



HAL
open science

Microscopie par localisation ultrasonore dans les modèles d'accidents vasculaires cérébraux

Arthur Chavignon

► **To cite this version:**

Arthur Chavignon. Microscopie par localisation ultrasonore dans les modèles d'accidents vasculaires cérébraux. Acoustique [physics.class-ph]. Université Paris sciences et lettres, 2021. Français. NNT : 2021UPSL069 . tel-03517012

HAL Id: tel-03517012

<https://pastel.hal.science/tel-03517012>

Submitted on 7 Jan 2022

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.



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'École Supérieure de Physique
et de Chimie Industrielles de la ville de Paris

**Microscopie par localisation ultrasonore dans les modèles
d'accidents vasculaires cérébraux**

Soutenu par

Arthur CHAVIGNON

Le 1 décembre 2021

École doctorale n°391

**Sciences Mécaniques,
Acoustique, Électronique
et Robotique de Paris**

Spécialité

Acoustique

Préparée au

Laboratoire d'Imagerie Biomédicale
Sorbonne Université

Composition du jury :

Denis VIVIEN Professeur des Universités, Université Caen Normandie	<i>Président du jury Examineur</i>
Hervé LIEBGOTT Professeur des Universités, IUT Lyon, Creatis	<i>Rapporteur</i>
Jean PROVOST Professeur agrégé, Département de génie physique, Polytechnique Montréal	<i>Rapporteur</i>
Lori BRIDAL Directrice de recherche, Sorbonne Université, LIB	<i>Examinatrice</i>
Cyrille ORSET Maître de conférences, Université Caen Normandie	<i>Examineur</i>
Benoît LARRAT Chargé de recherche, NeuroSpin CEA	<i>Examineur</i>
Olivier COUTURE Directeur de recherche, Sorbonne Université, CNRS, LIB	<i>Directeur de thèse</i>

Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier mon directeur Olivier Couture, qui m’a encadré au long de ces trois années de thèse, avec suffisamment de liberté pour laisser s’exprimer ma créativité et mon auto-critique. Un joyeux mélange de positivisme, pessimisme, optimisme et scepticisme.

Je tiens également à remercier tout le Laboratoire d’Imagerie Biomédicale, en particulier la directrice Lori Bridal qui m’a accueilli et permis de continuer à travailler en dépit des multiples restrictions.

Je remercie Cyrille Orset et Denis Vivien de la plate-forme d’imagerie normande Cyce-ron/BB@C qui m’ont offert une place sur leurs paillasses, leurs mains expertes, leurs expertises sur les petits animaux et les modèles d’AVC, et leurs conseils sur le prix des coquilles. Je remercie aussi toutes les personnes qui m’ont aidé sur place avec les animaux, l’IRM, et le scanner.

Je tiens à remercier Benoît Larrat qui a suivi le déroulement de ma thèse avec un regard expert extérieur.

J’adresse mes remerciements aux rapporteurs Jean Provost et Hervé Liebgott qui ont pris le temps d’examiner les quelques 200 pages avec une vision à la fois très générale et pointilleuse.

Merci à mes fidèles acolytes de l’aventure de la *superloc* Baptiste Heiles et Vincent Hingot. J’ai encore plein de choses à apprendre, finalement.

Je remercie l’équipe *Physiologie et Pathologie de la Microcirculation* avec qui j’ai partagé de nombreuses réunions plus ou moins fructueuses, des galères de code, des recettes d’agar-agar et de teurgoules. Mentions à Louise Denis et Antoine Coudert qui rejoignent le troupeau de l’ULM 3D, ne laissez jamais une brebis sans surveillance.

Merci à tous ceux qui m’ont apporté professionnellement ou scientifiquement durant ces années de laboratoires : Jérôme Baranger, Jack Sauvage, Justine Robin, Victor Finel, Laura Zamfirov, Sofiane Décombas-Deschamps, Clémentine Morisset, Hicham Serroune, Florian Laszlo, Béatrice Berthon, Antoine Bergel, Eliott Teston, Pauline Lopez, Daniel Suarez, Benoît Longrez, Patrick Courtois, Sebastien Salles, Miguel Bernal, Lucas Merabet... et bien d’autres mais la liste serait trop longue.

Merci à tous mes amis bien loin des problèmes de Verasonics, de cathéters et de biomarqueurs : la Confiserie, le Nymphonik Orchestra, Tumult, *les Copains beaufs de Carté du 50+Val*, les grimpeurs...

À mes muses de rédaction Billie et Dua.

Enfin, merci à mes parents et toute ma famille pour leur soutien sans faille, leur hospitalité à la mer, à la montagne ou à la campagne, et pour la chasse minutieuse aux dernières coquilles et fautes d’orthographe.

Résumé

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une perte subite de la vascularisation d'une partie du cerveau. Une prise en charge rapide réduit considérablement les pertes neuronales et séquelles à long terme. Les hémorragies cérébrales et infarctus cérébraux représentent les principaux types d'AVC avec des symptômes similaires mais des traitements très spécifiques. Le diagnostic précoce est primordial et nécessite une imagerie du cerveau en profondeur à travers le crâne.

Le développement de la microscopie par localisation ultrasonore (ULM) a ouvert de nouvelles possibilités pour l'imagerie vasculaire en améliorant le contraste, la résolution et la profondeur de pénétration de l'échographie. Des microbulles sont injectées dans le sang et localisées pour reconstruire la microvascularisation en quelques minutes.

L'objectif général de cette thèse est l'application de l'ULM 3D pour le diagnostic non invasif de l'AVC en phase précoce. Une première étude porte sur une comparaison quantitative des algorithmes de localisation ultrasonore pour l'imagerie 2D. Un ensemble de métriques normées et de jeux de données universels ont été établis pour évaluer les différents algorithmes avec des critères objectifs et reproductibles. Puis un système d'ULM 3D a été développé pour pallier à la projection en élévation de l'imagerie 2D et élargir le champ de vue. En utilisant une sonde multiplexée, une angiographie d'un cerveau de rat a été réalisée in vivo avec un système commercial. Une résolution de quelques dizaines de microns a été obtenue à travers le crâne, réduisant au minimum l'impact de l'imagerie sur la physiologie de l'animal en vue d'une étude pré-clinique. Enfin, ce système a été utilisé pour imager des AVC induits sur une cohorte de rats. Il a prouvé sa capacité à distinguer les effets d'une ischémie par rapport à une hémorragie sur la vascularisation du cerveau. Cette première étude montre la pertinence d'une telle imagerie pour le diagnostic en phase précoce de l'AVC chez l'humain par ULM volumétrique en s'affranchissant des contraintes et disponibilités de l'IRM et du scanner.

Mots clés : Microscopie par localisation ultrasonore, super-résolution, algorithmes de localisation, microvascularisation du cerveau, imagerie 3D, sonde échographique multiplexée, accident vasculaire cérébral, hémorragie cérébrale, ischémie cérébrale

Abstract

A stroke is a sudden loss of vascularization of a part of the brain. Patients must receive medical care within the first hour to reduce neuronal loss and long-term sequelae. Most strokes are hemorrhagic or ischemic, with similar symptoms but specific treatments. Early-phase diagnosis becomes vital and requires deep brain imaging through the skull bone.

The development of Ultrasound Localization Microscopy (ULM) has widened applications for microvascular imaging by improving contrast, resolution, and penetration depth. Microbubbles are injected into the blood flow and localized to reconstruct the microvessels within few minutes.

The main objective of this thesis is the application of 3D ULM for non-invasive stroke diagnosis in the early phase.

A first study focuses on a quantitative comparison of localization algorithms for 2D ultrasound imaging. A set of standardized metrics and unified datasets were established to evaluate various algorithms with objective and reproducible criteria. Then a volumetric ULM system was set up to overcome the elevation projection of 2D imaging and increase the field of view. We performed a 3D angiography of a rat brain in vivo with a commercial scanner and a multiplexed ultrasonic probe. A few tens of micrometers resolution was obtained through the skull bone. This method didn't induce major modifications of the animal's physiology and can be used for a pre-clinical study. Finally, this system was used to image induced strokes in a cohort of rats. It proved its ability to distinguish the effects of ischemia versus hemorrhage on brain vascularization. This first study shows the relevance of such imaging for the early diagnosis of stroke in humans by volumetric ULM, without the constraints and availability of MRI and CT.

Keywords : Ultrasound localization microscopy, super-resolution, localisation algorithms, brain microvascularization, 3D imaging, multiplexed ultrasound probe, stroke, cerebral hemorrhage, cerebral ischemia

Table des matières

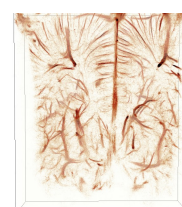
Remerciements	i
Résumé	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xvii
Acronymes et anglicismes	xviii
1 Introduction générale	1
1 L'accident vasculaire cérébral	3
1.1 Vascularisation et microvascularisation	3
1.2 L'accident vasculaire cérébral	4
1.3 Des traitements possibles	6
1.3.1 Traitements de l'ischémie	6
1.3.2 Traitements de l'hémorragie	7
1.4 Parcours fléchés pour l'AVC	7
1.5 Enjeu de l'imagerie en phase précoce	8
2 Imagerie pour le diagnostic médical	9
2.1 Observer pour comprendre	9
2.2 Méthodes d'imagerie cérébrale	9
2.2.1 Tomodensitométrie par rayons X	9
2.2.2 Imagerie par résonance magnétique	11
2.2.3 Tomographie par émission de positons	13
2.2.4 Échographie	14
2.2.5 Spectroscopie proche infrarouge	15
2.2.6 Autres méthodes d'imagerie indirectes	15
2.3 Imagerie de la microvascularisation	16
2.3.1 Résolution et profondeur	16
2.3.2 Microscopie photo-acoustique	17
2.3.3 Microscopie par excitation à deux photons (TPLSM)	17
2.3.4 Techniques d'imagerie <i>ex vivo</i>	18
2.4 Imagerie dans le contexte de l'AVC	20
3 L'imagerie échographique	21

3.1	Principe de l'imagerie échographique	21
3.2	Échographie conventionnelle, par ondes focalisées	25
3.2.1	Principe d'imagerie	25
3.2.2	Résolution	26
3.2.3	Modes d'imagerie en échographie conventionnelle	28
3.3	Imagerie ultra-rapide	32
3.3.1	Imagerie par ondes planes	32
3.3.2	Caractéristiques techniques	33
3.3.3	Nouvelles perspectives de l'imagerie ultra-rapide	34
4	Microscopie par Localisation Ultrasonore	37
4.1	Microscopie par localisation optique	38
4.2	Principe de la microscopie par localisation ultrasonore	40
4.2.1	De l'imagerie optique à l'imagerie ultrasonore	40
4.2.2	Grandes étapes de l'ULM	42
4.2.3	Imagerie de diffuseurs ultrasonores ponctuels	43
4.2.4	Détection et localisation sub-longueur d'onde	46
4.2.5	Suivi de trajectoires des microbulles	48
4.2.6	Représentations graphiques	51
4.3	Mesure de résolution et qualité d'une image ULM	54
4.4	Applications de la microscopie par localisation ultrasonore	56
4.5	Limitations de l'imagerie 2D et premiers résultats 3D	60
5	Imagerie volumétrique ultrasonore	62
5.1	Nécessité d'une imagerie volumétrique	62
5.2	Vers l'imagerie 3D haute cadence	62
5.2.1	3D par balayage	62
5.2.2	Évolution vers les sondes matricielles	63
5.2.3	Contraintes et problématiques des sondes matricielles	64
5.3	Échographie 3D haute cadence	65
5.4	Microscopie par localisation ultrasonore en 3D	68
6	Objectifs de la thèse	71
6.1	Comparaison et évaluation des algorithmes de localisation pour l'ULM 2D	71
6.2	Imagerie volumétrique avec sonde multiplexée pour la microscopie par localisation ultrasonore	72
6.3	Étude préclinique du diagnostic de l'AVC en phase aiguë	72
2	Comparaison et évaluation des algorithmes de localisation pour l'ULM 2D	73
1	Introduction	74
1.1	Contexte de l'étude	74
1.2	Objectifs	74
1.3	Méthodes générales	74
1.4	Principaux résultats	75
1.5	Conclusion	76
2	Article : <i>Performance benchmarking of microbubble-localization algorithms for ULM</i>	77
2.1	Abstract	78
2.2	Main	78
2.3	Results	80
2.3.1	<i>In silico</i> and <i>in vivo</i> datasets	81
2.3.2	General comparisons of 7 algorithms using 11 metrics	83
2.3.3	Accuracy metrics in simulated datasets	85

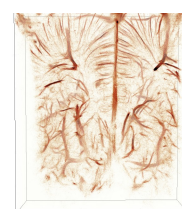
2.3.4	Image quality metrics <i>in silico</i> and <i>in vivo</i>	89
2.4	Discussion	92
2.5	Outlook	96
2.6	References	97
2.7	Methods	99
2.7.1	Point Spread Function dataset (" <i>in silico</i> PSF")	99
2.7.2	<i>In silico</i> angiography dataset (" <i>in silico</i> Flow")	100
2.7.3	<i>In vivo</i> dataset (" <i>in vivo</i> rat brain perfusion" and " <i>in vivo</i> rat brain bolus")	100
2.7.4	<i>In vivo</i> dataset (" <i>in vivo</i> rat kidney")	101
2.7.5	<i>In vivo</i> dataset (" <i>in vivo</i> mouse tumor")	101
2.7.6	ULM workflow and detection	102
2.7.7	Localization algorithms	102
2.7.8	Tracking algorithm	103
2.7.9	Reconstruction	103
2.7.10	<i>In silico</i> metrics	104
2.7.11	<i>In vivo</i> metrics	104
2.7.12	Conversion metrics to scores	105
2.7.13	Micro angiography Computed Tomography (microangio-CT) with μ Angiofil	105
3	Annexes	107
3.1	Imagerie multimodale de la microvasculariation du cerveau : ultrasons et microtomographie aux rayons X	107
3.1.1	Problématique	107
3.1.2	Protocole pour le cerveau de rat	107
3.1.3	Résultats	108
3.1.4	Conclusion	110
3.2	Rendus graphiques pour l'ULM	110
3	Imagerie 3D avec sonde multiplexée pour l'ULM	113
1	Introduction	115
1.1	Contexte de l'étude	115
1.2	Objectif	115
1.3	Méthodes générales	115
1.4	Résultats	116
1.5	Conclusion	117
2	Article : <i>3D transcranial ULM in rat brain with a multiplexed matrix probe</i>	118
2.1	Abstract	119
2.2	Introduction :	119
2.3	Methods :	122
2.3.1	Optimized volumetric imaging with a multiplexed matrix probe	122
2.3.2	<i>In silico</i> , <i>in vitro</i> , and <i>in vivo</i> validation setups	124
2.3.3	Dedicated imaging sequence for volumetric ULM	125
2.3.4	Volumetric ULM post-processing for hemodynamic angiography	126
2.3.5	3D renderings and hemodynamic measurements	127
2.3.6	Microangio Computed Tomography with μ Angiofil perfusion	128
2.4	Results	128
2.4.1	PSF optimization with sub-aperture management	128
2.4.2	Homogenous microbubbles localization within a canal	129



	2.4.3	Transcranial volumetric ULM of a rat brain <i>in vivo</i> with an intact skull	130
	2.4.4	Blood vessels detection down to 30 μm diameter	132
	2.5	Discussion	134
	2.6	Conclusion	138
	2.7	Acknowledgments	138
	2.8	References	138
3	Annexes		142
	3.1	Calibration spatiale des transducteurs de la sonde matricielle	142
	3.1.1	Problématique	142
	3.1.2	Méthode de calibration	142
	3.1.3	Résultats	144
	3.2	Imagerie du cerveau avec craniectomie	144
	3.2.1	Introduction	144
	3.2.2	Méthodes	145
	3.2.3	Résultats	145
	3.3	Mesure de l'atténuation du crâne de rat	147
	3.3.1	Problématique	147
	3.3.2	Méthodes	148
	3.3.3	Résultats	149
	3.4	Temps d'acquisition et de reconstruction	150
	3.5	Imagerie du cerveau de souris en transcrânien	151
4	Détection et caractérisation des accidents vasculaires cérébraux en phase précoce		153
1	Introduction		154
	1.1	Contexte de l'étude	154
	1.2	Objectif	154
	1.3	Méthodes générales	154
	1.4	Résultats	155
	1.5	Conclusion	156
2	Article : <i>In vivo 3D ULM reveals differential patterns of perfusion losses at the early phases of ischemic and hemorrhagic strokes in the rat</i>		157
	2.1	Abstract	158
	2.2	Introduction	158
	2.3	Methods	159
	2.3.1	Animal experiments	159
	2.3.2	Stroke models in the rat	160
	2.3.3	Stroke models imaging	160
	2.3.4	3D ULM imaging sequence	161
	2.3.5	3D ULM processing	162
	2.3.6	Microvascular diffusion index	162
	2.3.7	Unsupervised observation for MCA occlusion	162
	2.3.8	Supervised observations	163
	2.4	Results	163
	2.4.1	ULM revealed a large hypoperfused region in hyperacute ischemic stroke	163
	2.4.2	The MDI dropped only in the cortex irrigated by the MCA	165
	2.4.3	Inside the ischemic area, the perfusion loss is sudden and total	165



2.4.4	The hemorrhagic model shows diffuse and progressive perfusion losses	166
2.4.5	Analysis with multiple animals	168
2.5	Discussion	169
2.6	Conclusion	171
2.7	Acknowledgements	171
2.8	Contributions	172
2.9	Disclosure	172
2.10	Competing interests	172
2.11	Bibliography	172
Conclusion et perspectives		175
1	Contributions personnelles	175
2	La réalité de l'ULM	177
3	Ambitions pour l'ULM	178
4	Vers l'ULM clinique	181
5	Et après ?	181
Liste des publications		184
Bibliographie		186

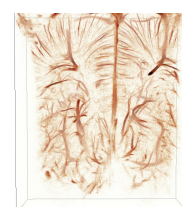


Liste des figures

1.1	(a) Le réseau vasculaire est composé des réseaux artériel et veineux. (b) Les capillaires sanguins réalisent la jonction entre les réseaux artériel et veineux. Ils permettent des échanges moléculaires avec les cellules environnantes. [Wikimedia Commons]	3
1.2	(a) Principales artères du cerveau humain, et les territoires vasculaires associés (b). [Campbell, 2019]	4
1.3	L'Infarctus Cérébral est une occlusion d'une artère cérébrale, bloquant l'irrigation du territoire aval. L'Hémorragie Cérébrale résulte d'une rupture d'une artère dans le cerveau avec un épanchement sanguin. [AboutKidHealth.ca, 2021]	5
1.4	Différentes zones d'influence de l'ischémie et leurs évolutions temporelles en l'absence de traitement : zone de nécrose, pénombre et oligémie (a). (b) Face à une perte de débit sanguin prolongé, la pénombre dérive en nécrose, avec des pertes irréversibles. [Maïer, 2018]	6
1.5	Temps d'accès aux Unités NeuroVasculaires (UNV) actuelles et prévues et aux urgences avec plateau d'imagerie, en 2014. (France AVC)	8
1.6	(a) Première radiographie par Wilhelm Röntgen, main de son épouse Anna Bertha Ludwig. (b) Quelques mois plus tard, la bague de la main de Albert von Kölliker, ami de Wilhelm Röntgen, se distingue clairement. [Domaine public]	9
1.7	CT-scan de l'AVC. (a) Ischémie cérébrale avec artère occlue en hyperdense (flèches jaunes) [Muir, 2006]. (b) Hémorragies cérébrales avec hématome dans le parenchyme hyperdense (étoiles noires). (c) CT Angiographie d'un anévrisme avec agent de contraste [Birenbaum, 2011].	10
1.8	Différentes séquences utilisées pour une ischémie en phase aiguë : (a) diffusion, (b) coefficient apparent de diffusion, (c) T ₁ , (d) T ₂ , (e) FLAIR, (f) écho de gradients, (g) T ₁ avec gadolinium, (h) angiographie temps de vol, (i) angiographie par résonance magnétique. [Roldan-Valadez, 2014]	12
1.9	Accessibilité et disponibilité des équipements d'IRM en France en 2017. [SNITEM, 2017]	13
1.10	Identification de la pénombre hypoperfusée par imagerie TEP (baisse du CBF) 5 heures après l'ischémie. Validation par imagerie IRM <i>Time-To-Peak</i> (temps au pic) et de diffusion (DWI). [Heiss, 2017]	13
1.11	(a) Imagerie Doppler transcrânienne de la ACM [Birenbaum, 2011]. (b) Imagerie du polygone de Willis via la fenêtre temporale [Kirsch, 2013].	14



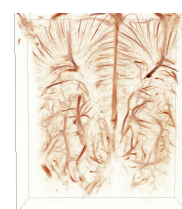
1.12	Imagerie échographique transcrânienne d'une occlusion de l'ACM dans l'hémisphère gauche (a) <i>Peak to signal Intensity</i> , (b) <i>Time To Peak</i> (haut : ipsilatéral, bas : contralatéral) et comparaison par CT-scan à 1,5 h (c) et 38 h (d) après symptômes [Seidel, 2009]. Hémorragie cérébrale du thalamus avec CT-scan (e) et échographie avec agent de contraste (f) [Meyer-Wiethe, 2009].	15
1.13	(a) Suivi du flux sanguin artériel [Orset, 2007]. (b) Visualisation du territoire ischémique à la surface du cerveau de souris [Anfray, 2021].	16
1.14	(a) Organisation microvasculaire du couplage neuro-vasculaire autour des capillaires et neurones [Hamilton, 2010]. (b) Compromis résolution/profondeur d'imagerie pour la microvascularisation (adapté depuis [Shih, 2012]).	16
1.15	Microscopie photo-acoustique (a) résolution optique (OR-PAM), (b) résolution acoustique (AR-PAM). [Wang, 2012]	17
1.16	(1) Principe d'imagerie 2-photons [Svoboda, 2006]. (2-3) Imagerie du cortex avec marquage du sang (vert), et des astrocytes (rouge) [Shih, 2012].	18
1.17	(1) Transparence d'un cerveau de souris [Ertürk, 2012]. (2) Capillaires sanguins dans le cerveau de souris en ultramicroscopie, barres d'échelle 400 μm (a) et 50 μm (b) [Jährling, 2009]. (3) Neurones dans un cerveau de souris (barre d'échelle de 100 μm) [Tomer, 2014].	19
1.18	Micro-CT du cerveau de rat avec implantation d'une tumeur, perfusé avec du $\mu\text{Angiofil}$ (Fumedica AG, Switzerland). [Hlushchuk, 2020]	20
1.19	(a) Propagation de l'onde ultrasonore : champ de pression avec des oscillations de longueur d'onde $\lambda = c/f$. (b) Émission d'une impulsion ultrasonore par un transducteur et rétrodiffusion par un diffuseur du milieu.	21
1.20	(a) Contribution de plusieurs ondes sphériques pour former un front d'onde, (b) onde plane angulée par retard à l'émission, (c) onde focalisée en un point devant la sonde.	22
1.21	(a) Rétrodiffusion de l'onde par un diffuseur ponctuel. Les transducteurs enregistrent l'écho avec des retards dépendants de leur position. (b) Pour reconstruire un pixel, on calcule sa loi de retard théorique pour chaque position des transducteurs, puis on additionne les signaux mesurés avec ce retard dans les données RF. (c) Exemple de carte d'échogénicité du milieu pour un seul diffuseur.	23
1.22	Caractéristique atténuation/fréquence des différents milieux biologiques. Courbe de l'os du crâne en rouge. [Cobbold, 2007]	24
1.23	Reconstruction d'une image par focalisations successives du faisceau ultrasonore. [Bercoff, 2011]	26
1.24	Limite de séparabilité entre deux sources proches. La FWHM désigne la largeur à mi-hauteur de la tache d'imagerie. La limite de résolution est atteinte quand les deux sources sont distantes d'une largeur à mi-hauteur : critère de Rayleigh.	27
1.25	Compromis entre profondeur d'imagerie et résolution. La distance demie-énergie correspond à une perte de 3 dB dans le foie (atténuation de $\sim 5 \text{ dB/cm/MHz}$). [Couture, 2018]	28
1.26	Examen échographique du cerveau d'un nouveau-né. [Lowe, 2011]	29
1.27	Schéma d'une microbulle <i>SonoVue</i> (Bracco, Italie). Compression et dilatation non-linéaire au passage d'une onde acoustique.	30
1.28	Échographies avec agent de contraste : (a) Vascularisation du foie en l'image MIP avec agent de contraste [Wilson, 2010]. (b) Comparaison des temps d'arrivée du bolus dans le foie (<i>Transit Time</i>) [Cosgrove, 2010]	31



1.29	Échographies transcrâniennes avec agent de contraste : (a) Imagerie du cercle de Willis et des premiers segments artériels (ACA : A1-2, ACM : M1-3, APC P1-4) [Hölscher, 2005]. Imagerie transcrânienne avant l'arrivée du bolus d'agent de contraste (b), au moment de l'injection (c), juste après (d) avec mesure du spectre Doppler [Seidel, 2009].	31
1.30	(1) Principe d'imagerie par onde plane. (2) Image mode-B avec 1 onde plane (a), 71 ondes planes (b), 128 focalisations latérales (c), 128 focalisations latérales et 4 focalisations en profondeur. [Montaldo, 2009]	32
1.31	Principe de la sommation cohérente : l'image finale est obtenue après sommation de plusieurs sous images associées à une onde plane. [Bercoff, 2011]	33
1.32	(a) Génération d'un cône de Mach par focalisation et propagation d'une onde de cisaillement latéralement, puis imagerie haute cadence du déplacement des tissus. (b) Carte de vitesse du son autour d'une masse dure, avec une vitesse du son de 7,1 m/s. [Gennisson, 2013]	34
1.33	(a) Doppler conventionnel, (b) Doppler ultra-sensible. (c) Imagerie de l'activité fonctionnelle avec activation du cortex somato-sensoriel (S1). [Macé, 2011]	35
1.34	(1) Imagerie fonctionnelle peropératoire et vasculaire d'une tumeur humaine. (A : IRM fonctionnelle, B : imagerie fonctionnelle ultrasonore, C : corrélation avec la tâche à réaliser) [Soloukey, 2020]. (2) Mise en évidence des corrélations intra et interhémisphériques chez les bébés grands prématurés [Baranger, 2021].	36
1.35	Avantages et inconvénients des méthodes d'imagerie pour la microvascularisation dans le contexte du diagnostic en phase précoce de l'AVC. (*minimalement invasif)	37
1.36	Limite de diffraction théorisée par Abbe	38
1.37	(a) PSF et localisation du diffuseur [Carl Zeiss Microscopy Online Campus]. (b) Détermination de la position des diffuseurs [Hess, 2006].	38
1.38	(1) Excitations successives des fluorophores et localisation sources isolées. (2a) Accumulation de toutes les contributions des fluorophores, résolution de 200 nm, (2b-c-d) fPALM avec une précision de localisation de 2 à 25 nm. [Betzig, 2006]	39
1.39	Montages expérimentaux pour l'ULM : (a) section d'un canal <i>in vitro</i> [Viessmann, 2013], (b) oreille de souris <i>in vivo</i> [Christensen-Jeffries, 2015].	40
1.40	Premières démonstrations de l'ULM : (a) [Couture, 2011], (b) [Siepmann, 2011], (c) [Viessmann, 2013], (d) [Desailly, 2013], (e) [O'Reilly, 2013].	41
1.41	ULM sur l'oreille de souris à 25 Hz. (a) Image mode-B de référence, (b) intensité de localisations, (c) comparaison optique, (d) carte de direction des flux, (e) carte de vitesse des flux, (f) profils d'intensité et de vitesse. [Christensen-Jeffries, 2015]	41
1.42	ULM dans le cerveau de rat avec 75 000 images à 500 Hz.	42
1.43	Schéma de principe de l'ULM avec les grandes étapes	43
1.44	(1) Réponse fréquentielle des microbulles <i>SonoVue</i> pour différentes pressions [Jong, 2009]. (2a) Imagerie harmonique, (2b) non-linéaire avec inversion de polarisation, (2c-d) modulation d'amplitude [Wang, 2018].	45
1.45	Principe de localisation sub-longueur d'onde en imagerie ultrasonore. [Heiles, 2021b ; Desailly, 2013]	47
1.46	Principe de l'algorithme de tracking avec minimisation de la matrice inter-distances. [Song, 2018b]	49
1.47	(a) Interpolation de la trajectoire d'une microbulle. (b-c) ULM sur le cerveau de rat sans et avec interpolations des trajectoires [Heiles, 2021b].	49
1.48	Construction d'une image intensité par accumulation des trajectoires dans les pixels.	51



1.49	Différents rendus pour l'ULM sur le cerveau de rat avec craniectomie à 15 MHz : (a) intensité des microbulles, (b) vitesse et direction, (c) vitesse et direction axiale. (Barre d'échelle 1 mm)	52
1.50	(a) Reconstruction avec différentes tailles de pixels et plusieurs temps d'acquisition. (b) Courbes de saturation pour différentes tailles de pixels. (c) Temps caractéristiques d'acquisition pour une taille de pixel donnée. [Hingot, 2019] . . .	52
1.51	(a) Cerveau d'embryon de poulet avec et sans filtrage directionnel pour une concentration élevée de microbulles [Huang, 2020]. (b) Simulation d'écoulement de microbulles et reconstruction avec méthode classique et avec apprentissage profond [Milecki, 2021].	53
1.52	(1) ULM dans le cerveau de rat sans et avec correction de mouvement, et profil de vaisseau amélioré [Hingot, 2017]. (2) Correction de mouvement dans le rein de rat. De haut en bas : sans correction, correction locale, correction globale avec champ de mouvement [Taghavi, 2021]. (3) Myocarde de rat sans et avec correction des positions issues des images classiques, et avec le beamforming en coordonnées de Lagrange (MULA) [Cormier, 2021].	54
1.53	Différentes mesures caractéristiques des images ULM.	56
1.54	Exemple d'ULM <i>in vivo</i> . (a-b) Cerveau de rat avec craniotomie [Hingot, 2019; Milecki, 2021]. (c-d) Mœlle épinière de rat [Sloun, 2020; Claron, 2021]. (e-f) Rein chez le rat [Tang, 2020; Foiret, 2017]. (g) Pancréas de rat (non publié, V. Hingot et P. Lopez).	57
1.55	(a) Modèle expérimental de l'ULM dans l'embryon de poulet de moins de 10 jours. (b) Imagerie optique, (c) rendus ULM avec intensité, (d) rendu hémodynamique. [Huang, 2020]	58
1.56	Imagerie de tumeurs avec une arborescence vasculaire chaotique (a) chez le rat [Lin, 2017], (b) la souris [Opacic, 2018], (c) l'embryon de poulet [Huang, 2020], (d) et la souris [Heiles, 2021b].	58
1.57	(1) Imagerie de l'AVC ischémique chez la souris [Hingot, 2020]. (2) Étude de l'hypoxie dans une tumeur de l'embryon de poulet [Lowerison, 2020]. (3) Cerveaux de souris jeunes et âgées en ULM [Lowerison, 2021].	59
1.58	(a) Rein avec direction axiale encodée en couleur, et carte de vitesse. (b) Foie sein superposé sur l'image mode-B, et carte des vitesses. (c) Mesure de profil en Doppler puissance (PD) et ULM, histogramme de répartition des vitesses. [Huang, 2021]	59
1.59	(a) Positionnement de la sonde 2D sur la tempe en imagerie CT. (b) ULM avec correction d'aberration. (c) Comparaison CT et ULM transcrânien, (d) champ de vitesse. [Demené, 2021]	60
1.60	(1) balayage mécanique pour échographie 3D [Fenster, 2001]. (2) Système tomographique pour le cerveau de rat, en Doppler puissance avec une sonde linéaire à 15 MHz [Demené, 2016].	63
1.61	(a) Évolution des sondes bi-dimensionnelles [Foster, 2000]. (b) Caractéristiques de focalisation en émission et réception. (c) Sonde matricielle [Light, 2001]. (d) Émission d'ondes divergentes (ou défocalisées) et planes en 3D [Provost, 2014]. . .	64
1.62	Images commerciales de GE avec l'appareil <i>Voluson E10</i> : (a) fœtus, (b) cordon ombilical, et <i>Vivid E95</i> , (c) cœur avec rendu photo-réaliste. [www.gehealthcare.fr, 2021]	65



1.63	(a) Système <i>SARUS</i> [Jensen, 2013], (b) machine 1024 voies et, (c) la sonde matricielle à 3 MHz (Vermon, Tours, France) [Gennisson, 2015], (d) système Verasonics de CreaTis [Petrusca, 2018], (e) système 3D commercial Verasonics (Kirkland, WA, USA).	66
1.64	(a) Sous population parcimonieuse d'une sonde avec 1024 transducteurs [Roux, 2018]. (b) Principe d'une sonde lignes-colonnes [Rasmussen, 2015].	67
1.65	(a) Echographe Verasonics avec boîtier de multiplexage (Kirkland, WA, USA), (b) sonde 1024 voies avec quatre connecteurs similaires (Vermon, Tours, France). (c) Architecture avec sonde 1024 voies, multiplexeur et échographe 256 voies [Yu, 2020].	68
1.66	Exemples d'applications de l'ULM 3D <i>in vitro</i> : (a) bifurcation imagée avec un système 1024 voies [Heiles, 2019b], (b) double hélice sub-longueur d'onde avec une sonde parcimonieuse à 512 éléments [Harput, 2020], (c) micro canal imprimé en 3D [Jensen, 2020].	69
1.67	(a) Cerveau de rat en ULM (gauche) et en Doppler puissante (droite), (b) tranche sagittale de 500 μm . (c) Tranche coronale avec encodage des vitesses en couleur (composante axiale montante en jaune, descendante en bleu). (d) Rendu 3D pour le cerveau tout entier. [Heiles, 2019a; Heiles, 2021a]	70
2.1	Rat brain vascular imaging with <i>in vivo</i> ULM and post mortem microangio-CT.	79
2.2	Description of the framework for data simulation and performance assessment.	82
2.3	Results of the study combined in the PALA global score for each algorithm.	84
2.4	Directional errors and statistical indices for performance on the dataset " <i>in silico</i> Flow" at 30 dB.	86
2.5	Study of PSF non-uniformity in direction and its effect on localisation.	88
2.6	2D ULM density-based renderings of " <i>in silico</i> Flow" along with a focus on particular areas.	89
2.7	2D ULM density-based renderings of " <i>in vivo</i> rat brain perfusion", with gridding index and saturation.	91
2.8	2D ULM density-based renderings of 3 other <i>in vivo</i> datasets, with partial scores.	92
2.9	Schéma de la perfusion de $\mu\text{Angiofil}$ (Fumedica) pour la microtomographie du cerveau de rat.	107
2.10	Microvascularisation multimodale du cerveau de rat. Imagerie ultrasonore à 15 MHz avec craniectomie : (a) Doppler CEUS, et (b) ULM. Microtomographie aux rayons X avec perfusion d'agent de contraste $\mu\text{Angiofil}$ (Fumedica) : (c) scanner <i>in vivo</i> Inveon PET-CT 838 (Siemens), (d) scanner <i>ex vivo</i> Skyscan 1172 (Bruker microCT).	109
2.11	(a) Système d'encodage des couleurs HSL (<i>Hue, Saturation, Lightness</i>). (b) La direction des flux est associée à la teinte, et la vitesse à la saturation. (c) La vitesse est associée à la teinte, avec une distinction sur le signe de la composante verticale. L'intensité donne la luminosité.	111
2.12	Microvascularisation du rein de rat. (a) Doppler ultra-sensible avec agent de contraste. (b) Rendu ULM avec intensité. (c) Rendu avec vitesse (maximum 40 mm/s), encodage couleur de la composante axiale. (d) Rendu vitesse avec encodage couleur de direction.	111
2.13	Microvascularisation du cerveau de rat avec craniectomie. (a) Doppler ultra-sensible avec agent de contraste. (b) Rendu ULM avec intensité. (c) Rendu avec vitesse (maximum 60 mm/s), encodage couleur de la composante axiale. (d) Rendu vitesse avec encodage couleur de direction.	112



3.1	<p>(a) Multiplexed matrix probe with 4 active layer panels of 32×8 transducers elements, divided into 4 sub-apertures. The 256 switches of the 1-4 MUX can address 1 transducer among 4. (b) "Direct", "full" and "light" multiplexing combinations. Links represent the transmission aperture/reception aperture (TxAp/RxAp) couples. (c) Timeline of the asynchronous sequence. Each block of 200 volumes was composed of a set of 5 plane waves requiring 50 TxAp/RxAp couples. (d) Echoes generated by successive transmit apertures (TxAp) and received by aperture 2 (RxAp) were accumulated directly in hardware before being transferred to the host computer.</p>	122
3.2	<p>(a) <i>In vitro</i> setup with a 0,5 mm diameter tube molded in agar, oriented in the elevation direction of the probe (y-axis). The bottom of the tank was covered with an acoustic absorber and water was used to fill the gap between the agar and the probe. (b) <i>In vivo</i> setup of the rat brain imaging with a stereotaxic frame constraining rat's head, and holding the matrix probe. The rat was anesthetized with isoflurane via an inhalation mask, and its temperature was regulated with a heating pad. Sonovue microbubbles were injected with a tail vein catheter.</p>	124
3.3	<p>ULM processing steps. (a) Radiofrequency data were beamformed with a Delay-And-Sum algorithm. (b) IQ volumes were filtered to remove tissue signals, and local maxima were detected (yellow crosses). (c) Maxima with low local SNR were rejected. The remaining maxima were localized with a radial symmetry-based algorithm (yellow circles). (d) Microbubbles were paired with a tracking algorithm. Trajectories were interpolated and smoothed. (e) Interpolated trajectories were projected on a rendering volume by counting the occurrence per voxel. (f) After accumulating a large number of trajectories, a power-law compression was applied to the final volume for visual analysis.</p>	126
3.4	<p>Simulated point spread function for the "full", "light", and "direct" combinations at different : lateral slices (x-axis) (a) and axial slices (z-axis) (b). (c) Elevation profiles of PSF for all combinations at various depths. The elevation resolution was measured at -6 dB from the central lobe. ($\lambda = 197 \mu\text{m}$)</p>	129
3.5	<p>(a) Localization heatmaps with lateral projection (x-axis) for different combinations. Each canal was processed independently. The figure presents the results normalized on a single image. The white dot lines delineate the inter-aperture zones from the intra-aperture zones. (b) Number of localizations in canal's axis at 26, 38, and 54 wavelengths from the probe (5,1 ; 7,5 ; 10,6 mm). ($\lambda = 197 \mu\text{m}$)</p>	130
3.6	<p>(a-b-c) 3D rendering of the brain microvascular with Amira (ThermoFisher). (a) coronal view, (b) sagittal view. Intensity reflects the count of microbubbles. (d) 3D rendering with tilted ultrasound probe on another rat to observe the cortex in the right hemisphere. The shadowed region is now tilted, revealing microvasculature under the sagittal suture. (e-f-g-h-i) 3DULM rendering overlapped with the Waxholm Space Atlas of the Sprague Dawley rat brain, in shaded blue. (i) 3D ULM rendering with a tilted probe. L : left, R : right, A : anterior, P : posterior, D : dorsal, V : ventral. (See supplementary video 1)</p>	131
3.7	<p>(a) 3D rendering MIP of the flow velocity with Amira (ThermoFisher) (b) $600 \mu\text{m}$ coronal slice at bregma $-1,5$ mm of the hemodynamic volume up to 30 mm/s. Flows are encoded yellow to red (positive) for upward flows, and green to blue (negative) for downward flows. (c) Histogram of microbubbles' velocities for a total count of 541 k microbubble trajectories. (Bin width : 1 mm/s, see supplementary video 2)</p>	132



3.8	Significant increase in resolution and sensitivity (a) Coronal slice of micro Power Doppler CEUS imaging. (b) 2 mm coronal slice of 3D ULM intensity rendering at bregma -2 mm. (c) 2 mm coronal slice of micro-CT with μ Angiofil perfusion with MIP rendering. (d) 3D rendering with alpha composition mode with Amira of <i>in vivo</i> ULM compared to (e) <i>ex vivo</i> micro-CT. (See supplementary video 3)	133
3.9	(a) Manually selected blood vessels with longitudinal and axial intensity projections and main velocity profiles. The percentage represents the ratio of intensity inside the estimated radius, over a disk of 2 radii. (b) Fourier Shell Correlation computed from two subsets of the list of microbubble trajectories. The intersection with the $2\text{-}\sigma$ curve gives the maximal consistent spatial frequency.	134
3.10	(a) Rendu 3D ULM d'un cerveau de rat avec craniectomie. (b-c) Intensité maximale projetée d'une tranche axiale avec et sans correction de la position des transducteurs. (Barre d'échelle : 1 mm)	142
3.11	(a) Schéma de la procédure de calibration des positions des transducteurs. (b) Sonde ultrasonore et hydrophone.	143
3.12	Détection des temps de vol entre les transducteurs et les positions de l'hydrophone.	143
3.13	Positions mesurées des transducteurs (points noirs), et orientations des quatre panneaux de la sonde matricielle.	144
3.14	Procédure de craniectomie du rat. Incision de la peau au-dessus de la suture sagittale, puis fraisage des os pariétaux pour exposer le cerveau en préservant la dure-mère.	145
3.15	Imagerie 3D ULM du cerveau de rat avec craniectomie.	146
3.16	Identification des principales artères de la base du cerveau sur des coupes coronales (en haut) et sagittales (en bas) d'un volume ULM. Les positions antero-postérieures sont indiquées en haut, en mm par rapport à <i>Bregma</i> . Tranches d'épaisseurs $400\ \mu\text{m}$ en coronal et $800\ \mu\text{m}$ en sagittal. Atlas vasculaire issu de [Xiong, 2017].	147
3.17	(a) Crâne de rat. Os frontal (1), pariétal (2), temporal (3), interpariétal (4). (b) Projection axiale d'un volume ULM (MIP), (c) vue coronale.	148
3.18	(a) Système de calibration avec sonde ultrasonore, le crâne de rat, et l'hydrophone sur platine motorisée. (b) Mesures des PNP et PPP le long de l'axe coronal, de part et d'autre de la suture sagittale.	148
3.19	Mesure de pics de pressions avec (<i>skull</i>) et sans crâne (<i>ref</i>) pour différents angles d'émission.	149
3.20	Projections axiales et coronales pour plusieurs nombres de volumes acquis de 10 sec à 7 min.	150
3.21	(a) Indice de saturation en fonction du nombre de volumes acquis, les valeurs indiquées correspondent au temps de traitement ULM 3D. (b) Courbes de saturation pour plusieurs tailles de voxels reconstruits.	151
3.22	Imagerie 3D ULM du cerveau de souris avec crâne intact.	152
4.1	3D ULM for <i>in vivo</i> angiography in early phase of stroke's models.	161
4.2	Microvascular diffusion index reflects the vascularization density.	163
4.3	MCA occlusion ischemic stroke observed with 3D ULM in the early phase.	164
4.4	Sudden and massive loss of perfusion in the cortex.	165
4.5	Collagenase induced hemorrhage in the striatum observed with 3D ULM in the early phase.	167
4.6	Graduated perfusion loss of the hemorrhage model in the striatum.	168
4.7	Comparison ischemic and hemorrhagic model.	169



5.8	Évolution de l'ULM 3D au cours de la thèse. Les trois premières images sont issues des mêmes données, seul le traitement a été amélioré.	176
5.9	Absence de capillaires en imagerie ULM dans certaines zones du cerveau (étoiles jaunes) : (a) dans les ventricules dilatés d'un cerveau de rat avec craniectomie (imagerie 2D), (b) dans la partie ischémisée du cortex de rat, (c) dans le cortex de rat avec craniectomie ayant entraînée une hémorragie sous-arachnoïdienne avec vasospasme.	178
5.10	Évolution de ULM dans le cerveau	179
5.11	(a) Sondes matricielles 32×32 haute et basse fréquence. (b) Champ de vue pour la sonde haute fréquence (PW : <i>plane waves</i>), et basse fréquence (DW : <i>diverging waves</i>). (c) ULM avec la sonde basse fréquence : superposition de deux canaux dans l'eau. (d) projections latérale et en élévation. (Barre d'échelle : 5 mm) . . .	180



Liste des tableaux

1.1	Valeur d'atténuation en unité de Hounsfield pour le sang et les tissus cérébraux, échelle quantifiant la radiodensité. [Bendok, 2012]	10
1.2	Impédances acoustiques des milieux rencontrés dans le corps en $10^6 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [Chan, 2011].	22
1.3	Caractéristiques comparées à l'imagerie focalisée. [Montaldo, 2009]	33
1.4	Vitesse maximale détectable pour une distance maximale de déplacement pour $n = 2$ longueurs d'onde. (*cadence en imagerie ultra-rapide)	50
1.5	Génération des données en 2D et 3D	69
3.1	Pulse excitations parameters. The transmission frequency was set in both cases to 7,8 MHz. Pressures measured in water.	124
3.2	Vecteurs normaux des sous-ouvertures de la sonde, et erreurs de leurs centres par rapport au dessin initial.	144



Acronymes et anglicismes

- ACA** Artère Cérébrale Antérieure
ACM Artère Cérébrale Moyenne
APC Artère Postérieure Cérébrale
AVC Accident Vasculaire Cérébral
beamforming formation de voies
CBF *Cerebral Blood Flow* (débit sanguin cérébral)
CEUS *Contrast-Enhanced UltraSound* (échographie de contraste)
CPU *Central Processing Unit* (processeur central)
CT-scan *Computed Tomography Scan* (tomographie aux rayons X)
Cub-Interp *Cubic Interpolation* (Interpolation cubique)
FR *Frame Rate* (cadence d'imagerie)
FRC *Fourier Ring Correlation* (corrélation par anneaux de Fourier)
FWHM *Full Width at Half Maximum* (largeur à mi-hauteur)
Gauss-Fit *Gaussian fitting* (Déconvolution gaussienne)
GPU *Graphical Processing Unit* (processeur graphique)
HC Hémorragie Cérébrale
IC Infarctus Cérébral
IRM Imagerie par Résonance Magnétique
LCS Liquide CerebroSpinal
Lz-Interp *Lanczos Interpolation* (Interpolation Lanczos)
MDI *Microvascular Diffusion Index* (indice de diffusion microvasculaire)
MI *Mechanical Index* (indice mécanique)
micro-CT *Micro-Computed Tomography* (microtomographie aux rayons X)
MIP *Maximum Intensity Projection* (projection de l'intensité maximale)
NIRS *Near-InfraRed Spectroscopy* (spectroscopie dans l'infrarouge proche)
NVMexpress *Non-Volatile Memory express*
PALM *Photo-Activated Localization Microscopie* (microscopie par localisation photoactivée)
PAM *Photo-Acoustic Microscopy* (microscopie photo-acoustique)
PNP *Pic Negative Pressure* (pic de pression négative)
PPP *Pic Positive Pressure* (pic de pression positive)



- PRF** *Pulse Repetition Frequency* (fréquence de répétition des tirs)
- PSF** *Point Spread Function* (fonction d'étalement du point)
- RAM** *Random Access Memory*
- RCA** *Row-Column Array* (sonde lignes-colonnes)
- RF** radiofréquence
- RMSE** *Root Mean Square Error* (racine de l'erreur quadratique moyenne)
- RS** *Radial Symmetry* (symétrie radiale)
- scattering** diffusion des ondes
- SMLM** *Single-Molecule Localization Microscopy* (microscopie par localisation de molécules uniques)
- SNR** *Signal-to-Noise Ratio* (rapport signal sur bruit)
- Sp-Interp** *Spline Interpolation* (Interpolation spline)
- SSD** *Solid-State Drive*
- STORM** *STochastic Optical Reconstruction Microscopy* (microscopie de reconstruction optique stochastique)
- SVD** *Singular Value Decomposition* (décomposition par valeurs singulières)
- switch** commutateur, multiplexeur
- TEP** Tomographie par Émission de Positons
- tPA** Activateurs Tissulaires du Plasminogène
- TPLSM** *Two-Photon Laser Scanning Microscopy* (microscopie par excitation à deux photons)
- tracking** suivi de trajectoire
- trigger** déclencheur
- ULM** *Ultrasound Localization Microscopy* (microscopie par localisation ultrasonore)
- UNV** Unités NeuroVasculaires
- WA** *Weighted Average* (Moyenne pondérée)



Chapitre 1

Introduction générale

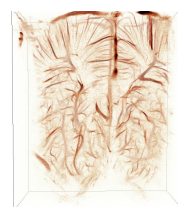
Objectifs

L'accident vasculaire cérébral est une perte subite de la vascularisation du cerveau. La prise en charge doit être rapide avec une étape d'imagerie pour caractériser l'AVC et associer un traitement. Les développements en imagerie ultrasonore haute cadence ont ouvert de nouvelles techniques d'imagerie *in vivo*. En particulier, la microscopie par localisation ultrasonore améliore la résolution et la sensibilité de manière non invasive et à moindre coût. Mais cette imagerie 2D se heurte à la projection en élévation réduisant le champ de vue et sa sensibilité pour le diagnostic cérébral. L'imagerie ultrasonore 3D pourrait solutionner ces limites mais entraîne des contraintes de conception, d'acquisition et de traitement. L'objectif de ce chapitre est d'introduire les concepts mis en jeu dans ce travail de recherche.

Sommaire

1	L'accident vasculaire cérébral	3
1.1	Vascularisation et microvascularisation	3
1.2	L'accident vasculaire cérébral	4
1.3	Des traitements possibles	6
1.4	Parcours fléchés pour l'AVC	7
1.5	Enjeu de l'imagerie en phase précoce	8
2	Imagerie pour le diagnostic médical	9
2.1	Observer pour comprendre	9
2.2	Méthodes d'imagerie cérébrale	9
2.3	Imagerie de la microvascularisation	16
2.4	Imagerie dans le contexte de l'AVC	20
3	L'imagerie échographique	21
3.1	Principe de l'imagerie échographique	21
3.2	Échographie conventionnelle, par ondes focalisées	25
3.3	Imagerie ultra-rapide	32
4	Microscopie par Localisation Ultrasonore	37
4.1	Microscopie par localisation optique	38
4.2	Principe de la microscopie par localisation ultrasonore	40
4.3	Mesure de résolution et qualité d'une image ULM	54
4.4	Applications de la microscopie par localisation ultrasonore	56

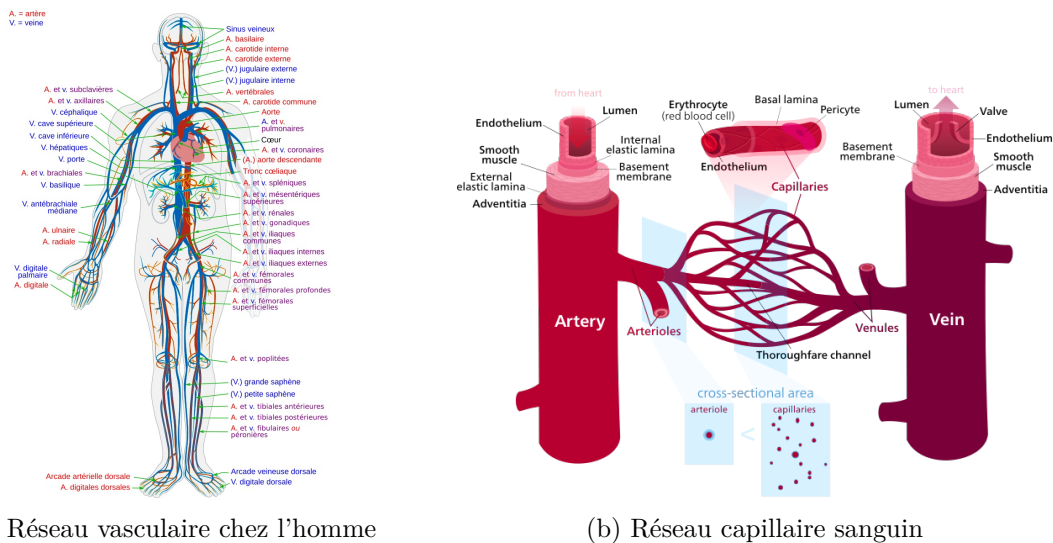
4.5	Limitations de l'imagerie 2D et premiers résultats 3D	60
5	Imagerie volumétrique ultrasonore	62
5.1	Nécessité d'une imagerie volumétrique	62
5.2	Vers l'imagerie 3D haute cadence	62
5.3	Échographie 3D haute cadence	65
5.4	Microscopie par localisation ultrasonore en 3D	68
6	Objectifs de la thèse	71
6.1	Comparaison et évaluation des algorithmes de localisation pour l'ULM 2D	71
6.2	Imagerie volumétrique avec sonde multiplexée pour la microscopie par localisation ultrasonore	72
6.3	Étude préclinique du diagnostic de l'AVC en phase aiguë	72



1 L'accident vasculaire cérébral

1.1 Vasularisation et microvascularisation

Le corps humain est un système complexe composé d'une multitude d'organes aux fonctions propres diverses et variées, allant de la contraction musculaire au contrôle des actions. Ces organes fonctionnent en symbiose : pour opérer un déplacement mécanique, un muscle doit recevoir une information via le système nerveux, et avoir un apport d'énergie. Plusieurs réseaux sont chargés de convoier les informations, l'énergie, les ressources : le système nerveux, le réseau sanguin, le réseau lymphatique, le système digestif et urinaire [fig. 1.1a].



(a) Réseau vasculaire chez l'homme

(b) Réseau capillaire sanguin

FIGURE 1.1 – (a) Le réseau vasculaire est composé des réseaux artériel et veineux. (b) Les capillaires sanguins réalisent la jonction entre les réseaux artériel et veineux. Ils permettent des échanges moléculaires avec les cellules environnantes. [Wikimedia Commons]

Le réseau sanguin occupe une place clé dans ce système. Il est en charge du transport et des échanges de nombreuses substances entre les différents organes du corps. Les poumons fournissent un apport en oxygène dans le sang, qui est ensuite acheminé et consommé par différents organes comme le cerveau ou le cœur. Un vaste réseau ramifié est alors nécessaire pour approvisionner en sang toutes les parties du corps humain. À l'âge adulte, sa longueur totale est estimée à 100 000 km. Le réseau se caractérise par deux ramifications, d'un côté le réseau artériel qui part du cœur via l'aorte et se divise en artères (diamètre 0,3-10 mm), et artérioles (10-300 μm). Il est responsable de l'apport des nutriments et de l'oxygène aux cellules. De l'autre côté, le réseau veineux est composé de veines (0,1-10 mm), veinules (10-100 μm), et permet le rejet du dioxyde de carbone vers les poumons via les veines caves et les artères pulmonaires. Entre les deux, se trouve le réseau capillaire [fig. 1.1b]. Aussi appelé lit capillaire, c'est un enchevêtrement de petits canaux de quelques micromètres de diamètre (5-10 μm). Ces petits vaisseaux fins sont tapissés d'une seule couche de cellules endothéliales qui rendent possibles les échanges moléculaires entre le sang et les cellules.

Le cerveau, organe pilote de notre corps, possède une architecture vasculaire particulière



permettant d'irriguer en quantité les cellules cérébrales. Bien que ne représentant que 2% de la masse du corps, sa consommation en oxygène et nutriments représente 20% des besoins de l'organisme en moyenne. Pour fournir un tel apport en oxygène et nutriments, le sang arrive au niveau de la tête par les artères carotides et vertébrales, puis se répartit dans le polygone de Willis d'où partent les artères cérébrales [fig. 1.2]. Les différentes artères perfusent ensuite de larges territoires vasculaires. On peut citer les artères cérébrales moyennes (ACM) qui irriguent les parties latérales du cortex, et les artères cérébrales antérieures (ACA) qui alimentent la partie centrale du cortex.

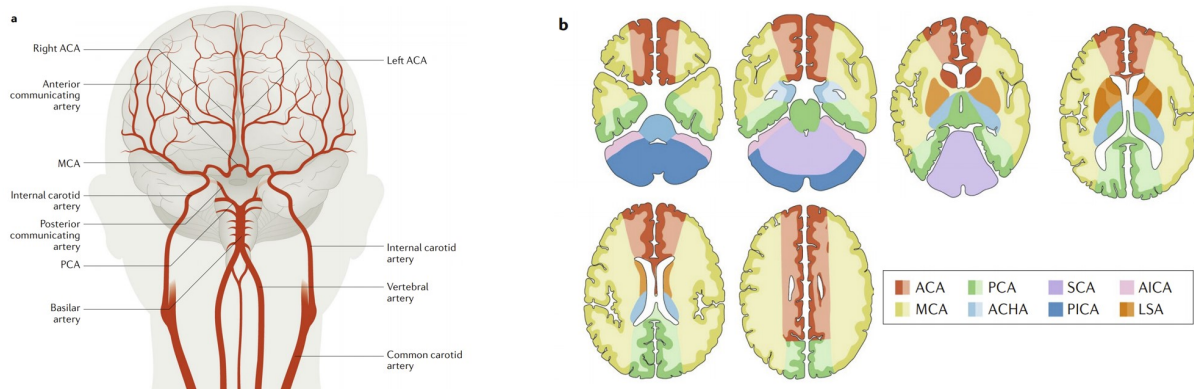


FIGURE 1.2 – (a) Principales artères du cerveau humain, et les territoires vasculaires associés (b). [Campbell, 2019]

Lors d'une activité fonctionnelle intense, les besoins des neurones augmentent et un apport d'énergie supplémentaire est nécessaire. Cet apport se traduit par une augmentation du flux sanguin dans le cerveau et dans la zone fonctionnelle en question : c'est le couplage neuro-vasculaire. A l'inverse, en cas de diminution ou perte du flux sanguin, les tissus se retrouvent privés d'apport en oxygène, c'est l'hypoxie. Les neurones ne sont alors plus capables de réaliser les tâches fonctionnelles désirées. Contrairement aux muscles, les réserves dans le cerveau sont très faibles et le manque d'oxygène devient critique très rapidement, entraînant la mort des neurones. C'est le cas par exemple lors d'un accident vasculaire cérébral.

1.2 L'accident vasculaire cérébral

L'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) est un arrêt brutal de la vascularisation d'une partie du cerveau. Cette perte de flux sanguin provoque une hypoxie des tissus, suivie de la mort des cellules cérébrales [Bendok, 2012]. Un œdème cérébral se développe peu après en réponse à l'inflammation, entraînant une compression des tissus et une hypertension intracrânienne.



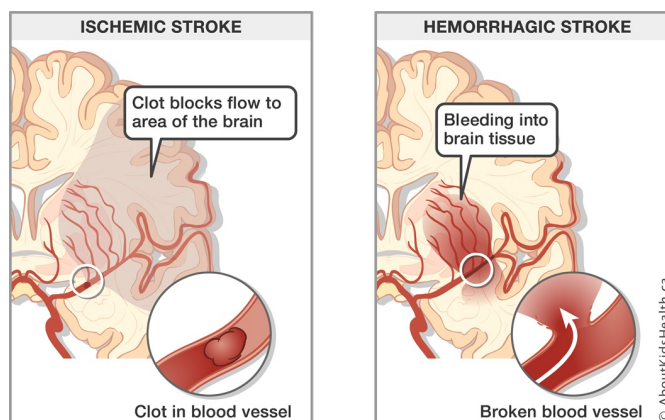


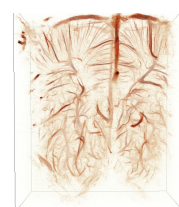
FIGURE 1.3 – L'Infarctus Cérébral est une occlusion d'une artère cérébrale, bloquant l'irrigation du territoire aval. L'Hémorragie Cérébrale résulte d'une rupture d'une artère dans le cerveau avec un épanchement sanguin. [AboutKidHealth.ca, 2021]

Deux types d'AVC existent : les AVC ischémiques ou **Infarctus Cérébral (IC)**, et **Hémorragie Cérébrale (HC)**. L'IC est causé par la formation ou la remontée vers le cerveau d'un caillot, ou thrombus. Ces caillots sont composés principalement de plaquettes, globules rouges et de fibrines, et peuvent se former au niveau du cœur avec la coagulation de sang mal évacué (origine cardio-embolique), ou au niveau de plaques d'athéromes¹ dans les grosses et moyennes artères comme les artères carotides ou de l'arche aortique (origine athéromateuse). En arrivant dans les ramifications plus fines, ils viennent occlure une artère et bloquent l'irrigation de la zone en aval. L'HC est un saignement suite à la rupture dans le réseau sanguin. Dans la plupart des cas, cette rupture intervient lors de malformations artérioveineuses comme un anévrisme. Dans la plupart des cas, les AVC sont d'origine ischémique (80%), et les 20% restant associés à des hémorragies cérébrales.

L'AVC est une pathologie tristement répandue avec plus de 13 millions de cas par an dont 5,5 millions de décès [Lindsay, 2019 ; Feigin, 2019]. En France, 150 000 personnes sont victimes d'un AVC chaque année [Solidarité-santé.gouv]. Parmi elles, 110 000 sont hospitalisées, et 30 000 décèdent, faisant de cette pathologie la 3^{ème} cause de mortalité après les cancers et l'infarctus du myocarde. C'est également la première cause de handicap acquis chez l'adulte, avec des séquelles importantes qui peuvent être réduites avec la prise en charge et une rééducation spécifique.

Une des caractéristiques particulières de l'AVC est sa brutalité avec une apparition subite, locale avec pertes neuronales dès les premiers instants. On estime que 2 millions de neurones sont perdus chaque minute [Saver, 2006], contre 85 000 par jour en temps normal. Au total, la perte suite à un AVC peut atteindre 1,2 milliards de neurones, équivalent à 36 années de vieillissement naturel du cerveau. Dès l'apparition de l'hypoxie dans une zone, les symptômes commencent avec des troubles fonctionnels correspondants à la zone cérébrale atteinte. Les principaux symptômes sont des troubles de la parole, une faiblesse des membres d'un côté du corps, et une déformation asymétrique de la bouche (Ministère des solidarités et de la santé). La prise en charge doit alors se faire le plus rapidement possible pour préserver les cellules cérébrales

1. Dépôt graisseux sur une partie interne de la paroi des artères.



et limiter les séquelles irréversibles. Lors d'une ischémie, trois zones peuvent être distinguées : le foyer ischémique (perte irréversible), la pénombre (perte réversible) et l'oligémie² (pas de perte). Le foyer ischémique subit une nécrose avec des pertes irréversibles, mais la pénombre peut être sauvée si la vascularisation est rétablie rapidement.

Trois phases sont définies pour caractériser les étapes de l'AVC :

Phase aiguë : jusqu'à 14 jours après l'AVC

Phase subaiguë : jusqu'à 6 mois après l'AVC

Phase chronique : au delà de 6 mois après l'AVC

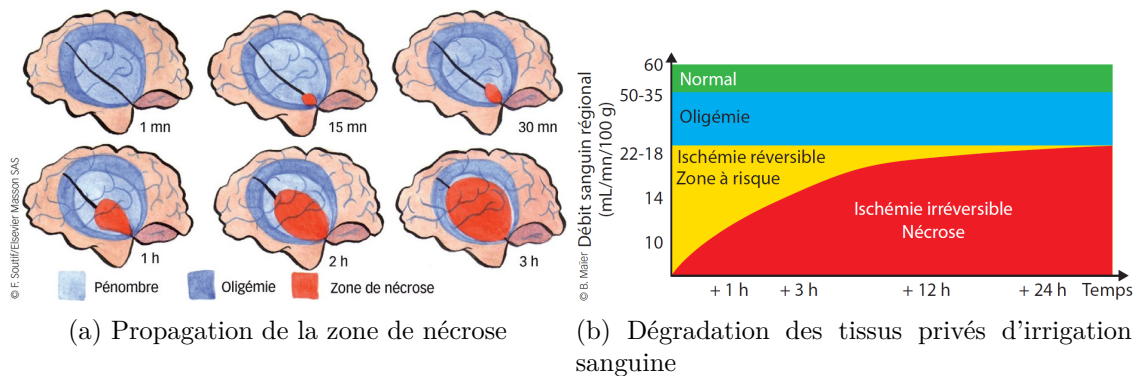


FIGURE 1.4 – Différentes zones d'influence de l'ischémie et leurs évolutions temporelles en l'absence de traitement : zone de nécrose, pénombre et oligémie (a). (b) Face à une perte de débit sanguin prolongé, la pénombre dérive en nécrose, avec des pertes irréversibles. [Maier, 2018]

1.3 Des traitements possibles

1.3.1 Traitements de l'ischémie

Dans les cas ischémiques, des traitements sont possibles pour recanaliser le territoire ischémique et sauver la pénombre. Ils doivent être administrés dans les premières heures pour avoir une balance bénéfices-risques positive. Au-delà d'une certaine fenêtre horaire, les traitements anti-coagulants deviennent trop risqués avec l'apparition d'hémorragies, aggravant l'état du patient. Les principaux traitements sont détaillés ci-dessous. D'autres traitements moins courants sont détaillés dans la littérature [Bendok, 2012].

Thrombectomie mécanique : Elle est autorisée en France jusqu'à 6 h après les premiers symptômes de l'AVC. Elle consiste à venir chercher le thrombus *in situ* à l'aide d'un cathéter pour rétablir le flux sanguin. Le cathéter est inséré au niveau de l'artère fémorale et remonté jusqu'aux artères cérébrales. Cette technique est utilisée principalement pour les occlusions des premières grosses artères, facilement accessibles par les carotides. Elle peut être accompagnée d'un traitement anticoagulant ou antiagrégant plaquettaire pour faciliter la circulation sanguine. À noter que des études sur la fenêtre thérapeutiques montrent un intérêt jusqu'à 24 heures après le début de l'ischémie [Nogueira, 2018].

2. chute du débit sanguin



Thrombolyse pharmacologique : C'est une substance qui va dégrader le caillot, souvent constitué de fibrine, protéine fibreuse du processus de coagulation. L'injection de tPA³ déclenche le processus de fibrinolyse par sécrétion de plasmine qui dissout le caillot. La fenêtre thérapeutique est limitée à 4h30. Au-delà, les risques d'hémorragies intracérébrales deviennent trop élevés avec saignement intra ou extra-cérébral.

1.3.2 Traitements de l'hémorragie

Le traitement de l'hémorragie est plus complexe et rare. En cas de rupture d'anévrisme, celui-ci peut être isolé de la circulation sanguine en posant une pince (clip) par intervention chirurgicale. Il peut aussi être comblé par un fil de platines (*coil*) pour éviter un nouveau saignement. La surpression intracrânienne induite par un saignement peut être diminuée chirurgicalement, en retirant l'épanchement sanguin ou le LCS⁴.

1.4 Parcours fléchés pour l'AVC

L'AVC ischémique et l'hémorragie cérébrale présentent les mêmes symptômes mais des traitements très différents. Deux problématiques se posent alors pour la prise en charge de l'AVC : le diagnostic du type d'AVC, et le temps entre les débuts des symptômes et l'administration d'un traitement adapté. Le diagnostic doit donc être précis et rapide pour un traitement efficace et limiter les séquelles. En France, pour accélérer la prise en charge, 132 Unités NeuroVasculaires (UNV) quadrillent le territoire national [fig. 1.5]. Elles assurent une prise en charge en urgence des suspicions d'AVC, avec un plateau d'imagerie disponible 24h/24 pour un diagnostic dans les plus brefs délais. Une expertise neuro-vasculaire est apportée pour définir une orientation adaptée à chaque patient. En l'absence d'une expertise directe sur site, elle peut être réalisée par "télé AVC" avec l'avis et l'interprétation d'un médecin radiologue ou neuroradiologue à distance. Une équipe médicale dédiée peut ensuite réaliser une thrombolyse pharmacologique ou une thrombectomie mécanique.

3. Activateurs Tissulaires du Plasminogène

4. Liquide CerebroSpinal



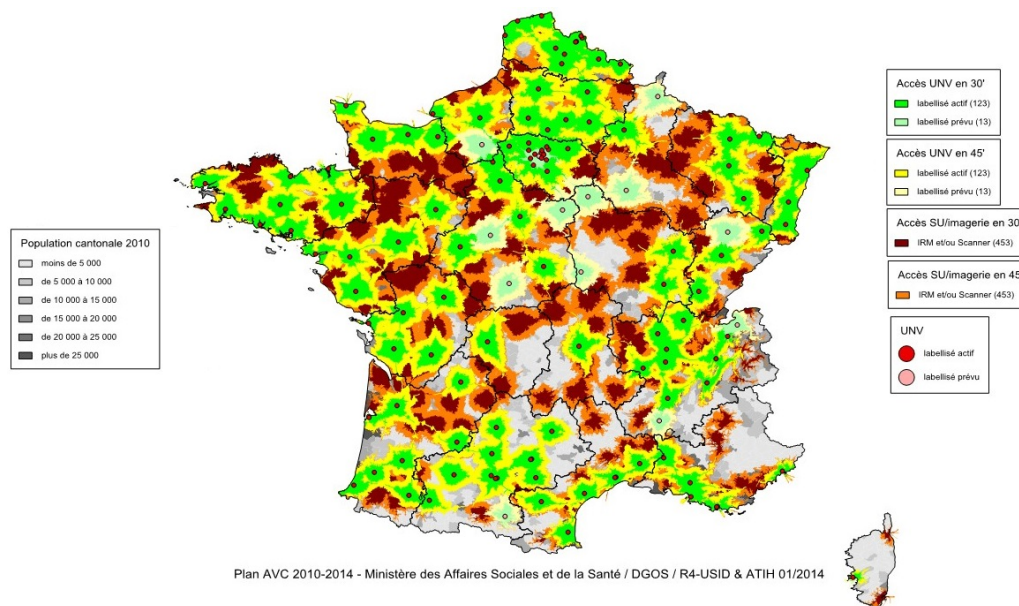


FIGURE 1.5 – Temps d’accès aux Unités NeuroVasculaires (UNV) actuelles et prévues et aux urgences avec plateau d’imagerie, en 2014. [France AVC⁵]

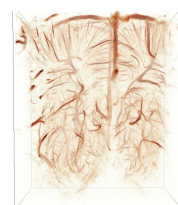
Le ministère de la Santé a mis en place le plan AVC entre 2010 et 2014 pour diminuer la mortalité et le handicap suite à un AVC. Quatre grandes actions ont été lancées pour améliorer la prévention et l’information pour la population, mettre en place des filières de prise en charge et des systèmes d’information adaptés, assurer l’information et la formation des professionnels, et promouvoir la recherche⁶. Ce plan a permis d’augmenter à 89 % l’accès à l’expertise neurovasculaire pour les patients, ainsi que l’évaluation par un professionnel de la rééducation. Pour les patients atteints d’infarctus cérébraux, le taux de thrombolyse était de 14,2 % en 2017 (contre 11,8 % en 2015, et 1 % en 2008), avec un temps médian entre l’arrivée dans l’UNV et l’administration médicamenteuse de 1h09 (contre 2h55 en 2015). Les thrombectomies mécaniques sont plus rares, car les établissements doivent être équipés d’un plateau de neuroradiologie interventionnelle. Après exclusions des patients arrivés trop tard ou exclus pour contre-indication, seulement 4 % des IC bénéficient de ce type de prise en charge.

1.5 Enjeu de l’imagerie en phase précoce

L’enjeu de l’imagerie est donc double : avoir un diagnostic précis pour distinguer l’hémorragie de l’ischémie, et une grande disponibilité pour réduire le temps d’attente avant le traitement. En 2006, le délai médian entre le début des symptômes et l’arrivée à l’hôpital était de 3h07, et le temps entre l’arrivée et la réalisation de l’imagerie était de 1h42 (Société Française de Médecine d’Urgence) avec une IRM ou une tomodensitométrie par rayons X.

5. Plan AVC 2010-2014, Ministère des Affaires Sociales et de la Santé / DGOS / R4-USID ATIH 01/2014

6. Haute Autorité de Santé, Prise en charge initiale de l’accident vasculaire cérébral - Campagne 2017



2 Imagerie pour le diagnostic médical

2.1 Observer pour comprendre

L'observation des phénomènes biologiques est souvent nécessaire à leur compréhension. Mais elle n'est pas toujours possible avec l'œil humain. En effet la lumière peut traverser les premières couches de la peau pour éclairer au travers, mais la diffusion induite par les tissus brouille la vision précise. L'examen visuel se limite alors à la surface de la peau ou des tissus intérieurs par endoscopie. Pour visualiser l'intérieur du corps, en coupe virtuelle, il faut recourir à d'autres méthodes d'observations.

Un grand nombre de méthodes d'imagerie sont utilisées avec des champs d'applications divers et variés. Les systèmes d'imagerie peuvent avoir des caractéristiques très différentes en termes de sensibilité, spécificité, résolutions spatiales et temporelles, disponibilités... Elles apportent chacune une vision particulière du corps humain, qui ne serait pas accessible à l'œil humain.

Les débuts de l'imagerie médicale remontent aux travaux de Wilhelm Röntgen en 1895 avec la découverte de la radiographie. Au cours d'une expérience, il remarque que les rayons X ont la capacité à traverser les objets avec plus ou moins de facilité. Après avoir testé sur lui-même, il utilisera la main de sa femme pour produire la première radiographie humaine [fig. 1.6]. Cette première technique d'imagerie met en évidence la présence de matériaux plus absorbants aux rayons X dans le corps : les os par rapport aux tissus mous, *in vivo* et de manière non invasive (ou faiblement à cause de l'exposition aux rayonnements). Ses travaux seront récompensés par un prix Nobel en 1901.



(a) 1895



(b) 1896

FIGURE 1.6 – (a) Première radiographie par Wilhelm Röntgen, main de son épouse Anna Bertha Ludwig. (b) Quelques mois plus tard, la bague de la main de Albert von Kölliker, ami de Wilhelm Röntgen, se distingue clairement. [Domaine public]

2.2 Méthodes d'imagerie cérébrale

2.2.1 Tomodensitométrie par rayons X

La tomodensitométrie par rayons X est une application directe de la radiographie. Les rayons X sont envoyés à travers le corps et récupérés sur un capteur. Plus le rayon aura traversé



des objets absorbants, plus le signal sera faible sur le récepteur. On obtient une projection bidimensionnelle de l'absorption de corps : l'intensité de l'image reflète l'absorption des rayons X par la traversée des différentes couches du corps. La radiographie est particulièrement utilisée pour l'imagerie des fractures osseuses avec un très bon contraste pour les os [table. 1.1].

