* (2001).

[97] D.D. LEE et H.S. SEUNG. « Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization ». In : *Nature* (1999).

[98] Baowang LI et Ralph D FREEMAN. « High-resolution neurometabolic coupling in the lateral geniculate nucleus ». In : *Journal of Neuroscience* 27.38 (2007), p. 10223-10229.

[99] Nikos K. LOGOTHETIS. « What we can do and what we cannot do with fMRI ». In : *Nature* (2008).

[100] Cátia F LOURENÇO et al. « Neurovascular-neuroenergetic coupling axis in the brain : master regulation by nitric oxide and consequences in aging and neurodegeneration ». In : *Free Radical Biology and Medicine* 108 (2017), p. 668-682.

[101] M.J. LOWE, B.J. MOCK et J.A. SORENSON. « Functional connectivity in single and multislice echoplanar imaging using resting-state fluctuations ». In : *Neuroimage* (1998).

[102] H. LU et al. « Rat brains also have a default mode network ». In : *PNAS* (2012).

[103] E. MACE et al. « Functional ultrasound imaging of the brain ». In : *Nature Methods* (2011).

[104] E. MACE et al. « Functional ultrasound imaging of the brain : theory and basic principles ». In : *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* (2013).

[105] Emilie MACÉ et al. « In vivo mapping of brain elasticity in small animals using shear wave imaging ». In : *IEEE transactions on medical imaging* 30.3 (2010), p. 550-558.

[106] D. MANTINI et al. « Default mode of brain function in monkeys ». In : *J. Neurosci* (2011).

[107] Stephen MAREN. « The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory ». In : (2003).

[108] Yogesh K MARIAPPAN, Kevin J GLASER et Richard L EHMAN. « Magnetic resonance elastography : a review ». In : *Clinical anatomy* 23.5 (2010), p. 497-511.

[109] Claus MATHIESEN et al. « Modification of activity-dependent increases of cerebral blood flow by excitatory synaptic activity and spikes in rat cerebellar cortex ». In : *The Journal of physiology* 512.2 (1998), p. 555-566.

[110] Alexander MATHIS et al. « DeepLabCut : markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning ». In : *Nature neuroscience* 21.9 (2018), p. 1281-1289.

[111] M.J. MCKEOWN, L.K. HANSEN et T.J. SEJNOWSK. « Independent component analysis of functional MRI : what is signal and what is noise ? » In : *Current Opinion in Neurobiology* (2003).

[112] *Mobile Home Cage*. Neurotar. 22 mar. 2021. URL : https://www.neurotar.com/the-mobile-homecage/.

[113] G. MONTALDO et al. « Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography ». In : *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* (2009).

[114] P. MONTEIRO et G. FENG. « SHANK proteins : roles at the synapse and in autism spectrum disorder ». In : *Nat Rev Neurosci* (2017).

[115] M.M. MONTI. « Statistical analysis of fMRI time-series : a critical review of the GLM approach ». In : *Front. Hum. Neurosci.* (2011).

[116] Matthew C MURPHY et al. « Decreased brain stiffness in Alzheimer's disease determined by magnetic resonance elastography ». In : *Journal of magnetic resonance imaging* 34.3 (2011), p. 494-498.

[117] Neetu NAIR et al. « Effects of stress on functional connectivity during problem solving ». In : *NeuroImage* 208 (2020), p. 116407.

[118] F.A. NASRALLAH, H-C. TAY et K.H. CHUANG. « Detection of functional connectivity in the resting mouse brain ». In : *Neuroimage* (2014).

[119] Kaoutsar NASRALLAH et al. « Routing hippocampal information flow through parvalbumin interneuron plasticity in area CA2 ». In : *Cell reports* 27.1 (2019), p. 86-98.

[120] Sumner L NORMAN et al. « Single-trial decoding of movement intentions using functional ultrasound neuroimaging ». In : *Neuron* (2021).

[121] M NOUHOUM et al. « Fully-automatic ultrasound-based neuro-navigation : The functional ultrasound brain GPS ». In : (2021).

[122] Philip O'HERRON et al. « Neural correlates of single-vessel haemodynamic responses in vivo ». In : *Nature* 534.7607 (2016), p. 378-382.

[123] B.F. OSMANSKI et al. « Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution ». In : *Nature Communications* (2014).

[124] B.F. OSMANSKI et al. « Transthoracic ultrafast Doppler imaging of human left ventricular hemodynamic function ». In : *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* (2014).