Tissu	[UH]	Tissu	[UH]	Tissu	[UH]
Air	-1000	Matière blanche	20 à 30	Muscle	40
Gras	-100 à -50	Matière grise	40 à 45	Calcifications	120 à 200
Eau	0	saignement (subaigu)	30 à 50	Os	1000
LCS	15	saignement	40 à 90		

TABLE 1.1 – Valeur d'atténuation en unité de Hounsfield pour le sang et les tissus cérébraux, échelle quantifiant la radiodensité. [Bendok, 2012]

En faisant tourner le capteur et l'émetteur autour de l'objet à imager, on obtient une multitude de projections qui peuvent être converties en un volume 3D : c'est la tomodensitométrie aux rayons X, aussi appelée scanner, ou **CT-scan**⁷). Elle permet une exploration en 3D du corps humain avec une résolution inférieure au millimètre et une résolution temporelle de l'ordre de 100 ms.

L'imagerie peut être réalisée avec injection d'un produit de contraste : l'iode, qui absorbe fortement les rayons X. Le niveau d'absorption rehaussé permet alors de visualiser le passage de l'agent de contraste : l'arborescence vasculaire [fig. 1.7c]. La technique peut également être utilisée *ex vivo* pour obtenir une résolution spatiale beaucoup plus fine, mais avec une procédure terminale et la perte de résolution temporelle. Elle sera détaillée dans la section 2.3.4.

L'exposition aux rayons ionisants induits par cette imagerie doit cependant être contrôlée pour éviter tout risque de dérèglements cellulaires pouvant provoquer par exemple des cancers. À titre de comparaison, une imagerie tomographique du cerveau est équivalente à environ 10 mois d'exposition à la radiation naturelle (environ 2 mSv).

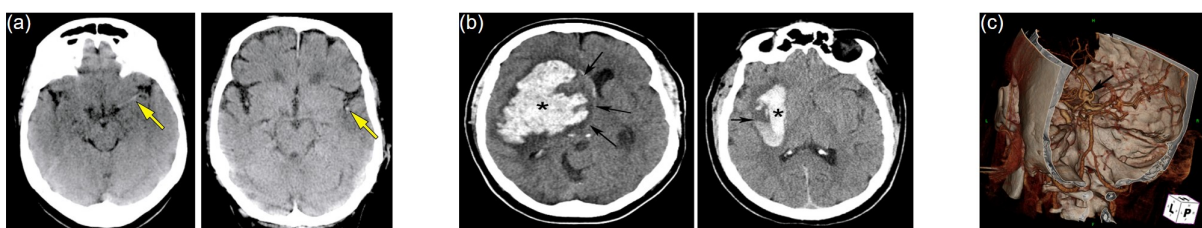


FIGURE 1.7 – **CT-scan** de l'AVC. (a) Ischémie cérébrale avec artère occlue en hyperdense (flèches jaunes) [Muir, 2006]. (b) Hémorragies cérébrales avec hématome dans le parenchyme hyperdense (étoiles noires). (c) CT Angiographie d'un anévrisme avec agent de contraste [Birenbaum, 2011].

Le scanner pour le diagnostic de l'AVC

Le scanner est utilisé pour le diagnostic l'AVC pour exclure l'hémorragie cérébrale. Le sang coagulé ayant une absorption plus élevée, la zone de l'hémorragie apparaît hyperdense par rapport au tissu sain [table. 1.1]. Les signes de l'ischémie sont plus subtils à déceler et dépendent de

7. *Computed Tomography Scan* (tomographie aux rayons X)



la phase de l'ischémie. Lorsque le scanner est suffisamment sensible et le thrombus gros, celui-ci peut apparaître hyperdense [fig. 1.7a]. Cependant, l'absence de détection ne doit pas exclure la présence d'une ischémie. Quelques heures après le début de l'ischémie, la zone hypo-perfusée est sujette à l'œdème qui se traduit par une hypodensité qui va augmenter progressivement au cours du temps. Si aucune trace d'hémorragie n'est visible au scanner, la procédure de thrombolyse peut être déclenchée.

Dans ce contexte, le scanner est souvent utilisé en première instance pour sa spécificité à l'hémorragie et sa disponibilité dans les hôpitaux. Son aspect 3D facilite l'interprétation de l'imagerie, du cerveau, sur toute sa profondeur. Néanmoins son utilisation ne peut être répétée pour le suivi de l'AVC à cause de la radiation induite.

2.2.2 Imagerie par résonance magnétique

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) exploite les propriétés magnétiques de spin des protons dans les atomes pour obtenir les propriétés des tissus. Il est composé d'un puissant aimant supraconducteur qui force les spins à s'aligner suivant un champ magnétique. D'autres champs magnétiques (appelés champs radiofréquences) viennent créer des hétérogénéités d'alignement des spins induisant des fréquences de précessions différentes. Un réseau d'antennes mesure ces petites variations de champ magnétique. Pour localiser ces variations, des gradients sont appliqués et permettent de remonter à la zone de ces variations. Les caractéristiques de relaxation des spins (réalignement des spins avec le champ de l'aimant supraconducteur) varient suivant les matières présentes dans le corps. Différentes séquences (enchaînement de perturbation des spins) sont utilisées pour exhiber certaines matières, notamment l'eau (et l'œdème), les graisses, les matières osseuses (os et calcifications) [fig. 1.8]. On obtient un volume entier de toute la tête, et du cou si nécessaire, avec une résolution de l'ordre du millimètre pour la plupart des installations (pour les IRM 3 Tesla). L'examen est non invasif et non irradiant, et peut durer une demie-heure en moyenne.

Des séquences spécifiques dites de diffusion mesurent le coefficient de diffusion des molécules d'eau avec une valeur quantitative. Elles mettent en avant les zones œdémateuses [fig. 1.8a], et peuvent être utilisées pour visualiser l'orientation des fibres de matières blanches dans le cerveau. Un produit de contraste, le gadolinium, peut également être injecté pour rehausser le signal du sang et obtenir une angiographie précise des principaux vaisseaux sanguins de la tête [fig. 1.8i].



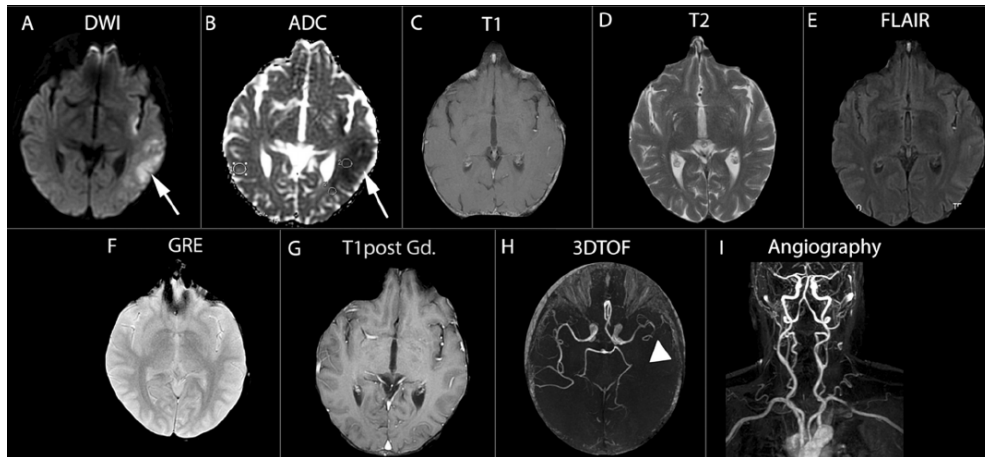


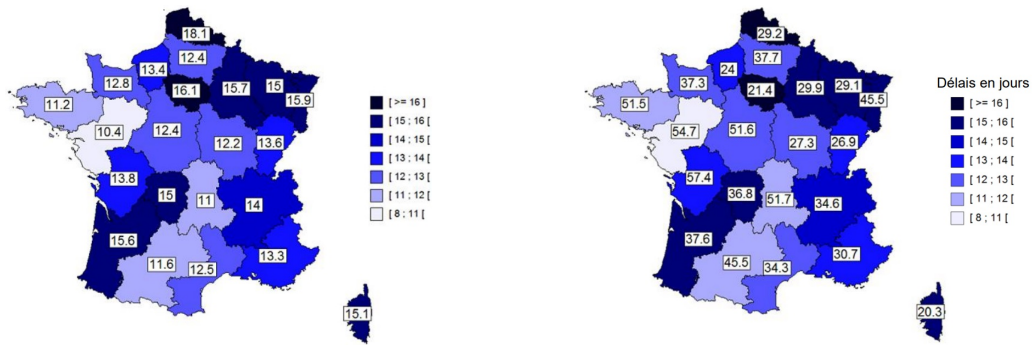
FIGURE 1.8 – Différentes séquences utilisées pour une ischémie en phase aiguë : (a) diffusion, (b) coefficient apparent de diffusion, (c) T₁, (d) T₂, (e) FLAIR, (f) écho de gradients, (g) T₁ avec gadolinium, (h) angiographie temps de vol, (i) angiographie par résonance magnétique. [Roldan-Valadez, 2014]

L'IRM pour le diagnostic de l'AVC

L'IRM est utilisé pour le diagnostic en phase aiguë avec une séquence de diffusion. Cette séquence met en évidence les prémices de l'œdème à moins d'une heure. Son caractère non invasif et non irradiant lui permet d'être répété les jours suivant la prise en charge du patient, à la différence du scanner. La Haute Autorité de Santé recommande ce diagnostic en priorité car il permet d'identifier les signes d'une ischémie récente ou une hémorragie intracrânienne. Cependant, le coût d'une installation d'IRM est un frein à son développement de grande ampleur sur tout le territoire. En particulier dans les territoires isolés [fig. 1.9], l'accès à une IRM disponible et proche pour le diagnostic rapide peut s'avérer difficile. Parmi les établissements prenant en charge l'AVC, 65 % sont dotés d'une IRM, et seulement 53 % d'entre eux y ont accès 24h/24 7 jours/7. Ce manque de disponibilité fait chuter à 1/3 l'accès à l'IRM en première intention pour l'AVC⁸. En cas d'indisponibilité de l'IRM, la procédure d'imagerie doit se faire sans attendre avec le scanner.

8. Haute Autorité de Santé, Prise en charge initiale de l'accident vasculaire cérébral - Campagne 2017





(a) Nombre d'IRM par million d'habitants en 2017 (b) Délais moyens d'attente pour les rendez-vous d'IRM obtenus et estimés en 2017

FIGURE 1.9 – Accessibilité et disponibilité des équipements d'IRM en France en 2017. [SNITEM, 2017]

2.2.3 Tomographie par émission de positons

La **Tomographie par Émission de Positons (TEP)** utilise la médecine nucléaire pour détecter des particules radioactives, appelées traceurs. Ces particules sont injectées par voie intra-veineuse et sont localisées par des capteurs lors de leurs désintégrations. Connaissant la quantité et le comportement des traceurs, on obtient une imagerie quantitative du métabolisme des cellules. Par exemple, le CBF^9 peut être mesuré par l'injection de l'isotope 15 de l'oxygène [fig. 1.10]. On obtient alors une mesure quantitative de la consommation d'oxygène des neurones, avec une résolution spatiale inférieure au centimètre.

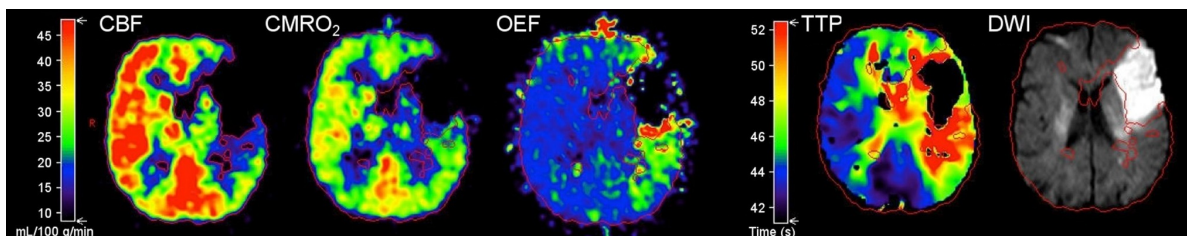
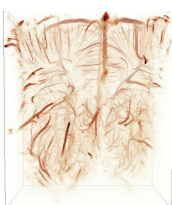


FIGURE 1.10 – Identification de la pénombre hypoperfusée par imagerie TEP (baisse du CBF) 5 heures après l'ischémie. Validation par imagerie IRM *Time-To-Peak* (temps au pic) et de diffusion (DWI). [Heiss, 2017]

La TEP pour le diagnostic de l'AVC

L'imagerie **TEP** apporte une information quantitative sur la consommation en oxygène des tissus, et permet l'identification de la pénombre réversible de l'ischémie [Heiss, 2017]. Son utilisation dans le cadre de la prise en charge rapide de l'AVC n'est pas encore préconisée en première instance, d'autant que sa disponibilité est encore plus limitée que celle de l'IRM.

9. *Cerebral Blood Flow* (débit sanguin cérébral)



2.2.4 Échographie

L'imagerie échographique utilise la propagation et la réflexion des ondes ultrasonores dans les tissus pour retrouver la position des particules réfléchives (globules rouges) et les variations d'impédances (interfaces entre tissus). À la différence de l'imagerie par rayons X qui projette l'absorption d'un corps, le champ de vue de l'échographie se limite à une tranche de l'anatomie sous la sonde échographique. L'examen échographique nécessite une phase exploratoire pour positionner la sonde et pour trouver le bon plan d'imagerie de l'organe désiré. Sa résolution temporelle très fine (plusieurs dizaines d'images par seconde) d'appliquer des filtrages temporels et révéler les flux dans les grosses artères et veines du cerveau. En utilisant l'effet Doppler induit par l'écoulement des particules dans le sang, la vitesse des flux peut être mesurée quantitativement. La résolution est également contrainte par la profondeur d'imagerie et le choix de la fréquence. Pour une imagerie en profondeur, la résolution devra être dégradée. L'imagerie cérébrale par ultrasons se heurte à la barrière du crâne fortement atténuante et aberrante pour les ondes ultrasonores. Elle se limite à l'imagerie des principales artères et veines à la base du cerveau (ACA¹⁰, ACM¹¹, cercle de Willis), lorsque l'épaisseur du crâne du patient le permet. Le principe de l'imagerie échographique sera détaillé dans la section 5.

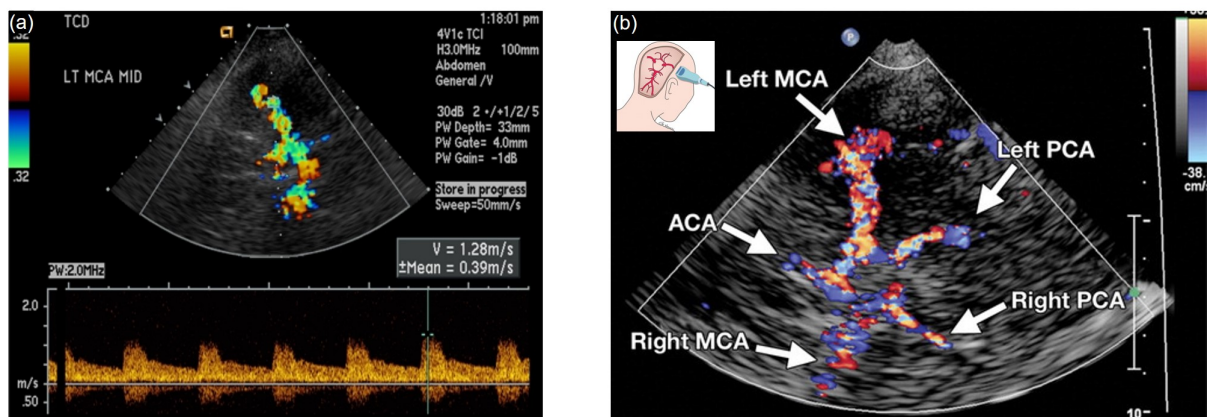


FIGURE 1.11 – (a) Imagerie Doppler transcrânienne de la ACM [Birenbaum, 2011]. (b) Imagerie du polygone de Willis via la fenêtre temporelle [Kirsch, 2013].

L'imagerie ultrasonore pour le diagnostic de l'AVC

Bien que cette imagerie ait des avantages forts : non invasive, non irradiante, faible coût, rapide et au lit du patient, son utilisation dans le cadre de l'AVC demeure quasi-inexistante à cause du manque de sensibilité et résolution pour les petites artères cérébrales et de la variabilité de la barrière du crâne. Même avec un crâne fin, la résolution pour une imagerie en profondeur est supérieure à 1 mm. Elle est surtout utilisée en dernière instance quand l'IRM et le scanner sont proscrits pour le patient, et pour le monitoring dans les jours qui suivent.

En utilisant l'imagerie Doppler, des caractérisations peuvent être réalisées sur les principales artères du cerveau et sur l'étude du spectre Doppler. Des symptômes de vasospasmes peuvent

10. Artère Cérébrale Antérieure

11. Artère Cérébrale Moyenne



être détectés dans les semaines suivant un AVC en comparant le spectre Doppler par rapport à une imagerie de référence réalisée en phase précoce [Kirsch, 2013 ; Purkayastha, 2012].

Certaines études ont tout de même démontré un intérêt clinique en phase précoce pour quantifier la perfusion des tissus avec injection d'un bolus d'agent de contraste lors d'une ischémie cérébrale [Seidel, 2009][fig. 1.12a-d], notamment grâce à l'évaluation du temps au pic du bolus (*Time To Peak*). Dans le cas de l'hémorragie, l'absence de microbulles dans la zone hypoperfusée apparaît en faible intensité [fig. 1.12e-f] en présence d'une bonne fenêtre d'imagerie et d'une lésion importante [Meyer-Wiethe, 2009].

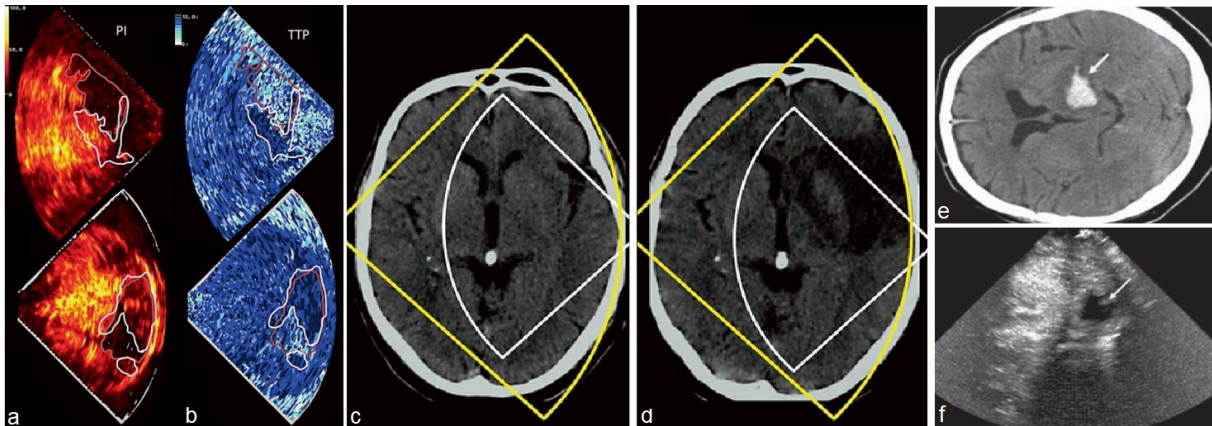


FIGURE 1.12 – Imagerie échographique transcrânienne d'une occlusion de l'ACM dans l'hémisphère gauche (a) *Peak to signal Intensity*, (b) *Time To Peak* (haut : ipsilatéral, bas : contralatéral) et comparaison par CT-scan à 1,5 h (c) et 38 h (d) après symptômes [Seidel, 2009]. Hémorragie cérébrale du thalamus avec CT-scan (e) et échographie avec agent de contraste (f) [Meyer-Wiethe, 2009].

2.2.5 Spectroscopie proche infrarouge

L'imagerie *Near-InfraRed Spectroscopy* (spectroscopie dans l'infrarouge proche) apporte une mesure quantitative de la consommation d'oxygène des tissus. Des rayons infra-rouges (700-1000 nm) pénètrent dans les premières couches du cerveau sur quelques centimètres et sont plus ou moins absorbés par l'hémoglobine du sang. L'hémoglobine oxygénée est moins absorbante et est donc plus réfléchive dans une région bien oxygénée. Son utilisation dans le périmètre de l'AVC demeure trouble : la région nécrosée ne consommant pas d'oxygène, l'hémoglobine reste chargée en oxygène et renvoie un signal normal. La zone de pénombre, privée également de sang renouvelé, va continuer à consommer l'oxygène dans le sang proche qui diminue le signal infrarouge [Nemoto, 2000]. Ce type d'imagerie n'est pas résolu, et donne une information moyennée sur une large zone du cerveau (plusieurs centimètres), avec une pénétration limitée de quelques centimètres seulement.

2.2.6 Autres méthodes d'imagerie indirectes

Le *Laser Doppler Flowmetry* (débitmètre par laser Doppler) utilise le principe de l'effet Doppler avec les globules rouges du sang et un rayon laser rouge guidé par une fibre optique. En



plaçant la fibre à la surface d'une artère, on peut suivre l'évolution du débit sanguin, notamment lors de la recanalisation après une ischémie chez le petit animal [fig. 1.13a][Orset, 2007].

Utilisant le même principe mais avec un capteur matriciel, le *Laser speckle contrasted imaging* permet la mesure du flux sanguin à la surface du cerveau. Il permet la visualisation des territoires privés de flux sanguin de manière indirecte en se basant sur la perfusion des tissus pour l'étude des modèles animaux [fig. 1.13b] [Anfray, 2021]. Ces deux techniques ne sont cependant pas utilisées pour l'imagerie du cerveau humain, principalement à cause du crâne.

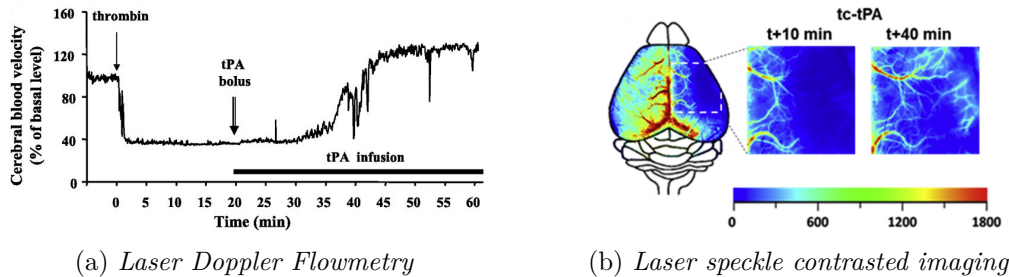


FIGURE 1.13 – (a) Suivi du flux sanguin artériel [Orset, 2007]. (b) Visualisation du territoire ischémique à la surface du cerveau de souris [Anfray, 2021].

2.3 Imagerie de la microvascularisation

2.3.1 Résolution et profondeur

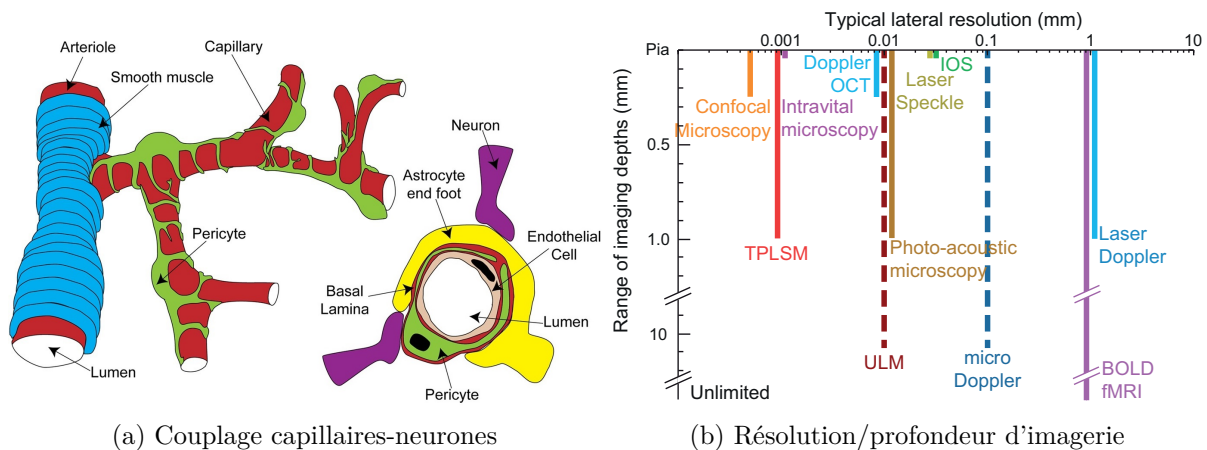


FIGURE 1.14 – (a) Organisation microvasculaire du couplage neuro-vasculaire autour des capillaires et neurones [Hamilton, 2010]. (b) Compromis résolution/profondeur d'imagerie pour la microvascularisation (adapté depuis [Shih, 2012]).

Les techniques présentées ci-dessus permettent d'imager les artères et veines cérébrales de manière directe (IRM angio, scanner avec agent de contraste), ou indirecte par une mesure de perfusion des tissus (*NIRS*, *laser speckle*), mais ne permettent pas de résoudre les niveaux vasculaires inférieurs : artérioles, veinules et capillaires. Or ce sont ces petites structures ramifiées qui irriguent les tissus en profondeur, où siègent les échanges moléculaires. En particulier dans le cerveau où le couplage neuro-vasculaire est très important [Hamilton, 2010], ce réseau capillaire



est responsable des apports aux neurones [fig. 1.14a].

Peu de méthodes permettent une imagerie *in vivo* en profondeur avec une résolution suffisamment fine [fig. 1.14b]. Actuellement, le TPLSM¹² est la technique qui accède à la plus fine résolution avec profondeur d'imagerie d'une millimètre [Shih, 2012]. Elle permet une meilleure résolution que l'imagerie PAM¹³.

2.3.2 Microscopie photo-acoustique

L'effet photo-acoustique est la transformation d'une énergie laser en une énergie mécanique par l'intermédiaire d'un objet absorbant et de la dilatation thermique de cet objet. En utilisant une excitation laser pulsée haute fréquence et un transducteur sensible à cette fréquence, on peut acquérir une carte d'absorption du tissu avec une résolution optique [Hu, 2010]. La focalisation peut se faire en optique (*optic resolution*), ou de manière acoustique (*acoustic resolution*) [fig. 1.15]. La résolution obtenue permet une imagerie de la microvascularisation avec une bonne sensibilité mais est limitée à une profondeur de l'ordre du millimètre. La spécificité de la détection apporte une information quantitative sur l'oxygénation des tissus, les débits sanguins, ou la concentration en hémoglobine [Yao, 2013].

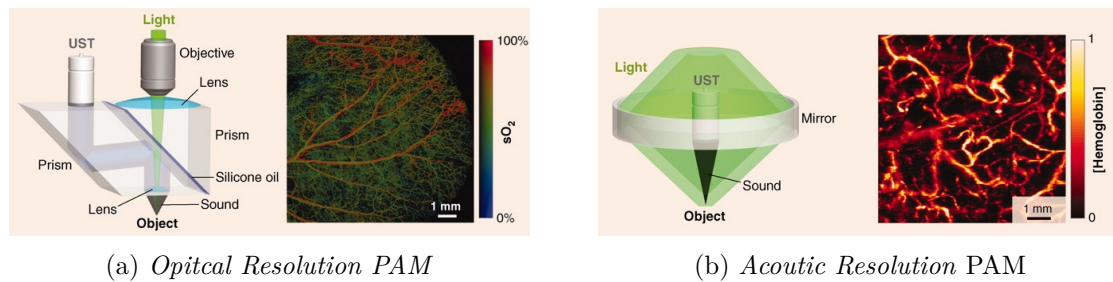


FIGURE 1.15 – Microscopie photo-acoustique (a) résolution optique (OR-PAM), (b) résolution acoustique (AR-PAM). [Wang, 2012]

2.3.3 Microscopie par excitation à deux photons TPLSM

Aussi appelée microscopie 2-photons, cette méthode utilise une émission stimulée de photons. Pour élever un électron depuis son niveau stable vers son niveau d'énergie excité, une quantité d'énergie définie doit être absorbée. Les photons d'excitations sont envoyés par un laser avec une énergie deux fois inférieure au delta des niveaux d'énergie. Pour passer au niveau excité, l'électron doit alors recevoir deux photons d'excitation arrivés au même moment [fig. 1.16 1a]. La probabilité que l'électron reçoive simultanément les deux photons est faible, et n'apparaît qu'au point focal du laser d'émission [fig. 1.16 1b]. Une fois excité, l'électron ré-émet un photon d'une énergie supérieure à celle d'un photon d'excitation. On parle alors de focalisation de l'excitation qui permet une localisation précise du lieu d'émission [Denk, 1990 ; Helmchen, 2005]. La focalisation se fait dans le plan d'imagerie, mais aussi en profondeur pour obtenir une imagerie 3D haute résolution. C'est une des seules méthodes d'imagerie *in vivo* qui obtient une résolution

12. *Two-Photon Laser Scanning Microscopy* (microscopie par excitation à deux photons)

13. *Photo-Acoustic Microscopy* (microscopie photo-acoustique)



micrométrique avec une profondeur de l'ordre du millimètre [fig. 1.14b], et avec une résolution temporelle suffisante pour mesurer la vitesse des globules rouges. L'imagerie peut être rendue spécifique, au sang ou aux astrocytes par exemple, en utilisant des marquages fluorescents ou des souches transgéniques [fig. 1.16c].

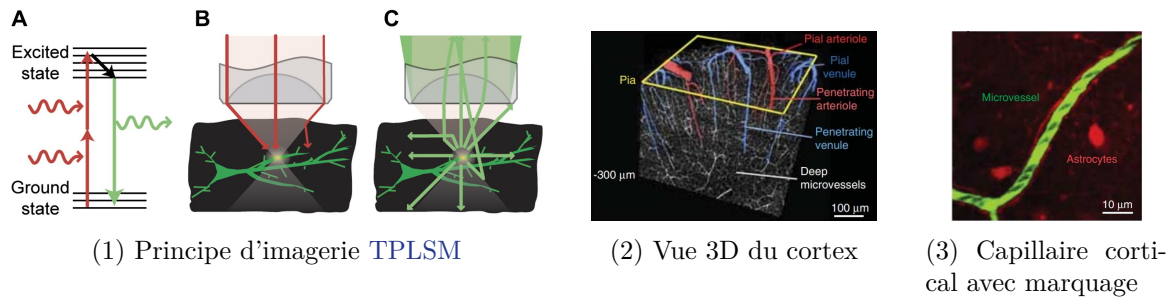


FIGURE 1.16 – (1) Principe d'imagerie 2-photons [Svoboda, 2006]. (2-3) Imagerie du cortex avec marquage du sang (vert), et des astrocytes (rouge) [Shih, 2012].

2.3.4 Techniques d'imagerie *ex vivo*

L'exploration des artérioles et capillaires *in vivo* se limite donc au premier millimètre de la surface du cerveau. Des techniques *ex vivo* sont utilisées en recherche pour dépasser ces limites et comprendre l'architecture et le fonctionnement de ce réseau.

Histologie

Historiquement, la première méthode d'imagerie en profondeur est l'histologie. Elle permet de s'affranchir de l'absorption et de la diffusion de la lumière visible dans les tissus. L'observation d'un fragment de tissu se fait par tranches fines de quelques microns à l'aide d'un microscope. Pour améliorer le contraste cellulaire, des colorants sont ajoutés pour visualiser la morphologie des cellules (éosine, bleu de méthylène, CD31 pour les cellules endothéliales...). L'exploration se fait tranche par tranche pour imager un volume avec une résolution microscopique. Un marquage cellulaire peut également être utilisé pour mettre en évidence certaines molécules, sur des tumeurs par exemple.

Transparisation

Pour résoudre le problème d'atténuation de la lumière dans les tissus, des traitements de transparence sont appliqués aux tissus [Ueda, 2020]. L'action de transparence se fait principalement sur les lipides, les pigments, la décalcification des tissus, et l'homogénéisation de l'indice de réfraction de la lumière. Différentes méthodes d'imagerie optique sont ensuite utilisées, avec une résolution en dessous de la cellule pour la microscopie à nappe de lumière (*Light-Sheet Microscopy*) [Keller, 2015]. Les microscopies 2-photons et confocale sont aussi utilisées [Ertürk, 2012; Ertürk, 2014]. Une fois transparent, des marquages moléculaires peuvent être réalisés pour visualiser les neurones, ou certaines cellules par immunomarquage [Susaki, 2014; Renier, 2014].



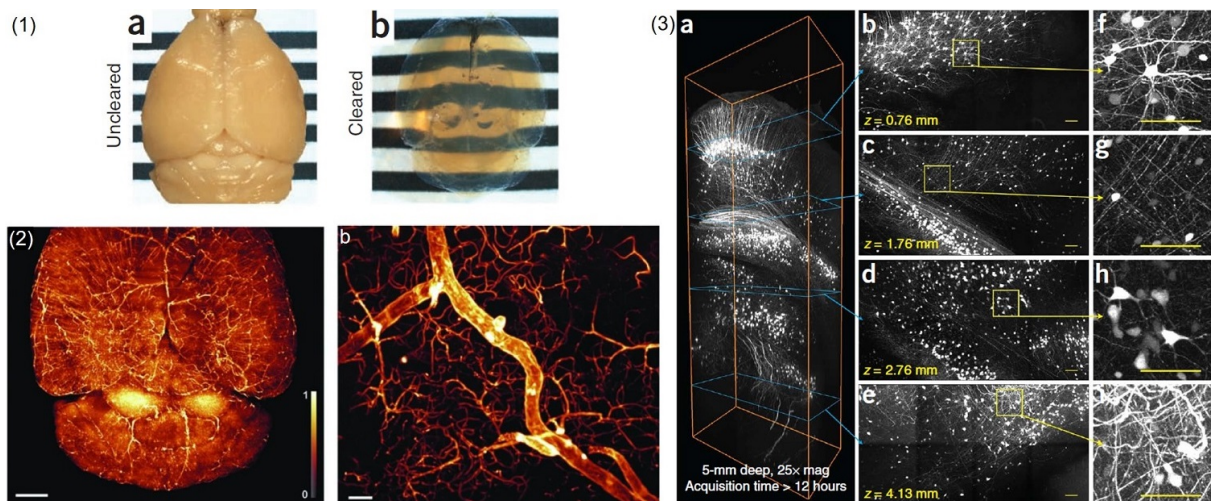


FIGURE 1.17 – (1) Transparenciation d'un cerveau de souris [Ertürk, 2012]. (2) Capillaires sanguins dans le cerveau de souris en ultramicroscopie, barres d'échelle 400 μm (a) et 50 μm (b) [Jährling, 2009]. (3) Neurones dans un cerveau de souris (barre d'échelle de 100 μm) [Tomer, 2014].

Microtomographie aux rayons X avec agent de contraste

Le *micro-CT*¹⁴ reprend le principe du scanner *in vivo* mais *ex vivo* avec perfusion d'un agent de contraste et un scanner *ex vivo* [Jorgensen, 1998]. Le réseau vasculaire de l'animal est perfusé avec un agent de contraste radio-opaque mélangé avec un polymère. En durcissant, le polymère fixe l'agent de contraste dans le réseau sanguin. Une fois le cerveau prélevé et fixé (avec du paraformaldéhyde par exemple), le cerveau peut être imagé avec un scanner tomographique aux rayons X. Ces scanners *ex vivo* ne sont pas contraint par le temps d'exposition qui conditionne la taille des pixels reconstruits : plus le pixel est petit, plus le temps d'acquisition est long. Ils sont couramment appelés *micro-CT* et *nano-CT*, permettant une imagerie volumique par tomographie avec des voxels jusqu'à quelques microns (scanners SkyScan, Bruker *microCT*, Kontich, Belgium¹⁵).

En utilisant du $\mu\text{Angiofil}$ (Fumedica AG, Switzerland), [Hlushchuk, 2020] a montré la possibilité d'imager en 3D les capillaires jusqu'à 4 μm dans le cerveau de rat [fig. 1.18]. La détection des vaisseaux est limitée par la qualité de la perfusion et l'opacité de l'agent de contraste puisque le temps d'exposition n'est pas limité.

14. *Micro-Computed Tomography* (microtomographie aux rayons X)

15. www.burker.com



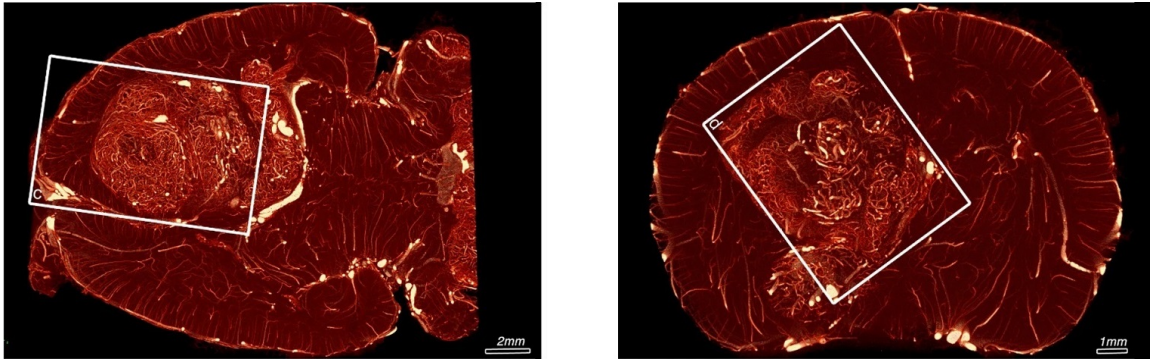


FIGURE 1.18 – Micro-CT du cerveau de rat avec implantation d’une tumeur, perfusé avec du μ Angiofil (Fumetica AG, Switzerland). [Hlushchuk, 2020]

2.4 Imagerie dans le contexte de l’AVC

L’imagerie de la microvascularisation pour l’AVC requiert une résolution fine pour observer individuellement les vaisseaux, mais aussi en profondeur pour explorer les différentes parties du cerveau. Ces besoins spécifiques mettent à mal le compromis entre résolution et pénétration. Pour l’étude sur le petit animal, l’imagerie doit visualiser les artérioles et veinules ($\sim 10 \mu\text{m}$) sur toute la profondeur du cerveau ($\sim 10 \text{mm}$).

Les techniques d’imagerie optique obtiennent une bonne résolution, mais sont rapidement limitées en profondeur même en utilisant l’effet photo-acoustique ou une focalisation de l’émission en 2-photons. Les grands imageurs par résonance magnétique et aux rayons X parcourent l’intégralité de l’animal, mais leur résolution et sensibilité ne permettent pas de résoudre les petits vaisseaux. Ils ont néanmoins la capacité de produire une imagerie indirecte de l’œdème ou de l’hématome lors d’un AVC. C’est pourquoi, ce sont les imageries de références dans le parcours fléché pour le diagnostic de l’AVC. Le point critique réside dans leurs accessibilités et disponibilités sur le territoire français.

L’imagerie par ultrasons semble être un bon compromis avec une profondeur d’imagerie suffisante et un temps d’acquisition limité, une accessibilité élevée de par son faible coût, mais une sensibilité et résolution à améliorer. La relation entre la résolution et la pénétration par la fréquence permet une translation facilitée entre l’humain et le modèle pré-clinique animale.



3 L'imagerie échographique

L'application de l'échographie en médecine remonte aux années 1950 bien que les études sur la propagation des ondes acoustiques soient antérieures avec la mesure de la vitesse du son dans l'eau, attribuée à Jean-Daniel Colladon en 1828 sur le lac Léman. Ses travaux inspireront la création du SONAR (*Sound Navigation And Ranging*) peu avant la Seconde Guerre mondiale. C'est en 1951, que les travaux de John Wild menèrent à l'imagerie ultrasonore chez l'homme d'une tumeur cancéreuse.

Aujourd'hui, le champ d'application de l'échographie est vaste : imagerie cardiaque, du système digestif, au cours de la grossesse, vasculaire... et porte une place importante dans le domaine de la santé en France. Avec près de 29 millions d'examen en 2016, c'est le deuxième acte médical le plus réalisé après la radiographie (31 millions d'examen) [CNAM, 2018]. Avec un coût moyen de 47 €, contre 30 € pour la radiographie, l'échographie représente l'examen d'imagerie avec la plus importante dépense pour l'Assurance Maladie (1,4 milliards d'euros sur un total de 9,3 milliards d'euros). À noter que l'échographie et la radiographie sont les deux examens les moins onéreux, comparés à la tomodensitométrie (118 €), l'IRM (182 €), et la scintigraphie (323 €).

3.1 Principe de l'imagerie échographique

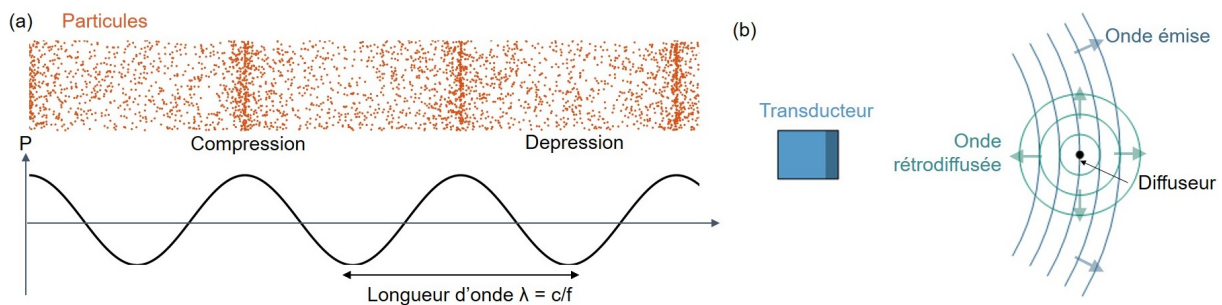


FIGURE 1.19 – (a) Propagation de l'onde ultrasonore : champ de pression avec des oscillations de longueur d'onde $\lambda = c/f$. (b) Émission d'une impulsion ultrasonore par un transducteur et rétrodiffusion par un diffuseur du milieu.

L'imagerie échographique se base sur la propagation d'une onde acoustique dans les tissus. L'onde acoustique est une onde pression qui se propage linéairement dans un milieu, à vitesse constante, en régime dit de diffusion simple [fig. 1.19a]. Lorsque l'onde de pression rencontre une différence locale d'impédance acoustique ($Z = \sqrt{\rho/\chi}$ avec ρ la masse volumique et χ la compressibilité du milieu), par exemple une interface muscle/gras, ou muscle/air [table. 1.2], une partie de l'onde rebondit sur la surface et se propage en sens inverse [fig. 1.19b]. En présence de structures très petites, comme des gouttes de graisse, structures de collagène, interfaces cellulaires ou cavités gazeuses dans le corps, l'onde est réfléchiée dans toutes les directions : c'est le régime dit de *scattering* [Jensen, 1991]. En écoutant cette onde diffusée, on peut remonter à la localisation de sa source par propagation inverse. La longueur d'onde $\lambda = c/f$ est reliée à la fréquence f et à la vitesse du son c dans le milieu, souvent considérée constante dans le corps humain (1540 m/s). En choisissant des fréquences acoustiques élevées (>1 MHz), dites



ultrasonores, la longueur d'onde est choisie inférieure au millimètre pour imager des petites structures.

Milieu	Impédance	Tissu	Impédance
Air	0,0004	Rein	1,63
Graisse	1,34	Foie	1,65
Eau (20 °C)	1,48	Muscle	1,71
Sang	1,65	Os	7,8

TABLE 1.2 – Impédances acoustiques des milieux rencontrés dans le corps en $10^6 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [Chan, 2011].

Émission de l'onde ultrasonore

L'émission de l'onde ultrasonore se fait par une barrette de transducteurs (ou éléments piézo-électriques) qui convertissent un signal électronique en un déplacement local de matière se propageant sous la forme d'une onde de pression dans le milieu. Les transducteurs sont disposés en ligne pour permettre l'imagerie 2D (généralement 128 ou 256 éléments). En envoyant une impulsion électronique, chacun des éléments génère une onde sphérique qui se propage devant lui, et qui s'ajoute à la contribution de celles de ses voisins. On obtient la propagation d'un front d'onde cohérent [fig. 1.20a]. En ajoutant un retard à l'émission de l'impulsion sur chaque transducteur, les ondes sphériques se superposent des manières particulières : on peut donner une forme au front d'onde. Le front peut se propager linéairement avec un angle par rapport à la sonde [fig. 1.20b], ou avoir une forme parabolique avec un point de focalisation où la pression sera maximale [fig. 1.20c]. Le dimensionnement des transducteurs contraint la bande passante et la directivité en fonction de la fréquence de l'impulsion ultrasonore. Pour une fréquence d'imagerie donnée, la largeur du transducteur est en généralement comprise entre $\lambda/2$ et 2λ pour garantir une qualité d'imagerie optimale. Les fréquences d'imagerie varient selon les utilisations, chaque domaine d'utilisation possède alors sa sonde dédiée.

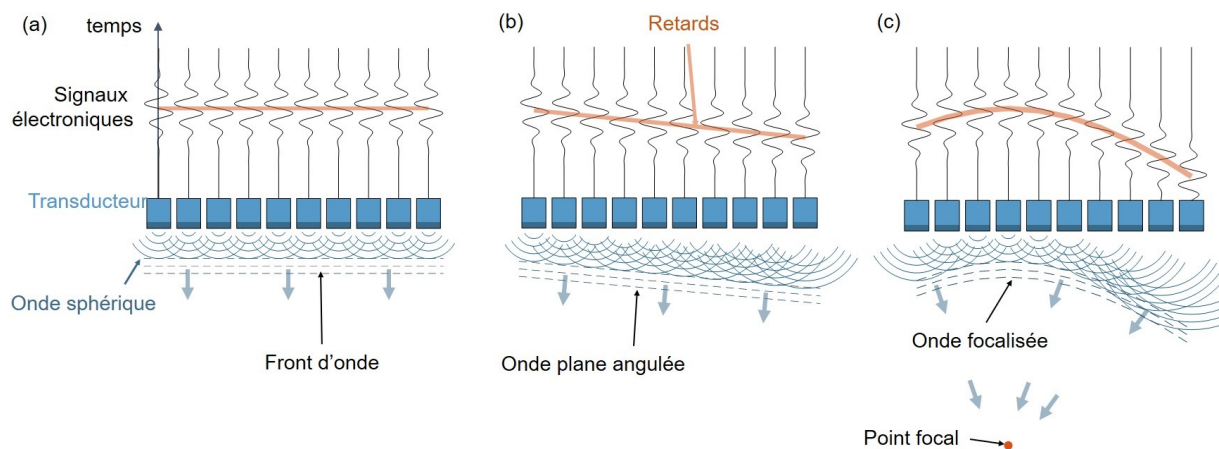


FIGURE 1.20 – (a) Contribution de plusieurs ondes sphériques pour former un front d'onde, (b) onde plane angulée par retard à l'émission, (c) onde focalisée en un point devant la sonde.



Réception des signaux rétrodiffusés et reconstruction de l'image

Lorsque le front d'onde traverse des milieux diffusants (peuplés de diffuseurs), une partie de l'énergie est absorbée et réémise sous forme d'ondes sphériques. Une partie du signal se propage en direction des transducteurs qui sont également capables de les convertir en signaux électroniques $s(t)$, on parle de signal rétro-diffusé. L'ensemble des signaux enregistrés par les transducteurs sont appelés les données radiofréquences (RF). Une fois les données acquises, l'image ultrasonore peut être reconstruite avec un algorithme de **formation de voies** (beamforming). Pour un pixel de l'espace à la position $\{x, z\}$, la loi de propagation de l'onde donne le retard théorique de l'écho dans les données RF. Il se décompose en temps aller (distance sonde vers diffuseur), et temps retour (distance diffuseur vers transducteur). Pour un transducteur en la position x_t , et une onde plane non angulée, le retard théorique est :

$$Retard_{RF}(x_t) = \frac{1}{c} \cdot \left(z + \sqrt{z^2 + (x - x_t)^2} \right) \quad (1.1)$$

Il ne reste plus qu'à additionner la valeur des signaux sur chaque canal de transducteur avec cette loi de retard. L'image obtenue est une matrice de pixels en niveau de gris qui traduit l'échogénicité du milieu environnant avec une résolution dépendante de la fréquence.

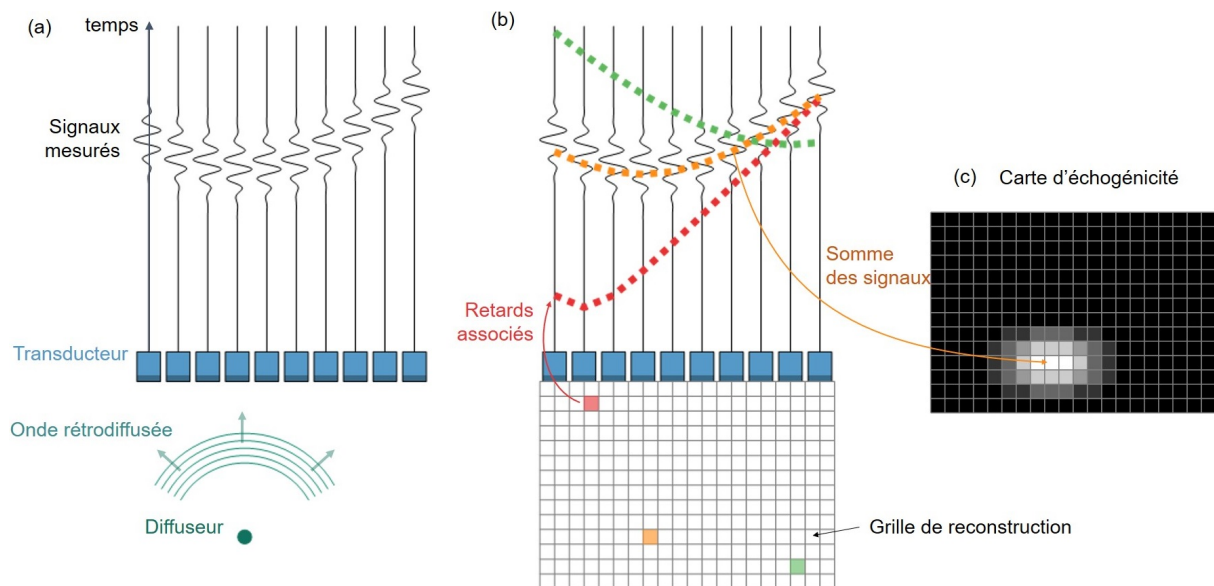


FIGURE 1.21 – (a) Rétrodiffusion de l'onde par un diffuseur ponctuel. Les transducteurs enregistrent l'écho avec des retards dépendants de leur position. (b) Pour reconstruire un pixel, on calcule sa loi de retard théorique pour chaque position des transducteurs, puis on additionne les signaux mesurés avec ce retard dans les données RF. (c) Exemple de carte d'échogénicité du milieu pour un seul diffuseur.

Atténuation et profondeur de pénétration

Les tissus biologiques sont dits transparents aux ultrasons quand ils sont homogènes et non absorbants : une onde ultrasonore peut se propager dans le tissu sur plusieurs centaines de longueurs d'onde avec une perte d'intensité minimale. Au fur et à mesure de la propagation



à travers les tissus biologiques hétérogènes (gouttes de graisses, variations d'impédance entre les organes...), l'onde perd en énergie par diffusion et absorption, et ne transporte plus assez d'information pour localiser les diffuseurs à travers le bruit : c'est l'atténuation et s'exprime en dB/MHz/cm. Celle-ci dépend directement des matériaux traversés et d'une loi de puissance en fréquence [fig. 1.22]. Une fréquence basse aura une profondeur de pénétration plus importante qu'une haute fréquence.

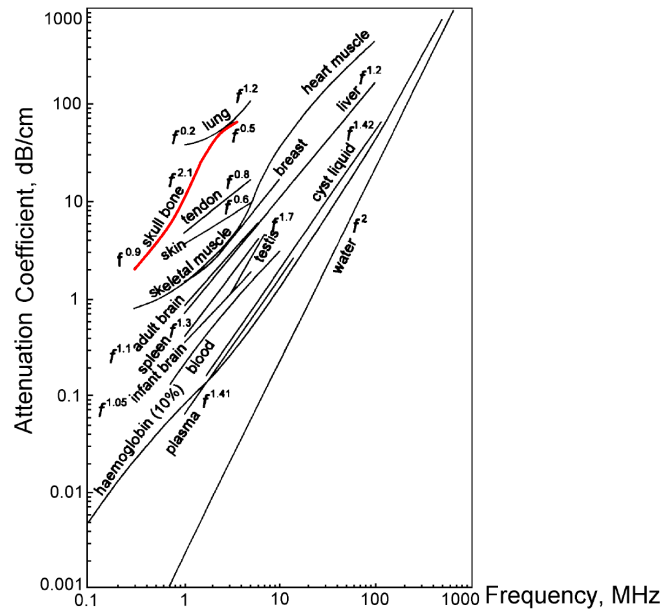


FIGURE 1.22 – Caractéristique atténuation/fréquence des différents milieux biologiques. Courbe de l'os du crâne en rouge. [Cobbold, 2007]

Influence du crâne

On notera une très forte atténuation du crâne [fig. 1.22] qui s'avère être un point critique pour l'imagerie cérébrale. Dans le crâne, l'onde n'est plus soumise à un régime de diffusion simple mais diffusion multiple : l'onde rebondit sur les pores de l'os, est absorbée dans l'épaisseur du crâne, puis convertie en chaleur et en onde de cisaillement [Pinton, 2011].

D'autres phénomènes dégradent la propagation de l'onde à travers le crâne. La grande variation d'impédance agit comme un miroir et une grande partie de l'onde incidence est réfléchi. Le reste du front d'onde qui parvient à traverser le crâne ressort déphasé : la différence de vitesse de son dans l'os et les variations d'épaisseurs induisent des différences de temps de vol dans l'épaisseur. En effet, l'os du crâne est composé d'une couche superficielle de chaque côté avec une vitesse du son de $c_{compact} = 2900$ m/s, et d'une couche intérieure, appelée diploë, avec une vitesse du son plus faible de $c_{diploë} = 2500$ m/s [Fry, 1978]. Le temps de vol de l'onde dépend alors de l'épaisseur des couches traversées ($e_{c1}(x)$, $e_{c2}(x)$, $e_{diploë}(x)$) [eq. (1.2)]. Le déphasage δt_x du front d'onde dégrade fortement la qualité de l'imagerie car la focalisation n'est plus optimale. Plus la fréquence de l'onde sera élevée, plus le déphasage de l'onde sera important relativement à la période, et la qualité d'imagerie sera dégradée.



$$\delta t_x = \left(\frac{e_{c1}(x) + e_{c2}(x)}{c_{compact}} + \frac{e_{diploë}(x)}{c_{diploë}} \right) - \frac{e_{c1}(x) + e_{diploë}(x) + e_{c2}(x)}{c_{eau}} \quad (1.2)$$

Remarques sur le déphasage On parle de déphasage des signaux pour lorsque deux impulsions ont un faible décalage. Une impulsion peut être associée à une onde porteuse de fréquence f_0 (celle de la sonde) avec une phase φ constante, modulée par une enveloppe, typiquement une Gaussienne de largeur la longueur de l'impulsion ($\sigma = nT$, avec n le nombre de périodes $T = 1/f_0$). Ce signal $s(t)$ s'écrit en notation complexe comme en électronique du signal $\mathbf{S}(t)$ [eq. (1.3a)]. Pour un décalage en temps dt faible devant la longueur de l'impulsion ($dt \ll nT$), les largeurs temporelles des enveloppes ne permettent pas de distinguer les deux impulsions. En utilisant les porteuses, on peut faire apparaître le déphasage par corrélation des deux signaux complexes [eq. (1.3b)]. Le retard relatif entre les deux signaux se lit avec une meilleure précision qu'avec seulement les enveloppes. Cette méthode est notamment utilisée pour calculer les vitesses Doppler.

$$s(t) = A \cdot e^{-\frac{t-t_0}{2\sigma^2}} \cdot \cos(2\pi f_0 t + \varphi) \quad \mathbf{S}(t) = A \cdot e^{-\frac{t-t_0}{2\sigma^2}} \cdot \operatorname{Re} \left(e^{2i\pi f_0 t + i\varphi} \right) \quad (1.3a)$$

$$\mathbf{S}(t+dt) \cdot \mathbf{S}^*(t) \approx A^2 \cdot e^{-2\frac{t-t_0}{2\sigma^2}} \cdot e^{2i\pi f_0 dt} \quad (1.3b)$$

$$dt = \frac{1}{2\pi f_0} \cdot \operatorname{arg} \left(\mathbf{S}(t+dt) \cdot \mathbf{S}^*(t) \right) \quad (1.3c)$$

3.2 Échographie conventionnelle, par ondes focalisées

3.2.1 Principe d'imagerie

L'imagerie échographique conventionnelle utilise des ondes ultrasonores focalisées en émission [fig. 1.20c]. La pression de l'onde rétrodiffusée par le diffuseur étant proportionnelle à celle de l'onde incidente, on maximise ce signal en augmentant le champ de pression reçu par le diffuseur en focalisant le front d'onde. Pour ce faire, des lois de retard sont appliquées aux transducteurs pour réaliser une focalisation : toutes les ondes sphériques des transducteurs vont arriver simultanément en un même point. Le signal rétrodiffusé sera d'autant plus énergétique que la surpression est élevée, et donnera la réflectivité du milieu aux alentours de ce point de focalisation. Puis le point focal est déplacé en modifiant la loi de retard à l'émission. On parle aussi de faisceau ultrasonore lorsque le point focal prend une forme de tache allongée [fig. 1.23]. Typiquement, pour une sonde avec 256 transducteurs, au moins autant d'émission/réception seront nécessaires que de transducteurs. En pratique, pour chaque transducteurs, plusieurs focalisations sont réalisées à différentes profondeurs.



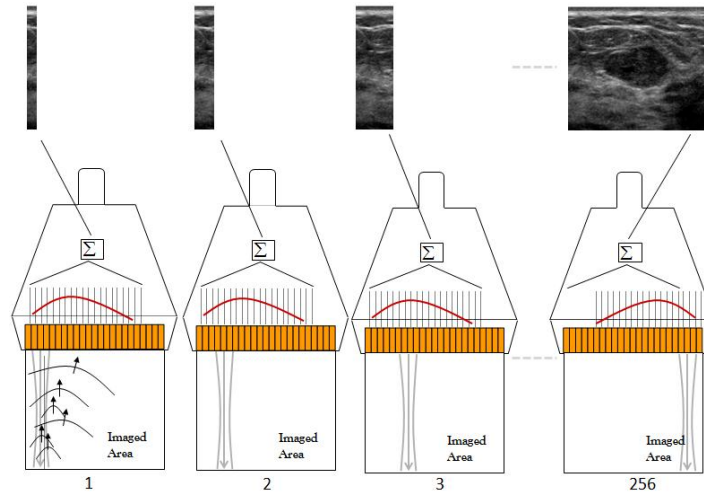


FIGURE 1.23 – Reconstruction d’une image par focalisations successives du faisceau ultrasonore. [Bercoff, 2011]

Fréquence de répétition et cadence d’imagerie

Le temps nécessaire pour une émission/réception dépend de la profondeur d’imagerie souhaitée et de la vitesse du son dans le milieu. On définit la *Pulse Repetition Frequency* (fréquence de répétition des tirs) (PRF) correspondant au temps nécessaire pour envoyer une impulsion et écouter les signaux rétrodiffusés. Elle peut atteindre quelques kilohertz (7,7 kHz pour une profondeur de 10 cm). L’imagerie focalisée nécessitant un balayage des points de focalisation, la cadence d’imagerie finale est la PRF divisée par le nombre d’éléments ($7,7 \text{ kHz} / 128 = 60 \text{ Hz}$). On obtient généralement des cadences d’imagerie de l’ordre de 50 Hz qui permettent une exploration fluide pour l’utilisateur. Pour explorer des flux rapides, la cadence d’imagerie doit être augmentée, en réduisant la profondeur ou la largeur de la fenêtre d’imagerie.

3.2.2 Résolution

Lorsque l’on image un diffuseur ponctuel, l’image obtenue après *beamforming* produit une tache en la position du diffuseur [fig. 1.21c]. Cette tache s’appelle la fonction d’étalement du point ou PSF¹⁶ et est caractéristique du système d’imagerie et de ses paramètres d’acquisition. Ses largeur et longueur sont notamment reliées à la longueur d’onde et à la géométrie de la sonde (largeur des éléments, distance focale, ouverture), et permettent de définir la résolution du système.

Le critère de Rayleigh stipule que deux sources ponctuelles peuvent être distinguées si elles sont distantes de la largeur à mi-hauteur (FWHM¹⁷) de chacune des taches [fig. 1.24]. Du fait de l’anisotropie de l’imagerie échographique, la résolution doit être caractérisée dans la direction axiale (le long de la propagation de l’onde), et latérale (le long de l’axe des transducteurs).

16. *Point Spread Function* (fonction d’étalement du point)

17. *Full Width at Half Maximum* (largeur à mi-hauteur)



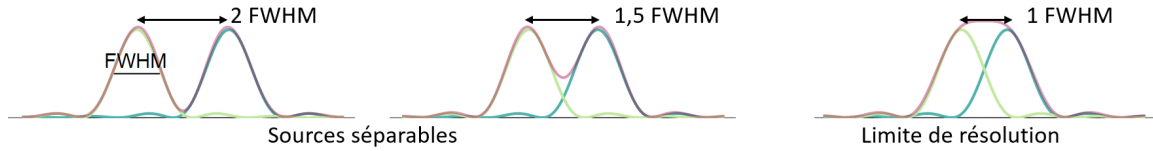


FIGURE 1.24 – Limite de séparabilité entre deux sources proches. La **FWHM** désigne la largeur à mi-hauteur de la tache d'imagerie. La limite de résolution est atteinte quand les deux sources sont distantes d'une largeur à mi-hauteur : critère de Rayleigh.

Résolution axiale

La résolution axiale est donnée par la résolution temporelle de l'impulsion ultrasonore émise. L'impulsion est composée d'une ou plusieurs oscillations (n cycles) à la fréquence de la sonde f_0 . La bande passante limitée de la sonde restreint le contenu spectral de l'impulsion qui ne peut pas être plus court qu'une période $T = 1/f_0$. La résolution temporelle, capacité à distinguer deux impulsions, est donc la longueur du pulse nT . La distance nécessaire entre deux sources pour renvoyer des échos avec un tel retard est [Cobbold, 2007] :

$$Res_{temporelle} = nT \qquad Res_{axiale} = n \frac{cT}{2} = n \frac{\lambda}{2} \quad (1.4)$$

Cette résolution théorique est à modérer par rapport au bruit environnant. Pour améliorer le ratio signal sur bruit, le nombre de cycles peut être augmenté en envoyant plus d'énergie dans le milieu.

Résolution latérale

La résolution latérale est contrainte par la capacité de la sonde à émettre et recevoir un faisceau focalisé fin pour discriminer deux diffuseurs proches. Le champ de pression $p(x, z)$ émis et reçu par la sonde est contraint par la diffraction des transducteurs et de l'ouverture D totale de la sonde, en la profondeur z . Le critère de Rayleigh prévoit alors une résolution égale à la largeur du faisceau [eq. (1.5)].

$$p(x, z) = \text{sinc} \left(\frac{\pi x D}{\lambda z} \right) \qquad Res_{latérale} = \lambda \frac{z}{D} = \lambda f_{number} \quad (1.5)$$

On distingue deux cas pour caractériser la résolution suivant les sondes utilisées. Les sondes *phased* (sondes à commande de phase) sont des barrettes assez étroites (généralement $D < 64\lambda$), avec des transducteurs d'une largeur proche de $\lambda/2$ peu directifs et peuvent accepter une angulation importante du faisceau ultrasonore. La limite de diffraction leur permet d'imager un secteur angulaire (l'image reconstruite est un cône). Dans ce cas, l'ouverture D est constante, et la résolution dépend de la profondeur d'imagerie.

Les sondes linéaires, avec des transducteurs de largeur supérieure à λ (largeur totale $D > 128\lambda$), sont plus directives et n'imagent que devant la sonde. Pour conserver une résolution constante, la largeur de la sonde en réception est limitée pour chaque pixel. On parle d'ouverture



en réception. La sensibilité angulaire limitée de transducteurs ne leur permet pas de recevoir un signal utile d'un diffuseur qui serait désaxé d'un angle trop important. Ils sont alors exclus pour la reconstruction de ce pixel. On définit le f_{number} qui fixe la résolution dans l'image. Pour chaque pixel $\{x, z\}$ de l'espace, on calcule l'ouverture en réception à utiliser (2a) : $2a = z/f_{number}$. L'étape de **beamforming** ne prendra en compte que les transducteurs compris dans l'intervalle $[x - a; x + a]$, on parle d'apodisation (ou fenêtrage) en réception pour réduire l'amplitude des lobes secondaires. Les valeurs de f_{number} sont généralement comprises en 1 et 4.

Compromis résolution/profondeur d'imagerie

Une des manières d'augmenter la profondeur d'imagerie est de réduire la fréquence de l'impulsion pour augmenter la longueur d'onde et gagner en profondeur. Cette diminution de la fréquence se fait donc au détriment de la résolution [fig. 1.25a]. Il faut trouver un compromis entre la profondeur de pénétration des ultrasons, et la résolution, qui va dépendre de la taille de l'organe/structure à imager, de sa situation et des structures à traverser. Pour imager en profondeur un organe volumineux comme le foie, on utilisera une sonde de fréquence assez basse : 3 MHz, avec une résolution spatiale d'environ 0,5 cm. À l'inverse, pour l'imagerie Doppler de la carotide, en surface, on utilisera une sonde plus haute fréquence de 7 MHz, avec une résolution de 0,2 cm [fig. 1.25b]. Le choix de la fréquence agit comme un effet de zoom, affinant la résolution mais diminuant le champ de vue.

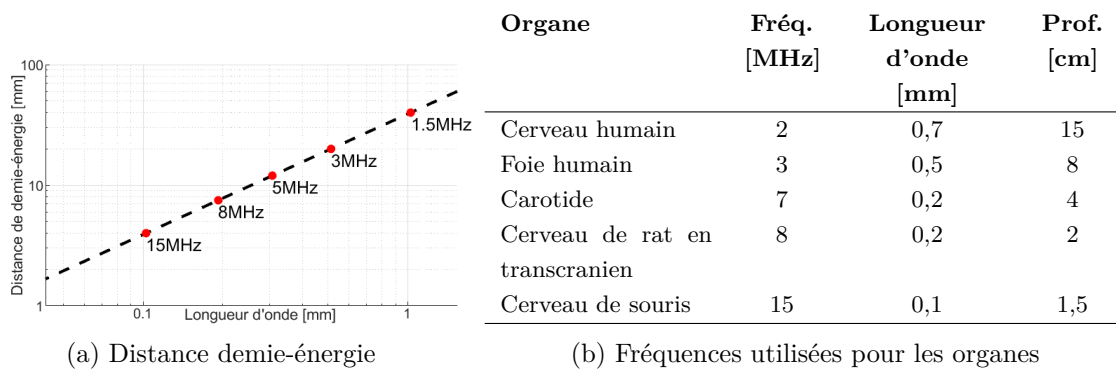


FIGURE 1.25 – Compromis entre profondeur d'imagerie et résolution. La distance demie-énergie correspond à une perte de 3 dB dans le foie (atténuation de ~ 5 dB/cm/MHz). [Couture, 2018]

3.2.3 Modes d'imagerie en échographie conventionnelle

L'imagerie échographique offre plusieurs modes pour visualiser différents types d'objets : les interfaces des organes, les flux sanguins, ou la vascularisation.



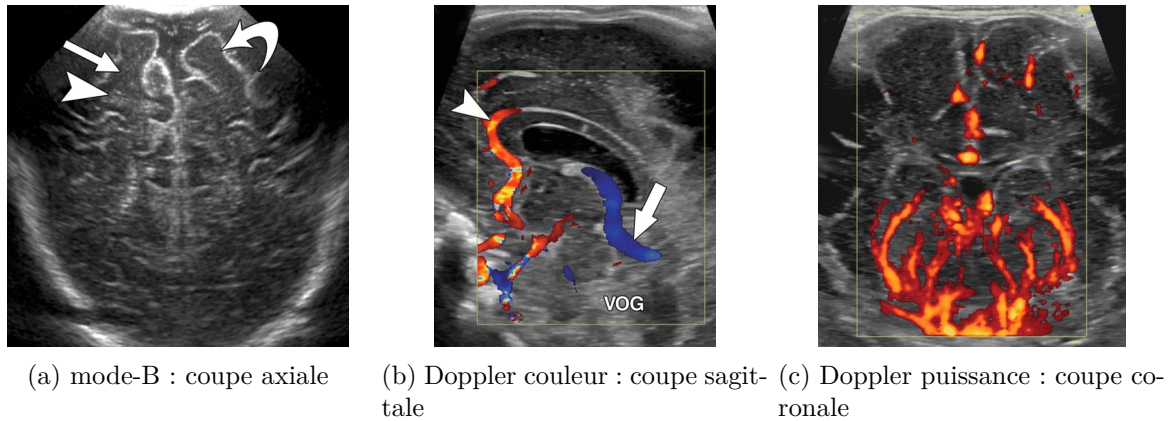


FIGURE 1.26 – Examen échographique du cerveau d'un nouveau-né. [Lowe, 2011]

Imagerie mode-B : brillance

L'imagerie dite mode-B visualise la brillance des tissus et les interfaces d'impédances acoustiques différentes [fig. 1.26a]. Elle se révèle très utile pour observer l'anatomie du corps. Par exemple le LCS apparaîtra beaucoup moins intense que la matière blanche dans le cerveau. Le sang, composé d'une multitude de diffuseurs (les globules rouges), apparaîtra plus intense que la matière blanche. L'exploration du corps se fait en temps réel en coupe, chose qui n'est pas possible avec une simple radiographie. Le radiologue peut détecter des malformations, kystes ou tumeurs, et mesurer la taille des structures. Elle est aussi utilisée pour guider les aiguilles de biopsie.

Échographie Doppler pulsé

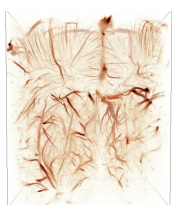
L'utilisation d'une cadence d'imagerie plus élevée donne accès à une information dynamique au cours du temps. Le concept Doppler pulsé se base sur l'imagerie de particules en mouvement vers la sonde dont la distance est modifiée entre deux images successives. Dans le sang, ce sont les globules rouges qui agissent comme diffuseurs en mouvement. Entre deux instants successifs, le temps de vol entre la sonde et un globule rouge qui se déplace est modifié. Le signal entre les deux tirs est alors décalé d'un petit temps dt . Connaissant la cadence d'imagerie FR ¹⁸, on peut déduire la vitesse de déplacement du globule rouge dans la direction axiale (v_z) :

$$v_z = \frac{1}{2} \cdot c \cdot dt \cdot FR \quad (1.6)$$

Pour obtenir des cadences d'imagerie très élevées pour imager les flux rapides, l'estimation de la vitesse se fait pour une ligne, avant le balayage latéral.

Cette méthode permet une imagerie spécifique du flux sanguin avec une représentation en couleur pour les flux montants et descendants relativement à la sonde. Contrairement à l'imagerie mode-B, elle est quantitative avec une mesure de la vitesse de déplacement du sang [fig. 1.26b]. Cependant, le Doppler Couleur donne une mesure pour un déplacement dans l'axe de la sonde

18. *Frame Rate* (cadence d'imagerie)



uniquement. La mesure pour un écoulement latéral n'est donc pas possible. Il faut généralement corriger la valeur de la vitesse avec l'angle entre la direction du flux et l'axe de la sonde.

En calculant l'énergie du Doppler pulsé, on peut détecter la présence et l'intensité d'un flux dans n'importe quelle direction [Rubin, 1994]. Cette approche apporte une meilleure sensibilité au flux sanguin, sans contrainte d'angle du flux, mais au détriment de la mesure quantitative de la vitesse [fig. 1.26c].

Imagerie avec agent de contraste

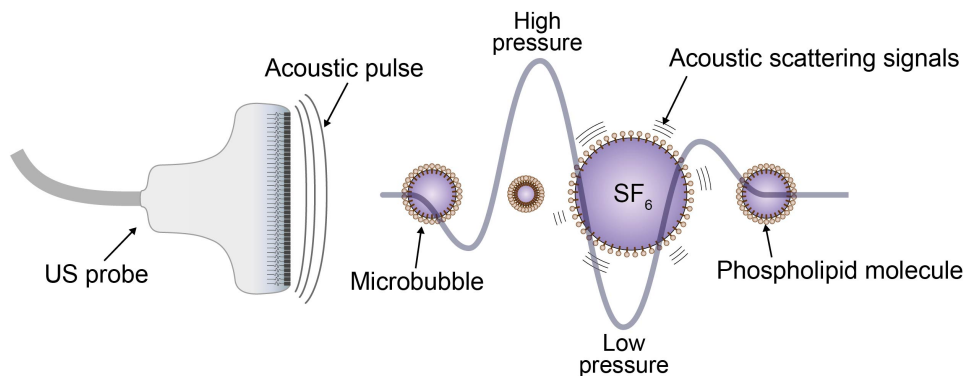


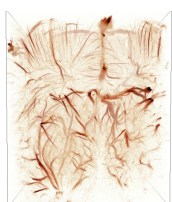
FIGURE 1.27 – Schéma d'une microbulle *SonoVue* (Bracco, Italie). Compression et dilatation non-linéaire au passage d'une onde acoustique.

L'imagerie de la vascularisation peut être améliorée par l'ajout d'un agent de contraste ultrasonore. Cet agent de contraste est composé de petites capsules de gaz [fig. 1.27] de quelques micromètres de diamètre [Schneider, 1999], appelées microbulles. La variation brutale d'impédance avec les tissus du corps humain [table. 1.2] entraîne une forte échogénicité et magnifie les zones perfusées par ces microbulles. Au passage d'une onde pression suffisamment énergétique, la microbulle entre en résonance et renvoie un écho plus fort que celui du sang et des tissus. De plus, cette résonance est un phénomène non-linéaire : la polarité de l'onde¹⁹ entraîne une signature particulière qui peut être isolée de celle des tissus linéaires.

L'imagerie avec agent de contraste²⁰ est utilisée chez l'homme en routine avec des microbulles injectables [Igne, 2016] (par exemple les microbulles *SonoVue*, Bracco, Italie) pour améliorer le contraste et la sensibilité [fig. 1.28a]. On peut également quantifier la perfusion par injection des microbulles en bolus et mesurer des temps d'arrivée dans les artères et veines [fig. 1.28b] [Cosgrove, 2010 ; Wilson, 2010].

19. l'onde commence par une compression ou une dépression

20. en anglais *Contrast-Enhanced UltraSound* (échographie de contraste) (CEUS)



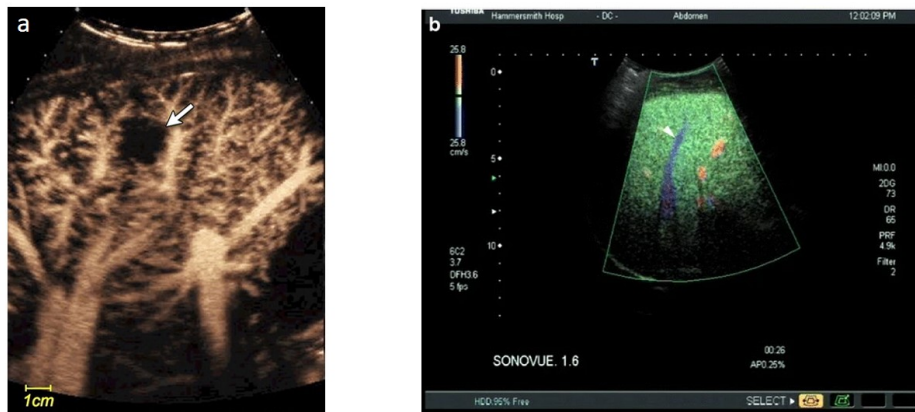


FIGURE 1.28 – Échographies avec agent de contraste : (a) Vascularisation du foie en l'image MIP avec agent de contraste [Wilson, 2010]. (b) Comparaison des temps d'arrivée du bolus dans le foie (*Transit Time*) [Cosgrove, 2010]

Dans le cas particulier de l'imagerie du cerveau, la perte de signal induite par le crâne peut amener à utiliser un agent de contraste ultrasonore [Seidel, 2002]. Il permet également d'imager les flux très lents en exploitant la non-linéarité des microbulles, ainsi que les petits vaisseaux où le contraste simple du sang n'est pas suffisant [Hölscher, 2005] [fig. 1.29a].

Lorsque la fenêtre temporale [Kirsch, 2013] permet l'imagerie, la variation d'épaisseur et d'atténuation de l'os induit des variations de qualités d'imagerie dans le cerveau, avec notamment des zones d'ombre [Martina, 2005] [fig. 1.29b-d]. De plus, ces variations de transmission acoustiques induisent des hétérogénéités de champs de pression qui complexifie l'expression de la non-linéarité des microbulles. Il est souvent nécessaire de baisser la fréquence ultrasonore pour gagner en contraste, au détriment de la résolution.

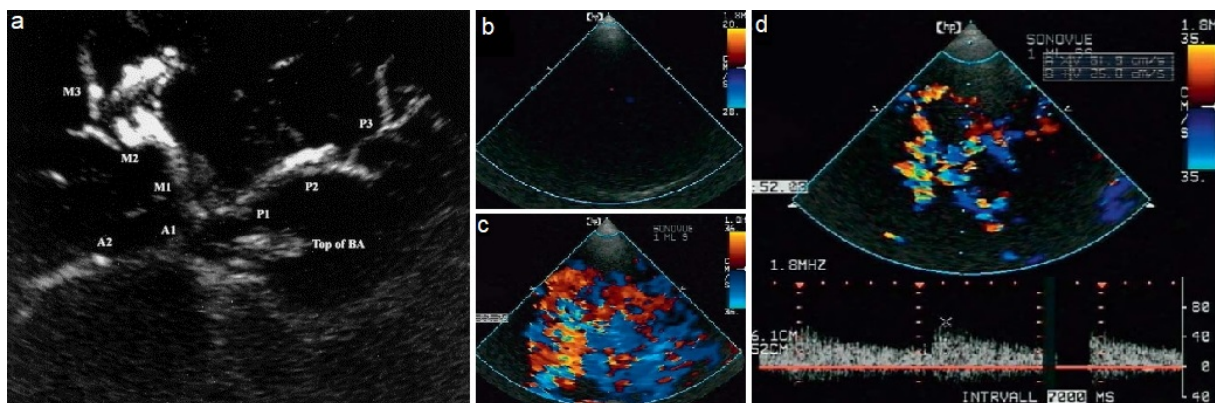
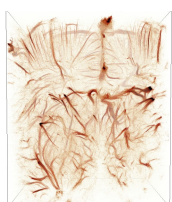


FIGURE 1.29 – Échographies transcrâniennes avec agent de contraste : (a) Imagerie du cercle de Willis et des premiers segments artériels (ACA : A1-2, ACM : M1-3, APC P1-4) [Hölscher, 2005]. Imagerie transcrânienne avant l'arrivée du bolus d'agent de contraste (b), au moment de l'injection (c), juste après (d) avec mesure du spectre Doppler [Seidel, 2009].

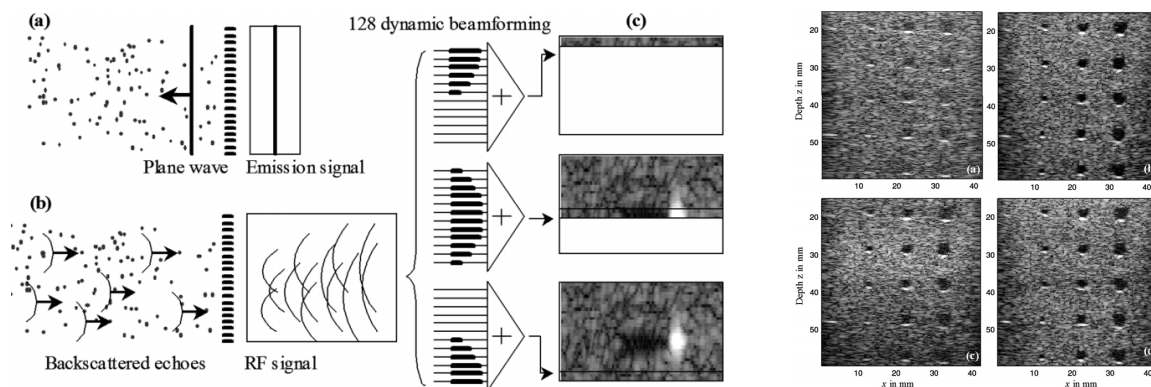


3.3 Imagerie ultra-rapide

3.3.1 Imagerie par ondes planes

L'imagerie conventionnelle, dite focalisée, permet d'imager les structures des organes et les écoulements de flux avec une résolution temporelle limitée. Pour obtenir une image, la reconstruction se fait par un balayage latérale de la focalisation : l'échographe nécessite plusieurs colonnes de focalisation du faisceau ultrasonore ce qui contrait sa cadence d'imagerie au nombre de focalisations [fig. 1.23]. La cadence d'imagerie finale (FR) pour toute l'image est alors inférieure à la centaine de Hertz malgré une cadence de tir (PRF) supérieure au kilohertz.

Si on s'affranchit de la focalisation en émission en envoyant une onde plane dans l'espace, l'intégralité des diffuseurs dans le milieu vont rétrodiffuser une part de l'énergie [fig. 1.30 1]. Il est alors possible, avec tous les échos reçus, de reconstruire une image de l'ensemble du milieu [Tanter, 2002 ; Shattuck, 1984]. On est donc capable d'avoir une image à chaque émission, donc une cadence d'imagerie de plusieurs kilohertz [fig. 1.30 2a].

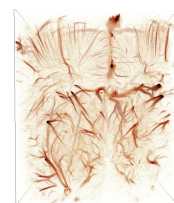


(1) Reconstruction d'une image avec une seule onde plane.

(2) Image mode-B par ondes planes et avec focalisations.

FIGURE 1.30 – (1) Principe d'imagerie par onde plane. (2) Image mode-B avec 1 onde plane (a), 71 ondes planes (b), 128 focalisations latérales (c), 128 focalisations latérales et 4 focalisations en profondeur. [Montaldo, 2009]

L'image résultante est cependant moins contrastée car les diffuseurs perçoivent un champ de pression beaucoup plus faible que lors d'une focalisation [fig. 1.30 2]. De plus, les signaux des diffuseurs vont avoir tendance à interférer entre eux et dégrader la résolution de l'image. On utilise alors une image composite composée de plusieurs images par ondes planes avec des angles différents : on parle de sommation cohérente (*compounding*) [fig. 1.31]. Les ondes planes sont envoyées successivement à la cadence de la PRF pour garantir une cohérence temporelle. Pour des images composites à 9 ondes planes, la cadence d'imagerie maximale sera $PRF/9$. Cette cadence est alors bien supérieure à celle en imagerie focalisée, et le contraste et la résolution sont restitués [table. 1.3] [Montaldo, 2009]. On parle alors d'imagerie *ultrafast* (ultra-rapide).



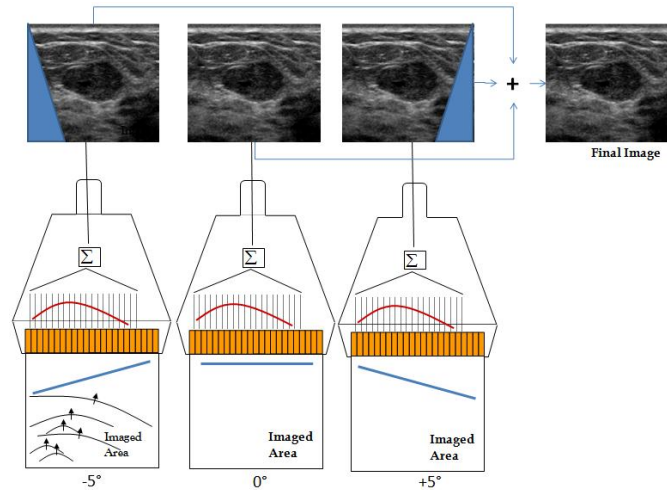


FIGURE 1.31 – Principe de la sommation cohérente : l'image finale est obtenue après sommation de plusieurs sous images associées à une onde plane. [Bercoff, 2011]

	Résolution latérale [mm]	Cadence [Hz]	Contraste [dB]	snr [dB]
Monofocus	1,1 à 1,8	100	21 à 32	18 à 0
Multifocus 4	1.35	25	29	18 à 0
1 onde plane	1.8	12 500	12	0
12 ondes planes	1.1	1 000	20	11
71 ondes planes	1.1	176	33	18

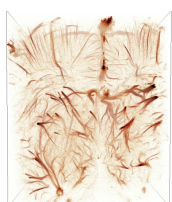
TABLE 1.3 – Caractéristiques comparées à l'imagerie focalisée. [Montaldo, 2009]

Résolution avec onde non focalisée

Avec des ondes planes, le champ de pression n'est plus focalisé en émission et ne permet pas de définir la résolution latérale. La résolution est obtenue uniquement par focalisation synthétique en réception lors de l'étape de **beamforming**. Le manque de focalisation en émission réduit la résolution de l'image. Pour pallier à ce manque, l'ajout d'ondes planes avec des angles différents agit comme une focalisation synthétique de l'émission en chaque point de l'espace. En utilisant beaucoup d'ondes planes (au moins une dizaine), la résolution s'approche de celle par ondes focalisées [Montaldo, 2009].

3.3.2 Caractéristiques techniques

En imagerie focalisée, l'opération de reconstruction de l'image se fait directement sur les signaux radiofréquences de manière analogique. L'opération étant simple (retards et sommes), elle est directement implémentée dans les cartes d'acquisitions. La conversion analogique/numérique se fait à la fin de la reconstruction pour une ligne focalisée devant un transducteur. Pour l'imagerie ultra-rapide par ondes planes, les lois de délais dépendent de la position du pixel, du transducteur et de l'onde envoyée. Les calculs sont plus complexes et doivent être exécutés numériquement, en passant par une conversion analogique/numérique. Le système électronique devient beaucoup plus complexe, avec autant de voies d'échantillonnages que de transducteurs



[Sandrin, 1999 ; Montaldo, 2004]. La quantité de données générée est également plus importante et doit pouvoir être stockée puis traitée. La machine utilisée par [Sandrin, 1999] possédait 64 voies, avec 128 ko de mémoire par voies, avec des temps de calculs de plusieurs minutes pour un processeur Pentium 300 MHz (Intel, USA).

Les progrès informatiques de ces deux dernières décennies ont largement augmenté les capacités des ordinateurs et réduit les prix du stockage des données (vitesse et quantité avec les RAM, SSD, NVMe), du transfert des données (protocole SATA, USB 3.0, PCIe), et des processeurs (CPU²¹) (par exemple 16 cœurs à 4,9 GHz sur une seule puce²²). La démocratisation du calcul sur carte graphique (GPU²³) et la diminution de leurs prix ont considérablement réduit les temps de calcul, jusqu'à pouvoir faire de l'imagerie temps réel avec de l'imagerie ultra-rapide sur des échographes cliniques (Aixplorer, SuperSonic Imaging, France²⁴).

3.3.3 Nouvelles perspectives de l'imagerie ultra-rapide

L'imagerie ultra-rapide par ondes planes ouvre un nouveau champ de recherche pour l'imagerie échographique avec l'accès à des phénomènes beaucoup plus rapides. Par exemple, les cadences en imagerie permettent de suivre la propagation d'une onde de cisaillement dans les tissus [fig. 1.32a]. On peut alors déterminer la vitesse de propagation cette onde [fig. 1.32b] et obtenir une carte de l'élasticité des tissus : appelée élastographie [Tanter, 2002 ; Bercoff, 2004]. L'onde de cisaillement peut être naturelle (élastographie passive) [Gallot, 2011], générée par le battement cardiaque, ou induite par la sonde ultrasonore avec une surpression locale (élastographie active) [Gennisson, 2013].

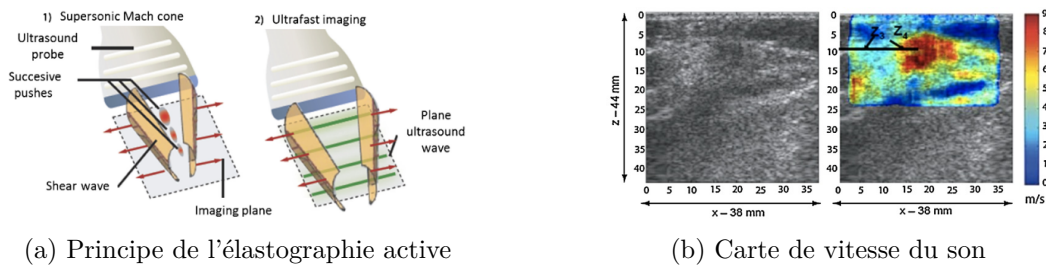
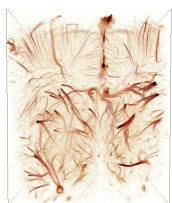


FIGURE 1.32 – (a) Génération d'un cône de Mach par focalisation et propagation d'une onde de cisaillement latéralement, puis imagerie haute cadence du déplacement des tissus. (b) Carte de vitesse du son autour d'une masse dure, avec une vitesse du son de 7,1 m/s. [Gennisson, 2013]

L'augmentation de la cadence d'imagerie améliore également l'imagerie Doppler avec une meilleure sensibilité et contraste [fig. 1.33a-b] [Macé, 2011 ; Bercoff, 2011]. Le signal des globules rouges est mieux échantillonné dans le temps et permet d'accéder aux variations faibles de flux induits par le couplage neuro-vasculaire [fig. 1.33c]. On parle d'imagerie fonctionnelle ultrasonore [Macé, 2011 ; Mace, 2013 ; Deffieux, 2021]. Avec une meilleure corrélation temporelle, on peut

21. *Central Processing Unit* (processeur central)
 22. Exemple RYZEN 9 5950X, AMD, USA
 23. *Graphical Processing Unit* (processeur graphique)
 24. www.supersonicimagine.fr



utiliser des filtres spatio-temporels avec une nette amélioration de la sensibilité [Demene, 2015] : appelé Doppler ultra-sensible.

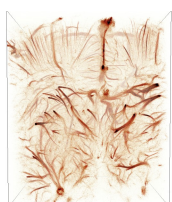
Cette technologie a été utilisée pour mesurer des réponses hémodynamiques chez le petit animal induites par des stimuli olfactif, mécanique ou médicamenteux en 2D [Osmanski, 2014; Rabut, 2020] et 3D [Rabut, 2019; Brunner, 2020].

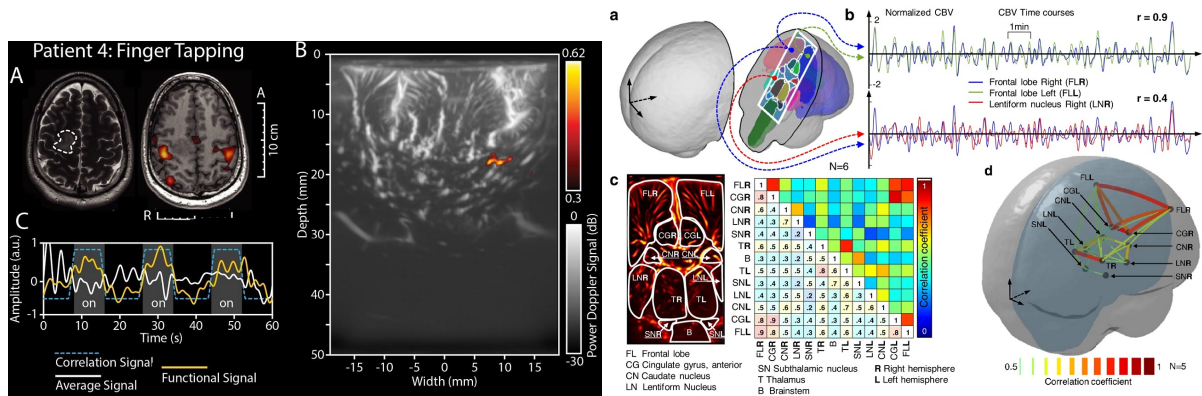


FIGURE 1.33 – (a) Doppler conventionnel, (b) Doppler ultra-sensible. (c) Imagerie de l'activité fonctionnelle avec activation du cortex somato-sensoriel (S1). [Macé, 2011]

L'apport de l'échographie par ondes planes a également amélioré les caractéristiques de l'imagerie des agents de contraste. La répartition plus homogène et continue du champ de pression permet d'obtenir un meilleur contraste avec la même résolution et destruction de microbulles qu'avec une séquence par ondes focalisées [Couture, 2009]. Ce gain en contraste et l'augmentation significative de la cadence d'imagerie sont alors plus adaptés pour observer les phénomènes rapides comme le déplacement des microbulles [Couture, 2009; Desailly, 2017], et notamment à travers le crâne de rat [Errico, 2016].

L'échographie ultra-rapide apporte un nouvel outil pour l'imagerie humaine avec l'avantage d'être facilement accessible comparée à l'IRM ou le scanner interventionnel. Ses caractéristiques temps réel, non invasif, et non irradiant réduisent les contraintes liées à la dosimétrie, aux contre-indications, et au transfert des patients vers la salle d'imagerie. Elle permet une imagerie vasculaire temps réel, éventuellement couplée à une imagerie fonctionnelle [fig. 1.34]. Les premiers essais cliniques montrent un engouement pour les nouvelles perspectives offertes par l'imagerie ultrasonore ultra-rapide [Baranger, 2021; Imbault, 2017; Soloukey, 2020].



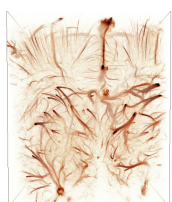


(1) Tumeur cérébrale humaine

(2) Corrélation dans le cerveau d'un grand prématuré

FIGURE 1.34 – (1) Imagerie fonctionnelle peropératoire et vasculaire d'une tumeur humaine. (A : IRM fonctionnelle, B : imagerie fonctionnelle ultrasonore, C : corrélation avec la tâche à réaliser) [Soloukey, 2020]. (2) Mise en évidence des corrélations intra et interhémisphériques chez les bébés grands prématurés [Baranger, 2021].

Le compromis entre la pénétration et la résolution doit être ajusté en choisissant une sonde et sa fréquence pour chaque application. L'imagerie à travers les structures osseuses reste très limitée, notamment pour le cerveau et le cœur, où la sonde doit être positionnée dans des fenêtres temporales pour le crâne, ou entre les côtes. La plupart des études précédentes ont d'ailleurs été réalisées avec craniectomie, ou via la fontanelle chez le nouveau-né. L'échographie, même ultra-rapide, reste majoritairement une imagerie qualitative, hormis le Doppler avec prise en compte de l'angle du flux et l'élastographie. Les mesures d'intensité de certains organes ne peuvent pas être quantifiées ni même comparées. Les valeurs peuvent seulement être comparées relativement à un autre organe du patient dans les mêmes conditions d'imagerie : échographe, sonde et paramètres d'imagerie.



4 Microscopie par Localisation Ultrasonore

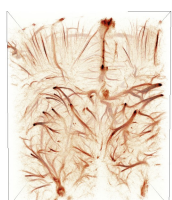
L'imagerie de la microvascularisation dans le contexte du diagnostic précoce de l'AVC requiert un système d'imagerie haute résolution, avec une bonne profondeur de pénétration et un contraste vasculaire, tout en préservant la physiologie. Les méthodes optiques sont rapidement limitées par l'absorption et la diffusion des rayons optiques dans les tissus. Les ondes magnétiques et rayonnements X traversent l'intégralité du corps mais n'offrent pas une sensibilité au sang suffisante. Même avec des produits de contraste, ils ne parviennent pas à résoudre la fine vascularisation du cerveau. Le compromis résolution-pénétration en échographie permet une investigation seulement des premières arborescences vasculaires avec le Doppler ultrasensible à haute fréquence. En ajoutant des produits de contraste, la sensibilité au réseau vasculaire serait augmentée.

	Résolution	Pénétration	Sensibilité	Non-invasif	Total
CTscan avec agent de contraste	1	2	2	-2	3
IRM	1	2	-2	2	3
IRM	1	2	1	2	6
IRM angio TOF	1	2	2	-1	4
MR angiographie					
TEP	-2	2	2	2	4
mode-B	-1	2	-2	2	1
Doppler Ultrasensible (basse fréq.)	1	1	1	2	5
Ultrasons	-1	2	1	2	4
Doppler Ultrasensible (haute fréq.)	-1	2	2	2	5
Doppler CEUS					
Microscopie par Localisation Ultrasonore	2	2	2	2*	8
NIRS	-2	-1	2	2	1
Laser Doppler	NA	-2	1	2	1
Laser Speckle	1	-2	2	2	3
PAM	2	-1	2	2	5
Microscopie 2-photons	2	-1	2	2	5
Histologie	2	2	2	NA	NA
Transparisation	2	2	2	NA	NA
MicroCT	2	2	2	NA	NA

FIGURE 1.35 – Avantages et inconvénients des méthodes d'imagerie pour la microvascularisation dans le contexte du diagnostic en phase précoce de l'AVC. (*minimalement invasif)

La figure [fig. 1.35] résume les caractéristiques des imageries présentées précédemment en vue d'une imagerie diagnostique de l'AVC en phase précoce. Il a été choisi de se focaliser seulement sur les performances d'imagerie. Certains critères ont été omis tels que le coût de l'appareil, de l'installation, de l'imagerie, la disponibilité, l'accessibilité, portabilité, la répétabilité, la translation de l'animal à l'humain, et la maturité de la technologie. Ces critères sont tout aussi importants pour sélectionner une technique et l'utiliser à grande échelle.

L'imagerie par ultrasons montre donc des perspectives intéressantes pour l'étude de la microvascularisation, avec une bonne sensibilité au flux sanguin, une profondeur de pénétration suffisante et un caractère non-invasif et non irradiant [fig. 1.35]. La résolution reste cependant limitée par la longueur d'onde par la limite de diffraction (100 μm à 15 MHz chez le petit animal), insuffisante pour résoudre artérioles et veinules.



Dépasser la limite de diffraction

$$d = \frac{\lambda}{2nA} \quad (1.7)$$

FIGURE 1.36 – Limite de diffraction théorisée par Abbe

L'imagerie optique est aussi soumise à cette limite de résolution par la longueur d'onde : on parle de limite de diffraction. En 1873, Ernst Abbe théorise cette limite (d) comme étant proportionnelle à la longueur d'onde (λ) et à l'inverse de l'ouverture numérique de la lentille du microscope (nA) [eq. (1.7)]. Les plus petites variations spatiales détectables sont limitées par la longueur d'onde utilisée : un point infiniment petit produit une tache de la taille de la longueur d'onde au minimum, caractérisée par la fonction d'étalement spectrale (PSF²⁵), ou réponse impulsionnelle. Celle-ci agit comme un opérateur de convolution sur l'objet à imager (composée d'une multitude de points infiniment petits) pour donner l'image finale à travers le microscope.

Connaissant la PSF du système d'imagerie, si on parvient à isoler cette tache particulière dans une image, on peut en déduire la présence d'un diffuseur plus petit que la longueur d'onde, localisé au centre cette tache [fig. 1.37]. On parle alors de microscopie par localisation de molécule unique (SMLM²⁶).

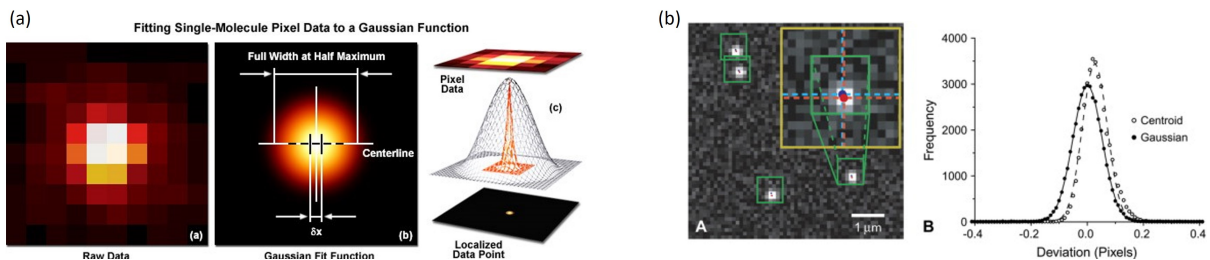


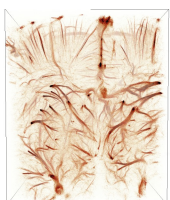
FIGURE 1.37 – (a) PSF et localisation du diffuseur [Carl Zeiss Microscopy Online Campus]. (b) Détermination de la position des diffuseurs [Hess, 2006].

4.1 Microscopie par localisation optique

Le SMLM consiste à observer d'un grand nombre de molécules isolées, à des instants et lieux différents du champ de vue. Le caractère isolé des molécules est nécessaire pour obtenir une image de la PSF et donc une localisation précise du centre de cette tache, avec une précision améliorée. Par accumulation d'une multitude de localisations à des instants différents, l'image finale obtient une résolution plus fine que la limitation PSF. Les molécules doivent être présentes dans toute la structure à imager, mais ne doivent pas émettre un signal en même temps. Si tous les diffuseurs sont allumés en même temps, leurs contributions vont se superposer et il ne sera

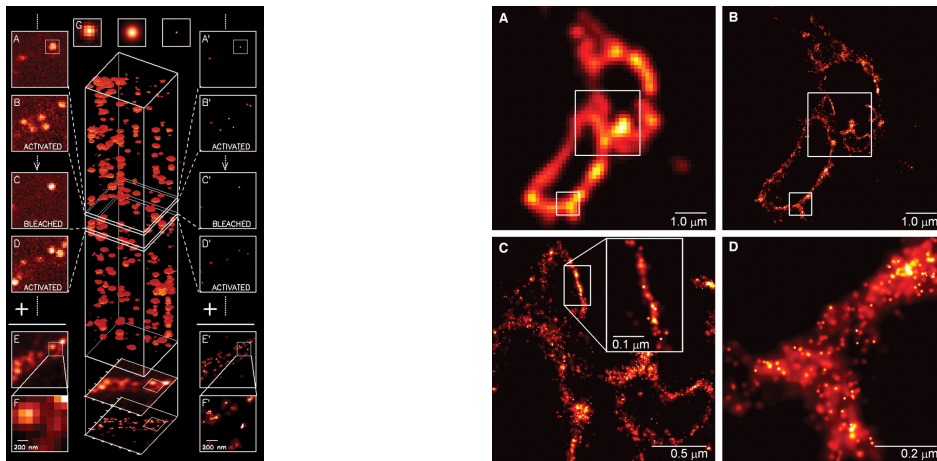
25. *Point Spread Function* (fonction d'étalement du point)

26. *Single-Molecule Localization Microscopy* (microscopie par localisation de molécules uniques)



pas possible de les localiser individuellement. À l'inverse, s'il n'y a pas assez de diffuseurs, l'image sera sous-échantillonnée spatialement et ne rendra pas compte des objets observés.

Les techniques PALM²⁷ [Betzig, 2006 ; Hess, 2006] et STORM²⁸ [Rust, 2006] exploitent l'excitation aléatoires de fluorophores, molécules fluorescentes de quelques manomètres. L'excitation se fait par flash lumineux sur tout l'objet, avec une fréquence de répétition de plusieurs kilohertz en contrôlant l'énergie envoyée. À chaque flash lumineux, un petit nombre aléatoire de fluorophores vont absorber l'énergie et la réémettre en direction du capteur par fluorescence. Chacune des images obtenues est un ensemble de PSF isolées, associé à une collection de fluorophores [fig. 1.38 1]. On peut alors localiser cette collection précisément puis répéter l'opération avec un nouveau flash et une nouvelle image. Par accumulation des localisations de fluorophores, l'objet se dessine peu à peu. Au bout d'un certain nombre de localisations, les zones avec plus ou moins de fluorophores apparaissent plus ou moins intenses, avec des contours fins. La résolution finale n'est plus limitée par la longueur d'onde, mais par la précision de localisation et l'échantillonnage spatial. Par exemple, en marquant la membrane d'une cellule avec des protéines fluorescentes manométriques, leurs excitations et localisations successives révèlent les frontières de la membrane avec une résolution bien en dessous de la limite de diffraction de l'optique utilisée [fig. 1.38 2].



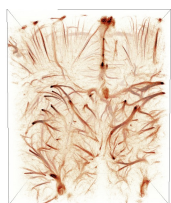
(1) Excitations successives d'une collection de fluorophores (2) Membrane de cellule avec protéines marquées en fluorescence

FIGURE 1.38 – (1) Excitations successives des fluorophores et localisation sources isolées. (2a) Accumulation de toutes les contributions des fluorophores, résolution de 200 nm, (2b-c-d) fPALM avec une précision de localisation de 2 à 25 nm. [Betzig, 2006]

Ces techniques ont ouvert le domaine de l'imagerie nanométrique avec la chute du mur de la diffraction, théorisée par Ernst Abbe en 1873. Les travaux de Stefan W. Hell, William E. Moerner, et Eric Betzig ont été récompensés en 2014 par le prix Nobel de chimie.

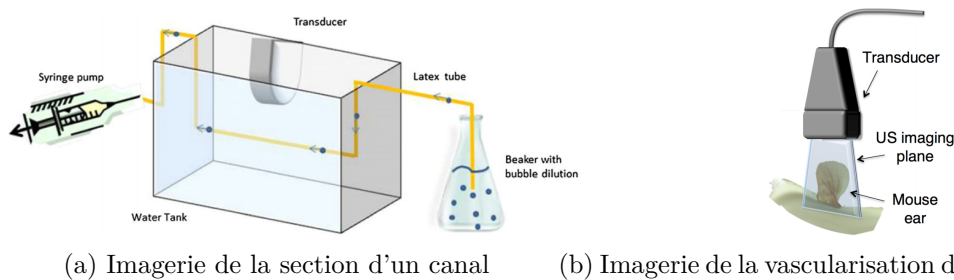
27. *Photo-Activated Localization Microscopy* (microscopie par localisation photoactivée)

28. *STochastic Optical Reconstruction Microscopy* (microscopie de reconstruction optique stochastique)



4.2 Principe de la microscopie par localisation ultrasonore

4.2.1 De l'imagerie optique à l'imagerie ultrasonore



(a) Imagerie de la section d'un canal (b) Imagerie de la vascularisation de l'oreille de souris

FIGURE 1.39 – Montages expérimentaux pour l'ULM : (a) section d'un canal *in vitro* [Viessmann, 2013], (b) oreille de souris *in vivo* [Christensen-Jeffries, 2015].

Le concept d'imagerie des diffuseurs isolés peut être adapté aux ultrasons avec des particules diffusantes d'une taille inférieure à la longueur d'onde d'imagerie. Injectées dans un réseau sanguin, leurs localisations par ultrasons dessinent l'arborescence vasculaire comme pour les fluorophores dans la membrane cellulaire. À la différence de l'imagerie PALM, en microscopie par localisation ultrasonore (ULM²⁹, aussi parfois appelée échographie super-résolue), les diffuseurs sont toujours visibles. C'est le flux sanguin qui permet le renouvellement et déplacement des diffuseurs dans le réseau vasculaire. Ainsi, à chaque image échographique, une collection de diffuseurs se trouvent en des endroits différents et permet un échantillonnage spatial adapté.

Les premiers travaux sur l'ULM remontent à 2011 *in vitro* [Couture, 2011 ; Couture, 2010] et *in vivo* [Siepmann, 2011]. Les diffuseurs ponctuels isolés sont obtenus avec un agent de contraste ultrasonore en très faible concentration dans de le flux : des microbulles de gaz de quelques micromètres de diamètre. Elles sont injectées dans un canal plus étroit que la longueur d'onde, ou dans le flux sanguin, et imagées à haute cadence avec un échographe. Au passage d'une microbulle dans le champ de vue de la sonde ultrasonore, elle renvoie un écho caractéristique d'un diffuseur ponctuel isolé qui permet d'être localisé précisément. L'image finale résulte de l'accumulation d'une multitude de localisations de microbulles ayant parcourues tout l'espace du flux (plusieurs millions). Le renouvellement étant limité par la vitesse d'écoulement du flux, l'acquisition d'une grande quantité d'image doit être répartie sur un temps long devant la vitesse d'écoulement (par exemple 100 000 images étalées sur 5 minutes).

Peu après, plusieurs équipes ont réalisé des travaux similaires sur la localisation de microbulles dans une section de canal [Viessmann, 2013 ; Couture, 2011], et dans l'axe de canaux avec une résolution en élévation [Desailly, 2013 ; O'Reilly, 2013] [fig. 1.40].

29. *Ultrasound Localization Microscopy* (microscopie par localisation ultrasonore)



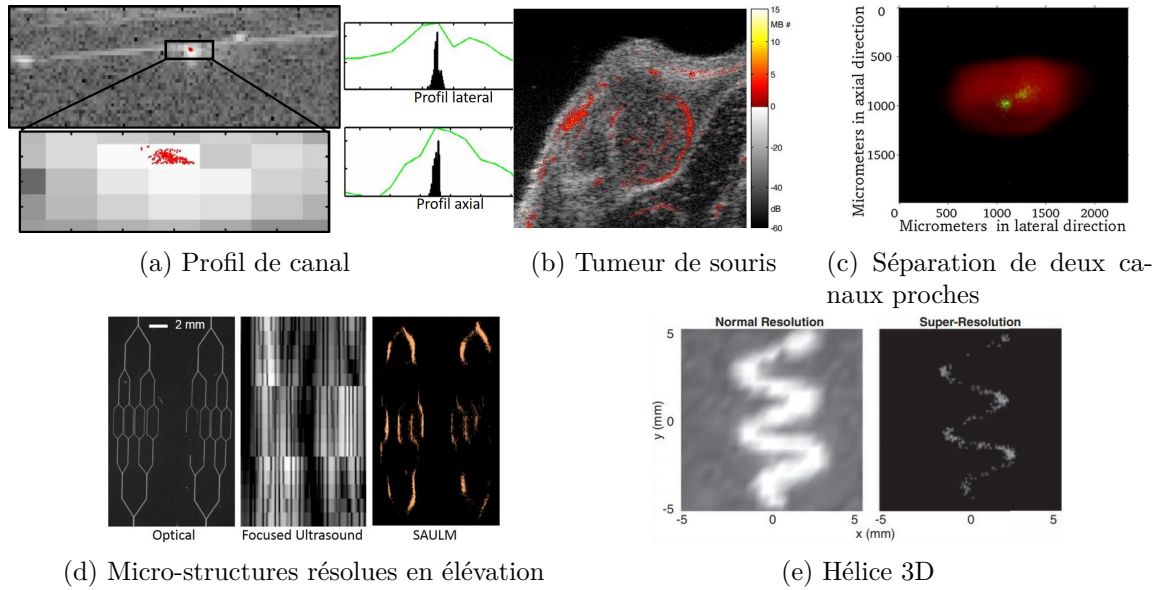


FIGURE 1.40 – Premières démonstrations de l’ULM : (a) [Couture, 2011], (b) [Siepmann, 2011], (c) [Viessmann, 2013], (d) [Desailly, 2013], (e) [OReilly, 2013].

La technique est ensuite appliquée à l’imagerie *in vivo* chez la souris, en injectant les microbulles dans le sang en faible concentration [Siepmann, 2011]. Comme l’imagerie super-résolue résulte d’une multitude d’images au cours du temps (plusieurs milliers), le sujet imagé doit rester immobile tout au long de l’acquisition des données. L’utilisation de l’imagerie haute cadence offre la possibilité de compenser le mouvement dans le plan pour les expérimentations *in vivo* [Siepmann, 2011 ; Hingot, 2017], à la différence des mouvements hors plan qui ne peuvent être corrigés. Avec un échantillonnage temporel élevé, les microbulles sont suivies individuellement sur quelques images [fig. 1.42 1]. Connaissant la trajectoire, les positions et instants d’une microbulle, les vitesses et directions sont calculées pour caractériser l’écoulement dans le vaisseau sanguin imagé [figs. 1.41 et 1.42].

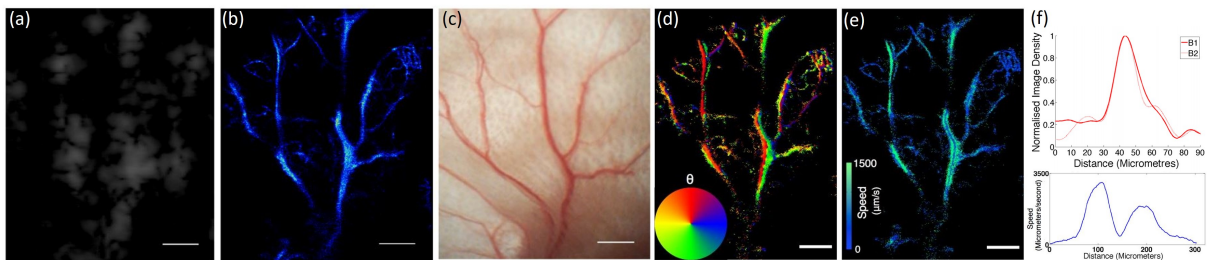


FIGURE 1.41 – ULM sur l’oreille de souris à 25 Hz. (a) Image mode-B de référence, (b) intensité de localisations, (c) comparaison optique, (d) carte de direction des flux, (e) carte de vitesse des flux, (f) profils d’intensité et de vitesse. [Christensen-Jeffries, 2015]



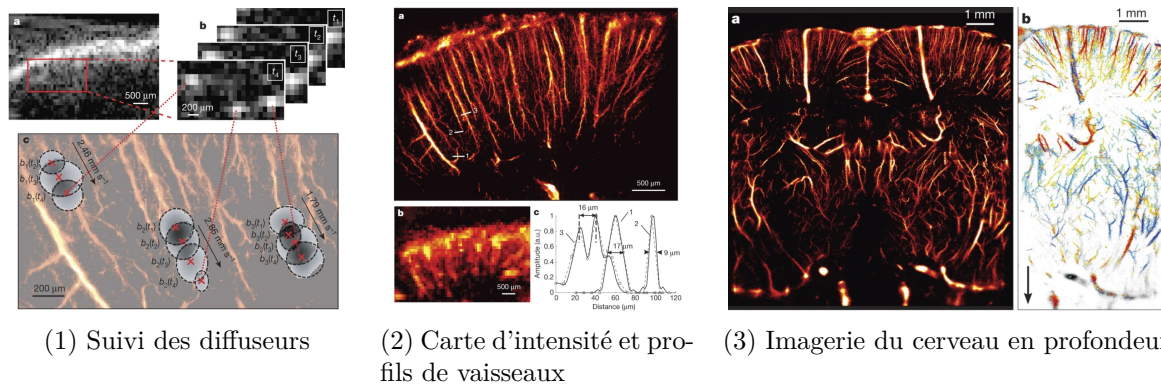


FIGURE 1.42 – ULM dans le cerveau de rat avec 75 000 images à 500 Hz. (1) Principe du suivi des microbulles avec mesure de vitesse. (2a) Carte d'intensité de microbulles comparée au Doppler (2b), (2c) profils d'intensité. (3a-b) Plan d'imagerie du cerveau de rat sur toute la profondeur (12,5 mm) avec vitesse des flux. [Errico, 2015]

Cette technique révèle la vascularisation des organes en profondeur avec la vitesse et direction des flux en augmentant significativement la résolution de l'imagerie échographique. [Christensen-Jeffries, 2015] a montré la possibilité de résoudre un vaisseau sanguin d'un diamètre de $19\ \mu\text{m}$ avec un système d'imagerie limité à une résolution de $100\ \mu\text{m}$ [fig. 1.41] (fréquence d'imagerie de $6,5\ \text{MHz}$, $\lambda = 240\ \mu\text{m}$). Avec une fréquence d'imagerie plus élevée à $15\ \text{MHz}$ ($\lambda = 100\ \mu\text{m}$), des vaisseaux de $9\ \mu\text{m}$ de diamètre peuvent être imagés dans le cerveau de rat à $12,5\ \text{mm}$ de profondeur, avec craniectomie [Errico, 2015]. Le compromis résolution/pénétration de l'imagerie échographique est dépassé. Pour une fréquence de sonde donnée, la résolution n'est plus limitée à quelques longueurs d'onde [fig. 1.25], mais est augmentée d'un facteur entre 10 à 20.

Pour résumé, l'ULM apporte une résolution spatiale fine pour les vaisseaux sanguins, en profondeur, et avec une bonne sensibilité au flux vasculaire du plan d'imagerie. Le gain en résolution spatiale se fait au détriment de la résolution temporelle perdue par le temps d'acquisition. Son caractère non invasif renforce son potentiel pour l'imagerie de la microvascularisation [fig. 1.35].

4.2.2 Grandes étapes de l'ULM

Le processus d'imagerie ULM se sépare en cinq étapes, de l'acquisition à l'exploitation des données : [fig. 1.43]

1. Longue séquence d'imagerie de microbulles isolées
2. Filtrage et isolement de la réponse impulsionnelle des microbulles
3. Détection et localisation sub-longueur d'onde
4. Suivi des trajectoires des microbulles (**tracking**), et interpolation des traces
5. Rendus graphiques et exploitation des données

Elles permettent de passer d'une séquence d'images avec microbulles dans un flux vasculaire à une image haute résolution du réseau vasculaire, avec la vitesse et la direction de flux. Chaque étape est détaillée dans les sections à venir.



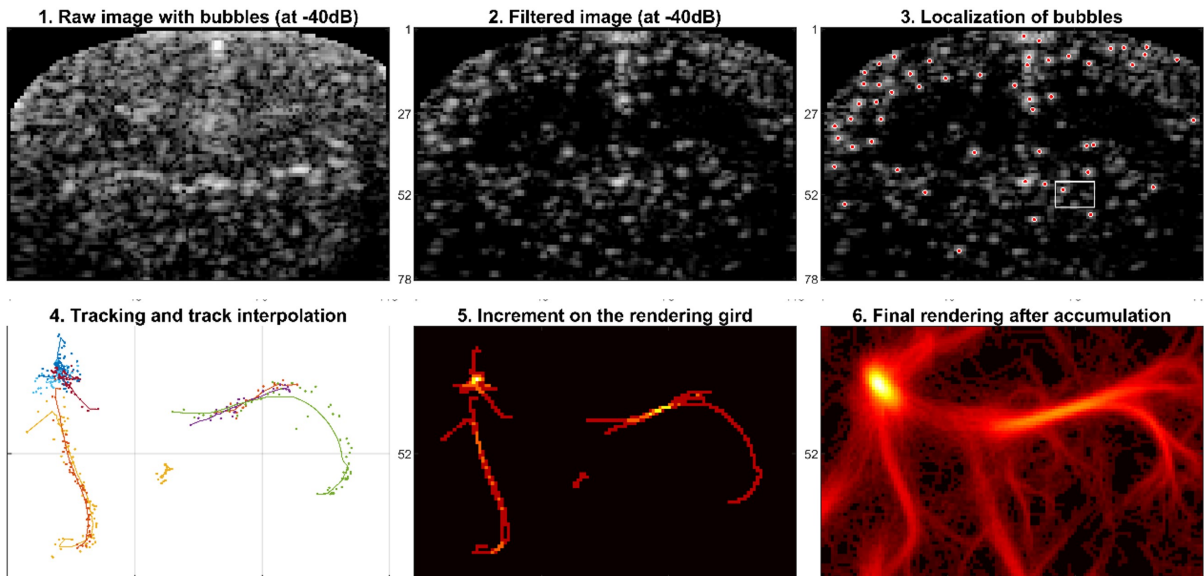


FIGURE 1.43 – Schéma de principe de l'ULM avec les grandes étapes : (1) longue séquence d'imagerie de microbulles isolées, (2) filtrage et isolement de la réponse des microbulles, (3) détection et localisation sub-longueur d'onde, (4) suivi des trajectoires et interpolation des traces, (5) carte d'intensité, (6) accumulation des localisations/trajectoires.

4.2.3 Imagerie de diffuseurs ultrasonores ponctuels

Agent de contraste ultrasonore

En imagerie ultrasonore, les agents de contrastes utilisés sont des petites microbulles de gaz microscopiques, injectées dans le sang avec une durée de vie de quelques minutes dans le réseau [Schneider, 1999]. Elles sont injectées par voie intraveineuse chez l'homme et ne présentent peu de risque particulier pour la santé.

Différents modèles de microbulles sont distribués par plusieurs compagnies depuis les années 1990 [Frinking, 2020]. Les microbulles dites de secondes générations enferment un gaz dans une membrane de phospholipides, augmentant leur temps de demie-vie dans le corps. A titre d'exemple, l'entreprise Bracco (Italie) distribue en Europe les microbulles *SonoVue* depuis 2001³⁰, composées d'hexafluorure de soufre dans une capsule de phospholipides.

Avec une taille légèrement inférieure à celle des globules rouges (6-8 μm), elles parcourent tout le réseau vasculaire, des artères aux veines en passant par les capillaires sanguins, et sont éliminées rapidement par les poumons. Contrairement aux agents de contraste utilisés en IRM et en radiologie (iode, gadolinium), les microbulles sont purement intravasculaires. Cette petite taille répond également au besoin de l'ULM, qui requiert des diffuseurs d'une taille inférieure à la longueur d'onde : les très hautes fréquences pouvant atteindre 50 MHz chez le petit animal ($\lambda = 30 \mu\text{m}$) (VisualSonics, Canada). Leur contraste ultrasonore est induit par la brusque variation d'impédance entre le tissu et le contenu gazeux. À partir d'une certaine pression et dans une bande de fréquences particulière, la forme sphérique de la microbulle entre en résonance et contribue à augmenter l'écho rétrodiffusé au passage de l'onde ultrasonore [section 3.2.3]. En

30. 2014 aux États-Unis, sous le nom *Lumason*



revanche, si l'onde ultrasonore est trop énergétique, les membranes des microbulles se rompent sous la trop grande déformation induite par les dépressions importantes.

L'image des microbulles s'étend dans l'image ultrasonore sur quelques longueurs d'onde, indépendamment de la taille des diffuseurs mais de la diffraction et donc de la **PSF** du système d'imagerie. Pour qu'elles apparaissent isolées les unes des autres, le nombre de microbulles présentes dans le champ de vue de la sonde ultrasonore doit être limité (généralement une microbulle par carré de 5 longueurs d'onde de côté). On distingue principalement deux méthodes : par bolus ou par infusion.

Les bolus consistent en une injection d'une petite quantité de microbulles en une seule fois. Le nombre de microbulles dans l'image augmente très rapidement, puis diminue progressivement au fur et à mesure de l'élimination des microbulles sur plusieurs minutes. L'exploitation des données se fait principalement sur la fin du bolus, après le pic de concentration quand le nombre de diffuseurs est suffisamment bas pour observer des microbulles isolées [Errico, 2015].

L'infusion se fait avec une injection continue à très faible concentration pour assurer un nombre de microbulles faible mais stable pendant plusieurs minutes [Hingot, 2019]. En pratique, les microbulles ont tendance à flotter ou à s'agréger dans la seringue au bout de quelques minutes [Lohmaier, 2004] et il est nécessaire d'agiter régulièrement la solution injectable pour garder une concentration homogène. Un système spécifique a d'ailleurs été conçu pour la perfusion de *SonoVue* (Bracco, Italie) avec une rotation automatique de la seringue (*VueJect, Bracco, Italie*). À défaut de ce système, l'infusion peut être réalisée par une série de micro-bolus de 50 μl , répétés toutes les 30 secondes ou minute, temps court devant la dynamique du bolus. La fluctuation est maîtrisée et assure un nombre à peu près constant de microbulles isolées dans l'image pendant toute la durée de l'injection (plusieurs minutes).

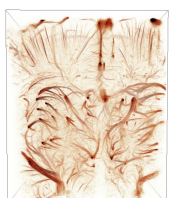
Pour un examen échographique chez l'homme, la posologie recommandée est de 4,8 ml³¹) (soit 0,06 ml/kg pour un adulte). Les volumes totaux injectés pour l'ULM chez le petit animal sont bien plus élevés : 0,8 ml/kg pour une infusion de 80 μl /min pendant 5 minutes [Hingot, 2019] (rat de 500 gr, total de 400 μl), 0,7 ml/kg pour un bolus de 150 μl [Errico, 2015] (rat de 225 gr). Cependant des études ont montré l'absence de complications chez l'humain pour un surdosage jusqu'à 0,6 ml/kg [Bokor, 2001]. Pour l'imagerie du petit animal, une attention devra être portée sur la quantité maximale de volume injectée dans le sang, pour ne pas dépasser 20 ml/kg (soit 5 ml pour un rat 250 gr, et 400 μl pour une souris de 20 gr) [Diehl, 2001].

Filtrage et isolement du signal des microbulles

L'échogénicité des microbulles reste pourtant inférieure à celle des tissus environnants et des os et il est nécessaire d'avoir recours à des techniques de suppressions du tissu pour faire apparaître le signal des microbulles.

La mise en résonance de la capsule de la microbulle peut induire une réponse non-linéaire dans certaines conditions de fréquence et pression [Jong, 2009]. Plusieurs modes d'imagerie sont

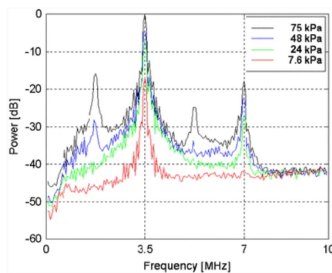
31. Commission de la transparence, Haute Autorité de Santé française



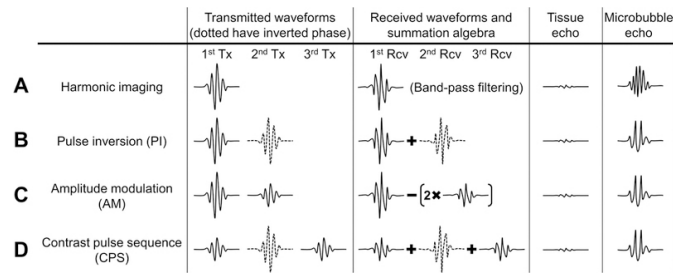
utilisés pour exploiter la signature acoustique particulière des microbulles et ont été comparés dans différents articles de revue [Goldberg, 1994 ; Stride, 2003 ; Cosgrove, 2010 ; Wang, 2018 ; Averkiou, 2020]. Parmi eux, les plus classiques sont :

Imagerie harmonique : le spectre des microbulles présente des résonances harmoniques et sous-harmoniques qui permettent d'observer les microbulles dans une gamme de fréquence autre que celle d'excitation [fig. 1.44 1]. Le tissu ayant une réponse linéaire, est absent du contenu fréquentiel de la gamme de réception [Forsberg, 2000 ; Basude, 2001 ; Goertz, 2005 ; Newsome, 2020].

Séquences spécifiques aux agents de contraste : la réponse non-linéaire est exaltée en réalisant des combinaisons d'impulsions de caractéristiques différentes. Le tissu ayant une réponse linéaire, on peut trouver des combinaisons d'excitations qui, une fois additionnées, s'annihilent et laissent paraître uniquement le signal non-linéaire des microbulles. Les schémas peuvent être basés sur l'inversion de polarité de l'excitation (*pulse inversion*) [Burns, 2000], ou sur l'amplitude de l'excitation (*amplitude modulation*) [fig. 1.44 2].



(1) Réponse fréquentielle des *SonoVue*



(2) Méthodes non-linéaires

FIGURE 1.44 – (1) Réponse fréquentielle des microbulles *SonoVue* pour différentes pressions [Jong, 2009]. (2a) Imagerie harmonique, (2b) non-linéaire avec inversion de polarisation, (2c-d) modulation d'amplitude [Wang, 2018].

L'imagerie non-linéaire nécessite cependant des régimes de pression et fréquences spécifiques. La non-linéarité apparaît à partir d'un certain seuil de pression, et principalement pour les fréquences faibles. Pour les imageries harmoniques, sous-harmoniques et ultra-harmoniques, une large bande passante en réception est nécessaire sur la sonde : l'émission se fait à f_0 et la réception à $f_0/2$, $1,5f_0$ ou $2f_0$ [Goertz, 2005]. Il est généralement difficile d'avoir un transducteur avec une bande passante plus large que de deux fois sa fréquence centrale³². Des transducteurs et sondes ont été spécifiquement dimensionnés pour obtenir des bandes passantes composites et permettre la réception des différentes harmoniques [Bouakaz, 2002 ; Martin, 2014]. D'autres approches utilisent deux types de transducteurs différents pour avoir une excitation basse fréquence dans la bande de résonance des microbulles, et une réception hautes fréquences au delà du spectre des tissus linéaires, aussi appelée angiographie acoustique [Gessner, 2013 ; Gessner, 2009].

D'autres techniques utilisent l'imagerie différentielle : la différence entre deux images successives fait apparaître les objets en mouvement comme les microbulles dans le flux sanguin avec

32. La bande passante s'exprime en pourcentage de la fréquence centrale : pour une sonde centrée en f_0 , une bande passante de 100 % correspond à la bande $[(1 - 50\%) \cdot f_0; (1 + 50\%) \cdot f_0]$



une imagerie haute cadence. Plus généralement, on peut utiliser des filtres passe-haut, ou l'effet Doppler, pour supprimer les tissus avec des mouvements faibles.

On peut également exploiter la signature spatiale et temporelle de l'écoulement de la microbulle : une petite tache spatialement et temporellement corrélée. Il a été montré que les filtres spatio-temporels (comme la SVD³³ [Demene, 2015]) apportaient un bon ratio signal à bruit (SNR³⁴) en imagerie ultra-rapide [Desailly, 2017; Brown, 2019]. L'imagerie ultra-rapide améliore également le contraste des microbulles dans l'image en répartissant de manière homogène le champ de pression par rapport à l'imagerie focalisée [Couture, 2012].

Ces méthodes temporelles requièrent un bon échantillonnage spatial et temporel (plusieurs centaines d'images par seconde) et un déplacement rapide des microbulles dans le temps pour les séparer efficacement du signal du tissu : le déplacement d'une microbulle entre deux images (échantillonnage temporel) doit être inférieur à la taille des pixels (échantillonnage spatial). Elles deviennent limitées lorsque les différences de vitesses sont faibles : pour les flux lents, ou lorsque que le tissu environnant est en mouvement [Brown, 2019].

L'imagerie non-linéaire sera donc plutôt utilisée pour des fréquences inférieures à 10 MHz avec une forte résonance et non-linéarité des microbulles, notamment pour les flux lents. À plus hautes fréquences, on privilégiera plutôt les filtrages temporels, avec des cadences d'imagerie très élevées et des déplacements de microbulles rapides (par rapport à la longueur d'onde et la cadence d'imagerie).

4.2.4 Détection et localisation sub-longueur d'onde

Détection de microbulles isolées

Une fois le signal des microbulles révélé dans l'image, la première étape du traitement consiste à reconnaître les formes des microbulles isolées, condition nécessaire pour l'imagerie SMLM. Certaines méthodes utilisent un simple algorithme de détection des maxima locaux [Errico, 2015; Hingot, 2019]. Dans ce cas, on considère que tout point brillant isolé est potentiellement une microbulle. D'autres traitements exploitent l'étalement théorique de la microbulle par simulation de la PSF. Elle est ensuite comparée aux diffuseurs présents dans l'image [Christensen-Jeffries, 2015; Song, 2018b]. Cette étape rejette les objets macroscopiques qui ne ressemblent pas à la PSF simulée et les microbulles trop proches. En effet, en présence de deux microbulles distantes de moins d'une longueur d'onde, les PSF se superposent, interfèrent et biaisent les algorithmes numériques de localisation classiques.

En théorie, la PSF d'un diffuseur ponctuel dépend de sa position par rapport aux transducteurs et nécessite d'être calculée en tout point de l'espace. En pratique, pour réduire les coûts algorithmiques, les PSF de microbulles sont souvent assimilées à des fonctions gaussiennes [Song, 2018b].

Localisation sub-longueur d'onde

33. *Singular Value Decomposition* (décomposition par valeurs singulières)

34. *Signal-to-Noise Ratio* (rapport signal sur bruit)



L'étape suivante est la localisation et va conditionner la qualité finale de l'image. Pour chaque tache de microbulle, le centre de la tache, correspondant à la position de la microbulle, doit être estimé avec une précision sub-longueur d'onde. L'image ultrasonore est généralement composée de pixels de taille comprise entre λ et $\lambda/4$. L'étape de localisation convertit la présence d'une microbulle dans un pixel $M_{i,j}$, en une position de microbulle en (x, y) .

De multiples algorithmes de localisation existent et seront détaillés dans le [Chapitre 2](#). Les principaux sont listés ci-dessous [fig. 1.45].

Moyenne pondérée : la position est obtenue en pondérant les déplacements par rapport au centre par l'intensité des pixels [Christensen-Jeffries, 2015 ; Hansen, 2016 ; Hingot, 2019]. C'est une opération linéaire rapide avec des poids associés aux pixels voisins de celui de plus haute intensité.

Interpolation : l'image initiale est interpolée, améliorant la résolution du pixel de plus haute intensité [Errico, 2015 ; Song, 2018b]. Les méthodes interpolées, généralement d'un facteur 10, sont très gourmandes en temps et espace de calcul, surtout en imagerie 3D.

Déconvolution gaussienne : pour chaque tache, un noyau gaussien est déconvolué pour déterminer la position correspondante [Ackermann, 2016]. C'est une méthode d'optimisation qui est aussi coûteuse en temps de calcul.

Symétrie radiale : cette méthode exploite les propriétés de symétrie de la PSF pour trouver le centre [Parthasarathy, 2012 ; Heiles, 2021b]. L'algorithme utilise une descente de gradient par les diagonales de la PSF. L'opération est linéaire et ne nécessite ni interpolation, ni optimisation, ce qui la rend rapide et peu coûteuse.

RF : la localisation se fait par détection des paraboles dans les données RF [Desailly, 2013]. L'étape de [beamforming](#) n'est plus nécessaire, réduisant le temps de calcul et augmentant théoriquement la précision de localisation mais implique de travailler sur des données plus grandes et moins contrastées.

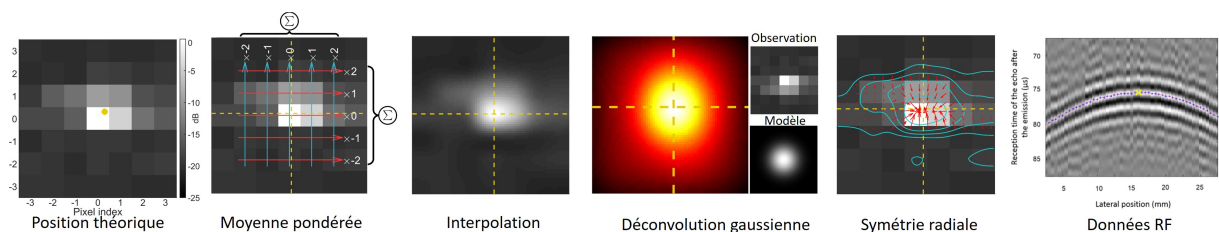


FIGURE 1.45 – Principe de localisation sub-longueur d'onde en imagerie ultrasonore. [Heiles, 2021b ; Desailly, 2013]

Localisation par réseaux de neurones

Plus récemment, des techniques avec apprentissage supervisé (*deep learning*) ont été appliquées pour la localisation des microbulles [Sloun, 2019 ; Sloun, 2020]. En utilisant une collection variée de positions de microbulles, y compris des microbulles proches, ces techniques tentent de localiser plus de microbulles dans une image car elles sont capables de résoudre les PSF qui



interfèrent entre elles, en un temps faible. Les travaux de [Milecki, 2021] ont montré une augmentation de la précision en classification binaire de 10% *in vitro* en détectant les trajectoires dans l'espace-temps à l'aide de convolutions tri-dimensionnelles. Avec ce type de méthode, la concentration en microbulles pourrait être augmentée, réduisant le temps d'acquisition et la taille des données à traiter.

Erreur de localisation

La localisation est toujours contrainte à une erreur due à la mesure et au bruit qui vont influencer sur la exactitude de la localisation (erreur moyenne) et la précision (écart-type de l'erreur). Un modèle théorique d'erreur de localisation minimale a été établi par [Desailly, 2015] en prenant en compte la largeur de la sonde (L_x), le nombre de transducteur (n), la profondeur d'imagerie z_0 , et l'erreur d'échantillonnage des transducteurs (σ_τ) [eq. (1.8)]. Ce modèle théorique donne une erreur de localisation très faible $\lambda/100$. Expérimentalement, d'autres paramètres influent sur la précision de localisation comme le déplacement de la microbulle, du tissu, les vibrations expérimentales, les variations d'impédance *etc.* Les améliorations de résolution *in vivo* sont généralement de l'ordre de $\lambda/10$.

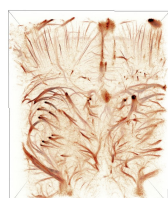
$$\sigma_x \approx 2\sqrt{3} \frac{c\sigma_\tau z_0}{\sqrt{n}L_x} \qquad \sigma_z \approx \frac{c\sigma_\tau}{2\sqrt{n}} \qquad (1.8)$$

La technique de localisation a également un fort impact sur l'image finale, surtout après accumulation de beaucoup de positions. Différentes publications scientifiques comparent les erreurs de localisation *in vitro* pour différents algorithmes [Christensen-Jeffries, 2017b; Song, 2018a; Brown, 2019]. Cependant l'erreur de localisation ne détermine pas totalement la résolution finale de l'image ULM. Nous avons montré dans [Heiles, 2021b] l'influence du choix de l'algorithme de localisation sur toutes les étapes de l'ULM. Ce travail sera détaillé dans le [Chapitre 2](#).

4.2.5 Suivi de trajectoires des microbulles

Contrairement à l'imagerie optique [SMLM](#) où les diffuseurs s'activent aléatoirement sans corrélation spatiale d'une image à l'autre, l'ULM exploite la propagation des diffuseurs dans un flux : une même microbulle est observée à plusieurs instants successifs $\{M(x, z, t)\}$. La trajectoire est alors définie par l'ensemble de points espace-temps $\{M_i(x, z, t) | i \in \text{trajectoire}\}$, et permet de démultiplier le nombre de localisations entre chaque instants : la trajectoire est continue dans l'image. Avec les points espace-temps des trajectoires, on accède à la direction et vitesse de la particule en chaque point. Cette information donne un aspect quantitatif à l'ULM : avec suffisamment de trajectoires dans un vaisseau sanguin, on peut mesurer la dynamique de l'écoulement (vitesse et débit). Cette notion de cohérence spatio-temporelle des microbulles était pressentie dès les débuts de l'ULM en 2011 avec [Siepmann, 2011] qui recommandait déjà l'utilisation de suivi de trajectoires (en anglais [tracking](#)). Les premières applications *in vivo* sont apparues en 2013 [Errico, 2015; Christensen-Jeffries, 2015].

Plusieurs méthodes existent et ont été utilisées pour l'ULM. [Errico, 2015; Christensen-Jeffries, 2015; Hansen, 2016] ont utilisé un appariement des microbulles par images successives



en cherchant la particule la plus proche dans l'image suivante. D'autres méthodes cherchent à associer les positions en prenant en compte un paquet d'images successives [Couture, 2018 ; Song, 2018b ; Hingot, 2019 ; Heiles, 2019a]. Une solution de ce problème d'affectation est la méthode combinatoire hongroise (ou de Kuhn-Munkres), développée dans les années 1955 [Munkres, 1957 ; Kuhn, 1955]. Pour un ensemble de points dans l'espace et le temps, la matrice inter-distance est calculée et on minimise la distance totale cumulée entre les points avec des opérations linéaires sur la matrice, avec une complexité en $\mathcal{O}(n^3)$ [fig. 1.46].

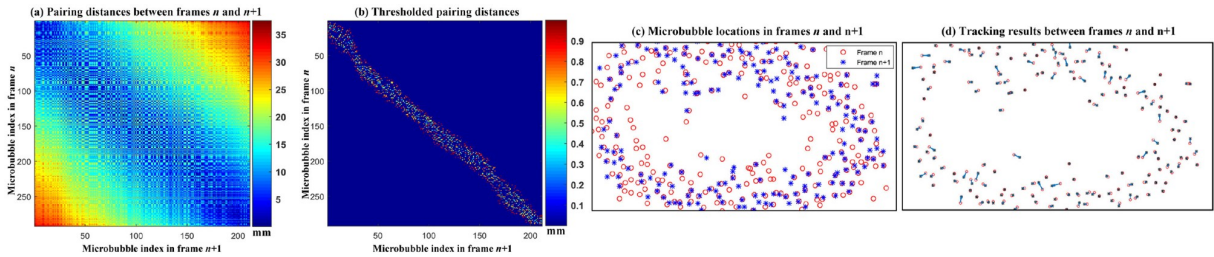


FIGURE 1.46 – Principe de l'algorithme de tracking avec minimisation de la matrice inter-distances. [Song, 2018b]

Plus récemment, des méthodes stochastiques ont été utilisées avec une approche Monte Carlo et chaîne de Markov [Ackermann, 2016 ; Opacic, 2018], et des filtres de Kalman [Solomon, 2019 ; Tang, 2020].

Interpolation des trajectoires

Une fois les positions de microbulles associées en une trajectoire continue définie par un ensemble de points dans l'espace-temps, la trajectoire est interpolée avec un pas d'échantillonnage plus fin [fig. 1.47a]. Les distances initiales entre les points étant de l'ordre de la longueur d'onde, l'interpolation permet de retrouver les positions successives entre deux images, comme s'il y avait une infinité de localisations entre chaque position imagée. La trajectoire est alors remplie par l'interpolation. L'image finale résulte non pas des localisations (comme en microscopie par localisation optique), mais des trajectoires représentées par une infinité de points proches. L'interpolation agit également comme un lissage sur les trajectoires, réduisant l'erreur de localisation de chaque position de la microbulle, et lui donnant une trajectoire plus réaliste [Tang, 2020].

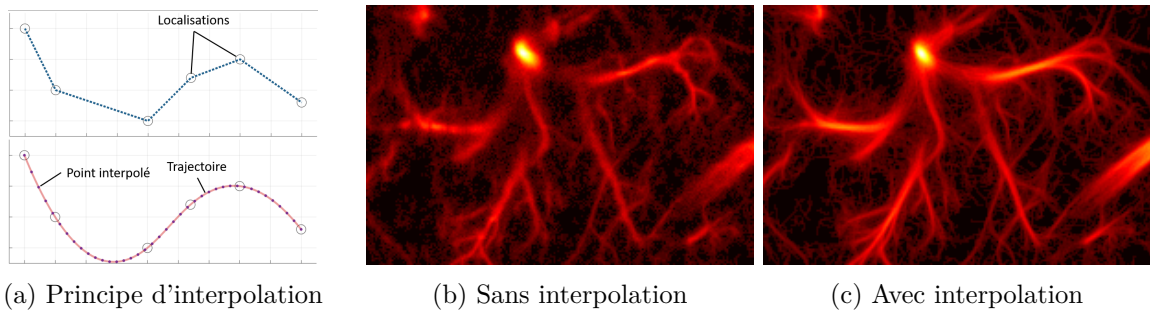


FIGURE 1.47 – (a) Interpolation de la trajectoire d'une microbulle. (b-c) ULM sur le cerveau de rat sans et avec interpolations des trajectoires [Heiles, 2021b].



Conditions d'imagerie

Pour être imagé correctement, certaines conditions sur l'objet sont nécessaires. Le canal (ou vaisseau sanguin) doit être contenu dans le plan d'imagerie. Pour des canaux orthogonaux au plan, une microbulle parcourt rapidement l'épaisseur du champ de vue de la sonde (quelques λ en élévation), et les localisations ne peuvent pas être assignées à une trajectoire. Il convient à l'utilisateur de rejeter ou non ces points.

La seconde condition est la persistance de la microbulle dans l'image pour pouvoir être suivie pendant un temps suffisant. Pour éviter la destruction des microbulles lors de l'imagerie, les pressions acoustiques utilisées sont généralement faibles, quelques centaines de kilopascal. Dans l'oreille de souris [Christensen-Jeffries, 2015], à 6,5 MHz, l'indice mécanique (MI ³⁵) est mesuré à 0,16, soit un pic de pression négatif de 400 kPa. Cet indicateur mesure la puissance maximale envoyée par la sonde et s'écrit $MI = P/\sqrt{f_0}$, avec P le pic de pression négatif en MPa, et f_0 la fréquence centrale en MHz. Il est recommandé par la *Food and Drug Administration*³⁶ de ne pas dépasser 1,9 pour un examen échographique chez l'humain (0,23 en ophtalmologie), et 0,8 pour l'imagerie avec agent de contraste [Frinking, 2020].

Enfin la dernière condition est un échantillonnage temporel adapté. Plus la cadence d'imagerie sera élevée devant la distance parcourue par une microbulle par rapport à la longueur d'onde, meilleure sera la discrétisation de la trajectoire, et les algorithmes de [tracking](#) seront plus efficaces. L'interpolation curviligne de la trajectoire sera également plus proche de la réalité. L'imagerie ultra-rapide est particulièrement adaptée pour suivre des flux rapides [table. 1.4]. Le déplacement maximal d'une microbulle entre deux images successives est souvent limité à quelques longueurs d'onde pour éviter les sauts de trajectoires lors de l'étape de [tracking](#). La vitesse maximale de détection des trajectoires est donc proportionnelle à la longueur d'onde (λ) et la cadence d'imagerie (Fr) : $v_{max} = n \cdot \lambda \cdot Fr$ (avec $n \in [0; 2]$). Une cadence d'imagerie supérieure à la vitesse maximale des particules de détection induirait un sur-échantillonnage des écoulements.

Fréquence [MHz]	Longueur d'onde [mm]	Cadence d'imagerie [Hz]	Vitesse maximale [mm/s]
1,5	1	25	51
1,5	1	100*	205
7	0,2	50	22
7	0,2	250*	110
7	0,2	500*	220
15	0,1	100	21
15	0,1	1000*	205

TABLE 1.4 – Vitesse maximale détectable pour une distance maximale de déplacement pour $n = 2$ longueurs d'onde. (*cadence en imagerie ultra-rapide)

Néanmoins, le suivi des trajectoires n'est pas une condition *sine qua non* à la microscopie

35. *Mechanical Index* (indice mécanique)

36. Marketing Clearance of Diagnostic Ultrasound Systems and Transducers, Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff, juin 2019



par localisation [Siepmann, 2011 ; Zhang, 2018]. À défaut, l'information obtenue est restreinte à la présence et position d'une microbulle en un endroit donné, sans considérations de vitesse ni direction.

4.2.6 Représentations graphiques

Les étapes précédentes transfèrent une information dense (des intensités de pixel dans l'espace et le temps) en une information parcimonieuse (des évènements ponctuels dans l'espace et le temps) : des localisations et des trajectoires dans l'espace. Pour faciliter la compréhension de l'utilisateur et rendre compte de l'ensemble des trajectoires, il convient de revenir à une information continue : une image avec une résolution améliorée par rapport aux données d'entrées (appelée aussi image super-résolue en opposition aux images avant traitement). Une structure vasculaire (ou un canal *in vitro*) apparaîtra comme une superposition d'une multitude de trajectoires semblables pour faire une carte d'intensité.

En microscopie optique, les images super-résolues sont obtenues en sommant la contribution de toutes les localisations. À chaque localisation, une déviation standard est estimée et utilisée pour définir une densité de probabilité de trouver une particule. En pratique, la contribution de chaque localisation prendra la forme d'une fonction gaussienne dans l'image haute résolution.

La méthodologie est transposée en ULM avec une erreur de localisation. En pratique, l'erreur de localisation n'est pas toujours calculée et on utilise plutôt une grille de reconstruction avec une taille caractéristique de pixel, souvent 10 fois plus fine que l'image initiale : on parle de pixel super-résolu. Si une trajectoire de microbulle passe par un pixel, son intensité est incrémentée d'une unité [fig. 1.48]. Au fur et à mesure des accumulations de trajectoires, des zones de forte intensité apparaissent et dessinent la vascularisation.

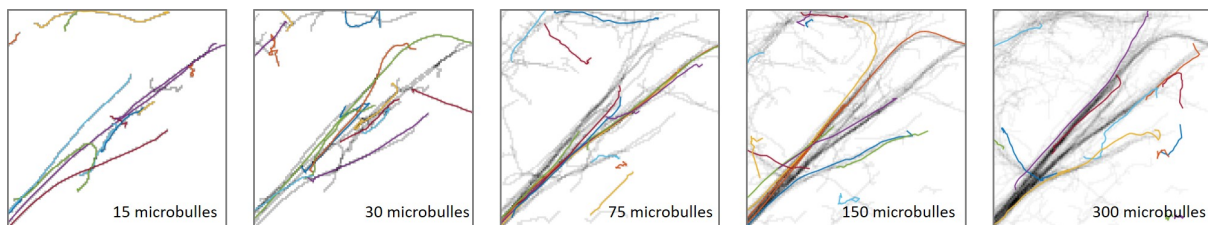


FIGURE 1.48 – Construction d'une image intensité par accumulation des trajectoires dans les pixels.