[125] KJ PARKER. « Are rapid changes in brain elasticity possible ? » In : *Physics in Medicine & Biology* 62.18 (2017), p. 7425.

[126] S PATZ et al. « Observation of functional magnetic resonance elastography (fMRE) in mouse brain ». In : *Proceedings of the 23rd Annual Meeting ISMRM*. 2015.

[127] Samuel PATZ et al. « Imaging localized neuronal activity at fast time scales through biomechanics ». In : *Science advances* 5.4 (2019), eaav3816.

[128] Samuel PATZ et al. « Mapping neural circuitry at high speed (10hz) using functional magnetic resonance elastography (fmre) ». In : *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 2018.

[129] George PAXINOS et Keith BJ FRANKLIN. *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic press, 2019.

[130] João PEÇA et al. « Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction ». In : *Nature* 472.7344 (2011), p. 437-442.

[131] R.R. PEETERS et al. « Comparing BOLD fMRI signal changes in the awake and anesthetized rat during electrical forepaw stimulation ». In : *Magn Reson Imaging* (2001).

[132] Francisco PÉREZ-VIZCAINO et al. « Vasodilator effects of sodium nitroprusside, levcromakalim and their combination in isolated rat aorta ». In : *British journal of pharmacology* 128.7 (1999), p. 1419-1426.

[133] Michael E. PHELPS. « Positron computed tomography studies of cerebral glucose metabolism in man : Theory and application in nuclear medicine ». In : *Seminars in Nuclear Medicine* (1981).

[134] Rebecca A PISKOROWSKI et al. « Age-dependent specific changes in area CA2 of the hippocampus and social memory deficit in a mouse model of the 22q11. 2 deletion syndrome ». In : *Neuron* 89.1 (2016), p. 163-176.

[135] C. RABUT et al. « 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents ». In : *Nature Methods* (2019).

[136] C. RABUT et al. « Pharmaco-fUS : Quantification of pharmacologically-induced dynamic changes in brain perfusion and connectivity by functional ultrasound imaging in awake mice ». In : *Neuroimage* (2020).

[137] L. RAHAL et al. « Ultrafast ultrasound imaging pattern analysis reveals distinctive dynamic brain states and potent sub-network alterations in arthritic animals ». In : *Scientific reports* (2020).

[138] Richard H ROTH et al. « Cortical synaptic AMPA receptor plasticity during motor learning ». In : *Neuron* 105.5 (2020), p. 895-908.

[139] J.M. RUBIN et al. « Power Doppler US : a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US ». In : *Radiology* (1994).

[140] Mustafa S SALMAN et al. « Group ICA for identifying biomarkers in schizophrenia :'Adaptive'networks via spatially constrained ICA show more sensitivity to group differences than spatio-temporal regression ». In : *NeuroImage : Clinical* 22 (2019), p. 101747.

[141] Laurent SANDRIN et al. « Shear modulus imaging with 2-D transient elastography ». In : *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control* 49.4 (2002), p. 426-435.

[142] Armen P SARVAZYAN et al. « Shear wave elasticity imaging : a new ultrasonic technology of medical diagnostics ». In : *Ultrasound in medicine & biology* 24.9 (1998), p. 1419-1435.

[143] N. SCHNEIDERMAN, G. IRONSON et S.D. SIEGEL. « Stress and health : Psychological, Behavioral, and Biological Determinants ». In : *Annu Rev Clin Psychol.* (2005).

[144] Katharina SCHREGEL et al. « Reduced vessel tone leads to vasodilation and decreased cerebral rigidity ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 141.5 (2017), p. 3617-3617.

[145] Katharina SCHREGEL et al. « Reduced vessel tone leads to vasodilation and decreased cerebral rigidity ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 141.5 (2017), p. 3617-3617.

[146] Sylvie SERRET et al. « Lithium as a rescue therapy for regression and catatonia features in two SHANK3 patients with autism spectrum disorder ». In : *BMC psychiatry* 15.1 (2015), p. 1-6.

[147] Sameer A SHETH et al. « Linear and nonlinear relationships between neuronal activity, oxygen metabolism, and hemodynamic responses ». In : *Neuron* 42.2 (2004), p. 347-355.

[148] Joshua S SIEGEL et al. « Statistical improvements in functional magnetic resonance imaging analyses produced by censoring high-motion data points ». In : *Human brain mapping* 35.5 (2014), p. 1981-1996.

[149] L.A. SIEU et al. « EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats ». In : *Nature Methods* (2015).