Pour obtenir une carte des vitesses ou des directions, la valeur de vitesse ou direction de la trajectoire est assignée et moyennée dans chaque pixel avec les autres trajectoires. Le choix des rendus graphiques va dépendre de ce que l'on veut regarder. Des codes couleurs peuvent être ajoutés pour rendre compte de certains paramètres. Pour certains organes avec un arrangement spatial particulier, il est intéressant de discriminer les flux dans certaines directions. Pour le cortex du cerveau, on peut encoder en couleur si les flux sont montants ou descendants pour discriminer le réseau artériel du réseau veineux. Dans le rein, les flux ont plutôt une organisation radiale, l'encodage de la couleur se fera si le flux s'approche ou s'éloigne du bassinnet (centre du rein).



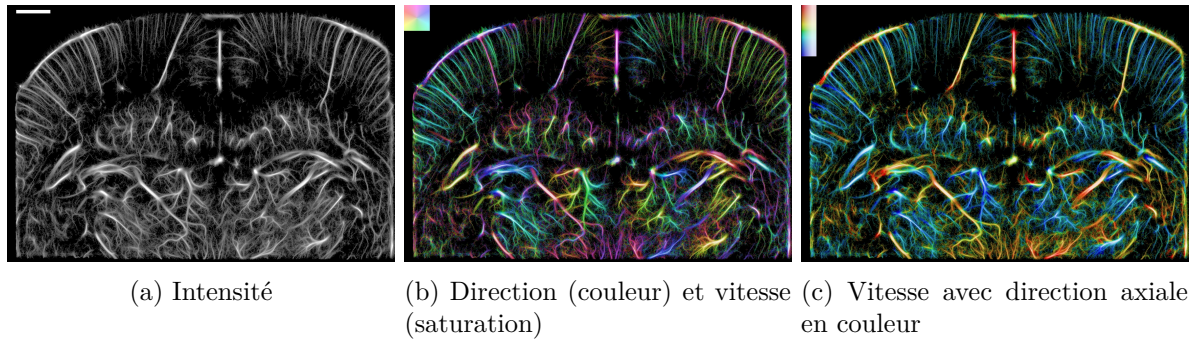


FIGURE 1.49 – Différents rendus pour l’ULM sur le cerveau de rat avec craniectomie à 15 MHz : (a) intensité des microbulles, (b) vitesse et direction, (c) vitesse et direction axiale. (Barre d’échelle 1 mm)

Taille de la grille de reconstruction et temps d’acquisition

La taille des pixels de reconstruction est un point crucial pour le rendu final de l’image. Elle est étroitement liée aux nombres de localisations obtenues et à leur capacité à se superposer pour donner de la dynamique à l’image. Si la grille est définie trop fine, les localisations ne se superposent pas et apparaissent de manière isolée sans reconstruire les vaisseaux. L’image sera parcimonieuse et ne rendra pas compte de la vascularisation. À l’inverse, si les pixels sont choisis trop grands, le gain en résolution ne sera pas significatif par rapport à l’image initiale.

Pour caractériser le remplissage de la grille, on définit la saturation comme étant le pourcentage des pixels super-résolus ayant été traversés par au moins une microbulle. L’étude de la dynamique de la saturation au cours temps donne un temps caractéristique maximal d’acquisition [fig. 1.50b]. Pour une taille de pixel donnée, il faut attendre un certain temps avant que la courbe de saturation puisse atteindre une asymptote, signifiant que toute l’arborescence vasculaire projetée sur la grille a été traversée par un moins une microbulle. Ce temps caractéristique est inversement proportionnel à la taille des pixels choisie [Hingot, 2019] et donne une bonne estimation des temps d’acquisition nécessaires [fig. 1.50c].

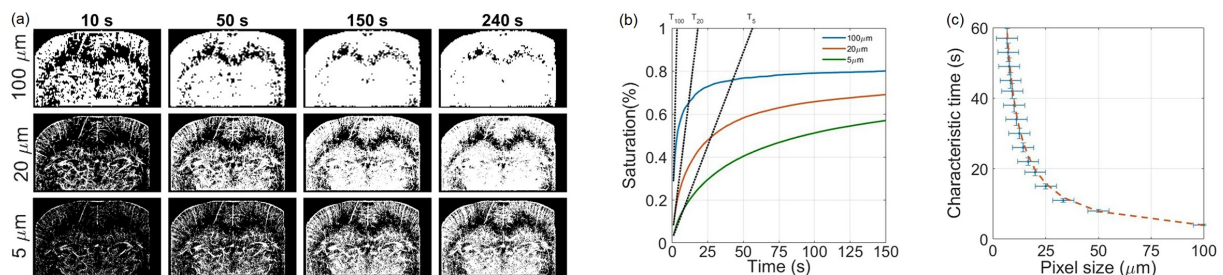


FIGURE 1.50 – (a) Reconstruction avec différentes tailles de pixels et plusieurs temps d’acquisition. (b) Courbes de saturation pour différentes tailles de pixels. (c) Temps caractéristiques d’acquisition pour une taille de pixel donnée. [Hingot, 2019]

Nombre de localisations et concentration

Le nombre de localisations peut être assimilé à un échantillonnage spatial de la vascularisa-



tion : plus il y aura de localisations, meilleur sera échantillonné le réseau sanguin. On cherche alors à avoir un maximum d'occurrences de localisation pour améliorer l'image en augmentant soit la concentration en microbulles, soit le temps d'acquisition. Augmenter la concentration dans le sang va augmenter le nombre de microbulles dans l'image jusqu'à un point où elles vont se superposer et moins de détections seront possibles. Certains traitements obtiennent de bons résultats pour résoudre les fortes concentrations par exemple avec des filtrages directionnels pour isoler les microbulles en fonction de leur direction de propagation [Huang, 2020], ou avec des méthodes d'apprentissage supervisé [Milecki, 2021][fig. 1.51].

Pour des concentrations faibles, augmenter le temps d'acquisition devient une contrainte importante *in vivo* car le sujet doit rester immobile plus longtemps pour éviter les mouvements de la sonde, de l'organe et la déformation de celui-ci. Les principales causes de mouvement sont la respiration et le battement cardiaque. Certaines équipes utilisent des phases d'apnée pour éviter les déplacements [Zhang, 2021], mais inférieures à 10 secondes chez l'humain [Huang, 2021].

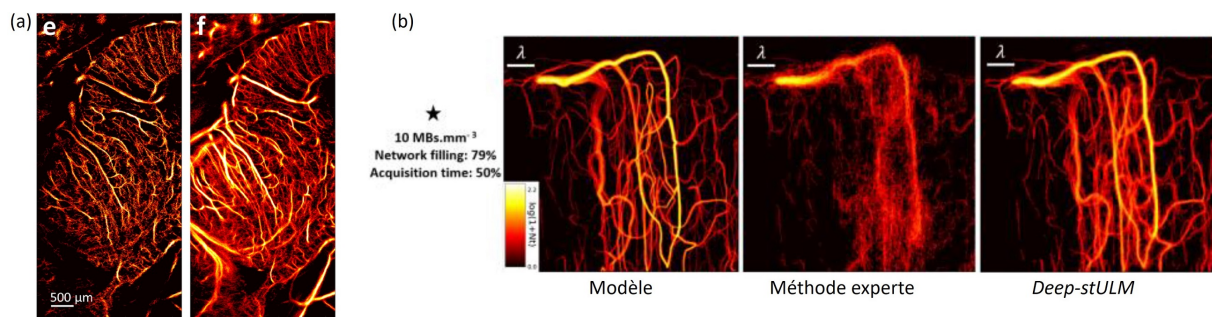


FIGURE 1.51 – (a) Cerveau d'embryon de poulet avec et sans filtrage directionnel pour une concentration élevée de microbulles [Huang, 2020]. (b) Simulation d'écoulement de microbulles et reconstruction avec méthode classique et avec apprentissage profond [Milecki, 2021].

Correction de mouvement

Pour réduire les effets des mouvements pendant les longues acquisitions, une correction de mouvement peut être appliquée au moment du traitement : le déplacement dans les images est estimé puis compensé pour créer une image finale plus piquée. L'accumulation des localisations et trajectoires est plus cohérente avec un gain en résolution et contraste.

Différentes méthodes numériques permettent de mesurer et corriger ce déplacement mouvement : en corrigeant chaque image par rapport à une image de référence [Siepmann, 2011 ; Harput, 2018], ou en mesurant le déplacement sur l'image mode-B avant de l'appliquer sur les localisations de microbulles dans le cerveau de rat [Hingot, 2017][fig. 1.52 1].

L'estimation du mouvement doit être réalisée sur l'image mode-B des tissus, qui requiert une séquence particulière pour être couplée avec de l'imagerie de contraste. [Taghavi, 2021] a intercalé dans une séquence ultrasonore des émissions pour l'imagerie non-linéaire des microbulles, et des émissions pour l'imagerie de tissus (linéaire) pour imager le rein de rat [fig. 1.52 2]. La spécificité aux microbulles est préservée avec l'imagerie non-linéaire, et le mouvement global est corrigé avec une amélioration nette de la résolution.

Une autre méthode consiste à reconstruire les images ultrasonores avec les coordonnées de



Lagrange pour prendre en compte le mouvement tissulaire avant la localisation. Le champ de déplacement est mesuré avec les vitesses Doppler puis est injecté dans l'étape de reconstruction de l'image avec les coordonnées de Lagrange [Cormier, 2021]. Les microbulles sont alors localisées dans le repère fixe myocarde du cœur de rat [fig. 1.52].

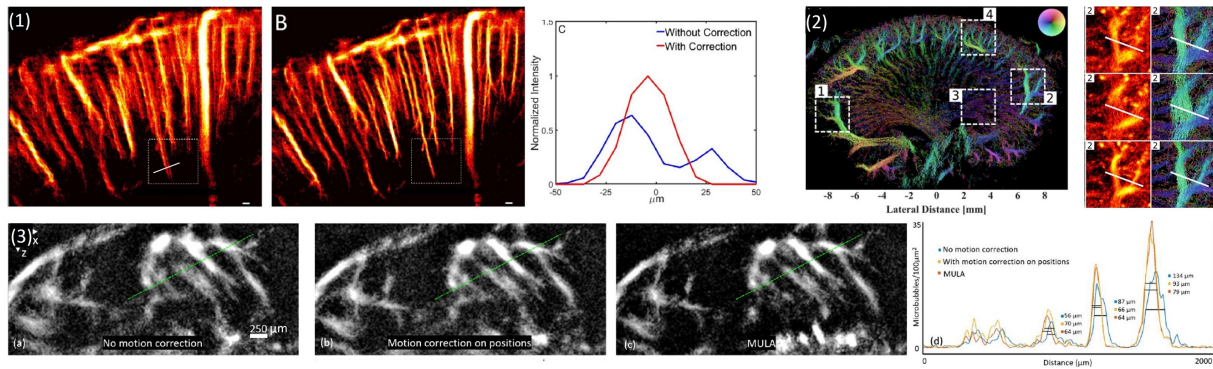


FIGURE 1.52 – (1) ULM dans le cerveau de rat sans et avec correction de mouvement, et profil de vaisseau amélioré [Hingot, 2017]. (2) Correction de mouvement dans le rein de rat. De haut en bas : sans correction, correction locale, correction globale avec champ de mouvement [Taghavi, 2021]. (3) Myocarde de rat sans et avec correction des positions issues des images classiques, et avec le beamforming en coordonnées de Lagrange (MULA) [Cormier, 2021].

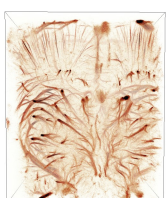
La correction de mouvement apparaît comme une étape nécessaire pour l'amélioration de la qualité d'imagerie, en particulier du contraste et de la résolution des petites structures.

4.3 Mesure de résolution et qualité d'une image ULM

En imagerie ultrasonore, la résolution d'imagerie est définie par la largeur de la fonction d'étalement du point. La **PSF** est la plus petite structure que l'on peut imager. En microscopie par localisation, les objets observés sont ponctuels et il n'existe pas de fonction d'étalement point à proprement parler. La résolution est plus complexe et dépend de plusieurs paramètres comme l'erreur de localisation, l'échantillonnage spatial, le temps d'acquisition, le mouvement... et peut être mesurée de multiples façons.

Une erreur de localisation peut être estimée mais elle ne représente qu'une part de la résolution finale en microscopie. Plusieurs études ont montré des erreurs de localisation *in vitro* avec des valeurs très faibles devant la longueur d'onde ($< \lambda/100$) [Couture, 2011; Desailly, 2015; Jensen, 2020]. Le choix des algorithmes de localisations va directement influencer sur l'erreur de localisation et fera l'objet d'étude du chapitre 2.

Pour caractériser la résolution de l'objet observé, il faut également prendre en compte l'échantillonnage spatial de l'objet : l'ensemble des localisations permet-il de représenter fidèlement l'objet ? Pour avoir un bon contraste, on cherche à maximiser l'amplitude des objets par rapport à zéro et donc à augmenter le temps d'acquisition [Hingot, 2019; Hingot, 2021]. Le niveau de bruit est souvent un paramètre important pour caractériser un système. En microscopie par localisation, on ne peut parler de bruit mais plutôt de faux positifs. Ces fausses localisations



sont le résultat de la détection d'un maximum local qui ne correspond pas à une microbulle et vont dégrader l'image. Ici aussi, le choix de l'algorithme de localisation influe sur la spécificité de la détection des microbulles.

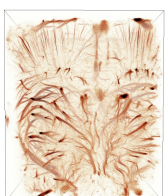
Une des manières classiques de caractériser une image ULM d'une vascularisation est de mesurer la largeur de la plus petite structure visible dans l'image super-résolue : c'est-à-dire avec suffisamment de microbulles ayant traversées le vaisseau. Le temps d'acquisition doit être suffisamment long d'autant que les petits vaisseaux ont une probabilité plus faible de voir passer des microbulles. La mesure du diamètre est généralement estimée par la largeur à mi-hauteur (FWHM) et comparée à la largeur en Doppler puissance ou mode-B [fig. 1.53b]. Ce critère peut être remis en cause car il exclut les bords du canal où le nombre de localisations est logiquement moins élevé. Dans le chapitre 3, la mesure des diamètres des vaisseaux se fait avec un seuil à 5% sur le profil de vitesse puis extrapolée.

Une autre méthode consiste à mesurer la distance minimale entre deux vaisseaux pour donner un critère de séparabilité. Il peut être mesuré directement *in vivo* [Errico, 2015 ; Song, 2018b ; Demené, 2021]. *In vitro*, une bifurcation peut être construite en croix ou en Y et permet la mesure de la plus petite distance séparable par l'ULM [fig. 1.53c] [Zhang, 2019 ; Heiles, 2019a ; Heiles, 2021b]. L'intérêt de ce type de modèle est que la distance entre les deux canaux est connue et augmente progressivement, chose difficile à trouver dans un vrai réseau vasculaire.

La dynamique des fluides peut également être caractéristique de la résolution avec un canal assez large. S'il est suffisamment bien échantillonné, le profil de vitesse est comparé à un profil théorique. Les mesures de vitesses issues des trajectoires sont groupées suivant leur position dans la section du vaisseau et on cherche la plus petite taille de discrétisation qui conserve des différences significatives entre les groupes d'observations [fig. 1.53d] [Errico, 2015 ; Demené, 2021].

Une méthode fréquentielle issue de la microscopie optique commence à être utilisée en ultrasons : la corrélation par anneaux de Fourier (FRC³⁷) [Hingot, 2021 ; Taghavi, 2021]. Les localisations (ou trajectoires) sont séparées en deux populations, et les contenus fréquentiels des deux images super-résolues sont comparés [fig. 1.53e]. Plus les fréquences spatiales sont élevées, moins les contenus fréquences sont corrélés et reflètent le bruit. Un critère de seuil doit être choisi pour définir la limite de la plus haute fréquence spatiale pertinente [Heel, 2005 ; Banterle, 2013].

37. *Fourier Ring Correlation* (corrélation par anneaux de Fourier)



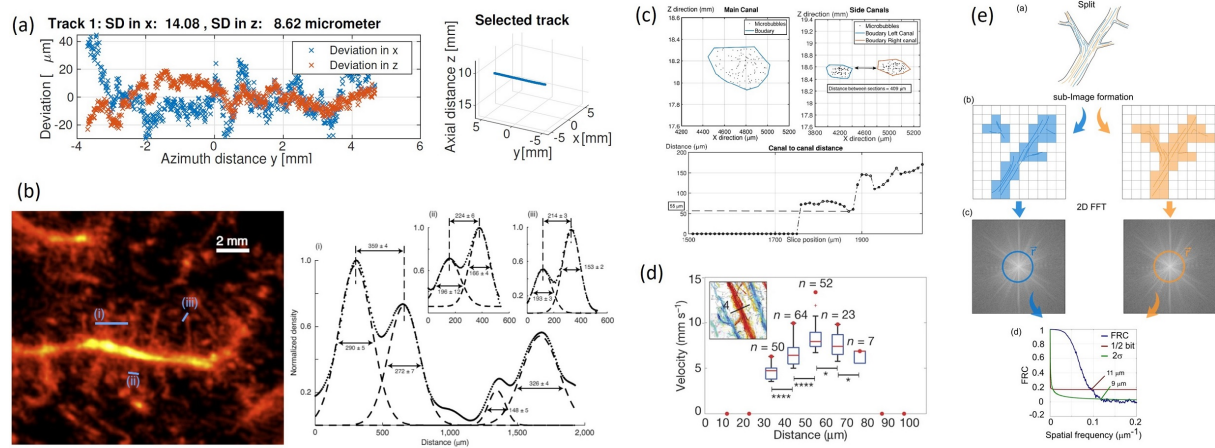


FIGURE 1.53 – Différentes mesures caractéristiques des images ULM. (a) Déviations standards de localisation [Jensen, 2020]. (b) Largeurs à mi-hauteur et distances entre vaisseaux [Demené, 2021]. (c) Distance entre les deux canaux d’une bifurcation en Y [Heiles, 2019a]. (d) Sous-populations de vitesse significativement indépendantes [Errico, 2015]. (e) Mesure par fréquence spatiale par FRC [Hingot, 2021].

Toutes ces méthodes donnent des mesures assez différentes les unes des autres, avec des méthodes de caractérisation très différentes. Il est quelquefois difficile de savoir comment sont obtenues les mesures, ce qu’elles reflètent réellement et leur robustesse. De plus, les valeurs diffèrent si elles sont estimées *in silico*, *in vitro*, ou *in vivo*. Une erreur de localisation théorique sera très éloignée de la taille des vaisseaux imagés *in vivo*, avec les problématiques de bruit, mouvements, temps d’acquisition, filtrage *etc.* En particulier pour les algorithmes de localisation, d’une publication à l’autre les méthodes de mesure ne sont pas toujours les mêmes donc incomparables.

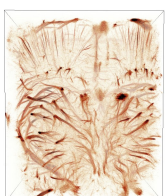
4.4 Applications de la microscopie par localisation ultrasonore

Le développement récent de l’ULM a élargi son champ d’application avec l’accès à la microvascularisation en profondeur facilement et à moindre coût. Au regard de l’IRM ou des rayons X, elle nécessite un échographe et un agent de contraste qui sont tous deux accessibles dans le monde entier. Le faible impact physiologique sur l’animal rend cette technique pertinente pour l’imagerie vasculaires des différents organes *in vivo*.

Angiographie *in vivo*

La première et principale utilisation à l’heure actuelle consiste à réaliser une cartographie précise du réseau sanguin dans les organes vitaux *in vivo* [fig. 1.54]. Par exemple dans le cerveau, l’ULM révèle l’organisation vasculaire qui plonge dans le cortex, à la différence du striatum [Errico, 2015; Hingot, 2017; Hardy, 2021; Milecki, 2021]. Ces travaux ont été réalisés avec craniotomie³⁸ de l’os pariétal pour faciliter la propagation des ultrasons hautes fréquences dans le cerveau et améliorer la sensibilité. Dans le rein, la vascularisation se dessine en étoile avec un

38. Retrait d’une partie de l’os de crâne



cortex orienté vers l'extérieur [Hansen, 2016 ; Foiret, 2017 ; Couture, 2018 ; Tang, 2020 ; Taghavi, 2021]. Après laminectomie³⁹, la vascularisation de la moelle est observée [Sloun, 2020 ; Claron, 2021]. L'ULM a été utilisée pour tenter d'imager les îlots de Langerhans dans le pancréas du rat (non publié, V. Hingot et P. Lopez).

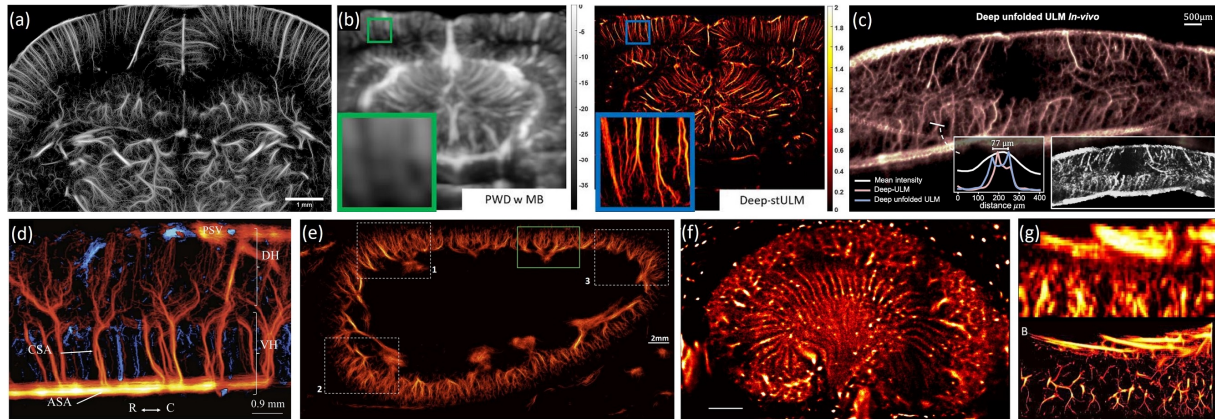


FIGURE 1.54 – Exemple d'ULM *in vivo*. (a-b) Cerveau de rat avec craniotomie [Hingot, 2019 ; Milecki, 2021]. (c-d) Moelle épinière de rat [Sloun, 2020 ; Claron, 2021]. (e-f) Rein chez le rat [Tang, 2020 ; Foiret, 2017]. (g) Pancréas de rat (non publié, V. Hingot et P. Lopez).

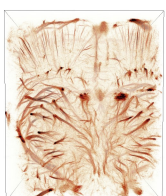
Modèle *in vitro*

Réaliser un modèle expérimental *in vitro* avec un réseau aussi complexe que celui du règne animal s'avère être une tâche complexe. La plupart des modèles *in vitro* se limitent à un ou plusieurs canaux (avec ou sans parois) avec quelques bifurcations [Desailly, 2013 ; Heiles, 2019a ; Zhang, 2018 ; Harput, 2020]. Le modèle le plus prometteur est obtenu par une impression stéréolithographique d'un polymère photosensible, et permet l'impression de canaux de $200 \mu\text{m}^2$ de section dans un matériau aux caractéristiques acoustiques proche de tissu (75 % massique d'eau) [Ommen, 2018]. Des réseaux plus complexes peuvent être imprimés comme la vascularisation du foie [Anandakrishnan, 2021].

Modèle *in ovo*

Pour diminuer l'impact de l'expérimentation animale, un modèle *in ovo* a été développé dans plusieurs laboratoires [Huang, 2020 ; Faez, 2012]. L'embryon de poulet permet une expérimentation proche de la réalité *in vivo* avec des propriétés acoustiques similaires, une architecture vasculaire complexe munie d'un réseau capillaire et d'une pulsativité cardiaque. Un contrôle optique peut également être établi pour confronter les ultrasons. Il est utilisé pour tester et valider des méthodes de traitement d'images : **tracking** avec filtre de Kalman [Tang, 2020], méthode de deep learning [Lok, 2021], reconstruction morphologique [Schoen, 2021].

39. Ablation de la lame vertébrale, partie postérieure de la vertèbre, pour libérer le canal de la moelle épinière



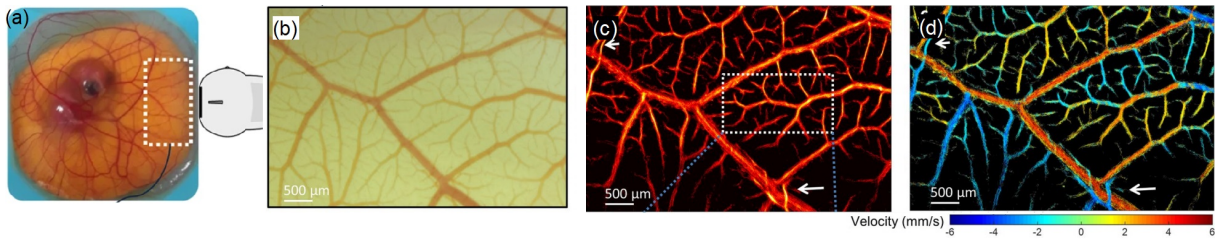


FIGURE 1.55 – (a) Modèle expérimental de l’ULM dans l’embryon de poulet de moins de 10 jours. (b) Imagerie optique, (c) rendus ULM avec intensité, (d) rendu hémodynamique. [Huang, 2020]

Imagerie de tumeurs

L’ULM s’avère être un outil intéressant pour diagnostiquer les pathologies, au même titre que l’échographie, en particulier pour le cancer ou les troubles neurologiques [Christensen-Jeffries, 2020]. La présence de cellules tumorales perturbe le processus d’angiogenèse au niveau capillaire et la vascularisation devient chaotique [Hanahan, 2000]. L’ULM permet d’accéder à cette échelle de vascularisation et dévoile l’architecture vasculaire de la tumeur [fig. 1.56] [Lin, 2017 ; Opacic, 2018].

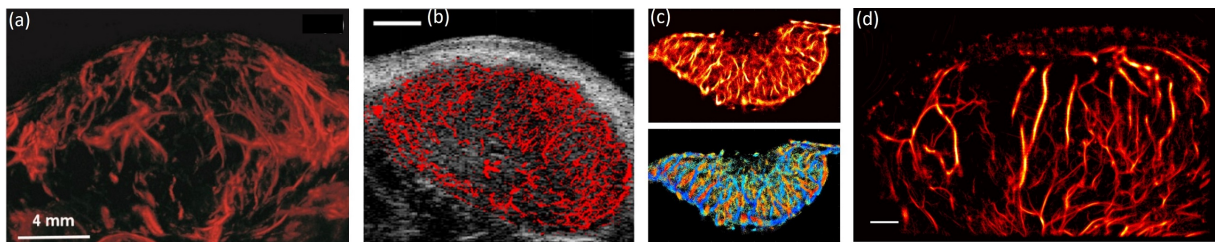
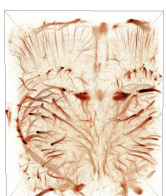


FIGURE 1.56 – Imagerie de tumeurs avec une arborescence vasculaire chaotique (a) chez le rat [Lin, 2017], (b) la souris [Opacic, 2018], (c) l’embryon de poulet [Huang, 2020], (d) et la souris [Heiles, 2021b].

Imagerie quantitative

La haute résolution spatiale et la mesure de la vitesse permettent d’accéder à un nouvel outil de mesure quantitatif pour les troubles de la santé [fig. 1.57]. Lors d’un AVC, l’ULM apporte une sensibilité et résolution accrues pour observer la perfusion de la région hypoperfusée et la présence d’artères collatérales [Hingot, 2020]. La vitesse des microbulles révèle des modifications de flux qui peuvent être corrélées à l’hypoxie dans une tumeur de l’embryon de poulet [Lowerison, 2020]. [Lowerison, 2021] a montré des variations microscopiques de vascularisation dans le cortex visuel de la souris vieillissante en observant la vitesse des microbulles et la tortuosité de leurs trajectoires. Cette étude met en lumière la modification des flux et de la morphologie des vaisseaux dans le cerveau âgé qui pourrait être une des explications de la dégénérescence cognitive et les troubles de la mémoire.



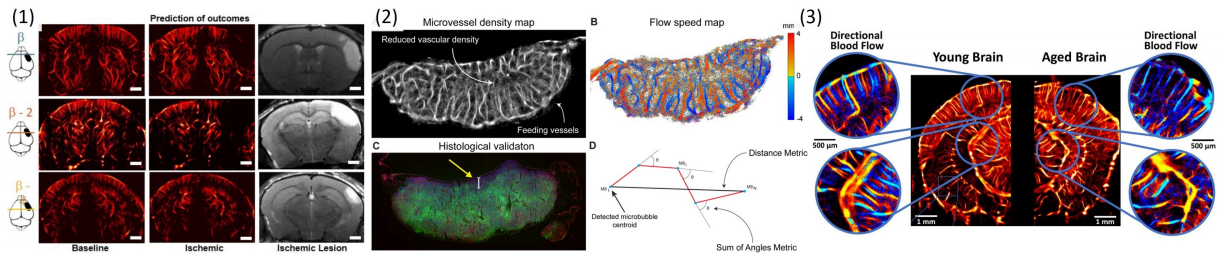


FIGURE 1.57 – (1) Imagerie de l'AVC ischémique chez la souris [Hingot, 2020]. (2) Étude de l'hypoxie dans une tumeur de l'embryon de poulet [Lowerison, 2020]. (3) Cerveaux de souris jeunes et âgées en ULM [Lowerison, 2021].

Vers l'ULM chez l'homme

Les démonstrations encourageantes chez le petit animal présagent de bons résultats chez l'homme pour étudier les problèmes de santé majeurs de l'humanité. En particulier les tumeurs, cancers, l'AVC, et les troubles cognitifs qui affectent les populations vieillissantes des pays à fort indice de développement humain.

Les premières preuves de concept chez l'humain ont été réalisées dans la jambe [Harput, 2018] et pour le cancer du sein [Opacic, 2018 ; Dencks, 2019] avec des échographes cliniques conventionnels. Les récentes améliorations sur les traitements des données ont permis d'améliorer fortement le nombre de localisations et la qualité des images. Les temps d'acquisition ont ainsi pu être réduits chez l'homme : en moins de 10 secondes d'imagerie, la vascularisation est décrite dans le foie sain et atteint d'ACLF⁴⁰, pancréas avec tumeur, sein avec tumeur, et rein [Huang, 2021]. L'ULM apporte une résolution 5,7 fois plus fine que celle obtenue en Doppler puissance, avec une détection de vaisseaux jusqu'à 150 μm . Ces images sont obtenues en combinant un faible temps d'acquisition en apnée, une correction de mouvement, et un filtrage directionnel des microbulles pour traiter les fortes concentrations de microbulles. Des motifs répétitifs de réseau vasculaire avec une arborescence fine apparaissent, lieu des échanges moléculaires [fig. 1.58].

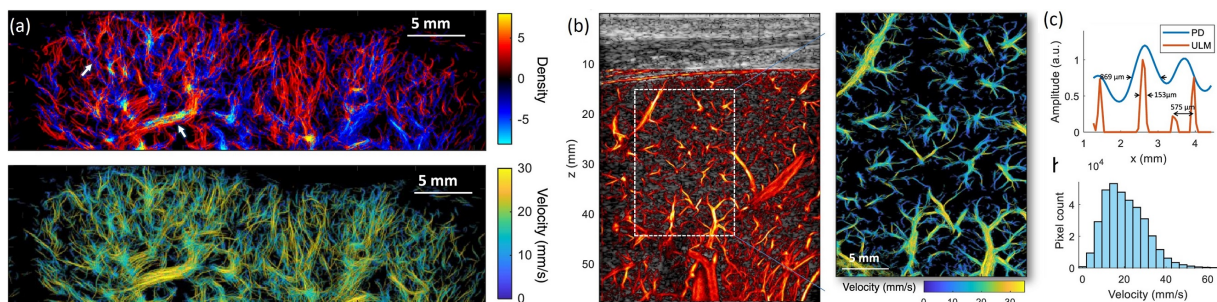
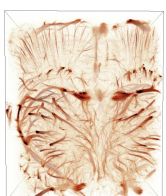


FIGURE 1.58 – (a) Rein avec direction axiale encodée en couleur, et carte de vitesse. (b) Foie sein superposé sur l'image mode-B, et carte des vitesses. (c) Mesure de profil en Doppler puissance (PD) et ULM, histogramme de répartition des vitesses. [Huang, 2021]

L'imagerie du cerveau humain apporte une complexité supplémentaire de par son aspect transcrânien. Suivant les patients et les caractéristiques de leur os temporal, les ondes ultraso-

40. ACLF (*Acute on Chronic Liver Failure*), cirrhose un syndrome caractérisé par une défaillance aiguë



nores sont plus ou moins atténuées et aberrées. Seule l'aberration de phase peut être compensée pour améliorer la qualité de l'image et la résolution. Des travaux *in vivo* ont montré la pertinence d'une telle correction pour l'imagerie du cerveau [O'Reilly, 2013; Soulioti, 2020]. La première preuve de concept clinique chez l'homme a été réalisée en transcrânien en 2021, avec correction d'aberration [Demené, 2021] [fig. 1.59]. Avec une fréquence de 2 MHz, des vaisseaux de 200 μm ont pu être observés jusqu'à une profondeur de 12 cm [fig. 1.53b].

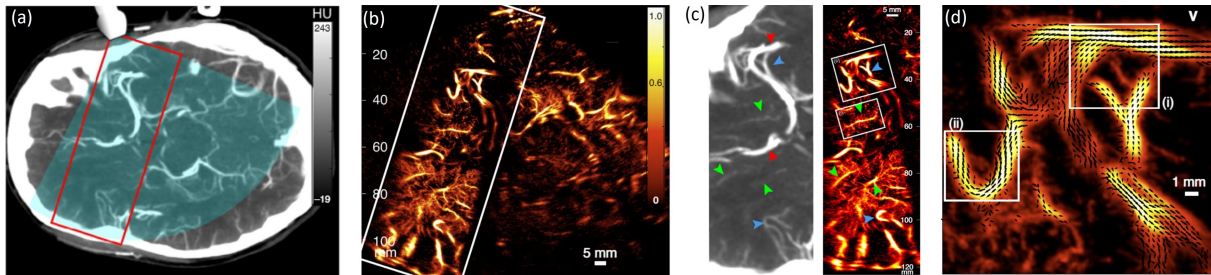


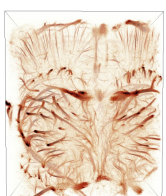
FIGURE 1.59 – (a) Positionnement de la sonde 2D sur la tempe en imagerie CT. (b) ULM avec correction d'aberration. (c) Comparaison CT et ULM transcrânien, (d) champ de vitesse. [Demené, 2021]

4.5 Limitations de l'imagerie 2D et premiers résultats 3D

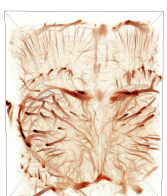
L'ULM offre des nouvelles perspectives d'imagerie pour le diagnostic de la microvascularisation *in vivo*. Les récentes études ont montré des résultats prometteurs pour l'application chez l'homme avec un meilleur contraste, résolution, et une information quantitative de la vitesse des flux sanguins, difficilement accessible par d'autres méthodes d'imagerie.

Un certain nombre de limitations modère l'utilisation de l'ULM dans certaines conditions. Le processus de suivi de trajectoires des microbulles implique une persistance des diffuseurs dans l'image de quelques millisecondes au moins. Pour les vaisseaux orthogonaux au plan d'imagerie, cette persistance des microbulles dans le champ de vue se limite à une ou deux images et ne permet pas de les suivre. Ils sont donc absents des images super-résolues. De plus, les vaisseaux traversants l'image ont une vitesse sous-estimée par projection de l'angle dans le plan d'imagerie. D'autre part, l'imagerie 2D ne permet que la correction des déplacements dans le plan d'imagerie, ce qui exclut les conditions d'imagerie avec des mouvements rapides par rapport au temps d'acquisition de l'ULM, ou déplacements complexes. Enfin, le caractère temps réel de l'échographie est perdu par la contrainte du temps d'acquisition long de l'ULM. L'exploration ne peut plus se faire à main levée pour trouver le bon plan d'imagerie, et nécessite plusieurs positions d'imagerie.

Les premières tentatives d'imagerie 3D sont arrivées peu de temps après l'imagerie ULM 2D. En utilisant une sonde 1,75 D [fig. 1.61a], [Desailly, 2013] a pu résoudre des canaux microfluidiques en élévation [fig. 1.40d]. La même année, [O'Reilly, 2013] a utilisé une sonde de thérapie, composée de 128 transducteurs disposés sur une coupole, pour localiser des microbulles dans un tube hélicoïdale [fig. 1.40e]. En utilisant un balayage par translation de sonde, [Lin, 2017] a obtenu la reconstruction d'une tumeur en 3D [fig. 1.56a]. Enfin, [Christensen-Jeffries, 2017a] a



montré la possibilité de séparer deux flux de microbulles en utilisant deux sondes linéaires orthogonales. Les résolutions, sensibilités et champs de vue de ces systèmes ne suffisent pas pour obtenir une représentation fidèle, en profondeur des structures tri-dimensionnelles complexes. Le passage d'une imagerie ultrasonore 2D à 3D n'est cependant pas trivial et a nécessité d'importants développements acoustiques, électroniques et algorithmiques pour obtenir une imagerie volumétrique isotrope, haute cadence, et avec un large champ de vue. Les grands principes en sont détaillés dans la section suivante.



5 Imagerie volumétrique ultrasonore

5.1 Nécessité d'une imagerie volumétrique

L'imagerie ultrasonore 2D résulte de la projection d'une tranche large de quelques longueurs d'onde sur un plan devant la sonde linéaire. Les organes et flux sont imagés en projetant les composantes en élévation sur ce plan d'imagerie. Il n'est alors pas possible de distinguer deux structures très proches en élévation, ou un flux orthogonal au plan d'imagerie. Pour un flux oblique traversant le plan, la mesure de la vitesse est biaisée par son inclinaison par rapport au plan.

En pratique, l'imagerie 2D requiert un placement précis de la sonde pour imagier correctement un plan désiré, et obtenir une mesure quantitative juste. En imagerie Doppler, comme en ULM, le placement détermine la sensibilité aux vaisseaux imagés : ceux qui sont dans le plan. Pour des structures tri-dimensionnelles complexes comme les tumeurs ou le striatum dans le cerveau, l'imagerie 2D est limitée à des plans de coupes, et à une sensibilité à certains vaisseaux. La correction de mouvement est également limitée en imagerie 2D, et se restreint aux mouvements dans le plan. Chez l'homme, les organes du tronc sont particulièrement sujets aux mouvements respiratoire et cardiaque (cœur, rein, foie, pancréas...), entraînant des déplacements tri-dimensionnels, avec modifications morphologiques.

Pour pallier à ces limitations, il convient d'avoir un système d'imagerie isotrope en sensibilité et résolution dans les trois dimensions de l'espace pour une bonne caractérisation des structures et des flux. En ajoutant une deuxième dimension au capteur ultrasonore, d'une sonde linéaire à un capteur matriciel, l'imagerie échographique devient 3D : deux dimensions spatiales de la sonde (latérale, en élévation) et une dimension temporelle (axiale).

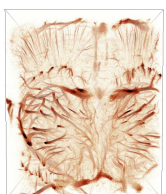
Les besoins de l'imagerie volumétrique ont été pressentis très tôt dans le développement des ultrasons pour la médecine, avec la nécessité d'avoir une représentation 3D d'un objet pour mieux comprendre sa forme et sa relation avec les autres organes [Fenster, 2001 ; Smith, 1991 ; Ramm, 1991]. La dépendance à l'utilisateur s'avère être un réel frein pour la répétabilité de la mesure en 2D, par exemple pour suivre l'évolution d'une tumeur. Certaines contraintes de l'échographie 3D, déjà énoncées au siècle dernier [Nelson, 1998], sont encore d'actualité comme la taille de la sonde, la cadence d'imagerie, la classification et l'exploitation des données, l'interactivité avec l'utilisateur, et l'imagerie temps-réel.

5.2 Vers l'imagerie 3D haute cadence

5.2.1 3D par balayage

Les premiers systèmes d'imagerie 3D utilisent un échographe 2D conventionnel auquel se rajoute un degré de liberté mécanique [fig. 1.60 1] : une translation [Dabrowski, 2001], rotation [Tong, 1996 ; Downey, 1996], ou un pivot [Gilja, 1995]. Ils permettent une imagerie volumique composée d'une multitude de tranches d'imagerie. Le temps de reconstruction étant assez long (>1 minute pour un volume), l'analyse ne se fait pas en temps réel.

Inspiré des algorithmes de tomographie par rayons X, un système 3D tomographique a été



mis au point pour l'imagerie 3D du cerveau chez le rat en Doppler puissance avec craniotomie [Demené, 2016]. En combinant une imagerie ultra-rapide avec une sonde à 15 MHz, 18 angles de rotation et 65 positions de balayage linéaire pour chaque angle, la vascularisation de tout le cerveau est obtenue avec des voxels isotropes de 0,1 mm. La technologie de ces systèmes est assez simple mais l'étape de reconstruction est plus complexe avec la combinaison d'une multitude d'images pour générer un volume composite. Un volume étant composé d'une série d'émission-réception avec des positions de sonde différentes, la corrélation temporelle dans toute l'image est limitée à quelques minutes.

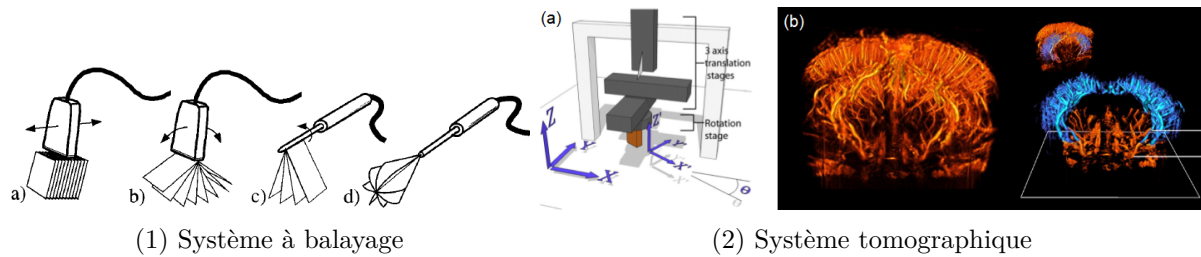


FIGURE 1.60 – (1) balayage mécanique pour échographie 3D [Fenster, 2001]. (2) Système tomographique pour le cerveau de rat, en Doppler puissance avec une sonde linéaire à 15 MHz [Demené, 2016].

5.2.2 Évolution vers les sondes matricielles

Le développement des sondes bi-dimensionnelles a commencé avec des sondes pseudo 2D principalement pour résoudre le problème de focalisation en émission. Chaque transducteur émettant une onde sphérique, le champ de pression émis par une sonde linéaire se ferait sur un secteur angulaire, et non un tranche focalisée en élévation. Pour réduire la largeur du faisceau, une lentille convergente est apposée sur la surface active de la sonde et réalise la focalisation en élévation des ondes sphériques. La focalisation est alors effectuée à une profondeur fixe. En ajoutant une rangée de transducteurs de part et d'autre de la ligne de transducteur, la profondeur de focalisation peut être contrôlée de façon analogique en réception et/ou en émission [fig. 1.61a]. Les sondes 1,25D et 1,5D apportent de meilleures performances en élévation avec une modification limitée sur l'électronique [Wildes, 1997]. Le système avec une sonde 1,75D permet une focalisation en élévation plus fine et quasiment constante sur toute la profondeur [Fernandez, 2003]. Ces premiers développements ont encouragé le développement technologique des capteurs matriciels et de l'électronique. La plupart des échographes ne possédant que 128 voies, il est nécessaire d'ajouter des systèmes de multiplexage pour commander les différentes voies de la sonde (jusqu'à 1024 voies pour la sonde 1,75D).



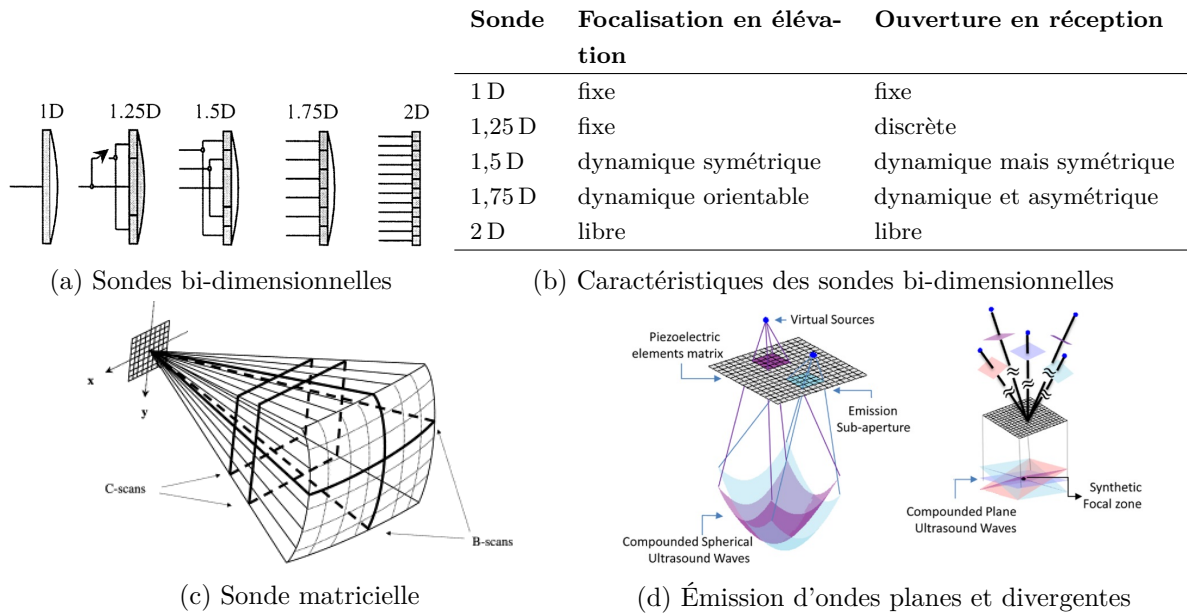
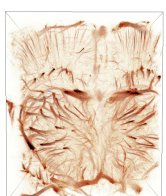


FIGURE 1.61 – (a) Évolution des sondes bi-dimensionnelles [Foster, 2000]. (b) Caractéristiques de focalisation en émission et réception. (c) Sonde matricielle [Light, 2001]. (d) Émission d'ondes divergentes (ou défocalisées) et planes en 3D [Provost, 2014].

L'imagerie 3D est finalement obtenue avec des sondes matricielles peuplées de transducteurs disposés sur un maillage carré, et sans lentille convergente [fig. 1.61c]. La focalisation en émission/réception n'est plus limitée par la position des transducteurs mais contrôlée arbitrairement par l'utilisateur en choisissant les délais à appliquer à chaque élément [Smith, 1991]. Les émissions peuvent être focalisées en un point, planes bi-dimensionnelles avec un angle, ou divergentes [fig. 1.61d]. La réception des signaux se fait alors sur la large zone que couvrent les transducteurs, conférant à l'imagerie deux dimensions spatiales, la troisième étant fournie par la propagation temporelle de l'onde [Light, 2001]. Le nombre de transducteurs devient rapidement un point clé de développement. La majeure partie des sondes linéaires ne possèdent que 128 voies, bien inférieures aux besoins de l'imagerie 3D. Pour conserver la résolution et le contraste d'une sonde linéaire, en 3D, il faudrait une sonde matricielle carrée avec 16 834 transducteurs [Prager, 2010] (matrice 128×128).

5.2.3 Contraintes et problématiques des sondes matricielles

Construire et piloter une sonde matricielle de 16 834 transducteurs soulève un certain nombre de problèmes techniques, et n'est pas forcément pertinent. La taille des transducteurs doit rester de l'ordre de la longueur d'onde pour ne pas qu'ils soient trop directifs. Pour l'imagerie du petit animal, les fréquences classiques se situent entre 10 et 50 MHz ($\lambda \sim 30 - 150 \mu\text{m}$). Connecter autant de transducteurs sur une surface aussi petite devient très complexe, et avec des problématiques d'adaptation d'impédance électrique. Le nombre de connexions nécessaires pour relier chacune des voies individuellement impose aussi un câble épais contraignant pour l'imagerie clinique [Prager, 2010]. À la différence de l'imagerie 2D, les calculs pour la reconstruction d'un volume sont trop complexes pour être réalisés de manière analogique. Les signaux doivent être



numérisés puis traités par ordinateur. Or, la plupart des échographes conventionnels sont limités à 128 ou 256 voies d'échantillonnage pour des raisons de coût et d'encombrement. Enfin, en terme de quantité de données, convertir 1600 éléments à 80 MHz sur 12-bits nécessite une bande passante de 1500 Go/s [Roux, 2016] (pour une sonde cardiaque 3 MHz de 20 mm de côté). À titre de comparaison, la bande passante des connexions PCI-express 5 est limitée à 64 Go/s.

Il convient alors de repenser la manière d'utiliser les capteurs matriciels pour avoir une construction et un pilotage réalistes, en réduisant notamment le nombre de voies d'échantillonnage.

5.3 Échographie 3D haute cadence

Sonde avec micro-beamforming intégré

Réduire le nombre de voies n'implique pas nécessairement de diminuer le nombre transducteurs, mais la manière de les piloter. Pour la réception des signaux, une des solutions technologiques a été de placer des cartes avec **beamforming** partiel analogique au plus proche des transducteurs, directement dans la sonde [Matrone, 2014 ; Wygant, 2009]. Elles réalisent un pré-traitement sur des sous-groupes de transducteurs pour réduire la quantité de données à transférer et le nombre de câbles nécessaires. Cette technologie permet également d'améliorer la qualité du signal et les adaptations d'impédances avec les petits transducteurs.

Cette technique a été retenue par les grandes compagnies d'imagerie échographique avec un encombrement limité, une très bonne qualité d'image, et des coûts réduits. Elle est principalement utilisée en imagerie du nouveau-né [fig. 1.62a-b] et cardiaque [fig. 1.62c] qui requiert une imagerie volumique haute cadence. Quelques modèles sont cités ci-après et font tous l'objet de multiples brevets :

- *ACUSON SC2000 Prime* avec sonde 4Z1c (Siemens Healthcare, Erlangen, Allemagne)
- *EPIQ CVx* avec sonde X7-2 de la gamme *xMatrix* (Koninklijke Philips Electronics N.V., Amsterdam, Pays-Bas)
- *Vivid E95* avec sonde 4Vc-D (General Electric, Fairfield, Connecticut, USA)

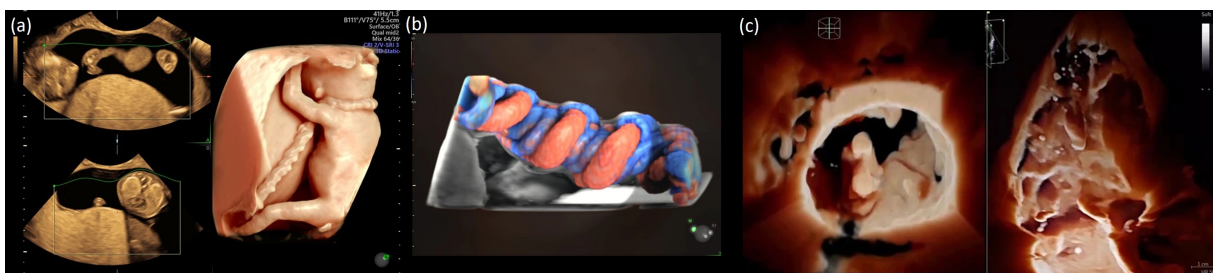


FIGURE 1.62 – Images commerciales de GE avec l'appareil *Voluson E10* : (a) foetus, (b) cordon ombilical, et *Vivid E95*, (c) cœur avec rendu photo-réaliste. [www.gehealthcare.fr, 2021]

L'utilisation de ces sondes offre de belles performances mais nécessite un développement important des circuits électroniques embarqués dans la sonde qui sont spécifiques à une tâche



(*Application Specific Integrated Circuits*). Ils sont très adaptés aux applications industrielles mais pas assez flexibles pour la recherche en imagerie médicale.

Système 1024 voies entièrement peuplées

Pour obtenir un contrôle total de tous les transducteurs et des cadences d'imagerie ultra-rapides (aussi appelé imagerie 4D), des échographes spécifiques ont été construits avec 1024 transducteurs et autant de voies d'échantillonnage. Ces systèmes nécessitent des modifications lourdes sur les systèmes existants et des coûts de développement importants. Seuls quelques laboratoires dans le monde se sont lancés dans le développement des telles machines.

Au Danemark, à la Danmarks Tekniske Universitet (DTU), l'échographe *SARUS* (Synthetic Aperture Real-time Ultrasound System) possède 1024 voies indépendantes [Jensen, 2013] [fig. 1.63a]. Il est composé de 16 cartes d'acquisition de 64 voies indépendantes, assemblées et connectées ensemble. Cette machine est utilisée pour la mesure de flux *in vivo* grâce à sa très haute cadence d'imagerie [Holbek, 2015 ; Holbek, 2017b ; Holbek, 2017a].

En France, l'Institut Langevin a assemblé et synchronisé quatre machines échographiques ultra-rapides *Aixplorer V6* (SuperSonic Imaging, Aix-en-Provence, France) [Provost, 2014] [fig. 1.63b]. Chaque machine possède 256 voies en émission et 128 en réception multiplexées (seules 128 voies son accessible à la fois), ainsi que son propre ordinateur pour commander et traiter une partie des données. Un ordinateur maître rapatrie les données pour générer l'affichage final. Ce système a montré sa capacité à imager *in vivo* en 3D à des cadences très élevées pour l'imagerie Doppler quantitative [Provost, 2015 ; Correia, 2016], des ondes de cisaillement [Gennisson, 2015], de l'orientation des fibres cardiaques [Papadacci, 2017 ; Correia, 2018], fonctionnelle [Rabut, 2019], et la microscopie par localisation ultrasonore [Heiles, 2019b ; Heiles, 2021a].

Le laboratoire Creatis à Lyon (France) a également mis au point une machine 1024 voies en synchronisant quatre échographes de recherche *Vantage 256* (Verasonics, Kirkland, WA, USA) [Petrusca, 2018] [fig. 1.63d]. Avec 1024 voies contrôlables en émission et réception, elle est utilisée pour l'étude des sondes parcimonieuses [Roux, 2018].

Récemment, l'entreprise Verasonics a commencé à commercialiser un système proche de celui de l'Institut Langevin, avec quatre échographes de recherche synchronisés et pilotés par un ordinateur maître [fig. 1.63e] [Verasonics.com]. Ce système offre la possibilité à n'importe quel laboratoire d'accéder à la technologie 3D ultra-rapide sans développement électronique.

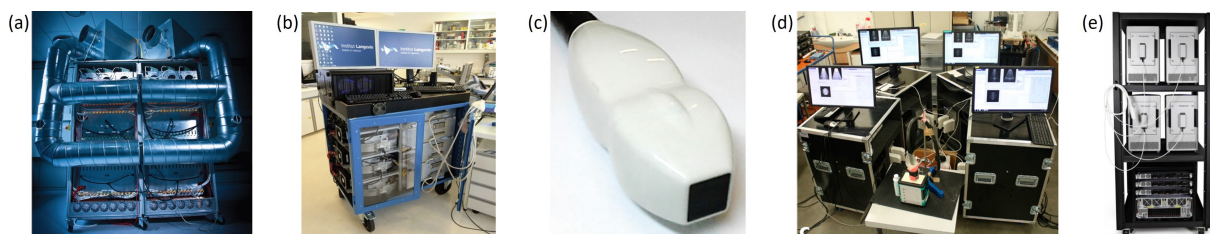


FIGURE 1.63 – (a) Système *SARUS* [Jensen, 2013], (b) machine 1024 voies et, (c) la sonde matricielle à 3 MHz (Vermon, Tours, France) [Gennisson, 2015], (d) système Verasonics de Creatis [Petrusca, 2018], (e) système 3D commercial Verasonics (Kirkland, WA, USA).



Ces systèmes permettent de contrôler toutes les émissions et réceptions de 1024 éléments avec des cadences ultra-rapides, mais restent complexes et onéreux à mettre en place, avec un encombrement important.

Sondes parcimonieuses (*sparse array*)

Pour réduire le nombre de voies tout en conservant une large fenêtre d'imagerie, des études ont montré la possibilité d'utiliser une sous-population d'une matrice ultrasonore, avec des transducteurs isolés [Smith, 1991]. En conservant une sonde matricielle composée de 1024 transducteurs, mais en adressant seulement 256 transducteurs à des voies d'échantillonnage, les coûts et quantité de données sont sensiblement réduits. La sous population peut être choisie aléatoirement, ou issue d'une optimisation [Bernal, 2020; Roux, 2018; Harput, 2020] [fig. 1.64a]. La réduction du nombre de transducteurs actifs dégrade néanmoins le champ de pression émis et la réception des échos, avec des performances inférieures aux sondes entièrement peuplées de 1024 voies.

Sonde lignes-colonnes (*row-column array*)

Une autre approche consiste à utiliser deux réseaux de transducteurs linéaires orthogonaux [Christiansen, 2015; Rasmussen, 2015] [fig. 1.64b]. Chaque réseau apporte la résolution dans une direction. La combinaison des deux rend l'imagerie presque isotrope. Ces sondes RCA⁴¹ permettent une imagerie volumétrique avec un échographe commercial pour de l'imagerie Doppler chez l'homme ou le petit animal [Sauvage, 2018; Sauvage, 2020]. La surface active de la sonde n'est plus limitée par le nombre de transducteurs, mais elle s'étend avec la longueur des éléments. On obtient alors des sondes avec un large champ de vue pour seulement 64+64 ou 32+32 éléments. Comparées aux sondes entièrement peuplées, à surface active équivalente, les sondes lignes-colonnes peinent à obtenir des caractéristiques similaires en résolution et contraste [Flesch, 2017].

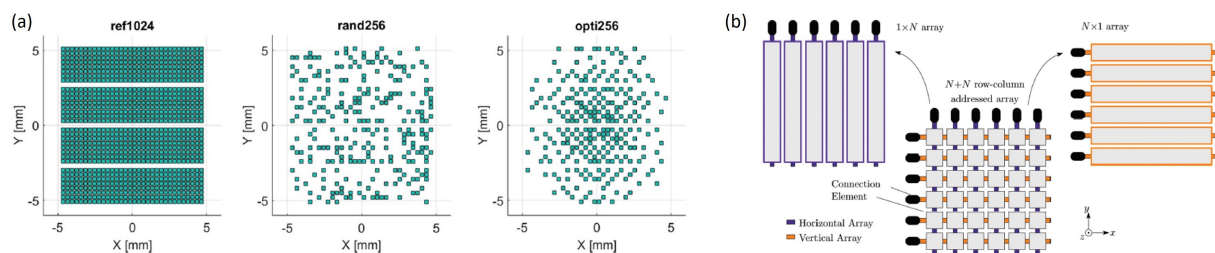
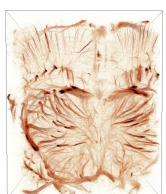


FIGURE 1.64 – (a) Sous population parcimonieuse d'une sonde avec 1024 transducteurs [Roux, 2018]. (b) Principe d'une sonde lignes-colonnes [Rasmussen, 2015].

Imagerie multiplexée

Les récents développements sur l'électronique d'adressage des sondes ont ouvert la possibilité de l'imagerie volumétrique multiplexée avec une solution commerciale proposée par Verasonics

41. *Row-Column Array* (sonde lignes-colonnes)



(Verasonics.com) [fig. 1.65a-b]. La sonde ultrasonore matricielle est toujours composée de 1024 transducteurs avec autant de voies comme pour un système 1024 voies, mais qui ne sont pas toujours échantillonnées. Elle est pilotée par un échographe ultra-rapide de 256 voies par l'intermédiaire de 256 *switch*⁴² qui connectent un transducteur parmi un groupe défini : la voie d'échantillonnage i peut être connectée à l'un des éléments parmi les indices $\{i, i + 256, i + 512, i + 768\}$. Pour chaque transmission ou réception, on sélectionne une ouverture : liste de 256 transducteurs connectés aux 256 voies d'échantillonnage. Ce système permet le contrôle de toute la sonde au moyen d'émissions/réceptions successives en choisissant des ouvertures synthétiques différentes. Le contraste et la résolution sont théoriquement similaires aux systèmes 1024 voies mais nécessitent plusieurs tirs successifs, induisant une baisse de la cadence d'imagerie. Pour être parfaitement équivalent à une système 1024 voies, 16 combinaisons émissions/réceptions sont nécessaires (pour un système à 256 voies et 4 ouvertures). Il permet une imagerie volumétrique simple à mettre en place avec un coût modéré, sans développement électronique important et est utilisé pour l'imagerie fonctionnelle chez le petit animal [Yu, 2020 ; Brunner, 2020] [fig. 1.65c].

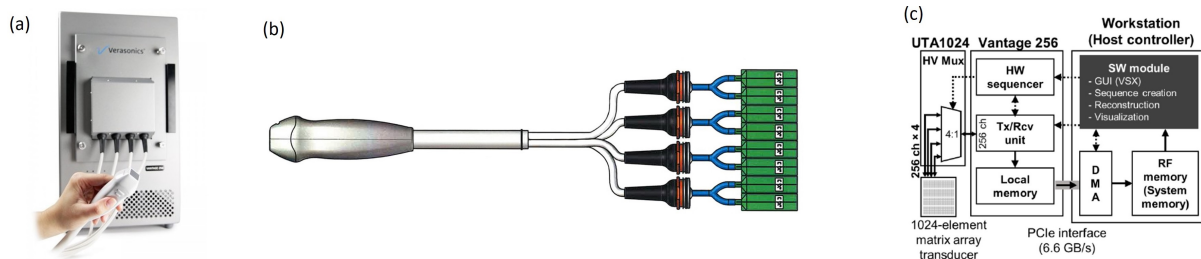


FIGURE 1.65 – (a) Echographe Verasonics avec boîtier de multiplexage (Kirkland, WA, USA), (b) sonde 1024 voies avec quatre connecteurs similaires (Vermon, Tours, France). (c) Architecture avec sonde 1024 voies, multiplexeur et échographe 256 voies [Yu, 2020].

5.4 Microscopie par localisation ultrasonore en 3D

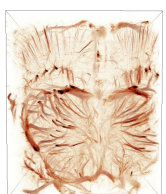
La création de ces quelques systèmes d'imagerie volumétrique a poussé les équipes à les utiliser pour la localisation des microbulles dans les flux, avec cette fois une résolution presque isotrope et un large champ de vue en 3D. Les microbulles sont localisées dans un volume sous la sonde, sans projection, avec des vitesses mesurées sans biais.

[Heiles, 2019a] a utilisé la machine 1024 voies de l'Institut Langevin pour résoudre une bifurcation de canaux *in vitro* [fig. 1.66a]. Avec une sonde centrée à 6 MHz ($\lambda = 171 \mu\text{m}$), les deux structures sont séparables à partir d'un écartement de $52 \mu\text{m}$.

Une sonde parcimonieuse a permis de séparer et mesurer des flux dans des canaux hélicoïdaux en cellulose très proches, mesurés à $190 \mu\text{m}$ avec une sonde centrée à 3,7 MHz ($\lambda = 404 \mu\text{m}$) [fig. 1.66b] [Harput, 2020].

Enfin, [Jensen, 2020] a tiré parti du large champ de vue de la sonde RCA de 18 mm de côté (3 MHz, $\lambda = 513 \mu\text{m}$) pour imager un canal plan de diamètre $200 \mu\text{m}$ avec seulement 128 voies nécessaires [fig. 1.66c].

42. commutateur, multiplexeur



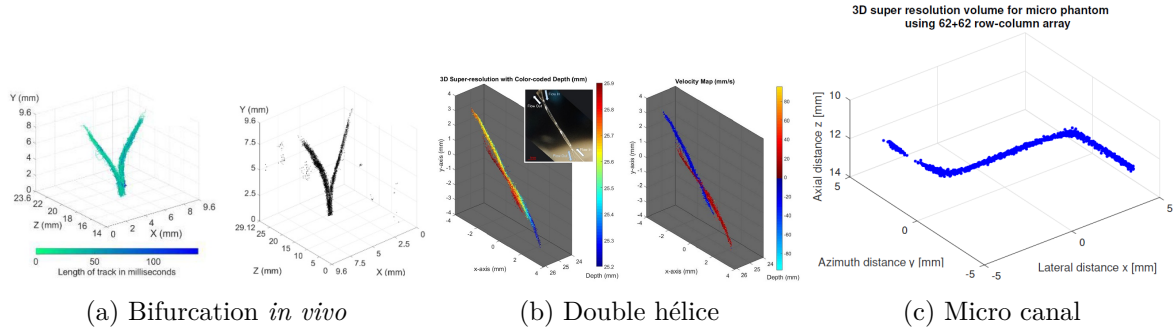


FIGURE 1.66 – Exemples d’applications de l’ULM 3D *in vitro* : (a) bifurcation imagée avec un système 1024 voies [Heiles, 2019b], (b) double hélice sub-longueur d’onde avec une sonde parcimonieuse à 512 éléments [Harput, 2020], (c) micro canal imprimé en 3D [Jensen, 2020].

Vers l’imagerie ULM 3D *in vivo* : l’enjeu de la gestion des données

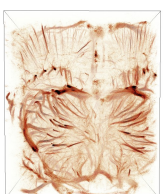
La résolution étant directement liée au temps d’acquisition [Hingot, 2019], un grand nombre de volumes est nécessaire pour résoudre les petites structures, entraînant une grande quantité de données. Le passage à l’imagerie volumétrique décuple la quantité de données et nécessite des architectures spécifiques pour stocker et traiter les données [Jensen, 2013]. Les quantités de données générées par les précédentes démonstrations *in vitro* étaient assez limitées pour être accumulées dans la RAM des ordinateurs ([Jensen, 2013] : 400 volumes, [Harput, 2020] : 12 000 volumes, [Heiles, 2019b] : 6000 volumes).

En comparant des conditions d’imagerie *in vivo* réalistes en 2D et 3D inspirées de [Hingot, 2019; Heiles, 2019b], on constate que l’imagerie 3D génère 10 fois plus de données qui doivent être stockées au fur et à mesure de l’acquisition sur des disques [table. 1.5].

Exemple		2D	3D
		[Hingot, 2019]	[Heiles, 2019b]
Nb voies	[1]	128	1024
Nb angles	[1]	3	4
Profondeur	[mm]	10	25
Fréquence	[MHz]	15	9
Nb échantillons par voie	[1]	390	584
Cadence	[Hz]	1000	500
Nb échantillons par image	[1000/vol]	0,15	2,39
Taille des données (int16)	[Go/s]	0,28	2,23
4 min d’acquisition	[Go]	67	535

TABLE 1.5 – Génération des données en 2D et 3D

Une implémentation efficace utilise un système 1024 voies, pilotée par quatre ordinateurs [Provost, 2014], permettant de séparer les données sur chaque ordinateur. Elle a été mise en place et utilisée *in vivo* par Baptiste Heiles [Heiles, 2019a; Heiles, 2021a]. Il est néanmoins nécessaire d’ajouter des temps de pause pour le transfert des données des mémoires RAM (16 Go par ordinateur) aux disques durs SSD des ordinateurs (1 To par ordinateur), augmentant le temps total d’acquisition. Pour l’imagerie du cerveau de rat, avec craniotomie de l’os pariétal, 99 900



volumes ont été acquis en 18 minutes, par bloc de 185 volumes à 500 Hz, pour un total de 1 To de données. À noter que comparé à l'imagerie *in vitro* [Heiles, 2019b], le nombre d'angles a été augmenté à 12 pour améliorer le SNR sans augmenter la puissance transmise. Le temps de traitement est également considérablement augmenté avec le nombre de localisations et la complexité de l'algorithme de *tracking* en $\mathcal{O}(n^3)$. Un effort particulier a été fait sur la localisation sans interpolation et l'ordonnancement asynchrone de tâche d'ULM pour optimiser le traitement. Le temps nécessaire pour tous les volumes s'élève à une dizaine d'heures.

Les vaisseaux peuvent ainsi être caractérisés dans un large champ de vue de 9×10 mm et une profondeur de 10 mm, pour révéler, artérioles, veinules et éventuellement capillaires, avec des pixels de $10 \mu\text{m}$ [fig. 1.66]. La cadence d'imagerie élevée et le suivi des trajectoires permet une détection de vitesse jusqu'à 100 mm/s. Enfin, en combinant plusieurs acquisitions, il a été possible d'imager le cerveau d'un rat tout entier *in vivo*.

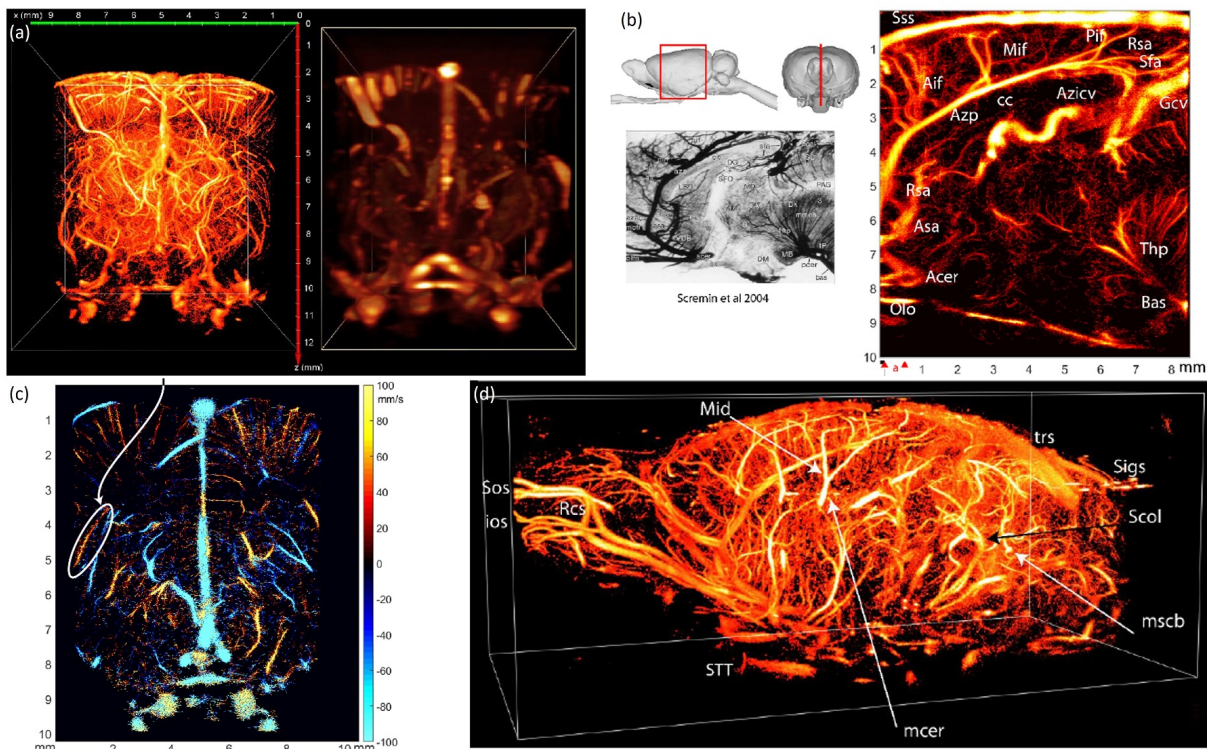
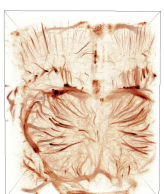


FIGURE 1.67 – (a) Cerveau de rat en ULM (gauche) et en Doppler puissante (droite), (b) tranche sagittale de $500 \mu\text{m}$. (c) Tranche coronale avec encodage des vitesses en couleur (composante axiale montante en jaune, descendante en bleu). (d) Rendu 3D pour le cerveau tout entier. [Heiles, 2019a ; Heiles, 2021a]



6 Objectifs de la thèse

Nous avons vu que le diagnostic de l'AVC requiert une imagerie de vascularisation profonde à travers le crâne pour distinguer les effets d'une hémorragie par rapport à ceux d'une ischémie cérébrale. Le développement de la microscopie par localisation ultrasonore offre une nouvelle méthode d'imagerie en profondeur avec une résolution beaucoup plus fine jamais atteinte en échographie. L'utilisation d'agents de contraste augmente significativement le contraste à travers le crâne et rend l'imagerie spécifique à la vascularisation.

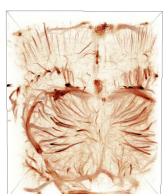
La localisation des microbulles dans les images haute cadence est une étape clé pour assurer une imagerie résolue avec une bonne séparation des petites structures. Le choix de cet algorithme de localisation devient alors primordial avec un fort impact sur l'erreur de localisation et le temps de calcul. D'autre part, l'imagerie 2D est limitée par la projection en élévation qui la rend aveugle aux flux orthogonaux, et le passage à l'imagerie 3D requiert des systèmes spécifiques avec un grand nombre de voies d'échantillonnages peu démocratisés. Parallèlement, d'autres approches utilisent des échographes standards pour réaliser une imagerie volumétrique légèrement dégradée par rapport aux systèmes spécifiques.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans le projet *ResolveStroke*, financé par le Conseil Européen de la Recherche (*ERC*) sous le programme Horizon 2020. La finalité du projet est le diagnostic précoce de l'AVC par ULM 3D transcrânienne avec un système échographique simple, compact, rapide, et idéalement transportable au plus près du patient pour accélérer la prise en charge. La phase préclinique de l'étude sera traitée en partie dans cette thèse avant une transition chez le gros animal puis vers l'homme.

Le manuscrit se décompose en trois grands chapitres : de l'imagerie ULM 2D, au passage à la 3D, puis son application pour le diagnostic de l'AVC chez le petit animal.