[150] Stephen J SMITH. « Neuronal cytomechanics : the actin-based motility of growth cones ». In : *Science* 242.4879 (1988), p. 708-715.

[151] Sadaf SOLOUKEY et al. « Functional ultrasound (fUS) during awake brain surgery : the clinical potential of intra-operative functional and vascular brain mapping ». In : *Frontiers in neuroscience* 13 (2020), p. 1384.

[152] Erica L STEVENSON et Heather K CALDWELL. « Lesions to the CA 2 region of the hippocampus impair social memory in mice ». In : *European Journal of Neuroscience* 40.9 (2014), p. 3294-3301.

[153] S. TAHIR et W. IQBAL. « Big Data — An evolving concern for forensic investigators ». In : *ICACC* (2015).

[154] M. TANTER et al. « Ultrafast compound imaging for 2-D motion vector estimation : application to transient elastography ». In : *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* (2002).

[155] Mickael TANTER et al. « Quantitative assessment of breast lesion viscoelasticity : initial clinical results using supersonic shear imaging ». In : *Ultrasound in medicine & biology* 34.9 (2008), p. 1373-1386.

[156] Mickaël TANTER et al. « Ultrafast compound imaging for 2-D motion vector estimation : Application to transient elastography ». In : *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control* 49.10 (2002), p. 1363-1374.

[157] P.K. THANOS et al. « Mapping brain metabolic connectivity in awake rats with µPET and optogenetic stimulation ». In : *J Neurosci* (2013).

[158] E. TIRAN et al. « Transcranial functional ultrasound imaging in freely moving awake mice and anesthetized young rats without contrast agent ». In : *Ultrasound Med. Biol.* (2017).

[159] D. TOMASI et al. « fMRI-acoustic noise alters brain activation during working memory tasks ». In : *Neuroimage* (2005).

[160] Zehra TOPAL et al. « Social communication disorder : A narrative review on current insights ». In : *Neuropsychiatric disease and treatment* 14 (2018), p. 2039.

[161] Tomokazu TSURUGIZAWA, Luisa CIOBANU et Denis LE BIHAN. « Water diffusion in brain cortex closely tracks underlying neuronal activity ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.28 (2013), p. 11636-11641.

[162] Daniel H TURNBULL et Susumu MORI. « MRI in mouse developmental biology ». In : *NMR in Biomedicine : An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo* 20.3 (2007), p. 265-274.

[163] Heiko TZSCHÄTZSCH et al. « In vivo time-harmonic ultrasound elastography of the human brain detects acute cerebral stiffness changes induced by intracranial pressure variations ». In : *Scientific reports* 8.1 (2018), p. 1-9.

[164] Debra UMBERSON et Jennifer KARAS MONTEZ. « Social relationships and health : A flashpoint for health policy ». In : *Journal of health and social behavior* 51.1_suppl (2010), S54-S66.

[165] Jonathan VAPPOU. « Magnetic Resonance- and Ultrasound Imaging- Based Elasticity Imaging Methods : A Review ». In : *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering* 40.2 (2012).

[166] D. WILKINSON et P. HALLIGAN. « The relevance of behavioural measures for functional-imaging studies of cognition ». In : *Nature Reviews Neuroscience* (2004).

[167] P.W. WRIGHT et al. « Functional connectivity structure of cortical calcium dynamics in anesthetized and awake mice ». In : *PLoS ONE* (2017).

[168] Yang ZHOU et al. « Atypical behaviour and connectivity in SHANK3-mutant macaques ». In : *Nature* 570.7761 (2019), p. 326-331.

Communications scientifiques

Posters présentés en conférences scientifiques

1. DIM ELICIT day - 18 mars 2019 - Paris, France.
   F. Laszlo, E. Ey, T. Deffieux, R. Toro, T. Bourgeron et M. Tanter.
   "Ultrafast ultrasound functional imaging of the brain development and social interactions"

2. SfN 2020 - Society For Neuroscience - En ligne.
   F. Laszlo, C. Rabut, S. Pezet, T. Deffieux et M. Tanter.
   "Simultaneous functional imaging of hemodynamic and mechanical properties changes during neuronal activation in the rodent brain with ultrafast imaging"

3. NeuroFrance 2021 - En ligne.
   C. Viollet, **F. Laszlo**, L. Beynac, T. Deffieux, S. Pezet, M. Tanter et R. Piskorowski.
   "In vivo examination of social circuits in mice"