6.1 Comparaison et évaluation des algorithmes de localisation pour l'ULM 2D

L'état de l'art sur la microscopie par localisation ultrasonore révèle un manquement sur la mesure de l'efficacité et de la précision des différents algorithmes de localisation. Les valeurs annoncées sont souvent propres à un type de mesure de résolution et il est difficile de les comparer quantitativement. La première partie de ce manuscrit porte sur l'étude comparative des différents algorithmes avec des jeux de données unifiés. Elle comporte une étude sur l'erreur de localisation *in silico* induite par 8 algorithmes classiques utilisés par la communauté. Ceux-ci sont ensuite utilisés sur une simulation réaliste d'un écoulement de particules dans des canaux. La simulation apporte la connaissance des positions théoriques des diffuseurs et permet donc de mesurer des indices statistiques sur la spécificité, sensibilité pour chaque algorithme. Enfin, des données *in vivo* variées sont traitées pour confronter les algorithmes dans des situations typiques en expérimentation. Pour chacune des situations, plusieurs métriques sont évaluées et combinées en un score global qui prend en compte tous les aspects de l'ULM : erreur de localisation, spécificité, temps de calcul, aliasing... Les algorithmes sont finalement classés suivant ces critères



quantitatifs pour s'adapter au mieux à différentes situations d'imagerie. En plus de la mesure de performance des algorithmes, ce travail a une visée pédagogique et de partage des algorithmes de traitement ULM. Il fait l'objet d'une publication scientifique avec les données et scripts de traitement en accès ouvert à la communauté.

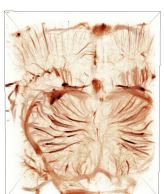
6.2 Imagerie volumétrique avec sonde multiplexée pour la microscopie par localisation ultrasonore

Pour résoudre le problème de la projection en élévation de l'imagerie 2D et obtenir la microvascularisation du cerveau en 3D, j'ai développé une séquence d'acquisition dédiée à l'imagerie volumétrique avec un échographe conventionnel de recherche et une sonde multiplexée à 8 MHz. Avec ce type de sonde, jusqu'à 16 émissions/réceptions sont nécessaires pour acquérir totalement un volume. J'ai proposé et testé une combinaison particulière réduisant à 10 couples d'émissions/réceptions, tout en conservant la même qualité d'image et une cadence d'imagerie plus élevée en simulation et sur un canal *in vitro*. La spécificité de l'ULM requiert une gestion optimisée des données pour stocker une grande quantité de données sans limitations de temps. La séquence proposée ici n'est limitée que par la mémoire de l'ordinateur, et peut acquérir jusqu'à 250 volumes par seconde pendant plusieurs minutes. La séquence est finalement validée *in vivo* avec une imagerie ULM du cerveau de rat en transcrânien sur toute sa profondeur, sans modifications de la physiologie de l'animal. Le volume reconstruit permet une visualisation des artérioles et veinules ainsi que la mesure de leurs débits. Le rat a été choisi comme modèle animal pour avoir une absorption du crâne équivalente pour la fréquence d'imagerie choisie. La pertinence de l'image justifie l'étude préclinique pour le diagnostic de l'AVC.

6.3 Étude préclinique du diagnostic de l'AVC en phase aiguë

Le système d'imagerie 3D ULM est ensuite utilisé en routine pour l'imagerie de l'AVC chez le rat en phase aiguë. Une cohorte d'animaux a été imagée avec induction d'un modèle ischémique par occlusion de l'artère cérébrale moyenne, ou d'un modèle hémorragique dans le striatum. L'imagerie ULM révèle une perte subite du territoire de l'ischémie et une diminution progressive de la perfusion dans le site de l'hémorragie. J'ai proposé un biomarqueur pour caractériser la perte de perfusion en se basant sur la diffusion de microvasculaire. Cet indice montre des comportements spatiaux et temporels différents suivant le type d'AVC. En particulier, la perte subite du territoire aval de l'artère cérébrale moyenne distingue l'ischémie de l'hémorragie.

Une conclusion générale sera dressée en fin de manuscrit pour donner un avis général sur les limitations et perspectives de l'ULM pour l'imagerie de la vascularisation chez le petit animal et chez l'homme.



Chapitre 2

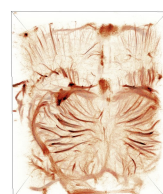
Comparaison et évaluation des algorithmes de localisation pour la microscopie par localisation ultrasonore 2D

Objectifs

La microscopie par localisation ultrasonore améliore la résolution avec un gain significatif par la simple localisation de diffuseurs isolés. Différents algorithmes existent avec des caractéristiques variées sans méthodes de comparaison objectives. L'objectif de ce chapitre est de construire une évaluation quantifiée de ces algorithmes avec des jeux de données tests, des métriques associées, et des scores combinants leurs avantages et inconvénients.

Sommaire

1	Introduction	74
1.1	Contexte de l'étude	74
1.2	Objectifs	74
1.3	Méthodes générales	74
1.4	Principaux résultats	75
1.5	Conclusion	76
2	Article : <i>Performance benchmarking of microbubble-localization algorithms for ULM</i>	77
2.1	Abstract	78
2.2	Main	78
2.3	Results	80
2.4	Discussion	92
2.5	Outlook	96
2.6	References	97
2.7	Methods	99
3	Annexes	107
3.1	Imagerie multimodale de la microvasculariation du cerveau : ultrasons et microtomographie aux rayons X	107
3.2	Rendus graphiques pour l'ULM	110



1 Introduction

1.1 Contexte de l'étude

L'échographie est largement utilisée pour le diagnostic médical, le pronostic et le guidage interventionnel. Sa haute résolution temporelle et sa sensibilité aux diffuseurs intravasculaires lui confèrent la capacité à imager les flux sanguins à travers les tissus de manière non-invasive et non-irradiant. Cependant l'imagerie ultrasonore se confronte à un compromis entre la résolution et la profondeur de pénétration, plafonnant la résolution à la limite de diffraction pour une fréquence d'imagerie donnée.

L'utilisation des microbulles comme diffuseurs intravasculaires isolés a permis le dépassement de cette limite avec la microscopie par localisation ultrasonore. La qualité des images ULM ainsi obtenues est directement liée aux conditions d'acquisition et aux méthodes de traitement des données. En particulier, l'étape de localisation des microbulles est déterminante pour atteindre une précision sub-longueur d'onde. De multiples algorithmes ont été implémentés par les différentes équipes de recherche, avec des approches variées comme l'interpolation, l'ajustement de courbe par exemple gaussienne (*gaussian fitting*), ou la moyenne pondérée. Pour les modèles expérimentaux ou simulés, les méthodes de mesure sont à chaque fois différentes. Il est alors difficile de comparer et quantifier les performances des algorithmes.

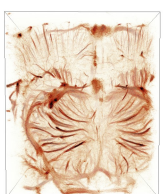
1.2 Objectifs

L'objectif de ce travail est de proposer un traitement des données ULM unifié, utilisable et compréhensible pour la communauté ultrasonore, incluant les principaux algorithmes de localisation, avec un ensemble de données d'exemple *in vivo* et *in silico*. Cet environnement de données et de codes de traitement répond à la problématique d'évaluation des méthodes de localisation avec des conditions d'imagerie unifiées. Pour comparer quantitativement les algorithmes, un ensemble de métriques ont été définies, implémentées et évaluées pour chaque méthode pour les données fournies. Des scores finaux résument objectivement les avantages et inconvénients des algorithmes afin d'orienter l'utilisateur pour différentes conditions expérimentales.

1.3 Méthodes générales

La base de données est composée de quatre jeux de données *in vivo* acquis dans le cerveau et rein de rat, et dans une tumeur chez la souris. Entre 30 000 et 192 000 images de microbulles intravasculaires ont été acquises avec une cadence supérieure à 500 Hz par une sonde ultrasonore linéaire centrée à 15 MHz. Pour l'imagerie du cerveau, l'os pariétal a été retiré pour s'affranchir de l'aberration et absorption du crâne et obtenir la meilleure qualité d'imagerie possible. Les microbulles *SonoVue* (Bracco) ont été injectées dans le réseau sanguin soit en un seul et unique bolus, soit en plusieurs petits bolus répétés tout au long de l'acquisition pour maintenir une concentration constante.

Pour caractériser l'erreur de localisation, deux ensembles de données *in silico* ont été simulés avec le logiciel *Verasonics Research Ultrasound Simulator* (Verasonics). Ils permettent d'accéder



à la position théorique du diffuseur et de la confronter à celles obtenues par les algorithmes de localisation. J'ai simulé la réponse acoustique d'un diffuseur ponctuel avec des déplacements sub-longueur d'onde, avec les mêmes conditions d'imagerie *in vivo*. Ce premier ensemble de données permet d'établir l'influence de la position du diffuseur par rapport à la grille de reconstruction dans le processus de localisation. Le deuxième ensemble de données reflète des conditions *in vivo* avec des écoulements de particules dans des canaux fins. Pour prendre en compte une concentration de diffuseurs et leurs potentielles interactions, j'ai propagé un écoulement de Poiseuille avec une concentration donnée, puis simulé la réponse acoustique. Ce jeu de données comprend également deux canaux s'écartant lentement pour étudier la séparabilité de deux micro-structures. Pour ces deux ensembles de données, le niveau de bruit peut être choisi et ajouté sur les images avant l'étape de localisation et ainsi reproduire des conditions réelles d'imagerie.

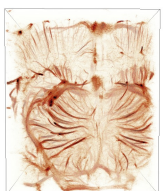
Une structure de traitement a été mise en place, optimisée, et clarifiée, avec les différents algorithmes de la communauté et deux algorithmes implémentés en interne par l'équipe. Un ensemble de métriques a été choisi pour sa pertinence et implémenté par moi-même pour comparer les algorithmes avec une vision objective. Ces métriques caractérisent les erreurs de localisation *in silico*, la sensibilité et spécificité, la séparabilité de deux structures, l'aliasing, et le temps de calcul. Au total, 11 métriques ont été évaluées pour 7 algorithmes de localisation, et leurs résultats sont combinés en scores globaux pour des scénarios d'imagerie différents.

L'angiographie par ULM a été comparée avec une technique de référence pour l'imagerie de la vascularisation *ex vivo*. L'os pariétal a été retiré pour l'imagerie ULM, puis l'animal a été perfusé avec un agent de contraste radio-opaque mélangé avec un polymère. Après durcissement, le cerveau a été prélevé et scanné par tomographie aux rayons X.

1.4 Principaux résultats

L'unification des jeux de données test et l'ensemble des métriques ont permis une quantification objective des algorithmes suivant différents critères entrant en compte pour l'application de l'ULM *in vivo*. Une fois les critères convertis en scores, un classement a pu être établi pour choisir l'algorithme le plus adéquat pour une situation d'imagerie donnée.

Les deux algorithmes développés en interne (localisation par symétrie radiale et par moyenne pondérée) obtiennent les meilleures performances au classement global. Les plus faibles erreurs de localisation, autour de $\lambda/10$, sont obtenues avec les algorithmes par symétrie radiale et par ajustement de fonction gaussienne. Ce dernier se classe en troisième position à cause d'un temps de calcul trop élevé contraignant pour une utilisation en routine. Ces deux méthodes obtiennent aussi les meilleures performances pour la séparabilité des petites structures avec un seuil de détection minimal pour la symétrie radiale à $0,36\lambda$. De même, la similarité (indice de Jaccard) et la précision obtenues sur le jeu de données d'écoulements simulés classent le *gaussian fitting* en première position, suivi de la symétrie radiale et des modèles avec interpolation. Dans les conditions *in vivo*, le temps de calcul est minimal pour la moyenne pondérée, et rédhibitoire pour les modèles interpolés et par ajustement de fonction. Enfin, l'algorithme radial semble découvrir plus de structures vasculaires complexes avec un taux de saturation maximal.



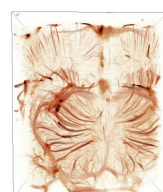
1.5 Conclusion

La comparaison quantitative des algorithmes communs en ULM révèle des différences significatives en termes d'erreur de localisation, de précision, et de rapidité d'exécution. Cette comparaison doit pouvoir orienter les utilisateurs pour choisir objectivement la méthode la plus adaptée à leurs besoins.

Ces travaux ont également une visée pédagogique avec le partage d'un script de traitement documenté disponible dans un répertoire public [GitHub](#)¹. Il comprend également tous les scripts et fonctions pour comparer les méthodes de localisation, avec la possibilité d'ajouter un nouvel algorithme facilement. Un logiciel de traitement d'image a mis en ligne : *LOTUS (LOcalization and tracking Toolbox for Ultrasound Super-resolution)*, pour faciliter le traitement des données ULM pour les chercheurs extérieurs à la communauté. Toutes les données *in silico* et *in vivo* sont partagées sur la plateforme [Zenodo](#)² et peuvent être utilisées avec les scripts ou pour le développement de nouvelles méthodes de traitement.

1. <https://github.com/AChavignon/PALA>

2. <http://doi.org/10.5281/zenodo.4343435>



2 Article : *Performance benchmarking of microbubble-localization algorithms for ultrasound localization microscopy*

Article accepté pour publication le 29/07/2021 dans *Nature Biomedical Engineering*

Performance benchmarking of microbubble-localization algorithms for ultrasound localization microscopy

Baptiste Heiles^{1,2,*}, Arthur Chavignon^{1,*}, Vincent Hingot^{1,2}, Pauline Lopez^{2,3}, Elliott Teston², Olivier Couture¹

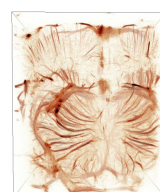
¹Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Department Laboratoire d'Imagerie Biomedicale, Paris, France,

²ESPCI, CNRS, INSERM, PhysMedParis, Paris, France,

³Institut Cochin, INSERM U1016, Paris, France,

*Contribution égale de ces auteurs.

Documents complémentaires (figures) accessibles avec la publication à venir.



2.1 Abstract

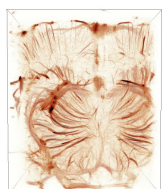
Ultrasound Localisation Microscopy (ULM) is an ultrasound imaging technique that relies on the acoustic response of sub-wavelength ultrasound scatterers to map the microcirculation with an order of magnitude increase in resolution as compared to conventional ultrasound imaging. Initially demonstrated *in vitro*, ULM has matured and sees implementation *in vivo* for vascular imaging of organs or tumors in both animal models and humans. The performance of localisation algorithms greatly defines the quality of vascular mapping. In this Resource, we compile a collection of ultrasound localisation algorithms, including two algorithms optimized for reconstruction speed, and compare their performance by proposing eleven metrics, implemented using *in silico* datasets (of simulated canals) and *in vivo* datasets (of a rat brain perfusion, a rat brain bolus, a rat kidney and a mouse tumour). The algorithms, evaluation metrics and datasets are provided in open format as a compendium to setup and perform ULM-based experiments, allowing the user to identify the optimal localisation algorithm for their application, benchmark their own software and enhance the overall quality of their ULM images.

2.2 Main

The circulatory system carries the essential nutrients of life to cells in the body. It forms a 100 000 kilometer-long network composed of centimeter-wide arteries down to capillaries that are a few micrometers in diameter at most. The study of the vascular system is essential for both the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases, cancer, diabetes, stroke, or organ dysfunction. Due to its diversity of scale, imaging the vasculature is a daunting task and few techniques are capable of measuring micro-hemodynamics deep in the human body.

Ultrasound imaging is extensively used in medical practice as a non-invasive tool that provides soft-tissue diagnosis, prognosis, or guides interventions. Using the Doppler effect, it can also measure blood flow in real-time. With the advent of plane wave techniques¹, ultrasound has reached frame rates up to 20 kHz making it possible to observe and measure fast occurring changes [1] such as functional changes in the brain [2], as well as increase sensitivity to blood flow that allows more accurate filtering [3,4]. To increase blood’s contrast, micrometric gas microbubbles can be intravenously injected *in vivo*. Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) is mostly used for perfusion studies and cardiac imaging [5].

Because conventional ultrasound imaging, Doppler, and contrast-enhanced ultrasound all rely on the propagation of sound waves, ultrasound imaging is largely limited in resolution by diffraction. Recently, Ultrasound Localisation Microscopy (ULM) has broken that limit by isolating a small number of microbubbles as subwavelength sources in each image and localizing them with micrometric precision [6–8]. Similar to PALM (PhotoActivated Localisation Microscopy), it uses these agents as individual sensors to map the region of imaging by accumulating thousands of events and adding them through density-based methods. When implemented at kilohertz frame rates, ULM can also retrieve the trajectories of microbubbles carried in the bloodstream and reconstruct several centimeters deep, hemodynamic maps of the vasculature both in 2D and 3D [9–11], a feat rising to the challenge of multiscale imaging tools for both the



vasculature and microvasculature. For example, typical imaging of a rat brain with craniectomy *in vivo* with Doppler contrast-enhanced ultrasound and ULM is shown in [fig. 2.1] next to a post mortem microangio-computed tomography (microangio-CT) for reference. Microvessels appear on each modality but sharper and brighter on the ULM rendering (red triangles on [fig. 2.1]).

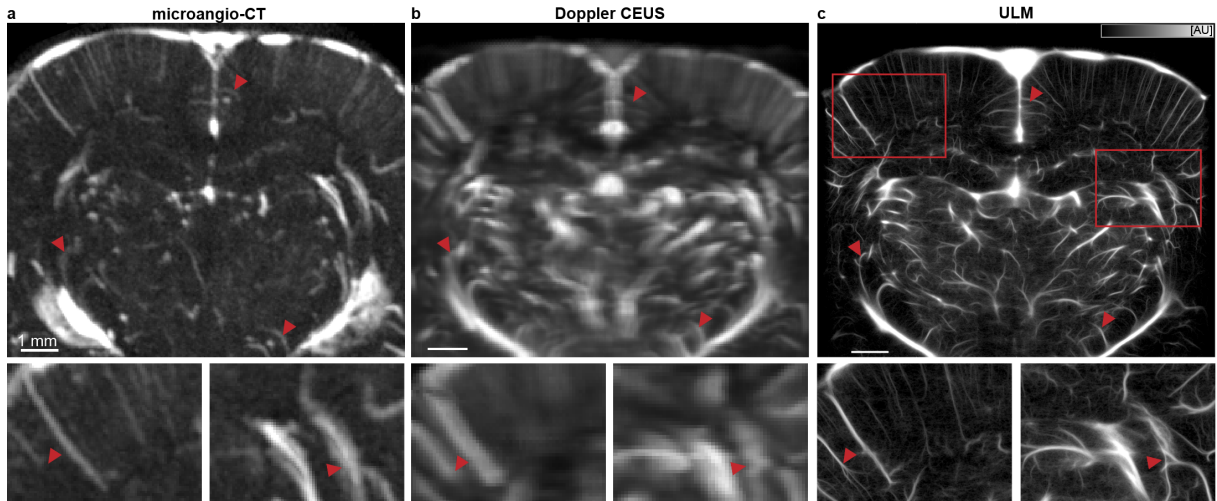
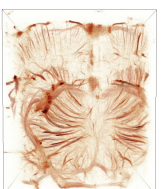


FIGURE 2.1 – Rat brain vascular imaging with *in vivo* ULM and post mortem microangio-CT. **a**, Post mortem microangio-CT with perfusion of μ Angiofil (Fumedica AG, Switzerland) of the rat brain performed with a preclinical micro-CT. Slice of 400 μ m. Red arrows indicate corresponding vessels in the different images. **b**, *In vivo* Doppler contrast-enhanced ultrasound (CEUS) of the rat brain. **c**, *In vivo* ULM of the rat brain with 200 000 images at 1 kHz, red squares indicate where the zooms below each image are taken.

Several teams have been implementing ULM using various localisation techniques over the last few years [6,10,12–14]. The quality of ULM images is directly dependent on the signal-to-noise ratio of the original images or detection filters but most importantly on the localisation and rendering techniques. However, because each team uses different *in vitro* and *in vivo* models as well as different probes, ultrasound machines, and acquisition parameters, comparing these algorithms, along with their general approaches, is difficult. Progress in the field of ultrasound super-resolution is hindered by a lack of widely accepted comparison metrics, even though several attempts have been published on filtering [15], localisation [16–18], and tracking [15] errors.

In this paper, we present a comprehensive open data-processing framework for ULM, including six datasets, *in vitro* and *in vivo* – available at <http://doi.org/10.5281/zenodo.4343435> - complemented by a series of universal performance metrics to evaluate quantitatively different ULM implementations. We provide five of the most used algorithms for microbubble localisation to compare their performances : Lanczos, spline and cubic interpolation (**Lz-Interp**, **Sp-Interp**, **Cub-Interp**), Gaussian fitting of the PSF (**Gauss-Fit**), and a no-shift method that assumes ideal centering of the microbubble in the pixel. The scripts along with our Localisation and tracking Toolbox for Ultrasound Super-resolution (LOTUS), are available on a GitHub repository (<https://github.com/ACHavignon/PALA>). In Supplementary figure 6-1, we have compiled the localisation methods used and their related articles as well as a few comments.

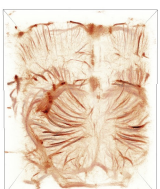


Localisation method	Related articles	Comments
Gaussian fitting	(Ackermann and Schmitz, 2016; Luke et al., 2016; O'Reilly and Hynynen, 2013; Song et al., 2018b) [19–22]	Usually, these works use a Gaussian convolved PSF rather than a Gaussian fitting with an optimizer.
Weighted average based	(Christensen-Jeffries et al., 2015; Hansen et al., 2016; Heiles et al., 2019; Lin et al., 2017; Song et al., 2018a; Soulioti et al., 2018; Viessmann et al., 2013; Zhang et al., 2018; Zhu et al., 2019) [10,13,15,23–28]	Except for Heiles et al 2019, these work on data beamformed with pixels of sizes below the wavelength or data beamformed with commercial scanners which might affect PSF shape and full width at half maximum.
Lanczos based interpolation and Gaussian fitting	(Errico et al, 2015) [9]	
Spline based interpolation	(Huang et al., 2020; Song et al., 2018b) [22,29]	
Linear based interpolation	(Song et al., 2018a) [15]	On top of the linear-based interpolation, this paper convolves with a Gaussian profile.
Cubic based interpolation	(Song et al., 2018b) [22]	This paper is a comparison of algorithms
Radial symmetry	(Parthasarathy, 2012) [30] (optic super-resolution only)	
RF-based	(Brown et al., 2019; Christensen-Jeffries et al., 2017a, 2017b; Desailly et al., 2013, 2015) [16,17,31–33]	These papers are based on radiofrequency data before beamforming. In particular, the papers from the team at Imperial College/Kings College London use the onset of the Hilbert transform of the RF signals.

In addition, we introduce two algorithms developed by our team called weighted average (WA) and radial symmetry (RS). We provide all algorithms ready for use so that labs lacking the expertise to implement ULM can contribute to the fast development of ultrasound super-resolution imaging (see supplemental data). Importantly, we introduce metrics that address still unanswered questions such as : how accurate and sensitive is the localisation algorithm [17], how much is ULM affected by low SNR [13], what affects the precision of the code, how well is it possible to reconstruct difficult structures such as highly tortuous vessels, aneurysms, stenosis, where do the grid artifacts come from [34], and finally how can 3D ULM be implemented without a dramatic increase in computational power and time? The platform is designed to allow the integration of new metrics and answers to questions the user might come up with on its own.

2.3 Results

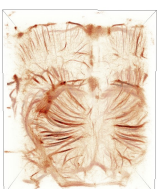
Ultrasound localisation microscopy is a multi-step process comprising the acquisition of a large number of frames, pre-processing, detection, localisation, and image reconstruction as described in [fig. 2.2] and Supplementary Figure 1-1. Although this article is mostly focused



on the comparison of localisation algorithms, readers will find, in supplementary material, the scripts and appropriate open software (LOTUS) to perform each of these steps in the most straightforward way. These scripts can be easily adapted to different acquisition types or various computer setups and parallelized. In LOTUS, users can load their own acquired data, filter it, localize microbubbles, track them and generate ultrasound super-resolution renderings.

2.3.1 *In silico* and *in vivo* datasets

To study the performances of different localisation algorithms, the first step was to create and acquire 3 different datasets, each of which we make fully available for reuse in supplementary materials. The first one ("*in silico* PSF"), the point-spread function (PSF) simulation, is designed to study non-uniformity effects on localisation and spatial sampling effect on the beamforming process. It consists of a point-like scatterer moved in a $\lambda \times \lambda$ space, the size of one pixel, by $\lambda/21$ steps, resulting in 441 positions. The second dataset ("*in silico* Flow"), the microcirculation simulation, allows for testing *in silico* more fundamental aspects of resolution such as the separability of microvessels and the accuracy of microbubble tracking. It is comprised of complex 3D tubes in the imaging plane mimicking an actual 2D imaging situation. Inside, point-like scatterers are placed at random in each of the tubes section and then are propagated through 20 000 frames according to a Poiseuille flow model assuming continuity on streamlines. Concentrations, speeds, and noise level can all be modified by the user and are presented in the methods [section 2.7](#). The maximum velocities in each of these tubes range from $0,05\lambda/\text{frame}$ to $3\lambda/\text{frame}$. We studied the localisation errors and the effect of different signal-to-noise ratios (SNR) using this dataset. For these datasets, the point-like scatterer's ultrasound response is simulated using the Verasonics Research Ultrasound Simulator (Verasonics Inc., Kirkland Washington, USA), using a 128 elements linear probe, with elements' pitch at a wavelength ($\lambda = 100 \mu\text{m}$).



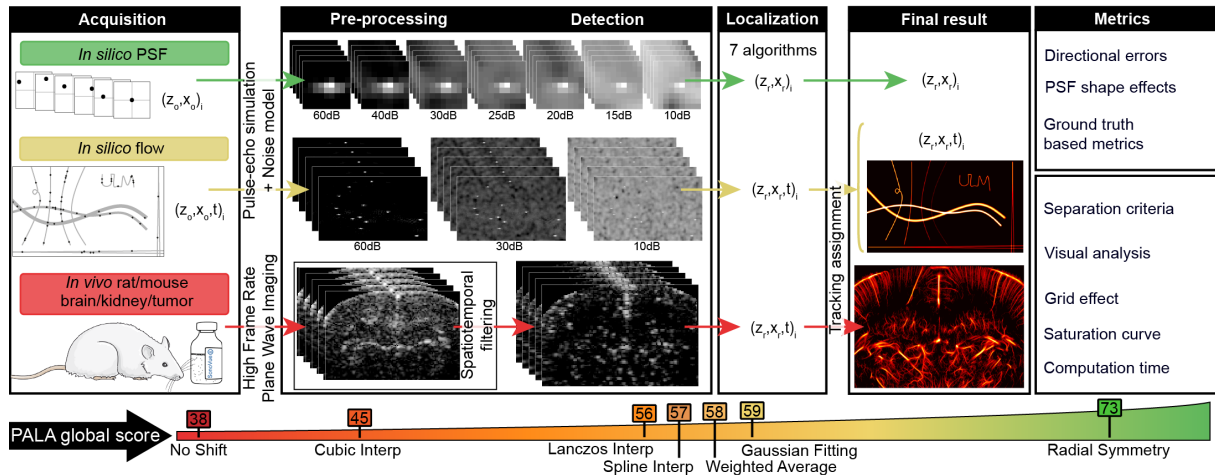
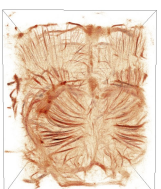


FIGURE 2.2 – Description of the framework for data simulation and performance assessment. The framework presented here fits easily into the classical layout of ULM acquisition, filtering/pre-processing, detection of microbubbles, localisation of events' centers, tracking, and mapping of the flow. Each dataset gives different information about the localisation process. The separation criteria, which defines maximum resolution attainable is given by dataset "*in silico* PSF". The ground truth based metrics are given by *in silico* datasets. *In vivo* datasets, "*in vivo* rat brain perfusion", "*in vivo* rat brain bolus", "*in vivo* rat kidney", "*in vivo* mouse tumor", give information about the *in vivo* visual aspect, the influence of the algorithms on the grid effect and on computation time. Visual analysis is also provided by dataset "*in silico* Flow". The PALA global score is calculated based on a combination of the metrics on the right column computed on *in vivo* and *in silico* datasets. By summing and weighting each of these metrics derived scores, we obtain the global score, designed to grade the algorithms' performance.

While the simulation-based datasets give access to the ground truth and are useful to compare the error of localisation-based metrics, the best validation is still *in vivo* experiments as we are confronted with multi-factorial signal noise, breathing motion, speed of sound changes coming from propagation through fatty tissue, pulsating blood and other phenomena arduous to reproduce in simulation. Imaging different organs allow us to compare different physiologies, hemodynamics, and anatomical geometries. The *in vivo* datasets comprise of :

- "*in vivo* rat brain perfusion", "*in vivo* rat brain bolus" : two Sprague Dawley rat brains at different coronal sections. One was acquired while continuously injecting microbubbles through the jugular vein (192 000 ultrasound images at a SNR of 29 dB), another one by injecting a bolus of microbubbles in the caudal vein (170 000 frames at a SNR of 28 dB).
- "*in vivo* rat kidney" : a Sprague Dawley rat kidney (188 020 frames at a SNR of 26 dB)
- "*in vivo* mouse tumor" : A subcutaneous tumor implanted in an FvB strain mouse (30 000 frames at a SNR of 25 dB)

The *in vivo* angiography of the rat brain with continuous injection is named "*in vivo* rat brain", which is the most complete dataset and one that has already been used as reference [8,35]. The skull of the rat was previously removed following craniotomy surgery protocol (detailed in the Methods section). The other rat brain we imaged went through the same protocol with a different method for injection. The rat kidney dataset was acquired after isolation of the



kidney outside of the rat following lumbotomy protocol (detailed in Online methods). The tumor dataset was obtained on a subcutaneous tumor in mice after implantation of primary cancerous cells developed in mouse mammary tumor virus-polyoma middle tumor-antigen (MMTV-PyMT) donor mice (detailed in Online methods). The kidney and mouse tumor datasets are more subject to breathing motion than the rat brain since the animal is not fixed. These datasets will thus allow us to compare the performance of the algorithms in low SNR, moderate motion situations. The mouse tumor which is expected to have a disorganized vasculature is of particular interest.

On each of these datasets, and based on the state of the art we selected and applied 7 different localisation algorithms to retrieve subwavelength positions. They are then processed by a Kuhn-Munkres assignment to perform tracking and velocimetry [36,37]. Final images are reconstructed by density projection or velocity renderings. The whole framework is presented in [fig. 2.2].

2.3.2 General comparisons of 7 algorithms using 11 metrics

To alleviate the current difficulty in comparing the attainable resolution in different organs and by different groups, we report here 11 different metrics to compare various ULM algorithms. In each simulated dataset, we look at the directional errors, statistical measures using a binary classification test, and separation criteria to define maximum attainable resolution. For *in vivo* results, we report an in-depth visual analysis as well as grid effect characterisation, and computation time. In the end, the localisation algorithms are rated with an overall scoring called PALA global score that takes into account errors, the ability to detect microbubbles accurately, and computation time, computed on *in silico* and *in vivo* datasets (see Methods section 2.7 and Supplementary Figure 5-1 to 5-4). The results are presented in [fig. 2.3].

Two algorithms, Gaussian fitting, and radial symmetry come out on top on almost every quantitative index that we have devised. However, when looking at the time it takes to perform ULM with tracking and localisation, the ranking is modified. The weighted average and the radial symmetry-based algorithms are the fastest localisation implementations, while the Gaussian fitting is almost 50 times slower. The values presented in [fig. 2.3b] were normalized according to the fastest implementation which takes for the *in vivo* dataset around 3 minutes, faster than the actual acquisition of the images.



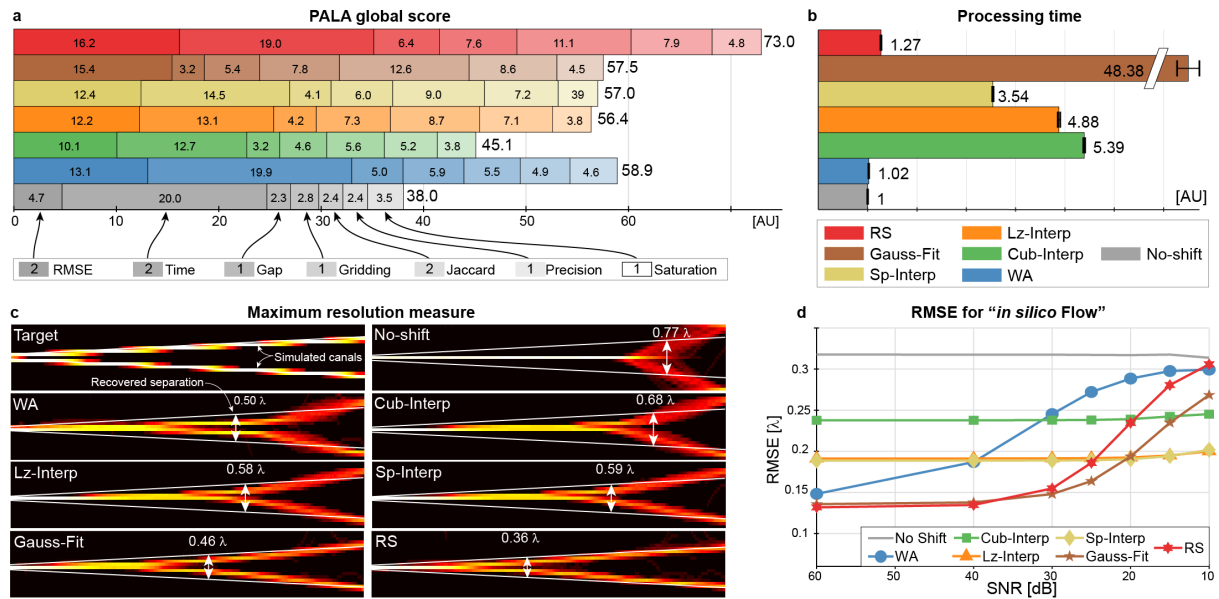


FIGURE 2.3 – Results of the study combined in the PALA global score for each algorithm. **a**, PALA global score obtained with the different scores from "in silico PSF" dataset : RMSE, "in silico flow" dataset : minimum separation measured between the two canals (i.e. maximum resolution), Jaccard index, precision value, and "in vivo rat brain perfusion" : the time factor, gridding index and saturation index based on saturation curves (see [fig. 2.7]). The bigger the score, the higher is the performance of the algorithm. To reflect the importance of the different indices, some of them were multiplied by coefficients (value in legend). These arbitrary coefficients allow us to double the impact of RMSE, time factor, and Jaccard index, the three indices we consider most critical. The weights used as well as the exact formulae for the conversion of the metrics to arbitrary unit scores on a scale of 0 to 100 are available in the methods section 2.7 and a supplementary dynamic table "PALA_GlobalScores_DynamicTable.xlsx". Different weights have also been chosen to reflect implementations where time or SNR influence might be less crucial in the supplementary information. **b**, Computation time for each algorithm compared to the fastest implementation, the no-shift implementation taking 3 minutes on our high-end computer (Intel Core i9 @ 2,9GHz 12 cores, NVidia RTX 2080Ti, 128 GB RAM @ 2133 MHz). Error bars represent $\pm s.d.$ (N = 240 blocks of 800 frames). **c**, Maximum resolution attainable on the dataset "in silico Flow" at SNR = 30 dB with different localisation schemes. λ represents the wavelength. For each rendering, the point where the intensities of the two canals reconstructed are distinct by more than 3% is calculated. The lateral position at which it is located is taken to calculate the real distance between the two simulated canals. That is taken as the minimum separation that can be accurately recovered by the algorithm. It is the separation index. **d**, Root mean square error of the localisation schemes for recovery of simulated points in dataset "in silico Flow" with different SNR.

Overall the radial symmetry (RS) based and weighted average (WA) algorithms showed the highest performance with the weights chosen. Looking closer, the maximum resolution attainable measured as the separation criteria is the highest for the RS and Gauss-Fit based algorithms at $0,36\lambda$ and $0,46\lambda$. The time factor, however, is the lowest for the WA with under 3 minutes of calculation which is lower than the acquisition time with our computer. The large increase and very low root mean square error (RMSE) minimum of the weighted average algorithm ($0,13\lambda$) confirm that it is a very good candidate for localisation at a high signal-to-noise ratio (SNR)



but that one should switch to either **Gauss-Fit** or **RS** when the SNR worsens below 30 dB. At 15 dB and downwards, one should theoretically consider using interpolation-based algorithms (see Supplementary Figures 3-3). The gridding index, which is a quantitative measure of the reprojection of localized microbubbles on the original beamformed grid, impairing accurate vessel delineation, is maximized for both **RS** and **Gauss-Fit** approaches. This gridding index increases when specific spatial frequencies are overexpressed.

2.3.3 Accuracy metrics in simulated datasets

We simulated both *in silico* datasets with 7 different signal-to-noise ratios from 10 dB to 60 dB (white Gaussian noise model, 0,2ohm impedance noise, ± 10 dB amplitude, for clutter filtered with 0,7 pixel wide 2D Gaussian kernel, see Supplementary figure 2-3). The different localisations in the 30 dB set were classified depending on their distance to the scatterer simulated position. When this distance is lower than $\lambda/4$, the localisation is deemed successful, otherwise, it is either classified as a false negative (FN) if an existing scatterer was not detected or as a false positive if no real scatterer was present (FP) (see [fig. 2.4a], and Supplementary Figure 3-6). The highest number of localisations 386 000, calculated as the total of false and true positives is obtained in the radial symmetry case, with 12 % more than the worst-rated algorithm, the **Cub-Interp**. The number of true positives is the highest in the **Gauss-Fit**/**RS**-based algorithms with a value of 3,7 and 3,5 times higher respectively than the no-shift algorithm. The interpolation-based algorithms have similar TP values while the cubic interpolation fares the worst. The same trends in FP and FN numbers can be observed. To interpret these more easily, the precision, Jaccard, and sensitivity indices were also plotted [fig. 2.4b]. For the three indices, the **Gauss-Fit** and **RS** come out on top with as much as 85,9 % simulated scatterers being picked up by the best localisation algorithm.

The sensitivities of **WA** and the best interpolation-based algorithms are quite low at around 40 %, while the precision is higher for the latter at 71,8 % [fig. 2.4b]. The no-shift algorithm has the lowest values albeit not as low as one would expect given that no localisation is involved. The Jaccard index which represents a detection rate is at most 63,2 % and can be as low as 11,8 % for the no-shift scheme. **Gauss-Fit** and **RS** are more precise than others. This is due to a low localisation error, and as such a high cardinality of true positives. As the total number of TP+FN is finite, this also means that the sensitivity index is high. For the weighted average scheme, we measure a high precision and high sensitivity although its localisation error is the highest among the schemes. It gives us a glimpse into why this happens : the TP and FN values are almost identical to the best interpolation schemes.

The directional errors are calculated for every simulated point and every recovered localisation [fig. 2.4c]. At first look, **WA** and **Cub-Interp** localisation algorithms have similar error values and standard deviations. However, their error distributions are very different and we can uncover further insight about localisation behavior by closely studying them. The distribution axial error of the latter has $\lambda/10$ peaks compared to the others' smooth distribution. That points towards jumps in the localisations. We hypothesize that this will cause a significant increase in the number of false negatives and a decrease in the number of true positives which can be verified in



[fig. 2.4a], $TP_{WA} = 180\text{ k}$, $TP_{(Cub-interp)} = 178\text{ k}$ and $FN_{WA} = 289\text{ k}$, $FN_{(Cub-Interp)} = 290\text{ k}$.

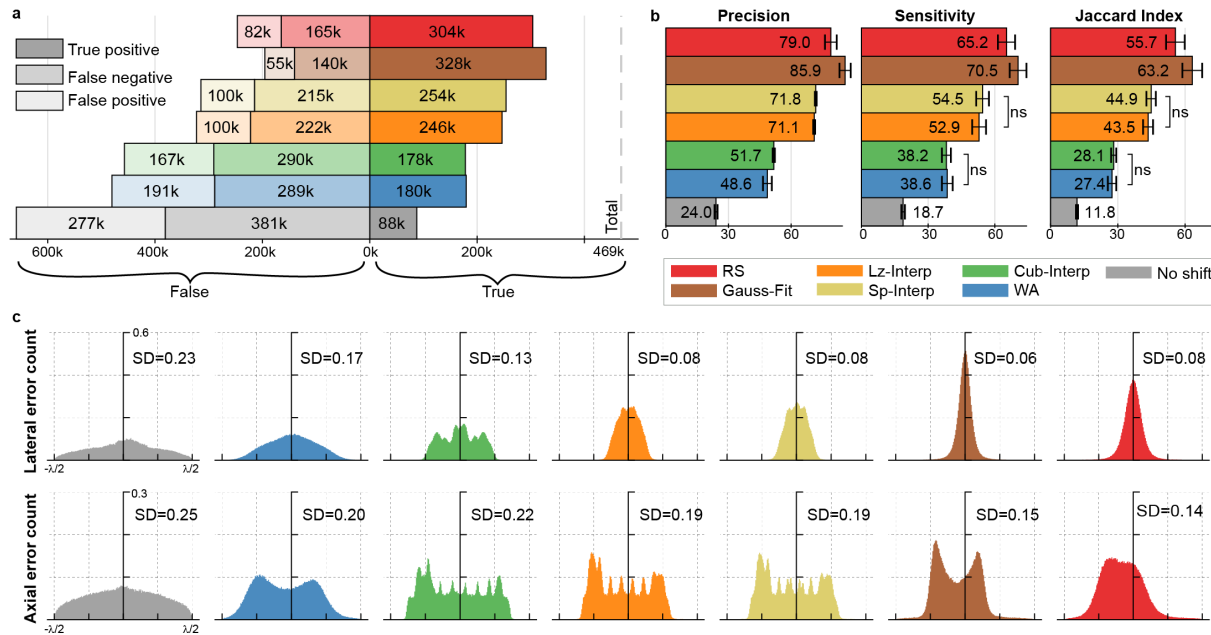


FIGURE 2.4 – **Directional errors and statistical indices for performance on the dataset "in silico Flow" at 30 dB.** **a**, Statistical measures of the different localisation schemes for dataset "in silico Flow". The left direction indicates the false ensemble, the right, the true ensemble. The total number of points simulated is 469 000. **b**, Statistical indices based on statistical measures for the different localisation schemes in percent. Means values of 20 blocks of 1000 continuous frames. Error bars represent \pm s.d. Unpaired two-sample t-test of the means of the different algorithms always returns p-values lower than 5% except when "ns" is specified (non-significant, $p > 0,05$). **c**, Lateral and axial error distributions for the different localisation schemes. Some of these distributions have skew for example the spline and Lanczos interpolation schemes in the lateral direction. λ represents the wavelength. ($N > 100\,000$)

The largest standard deviation of the lateral error was found for the no-shift method as expected. For the axial error, the algorithms have standard deviations between 0,06 and 0,23, with the lowest being the GF and the highest being the no shift. For the Gauss-Fit and RS-based algorithm, their lateral standard deviation error is around half lower than their axial error. The Lanczos and Spline interpolations schemes have similar ratios between the lateral and axial error standard deviation. The histogram distributions in the lateral direction for these algorithms seem to follow a Power-law with a high exponent whereas the weighted average, Lanczos, and spline kernel-based interpolation follow a linear law. The axial error distributions all present sharp peaks in different patterns. The most notable pattern is the fork pattern at $\lambda/10$ on the interpolation-based methods reproducing the interpolation grid used. Another pattern present in the radial symmetry and Gaussian fitting-based methods takes the shape of two sharp peaks on either side of the center value showing a bimodal behavior where the microbubble is localized in two preferred locations outside of the actual center. The RMSE is highly affected by this difference in localisation in both directions and while the RMSE of the radial symmetry and Gaussian fitting-based schemes are better than the others, the improvement in localisation



brought by these algorithms in the lateral direction is diminished in the final value of the RMSE. These errors were calculated for seven different SNR and are presented in Supplementary Figures 3-3.

The various algorithms spatially shift the expected localisation in different ways. To study this effect more precisely, it is useful to look at the results of the PSF simulation. The results are presented in [fig. 2.5]. The two main results are visible at once : first, the interpolation-based algorithms are scarcely affected by noise as they only take into account the closest neighboring sample to build the final function, and second, they exhibit a quite high standard deviation of their errors in the axial direction ($sd(err_{axspline}) = 0,19\lambda$, $sd(err_{axcubic}) = 0,22\lambda$). Putting it into perspective when plotting the absolute error at each of the $\lambda/21$ grid points helps to understand the dynamics of the noise impact [fig. 2.5b]. When the SNR diminishes, the errors of the best-ranked algorithms tend to show the bimodal behavior of the worst-ranked : axial and lateral errors are distributed in two bands in each direction up until a certain SNR value. At 15 dB the weighted average exhibits this behavior very clearly for the lateral error while the GF and RS have an almost uniform distribution. All distributions and maps are presented in Supplementary Figures 2-5 to 2-6 and 3-3. If we look more closely at the intensity profiles generated by our framework [fig. 2.5c], we can see that displacement in any direction induces a displacement of the maximum amplitude.



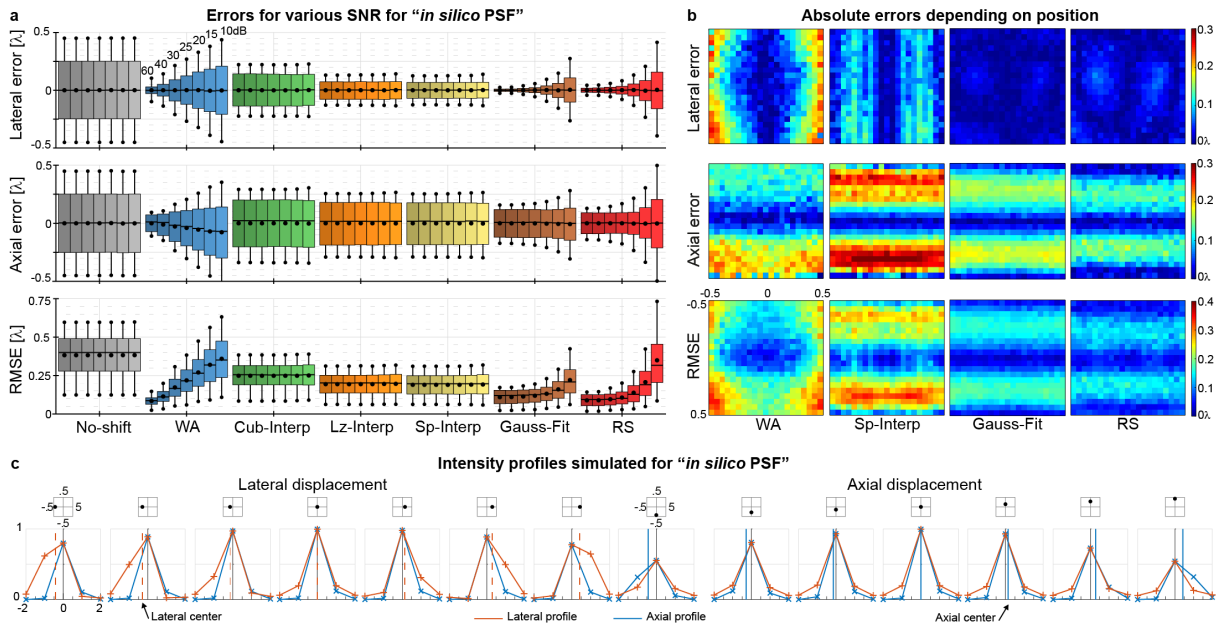


FIGURE 2.5 – Study of PSF non-uniformity in direction and its effect on localisation.
a, Lateral, axial and root mean square errors averages with standard deviations measured for the different localisation schemes on the dataset "*in silico* PSF" with different SNR. Errors are standard deviations. Bold center lines show medians, upper and lower box limits show the upper and lower quartiles, whiskers represent the first 5% and 95% quantiles. Round markers show mean values. ($N = 2646$) **b**, Absolute lateral, axial, and root mean square errors for each position where a scatterer was simulated inside the $\lambda \times \lambda$ grid with a SNR of 30 dB. λ represents the wavelength. ($N = 6$ per pixel) **c**, $5\lambda \times 5\lambda$ PSF simulated for a scatterer displaced in the $\lambda \times \lambda$ grid with $\lambda/7$ step. The intensity profiles demonstrate the inability of the wavelength-driven system to accurately reflect sub-wavelength displacement. The dashed lines represent the true position of the scatterer simulated.

However, even when moving close to the neighboring pixel situated ($\lambda/5$) further from the center, the maximum amplitude remains at the center of the pixel ($\{x, z\} = 0$). The maximum drop in intensity for each displacement is 12 dB below the peak amplitude on the connected components of the central pixel. This means that the bimodal behavior observed above in the axial error is due to low SNR that prevents the algorithms to use the information present in the neighboring pixels to perform accurate localisation. This confirms that the interpolation schemes don't vary with SNR as much as the other schemes as they only use 3 points to perform the interpolation. At SNR lower than 15 dB, localisation might fail in the **WA** and **RS** schemes at giving accurate enough results and providing enhanced resolution in the axial direction. The spatial frequency peak to baseline analysis detailed in the methods section 2.7 is presented in [fig. 2.7]. The cubic interpolation has a large score that is in line with what is described in the next section. The **Sp-Interp** and **WA** seem to have the same level of gridding. The radial and Gaussian fitting schemes come out on top with values almost 3 times less than the worst scheme.



2.3.4 Image quality metrics *in silico* and *in vivo*

With the provided datasets, both simulated and real microcirculation can be evaluated with the various algorithms. For instance, [fig. 2.6] shows the whole view of the ULM rendering of the simulated microcirculation. There are notable differences in how well algorithms manage to recover the initial shapes. In some cases, the overall contrast of the structures compared to the target is lower, with some vessels or part of vessels disappearing for example in the no-shift or cubic interpolation schemes. The horseshoe pattern and ULM watermark [fig. 2.6b] are the hardest structures to recover, few algorithms seem to perform well. Gauss-Fit/RS/Sp-Interp seem to yield the rendering closest to what was simulated, especially the curvature before and after the horseshoe. This shape is interesting as it is similar to saccular aneurysms. The smallest tubes are correctly represented in most cases but the separation index presented in [fig. 2.3] gives us an idea of the maximum resolution attainable which is the gold standard for resolution determination.

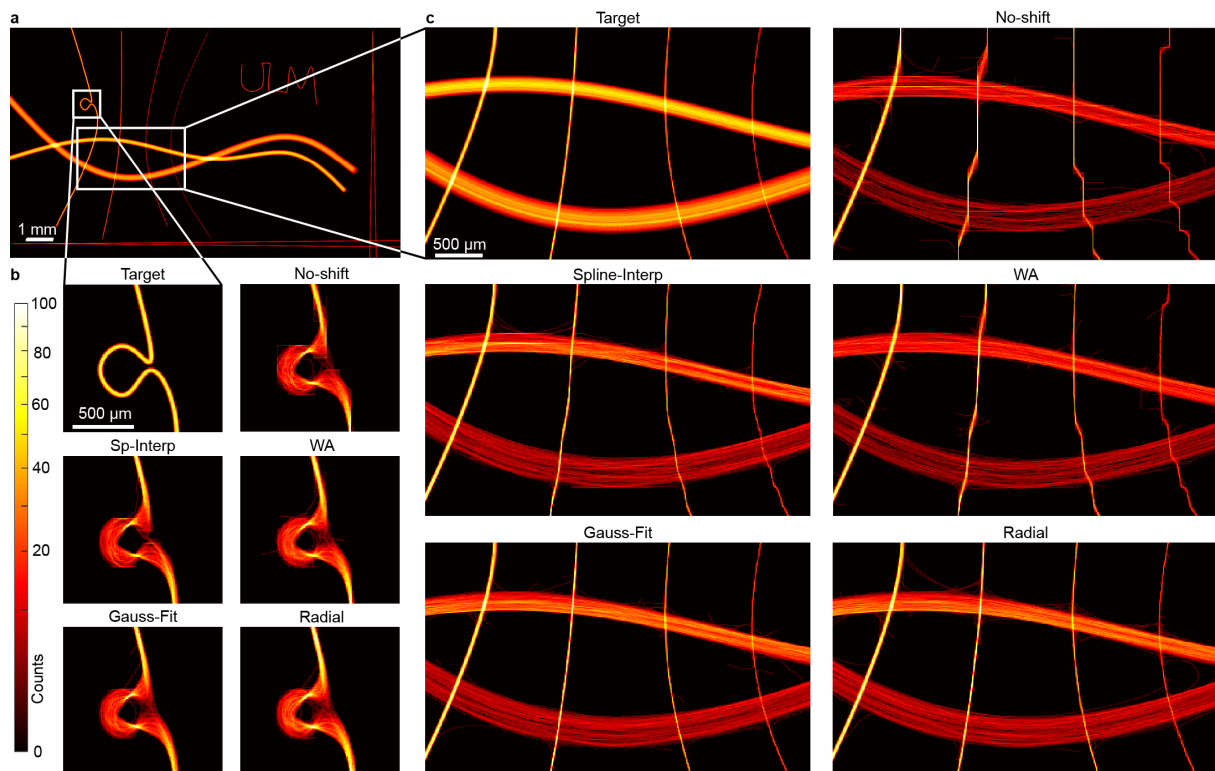


FIGURE 2.6 – 2D ULM density-based renderings of "*in silico* Flow" along with a focus on particular areas. The different renderings are obtained by giving each pixel in the image a value that is the number of trajectories passing through that coordinate. **a**, Target to be recovered by the algorithm. Composite rendering of 20 000 frames. **b**, Zoomed in renderings for the different localisation schemes on the horseshoe pattern. **c**, Zoomed in renderings for the different localisation schemes on structures with various diameters and characteristics.

The no-shift is valuable to study a hypothesis made in a previous paper about 3D ULM [37] stating that the grid effect appears because of erroneous localisation in areas of low SNR. Because the no-shift does not involve sub-pixel localisation, it should suffer the most from the grid effect



and one can see that it does, appearing in all of the structures smaller than the wavelength of the ultrasound sent (100 μm). Some behaviors are only visible when zooming in [fig. 2.6c]. The **WA** and the **Cub-Interp** scheme seem to suffer similar grid effects on the same tubes. The **Sp-Interp** only suffers gridding on the two smaller curved tubes (10 and 5 μm). The **Gauss-Fit** and **RS**, on the other hand, adapt completely and do not suffer from any gridding on any curved tubes. More renderings are produced in Supplementary Figures 3-1, 3-2, 4-2, and 4-3. We devised an index to measure the grid-effect by a spatial frequency peak to baseline analysis in both directions. The value of that index grows with the severity of gridding. The values are reported in [fig. 2.7] next to the renderings of the brain vasculature. The no-shift-based ULM performs very poorly *in vivo* as predicted by the simulation and has the highest gridding index. The vessels in the cortex rendered by that scheme suffer from considerable gridding making their structure disorganized. The **Cub-Interp** also suffers from gridding as predicted, however, the **WA** localisation-based ULM is in appearance not gridded. To further investigate the effects of localisation, we zoomed in on a specific subcortical region where the grid effect is maximum, and where there is a large variety of vessel sizes [fig. 2.7b]. Our previous conclusion holds partially. The **Cub-Interp** is still massively subjected to gridding and we can see some gridding appearing in specific regions in **WA** (indicated by white triangles). For the four best-ranked algorithms, almost no gridding is present in the images *in vivo*. One considerable difference can be noted though between the **RS**-based ULM and the interpolation schemes : the vessels seem more detailed and sharper in the interpolation schemes. In **RS**, there seems to be a lot of small crossing trajectories in between the brightest and largest vessels.

Further insight can be drawn from [fig. 2.8] where the other *in vivo* datasets are presented. In the kidney, where the vasculature is organized differently than in the brain, these small crossing trajectories are not observed for the **RS** scheme. In the tumor, the vasculature is disorganized but no crossing trajectories are observed anyway. The difference between the best of the interpolation schemes (**Sp-Interp**) and the **GF** or **RS** algorithms is notable in the tumor where fewer vessels are being picked up by the former than the latter. The saturation curves, counting the number of illuminated pixels throughout the reconstruction, show us the capacity of algorithms to detect new structures. When interpolated based localisations saturate, **WA/Gauss-Fit/RS** are still recovering new pixels in the image. Finally, the **RS** obtain the highest final saturation value at 48,2 %, 1,9 % above the Weighted-Average.



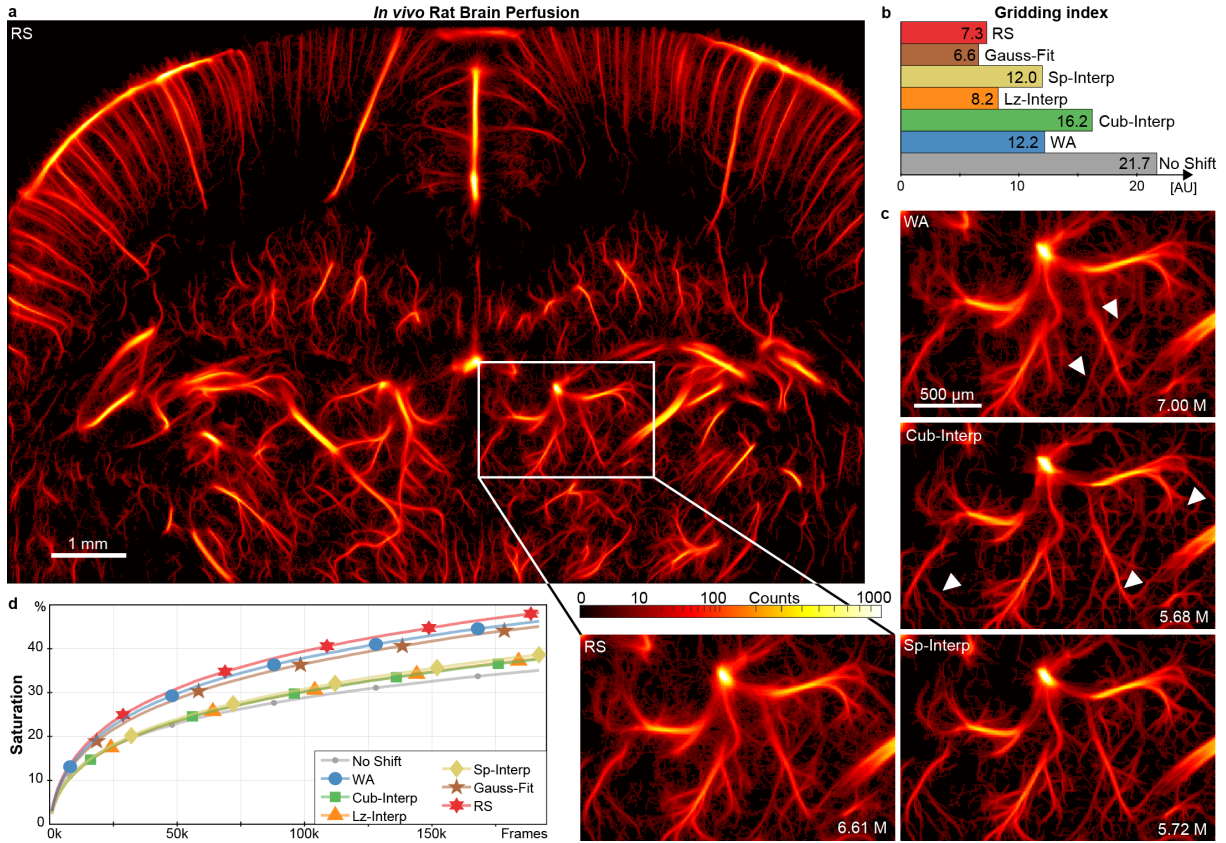


FIGURE 2.7 – 2D ULM density-based renderings of "in vivo rat brain perfusion", with gridding index and saturation. The different renderings are obtained by giving each pixel in the image a value that is the number of trajectories passing through that coordinate. **a**, Rat brain rendering using radial localisation algorithm. Composite rendering of 192 000 frames. **b**, Gridding index calculated on the dataset "in vivo rat brain perfusion" for every algorithm. **c**, Zoomed in portions of rat brain ULM using cubic interpolation, weighted average, spline interpolation, and radial symmetry-based localisations. **d**, Saturation coefficient calculated for each algorithm. For more detailed renderings, see Supplementary Figures 4-2 to 4-3

The results obtained on the three other *in vivo* datasets are presented in [fig. 2.8] (see also Supplementary Figures 4-5 to 4-7). The patterns described in the previous dataset still hold. In the *in vivo* rat brain bolus, the superiority of the GF and RS algorithms is confirmed, the overall score obtained by the RS is even higher than its score on the rat brain perfusion dataset. This superiority and the GF algorithms' high-quality imaging is best illustrated with the tumor where few vessels are present and are characterized by a disorganized structure. The GF and RS algorithm depict evidently more vessels than the other schemes. The gridding effect is clearly seen in the WA and Cub-Interp localisation schemes. As for the Sp-Interp, its imaging quality is quite high for example in the kidney, it is almost identical to the GF algorithm, but in the tumor dataset, we can see clear evidence that it localizes fewer vessels than GF and RS. The partial score (obtained from time, gridding, and saturation) difference between rat brain and tumor for the RS is 23% while for the Weighted Average it is considerably less at 15%. This difference for the interpolation-based schemes is interestingly constant at 22%. For the no-shift, the ratio is 19%.



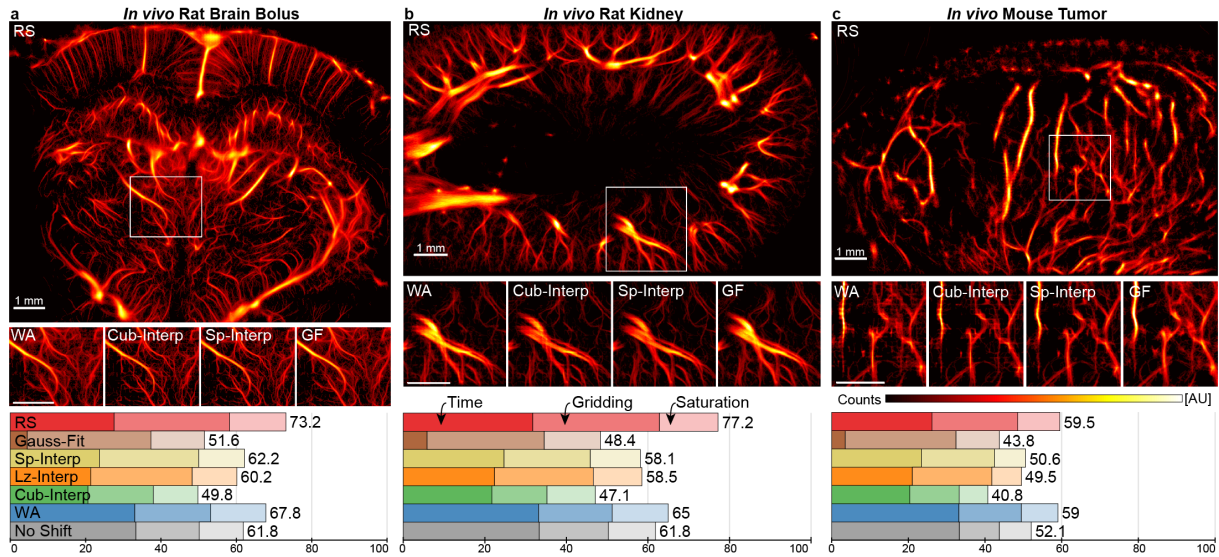


FIGURE 2.8 – **2D ULM density-based renderings of 3 other *in vivo* datasets, with partial scores.** Density renderings obtained with radial symmetry are presented for 3 other *in vivo* datasets from the rat brain, rat kidney, and mouse tumor. Below each image is presented a cropped area (in white) of the same respective datasets obtained with Weighted Average, **Cub-Interp**, **Sp-Interp**, and Gaussian fitting renderings. Three dataset-specific metrics are presented on each of these datasets for all localisation algorithms, computation time, gridding index, and saturation index. **a**, *In vivo* rat brain imaging obtained by injecting microbubbles with bolus in the tail vein. The imaging plane acquired is different from the previous dataset presented. Noise is present on the far left corner of this dataset due to the remaining bone presence. Composite rendering of 170 000 frames. **b**, *In vivo* rat kidney imaging obtained after isolating the kidney outside of the abdomen. Motion has been corrected for. The vascular structure is clearly recognisable with the two main arteries and veins on the left of the image. Composite rendering of 188 000 frames. **c**, *In vivo* mouse tumor imaging obtained on a subcutaneous back tumor. The vascular structure here is clearly disorganized and not as sharp as in the kidney and brain images. Composite rendering of 30 000 frames. All scale bars, 1 mm.

2.4 Discussion

The ULM workflow evaluated here includes every step after data acquisition/generation to final rendering, along with the calculations of the various proposed metrics for ULM quality. The localisation step alone was benchmarked as it is the most variable aspect of ULM algorithms used by different teams. However, filtering, ultrasound acquisition parameters, contrast agent types, and tracking algorithms should also be studied. Partial studies have been made about filtering [37,38], contrast agent types [39,40]; ultrasound acquisition parameters [22] as well as tracking algorithms [38] but it is hard to draw general conclusions for the techniques as these papers do not use the same datasets. We hope that with the datasets provided in this paper, comparison and accurate characterisation of all the steps will be feasible. Devising metrics to compare and rate specific aspects of localisation is a crucial step in providing a better understanding of super-resolution imaging. Visual scoring by radiologists, neurologists, or physiologists will be required to establish quality grading for each application. However, ULM will first need to gain better uniformity through quantitative and objective metrics assessments.



Thanks to the different datasets generated, we can quantify the influence of PSF inhomogeneity, size, complexity, the position of the shape to recover, and behavior *in vivo* of the localisation schemes. The *in vivo* datasets are particularly important as they validate the different approaches in a pre-clinical setting. Specifically, they focus on brain, kidney, subcutaneous tumors which have very different vascular organisations and exhibit different experimental characteristics. For example, the tumor and kidney images will be subjected to more significant breathing motion, the tumor will also be fed by disorganized and low perfused vessels. The metrics were chosen to be as universal as possible and should work in any workflow, especially the ground truth-based metrics. The availability of the *in vivo* datasets should be seen as an incentive to both enhancing existing localisation algorithms and comparing the imaging quality of new *in vivo* applications. These *in vivo* datasets can also be used to try new approaches without going through the many stumbling points strewn along with preclinical experimentation.

We think the metrics presented here could be used whenever a new processing step or technology for ULM is implemented. Firstly, the improvement in localisation following the integration of this innovation should be characterized by using the "*in silico*" PSF and "*in silico* Flow" datasets. Rather than relying on the full width at half maximum of vessels, these metrics are based on the ground truth and thus are more accurate in quantifying localisation improvements. Secondly, the increase in the number of localisations should be quantified by using the statistical indices (True Positive, False Negative, and Positive), and the impact of that increase be measured with the Separation Index thanks to the codes available on the platform. Finally, we recommend that the impact of any innovation in ultrasound super-resolution is benchmarked on *in vivo* data as this technique's main application is pre-clinical and clinical imaging of the microvasculature. In order to include this, the *in vivo* datasets given here should be used as databases and the metrics Number of detections, Saturation, Gridding Index, and Processing Times should be computed and discussed in the report. The combination of these scores in a global score (identical to the PALA global score or with different weights to reflect other scenarii) is made easy by the dynamic table on the platform and will allow the community to evaluate the innovation at a quick glance.

An interesting aspect brought by the distribution errors point of view is the peaks present in the cubic, Lanczos, and spline interpolation schemes for the axial error. They are periodic with a frequency corresponding to the $\lambda/10$ interpolation grid. This would lead to a clear pattern on the final images.

On image quality metrics, we notice that the grid effect is especially present for interpolation-based localisation algorithms. It is very similar to quantisation in its form and as the no-shift method confirms, it is due to errors in the localisation. This means that in interpolation schemes, gridding comes from a reprojection of the localized center towards the center of the original pixel grid. It can be linked to low SNR in certain regions following this line of thought : if SNR is low, the full width at half maximum of the intensity increases so much that covered by the clutter noise, not enough information is present in the profiles to perform an accurate interpolation or localisation. When confronted with low SNR images, the algorithms tend to calculate the super-resolved center very close to the original center because it lacks sufficient signal, and thus



all positions align along one line, tracing that gridding pattern. This is confirmed by looking at where gridding happens in **Lz-Interp** and **Sp-Interp** schemes *in silico* or *in vivo*. In the large vessels, the number of events is sufficient to compensate for that effect, but for smaller vessels, the density of microbubbles is too low. This can be seen in the tumor images.

As such, attention should be paid to the reconstruction grid used for rendering. Decreasing the pixel size too much would increase the grid effect and the interpolation kernels, making the calculations more time-consuming. *In vivo*, the interpolation factor depends on the maximum theoretical resolution attainable, and as such, we advise that the super-resolved image pixel size and the maximum theoretical resolution be matched. One can note that even though localisation is performed poorly in the no-shift scheme, the rendering still appears believable and that should be kept in mind when evaluating the quality of ULM. Additionally, as was seen in the no-shift localisation scheme, if the reconstruction grid is too fine but the tracking algorithm contains an interpolation of tracks or smoothing, the grid effect may disappear and some artifacts may appear. These artifacts will lead to erroneous velocity estimations which can be measured and characterized by looking at the Poiseuille distributed profiles for these small vessels. Another difference to be noted is the lower gridding index calculated for **WA** compared to **Sp-Interp** although in [fig. 2.7b] the gridding effect is clearly higher. With 7,00 M events localized in the *in vivo* rat brain perfusion dataset, **WA** is the algorithm that localizes the most events (1,3 M more than **Sp-Interp**). The lower precision and higher **RMSE** compared to the **Sp-Interp** means that the final rendering contains a lot more erroneous localisations thus decreasing the principal peaks' amplitude in the frequency analysis devised for the gridding index.

In vivo, interpolation-based localisations seem to have a very sharp delineation of the vessels whereas **RS/Gauss-Fit** have many small trajectories going in and out of the most intense vessels. This makes the image obtained by the spline interpolation localisation look better than that obtained with the radial symmetry-based localisation. The latter looks like it has more noise than its interpolation-based counterpart. However, the *in silico* metrics tell us that the **RS** localisation is more sensitive and precise, meaning that it localizes microbubbles more correctly. It is confirmed by looking at the total number of particles localized [fig. 2.4], where the increase in the number of microbubbles localized in the radial symmetry-based algorithm is 21 %, and by the saturation, 4 % higher than the second algorithm. We hypothesize that the small trajectories in between vessels are also small vessels that can represent the capillary bed. When looking at how the kidney and tumor images are depicted by the different algorithms, we note the absence of cross trajectories. The duration of ultrasound imaging in these organs does not allow to represent the capillary bed clearly as the recovery of small vessels needs longer acquisition times. If the cross trajectories were due to noise, however, we would see them regardless of recording duration. A possible way to verify this *in vivo* would be to have access to the ground truth for example by observing fluorescently labeled microbubbles with ULM and optical imaging. A recently published study has indeed used such microbubbles [41]. Although coming in second after the Gaussian fitting algorithm in precision, and Jaccard index, the radial symmetry remains a good candidate for analysis of the capillary bed. Globally if time and low **RMSE** are more critical than an accurate classification of microbubbles, then the radial symmetry should be favored.



The time factor, measured for the fastest algorithm, is critical to the fast testing of many different parameters. If the algorithm of localisation runs for hours before being able to deliver a full image, changing parameters and waiting for the result will take days. This becomes critical in 3D as the third dimension makes everything considerably more complex. In our team, we have chosen to give priority to speedy calculations. That meant that in 2D, it only takes us 3 minutes to perform full ULM on 192 000 images which is less than the total acquisition time (4 minutes). Our computer is largely above average in terms of performance (Intel Core i9 @ 2,9 GHz 12 cores, NVidia RTX 2080Ti, 128 GB RAM @ 2133MHz) but the ratio of speed improvement would be similar for any machine. This implementation appears much faster than many other algorithms. It improves the applicability of ULM, by allowing a simultaneous acquisition and reconstruction. In a clinical setting, that also means that the practitioner does not have to wait for its result and can either make another image in a matter of minutes or deliver his diagnosis.

The PALA global score we have devised and presented here aims at compiling all of these different metrics to aid algorithm selection. Our own defined global score was aimed at favoring fast and low error algorithms. However, one might want to favor calculation time above all other metrics for real-time applications or 3D. To do this we provide a dynamic table in supplementary (PALA_GlobalScores_DynamicTable.xlsx) (see Supplementary figures 5-2 to 5-4) where 6 different scenarios were designed to reflect experimental requirements : Non-weighted, 3D ULM, 2D scanning, Real-time, Low SNR, and our own defined global score. An additional line called New Entry allows the reader to set its own set of weights.

Several limitations remain in this study. For instance, the localisation is performed on microbubbles imaged at a high-frequency (15 MHz), limiting the effects linked to the resonant oscillations of microbubbles [17]. While that allows all of the results on the errors to be readily transposable to other frequencies, this is only applicable if linear imaging is used. Also as we have no access to ground truth *in vivo* at these depths in living animals, the structure of the capillary can only be hypothesized. We have not included the impact of beamforming techniques aimed at enhancing the PSF and CNR, as well as the different tracking algorithms available for ULM. However, thanks to the versatility of our framework, these can be easily included and benchmarked ad hoc. This versatility can be put to use to develop new metrics. One very valuable metric would be an index to benchmark the quality of ULM algorithms in between organs and in between datasets coming from different groups. Comparing organs that have a very different vascular organisation, such as the kidney or the brain, remains a challenge. In 2D, the possibility to have an atlas of the vasculature of the rat's brain could be explored but will probably run into out-of-plane related issues (motion, size of the plane at focus, interrupted tracks, reprojection of vessels).

The noise simulated in the *in silico* dataset is a simple model aimed at imitating clutter noise. Added to the beamformed images, it does not take into account jitter, false peak errors in the radiofrequency data, readout noise from the electronics, nor does it represent potential motion. As the *in vivo* data we have presented have been filtered with a spatiotemporal clutter filter, our aim, by choosing this simplistic approach, was to reproduce SNR values and aspects seen in the *in vivo* cases. However, thanks to the versatility of our platform, any noise model



could be added to the *in silico* dataset easily.

We hope that these algorithms, datasets, and metrics will improve the comparisons and discussions among the growing ULM community and allow more users with less ultrasonic expertise to exploit these new methods. Besides potentially becoming a valuable clinical imaging modality, ULM opens a new window to observe the microcirculation in-depth and complements other laboratory imaging methods that lack either resolution or penetration.

2.5 Outlook

We have developed a platform to analyze and measure the performance of the most used localisation schemes in Ultrasound Localisation Microscopy. This led us to integrate these in an open-source algorithm, which is available in the supplementary information, to facilitate the dissemination of the technique for research groups around the world. Furthermore, we provide the data and scripts needed to benchmark future techniques or other aspects of the ULM process. Also, these algorithms can be readily used on emerging contrast agents such as acoustically activated nanodroplets, biogenic gas vesicles, or novel imaging applications such as 4D ultrasound or non-linear imaging. This open framework could benefit from further development such as non-linear behavior simulation or tracking improvement. Finally, we have presented two novel algorithms, one of which obtains the highest score according to the criteria proposed here. With the advent of new artificial intelligence-based super-resolution methods, the metrics devised will help to compare and characterize such methods. We see great potential in the collective use of these resources to improve our knowledge of ULM, increase its quality, and provide better and faster imaging for 3D developments.

Reporting summary.

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The main data supporting the results in this study are available within the paper and its Supplementary Information. All data generated in this study, including source data and the data used to make the figures, are available from zenodo with the identifier <https://doi.org/10.5281/zenodo.4343435>

Code availability

All the codes used for data acquisition and for data analysis referenced in this resource are available on a GitHub repository, along with potential updates and can be downloaded at <https://github.com/AChavignon/PALA>.



2.6 References

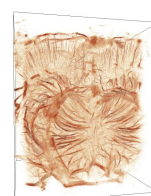
- [1] Tanter, M. & Fink, M. Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 61, 102–119 (2014).
- [2] Macé, E. et al. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat. Methods* 8, 662–664 (2011).
- [3] Macé, E. et al. High sensitivity brain angiography using ultrafast Doppler. in (2010). doi :10.1109/ultsym.2010.5935810.
- [4] Demene, C. et al. Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity. *IEEE Trans. Med. Imaging* 34, 2271–2285 (2015).
- [5] Frinking, P., Segers, T., Luan, Y. & Tranquart, F. Three Decades of Ultrasound Contrast Agents : A Review of the Past, Present and Future Improvements. *Ultrasound Med. Biol.* 46, 892–908 (2020).
- [6] Couture, O., Besson, B., Montaldo, G., Fink, M. & Tanter, M. Microbubble ultrasound super-localisation imaging (MUSLI). in 1285–1287 (IEEE, 2011). doi :10.1109/ULTSYM.2011.6293576.
- [7] Olivier Couture, Mickael Tanter & Mathias Fink. Patent 889 Cooperation Treaty (PCT) /FR2011/052810.
- [8] Couture, O., Hingot, V., Heiles, B., Muleki-Seya, P. & Tanter, M. Ultrasound Localisation Microscopy and Super-Resolution : A State of the Art. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 65, 1304–1320 (2018).
- [9] Errico, C. et al. Ultrafast ultrasound localisation microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature* 527, 499–502 (2015).
- [10] Christensen-Jeffries, K., Browning, R. J., Tang, M.-X., Dunsby, C. & Eckersley, R. J. In Vivo Acoustic Super-Resolution and Super-Resolved Velocity Mapping Using Microbubbles. *IEEE Trans. Med. Imaging* 34, 433–440 (2015).
- [11] Heiles, B. Ultrafast Volumetric Ultrasound Localisation Microscopy in vivo. in (2018).
- [12] Viessmann, O. M., Eckersley, R. J., Christensen-Jeffries, K., Tang, M. X. & Dunsby, C. Acoustic super-resolution with ultrasound and microbubbles. *Phys. Med. Biol.* 58, 6447–6458 (2013).
- [13] Lin, F. et al. 3-D Ultrasound Localisation Microscopy for Identifying Microvascular Morphology Features of Tumor Angiogenesis at a Resolution Beyond the Diffraction Limit of Conventional Ultrasound. *Theranostics* 7, 196–204 (2017).
- [14] O’Reilly, M. A. & Hynynen, K. A super-resolution ultrasound method for brain vascular mapping : Super-resolution ultrasound method for brain vascular mapping. *Med. Phys.* 40, 110701 (2013).
- [15] Song, P. et al. Improved Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging With Spatiotemporal Nonlocal Means Filtering and Bipartite Graph-Based Microbubble Tracking. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 65, 149–167 (2018).
- [16] Brown, J. et al. Investigation of Microbubble Detection Methods for Super-Resolution Imaging of Microvasculature. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 66, 676–691 (2019).
- [17] Christensen-Jeffries, K. et al. Microbubble Axial Localisation Errors in Ultrasound Super-Resolution Imaging. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 64, 1644–1654 (2017).
- [18] Kanoulas, E. et al. Super-Resolution Contrast-Enhanced Ultrasound Methodology for the Identification of In Vivo Vascular Dynamics in 2D : *Invest. Radiol.* 54, 500–516 (2019).
- [19] Ackermann, D. & Schmitz, G. Detection and Tracking of Multiple Microbubbles in Ultrasound B-Mode Images. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 63, 72–82 (2016).
- [20] Luke, G. P., Hannah, A. S. & Emelianov, S. Y. Super-Resolution Ultrasound Imaging in Vivo with Transient Laser-Activated Nanodroplets. *Nano Lett.* 16, 2556–2559 (2016).
- [21] O’Reilly, M. A. & Hynynen, K. A super-resolution ultrasound method for brain vascular mapping : Super-resolution ultrasound method for brain vascular mapping. *Med. Phys.* 40, 110701 (2013).
- [22] Song, P., Manduca, A., Trzasko, J. D., Daigle, R. E. & Chen, S. On the Effects of Spatial Sampling Quantisation in Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 65, 2264–2276 (2018).
- [23] Hansen, K. B. et al. Robust microbubble tracking for super resolution imaging in ultrasound. in 2016 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS) 1–4 (IEEE, 2016). doi :10.1109/ULTSYM.2016.7728793. [24] Heiles, B. et al. Ultrafast 3D Ultrasound Localisation Microscopy using a 32x32 Matrix Array. *IEEE Trans. Med. Imaging* 13 (2019).
- [25] Soulioti, D. E., Espíndola, D., Dayton, P. A. & Pinton, G. Super resolution imaging through the human skull. *ArXiv181110653 Cond-Mat Physicsphysics* (2018).
- [26] Viessmann, O. M., Eckersley, R. J., Christensen-Jeffries, K., Tang, M. X. & Dunsby, C. Acoustic super-resolution with ultrasound and microbubbles. *Phys. Med. Biol.* 58, 6447–6458 (2013).



- [27] Zhang, G. et al. Acoustic wave sparsely activated localisation microscopy (AWSALM) : Super-resolution ultrasound imaging using acoustic activation and deactivation of nanodroplets. *Appl. Phys. Lett.* 113, 014101 (2018).
- [28] Zhu, J. et al. 3D Super-Resolution US Imaging of Rabbit Lymph Node Vasculature in Vivo by Using Microbubbles. *Radiology* 291, 642–650 (2019).
- [29] Huang, C. et al. Short Acquisition Time Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging via Microbubble Separation. *Sci. Rep.* 10, 6007 (2020).
- [30] Parthasarathy, R. Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers. *Nat. Methods* 9, 724–726 (2012).
- [31] Christensen-Jeffries, K. et al. 3-D In Vitro Acoustic Super-Resolution and Super-Resolved Velocity Mapping Using Microbubbles. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 64, 1478–1486 (2017).
- [32] Desailly, Y., Couture, O., Fink, M. & Tanter, M. Sono-activated ultrasound localisation microscopy. *Appl. Phys. Lett.* 103, 174107 (2013).
- [33] Desailly, Y., Pierre, J., Couture, O. & Tanter, M. Resolution limits of ultrafast ultrasound localisation microscopy. *Phys. Med. Biol.* 60, 8723–8740 (2015).
- [34] Song, P., Manduca, A., Trzasko, J. D., Daigle, R. E. & Chen, S. On the Effects of Spatial Sampling Quantisation in Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 65, 2264–2276 (2018).
- [35] Hingot, V. et al. Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localisation Microscopy. *Sci. Rep.* 9, (2019).
- [36] Kuhn, H. W. The Hungarian method for the assignment problem. *Nav. Res. Logist. Q.* 2, 83–97 (1955).
- [37] Heiles, B. et al. Ultrafast 3D Ultrasound Localisation Microscopy using a 32x32 Matrix Array. *Accept. IEEE Trans. Med. Imaging* 13 (2019).
- [38] Song, P. et al. Improved Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging With Spatiotemporal Nonlocal Means Filtering and Bipartite Graph-Based Microbubble Tracking. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 65, 149–167 (2018).
- [39] Luke, G. P., Hannah, A. S. & Emelianov, S. Y. Super-Resolution Ultrasound Imaging in Vivo with Transient Laser-Activated Nanodroplets. *Nano Lett.* 16, 2556–2559 (2016).
- [40] Zhang, G. et al. Acoustic wave sparsely activated localisation microscopy (AWSALM) : Super-resolution ultrasound imaging using acoustic activation and deactivation of nanodroplets. *Appl. Phys. Lett.* 113, 014101 (2018).
- [41] Lowerison, M. R., Huang, C., Lucien, F., Chen, S. & Song, P. Ultrasound localisation microscopy of renal tumor xenografts in chicken embryo is correlated to hypoxia. *Sci. Rep.* 10, 2478 (2020).
- [42] Forsberg, F., Leeman, S. & Jensen, J. A. Assessment of hybrid speckle reduction algorithms. *Phys. Med. Biol.* 36, 1539–1549 (1991).
- [43] Ledoux, L. A. F., Brands, P. J. & Hoeks, A. P. G. Reduction of the Clutter Component in Doppler Ultrasound Signals Based on Singular Value Decomposition : A Simulation Study. *Ultrason. Imaging* 19, 1–18 (1997).
- [44] Desailly, Y. et al. Contrast enhanced ultrasound by real-time spatiotemporal filtering of ultrafast images. *Phys. Med. Biol.* 62, 31–42 (2017).

Acknowledgements

The project has been funded by the European Research Council under the European Union Horizon H2020 program/ERC Consolidator grant agreement No 772786-ResolveStroke. The project was also supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the project ANR Predic and the Plan Cancer UICT. We thank the laboratories Institut Langevin and PhysMed Paris for technical support and particularly Line Rahal for helping with data acquisition. We thank Cyrille Orset (INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Caen, France) for animals' preparation and perfusion of contrast agent and the biomedical imaging platform CYCERON (UMS 3408 Unicaen/CNRS, Caen, France), particularly, Hanadi Skeif and Vincent



Beaudouin for the micro-CT of brains. We would like to thank Ruslan Hlushchuk for all his valuable advices for μ Angiofil perfusion, David Maresca for useful discussion and our collaborators Franck Lager, Gilles Renault and Alba Nicolas-Boluda for helping with the mouse tumor model and the in vivo experiments.

Author contributions

All authors conceived the project. ET and PL are the main collaborators on the kidney and tumor experiments. BH and VH laid out the general framework and algorithm for ULM with contributions from all authors. BH wrote the original codes for localisation algorithms with significant improvements brought by AC. AC wrote the simulation framework and implemented the metrics. VH, AC, ET, and PL acquired *in vivo* data. BH wrote the manuscript with input from all authors. OC has directed the work of BH, AC, and VH as thesis/postdoctoral supervisor.

Competing interests

Baptiste Heiles, Arthur Chavignon, Vincent Hingot, Pauline Lopez and Elliott Teston declare no competing financial interests. Olivier Couture is a co-inventor of an ultrasound super-resolution patent (PCT)/FR2011/052810.

Additional information

Animal experimentation All animals received humane care in compliance European Community Council Directive of 22nd September 2010 (010/63/UE) and approved by the institutional committee C2EA-59 : "Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale Paris Centre et Sud" under the protocol APAFIS #13363-2018020321116321 (rat brain), APAFIS #16874-2017122914243628 (rat kidney), the institutional committee C2EA-034 : "Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale Paris Descartes", APAFIS #25169-202008071746473 (mouse tumor), and the institutional committee C2EA-54 "Comité d'éthique Normandie en matière d'expérimentation animale" under the protocol APAFIS #22544-2019093017523797 (rat brain with micro-CT)

2.7 Methods

2.7.1 Point Spread Function dataset ("*in silico* PSF")

The Point-Spread Function (PSF) simulation is designed to study non-uniformity effects on localisation and spatial sampling effect on the beamforming process. A point-like scatterer is simulated using the Verasonics Research Ultrasound Simulator (Verasonics Inc., Kirkland Washington, USA). The position of the scatterer is moved by $\lambda/7$ increments in both directions in a $\lambda \times \lambda$ space. For each of these positions, the radiofrequency response, as well as its beamformed image, was produced using 3 tilted plane waves emitted from a 15 MHz linear probe, with 128 elements spaced by one wavelength. The speed of sound was set to 1540 m/s.



2.7.2 *In silico* angiography dataset ("*in silico* Flow")

The media simulated comprised of 11 tubes with various geometries with various complexity (see [fig. 2.6] and Supplementary table 6-2, Supplementary Figure 2-1) :

Structure	Diameters	Maximal velocities
A pseudo double helix	3λ	$v_{max} = 3\lambda/\text{frame}$
	2λ	$v_{max} = 2\lambda/\text{frame}$
A curved tube with a constant diameter and a horseshoe pattern	$0,5\lambda$	$v_{max} = 0,5\lambda/\text{frame}$
	$0,2\lambda$	$v_{max} = 0,2\lambda/\text{frame}$
3 curved tubes with 3 different diameters	$0,1\lambda$	$v_{max} = 0,1\lambda/\text{frame}$
	$0,05\lambda$	$v_{max} = 0,05\lambda/\text{frame}$
	$0,1\lambda$	$v_{max} = 0,9\lambda/\text{frame}$
4 spreading tubes with a constant diameter	$0,1\lambda$	$v_{max} = 0,9\lambda/\text{frame}$
A watermark comprised of the word ULM that does not serve other purposes but identification	$0,1\lambda$	$v_{max} = 0,4\lambda/\text{frame}$

To simulate moving microbubbles, we chose initial random positions in the tubes and recorded them as point-like scatterers. For each of these positions, a trajectory calculated by Poiseuille's law was assigned based on their position in the cross-section of the tube. We considered that microbubbles could not jump from one trajectory to another and so had to follow the same trajectory for as long as it is simulated. Using the Verasonics Research Ultrasound Simulator, we simulated radiofrequency and beamformed images of a moving scatterer in a $7 \times 14,9 \text{ mm}^2$ area insonified with 3 tilted plane waves with a 15 MHz linear probe, with 128 elements spaced by one wavelength. The simulation sequence was based on the Vantage example script (Vantage release 4.0.0) FlashAngles and adapted to save either radiofrequency data and beamformed images with $\lambda \times \lambda$ pixel size. The speed of sound was set to 1540 m/s. For each image in the two *in silico* datasets, we added clutter noise modeled by a Gaussian filtered white Gaussian noise (see Supplementary Figure 4-2). The parameters for the white Gaussian Noise were matched with a typical 30 dB noise present in our *in vivo* images : we used *wgn* MATLAB (The MathWorks, Inc., Natick Massachusetts, USA) function to generate a 0,2 ohm impedance noise, with a ± 10 dB amplitude. The resulting noise was then filtered using a 2D Gaussian kernel of size 0,7 pixel. Finally, the noise was added to the beamformed image by choosing an amplitude in dB between the maximum intensity value of the beamformed image and the average intensity of the generated noise. This process results in noised images, with a user-selected SNR, and a pseudo clutter with 20 dB of amplitude.

2.7.3 *In vivo* dataset ("*in vivo* rat brain perfusion" and "*in vivo* rat brain bolus")

All animals received humane care in compliance European Community Council Directive of 22nd September 2010 (010/63/UE) and approved by the institutional committee C2EA-59 : "Comité d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale Paris Centre et Sud" under the protocol 2015-23. 8-10 weeks Sprague-Dawley rats were obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-



Isle, France). The animals were kept for at least a week before surgery. Water and a commercial pelleted diet SAFE A04-10 (Augy, France) were available ad libitum. SAFE FLAKE sawdust was used as bedding, enrichment such as pieces of cardboard, paper tunnels were provided. After 5 minutes in the induction cage filled with a mix of air and 5 % of Isoflurane, the animal was placed on the back on a heated plate with a respiratory mask. The mix was replaced with O_2 mixed with 4 % of Isoflurane. The depth of the anesthesia was tested by the absence of withdrawal reflex when pinching the toes of the hind limb. A jugular vein catheter was then placed and craniotomy surgery was used to remove the skull on a window in between the Lambda and Bregma planes and 14 mm wide. 400 μ l of Sonovue microbubbles (Bracco Imaging®, Milan, Italy) were injected at a steady rate of 80 μ l/min to keep a stable concentration in the bloodstream or with boli in the second dataset. A continuous ultrasound acquisition comprised of 240 blocs (or 213 blocs for bolus dataset) of 800 frames taken at a compounded frame rate of 1000 Hz with 3 tilted plane waves $[-3;0;3]^\circ$ or $[-5;0;5]^\circ$ for bolus dataset) using a 15 MHz centered frequency probe manufactured by Vermon®, Tours, France with a 0,1 mm pitch. Acquisitions lasted 4 min for the perfusion dataset, and 3 min 30 sec for the bolus dataset. Elevation focusing is provided through a plastic lens to reach 500 μ m at 8 mm. The radiofrequency data were beamformed on the ultrasound machine's GPU (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) and transferred to an external hard drive for later processing. The microbubbles' SNR was measured on a filtered image as the intensity ratio between the 10 brightest microbubbles and the average image intensity.

2.7.4 *In vivo* dataset ("*in vivo* rat kidney")

All animals received humane care in compliance European Community Council Directive of 22nd September 2010 (010/63/UE) and approved by the institutional committee C2EA-59 : "Comité d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale Paris Centre et Sud" under the protocol APAFIS #16874-2017122914243628. The same housing protocol and strain of rat were used as the animals used for the brain experiments. The kidney was exposed through a lumbotomy incision and placed on an acoustically absorbing material to facilitate imaging. A heat lamp was used to prevent hypothermia of the animal. Ultrasound gel was applied on top of the imaging area to provide coupling, Sonovue microbubbles (Bracco Imaging®, Milan, Italy) were injected in boli via a jugular vein catheter. A continuous ultrasound acquisition comprised of 240 blocs of 800 frames taken at a compounded frame rate of 1000 Hz with 5 tilted plane waves $[-10; -5; 0; 5; 10]^\circ$ using a 15 MHz centered frequency probe manufactured by Vermon, Tours, France with a 0,1 mm pitch. The acquisition lasted 4 minutes. Elevation focusing is provided through a plastic lens to reach 500 μ m at 8 mm.

2.7.5 *In vivo* dataset ("*in vivo* mouse tumor")

All animals received humane care in compliance European Community Council Directive of 22nd September 2010 (010/63/UE) and approved by the institutional committee C2EA-34 : "Comité d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale Paris Descartes" under the protocol

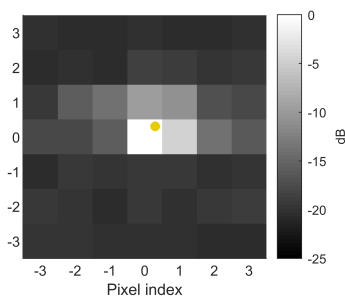


APAFIS #25169-202008071746473. For this study, MMTV-PyMT transgenic mice were backcrossed with FvB/NCrl mice (Charles River Laboratories, Wilmington Massachusetts, USA). A transplanted model of the MMTV-PyMT was used for this study. Tumor implantation was performed using primary tumors developed in donor mice. Donor mice with primary tumors of $\sim 10\text{--}15\text{ mm}$ were killed and tumors were pooled, dissociated, and then re-injected orthotopically in receiver mice. Tumors were dissociated mechanically and incubated for 30 minutes at 37°C with DNase I ($100\ \mu\text{g}/\text{ml}$, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), collagenase ($1\ \text{mg}/\text{ml}$, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and hyaluronidase ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA) in RPMI with 2% serum. After red blood cell lysis and filtration on a $70\ \mu\text{m}$ sieve, the cell suspension was rinsed 3 times in PBS and used for tumor transplantation. Thus, 106 cells isolated from tumors of MMTV-PyMT mice were injected in $100\ \mu\text{l}$ of PBS in the mammary fat pad of 8 weeks-old FvB mice. About 10 days after inoculation, transplanted PyMT tumors reached a diameter of $\sim 6\text{ mm}$. A continuous ultrasound acquisition comprised of 150 blocs of 200 frames taken at a compounded frame rate of 500 Hz with 5 tilted plane waves $[-10;-5;0;5;10]^\circ$ using a 15 MHz centered frequency probe manufactured by Vermon, Tours, France with a $0,1\text{ mm}$ pitch. The acquisition lasted 2 min 30 sec. Elevation focusing is provided through a plastic lens to reach $500\ \mu\text{m}$ at 8 mm .

2.7.6 ULM workflow and detection

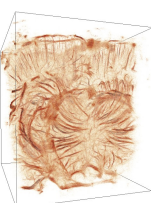
ULM is a multi-step method. The general layout is presented in [fig. 2.2] and Supplementary Figure 4-8. Firstly, one needs to acquire a large number of frames in the region of imaging. Then, a detection process takes place to enhance the signal of microbubbles. Close microbubbles are isolated. *In silico*, such a step is dispensed with as the signal-to-noise ratio is set high enough in the simulation. For the *in vivo* dataset, we use the Singular Value Decomposition approach [4,42,43]. By rearranging a continuous set of beamformed images as a Casorati matrix ($N_z \times N_x, N_t$), we will use the new basis given by the SVD to filter the tissue from the microbubbles according to its spatiotemporal decorrelation [44]. We remove the four highest energy vectors out of a basis of 800.

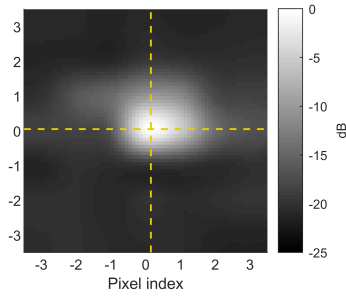
2.7.7 Localization algorithms



Simulated beamformed image centered on a microbubble. The pixel size is $\lambda \times \lambda$. The real position of the simulated scatterer is $20,3\lambda$ the lateral position, and $61,3\lambda$ the axial position and is represented by the yellow solid dot. To apply the localisation kernel, the full image is cropped and centered on the pixel with the highest intensity. The localisation kernel returns the position shift of the estimated. The No-shift algorithm will always return a null shift.

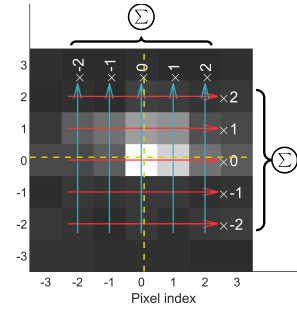
The image is rendered with a log compression.





Interpolation based algorithm

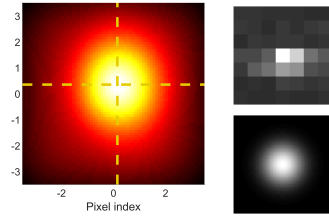
Simulated beamformed image centered on a microbubble with interpolation to illustrate interpolation-based algorithms. Each pixel is divided into 10×10 subpixels. Different localisation methods can be used : cubic, Lanczos, spline.



Weighted average algorithm

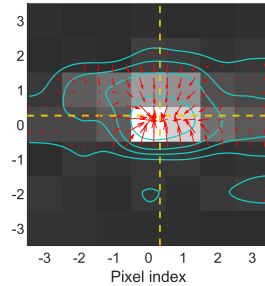
Simulated beamformed image centered on a microbubble. Arrows illustrate the process of weighted average algorithm. For the axial shift, the image intensity (without log compression) is summed over the 5 lateral pixels, and weighted with $[-2; -1; 0; 1; 2]$ coefficients and divided by the total intensity.

$$z_{shift} = \frac{\sum_{i=-2}^2 \sum_{j=-2}^2 I(i, j) \cdot j}{\sum_{i=-2}^2 \sum_{j=-2}^2 I(i, j)}$$



Gaussian fitting algorithm

The top right-hand image is the input image of a centered microbubble with a log compression. The bottom right-hand image shows the Gaussian function used for the fitting.



Radial symmetry algorithm

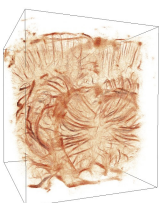
Simulated beamformed image centered on a microbubble with equipotential lines plotted in blue. The red arrows show the direction and amplitude of the gradient and point on the microbubble position.

2.7.8 Tracking algorithm

After microbubbles' positions are measured and stored, a tracking algorithm was implemented based on the Hungarian method or Kuhn-Munkres algorithm for assignment. For each particle, the squared distance to all of the particles in the subsequent frame is computed. We obtain a vector containing $N_{particles}(t + dt)$, the number of particles in the frame $(t + dt)$. By applying the Kuhn-Munkres algorithm, we are able to find the optimal pairing for the subsequent frames by minimizing the total squared distance. We can calculate the velocities of each microbubble by differentiating each position in a trajectory according to the time vector.

2.7.9 Reconstruction

We build the final image by accumulating all the super-resolved positions of the microbubbles through time in a user defined pixel grid in a Maximum Intensity Projection fashion. The pixel



intensity represents the number of tracks passing through this pixel (see Supplementary Figure 4-9).

2.7.10 *In silico* metrics

Thanks to the simulation tool, we have access to the ground truth and can devise numerical and several statistical metrics based on classification :

- the error of localisation in two directions Z, X and calculate the average root mean square error (RMSE). $(z^0; x^0)$ represent the absolute position of the scatterer, and $(z; x)$ the position measured by algorithms.

$$\delta_z(i) = z_i^0 - z_i \qquad \delta_x(i) = x_i^0 - x_i$$

$$RMSE = \frac{1}{N} \sum_i^n \sqrt{(x_i - x_i^0)^2 + (z_i - z_i^0)^2}$$

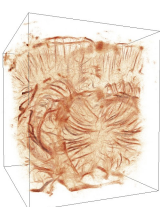
- True-positives (TP) : a microbubble was simulated and a microbubble was localized in a $\lambda/4$ excluding neighborhood
- False-positive (FP) : a microbubble was localized but no microbubble was simulated in the neighborhood
- False-negative (FN) : no microbubble was localized within a distance $\lambda/4$ of the simulated microbubbles
- the Jaccard index as : $JAC = TP / (FN + TP + FP)$
- positive predictive value (precision) p and recall (sensitivity) : $p = TP / (FP + TP)$, and $r = TP / (FN + TP)$
- separation index : minimal distance between inside borders of simulated canals, maximum resolution criteria

2.7.11 *In vivo* metrics

A visual analysis of the *in vivo* ULM rendering is done for each of the algorithms following several criteria : the number of localisations, likeliness of the trajectories, histogram of trajectory lengths, and visual aspects such as aliasing and branching vessels. The saturation curve represents the fraction of non-zero pixels in the image. The power spectral density of the spectral content in the (Z, X) directions of the intensity was calculated as :

$$F_z = FFT \left(\sum_x I(z, x) \right) \qquad F_x = FFT \left(\sum_z I(z, x) \right)$$

The peak to the baseline value of the two first peaks of the power spectral density are summed in a logarithmic scale to quantify the amount of aliasing present in the image. For more details see Supplementary Figure 3-16. Finally, the computation time was evaluated for each algorithm



in the *in vivo* case and compared to the fastest algorithm. All 11 metrics can be summarized in a table (see Supplementary table 6-3).

Number	Measurement	Dataset		
		<i>In silico</i> PSF	<i>In silico</i> Flow	<i>In vivo</i>
1	Lateral error	X	X	
2	Axial error	X	X	
3	RMSE	X	X	
4	True Positive		X	
5	False Negative		X	
6	False Positive		X	
7	Gap		X	
8	Number of detections			X
9	Saturation			X
10	Gridding Index			X
11	Processing time			X

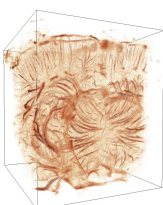
2.7.12 Conversion metrics to scores

Before building the global score, metrics are normalized into a percentage value. The table Supplementary table 6-4 explains the conversion from metrics results to scores. The global score is a weighted average of these individual scores.

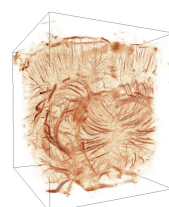
Metric	Unit	Conversion	Score Range
RMSE	Wavelengths	$Score(x_i) = 100 \cdot (1 - \frac{x_i}{0,5\lambda})$	$0\lambda : 100/100$ $0,5\lambda : 0/100$
Processing Time	Seconds	$Score(x_i) = 100 \cdot (1 - 0,5 \log_{10} (\frac{x_i}{min(x)}))$	$min(x) : 100/100$ $100 \cdot min(x) : 100/100$
Separation Index	Wavelengths	$Score(x_i) = 100 \cdot (1 - \frac{x_i}{1\lambda})$	$0\lambda : 100/100$ $1\lambda : 0/100$
Gridding Index	dB	$Score(x_i) = 100 \cdot (1 - \frac{x_i}{30})$	$0 \text{ dB} : 100/100$ $30 \text{ dB} : 0/100$
Jaccard	%	$Score(x_i) = x_i$	$100 \% : 100/100$ $0 \% : 0/100$
Precision	%	$Score(x_i) = x_i$	$100 \% : 100/100$ $0 \% : 0/100$
Saturation	[%]	$Score(x_i) = x_i$	$100 \% : 100/100$ $0 \% : 0/100$

2.7.13 Micro angiography Computed Tomography (microangio-CT) with μ Angiofil

The animal was heparinized and carotid arteries were cannulated. The brain was perfused with saline (NaCl) at the animal's temperature to wash out the blood. Then the μ Angiofil (Fumedica AG, Switzerland) was perfused until the brain, tongue, and eyes became blue. After polymerisation of the μ Angiofil (at least 30 minutes), the head was removed and fixed with paraformaldehyde (PFA). Later, the brain was carefully extracted from the skull. The brain was



scanned with a pre-clinical micro-CT Siemens Inveon PET-CT (Siemens, Germany) with a voxel size of 37 μm .



3 Annexes

3.1 Imagerie multimodale de la microvascularisation du cerveau : ultrasons et microtomographie aux rayons X

3.1.1 Problématique

La plupart des techniques d'imagerie *in vivo* ne permettent pas d'imager la microvascularisation en profondeur avec une résolution et une sensibilité suffisantes pour les artérioles et veinules [fig. 1.14]. L'imagerie *ex vivo* par microtomographie aux rayons X [2.3.4] utilise un agent de contraste radio-opaque pour améliorer la sensibilité et le contraste, en utilisant des scanners dédiés haute résolution et des très temps d'acquisitions étendus (plusieurs heures).

La littérature actuelle ne présente pas de validation des capacités de l'ULM sur des organes complexes. Pour confronter l'imagerie ULM avec une autre technique de référence, le cerveau de rat a d'abord été imagé par ultrasons avec retrait de l'os pariétal, puis perfusé avec un agent de contraste radio-opaque. Pour avoir une imagerie de tous les vaisseaux en micro-CT, l'intégralité du réseau vasculaire doit être rempli d'agent de contraste. La difficulté de cette perfusion est d'éviter la coagulation du sang dans le cerveau, et la présence de bulles d'air qui pourraient bloquer le passage du produit opaque.

3.1.2 Protocole pour le cerveau de rat

Le protocole de perfusion est détaillé dans la publication [Hlushchuk, 2020]. La méthode a été adaptée pour le cerveau de rat avec Cyrille Orset et les conseils experts de Ruslan Hlushchuk.

Suite à l'imagerie ultrasonore, l'animal est maintenu à une température de 38 °C et une injection d'héparine est effectuée pour prévenir la coagulation en vue du remplacement de tout le sang du cerveau par l'agent de contraste.

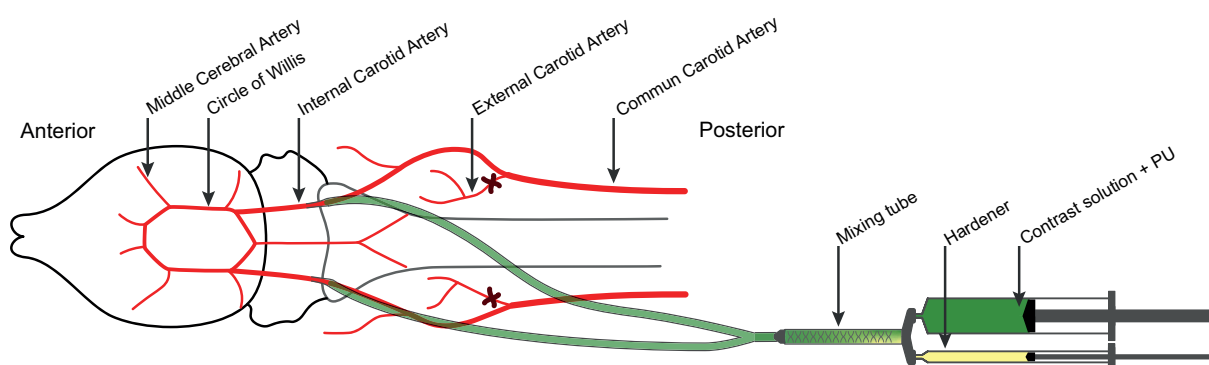
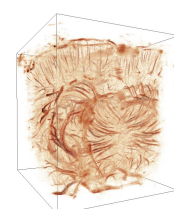


FIGURE 2.9 – Schéma de la perfusion de μ Angiofil (Fumedica) pour la microtomographie du cerveau de rat.

Deux cathéters sont nécessaires pour une perfusion optimale du cerveau, dans chaque artère carotidienne commune [fig. 2.9]. Les artères cérébrales externes sont ligaturées pour réduire le volume à perfuser et éviter les fuites. Un premier cathéter est posé pour débiter le rinçage du cerveau avec un mélange de saline et héparine à 38 °C. Au moins 20 ml sont admis par ce cathéter. En



parallèle, la deuxième artère carotide interne est canulée et le ringage se poursuit avec 40 ml dans chacune des artères. Le ringage du cerveau conduit petit à petit au décès de l'animal.

Le produit de contraste μ Angiofil (Fumedica AG, Suisse) est préparé suivant les recommandations du fournisseur. Les seringues de durcisseur et polymère sont connectées au mélangeur (*mixing tube*). Celui-ci est généreusement vidangé pour faire sortir toutes les bulles d'air. Il est ensuite raccordé aux deux cathéters pour débiter la perfusion. L'injection se fait manuellement en exerçant une pression assez importante pour contrer la viscosité du produit.

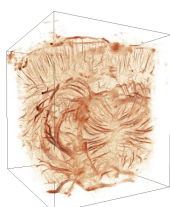
Au cours de la perfusion, la tête, la langue et les yeux deviennent bleu-vert, signe d'une bonne perfusion. Le produit doit alors ressortir par les veines. Pour un cerveau de rat âgé de 7 semaines, environ 6 ml de produit sont injectés.

L'animal est laissé à température ambiante au moins 30 minutes pour la catalyse du polymère. Le moule de vascularisation est alors dur, et le cerveau est ensuite prélevé et fixé dans du paraformaldéhyde.

Deux scanners ont été utilisés pour réaliser la microtomographie du cerveau. D'abord un micro-CT pré-clinique *in vivo* Inveon PET-CT 838 (Siemens, Allemagne), avec une taille de voxel isotrope de 37 μ m. Puis, le même cerveau a été scanné avec un micro-CT *ex vivo* Skyscan 1172 (Bruker microCT, Kontich, Belgique) avec une taille de voxel de 5 μ m et un temps total d'acquisition de 8,5 heures (80 kV, 100 μ A).

3.1.3 Résultats

Les résultats d'imagerie sont présentés dans la figure [fig. 2.10], avec l'imagerie Doppler avec agent de contraste, l'ULM, l'angio-CT (scanner *in vivo*), et le microangio-CT (scanner *ex vivo*). Les images ultrasonores résultent d'une projection en élévation de quelques millimètres d'épaisseur dans le plan devant le transducteur. L'épaisseur de cette projection en élévation n'est pas constante, il est difficile de retrouver parfaitement le même champ de vue dans les volumes 3D.



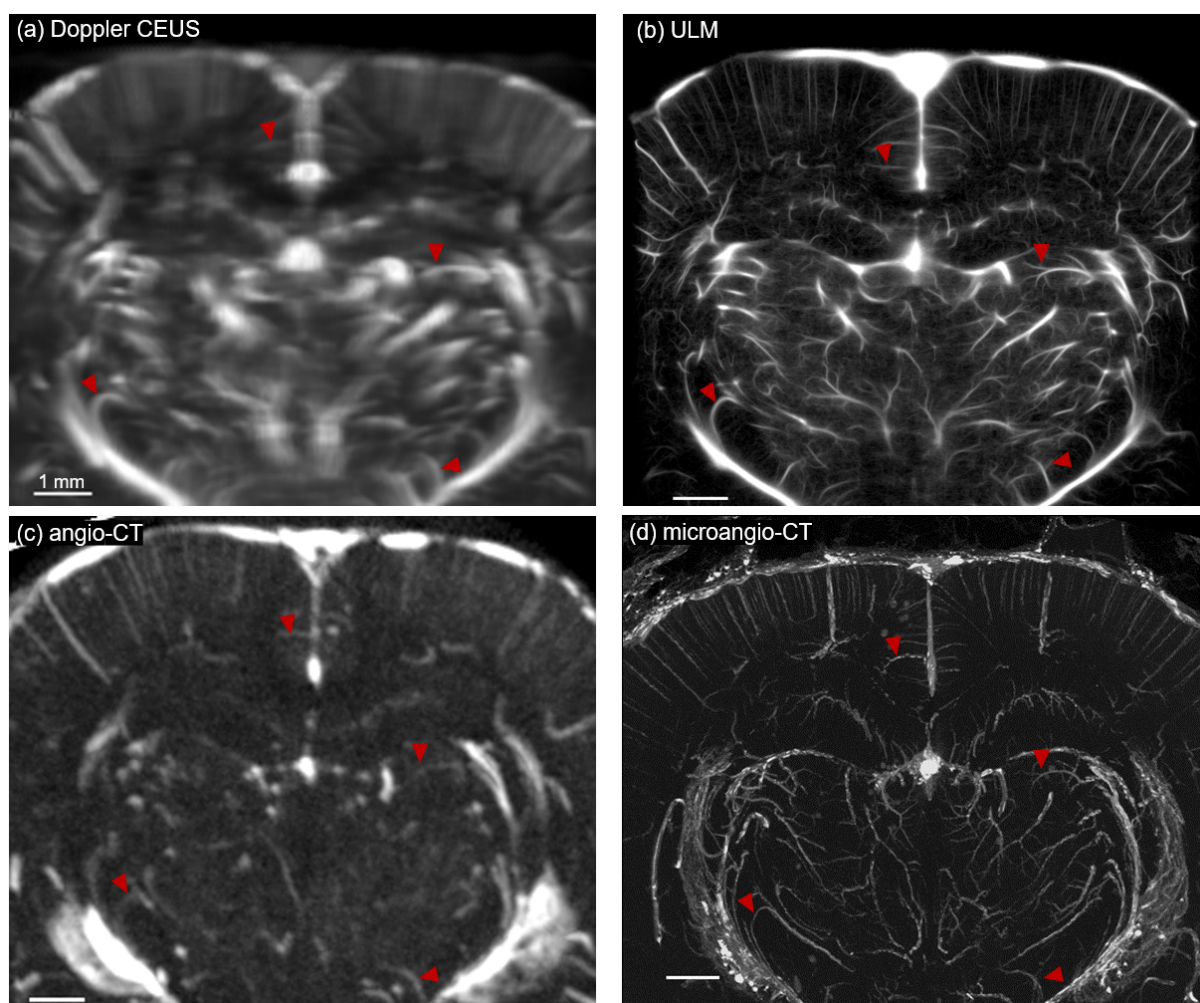
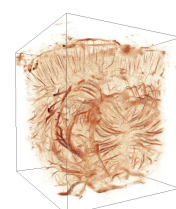


FIGURE 2.10 – Microvascularisation multimodale du cerveau de rat. Imagerie ultrasonore à 15 MHz avec craniectomie : (a) Doppler CEUS, et (b) ULM. Microtomographie aux rayons X avec perfusion d'agent de contraste μ Angiofil (Fumedica) : (c) scanner *in vivo* Inveon PET-CT 838 (Siemens), (d) scanner *ex vivo* Skyscan 1172 (Bruker microCT).

Les structures vasculaires importantes se retrouvent dans toutes les modalités d'imagerie avec des résolutions et contrastes différents. L'imagerie Doppler CEUS, limitée par la diffraction, offre une résolution proche de la longueur d'onde, mais est réalisée *in vivo* en temps réel avec une résolution temporelle très élevée (plusieurs centaines de hertz), et une bonne sensibilité aux flux vasculaires.

Toujours *in vivo*, l'ULM dépasse la limite de diffraction avec une résolution améliorée jusqu'aux petits vaisseaux. Comparée au Doppler, cette modalité nécessite une acquisition de quelques minutes sans mouvements et la perfusion d'agent de contraste.

Les imageries par tomographie aux rayons X sont beaucoup plus compliquées à mettre en place, nécessitant la perfusion d'un agent radio-opaque et le sacrifice de l'animal, et donc la perte de l'information hémodynamique. La microvascularisation apparaît en tout point perfusé d'agent de contraste. Si la perfusion n'est pas parfaite, avec par exemple une bulle d'air obstruant une artère, toute une partie du cerveau peut être absente : l'aval de l'obstruction. Ceci peut



introduire un biais pour l'étude *post-mortem* des ischémies. La sensibilité et le contraste sont très bons pour les gros troncs vasculaires, avec une grande quantité d'agent de contraste. Pour les plus petits vaisseaux, la sensibilité va dépendre de la résolution du système de tomographie et de la taille des voxels reconstruits : plus les voxels sont petits, moins ils sont concentrés en agent radio-opaque et le ratio signal-sur-bruit est diminué.

3.1.4 Conclusion

La comparaison avec l'imagerie par tomographie aux rayons X confirme la faculté de l'ULM à imager les microvaisseaux du cerveau. Les déformations induites par le processus de perfusion, le décès de l'animal, et la fixation empêchent un recalage parfait des volumes acquis *in vivo* et *ex vivo*. Les sensibilités des systèmes ne permettent pas de résoudre précisément le lit capillaire. D'autres techniques comme l'imagerie confocale permettrait cette comparaison sur la couche superficielle du cortex.

3.2 Rendus graphiques pour l'ULM

Le processus de traitement pour l'ULM génère une liste de trajectoire de microbulles, avec leur vitesse en chaque point. Cet ensemble de données parcimonieux n'est pas interprétable par l'utilisateur tel quel pour apprécier la vascularisation d'un organe. Pour rendre compte des densités de vaisseaux, les trajectoires sont accumulées sur une grille, représentant les lieux de passage des microbulles [section 4.2.6]. La taille des pixels est choisie plus petite que celle des images sources avec une amélioration de résolution [fig. 2.11a-b].

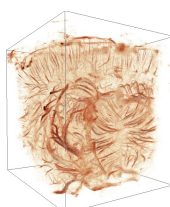
Pour rendre compte des vitesses, on peut utiliser la même grille et moyenniser les vitesses de trajectoires pour chaque pixel. Ce type de rendu ne permet cependant pas de prendre en compte le nombre de bulles étant passées par ce pixel : pour une même vitesse moyenne, la valeur sera plus moins erronée s'il y a un grand nombre de valeurs moyennées (avec un écart-type élevé).

On peut alors utiliser un encodage couleur spécifique pour exprimer les différentes informations des trajectoires :

- intensité : nombre de trajectoires traversant le pixel
- vitesse : vitesse moyenne des microbulles dans le pixel
- direction : orientation du vecteur vitesse

L'encodage des pixels est réalisé avec le système colorimétrique *HSL* [fig. 2.11a] :

- H, *Hue* (teinte) : couleur avec une variation des trois couleurs primaires sur 360°
- S, *Saturation* (saturation) : couleur achromatique, de la couleur vive au gris
- L, *Lightness* (luminosité) : du blanc au noir



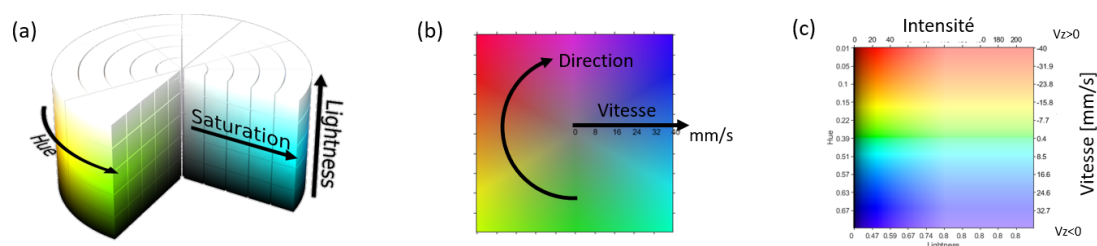


FIGURE 2.11 – (a) Système d’encodage des couleurs HSL (*Hue*, *Saturation*, *Lightness*). (b) La direction des flux est associée à la teinte, et la vitesse à la saturation. (c) La vitesse est associée à la teinte, avec une distinction sur le signe de la composante verticale. L’intensité donne la luminosité.

Suivant l’organisation de la microvascularisation dans l’organe, on peut adapter le type de rendu pour aider à la compréhension. Dans le rein [fig. 2.12], l’orientation des petits vaisseaux du cortex est globalement radiale, avec des flux qui vont vers le centre (le bassinnet) ou vers l’extérieur. On peut alors choisir d’encoder l’orientation du vecteur vitesse avec la couleur sur 360° , et l’amplitude de la vitesse avec la luminosité [fig. 2.11b].

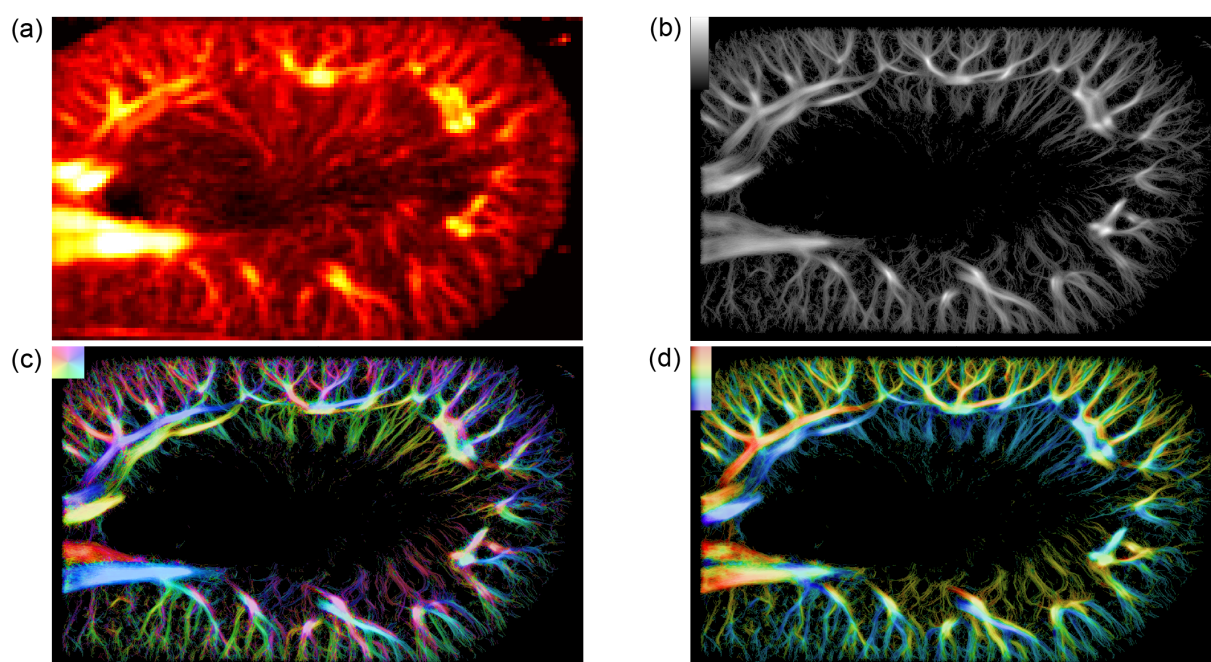
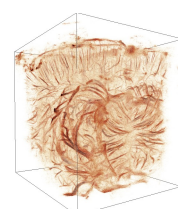


FIGURE 2.12 – Microvascularisation du rein de rat. (a) Doppler ultra-sensible avec agent de contraste. (b) Rendu ULM avec intensité. (c) Rendu avec vitesse (maximum 40 mm/s), encodage couleur de la composante axiale. (d) Rendu vitesse avec encodage couleur de direction.

Pour le cerveau, le cortex présente une architecture plutôt axiale, avec des artères qui descendent dans le cerveau, et des veines qui remontent vers la surface. Dans ce cas, on peut utiliser la couleur pour encoder l’amplitude de vitesse sur une partie restreinte de la teinte, en faisant la distinction sur la composante verticale [fig. 2.11c] : la grandeur $\vec{v} \cdot \vec{u}_z$ fait varier la teinte entre $-v_{max}$ et v_{max} .



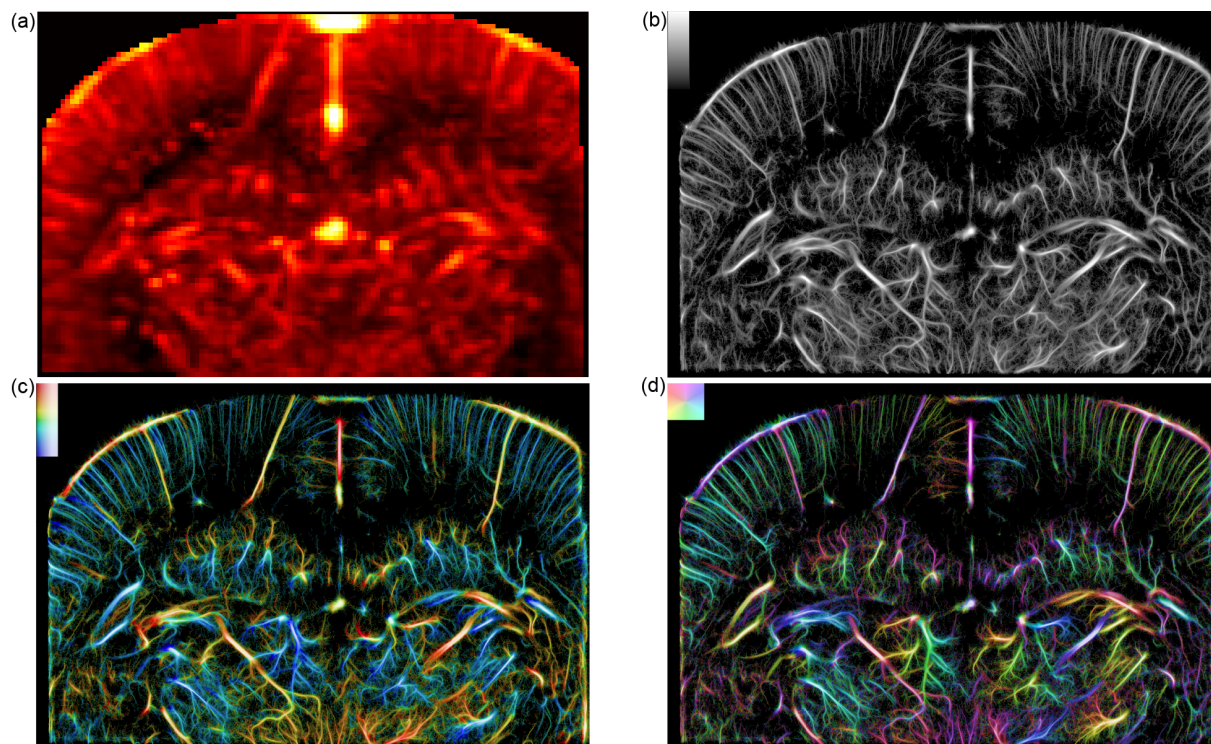
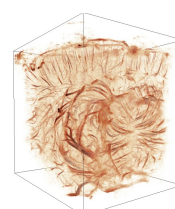


FIGURE 2.13 – Microvascularisation du cerveau de rat avec craniectomie. (a) Doppler ultrasensible avec agent de contraste. (b) Rendu ULM avec intensité. (c) Rendu avec vitesse (maximum 60 mm/s), encodage couleur de la composante axiale. (d) Rendu vitesse avec encodage couleur de direction.

L'utilisation de ce type de rendu graphique facilite la compréhension de données produite par l'ULM en combinant différentes informations des microbulles, leur vitesse, et leur direction.



Chapitre 3

Imagerie volumétrique avec sonde multiplexée pour la microscopie par localisation ultrasonore

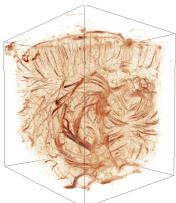
Objectifs

L'imagerie 2D est limitée par un champ de vue restreint et une sensibilité limitée aux écoulements dans le plan d'imagerie. L'imagerie volumétrique requiert un grand nombre de transducteurs et complexifie les solutions hautes cadences existantes. L'objectif de ce chapitre est l'imagerie haute cadence d'un large champ de vue en 3D avec une sonde multiplexée, pilotée par un échographe commercial en vue et son application pour la microscopie par localisations.

Sommaire

1	Introduction	115
1.1	Contexte de l'étude	115
1.2	Objectif	115
1.3	Méthodes générales	115
1.4	Résultats	116
1.5	Conclusion	117
2	Article : <i>3D transcranial ULM in rat brain with a multiplexed matrix probe</i>	118
2.1	Abstract	119
2.2	Introduction :	119
2.3	Methods :	122
2.4	Results	128
2.5	Discussion	134
2.6	Conclusion	138
2.7	Acknowledgments	138
2.8	References	138
3	Annexes	142
3.1	Calibration spatiale des transducteurs de la sonde matricielle	142
3.2	Imagerie du cerveau avec craniectomie	144
3.3	Mesure de l'atténuation du crâne de rat	147

3.4 Temps d'acquisition et de reconstruction 150
3.5 Imagerie du cerveau de souris en transcrânien 151



1 Introduction

1.1 Contexte de l'étude

La microscopie par localisation ultrasonore a permis d'imager la microvascularisation *in vivo* avec des résolutions jamais atteintes en ultrasons, et en profondeur dans les organes. Cependant, cette imagerie 2D reste soumise à la projection en élévation qui limite le champ de vue, la sensibilité aux flux orthogonaux, une sous-estimation des vitesses hors plan, et l'incapacité à corriger les mouvements tri-dimensionnels. Enfin, l'exploration d'un organe entier est rendue chronophage par le besoin de réaliser une multitude de coupes pour le caractériser dans son intégralité.

L'utilisation de capteurs matriciels apporte à l'imagerie 2D une 3^{ème} dimension et rend l'imagerie isotropique dans un large champ de vue. Piloter de telles sondes ultrasonores nécessite cependant des systèmes spécifiques avec un grand nombre de voies d'échantillonnage. Les systèmes les plus aboutis, mais aussi complexes, sont composés d'un millier de transducteurs tous adressés et pilotés par un ou plusieurs échographes synchronisés. D'autres systèmes utilisent un nombre réduit de transducteurs avec des matrices sous-peuplées (ou parcimonieuses), ou des sondes lignes-colonnes. La réduction du nombre de voies conduit cependant à une dégradation de la qualité d'imagerie en contraste et résolution. Enfin, les systèmes multiplexés offrent un compromis avec un nombre limité de voies d'échantillonnages, mais en conservant un grand nombre de transducteurs. Néanmoins, pour obtenir un volume complet avec la même qualité qu'un système entièrement adressé, plusieurs émissions/réception sont nécessaires et contraignent la cadence d'imagerie maximale.

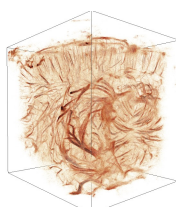
Ces systèmes complexes avec beaucoup de voies ont déjà démontré la faisabilité de l'ULM 3D *in vitro*, et récemment *in vivo* dans le cerveau de rat avec craniectomie.

1.2 Objectif

L'objectif de cette étude est la mise en place d'une imagerie volumétrique avec un échographe de recherche commercial et une sonde multiplexée, dédiée à l'ULM 3D *in vivo*. J'ai proposé une combinaison particulière d'émissions/réceptions successives permettant une amélioration de la cadence d'imagerie tout en conservant la résolution et le champ de vue de la sonde. J'ai d'abord validé la séquence en simulation, puis *in vitro* avec un écoulement de microbulles dans un canal. Enfin, la séquence a été utilisée *in vivo* dans le cerveau de rat, avec crâne intact pour réaliser une angiographie précise en profondeur.

1.3 Méthodes générales

L'imagerie ultrasonore volumétrique a été réalisée avec une sonde matricielle 32 par 32 à 7,8 MHz, pilotée par un échographe de recherche *Vantage 256* (Verasonics, Kirkland, WA, USA). Un multiplexeur 4-1 permet à l'échographe de piloter une des quatre sous-ouvertures rectangulaires de la sonde, reliée chacune à 256 transducteurs. Chaque émission d'une onde plane nécessite plusieurs tirs ultrasonores avec différentes ouvertures à l'émission et à la réception. Trois sché-



mas de combinaisons ont été implémentés : la combinaison dite "full", composée de 16 couples émission/réception, équivalente à une sonde entièrement adressée, la combinaison dite "direct", composée de seulement 4 couples, et la combinaison que j'ai introduite dite "light", composée de 10 couples. Pour réaliser un volume, cinq ondes planes successives sont envoyées pour une cadence d'imagerie finale de 250 Hz. J'ai implémenté une séquence d'acquisition spécifique pour obtenir une vitesse d'écriture suffisamment rapide pour acquérir une centaine de milliers d'images en un temps restreint, condition nécessaire pour l'ULM 3D. J'ai utilisé la sommation synthétique des données directement dans les cartes d'acquisition pour réduire considérablement la taille des données.

Les trois combinaisons ont été évaluées sur des fonctions d'étalement du point simulées, en positionnant des diffuseurs ponctuels à différentes profondeurs, devant et entre les sous-ouvertures de la sonde. Les résolutions et amplitudes sont comparées entre les combinaisons pour les différentes positions des diffuseurs.

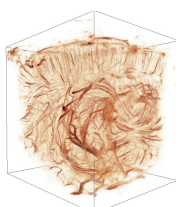
La séquence est ensuite testée *in vitro* sur un écoulement de microbulles dans un canal d'agar-agar, à différentes profondeurs. Pour chaque combinaison, les données sont reconstruites, puis filtrées pour observer l'écoulement des microbulles. Celles-ci sont localisées et suivies pour reconstruire leur trajectoire. Pour chaque combinaison, les détections le long des sous-ouvertures sont comptées pour comparer l'homogénéité spatiale.

La validation *in vivo* de la combinaison "light" est réalisée chez le rat âgé de 7 semaines, avec crâne intact. 100 000 volumes sont acquis du cerveau de l'animal sous perfusion de microbulles.

1.4 Résultats

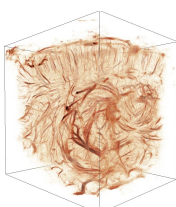
Alors que la combinaison "direct" montre des variations importantes de résolution, et détection en profondeur et entre les sous-ouvertures, les combinaisons "light" et "full" font preuve d'une bonne homogénéité. Ces deux combinaisons assurent une détection homogène et une localisation précise des microbulles dans tout le champ de vue de la sonde. L'imagerie *in vitro* dans le canal confirme ce résultat avec une densité linéaire de détection quasi-constante pour ces deux combinaisons entre les différents panneaux de la sonde. Les 6 couples émissions/réceptions additionnels de la combinaison "full" n'apportent donc pas d'information supplémentaire pour la détection des microbulles. La combinaison "light" est alors choisie pour la validation *in vivo* avec un gain de 60% en cadence d'imagerie par rapport à la combinaison "full".

La séquence dédiée à l'imagerie *in vivo* a réduit l'acquisition des 100 000 volumes à 250 Hz à 7 minutes. 42 millions de localisations ont été appairées en 541 000 trajectoires. Le volume final reconstruit révèle la microvascularisation du cerveau de rat avec des vaisseaux jusqu'à 31 μm de diamètre. Le suivi des trajectoires apporte une information supplémentaire sur les vitesses et directions des flux, compris entre 4,3 mm/s et 28,4 mm/s. Les crêtes osseuses et sutures du crâne intact empêchent néanmoins la détection des microbulles à certains endroits, créant des zones d'ombres sur toute la profondeur du volume.



1.5 Conclusion

Le système multiplexé est une solution adaptée pour l'ULM 3D avec un échographe commercial simple pouvant réaliser une imagerie des microbulles dans les régimes de vitesses adaptées au cerveau. Le passage à l'imagerie volumétrique apporte une résolution et sensibilité isotrope à l'ULM. La vascularisation des organes est rendue possible dans un large champ de vue jusqu'aux artérioles et veinules. Le caractère non-invasif et facile d'accès du système ouvre de nouvelles perspectives pour l'imagerie longitudinale des organes et de leurs pathologies.



2 Article : *3D transcranial Ultrasound Localization Microscopy in rat brain with a multiplexed matrix probe*

Article accepté pour publication le 15/12/2021 dans *IEEE - Transactions on Biomedical Engineering*

3D transcranial Ultrasound Localization Microscopy in rat brain with a multiplexed matrix probe

Arthur Chavignon¹, Baptiste Heiles², Vincent Hingot¹, Cyrille Orset³, Denis Vivien^{3,4},
Olivier Couture¹

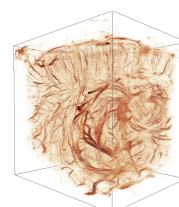
¹Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Department Laboratoire d'Imagerie Biomedicale, Paris, France,

²Maresca Lab, TU Delft, Pays-Bas,

³Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1237, Etablissement Français du Sang, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Caen, France,

⁴Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France.

Documents complémentaires (vidéos) accessibles avec la publication (DOI : [10.1109/TBME.2021.3137265](https://doi.org/10.1109/TBME.2021.3137265)).



Keywords :

Brain microvascularization, multiplexed probe, super-resolution ultrasound, transcranial ultrasound imaging, 3D ultrasound localization microscopy

Footnotes :

This study was funded by the European Research Council within the H2020 program (ERC Cog ResolveStroke 772786).

A. Chavignon, V. Hingot, O. Couture are with Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Department Laboratoire d'Imagerie Biomedicale, Paris, France.

B. Heiles is with Maresca Lab, TU Delft, Netherlands.

C. Orset and D. Vivien are with Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1237, Etablissement Français du Sang, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), 14000 Caen, France. D. Vivien is also with Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France.

2.1 Abstract

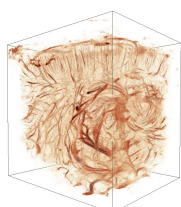
Ultrasound Localization Microscopy (ULM) provides images of the microcirculation in-depth in living tissue. However, its implementation in two-dimension is limited by the elevation projection and tedious plane-by-plane acquisition. Volumetric ULM alleviates these issues and can map the vasculature of entire organs in one acquisition with isotropic resolution. However, its optimal implementation requires many independent acquisition channels, leading to complex custom hardware. In this article, we implemented volumetric ultrasound imaging with a multiplexed 32×32 probe driven by a single commercial ultrasound scanner. We propose and compare three different sub-aperture multiplexing combinations for localization microscopy *in silico* and *in vitro* with a flow of microbubbles in a canal. Finally, we evaluate the approach for microangiography of the rat brain.

The "light" combination allows a higher maximal volume rate than the "full" combination while maintaining the field of view and resolution. In the rat brain, 100 000 volumes were acquired within 7 min with a dedicated ultrasound sequence and revealed vessels down to $31 \mu\text{m}$ in diameter with flows from $4,3 \text{ mm/s}$ to $28,4 \text{ mm/s}$.

This work demonstrates the ability to perform a complete angiography with unprecedented resolution in the living rat's brain with a simple and light setup through the intact skull. We foresee that it might contribute to democratize 3D ULM for both preclinical and clinical studies.

2.2 Introduction :

The brain microvascular system is a complex mesh of capillaries ($<10 \mu\text{m}$ diameter) linked to wider arterioles and venules ($[25-150] \mu\text{m}$ diameter) that feed neurons with glucose and oxygen. Modifications of blood flow and tissue perfusion are directly related to neural activity [1]. Malfunctions of this vascular network are involved in several disease processes, and visual analyses



are necessary for diagnosis. However, imaging at microscopic scales with a deep penetration remains a challenge for *in vivo* imaging techniques.

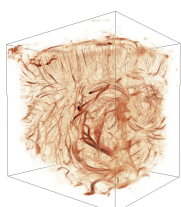
Some *ex vivo* techniques reach resolutions of a few microns, such as micro angio-computed tomography [2], [3]. Tissue optical clearing approaches offer an alternative with either microscopic resolution for vascular imaging (DISCO) [4], [5], nervous system (CLARITY) [6], [7], and fluorescent proteins imaging (CUBIC) [8]. For blood flow dynamics, 2-photon intravital microscopy provides arterioles and venules vasodynamic with an almost one-millimeter depth of imaging in the pia mater of the rat brain with craniectomy [9].

Ultrasound Localization Microscopy (ULM) is becoming an attractive option for *in vivo* microvascularization imaging [10]–[12]. By imaging isolated microbubbles with a sub-wavelength precision and tracking their propagation in blood vessels, it reveals the microvascularization of organs in small animals *in vivo* with a resolution of tens of microns : brain through a thinned skull [13] or with craniectomy [14], ear [15], kidney [16], [17], and other [18]–[22], and recently in the human kidney, liver, pancreas, breast, and brain [23], [24].

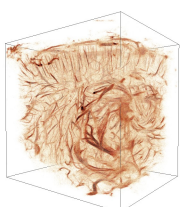
However, 2D ULM suffers elevation projection of the probe. It hinders imaging transversal vessels and underestimates velocity measurement of microbubbles' flows not aligned in the imaging plane. Moreover, out-of-plane motions cannot be tracked and corrected for moving organs. The necessity for careful selection of the imaging plane also induces a very high user dependency and a tedious approach to explore entire organs. Volumetric imaging becomes essential to solve these drawbacks.

For appropriate microbubble tracking in three-dimensional ULM, volume rates of hundreds of frames per second would be favorable. Unfortunately, conventional 3D ultrasound scanners use time-consuming line-by-line or sector-by-sector scanning techniques with a limit of a few tens of volumes per second. Recent developments in ultrafast imaging [25], [26] opened the possibility for a high-volume rate 3D ultrasound. The most straightforward implementation of volumetric ultrafast imaging consists of a numerous 2D matrix array where each element is connected to an independent channel of an ultrasound scanner [27]. For a matrix with 1024 transducers (32×32), 4 ultrasounds scanners of 256 channels each must be synchronized to control the entire probe [27]–[31]. New perspectives to reduce the number of channels are brought about by new ultrasound research scanners, high flexibility in ultrasound sequence programming, and customized probes and electronics. Sparse arrays use a fraction of transducers in a matrix array to perform volumetric imaging [32]–[34]. Row-column addressed (RCA) matrix probes exploited the orthogonal properties of two linear arrays to get an isotropic resolution on a large field of view [35]–[37]. However, these two last approaches pay the reduction of the channel by decreasing the imaging capability. Multiplexing systems try to preserve the imaging quality but require more transmission, affecting the maximal volume rate system [32], [38], [39]. ULM has already been implemented in 3D with encouraging results *in vitro* [40], [41], sparse matrix array [33], RCA matrix probes [42], particularly with synchronized ultrasounds scanners [43]. This last system was used *in vivo* to image the rat brain with craniectomy [44].

In this article, we implemented ultrafast volumetric imaging on a research scanner with a multiplexed matrix probe and performed 3D ULM *in vivo* in the rat brain with an intact



skull. The 1024 transducers of the probe were divided into four sub-apertures controlled by one commercial ultrasound scanner with 256 channels. Pulse transmissions were sent by one sub-aperture, and backscattered echoes were received by another sub-aperture. Therefore, to reach the fully addressed array imaging capability, 16 couples of transmission-reception were required (4 transmission \times 4 receptions). In this study, we defined and evaluated two multiplexing combinations, "direct" and "light", with fewer transmission-reception couples. The "light" combination preserved the imaging capability of a fully addressed array and allowed an imaging volume rate compatible with *in vivo* imaging of the brain micro-vascularization. The dedicated ultrasound sequence limited the amount of generated data and enabled long acquisition without volume number limitations. We compared imaging qualities of the 3 different multiplexing combinations *in silico* with point spread function simulation and *in vitro* with a microbubbles flow in a tube. Finally, the "light" combination was applied for *in vivo* experiments on a rat brain with an intact skull revealing the microcirculation.



2.3 Methods :

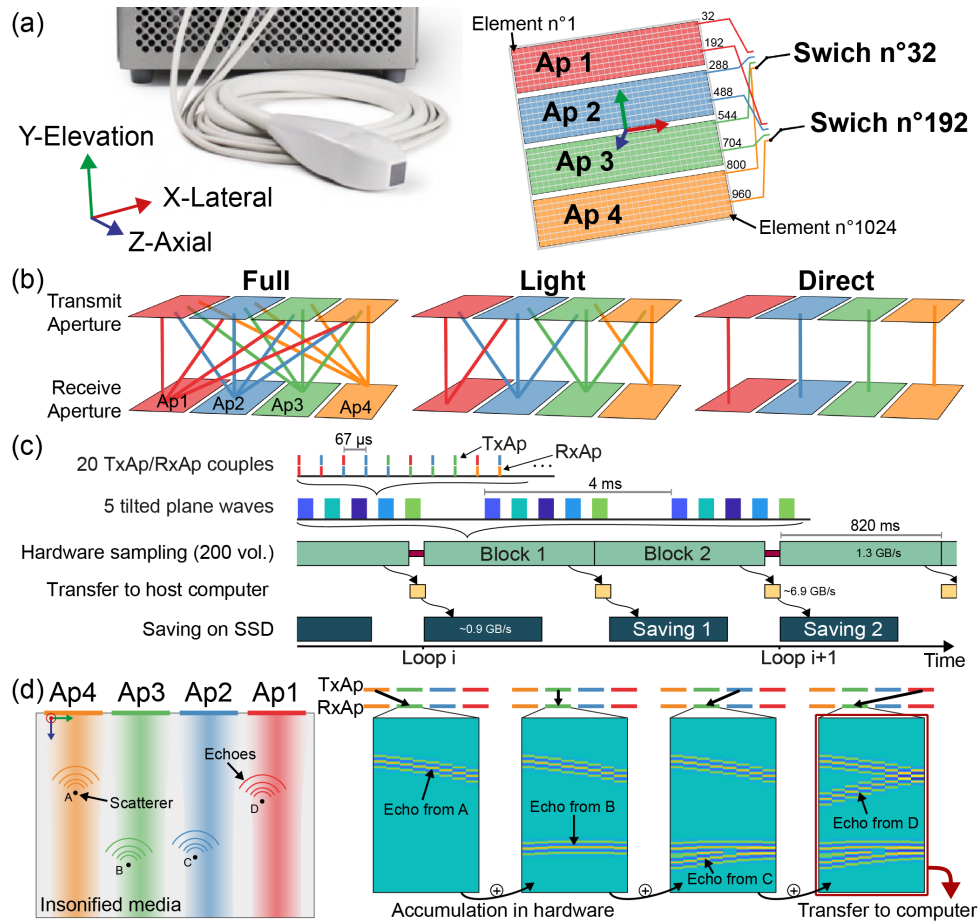
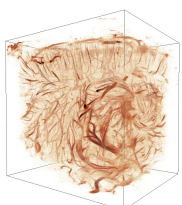


FIGURE 3.1 – (a) Multiplexed matrix probe with 4 active layer panels of 32×8 transducers elements, divided into 4 sub-apertures. The 256 switches of the 1-4 MUX can address 1 transducer among 4. (b) "Direct", "full" and "light" multiplexing combinations. Links represent the transmission aperture/reception aperture (TxAp/RxAp) couples. (c) Timeline of the asynchronous sequence. Each block of 200 volumes was composed of a set of 5 plane waves requiring 50 TxAp/RxAp couples. (d) Echoes generated by successive transmit apertures (TxAp) and received by aperture 2 (RxAp) were accumulated directly in hardware before being transferred to the host computer.

2.3.1 Optimized volumetric imaging with a multiplexed matrix probe

Ultrafast volumetric imaging was performed with a single Vantage 256™ Research Ultrasound Systems (Verasonics, Inc., Kirkland, WA, USA) driving a matrix probe of 1024 elements (central frequency 7,8 MHz, 56 % bandwidth at -6 dB) (Vermon, Tours, France) via the Verasonics UTA 1024-MUX adapter. Transducers were aligned on a 35×32 grid with a $300 \mu\text{m}$ pitch. Rows 9, 17, and 25 were unpopulated, yielding a $9,6 \text{ mm} \times 10,5 \text{ mm}$ field-of-view [fig. 3.1a]. Each sampling channel was wired to one of the 256 switches of the MUX adapter and could be connected successively to one transducer among 4 : channel i can be connected to transducers i , $i+256$, $i+512$, or $i+712$ [fig. 3.1a], with a commutation time of $4 \mu\text{s}$ approximatively (constructor datasheet). It enabled changing switches' state between the transmission of a pulse and recep-



tion of its echoes. We defined 4 sub-apertures composed of 256 successive channels, starting from channels 1, 257, 513, and 769. These sub-apertures corresponded to the four active layer panels of 32×8 transducers assembled to get the wide matrix array. The relative positions of active layer panels were calibrated to correct offsets and angulations. We measured a maximal offset of $145 \mu\text{m}$ ($0,73\lambda$) in the lateral direction, and an angulation of $2,1^\circ$ (lateral axis) between two panels, yielding a maximal axial offset of $114 \mu\text{m}$ ($0,58\lambda$) between transducers.

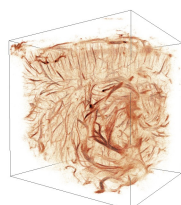
Each transmission of a plane wave requires multiple pulse emissions with different apertures of 256 transducers in transmission and reception to recover echoes from all scatterers with any transducer. Transmission Aperture/Reception Aperture (TxAp/RxAp) defines a couple of apertures used for emission and reception of one pulse emission. The high versatility of this system allows us to mix the apertures to reduce the number of pulses needed to reconstruct one full volume with a good quality Point Spread Function (PSF).