Présentations orales en conférences scientifiques

1. IEEE IUS 2020 - International Ultrasound Symposium - En ligne.
   F. Laszlo, C. Rabut, S. Pezet, T. Deffieux et M. Tanter.
   "Investigating simultaneous neurovascular and mechanical coupling in the rodent brain with ultrafast imaging"

Vidéos scientifiques

1. Chaîne YouTube du DIM ELICIT.
   F. Laszlo, E. Ey, B. Forget, F. de Chaumont, T. Nguyen, T. Deffieux, T. Bourgeron et M. Tanter.
   "Échographie ultrarapide : un nouveau regard sur l'autisme"
   https://youtu.be/lw5aSffZZxU

Articles en cours d'écriture

1. **F. Laszlo**, C. Rabut, S. Pezet, T. Deffieux et M. Tanter.
   "Investigation of neuromechanical coupling in the rodent brain using simultaneous functional ultrasound neuroimaging and functional Shear Wave Elastography"
2. C. Viollet, **F. Laszlo**, S. Pezet, T. Deffieux, R. Piskorowski et M. Tanter.
   "In vivo examination of social circuits in mice"
3. **F. Laszlo**, E. Ey, B. Forget, F. de Chaumont, T. Deffieux, T. Bourgeron et M. Tanter.
   "Functional analysis of social communication and stereotyped behaviours in SHANK3 mouse model of autism"

RÉSUMÉ

L'imagerie ultrasonore est une modalité émergente d'imagerie fonctionnelle cérébrale. Depuis la première preuve de concept en 2011, de nombreux projets en préclinique ont pu être menés sur des sujets très différents tels que l'étude de pathologies (Alzheimer, schizophrénie, . . .), l'étude de la tonotopie chez le petit animal ou encore celle des interactions sociales.
Dans ce dernier cas, il est alors nécessaire de pouvoir faire de l'imagerie éveillée ce qui induit une complexification à la fois de la génération des images et du dispositif expérimental mais aussi de leur interprétation à cause des artefacts liés au mouvement du sujet étudié. Être capable de faire de l'imagerie sans anesthésie est également crucial car cette dernière peut modifier le métabolisme.
La majorité des travaux conduits durant cette thèse consiste au développement de techniques expérimentales et de méthodes numériques au service de l'imagerie neurofonctionnelle ultrasonore chez le petit animal éveillé qui en est encore à ses débuts. Les avancées proposées sont appliquées à des cas concrets en partenariat avec l'institut Pasteur (étude d'un modèle d'autisme) et l'institut de phychiatrie et neurosciences de Paris (reconnaissance sociale et environnementale).
L'imagerie fonctionnelle ultrasonore du cerveau est basée sur le couplage neurovasculaire. Ce couplage permet une mesure indirecte de l'activité du cerveau en imageant les variations des flux sanguins dans les zones cérébrales stimulées. Cette réponse hémodynamique est assez lente et ne permet pas d'accéder aux phénomènes physiologiques rapides. Afin de chercher une solution à ce problème, le couplage neuromécanique, c'est-à-dire le lien entre activité cérébrale et rigidité des tissus, est étudié pour la première fois avec les ultrasons dans ce document.

MOTS CLÉS

imagerie - ultrasons - neurosciences - cerveau - traitement de signal - physique

ABSTRACT

Ultrasound imaging is a new emerging tool for neurofunctional imaging. Since 2011 and the first proof of concept, numerous preclinical projects were led on various topics such as pathology studies (Alzheimer and schizophrenia for instance), small animal tonotopy study or else social interactions.
To study social interactions with this technique, awake imaging is needed. Awake brain functional imaging is possible in ultrasound but it comes with difficulties not only with the image generation and the experimental setup but also with the interpretation of the results because of the movement artifacts. Being able to perform awake imaging is also very interesting as it allows to get rid of the anesthesia which is known to alter metabolism.
Most of the work presented in this document consists in the development of experimental techniques and numerical methodologies to perform functional ultrasound brain imaging (fUS) in awake small animals. The leads that are proposed will be applied on concrete examples with the help of the Pasteur institute (study of a model of an autistic trouble) and the Paris institute for neuroscience and psychiatry (social and environmental recognition).
fUS is based on the neurovascular coupling: it allows an indirect measure of brain activity by monitoring blood flow variations in the stimulated brain areas. This hemodynamic response is quite slow and thus this technique cannot depict faster transient physiological phenomena. To address this problem, the neuromechanical coupling, that is the link between cerebral activity and tissue stiffness, is investigated for the first time in ultrasound.

KEYWORDS

imaging - ultrasound - neuroscience - brain - signal processing - physics