We defined three different multiplexing combinations : lists of TxAp/RxAp couples used to sample one plane wave [fig. 3.1b].

1. The "full" combination : equivalent to a fully addressed matrix array, each aperture received echoes provided by the emission of each aperture, leading to 16 couples TxAp/RxAp per plane wave.
2. The "direct" combination : equivalent to 4 individual 32×8 matrix probes, each aperture received the echoes generated by itself, leading to only 4 couples per plane wave.
3. The "light" combination ; each aperture received the echoes generated by itself and its first neighbor's apertures, leading to 10 couples per plane wave. For example, aperture 2 acquired the echoes generated by apertures 1, 2, and 3.

The combination will limit the maximal volume rate of imaging. For *in vivo* acquisition, the maximal acquisition depth was fixed at 16,4 mm, with a pulse repetition frequency (PRF) of 15 kHz. This value was set lower than the maximal PRF (40 kHz) to prevent hardware lags. Volumes were obtained by compounding 5 bidimensional plane waves after Delay-And-Sum beamforming. Tilting angles were (Azimuth, Elevation) : $\{(0,0);(-5,0);(5,0);(0,-5);(0,5)\}$ in degrees. The maximal compounded volume rate (CVR) was devised from the PRF, the number of plane waves ($N_{PW} = 5$) and the number of TxAp/RxAp couples of the multiplexing combination ($N_{MUX} \in \{4; 10; 16\}$) : $CVR_{max} = PRF/N_{PW}/N_{MUX}$. For the "direct" combination, the CVR_{max} was 750 Hz, 300 Hz for "light", and 187 Hz for "full".

The 7,8 MHz excitation pulse parameters are exposed in table. 3.1 with measured peak negative pressure (PNP) and peak positive pressure (PPP) in water. No microbubble disruption was observed *in vitro* in those settings. For transcranial *in vivo* imaging, the skull attenuation calibration attested a reduction of both PNP and PPP by a factor 2 minimum, ensuring no microbubbles destruction inside the rat brain. A maximum thermal elevation of 1°C was measured on the surface of the probe emitting in an acoustic gel.



	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i> transcranial
Tension [volt]	10	16
Number of half cycles	2	4
Duty cycle	67 %	67 %
Peak Positive Pressure [kPa]	345	617
Peak Negative Pressure [kPa]	298	662

TABLE 3.1 – Pulse excitations parameters. The transmission frequency was set in both cases to 7,8 MHz. Pressures measured in water.

Echoes were sampled at 31,2 MHz. For quadrature demodulation, only the two first samples out of 4 per period were kept and transferred to the host controller to get the in-phase and quadrature signals with the "NS100BW" mode in Verasonics.

2.3.2 *In silico*, *in vitro*, and *in vivo* validation setups

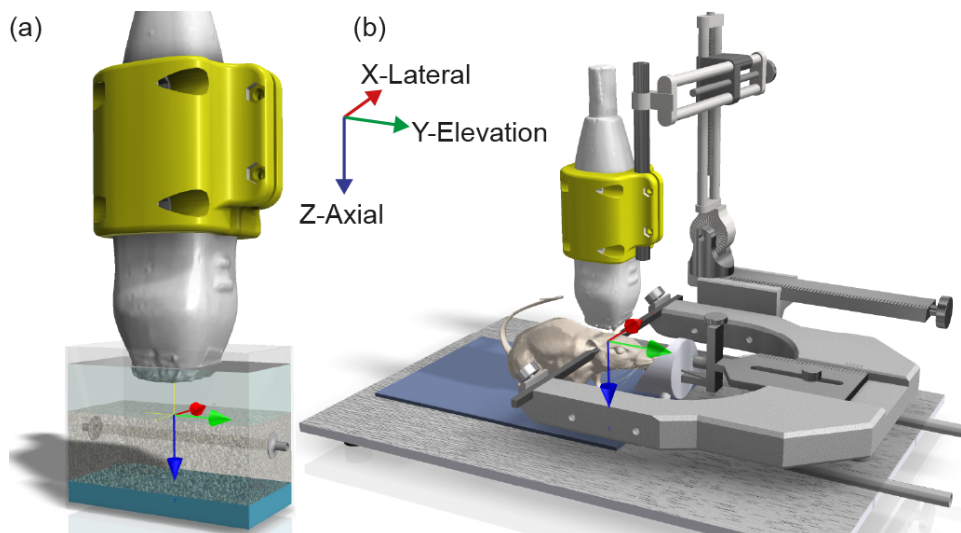
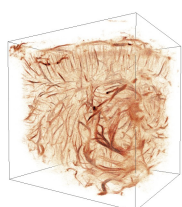


FIGURE 3.2 – (a) *In vitro* setup with a 0,5 mm diameter tube molded in agar, oriented in the elevation direction of the probe (y-axis). The bottom of the tank was covered with an acoustic absorber and water was used to fill the gap between the agar and the probe. (b) *In vivo* setup of the rat brain imaging with a stereotaxic frame constraining rat's head, and holding the matrix probe. The rat was anesthetized with isoflurane via an inhalation mask, and its temperature was regulated with a heating pad. Sonovue microbubbles were injected with a tail vein catheter.

We have validated these 3 different combinations in 3 different setups :

1. *In silico* : Point Spread Function simulation

The 3D PSF of isolated punctual scatterers was simulated with the Verasonics Research Ultrasound Simulator (Verasonics, Inc., Kirkland, WA, USA) with a pulse-echo model. Scatterers were placed in front of sub-aperture 3 (intra-aperture zone), at coordinates $[x = -1,35 \text{ mm} ; y = 0]$, and in the interleaving space between sub-apertures 1 and 2 (inter-aperture zone) at $[x = 2,70 \text{ mm} ; y = 0]$. Scatterers were imaged at five different depths between $z = 1,8 \text{ mm}$ (9λ) to z



= 25,2 mm (128 λ).

2. *In vitro* : microbubbles flow imaging in a canal

A 1/8000 diluted solution of microbubbles (Sonovue, Bracco, Italy) was injected in a 0,5 mm wide flow canal embedded downward in agar [43] at a flow rate of 0,50 ml/min (mean velocity 42 mm/sec), in the elevation direction (y-axis) [fig. 3.2a]. Radiofrequency data (RF data) generated by each TxAp/RxAp couple were saved independently. All multiplexing combinations were reconstructed in post-processing by selecting the right list of TxAp/RxAp couples to get either "direct", "light" or "full" modes. The CVR was reduced to 200 Hz for deeper imaging up to 125 wavelengths. 20 blocks of 200 continuous volumes were acquired.

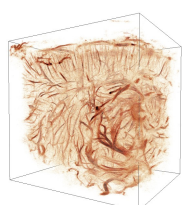
3. *In vivo* feasibility of 3D ULM : transcranial rat brain imaging

All animals' experiments were performed under the European Community Council guidelines (2010/63/EU) and approved by the protocol APAFIS #22544 validated by the French ethics committee "Comité d'éthique Normandie en matière d'expérimentation animale". 5 Sprague-Dawley 6-7 weeks old male rats were placed in a small animal stereotaxic frame (David Kopf stereotaxic instrument, Tujunga, CA, USA) equipped with an anesthesia mask with a mix of isoflurane (2%) and nitrous oxide [fig. 3.2b]. Ear bars and an incisor bar were used to restrain head motion. The animal's temperature was regulated at 38 °C with a heating pad and a rectal probe. The top of the head was shaved and covered with echographic gel. For a few animals, the head skin was scalped to image directly on the skull bone to prevent air bubbles stuck in the remaining hairs and sutured after the imaging sequence. The position of the ultrasonic probe was adjusted using the stereotaxic electrode manipulator (0,1 mm resolution, David Kopf stereotaxic instrument, Tujunga, CA, USA) with a custom 3D printed probe holder. During the 7 minutes of imaging, 14 boluses of 50 μ l (every 30 seconds) of Sonovue microbubbles were injected in a tail vein catheter to ensure a constant concentration of microbubbles in the rat blood volume. Two magnets (one inside the syringe, one outside) were softly agitated to prevent aggregations of microbubbles in the solution and ensure a constant concentration of microbubbles in the rat blood volume. 100 000 volumes were acquired in blocks of 200 continuous volumes at 243 Hz CVR, for a total datasize of 245 GB.

2.3.3 Dedicated imaging sequence for volumetric ULM

The multiplexing setup described in the previous section was used to perform volumetric ULM. A specific asynchronous acquisition sequence was designed and implemented through hardware and software levers to reduce data and acquisition time further.

Continuous blocks of 200 volumes were acquired digitalized by the hardware, transferred to the host computer (Intel Core i9 @2,9 GHz 12 cores, 128 GB RAM @2133 MHz) running with MATLAB (The MathWorks Inc., release 2019b, MA, USA) via a PCI-express interface (6,9 GB/s constructor datasheet) [fig. 3.1c]. Data were saved on an SSD (970 PRO 1 To SSD - PCIe 3.0x4 NVMe, Samsung, South Korea) with an estimated writing speed of 900 MB/s (*WriteSpeed*). As soon as the RF data have been transferred to the host computer, a new acquisition of 200 volumes can start, without the termination of the saving process [fig. 3.1c]. The sequence was only paused to wait for the saving process between blocs of 200 volumes.



For each transmission, the signal was sampled from 3,7 mm to 16,3 mm from the probe to avoid near-field imaging and reduce data size. For one tilted plane wave, all RF data generated by any transmitting aperture and received by the same aperture were coherently summed in the hardware system's storage memory by using the accumulation mode provided in Verasonics Sequencing software [fig. 3.1d], reducing the size of the data needed to be transferred and saved. The delay law at emission must be calculated considering the entire grid of 1024 elements. Each tilted plane wave generated 4 buffers of 256 samples ($N_{samples}$) per 256 channels (2,56 MB with 16 bits encoding) whatever the multiplexing combination used thanks to the coherent summation. We defined a writing volume rate (WVR) to estimate the number of volumes saved on disk per second (considering raw RF data for one volume). In that configuration, the writing volume rate was 343 volumes/s.

$$WVR = \frac{WriteSpeed}{(N_{samples} \cdot 256 \cdot 4 \cdot N_{PW} \cdot bytes)} \quad (3.1)$$

Under these imaging conditions, the WVR was lower than the CVR, leading to continuous acquisition at 243 Hz.

2.3.4 Volumetric ULM post-processing for hemodynamic angiography

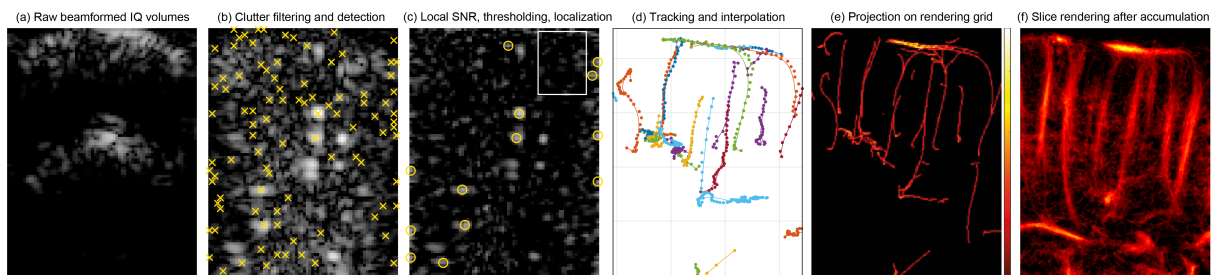
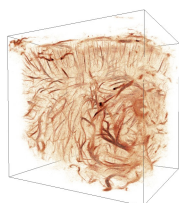


FIGURE 3.3 – ULM processing steps. **(a)** Radiofrequency data were beamformed with a Delay-And-Sum algorithm. **(b)** IQ volumes were filtered to remove tissue signals, and local maxima were detected (yellow crosses). **(c)** Maxima with low local SNR were rejected. The remaining maxima were localized with a radial symmetry-based algorithm (yellow circles). **(d)** Microbubbles were paired with a tracking algorithm. Trajectories were interpolated and smoothed. **(e)** Interpolated trajectories were projected on a rendering volume by counting the occurrence per voxel. **(f)** After accumulating a large number of trajectories, a power-law compression was applied to the final volume for visual analysis.

The general process of ULM was described previously in [12], [43]. RF data was beamformed a posteriori with Delay-And-Sum algorithm on CUDA cores (20 ms/volume with NVidia GeForce RTX 2080Ti, RAM 11 GB). Volumes were composed of $70 \times 76 \times 118$ voxels of $150 \mu\text{m}$ in lateral and elevation direction and $99 \mu\text{m}$ in the axial direction.

Continuous volumes were filtered with a Singular Value Decomposition filter (SVD) to separate microbubbles from tissue and blood signals [fig. 3.3a-b] [13], [45]–[47] (12 values removed *in vivo*, 15 *in vitro* over 200 volumes). A local maxima detection function was applied to detected potential microbubbles (yellow crosses on fig. 3.3b). A local signal-to-noise ratio (SNR) was



assigned to each local maximum by comparing the intensity of the local maximum voxel with the local average intensity in a 5 voxels width cube [fig. 3.3c]. Microbubbles with an SNR lower than 9 dB were rejected.

A custom 3D radial symmetry-based localization kernel was implemented to localize the sub-wavelength position of the microbubble [23], [44], [48]–[49], avoiding time and space-consuming interpolation schemes. Positions were paired into trajectories with a tracking algorithm based on the Kuhn-Munkres algorithm [fig. 3.3d] (simpletracker, Jean-Yves Tinevez). We fixed a maximal linking distance between two points of 0,3 mm, corresponding to a maximal microbubble’s velocity of 73 mm/s and a minimal persistence of 37 ms. Final trajectories were smoothed and interpolated [fig. 3.3d]. A 3D velocity vector was assigned to each point of the oversampled trajectory.

This process ran in 3 hours for *in vivo* imaging on asynchronous workers with MATLAB Parallel Computing Toolbox (The MathWorks Inc., release 2019a, MA, USA) for the 100 000 volumes acquired to generate one ULM volume (corresponding to 245 GB of raw RF data).

2.3.5 3D renderings and hemodynamic measurements

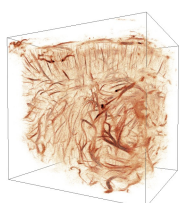
Two types of rendering were processed with isotropic voxels of 9,8 μm . An Intensity-based volume was built by counting all interpolated trajectories crossing each voxel [fig. 3.3e-f]. A vector flow volume ($\overrightarrow{V}_{(x,y,z)}$) was constructed by averaging velocity vectors of all trajectories crossing each voxel. 3D renderings were performed after a power-law compression (between 1/2 and 1/3) with Amira software (ThermoFisher) using the *Volume Rendering* module and maximum (MIP) or alpha compositions.

For the hemodynamic investigation, the volume rendering was performed with the velocity magnitude and color-encoded with the axial direction of flux : $\text{norm}(\overrightarrow{V}_{(x,y,z)}) \cdot \text{sign}(\overrightarrow{V}_{(x,y,z)} \cdot \vec{u}_z)$ (with (\vec{u}_z) the axial unitary vector).

Vessels’ diameters were measured from the hemodynamic volume. The velocity volume was averaged along the centerline of the vessel to build a cross-section velocity map. The section area was obtained by counting the number of pixels with a velocity exceeding half of the maximal velocity of the section and extended to a theoretical pipe section S_0 with a Poiseuille law laminar flow : $S_{v>\frac{1}{2}v_{max}} = \frac{1}{2}S_0$. Finally, the area was converted into an equivalent vessel radius R_{max} . For each vessel, the integral intensity inside the R_{max} was compared to the integral intensity I outside this radius r . This intensity ratio $IR_{(I/O)}$ gave an indicator of the validity of the radius estimation with the hemodynamic volume. Only measurements with a ratio higher than 70 % were kept.

$$IR_{(I/O)} = \frac{\int_{r < R_{max}} I(r)}{\int_{R_{max} < r < 2R_{max}} I(r)} \quad (3.2)$$

To further validate the resolution of our approach, the Fourier Shell Correlation (FSC) [50], [51] was computed. It provides a non-local estimation of the resolution by calculating the correlation of spatial frequencies. The list of microbubble trajectories was split into two sub-population (odd and even indices) used to reconstructed two observations of the same volume. The 2-sigma threshold [50], [52], [53] was applied to get a spatial frequency resolution compared



to an expected theoretical pure-noise. The 2-sigma curve is obtained with the number of voxels $n(R)$ in each correlation shell of spatial frequency $1/R$.

$$\sigma(R) = \frac{2}{\sqrt{n(R)/2}} \quad (3.3)$$

Below this threshold, spatial frequencies are not considered consistent.

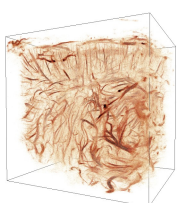
2.3.6 Microangio Computed Tomography with μ Angiofil perfusion

After the 3D ULM acquisition, the animal was perfused with μ Angiofil (Fumedica AG, Switzerland) according to a published procedure [2]. The animal was heparinized, and internal carotid arteries were cannulated. The brain was widely washed out from blood with saline via catheters. Later, the solution of μ Angiofil was perfused in the brain until a complete filling of the vascularization. After polymerization, the head was taken off the animal and fixed in paraformaldehyde (PFA). The day after, the brain was extracted from the skull and scanned with a high-resolution micro-CT (micro-Computed Tomography) Skyscan 1172 (Bruker micro-CT, Kontich, Belgium) with 10 μ m voxel size.

2.4 Results

2.4.1 PSF optimization with sub-aperture management

The point spread function (PSF) was simulated as a first step to characterize the imaging system. For each combination of transmitting and receiving apertures main lateral and axial slices are displayed [fig. 3.4a,b]. The main elevation profiles are plotted in [fig. 3.4c], with the elevation resolution measured at -6 dB. In near-field imaging, all combinations provided approximately the same elevation resolution but with variation between the inter-aperture zone ($1,8\lambda$) and the intra-aperture zone ($2,7\lambda$). PSF intensity was 10 dB lower in the inter-aperture zone with the "light" and "full" combination. In the mid-field imaging (from 19λ to 78λ), the "light" and "full" combinations provided a constant resolution of $1,8\lambda$. The maximal intensity of the PSF was also constant and homogenous. The "direct" combination presented a decreased resolution down to $5,9\lambda$. Deeper, only the "full" combination managed to keep a constant a good resolution thanks to its wider reception aperture, particularly with the second neighbors TxAp/RxAp couples (e.g. TxAp = 2, RxAp = 4).



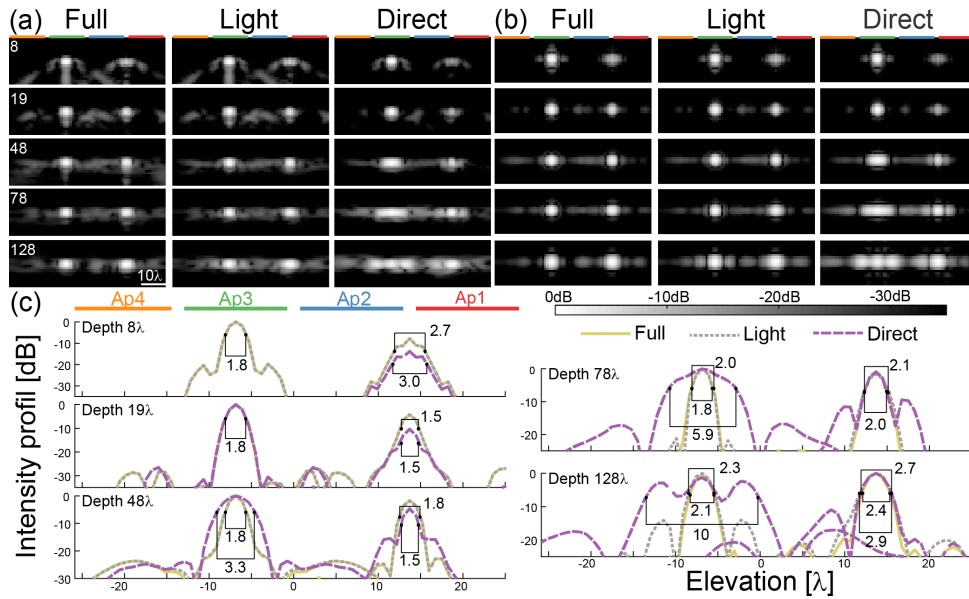
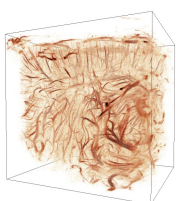


FIGURE 3.4 – Simulated point spread function for the "full", "light", and "direct" combinations at different : lateral slices (x-axis) (a) and axial slices (z-axis) (b). (c) Elevation profiles of PSF for all combinations at various depths. The elevation resolution was measured at -6 dB from the central lobe. ($\lambda = 197 \mu\text{m}$)

2.4.2 Homogenous microbubbles localization within a canal

We further investigated the characteristics of the different combinations by imaging the *in vitro* phantom with ULM.

[fig. 3.5a] shows the distribution of microbubble's localizations at each depth, with a lateral projection (x-axis). The 6 acquisitions of the same pipe with different depths have been summed on the same image. The number of detected microbubbles within the canals is plotted in [fig. 3.5b]. The localization density map with a "direct" combination presented a large axial variability with a maximal increase of $+230\%$ between aperture 4 and its right side closed to the probe [fig. 3.5b]. In the near-field, scatterers in inter-aperture zones did not receive enough signal to be imaged correctly, yielding four outlying localization areas. Deeper, when scatterers were located in an inter-aperture zone, the reception area was sheared with two reception aperture and wider than for scatterers facing a sub-aperture. Localizations appeared mostly in the three interleaving zones with a difference of $+100\%$ (aperture 3 and its left side in [fig. 3.5a]). The localization density remained homogenous for the "full" and "light" combinations starting from 30 wavelengths (5,9 mm). In the near-field, same as with the "direct" combination, a difference of $+60\%$ occurred between intra-aperture zones and inter-aperture zones. The 6 additional TxAp/RxAp couples of the "full" combination did not improve the number of localizations compared to the "light" combination.



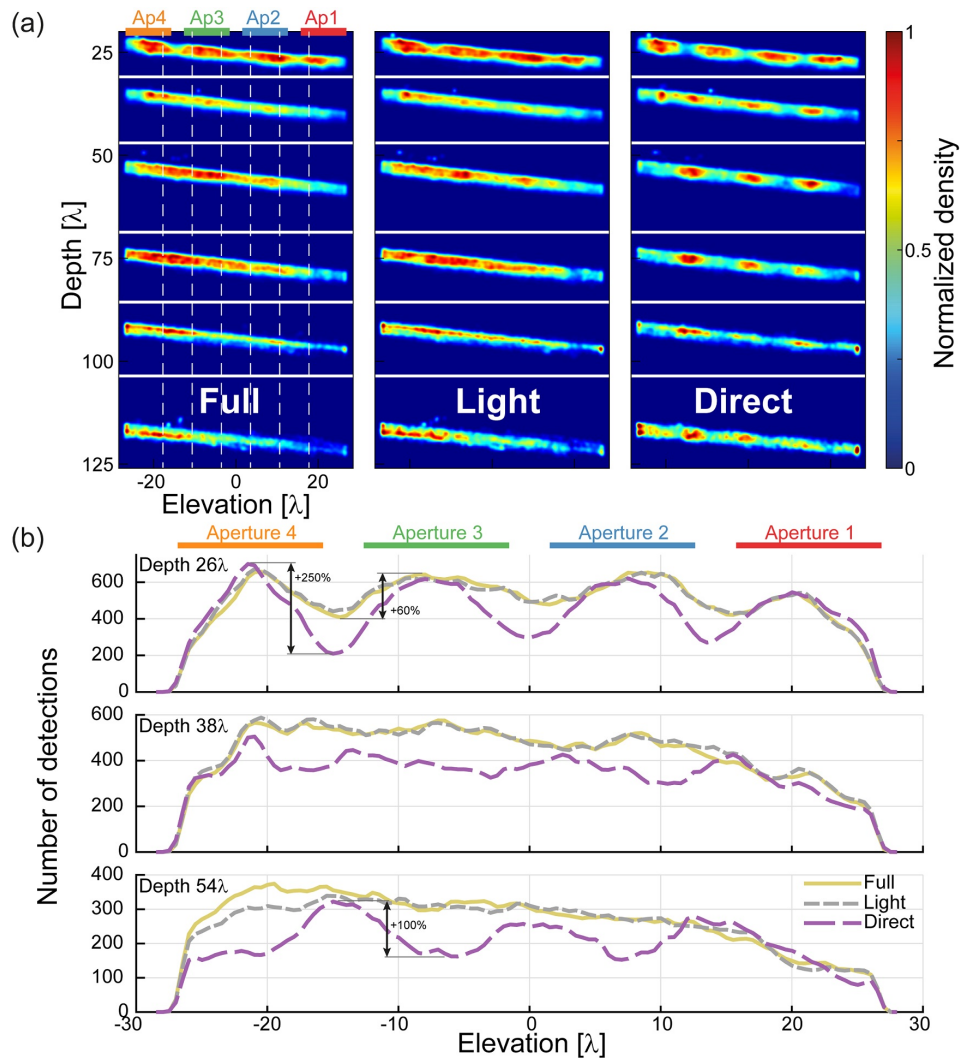
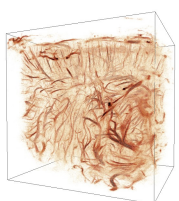


FIGURE 3.5 – (a) Localization heatmaps with lateral projection (x-axis) for different combinations. Each canal was processed independently. The figure presents the results normalized on a single image. The white dot lines delineate the inter-aperture zones from the intra-aperture zones. (b) Number of localizations in canal's axis at 26, 38, and 54 wavelengths from the probe (5,1 ; 7,5 ; 10,6 mm). ($\lambda = 197 \mu\text{m}$)

2.4.3 Transcranial volumetric ULM of a rat brain *in vivo* with an intact skull

Finally, we imaged a rat brain *in vivo* with an intact skull using the "light" TxAp/RxAp combination within 7 min. 42 M positions of microbubbles were localized, tracked into 541 k trajectories, and binned into 3D intensity volumes exposed in [fig. 3.6] with a surface mesh of the brain provided by the Waxholm Rat Atlas [54]. It revealed the complex vascular system of the brain from the neocortex to the circle of Willis. Because skull heterogeneities affect the propagation of ultrasound waves, some regions appeared shadowed in the axial direction of the probe, under the sagittal suture on [fig. 3.6a,d] (white arrows) with an axial shadowed zone. The same aberration appeared under coronal, lambdoidal sutures and temporal crests (white arrows on [fig. 3.6f]). The brain's right hemisphere could be recovered by tilting the probe (15 degrees around the y-axis) to bypass the lateral crest [fig. 3.6d].



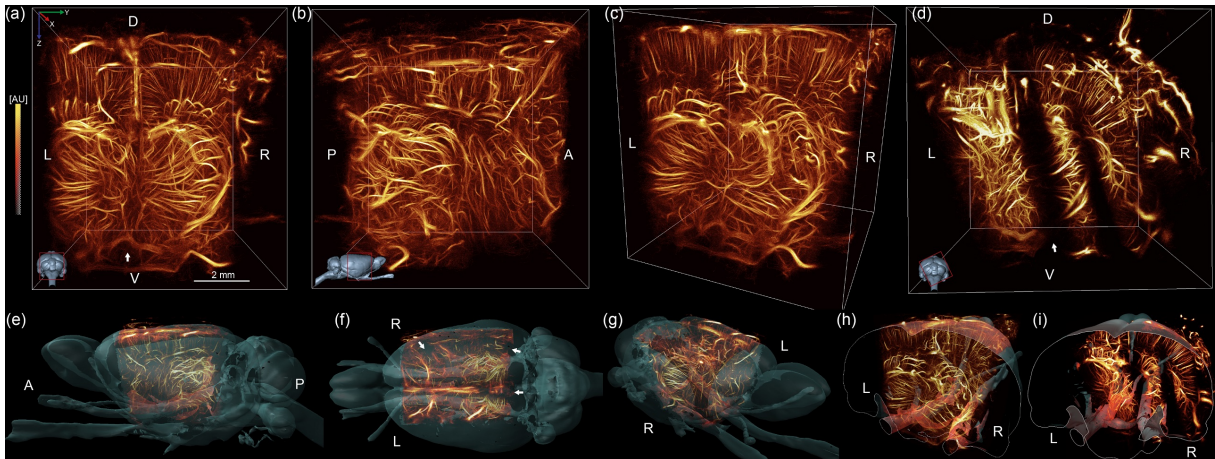
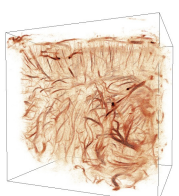


FIGURE 3.6 – (a-b-c) 3D rendering of the brain microvascular with Amira (ThermoFisher). (a) coronal view, (b) sagittal view. Intensity reflects the count of microbubbles. (d) 3D rendering with tilted ultrasound probe on another rat to observe the cortex in the right hemisphere. The shadowed region is now tilted, revealing microvasculature under the sagittal suture. (e-f-g-h-i) 3DULM rendering overlapped with the Waxholm Space Atlas of the Sprague Dawley rat brain, in shaded blue. (i) 3D ULM rendering with a tilted probe. L : left, R : right, A : anterior, P : posterior, D : dorsal, V : ventral. (See supplementary video 1)

[fig. 3.7a] shows a volumetric hemodynamic rendering of the brain. The color encoding of upward/downward (red/blue) flow facilitated the visualization of micro-vessels organization in the neocortex on a $600\ \mu\text{m}$ thin slice [fig. 3.7b]. Microbubbles were detected within a large velocities range, with 90% between $4,3\ \text{mm/s}$ and $28,4\ \text{mm/s}$ [fig. 3.7c].



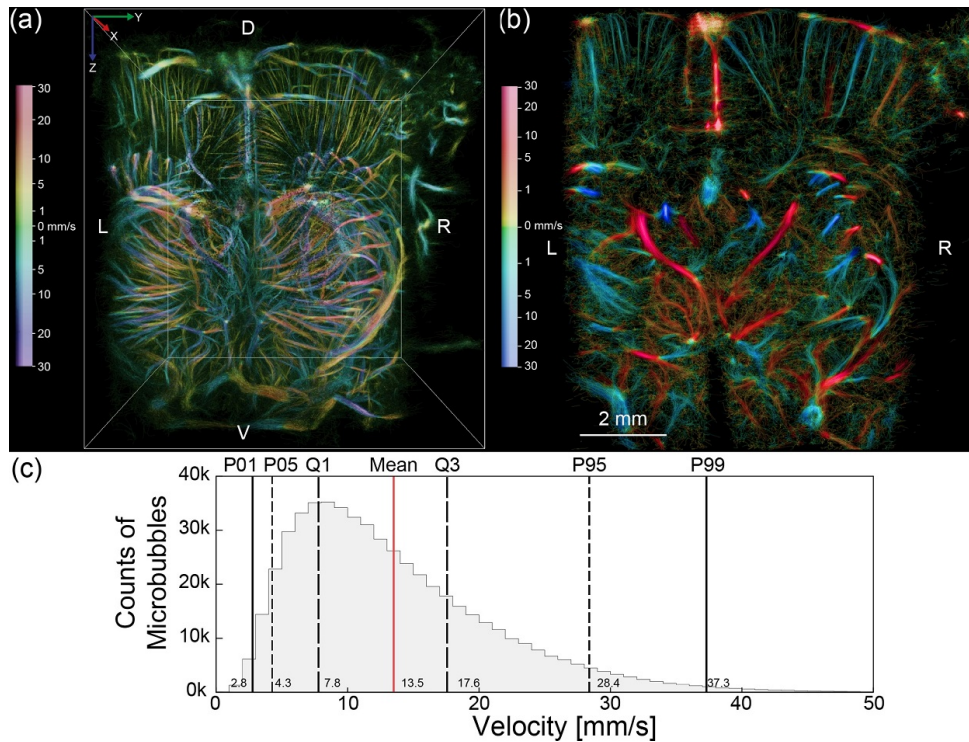
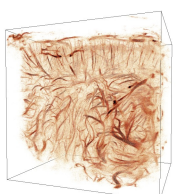


FIGURE 3.7 – (a) 3D rendering MIP of the flow velocity with Amira (ThermoFisher) (b) 600 μm coronal slice at bregma $-1,5$ mm of the hemodynamic volume up to 30 mm/s. Flows are encoded yellow to red (positive) for upward flows, and green to blue (negative) for downward flows. (c) Histogram of microbubbles' velocities for a total count of 541 k microbubble trajectories. (Bin width : 1 mm/s, see supplementary video 2)

2.4.4 Blood vessels detection down to 30 μm diameter

A significant increase in resolution and sensitivity appears when comparing Contrast-Enhanced Power Doppler [fig. 3.8a] and a 2 mm thick slice of volumetric ULM [fig. 3.8b]. Vessels appeared sharper on the ULM slice (white arrows on [fig. 3.8a]), and many micro-vessels were revealed (white arrows on [fig. 3.8b]).



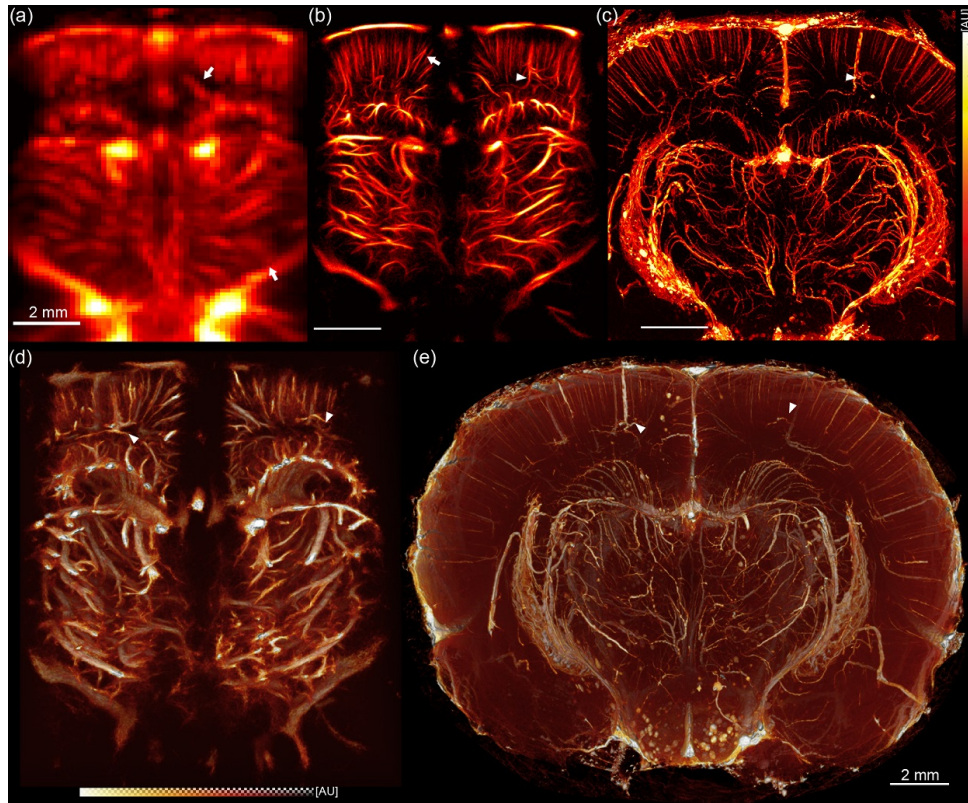
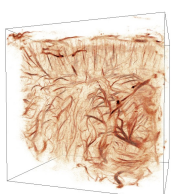


FIGURE 3.8 – Significant increase in resolution and sensitivity (a) Coronal slice of micro Power Doppler CEUS imaging. (b) 2 mm coronal slice of 3D ULM intensity rendering at bregma -2 mm. (c) 2 mm coronal slice of micro-CT with μ Angiofil perfusion with MIP rendering. (d) 3D rendering with alpha composition mode with Amira of *in vivo* ULM compared to (e) *ex vivo* micro-CT. (See supplementary video 3)

The *ex vivo* high-resolution micro-CT scan revealed the same vascular architecture with better contrast and sensitivity [fig. 3.8c]. Vessels appeared longer and finer on micro-CT and were not affected by the skull. Some particular vessels could be identified in both ULM and micro-CT but not in PowerDoppler (white triangles). Few vessels were missing on the micro-CT, probably due to a lack of contrast agent perfusion [fig. 3.8d-e]. Only on the ULM images, an unresolved mesh of tracks was present between arterioles and venules and can be associated with the capillary bed. Finally, the brain appeared deformed between *in vivo* transcranial ULM and *ex vivo* micro-CT.

To further characterize this improvement in resolution, a few vessels with different orientations were extracted from the volume and characterized with the diameter and a velocity profile in [fig. 3.9a]. Vessels could be measured with diameters from $169\ \mu\text{m}$ down to $31\ \mu\text{m}$. For each vessel, a few trajectories were necessary to ensure a relevant estimation of diameter and velocity. In particular, individual trajectories could not be characterized as vessels. For the selected vessels, the maximal blood velocity was estimated between $6\ \text{mm/s}$ up to $44\ \text{mm/s}$. Moreover, FSC provided a maximal consistent spatial frequency of $38\ \mu\text{m}$ with the $2\text{-}\sigma$ curve threshold in [fig. 3.9b]. Features with dimensions smaller than this scale may be confounded with uncorrelated trajectories.



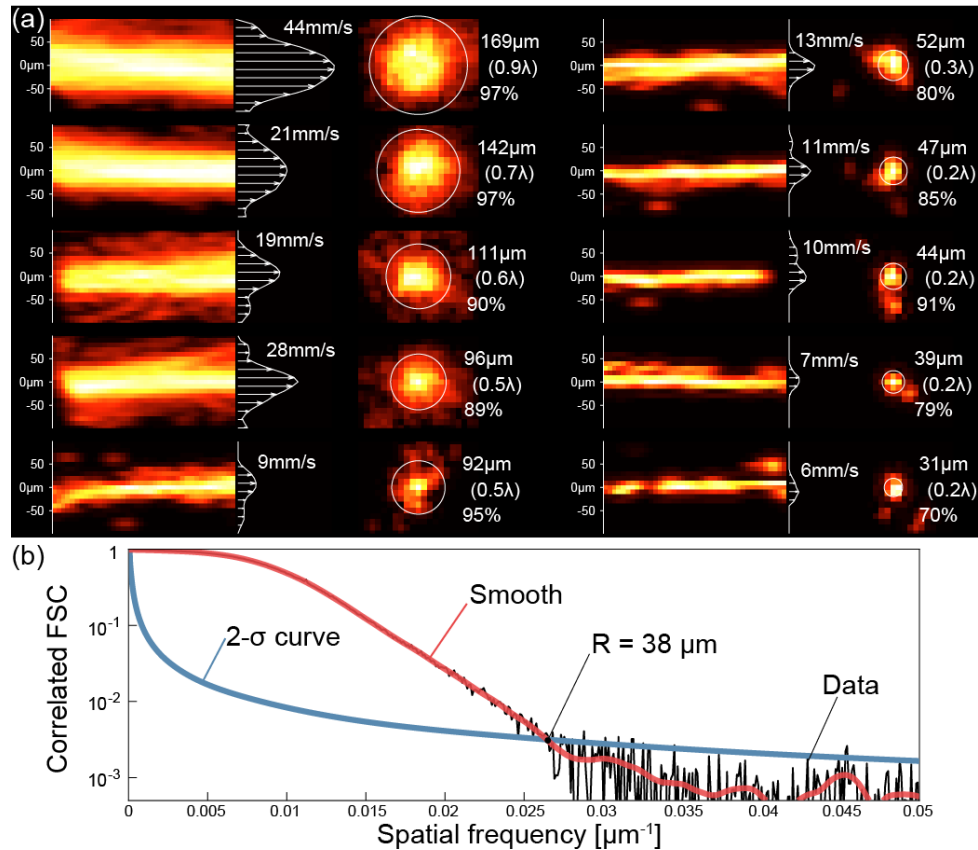
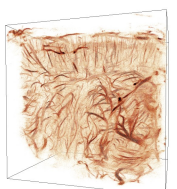


FIGURE 3.9 – (a) Manually selected blood vessels with longitudinal and axial intensity projections and main velocity profiles. The percentage represents the ratio of intensity inside the estimated radius, over a disk of 2 radii. (b) Fourier Shell Correlation computed from two subsets of the list of microbubble trajectories. The intersection with the 2- σ curve gives the maximal consistent spatial frequency.

2.5 Discussion

Previous studies demonstrated the ability of 2D ULM to reveal the microvascularization of organs in small animals [10], [13]. However, several issues plague 2D ultrasound imaging and significantly affect ULM. Among others, the velocity estimation of blood flow is poorly estimated because of the elevation projection. In this article, we proposed an implementation of volumetric ULM with a multiplexed matrix probe *in vivo*. Because multiplexing offers different ways of managing apertures in emission and reception, we compared characteristics of three multiplexing combinations with a PSF simulation and *in vitro* with a microbubbles flow in a canal. These tests confirmed the use of the "light" combination, and this was validated *in vivo* in the rat brain with an intact skull with a deep field of view. The imaging sequence and parameters described in the article provided an almost real-time sequence in data saving without the need for a specific ultrasound scanner.

4D systems composed of a high number of channels [27], [30] might be relevant to image fast phenomena such as heart contraction or shear waves (CVR higher than 2 kHz), but ULM does not require extremely high frame rates for blood flow imaging of brain microvascularization. To



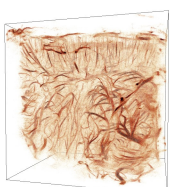
reduce the channel counts, several teams have been using sparse arrays or row-column approaches [33], [42], but these suffer from degraded PSF and lower SNR. The multiplexed sequence described in this article can be compared to a fully addressed array with multiple synthetic apertures. Both SNR and PSF shapes were preserved but required more transmissions/receptions than a fully addressed array. For blood flow estimation in the rat brain, the limited CVR of 243 Hz allowed flow detection up to 73 mm/s [fig. 3.7c].

The multiplexing system offers high flexibility management of each switch to create various sub-apertures, including random schemes [32]. We chose to keep the sub-apertures similar to the physical distribution of transducers, i.e. four groups of 32×8 to preserve the emitted pressure field homogenous. As multiplexing requires sub-aperture management, we introduced a new combination of TxAp/RxAp couples offering almost the same imaging capability as the "full" combination but with less transmission : the "light" combination. The "direct" combination studied in our article did not provide a good imaging quality as it suffered from many inhomogeneities [fig. 3.4]. The "light" and "full" combination shared closed results for both *in silico* and *in vitro* experiments with a resolution of 1,5 to 2,0 wavelengths in the *in vivo* range of imaging ([19-78] wavelengths) [fig. 3.4]. For each emitted plane, the "full" combination requires 6 additional transmissions but with no significant improvements of the imaging quality. Therefore, we used the "light" combination, which allows a higher compounded volume rate of *in vivo* imaging.

Volumetric imaging with a multiplexed probe generates a large quantity of data and can limit long acquisition. Indeed, the sensitivity of ULM imaging to detect small arteries is directly related to the time of acquisition [55]. In comparison, 3D imaging generates 10 times more data than 2D imaging (256 channels with 3 angles versus 1024 channels with 5 plane waves). Our implementation of synthetic summation makes the multiplexing system equivalent to a fully addressed probe in terms of data generation. As we used up to four synthetic emissions for one reception aperture of a plane wave, the synthetic summation reduced the total quantity of data by four without drawbacks.

Transcranial ultrasound imaging affects the signal of scatterers under the skull. The SNR and resolution can be enhanced by increasing the number of plane waves used for volume compounding. However, these extra plane waves generate more data which is problematic for long acquisition. In this study, we reached an SNR of 9 dB for microbubbles under the intact skull with only 5 compounded plane waves. As a comparison, [44] used 12 plane waves with the 4-Aixplorer system in the rat brain with craniectomy and 9 plane waves in [33] with the 2-ULA-OP system for flow canal imaging. This new generation of ultrasound scanners increases the ability of volumetric imaging with fewer plane waves, reducing the data generation and increasing the maximal compounded volume rate. Our implementation enabled 100 000 volumes acquired within 7 min with an SNR suitable for transcranial ULM.

The 3D ULM processing revealed the microvascular system down to almost 30 μm in diameter in the brain. This value was measured on manually selected vessels with enough microbubbles trajectories to get a confident estimation (at least 2 trajectories per voxel). To get a global estimation of the resolution, we used the Fourier Shell Correlation. By exploiting the correlation



of spatial frequency, it provided an overall measure, not based on a selected feature of the volume. For the current volume, the 2-sigma criterion gave a resolution of 38 μm , slightly higher than the segmented vessels. This value could be improved by extending the acquisition time. However, the maximal resolution is also limited by the localization precision, degraded by the aberration of the skull. In addition, a disorganized and sparse mesh of isolated microbubble trajectories appeared between resolved vessels [fig. 3.8]. We suggest it reflects the vascularization at a smaller scale than the localization precision, such as capillaries. Further local averaging could bring an estimation of flux or a dynamic of perfusion.

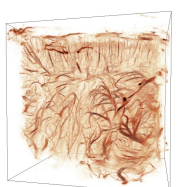
The high-resolution micro-CT scan confirms the angiography provided with ULM without hemodynamic information. Both imaging techniques show the same vascular system down to arterioles and venules. The brain morphology appears modified in micro-CT scan with tissue expansion and shrinkage due to brain fixation and extraction. Micro-CT provides a more contrasted and resolved imaging thanks to $\mu\text{Angiofil}$ perfusion coupled with an extended exposure scan ($>8\text{h}$), but few vessels can be missing if the perfusion is not total. Micro-CT is still a reference for high-resolution angiography but not suitable for non-invasive imaging nor hemodynamic angiography.

We selected a 7,8 MHz frequency as a trade-off between resolution and penetration and also the field-of-view. At higher frequencies, the absorption of the skull degrades the imaging system [56]. The field of view must be considered when selecting the frequency. In our system, the element's pitch was 2 wavelengths, and the 32 elements in the lateral direction were adapted for brain imaging of small animals. A higher frequency involves a reduced field of view or larger elements with a detrimental directivity of transducers. Lower frequencies could improve the penetration through the skull but would reduce the localization precision. Besides, bigger voxels tend to host more microbubbles and increase PSF overlapping, constraining the microbubbles' injection rate.

The volumetric field-of-view provided by this matrix array alleviated the plane selection of plane imaging, highly user-dependent in ultrasound imaging. Indeed, minimal probe alignment was necessary, and no motor was included in the system since a large volume of the brain could be observed under the probe. 3D ULM also eliminated the pre-selection of the imaging plane. Exploration of the various imaging sections could be done in post-treatment upon the entire dataset.

The association of microbubble trajectories and timestamps yielded a range of velocity of [4,3-28,4 mm/s] (for 90 % of the microbubbles). This scale was narrower than the range provided by the tracking algorithm [0-73 mm/s]. The lack of low-velocity [9], [57] can be explained by the SVD filtering that removed slowly moving signals. Lower velocity microbubbles could be enhanced with non-linear imaging methods [16], [58]. Higher velocities were excluded due to the lack of appropriate microbubble pairing.

The processing time of 3D ULM is still binding for routine usage with large cohorts of animals or patients. The current implementation with CUDA-based beamforming, non-interpolated localization scheme, and asynchronous processing reduced the processing time to 3 hours for 100 000 volumes. In addition, reducing the number of volumes to 33 000 can already provide a draft of

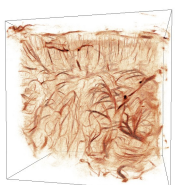


the vascularization, reducing acquisition time, data size, and processing time. Real-time imaging remains a future endeavor, and actual processing times should be compared to those requires by common imaging techniques, such as MRI or scanner (< 1 hour).

A drawback of the implementation of volumetric imaging with a MUX system is the reduced compounded volume rate. The numerous TxAp/RxAp couples imposed by the multiplexed probe limited the CVR of imaging at 243 Hz for 15 min imaging depth but was sufficient to track microbubbles up to 73 mm/s. The "direct" combination could provide a higher volume rate but with heterogenous localizations [fig. 3.5]. The main limit of a reduced volume rate arises for motion correction for rapid displacements [59]. In our experiments, the rat's head was constrained in a stereotaxic frame to prevent most head motion and did not require motion correction. However, organs such as the kidney, liver, or heart are more impacted by breathing or heart-beat and require motion correction algorithms. Furthermore, the transfer of this approach to human imaging may be more subjected to motion because the head cannot be restrained as in a stereotaxic frame, particularly in ambulatory conditions or injured patients.

The attenuation and aberration of the skull degraded the image quality in a few regions of our acquisitions [fig. 3.6], mainly under complex structures such as ridges and sutures. Attenuation could be compensated with a higher-pressure field, or by increasing the number of compounded plane waves. For the same compounded volume rate, our implementation did not tolerate additional plane waves. Due to the higher speed of sound in the bone, phase aberrations appear in the RF data and degrade the beamforming process. [60] proposed a phase aberration correction to adjust delays in the beamforming process. It seems efficient for canal imaging but requires many adaptations for volumetric imaging under the rat brain. It may reduce the shadow effect and increase the localization precision. To overcome this limitation, we decided to tilt the probe to focus on hidden zones exploiting the thin parietal bone window.

This study described 3D imaging of microvascularization with a multiplexed ultrasound scanner. ULM becomes highly beneficial when implemented in 3-dimensions as it corrects planar projection, motion, and user dependency. In particular, it avoids any bias due to plane selection during the experiment as the analysis is performed over the entire volumetric dataset. Because of its relative simplicity, this multiplexed portable system can be easily implemented in most animal imaging platforms. It improves upon other imaging modalities also impacted by depth, resolution, or incompatibilities with *in vivo* physiological measurements. The quasi-isotropic sensitivity and resolution of the probe highlighted the brain's complex vascularisation and would be interesting in other vital organs such as the kidney and heart. In neurology, it would provide a valuable tool for describing the interaction between microvascularization and brain function. Various disease processes implicating arterioles and venules, such as cancer or diabetes, could be better-described *in vivo* and studied at an early stage. It also opens the possibility for human diagnosis of microvascular diseases as it alleviates both the conventional resolution limit of ultrasound and its conventional planar implementation with a compact scanner.



2.6 Conclusion

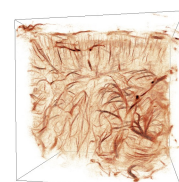
ULM reveals the microvascular system of organs in alive animals. Recent developments on ultrasound scanners and probes have permitted its extension to volumetric imaging. We demonstrated 3D transcranial ULM with a research-grade ultrasound scanner in the rat brain with an intact skull, highlighting a complex vascular and hemodynamic organization down to arterioles and venules. 3D ULM could bring promising features for the understanding and diagnostics of organs and their diseases.

2.7 Acknowledgments

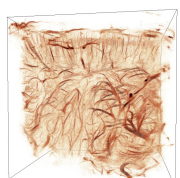
We would like to Ruslan Hlushchuk for his valuable advice on the perfusion of μ Angiofil and micro-CT scanning parameters. We also thank Dr. Christine Chappard and IMOSAR facility (Université Paris Diderot, INSERM, CNRS) for its expertise and access to micro-computed tomography.

2.8 References

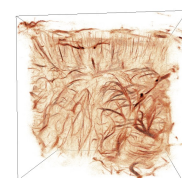
- [1] C. S. Roy and C. S. Sherrington, "On the Regulation of the Blood-supply of the Brain," *The Journal of Physiology*, vol. 11, no. 1–2, pp. 85–158, 1890, doi : 10.1113/jphysiol.1890.sp000321.
- [2] R. Hlushchuk et al., "Innovative high-resolution microCT imaging of animal brain vasculature," *Brain Struct Funct*, vol. 225, no. 9, pp. 2885–2895, Dec. 2020, doi : 10.1007/s00429-020-02158-8.
- [3] S. M. Jorgensen, O. Demirkaya, and E. L. Ritman, "Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 275, no. 3, pp. H1103–H1114, Sep. 1998, doi : 10.1152/ajpheart.1998.275.3.H1103.
- [4] A. Ertürk et al., "Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO," *Nat Protoc*, vol. 7, no. 11, pp. 1983–1995, Nov. 2012, doi : 10.1038/nprot.2012.119.
- [5] N. Renier, Z. Wu, D. J. Simon, J. Yang, P. Ariel, and M. Tessier-Lavigne, "iDISCO : A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging," *Cell*, vol. 159, no. 4, pp. 896–910, Nov. 2014, doi : 10.1016/j.cell.2014.10.010. [6] K. Chung and K. Deisseroth, "CLARITY for mapping the nervous system," *Nat Methods*, vol. 10, no. 6, pp. 508–513, Jun. 2013, doi : 10.1038/nmeth.2481.
- [7] R. Tomer, L. Ye, B. Hsueh, and K. Deisseroth, "Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues," *Nat Protoc*, vol. 9, no. 7, pp. 1682–1697, Jul. 2014, doi : 10.1038/nprot.2014.123.
- [8] E. A. Susaki et al., "Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis," *Cell*, vol. 157, no. 3, pp. 726–739, Apr. 2014, doi : 10.1016/j.cell.2014.03.042.
- [9] A. Y. Shih, "Two-Photon Microscopy as a Tool to Study Blood Flow and Neurovascular Coupling in the Rodent Brain," p. 33, 2012, doi : 10.1038/jcbfm.2011.196.
- [10] K. Christensen-Jeffries et al., "Super-resolution Ultrasound Imaging," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 46, no. 4, pp. 865–891, Apr. 2020, doi : 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.11.013.
- [11] O. Couture, B. Besson, G. Montaldo, M. Fink, and M. Tanter, "Microbubble ultrasound super-localization imaging (MUSLI)," in *Ultrasonics Symposium (IUS)*, 2011 IEEE International, 2011, pp. 1285–1287. doi : 10.1109/ULTSYM.2011.6293576.
- [12] O. Couture, V. Hingot, B. Heiles, P. Muleki-Seya, and M. Tanter, "Ultrasound Localization Microscopy and Super-Resolution : A State of the Art," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 65, no. 8, pp. 1304–1320, Aug. 2018, doi : 10.1109/TUFFC.2018.2850811.
- [13] C. Errico et al., "Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging," *Nature*, vol. 527, no. 7579, pp. 499–502, Nov. 2015, doi : 10.1038/nature16066.
- [14] L. Milecki et al., "A Deep Learning Framework for Spatiotemporal Ultrasound Localization Microscopy," *IEEE Trans. Med. Imaging*, pp. 1–1, 2021, doi : 10.1109/TMI.2021.3056951.



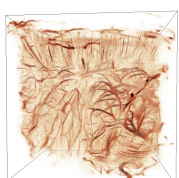
- [15] K. Christensen-Jeffries, R. J. Browning, M.-X. Tang, C. Dunsby, and R. J. Eckersley, "In Vivo Acoustic Super-Resolution and Super-Resolved Velocity Mapping Using Microbubbles," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 34, no. 2, pp. 433–440, Feb. 2015, doi : 10.1109/TMI.2014.2359650.
- [16] J. Foiret, H. Zhang, T. Ilovitsh, L. Mahakian, S. Tam, and K. W. Ferrara, "Ultrasound localization microscopy to image and assess microvasculature in a rat kidney," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 13662, Dec. 2017, doi : 10.1038/s41598-017-13676-7.
- [17] P. Song et al., "Improved Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging with Spatiotemporal Nonlocal Means Filtering and Bipartite Graph-Based Microbubble Tracking," *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 65, no. 2, pp. 149–167, Feb. 2018, doi : 10.1109/TUFFC.2017.2778941.
- [18] C. Huang et al., "Short Acquisition Time Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging via Microbubble Separation," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 6007, Dec. 2020, doi : 10.1038/s41598-020-62898-9.
- [19] F. Lin, S. E. Shelton, D. Espíndola, J. D. Rojas, G. Pinton, and P. A. Dayton, "3-D Ultrasound Localization Microscopy for Identifying Microvascular Morphology Features of Tumor Angiogenesis at a Resolution Beyond the Diffraction Limit of Conventional Ultrasound," *Theranostics*, vol. 7, no. 1, pp. 196–204, Jan. 2017, doi : 10.7150/thno.16899.
- [20] M. R. Lowerison, C. Huang, F. Lucien, S. Chen, and P. Song, "Ultrasound localization microscopy of renal tumor xenografts in chicken embryo is correlated to hypoxia," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, Art. no. 1, Feb. 2020, doi : 10.1038/s41598-020-59338-z.
- [21] W. Zhang, M. R. Lowerison, Z. Dong, R. J. Miller, K. A. Keller, and P. Song, "Super-Resolution Ultrasound Localization Microscopy on a Rabbit Liver VX2 Tumor Model : An Initial Feasibility Study," *Ultrasound in Medicine & Biology*, May 2021, doi : 10.1016/j.ultrasmedbio.2021.04.012.
- [22] J. Zhu et al., "3D Super-Resolution US Imaging of Rabbit Lymph Node Vasculature in Vivo by Using Microbubbles," *Radiology*, vol. 291, no. 3, pp. 642–650, Jun. 2019, doi : 10.1148/radiol.2019182593.
- [23] C. Demené et al., "Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients," *Nat Biomed Eng*, vol. 5, no. 3, Art. no. 3, Mar. 2021, doi : 10.1038/s41551-021-00697-x.
- [24] C. Huang et al., "Super-resolution ultrasound localization microscopy based on a high frame-rate clinical ultrasound scanner : an in-human feasibility study," *Phys. Med. Biol.*, vol. 66, no. 8, p. 08NT01, Apr. 2021, doi : 10.1088/1361-6560/abef45.
- [25] G. Montaldo, M. Tanter, J. Bercoff, N. Benech, and M. Fink, "Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 56, no. 3, pp. 489–506, Mar. 2009, doi : 10.1109/TUFFC.2009.1067.
- [26] M. Tanter and M. Fink, "Ultrafast imaging in biomedical ultrasound," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 61, no. 1, pp. 102–119, Jan. 2014, doi : 10.1109/TUFFC.2014.2882.
- [27] J. A. Jensen et al., "SARUS : A synthetic aperture real-time ultrasound system," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 60, no. 9, pp. 1838–1852, Sep. 2013, doi : 10.1109/TUFFC.2013.2770.
- [28] M. Correia, T. Deffieux, S. Chatelin, J. Provost, M. Tanter, and M. Pernot, "3D elastic tensor imaging in weakly transversely isotropic soft tissues," *Phys. Med. Biol.*, vol. 63, no. 15, p. 155005, Jul. 2018, doi : 10.1088/1361-6560/aacfaf.
- [29] L. Petrusca et al., "Fast Volumetric Ultrasound B-Mode and Doppler Imaging with a New High-Channels Density Platform for Advanced 4D Cardiac Imaging/Therapy," *Applied Sciences*, vol. 8, no. 2, p. 200, Jan. 2018, doi : 10.3390/app8020200.
- [30] J. Provost et al., "3D ultrafast ultrasound imaging in vivo," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 59, no. 19, pp. L1–L13, Oct. 2014, doi : 10.1088/0031-9155/59/19/L1.
- [31] C. Rabut et al., "4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents," *Nat Methods*, vol. 16, no. 10, pp. 994–997, Oct. 2019, doi : 10.1038/s41592-019-0572-y.
- [32] M. Bernal, B. Cunitz, D. Rohrbach, and R. Daigle, "High-frame-rate volume imaging using sparse-random-aperture compounding," *Phys. Med. Biol.*, vol. 65, no. 17, p. 175002, Sep. 2020, doi : 10.1088/1361-6560/ab9372.
- [33] S. Harput et al., "3-D Super-Resolution Ultrasound Imaging With a 2-D Sparse Array," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 67, no. 2, pp. 269–277, Feb. 2020, doi : 10.1109/TUFFC.2019.2943646.
- [34] E. Roux, F. Varray, L. Petrusca, C. Cachard, P. Tortoli, and H. Liebgott, "Experimental 3-D Ultrasound Imaging with 2-D Sparse Arrays using Focused and Diverging Waves," *Scientific Reports*, vol.



- 8, no. 1, Dec. 2018, doi : 10.1038/s41598-018-27490-2.
- [35] T. L. Christiansen, M. F. Rasmussen, J. P. Bagge, L. N. Moesner, J. A. Jensen, and E. V. Thomsen, "3-D imaging using row-column-addressed arrays with integrated apodization— part ii : transducer fabrication and experimental results," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 62, no. 5, pp. 959–971, May 2015, doi : 10.1109/TUFFC.2014.006819.
- [36] M. F. Rasmussen, T. L. Christiansen, E. V. Thomsen, and J. A. Jensen, "3-D imaging using row-column-addressed arrays with integrated apodization - part i : apodization design and line element beamforming," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 62, no. 5, pp. 947–958, May 2015, doi : 10.1109/TUFFC.2014.006531.
- [37] J. Sauvage et al., "4D Functional Imaging of the Rat Brain Using a Large Aperture Row-Column Array," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 39, no. 6, pp. 1884–1893, Jun. 2020, doi : 10.1109/TMI.2019.2959833.
- [38] C. Brunner et al., "A Platform for Brain-wide Volumetric Functional Ultrasound Imaging and Analysis of Circuit Dynamics in Awake Mice," *Neuron*, Oct. 2020, doi : 10.1016/j.neuron.2020.09.020.
- [39] J. Yu, H. Yoon, Y. M. Khalifa, and S. Y. Emelianov, "Design of a Volumetric Imaging Sequence Using a Vantage-256 Ultrasound Research Platform Multiplexed With a 1024-Element Fully Sampled Matrix Array," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 67, no. 2, pp. 248–257, Feb. 2020, doi : 10.1109/TUFFC.2019.2942557.
- [40] Y. Desailly, O. Couture, M. Fink, and M. Tanter, "Sono-activated ultrasound localization microscopy," *Applied Physics Letters*, vol. 103, no. 17, p. 174107, Oct. 2013, doi : 10.1063/1.4826597.
- [41] M. A. O'Reilly and K. Hynynen, "A super-resolution ultrasound method for brain vascular mapping," *Med Phys*, vol. 40, no. 11, Nov. 2013, doi : 10.1118/1.4823762.
- [42] J. A. Jensen et al., "Three-Dimensional Super-Resolution Imaging Using a Row-Column Array," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 67, no. 3, pp. 538–546, Mar. 2020, doi : 10.1109/TUFFC.2019.2948563.
- [43] B. Heiles et al., "Ultrafast 3D Ultrasound Localization Microscopy Using a 32x32 Matrix Array," *IEEE Trans. Med. Imaging*, vol. 38, no. 9, pp. 2005–2015, Sep. 2019, doi : 10.1109/TMI.2018.2890358.
- [44] B. Heiles et al., "Volumetric ultrasound localization microscopy of the whole brain microvasculature," Sep. 2021. doi : 10.1101/2021.09.17.460797.
- [45] C. Demene et al., "Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 34, no. 11, pp. 2271–2285, Nov. 2015, doi : 10.1109/TMI.2015.2428634.
- [46] Y. Desailly, A.-M. Tissier, J.-M. Correas, F. Wintzenrieth, M. Tanter, and O. Couture, "Contrast enhanced ultrasound by real-time spatiotemporal filtering of ultrafast images," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 62, no. 1, pp. 31–42, Jan. 2017, doi : 10.1088/1361-6560/62/1/31.
- [47] A. Yu and L. Lovstakken, "Eigen-based clutter filter design for ultrasound color flow imaging : a review," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 57, no. 5, pp. 1096–1111, May 2010, doi : 10.1109/TUFFC.2010.1521.
- [48] B. Heiles, Chavignon, Arthur, V. Hingot, Lopez, Pauline, Teston, Elliott, and O. Couture, "Performance benchmarking of microbubble-localization algorithms for ultrasound localization microscopy," *Nature Biomedical Engineering*, 2021, In press.
- [49] R. Parthasarathy, "Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers," *Nat Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 724–726, Jul. 2012, doi : 10.1038/nmeth.2071.
- [50] V. Hingot, A. Chavignon, B. Heiles, and O. Couture, "Measuring image resolution in Ultrasound Localization Microscopy," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, pp. 1–1, 2021, doi : 10.1109/TMI.2021.3097150.
- [51] R. P. J. Nieuwenhuizen et al., "Measuring image resolution in optical nanoscopy," *Nat Methods*, vol. 10, no. 6, pp. 557–562, Jun. 2013, doi : 10.1038/nmeth.2448.
- [52] N. Banterle, K. H. Bui, E. A. Lemke, and M. Beck, "Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy," *Journal of Structural Biology*, vol. 183, no. 3, pp. 363–367, Sep. 2013, doi : 10.1016/j.jsb.2013.05.004.
- [53] M. van Heel and M. Schatz, "Fourier shell correlation threshold criteria," *Journal of Structural Biology*, vol. 151, no. 3, pp. 250–262, Sep. 2005, doi : 10.1016/j.jsb.2005.05.009.
- [54] E. A. Papp, T. B. Leergaard, E. Calabrese, G. A. Johnson, and J. G. Bjaalie, "Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain," *NeuroImage*, vol. 97, pp. 374–386, Aug. 2014, doi : 10.1016/j.neuroimage.2014.04.001.



- [55] V. Hingot, C. Errico, B. Heiles, L. Rahal, M. Tanter, and O. Couture, "Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localization Microscopy," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 2456, Dec. 2019, doi : 10.1038/s41598-018-38349-x.
- [56] G. Pinton, J.-F. Aubry, E. Bossy, M. Muller, M. Pernot, and M. Tanter, "Attenuation, scattering, and absorption of ultrasound in the skull bone : Absorption of ultrasound in the skull bone," *Medical Physics*, vol. 39, no. 1, pp. 299–307, Dec. 2011, doi : 10.1118/1.3668316.
- [57] C. B. Schaffer et al., "Two-Photon Imaging of Cortical Surface Microvessels Reveals a Robust Redistribution in Blood Flow after Vascular Occlusion," *PLoS Biol*, vol. 4, no. 2, p. e22, Jan. 2006, doi : 10.1371/journal.pbio.0040022.
- [58] D. H. Simpson and P. N. Burns, "Pulse inversion Doppler : a new method for detecting nonlinear echoes from microbubble contrast agents," in *1997 IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings. An International Symposium (Cat. No.97CH36118)*, Toronto, Ont., Canada, 1997, vol. 2, pp. 1597–1600. doi : 10.1109/ULTSYM.1997.663301.
- [59] V. Hingot, C. Errico, M. Tanter, and O. Couture, "Subwavelength motion-correction for ultrafast ultrasound localization microscopy," *Ultrasonics*, vol. 77, pp. 17–21, May 2017, doi : 10.1016/j.ultras.2017.01.008.
- [60] D. E. Soulioti, D. Espindola, P. A. Dayton, and G. F. Pinton, "Super-Resolution Imaging Through the Human Skull," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 67, no. 1, pp. 25–36, Jan. 2020, doi : 10.1109/TUFFC.2019.2937733.



3 Annexes

3.1 Calibration spatiale des transducteurs de la sonde matricielle

3.1.1 Problématique

La sonde matricielle haute fréquence utilisée dans cette étude est composée de 1024 transducteurs de $300\ \mu\text{m}$ de côté qui doivent être assemblés et câblés vers le connecteur de l'échographe. La petite taille des transducteurs, le nombre élevé de connexions et leur organisation en grille complexifient la fabrication de la sonde. Celle-ci est composée de quatre panneaux de 256 transducteurs câblés, répartis sur une grille de 32 par 8. Les quatre panneaux sont finalement assemblés sur une matrice pour obtenir la taille finale. Les contraintes de fabrications imposent un espacement entre les panneaux, choisi égal à la taille des transducteurs.

En pratique, le positionnement relatif des quatre panneaux sur la matrice peut s'avérer imparfait et dégrader l'image. Les panneaux peuvent être décalés de leur position théorique et être non coplanaires. Si ces écarts ne sont pas corrigés, des artefacts importants apparaissent dans l'image sous forme de répliques en différents endroits de l'image. Par exemple, un décalage angulaire d'un panneau de 1° , entraîne un décalage latéral de $313\ \mu\text{m}$ ($1,6\lambda$) à une profondeur de $18\ \text{mm}$ (91λ). Cette erreur doit impérativement être prise en compte et corrigée pour l'imagerie ULM puisque la résolution doit s'approcher d'une dixième de la longueur d'onde.

Lors de premières imageries *in vivo*, nous avons constaté de telles répliques au niveau de certains vaisseaux à la jonction de deux sous-ouvertures [fig. 3.10].

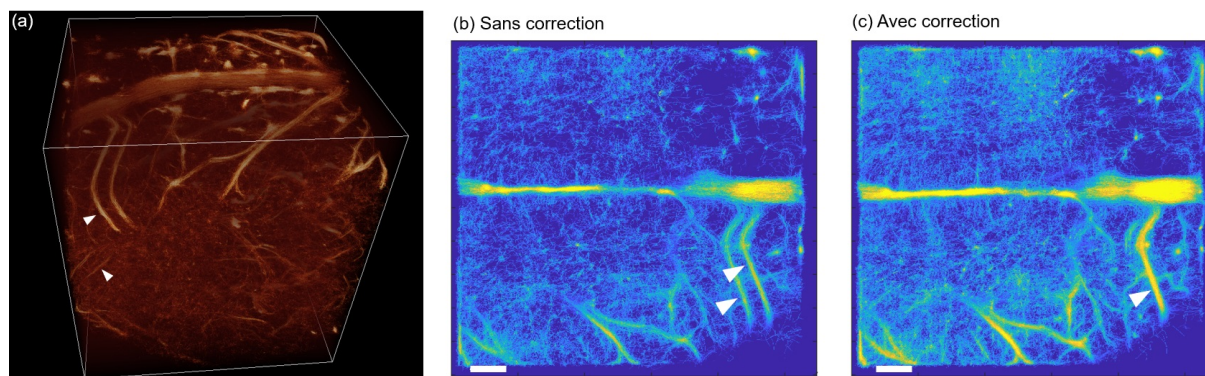
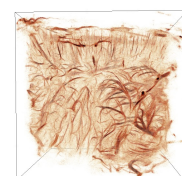


FIGURE 3.10 – (a) Rendu 3D ULM d'un cerveau de rat avec craniectomie. (b-c) Intensité maximale projetée d'une tranche axiale avec et sans correction de la position des transducteurs. (Barre d'échelle : 1 mm)

L'imagerie est alors faussée par la présence de vaisseaux répliqués artificiellement. De plus, l'énergie des microbulles dans ces zones de répliques est répartie entre les deux points de réplique, réduisant alors le ratio signal-à-bruit dans cette zone.

3.1.2 Méthode de calibration

Pour prendre en compte l'erreur de position des transducteurs, une calibration précise a été mise en place. Elle consiste à mesurer les temps de vol entre chaque transducteur et un



hydrophone pour un ensemble de positions connues. Connaissant les temps de vol, on en déduit la position du transducteur par rapport à la grille des positions de l'hydrophone qui sert de référence. En répétant cette opération, la position dans l'espace de chaque transducteur est obtenue par rapport à la grille de référence.

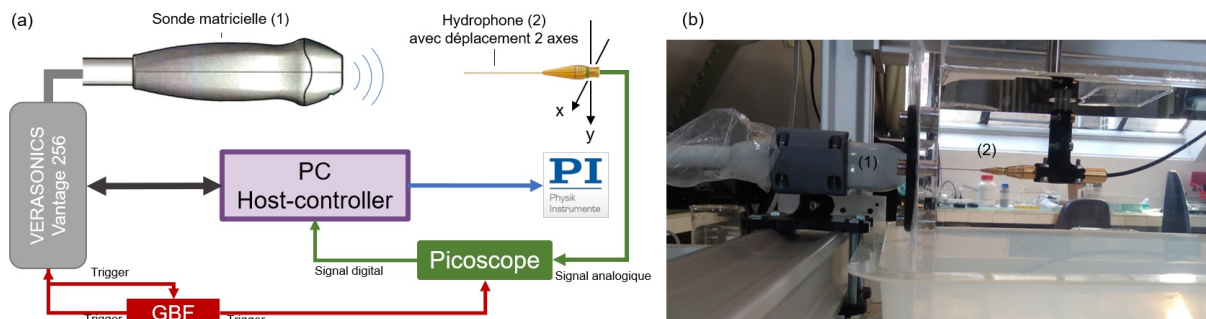


FIGURE 3.11 – (a) Schéma de la procédure de calibration des positions des transducteurs. (b) Sonde ultrasonore et hydrophone.

La mesure du temps de vol se fait en envoyant une impulsion ultrasonore de 5 demi-cycles à 7,8 MHz avec un seul transducteur avec l'échographe *Vantage* (Verasonics) [fig. 3.11]. L'impulsion se propage dans l'eau à 1480 m/s et est reçue par la pointe de l'hydrophone, puis échantillonnée à 62 MHz (8 échantillons par période) par l'oscilloscope numérique (Picoscope, PicoTechnology, G.B.). Les deux machines sont pilotées par le même ordinateur maître, et sont synchronisées avec un *trigger*¹ généré par un générateur basses fréquences.

L'ordinateur commande également le déplacement de la pointe de l'hydrophone avec des actionneurs linéaires (Physik Instrument, Allemagne). 783 positions sont utilisées dans le plan parallèle à la sonde, entre -12 mm et $+12$ mm par rapport au centre de la sonde. Chaque tir est répété 5 fois pour obtenir un bon ratio signal-sur-bruit.

Chaque signal reçu est corrélé avec l'impulsion théorique, et le temps de vol est mesuré avec une précision de l'ordre de quelques nanosecondes, donnant une précision de la distance parcourue de l'ordre de $5 \mu\text{m}$. Certains points trop bruités sont exclus [fig. 3.12b-c]. Un profil parabolique est ajusté sur les temps de vol et la position du transducteur est déduite par rapport à la grille de référence [fig. 3.12d-f].

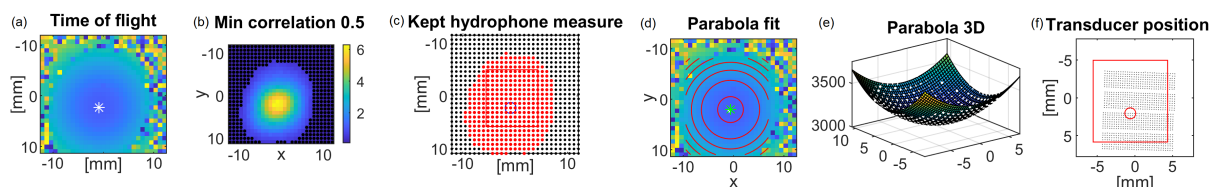
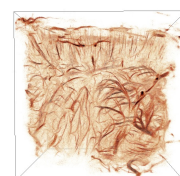


FIGURE 3.12 – Détection des temps de vol entre les transducteurs et les positions de l'hydrophone.

Une fois toutes les positions obtenues, on considère que chaque sous-ouverture de 32 par 8 est plane de par sa conception : ce sont des plaques piézoélectriques usinées pour obtenir des

1. déclencheur



éléments individuels [fig. 3.13]. On détermine alors la position de chaque sous-groupe de 256 éléments avec un centre de la sous-ouverture et son vecteur normal.

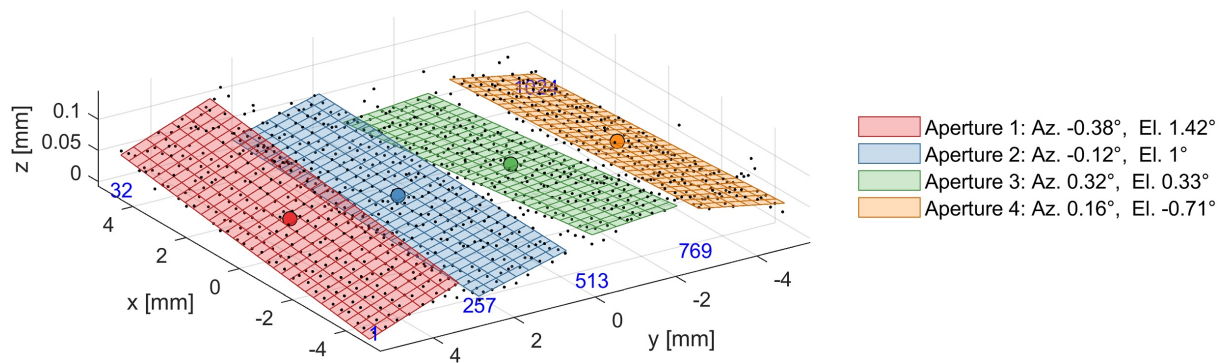


FIGURE 3.13 – Positions mesurées des transducteurs (points noirs), et orientations des quatre panneaux de la sonde matricielle.

3.1.3 Résultats

Les vecteurs normaux des panneaux sont présentés dans la table 3.2. On constate des décalages supérieurs à 1° pour les panneaux 1 et 2. Les centres des panneaux sont également décalés par rapport à leurs positions théoriques avec une erreur maximale de $86 \mu\text{m}$.

		Panneau 1	Panneau 2	Panneau 3	Panneau 4
Elevation (xz)	[°]	1,42	1,00	0,33	-0,71
Azimuth (yz)	[°]	-0,38	-0,12	0,32	0,16
Erreur X	[μm]	26 (0,13 λ)	59 (0,31 λ)	-86 (-0,45 λ)	2 (0,01 λ)
Erreur Y	[μm]	-16 (-0,08 λ)	-7 (-0,04 λ)	5 (0,03 λ)	18 (0,09 λ)
Erreur Z	[μm]	3 (0,02 λ)	-5 (-0,02 λ)	5 (0,03 λ)	-4 (-0,02 λ)

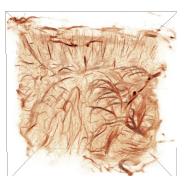
TABLE 3.2 – Vecteurs normaux des sous-ouvertures de la sonde, et erreurs de leurs centres par rapport au dessin initial.

Finalement, ces positions réelles ont été intégrées dans les codes d'acquisition et de traitement. Elles sont utilisées pour calculer les délais à l'émission pour chaque onde plane, et pour définir la position des transducteurs dans l'algorithme de [beamforming](#) pour la reconstruction des volumes. Une fois corrigées, les répliques disparaissent et la sensibilité est légèrement améliorée [fig. 3.10c].

3.2 Imagerie du cerveau avec craniectomie

3.2.1 Introduction

En complément de l'imagerie transcrânienne non-invasive par ultrasons, des imageries avec craniectomie ont été réalisées pour comparer la présence/absence du crâne. Ces expériences ont fait partie du développement de la méthode d'acquisition avec la sonde multiplexée pilotée par un échographe. Elles ont en partie été réalisées avec les expériences de Baptiste Heiles [Heiles, 2019a; Heiles, 2021a], ancien doctorant du laboratoire qui a mis en place l'ULM 3D avec un



système 1024 voies de quatre échographes synchronisés. Le protocole animal a été soumis et accepté par le comité d'éthique pour l'expérimentation Animale n° 59 "Paris Centre et Sud" pour ces expérimentations. Les deux systèmes peuvent alors être comparés dans des conditions animales similaires. Des expériences additionnelles ont été réalisées avec Cyrille Orset sur le protocole animal du financement ERC (comité d'éthique Normandie en matière d'expérimentation animale).

3.2.2 Méthodes

L'animal est anesthésié et installé dans un cadre stéréotaxique. Le dessus de la tête est rasé et aseptisé. Une incision est réalisée dans la longueur du crâne pour mettre à nu la suture sagittale [fig. 3.14]. Les os pariétaux sont ensuite découpés avec une micro fraise chirurgicale. L'opération doit être réalisée lentement pour éviter tout saignement et échauffement dans l'os cortical. Une fois le contour découpé, les deux os pariétaux sont retirés et laissent apparaître le cerveau sur environ 1 cm^2 sous la dure-mère. Celle-ci est très sensible et son altération peut entraîner des hémorragies subarachnoïdiennes. Une couche de gel échographique est déposée sur le cerveau pour le coupler avec la sonde ultrasonore.

La séquence ultrasonore utilisée est décrite dans la section 2. Le voltage utilisé est réduit pour éviter toute destruction des microbulles dans le cerveau. Le débit de perfusion en microbulles est également réduit : le SNR étant meilleur sans crâne, plus de microbulles sont détectables par la sonde.

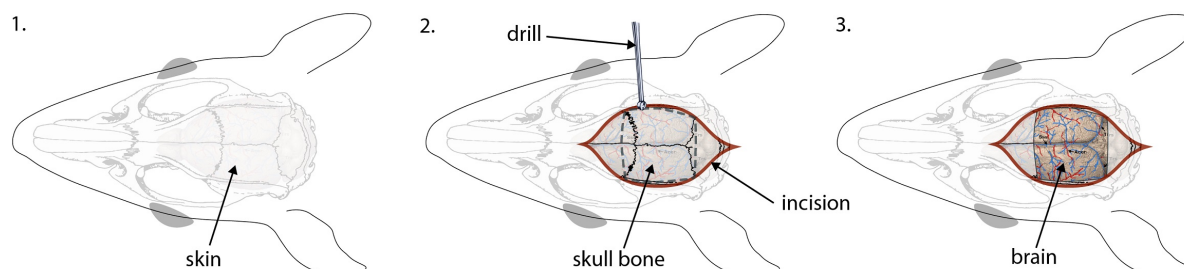
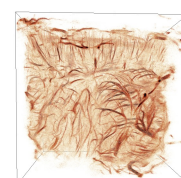


FIGURE 3.14 – Procédure de craniectomie du rat. Incision de la peau au-dessus de la suture sagittale, puis fraisage des os pariétaux pour exposer le cerveau en préservant la dure-mère.

3.2.3 Résultats

L'augmentation significative du SNR améliore à la fois la détection, et la précision de localisation pour les microvaisseaux. L'absence de suture et crêtes osseuses facilite la propagation des ultrasons dans ce milieu homogène et transparent aux ultrasons. Le cerveau est alors visible dans tout le champ de vue de la sonde, sur toute la profondeur [fig. 3.15]. À la différence des images en transcrânien, les sinus sagittaux veineux inférieur et supérieur sont bien visibles. Au niveau de la suture coronale, au plan *Bregma*, les départs des artères cérébrales vers l'extérieur sont visibles, avec les artères lenticulostrées (ou artères perforantes) qui sont des terrains privilégiés aux ischémies.



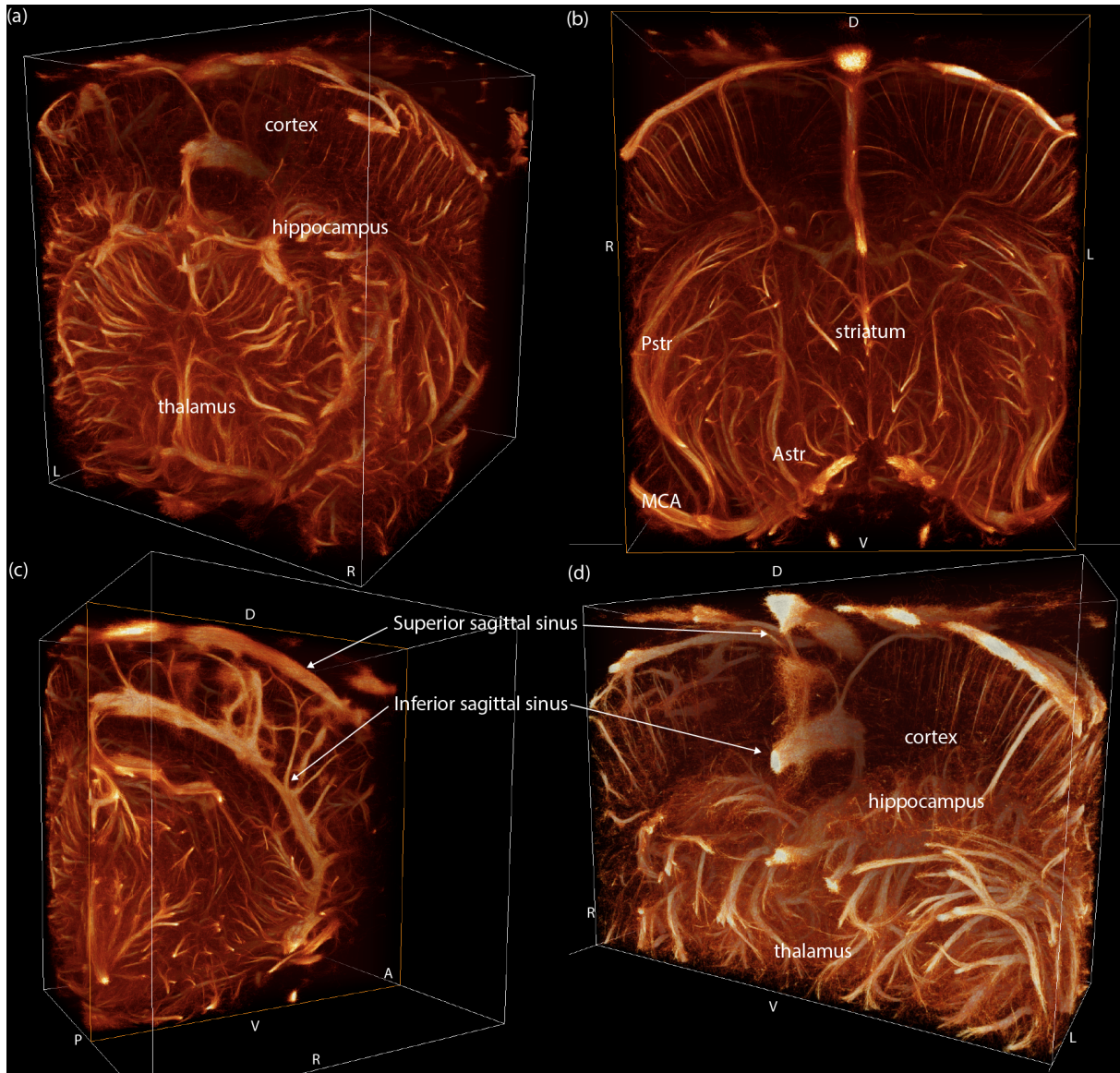
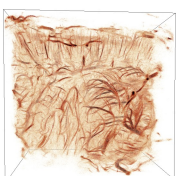


FIGURE 3.15 – Imagerie 3D ULM du cerveau de rat avec craniectomie. (a) Vue globale sur le cortex et le thalamus. (b) Plan de coupe coronale en *Bregma* avec les départs des ACM et les artères striatales (*Posterior striate* et *Anterior striate*). (c) Plan de coupe sagittale devant les sinus veineux. (d) Plan de coupe coronale devant les hippocampes. (*A-P* : axe sagittal antero-postérieur, *L-R* : axe latéral gauche-droite, *D-V* : axe axial dorsal-ventral)

À noter que lors de l'opération de craniectomie de l'animal, une hémorragie subarachnoïdienne a entraîné des vasospasmes dans le cortex. Il apparaît alors hypoperfusé avec seulement quelques petits vaisseaux irrigués sur les bords du volume [fig. 3.15d].

Les principes artères et veines du cerveau sont aisément identifiables par leur localisation et aspect dans le cerveau. Un certain nombre d'artères provenant du cercle de Willis sont labellisées avec l'arborescence décrite dans [Xiong, 2017] [fig. 3.16]. L'utilisation d'un encodage couleur de la direction axiale de flux facilite la reconnaissance des artères sur les coupes coronales et sagittales.



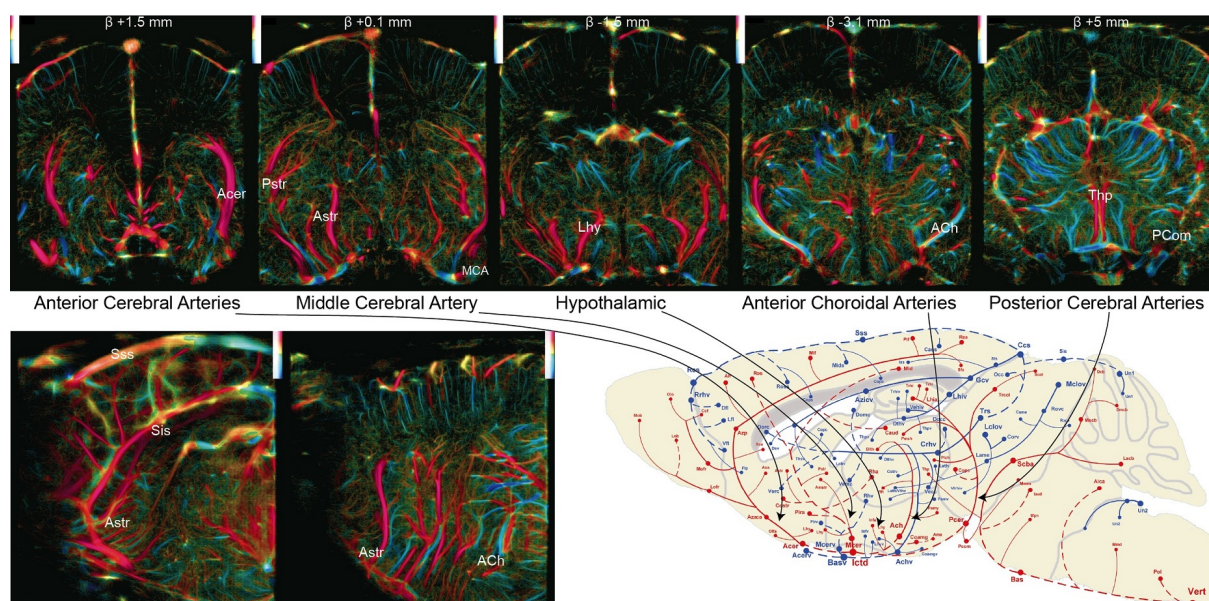


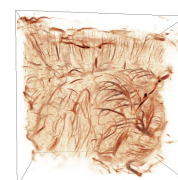
FIGURE 3.16 – Identification des principales artères de la base du cerveau sur des coupes coronales (en haut) et sagittales (en bas) d'un volume ULM. Les positions antero-postérieures sont indiquées en haut, en mm par rapport à *Bregma*. Tranches d'épaisseurs 400 μm en coronal et 800 μm en sagittal. Atlas vasculaire issu de [Xiong, 2017].

Une telle méthode d'imagerie montre une définition de toutes les artères et veines dans un large champ de vue, en profondeur et en 3D. Peu de méthodes permettent d'obtenir de tels résultats avec l'information quantitative de la vitesse et de sa direction en tout point de l'arborescence vasculaire. Comme pour l'imagerie transcrânienne, le filtrage temporel (par SVD) empêche la détection des flux vasculaires lents, présents notamment dans les plus petits vaisseaux. Dans ceux-ci, le comportement acoustique des microbulles est moins connu et l'échogénicité semble diminuée, et engendre une perte de sensibilité pour l'échographie. Enfin, le retrait de l'os pariétal est une procédure très invasive et risquée pour la préservation de la microvascularisation dans le cortex et introduit un biais important pour l'étude des constantes physiologiques par exemple.

3.3 Mesure de l'atténuation du crâne de rat

3.3.1 Problématique

L'imagerie ultrasonore du cerveau se heurte au passage du crâne avec une aberration et atténuation du front d'onde émise. Le champ de pression de part et d'autre de la boîte crânienne est donc différent, et dépend des caractéristiques locales du crâne. Lors des imageries transcrâniennes [fig. 3.17b-c], on peut observer une forte atténuation de la suture sagittale (entre les os pariétaux), des sutures entre les os pariétales et l'os frontal (suture coronale) et interpariétal (suture lambdoïde), et les crêtes osseuses (entre les os pariétaux et temporaux) [fig. 3.17a].



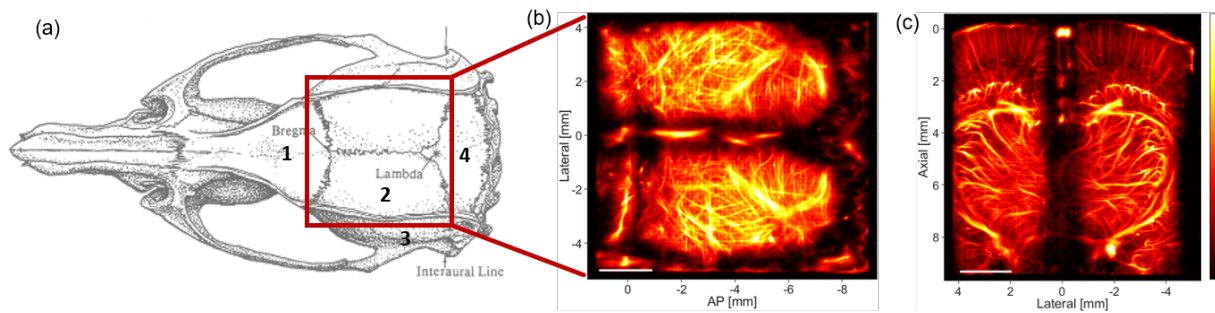


FIGURE 3.17 – (a) Crâne de rat. Os frontal (1), pariétal (2), temporal (3), interpariétal (4). (b) Projection axiale d'un volume ULM (MIP), (c) vue coronale.

Pour améliorer le signal, la pression de l'onde peut être augmentée à l'émission, mais doit être limitée pour ne pas détruire les microbulles sous le crâne. L'atténuation du crâne a donc été mesurée sur quelques crânes *ex vivo* pour déterminer la pression maximale à émettre par la sonde ultrasonore.

3.3.2 Méthodes

Des prélèvements de crânes de rats (6-8 semaines) ont été récupérés à la suite d'autres expériences réalisées au laboratoire. Ils sont principalement composés des deux os pariétaux. Un système de calibration a été mis en place devant la sonde ultrasonore, avec un hydrophone monté sur un système de déplacement motorisé 3 axes permettant la mesure précise du champ de pression. Le scan est réalisé latéralement, dans l'axe coronal, avec et sans le crâne entre la sonde et l'hydrophone [fig. 3.18a]. En chaque point, sont mesurés les pics de pressions positifs (PPP) et négatifs (PNP) [fig. 3.18b]. Les impulsions envoyées par l'hydrophone sont similaires à celles utilisées *in vivo* : 4 demi-cycles à 7,8 MHz avec une tension de 16 V. La directivité de l'hydrophone n'a pas été prise en compte pour les mesures (gain à -6 dB vers 30° .)

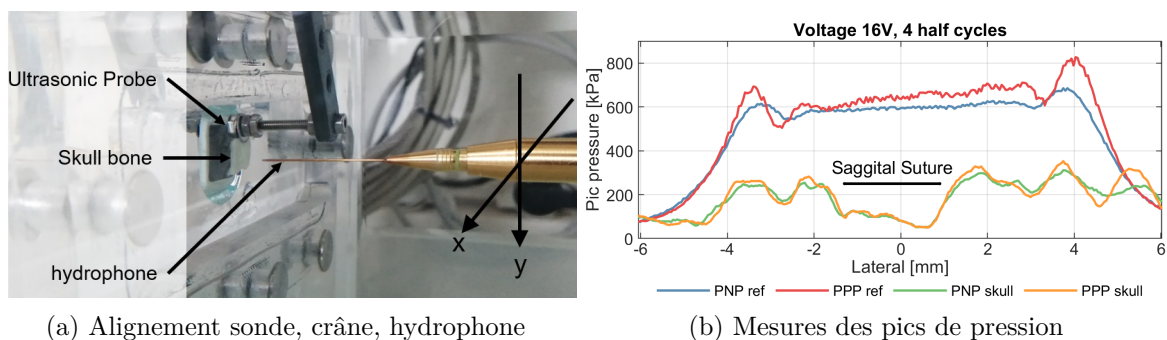
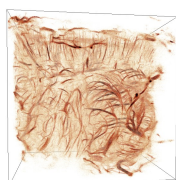


FIGURE 3.18 – (a) Système de calibration avec sonde ultrasonore, le crâne de rat, et l'hydrophone sur platine motorisée. (b) Mesures des PNP et PPP le long de l'axe coronal, de part et d'autre de la suture sagittale.

Le système de calibration a également été utilisé pour mesurer la réduction du champ de pression lors de l'angulation des ondes planes. L'augmentation des angles permet une amélioration théorique de la résolution [section 3.2.2], mais est limitée par la directivité de la sonde. À



partir d'un certain angle, le champ de pression émis par la sonde est réduit considérablement car l'énergie envoyée par les transducteurs n'est pas suffisante dans la direction voulue. La directivité des transducteurs peut s'écrire avec l'approximation de Fraunhofer [Cobbold, 2007] :

$$D(\theta) = \frac{\sin\left(\pi \cdot \sin(\theta) \frac{d}{\lambda}\right)}{\pi \cdot \sin(\theta) \frac{d}{\lambda}} \quad (3.4)$$

Avec $D(\theta)$ la directivité, d la largeur du transducteur rectangulaire, et λ la longueur d'onde. Pour la sonde utilisée, avec une largeur de transducteur de $300 \mu\text{m}$ et une longueur d'onde de $197 \mu\text{m}$, l'ouverture angulaire est de l'ordre de 23° pour une division par 2 de la pression. Les mesures de PNP et PPP sont réalisées avec et sans crâne, pour différents angles d'émissions de 0° à 15° .

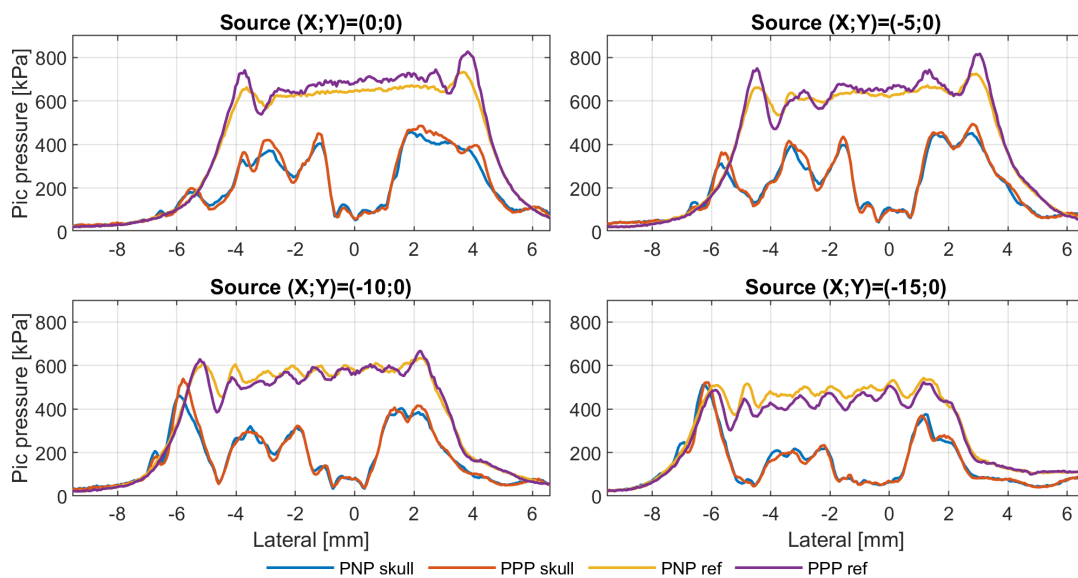


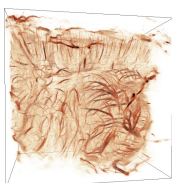
FIGURE 3.19 – Mesure de pics de pressions avec (*skull*) et sans crâne (*ref*) pour différents angles d'émission.

3.3.3 Résultats

Les mesures de pics de pression avec et sans crâne ont permis de régler la pression d'émission pour atteindre des seuils maximaux d'imagerie dans le cerveau de l'ordre de 400 kPa en PPP et PNP, soit un MI^2 de $0,14$. Cette pression est équivalente à celle mesurée dans les conditions d'imagerie *in vitro* dans le canal d'agar-agar sans destruction des bulles. On constate une forte atténuation au niveau de la suture sagittale qui explique les zones d'ombres observées dans les images ULM.

Nous avons essayé d'utiliser une apodisation réduisant la pression au niveau des os pariétaux pour maximiser le champ au niveau de la suture. De cette manière la pression émise par la sonde peut être augmentée. Les mesures réalisées ne sont cependant pas convaincantes du fait de la largeur de la suture ($< 1 \text{ mm}$), étroite devant celle des transducteurs. Le profil de l'apodisation

2. *Mechanical Index* (indice mécanique)



était constant hormis les 2 ou 3 transducteurs devant la suture. Cette solution n'a pas été retenue.

Les mesures réalisées avec angulation des ondes émises ont montré la limitation de la directivité de la sonde. Dès 10° d'angulation, le pic de pression est réduit d'environ 100 kPa. Au-delà, la réduction est trop importante. Des angles différents ont été testés *in vivo* entre 5 et 10°, mais n'ont pas montré de différences apparentes dans les images ULM reconstruites.

3.4 Temps d'acquisition et de reconstruction

L'ULM nécessite l'accumulation d'une multitude de localisations de microbulles. Plus le nombre de localisation est élevé, meilleure la qualité de l'image sera. En 2D, il est commun d'avoir des séquences d'imageries longues de plusieurs minutes, avec des quantités de données modérées (<10 Go) et un temps de reconstruction à peu près égale au temps d'acquisition [Heiles, 2021b]. Le passage à l'imagerie 3D apporte une contrainte supplémentaire sur la quantité de données générées. L'augmentation significative des données nécessite des temps de transfert et des espaces de stockage conséquents. Les temps de traitement dépassent rapidement plusieurs heures.

Pour une même acquisition, plusieurs volumes ULM ont été reconstruits avec différents temps d'acquisition de 10 sec à 7 min [fig. 3.20]. Dès 30 sec d'acquisition, les premiers gros troncs vasculaires commencent à apparaître. Il faut cependant attendre 3 min pour voir se dessiner les artérioles et veinules du cortex. Au-delà, le remplissage se fait dans les plus petits vaisseaux, avec vraisemblablement le lit capillaire.

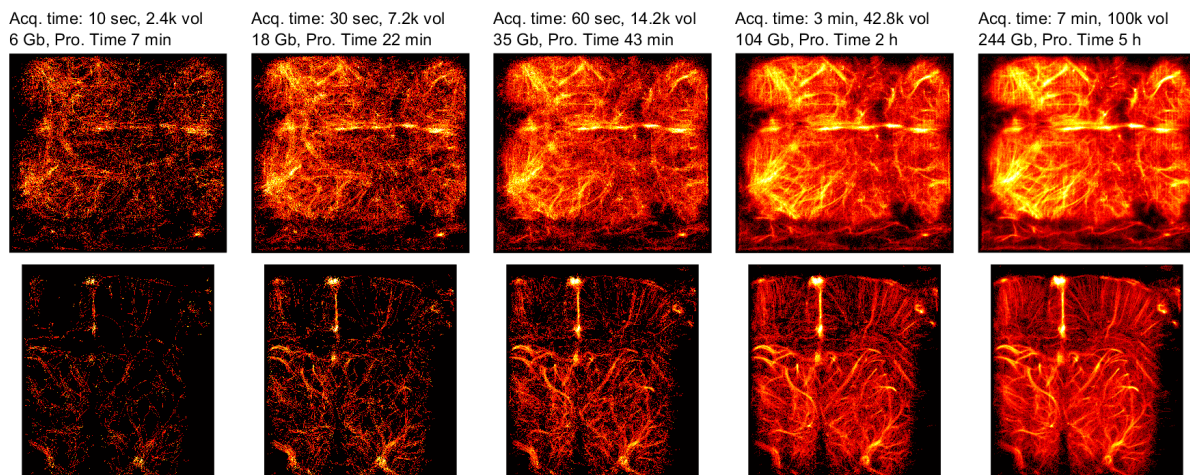
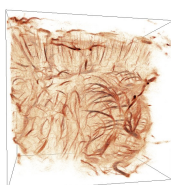


FIGURE 3.20 – Projections axiales et coronales pour plusieurs nombres de volumes acquis de 10 sec à 7 min.

Contrairement à l'imagerie 2D [Hingot, 2019], la courbe saturation a un comportement linéaire pour cette taille de reconstruction au moins jusqu'à 100 000 volumes [fig. 3.21]. La tendance devient exponentielle à partir d'une reconstruction avec des voxels de 50 μm ou pour beaucoup plus d'images acquises.



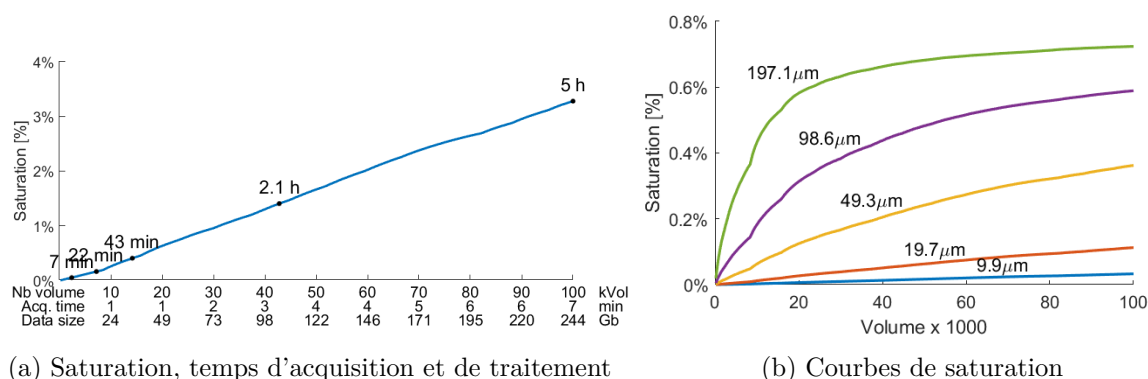


FIGURE 3.21 – (a) Indice de saturation en fonction du nombre de volumes acquis, les valeurs indiquées correspondent au temps de traitement ULM 3D. (b) Courbes de saturation pour plusieurs tailles de voxels reconstruits.

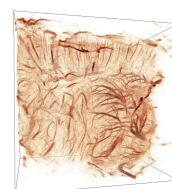
Le nombre de volumes à acquérir a été finalement fixé à 100 000 volumes comme un compromis entre la description de la microvascularisation et la quantité de données générées. Utilisé en routine sur les animaux, il était nécessaire de réaliser plusieurs volumes ULM en l'espace d'une demie-journée. L'ordinateur possédait 2 To de mémoire *NVMexpress*, permettant de réaliser jusqu'à 8 volumes complets sans attendre des temps de transfert vers un disque dur.

Les temps de traitement ont également une importance. Dans notre cas, le traitement se fait nécessairement *a posteriori*. Pour des expériences nécessitant une imagerie pseudo temps réel, des principaux troncs vasculaires par exemple, le nombre de volumes peut être réduit à une dizaine de milliers d'images, avec un temps de reconstruction inférieur à une demi-heure.

3.5 Imagerie du cerveau de souris en transcrânien

Au cours des expériences de laboratoire, nous avons eu l'occasion de tester le système d'imagerie 3D ULM sur quelques souris. Les animaux utilisés proviennent d'une autre expérience avec un autre protocole animal déposé et accepté pour l'induction d'AVC.

Le crâne étant plus fin que celui de rat, les imageries ont été réalisées directement avec crâne intact sur toute la profondeur du cerveau et révèlent presque toute la vascularisation du cerveau [fig. 3.22a-b]. Le champ de vue de la sonde couvre une grande partie du cerveau avec presque toute la largeur du cortex [fig. 3.22c-d]. Les sutures sagittales et coronales restent néanmoins occultant pour l'échographie et empêche la localisation des microbulles en certains endroits [fig. 3.22d-e].



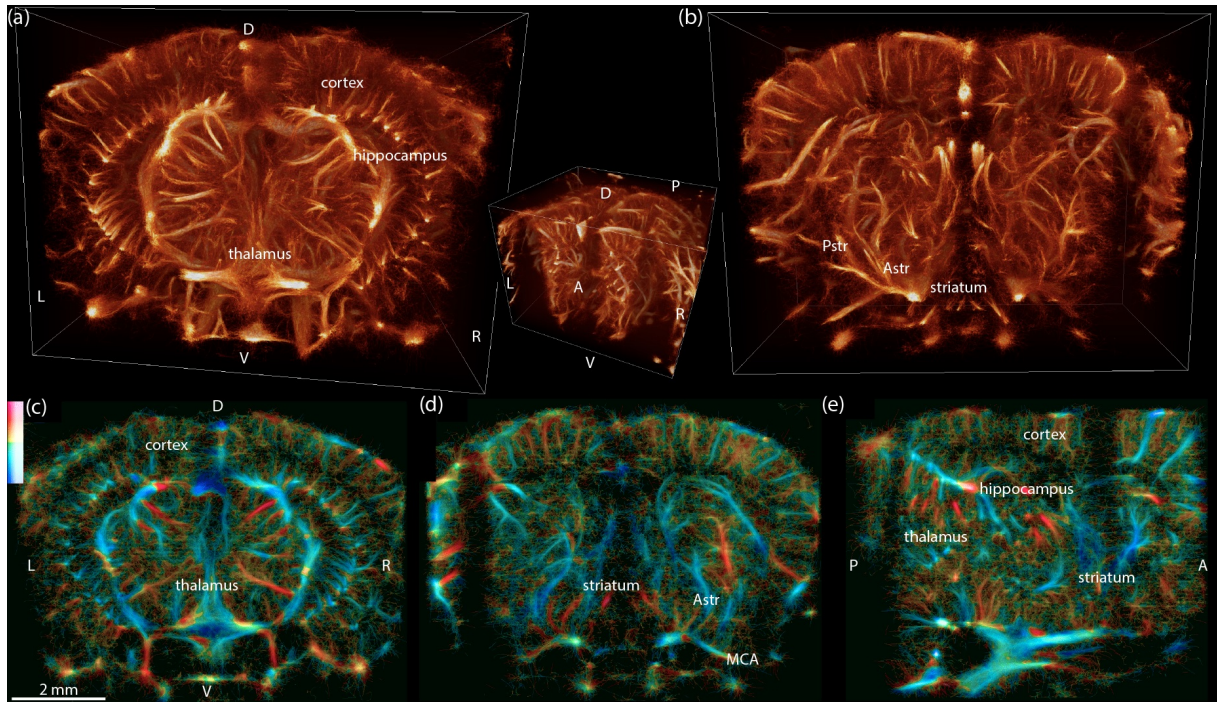
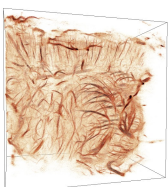


FIGURE 3.22 – Imagerie 3D ULM du cerveau de souris avec crâne intact. (a) Vues globales sur le cortex et le thalamus (*Bregma* ~ -2 mm), et (b) sur le striatum avec les départs des artères striatales (*Astr* et *Pstr*) en *Bregma*. (c) Plans de coupe coronale en *Bregma* ~ 2 mm, avec orientation des flux (bleu/rouge vers le haut/bas), et (d) en *Bregma*. (e) Plan de coupe sagittale devant les hippocampes. (*A-P* : axe sagittal antero-postérieur, *L-R* : axe latéral gauche-droite, *D-V* : axe dorsal-ventral)

Cette expérience a un but uniquement exploratoire et n'a pas été optimisée ni répliquée. La résolution apparente semble inférieure à celle chez le rat, mais nécessiterait d'être renouvelée avec les dernières séquences d'acquisition et de traitement.



Chapitre 4

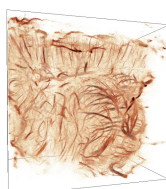
Détection et caractérisation des accidents vasculaires cérébraux en phase précoce

Objectifs

La neuroimagerie est nécessaire pour la classification des AVC et orienter un traitement thérapeutique dans les plus brefs délais. La microscopie par localisation ultrasonore apporte une angiographie résolue en un temps restreint avec un système simple en comparaison au scanner et à l'IRM. L'objectif de ce chapitre est d'imager en phase précoce des AVC ischémiques et hémorragiques chez le petit animal et distinguer des différences de troubles de la vascularisation et leur évolution.

Sommaire

1	Introduction	154
1.1	Contexte de l'étude	154
1.2	Objectif	154
1.3	Méthodes générales	154
1.4	Résultats	155
1.5	Conclusion	156
2	Article : <i>In vivo 3D ULM reveals differential patterns of perfusion losses at the early phases of ischemic and hemorrhagic strokes in the rat</i>	157
2.1	Abstract	158
2.2	Introduction	158
2.3	Methods	159
2.4	Results	163
2.5	Discussion	169
2.6	Conclusion	171
2.7	Acknowledgements	171
2.8	Contributions	172
2.9	Disclosure	172
2.10	Competing interests	172
2.11	Bibliography	172



1 Introduction

1.1 Contexte de l'étude

L'accident vasculaire cérébral se caractérise par un trouble de la vascularisation soudaine dans une partie du cerveau. La perte de perfusion entraîne rapidement une mort cellulaire et neuronale induisant des pertes cognitives importantes avec une dégradation rapide en quelques heures, voir le décès. La prise en charge doit se faire dans les plus brefs délais pour espérer endiguer ces pertes. La neuroimagerie est l'étape centrale de la prise en charge et doit pouvoir caractériser l'AVC pour orienter un traitement adéquat pour l'ischémie ou l'hémorragie.

Dans les parcours fléchés pour l'AVC, la neuroimagerie est réalisée par scanner ou IRM et offrent une bonne caractérisation des pathologies. Ces grands imageurs sont disponibles principalement dans les grands hôpitaux où des services sont dédiés à la prise en charge. Ils ne peuvent cependant pas être répétés pour le suivi de l'évolution, ni transportés au chevet du patient.

L'imagerie ultrasonore transcrânienne est plus disponible et simple à mettre en place mais ne permet pas en l'état actuel une sensibilité et résolution suffisantes pour le diagnostic. En effet, sa résolution et la perte de sensibilité à cause du crâne rendent vaine cette application de l'échographie. De plus, elle est limitée à un plan d'imagerie qui doit être sélectionné judicieusement par un opérateur expert.

La microscopie par localisation ultrasonore volumétrique solutionne ces problématiques avec une nette amélioration de la résolution et de la sensibilité à travers le crâne. Le caractère 3D apporte un large champ de vue, une sensibilité isotrope et la possibilité d'un diagnostic *post* acquisition.

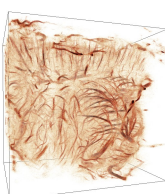
1.2 Objectif

L'objectif de cette étude est l'utilisation de l'ULM volumétrique pour le diagnostic non invasif de l'AVC chez le petit animal en phase précoce, et la comparaison des modifications microvasculaires entre les modèles d'ischémie et d'hémorragie. Un modèle ischémique d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, et un modèle d'hémorragie du striatum sont observés en phase précoce et le jour d'après grâce à ULM 3D. L'établissement d'un indice de diffusion microvasculaire atteste des évolutions différentes pour les deux modèles.

1.3 Méthodes générales

Le système d'imagerie 3D ULM que j'ai développé dans le chapitre précédent a été utilisé en routine sur une cohorte de rats ayant subis des modèles d'AVC.

Le modèle ischémique ($N = 4$) est une occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Une injection de thrombine dans l'artère entraîne la formation d'un caillot de fibrine privant d'apport sanguin la partie avale dans le cortex. Le modèle hémorragique ($N = 5$) est réalisé par l'injection de collagénase dans le striatum qui diffuse dans les tissus et dilate les vaisseaux jusqu'à leur rupture. L'imagerie 3D ULM est réalisée avant l'induction de l'AVC, en phase précoce à 30 minutes et 1h30. L'animal est ensuite réveillé. Le jour suivant, une imagerie de contrôle est réalisée en ULM



puis à l'IRM pour valider l'œdème et/ou l'hématome.

Les volumes ULM sont reconstruits et recalés sur un atlas anatomique du cerveau de rat. Un indice de diffusion microvasculaire (**MDI**¹) est établi pour traduire la densité de microvaisseaux imagés par ULM. Pour l'ischémie, il est évalué sur les principaux territoires anatomiques concernés : le striatum, le thalamus, les hippocampes et le cortex séparé en deux zones associées aux artères cérébrales (antérieure et moyenne). Dans un second temps, des régions d'intérêts (sphères d'environ 1 mm de diamètre) sont positionnées dans le cerveau pour réaliser une comparaison normalisée. Ces points de mesure sont positionnés dans le cortex pour l'ischémie, dans le cœur de l'hémorragie, et dans le thalamus. Cette dernière région est utilisée pour normaliser les valeurs temporellement ou spatialement.

1.4 Résultats

L'imagerie ULM révèle une part importante du cerveau avec une résolution des artérioles et veinules. L'augmentation du signal par les microbulles offre une imagerie sur toute la profondeur du cerveau. Seules les sutures (sagittale et coronale) et les crêtes osseuses empêchent l'imagerie sous ces endroits.

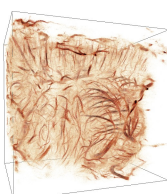
L'imagerie de l'ischémie en phase précoce montre une large zone du cortex privée de perfusion. Cette région bien délimitée suit l'anatomie du cortex. L'étude du **MDI** atteste une perte de 83 % 30 minutes après l'injection de thrombine par rapport à l'imagerie de contrôle. Seule la zone corticale associée à la **ACM** subit une diminution significative. L'étude avec les régions d'intérêts évite les différences de champs de vue entre les imageries à cause du placement de la sonde par rapport au crâne, mais nécessite de les placer aux endroits opportuns. Les mesures confirment la perte soudaine et quasi-totale dès le début de l'ischémie.

L'hémorragie se distingue par une perte plus diffuse de la vascularisation avec une diminution graduelle des petits vaisseaux, puis des vaisseaux plus importants jusqu'à 24h après l'induction de l'AVC. La mesure de l'indice de diffusion confirme une évolution lente avec une perte d'environ 30 % au cours des premières heures, et 80 % à 24h.

La répétition de l'expérience sur plusieurs animaux montre une tendance commune chez l'ischémie (N = 4), avec une perte moyenne de 88 % à 30 minutes par rapport à l'imagerie de contrôle. En revanche, les résultats pour l'hémorragie (N = 5) sont plus variés avec perte moyenne de 40 % à 30 minutes mais une déviation standard de 14 %.

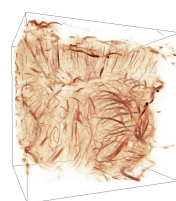
Enfin, les indices sont comparés spatialement dans chaque acquisition, entre la zone de l'AVC et la référence dans le thalamus. Une perte franche de plus de 90 % s'établit entre le cortex et le thalamus pour l'ischémie. Les résultats pour l'hémorragie sont moins convaincants avec une grande disparité. Cette caractérisation pourrait permettre une identification des occlusions de la **ACM** lors de suspicion d'AVC.

1. *Microvascular Diffusion Index* (indice de diffusion microvasculaire)



1.5 Conclusion

L'ULM 3D apporte un nouvel outil pour l'imagerie vasculaire cérébrale avec un système simple, non invasif, et non irradiant. L'étude sur les modèles d'AVC chez le rat montre une tendance intéressante pour l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne en calculant l'indice de diffusion microvasculaire. À l'inverse, l'hémorragie semble plus difficile à caractériser compte tenu de l'aspect diffus et variable de la lésion. Avec une adaptation à l'homme, et des biomarqueurs robustes, ce nouvel appareil d'imagerie semble pertinent pour venir en soutien des neuroimagineurs actuels pour la prise en charge rapide de l'AVC, et pour un suivi personnalisé pendant la convalescence.



2. Article : *In vivo 3D ULM reveals differential patterns of perfusion losses at the early phases of ischemic and hemorrhagic strokes in the rat*

2 Article : *In vivo 3D ULM reveals differential patterns of perfusion losses at the early phases of ischemic and hemorrhagic strokes in the rat*

Article soumis le 20/11/2021 dans *Theranostics*

In vivo 3D ULM reveals differential patterns of perfusion losses at the early phases of ischemic and hemorrhagic strokes in the rat

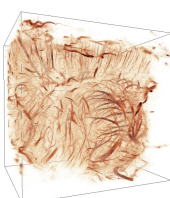
Arthur Chavignon¹, Vincent Hingot¹, Cyrille Orset², Denis Vivien^{2,3}, Olivier Couture¹

¹Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Department Laboratoire d'Imagerie Biomedicale, Paris, France,

²Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1237, Etablissement Français du Sang, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Caen, France,

³Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France.

Documents complémentaires (vidéos) accessibles avec la publication à venir.



2.1 Abstract

Stroke diagnosis is a critical part of the care of cerebral hemorrhage and ischemia. A rapid and accurate diagnosis reduces the delay to an appropriate treatment, either thrombolytic or neurosurgical. Actually, CTscan and MRI are the gold standards for this purpose with constraints of accessibility, availability, and contraindication. The development of Ultrasound Localization Microscopy has enabled new perspectives for ultrasound imaging with increased sensitivity, penetration depth, and resolution for transcranial imaging. In addition, volumetric imaging increases the field of view and provides a precise description of microvascular hemodynamic.

Methods : In this study, an ischemic model of MCA occlusion was induced on rats ($N = 4$) and imaged in the early phase with volumetric ULM. The perfusion losses were compared with a cerebral hemorrhage model induced on a second cohort ($N = 5$).

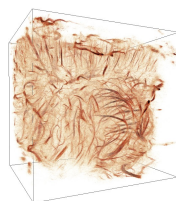
Results : The volumetric ULM performed in the early phase of ischemic stroke revealed a large hypoperfused area in the cortex following its anatomical delimitation. In the hemorrhagic stroke model, the hypoperfused area was smaller and diffused. The computation of a microvascular diffusion index highlighted different patterns of perfusion loss during the first 24 h.

Conclusion : Volumetric ULM is a new neuroimaging device with high resolution, sensitivity, safe, and a simple device. This first proof of concept on the small animal is a primary step toward diagnosis and monitoring of human strokes.

2.2 Introduction

Stroke is among the most serious health issues of the century with more than 13 million cases every year worldwide [1], [2]. Most of them, 80 %, are ischemic strokes that occur when the cerebral blood flow is dramatically reduced, depriving parts of the brain of oxygen and glucose [3]. The other 20 % are hemorrhagic strokes with blood leaks into the brain parenchyma due to a rupture of a vessel, leading to both hypoperfusion and increased intracerebral pressure [4]. In both cases, non-supplied tissues die in a few hours and leave patients with heavy cognitive impairments and high chances of dying. The care of ischemic stroke is rtPA-mediated fibrinolysis combined when possible with mechanical thrombectomy [5]. The treatment of hemorrhagic stroke consists of intracerebral blood removal and/or decompressive craniectomy [6], [7]. In both cases, time is brain, with a necessity to make appropriate interventions as soon as possible.

Thus, stroke management relies heavily on cerebral imaging techniques used to make early diagnosis and monitor potential complications. In particular, imaging is mandatory in the acute phase (less than 24 h) to address patients for treatments and/or neurosurgeries [8]–[10]. It would also be needed in the subacute phase of the disease (24 h to 5 days) to monitor secondary cerebral hypoperfusion and/or to detect serious complications such as vasospasms after hemorrhagic stroke [11] and vascular reorientations [12]. Although early brain imaging is performed thanks to CT or MRI to discriminate between ischemic and hemorrhagic strokes, post-stroke monitoring is insufficiently performed. Indeed, imaging is performed in most cases with CT scans or MRI, which unfortunately are neither easily repeatable, possible at the bedside and usually overbooked.



Ultrasound imaging is currently not recommended for stroke diagnosis. The human skull affects the propagation of acoustic waves and hinders the resolution and sensitivity for microvascular brain imaging. However, the advantage of ultrasound imaging are multiple : repeatable, safe, bedside, affordable and mainly available, and is already used to monitor major cerebral arteries with transcranial Doppler [13]. The introduction of Ultrasound Localization Microscopy (ULM)[14]–[18] may partly solve the lack of sensitivity and resolution thanks to intravascular microbubbles. The better image quality enables imaging of the small vessels behind the human skull and provides an accurate description of brain vascularization [19], [20]. In addition, the increased frame rate provided by ultrafast ultrasound scanners [21] enables the velocity measurement of microbubbles [18]. Nonetheless, these first proof of concept are limited by the elevation projection of 2D imaging and would require a plane-by-plane exploration of the brain with an experienced experimenter.

The elevation projection was solved with the emergence of volumetric imaging with a high volume rate [22]–[25]. These systems are composed a thousand of transducers and provided a large field of view for 3D ULM [26]–[29]. Therefore, the system is no longer limited by elevation projection with a large field of view, an unbiased velocity estimation and a quasi-isotropic resolution in-depth even though the intact skull bone[30].

In this study, we introduced 3D ULM to describe the perfusion losses in cerebral microvascularization in the early phase of induced ischemic and hemorrhagic stroke in the rat. Cerebral ischemia was performed following a thromboembolic middle cerebral artery (MCA) occlusion [31]–[33], and intracranial hemorrhage consisted of a collagenase injection in the striatum [34]. A microvascular diffusion index was devised and evaluated at different stages and locations of the brain and demonstrated different patterns of perfusion losses between stroke' models. We show evidence that 3D ULM could be a relevant microvascular imaging modality to detect perfusion changes in the acute phase of stroke. This new device may diversify imaging tools for stroke triage, with better availability than MRI and CT scan.

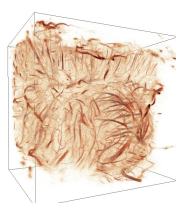
2.3 Methods

2.3.1 Animal experiments

Animals' experiments were performed under guidelines from the European Community Council (2010/63/EU) and approved by the protocol APAFIS #22544 validated by the French ethics committee "Comité d'éthique Normandie en matière d'expérimentation animale".

Sprague-Dawley male rats of 6-7 weeks old were used for this experiment, divided into two groups for ischemic model ($N = 4$) and hemorrhagic model ($N = 5$). All animals were anaesthetized with a mix of isoflurane (2%) and nitrous oxide and installed in a small animal stereotaxic frame (David Kopf stereotaxic instrument, Tujunga, CA, USA). The temperature of animals was regulated at 38 °C with a heating pad and a rectal probe.

The top of the head was shaved, and the skin was incised for the stroke model's induction and the convenience of ultrasound imaging (fig. 4.1B). The removal of the scalp did not affect the ULM results.



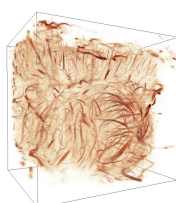
2.3.2 Stroke models in the rat

The ischemic model was described in [32], [33] with an injection of thrombin in the MCA (fig. 4.1B). The skin and muscle were incised between the eye and the ear on the right side. The temporal bone was drilled, and the dura was excised to access the branch of the MCA. 3 μ l of murine alpha thrombin (4 UI/ μ l) were injected with a micropipette inside the lumen. The thrombin-induced a fibrin clot, occluding the lumen of the MCA. The micropipette was removed a few minutes afterward when the fibrin clot was stabilized.

The hemorrhage model was induced with collagenase inside the striatum with the injection of 2 μ l of collagenase (fig. 4.1B) [34], [35]. A small hole of 1 mm diameter was drill through the parietal bone, and a micropipette was inserted at the stereotaxic coordinates Antero-posterior : *Bregma* -1,3 mm, Lateral : 3,5 mm, depth : 4,5 mm. The collagenase was pneumatically injected. The micropipette was slowly removed few minutes after the end of the injection.

2.3.3 Stroke models imaging

Each stroke model follows the same timeline with a control (t0) ULM imaging before the stroke induction (fig. 4.1A). Ischemic or hemorrhagic stroke models were then induced, and two ULM acquisitions were realized at 30 minutes and 1h30 after the induction. In the end, the catheter was removed, the incision sutured, and the animal was waked up and replaced in his cage for the night. The day after (D+1), the animal was anaesthetized again and imaged with the same position of the ultrasonic probe. Most animals were then scanned with MRI with T₂ and T₂ weighted sequences (7 T, Bruker, USA).



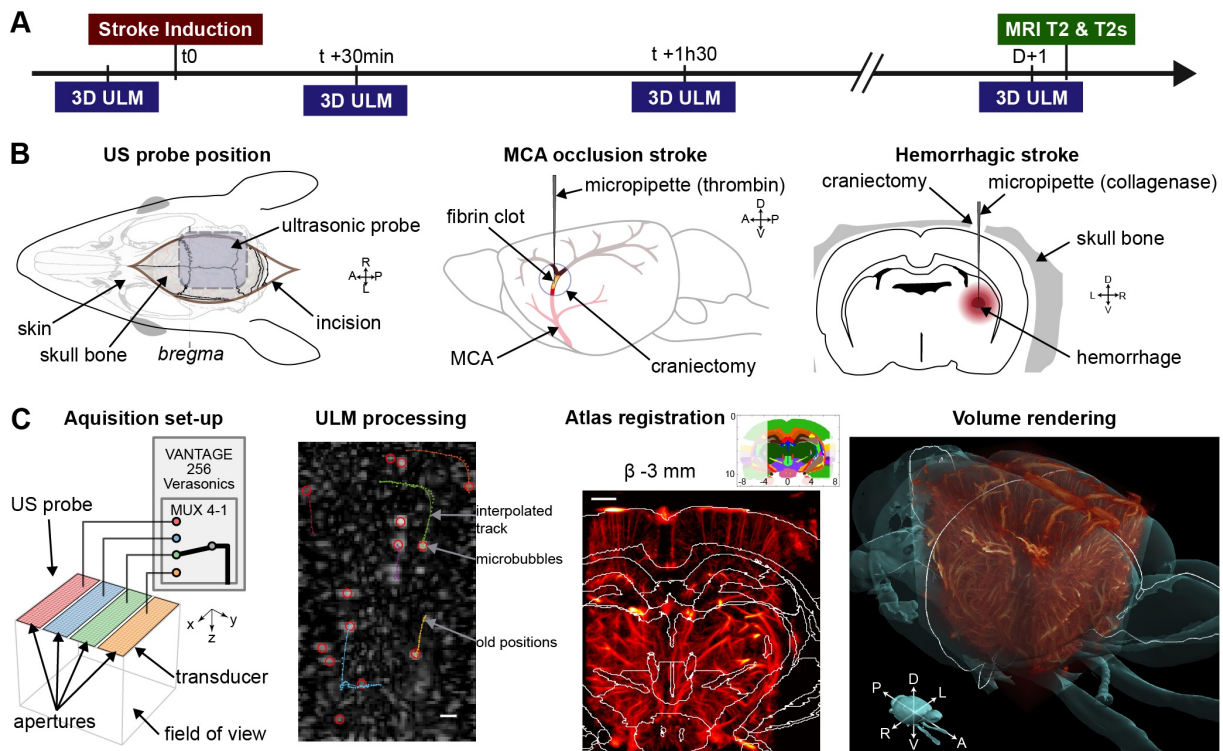


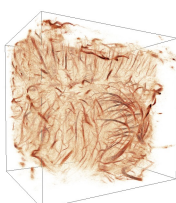
FIGURE 4.1 – 3D ULM for *in vivo* angiography in early phase of stroke’s models. **A.** Timeline of the experiment for each model, with four 3D ULM acquisition before (t_0), in hyperacute stage (30 min and 1h30), and the day after with MRI imaging.

B. Skin opening for ultrasound imaging. For the ischemic model, a small hole was drilled above the MCA branch and murine thrombin was injected with a micropipette. For hemorrhagic model, the parietal bone was drilled and collagenase was injected with a micropipette in the striatum.

C. Ultrasound matrix probe with 1024 transducers pooled in four synthetic sup-apertures successively connected to the echograph. ULM processing with filtered microbubbles, localization and tracks. Atlas rat brain registered on the final ULM volume. 3D rendering with brain surface form the atlas. Scale bars : 1 mm.

2.3.4 3D ULM imaging sequence

Ultrasound imaging was extensively detailed in [30]. The skull was covered with echographic gel to match the impedance with the ultrasonic probe. A 1024 ultrasonic matrix probe with 300 μm element’s pitch (central frequency 7,8 MHz, 56 % bandwidth at -6 dB) (Vermon, Tours, France) was driven by the unique Vantage 256 (Verasonics, Kirkland, USA) via a 4-1 multiplexer [36], [37]. Elements were placed on a 32×35 grid size, with three empty rows : 9, 17, 25, for an effective field of view of $9,6 \text{ mm} \times 10,5 \text{ mm}$ (fig. 4.1C). The 1024 channels of the probe were divided into four synthetic apertures representing four panels of 32×8 elements that can be connected to the 256 channels of the ultrasound scanner. By changing the state of the multiplexer, the ultrasonic scanner controls one of the four apertures. The switching time allows changing the state between the emission and the reception. Finally, to insonify and receive all signals from scatterers facing the probe with one plane wave, 10 transmissions were required with different couples of emission reception captures. Transmitting and receiving apertures were used in the



following order : $(TxAp, RxAp) = \{(1,1);(2,1);(1,2);(2,2);(3, 2);(2,3);(3,3);(4,3);(3,4);(4,4)\}$.

Volumes were obtained by compounding 5 tilted plane waves after a Delay-and-sum beamforming algorithm. Plan wave were sent in that order (Azimuth, Elevation) : $\{(0,0);(-5,0);(5,0);(0,-5);(0,5)\}$ in degrees. Therefore 50 transmissions were required for one compounded volume. The pulse repetition frequency was limited to 13 kHz, allowing a maximal depth of acquisition of 16 mm. Finally, the compounded volume rate was 250 Hz.

Excitation pulses were sent with a central frequency of 7,8 MHz, with 4 half-cycle and 16 volts (peak negative pressure 662 kPa, MI = 0,24). The PNP was also measured behind a rat skull *ex vivo*, and the pressures did not exceed 400 kPa (MI = 0,16), assuring no microbubbles destruction inside the brain.

For volumetric ULM imaging, 250 blocks of 200 volumes at 250 Hz compounded volume rate (CVR) were acquired in 7 minutes, with 256 GB of raw data signals. During this acquisition, 50 μ l boluses of Sonovue microbubbles (Bracco, Italy) were injected in a tail vein catheter every 30 seconds.

2.3.5 3D ULM processing

Data were beamformed, and volumes were filtered with a singular value decomposition to remove tissue signal [38], [39]. Microbubbles were detected then localized with a radial symmetry algorithm [28] (fig. 4.1C). All microbubble' positions in a block were paired into tracks with a Kuhn-Munkres algorithm to reconstruct the trajectory of most microbubbles (simpletracker, Jean-Yves Tinevez). All tracks were interpolated, smoothed, and binned in 9,9 μ m wide cubic voxels yielding a 10,5 \times 11,5 \times 11,2 mm³ angiographic volume (coronal \times sagittal \times axial). Tracks velocities were also averaged in each voxel of the volume. Volumes were registered on the Waxholm rat brain atlas [40] with a rigid registration (fig. 4.1C).

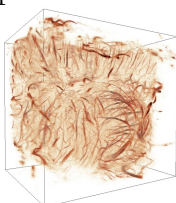
2.3.6 Microvascular diffusion index

A microvascular diffusion index (MDI) was devised from the 3D ULM volume. For each voxel, it reflects the proximity of microvessels as a weighted sum of close microbubbles trajectories with a diffusion law. The microvascular network was first enhanced by binarizing the angiography volume (Vol_{Angio}) (fig. 4.2A). A Gaussian convolution filter was applied with a standard deviation of 100 μ m (R_{O_2}). It represents the diffusion range of dioxygen in the tissue by capillaries . This value cannot be used as-is and was average on larger zones close to 1 mm³.

$$MDI(\vec{x}) = \int_{\|\vec{r}\| < R_{O_2}} Vol_{Angio}(\vec{x} + \vec{r}) \cdot e^{-\frac{\|\vec{r}\|}{R_{O_2}}} \cdot d\vec{r}$$

2.3.7 Unsupervised observation for MCA occlusion

For ischemic stroke, the MDI was computed in anatomical regions without prior knowledge of the stroke location. The regions were devised from the anatomical structures of the Waxholm Atlas. Five zones were analyzed : striatum, hippocampus, thalamus, and the cortex divided into 2 areas mainly perfused by the three cerebral arteries : anterior (ACA), middle (MCA). For



each region, the MDI values were normalized compared to the first time-point before the stroke induction.

Sutures (sagittal and coronal) and lateral crests obstruct the propagation of ultrasound waves and hide few regions. These regions were excluded from the study for each acquisition (fig. 4.2A).

2.3.8 Supervised observations

Regions of interest (ROI) were defined for both stroke' models to evaluated MDI. First, a 1,2mm diameter spherical region was defined in a well-insonified region (no under sutures of crests) and far from the stroke influence zone. This region of interest was used as a reference for the normalization of volume : all volumes did not receive the same number of microbubbles and must be equalized. A second region was located inside the cortex for ischemic stroke and closed to the injection site for the hemorrhage model. The location was determined with the volume imaging at D+1.

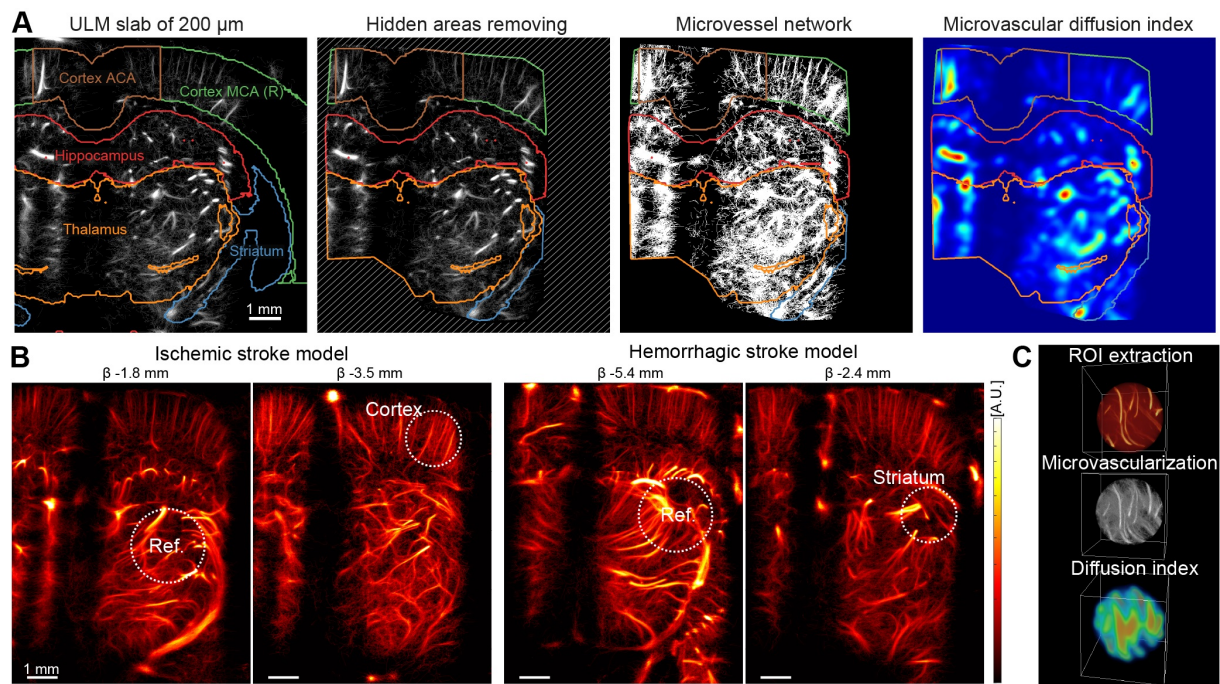
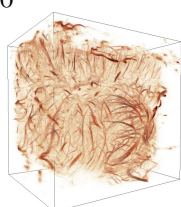


FIGURE 4.2 – Microvascular diffusion index reflects the vascularization density. **A.** MDI for unsupervised observation. Anatomical regions are extracted from anatomical structures. The hidden areas are excluded from the study. MDI computation with a range of 100 μm on binarized vascularization. **B.** Selection of a round reference region of 1,2 mm mm diameter in the thalamus, and a region of interest in the cortex for ischemic stroke (0,9 mm diameter), and in the striatum. **C.** Spherical ROI extracted from the ULM volume, binarization and MDI computation.

2.4 Results

2.4.1 ULM revealed a large hypoperfused region in hyperacute ischemic stroke

The injection of murine thrombin in the MCA initiated a fibrin clot which totally obstructed the lumen. A hypoperfused region appeared in the downstream area visible in the 3D ULM 30



minutes after the injection (fig. 4.3A). Large vessels could be identified in both volumes control and t+30 minutes (white triangles), but the microvascularization of the cortex was missing after the ischemic induction (white asterisk).

Coronal and sagittal slices of the volumes allowed a better identification of the ischemic region. The hypoperfused area follows the cortex anatomical structure (white dotted lines) (fig. 4.3B). This velocity rendering distinguishes upward and downward flows and facilitates arteries and veins identifications in the cortex. The hypoperfused region drastically lacks microbubbles trajectories, confirming inexistent perfusion. Only a few wide blood vessels remained supplied.

The monitoring of ischemia with volumetric ultrasound revealed the reperfusion in the next few hours. On this example animal, the microvascularization is slowly restored at t+1h30 with sparse, isolated trajectories in the previously hypoperfused area (white asterisk). The day after, the reperfusion was even more visible on the sagittal slice with the restoration of the initial complex mesh of microbubbles trajectories.

The ischemic lesion was validated the day after by MRI with a T₂ weighted sequence. Edema appeared brighter in a wide part of the right cortex and confirmed an extensive ischemic lesion of 90 mm³.

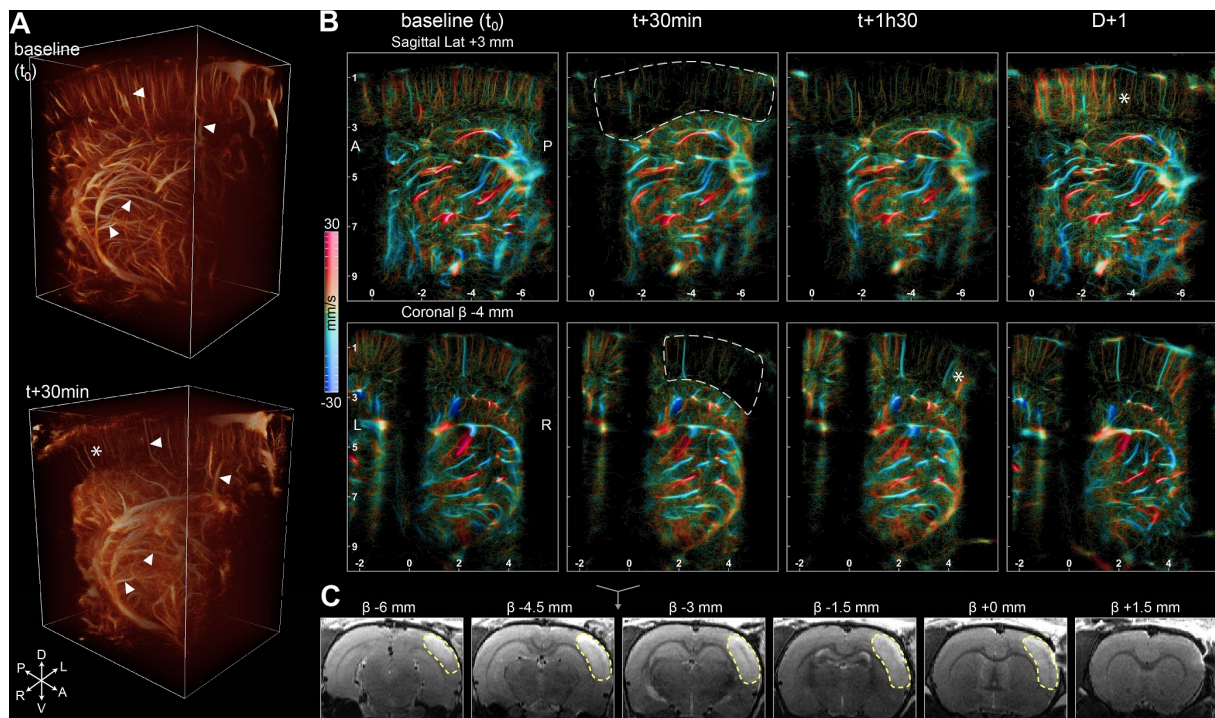
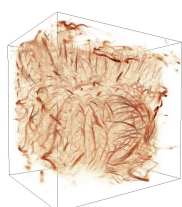


FIGURE 4.3 – MCA occlusion ischemic stroke observed with 3D ULM in the early phase.

A. 3D renderings before and 30 minutes after stroke's induction.

B. Sagittal and coronal slices of 600 μm with velocity rendering at different timepoints. Ischemic cortex wrapped with a white dot line. $v_{max} = 30$ mm/s, Upward flows : red, downward flows : blue.

C. T₂ weighted MRI at D+1. Scale bar : 2 mm.



2.4.2 The MDI dropped only in the cortex irrigated by the MCA

The microvascular diffusion index was computed for each anatomical region without prior localization of the ischemia at each time point. The hypoperfused region followed the cortex until the central part of the cortex perfused by the anterior cerebral artery (fig. 4.4A). The MDI values were normalized related to the initial values for each anatomical region. All average MDI remained constant with similar deviations (fig. 4.4A) except for the right cortex associated with the middle cerebral artery (Cortex MCA (R)) which underwent a massive loss down to 0,13 (std 0,23) at 30 minutes. Later, this value increases up to 0,45 (std 0,59) at 1h30 and confirmed the visual observation of the reperfusion. The day after, the value was restored close to the initial value at 1,18 (std 1,29).

As a comparison, in the neighbor's regions, hippocampus, thalamus, and cortex ACA regions, the MDI drop was limited to 21 % for the cortex ACA the day after. It corroborates the correlation of the ischemic area with the MCA perfusion region in the cortex.

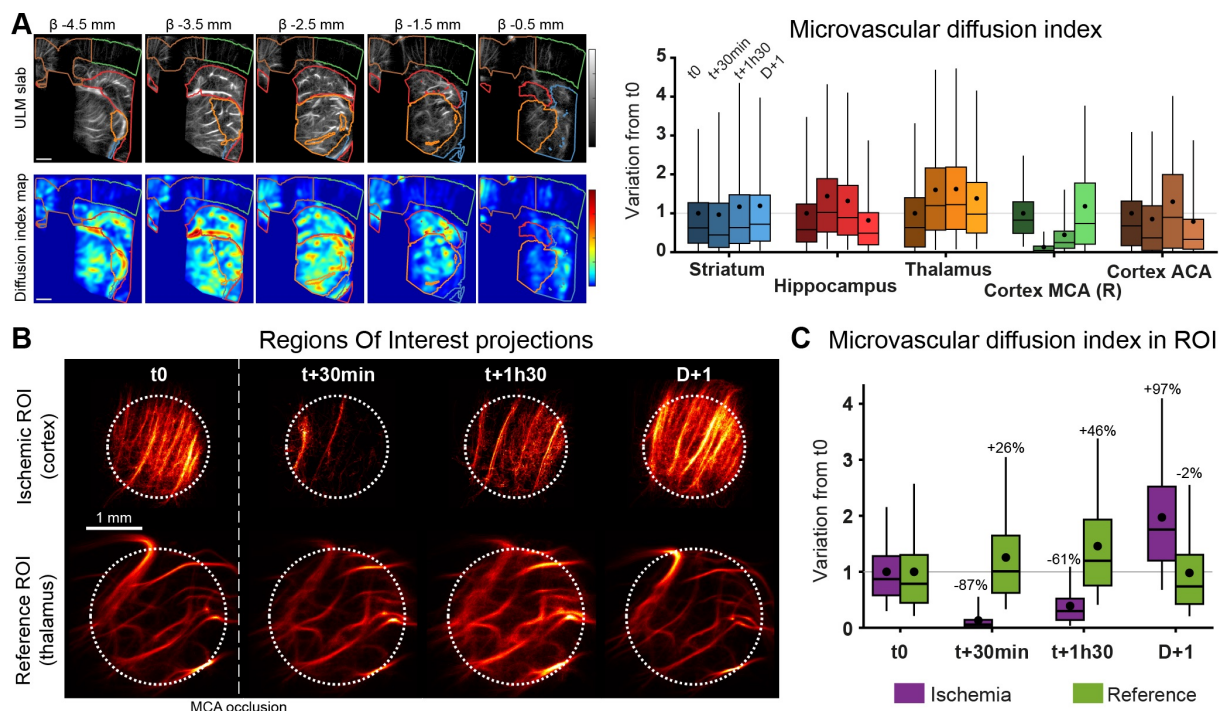


FIGURE 4.4 – Sudden and massive loss of perfusion in the cortex.

A. Coronal slices with anatomical regions and MDI computation. MDI values inside each region normalized with t0. Scale bar 1 mm, slices of 600 μ m. (N = 1)

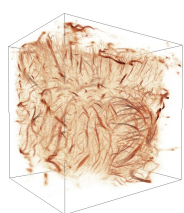
B. Projection of the selected ROI in the cortex and thalamus as a reference.

C. MDI values for the ROI inside ischemia and the reference, normalized with t0. (N = 4)

Box plot : mean (dot), median (line), 1 and 3 quartile (box), 5 and 95 % (whiskers).

2.4.3 Inside the ischemic area, the perfusion loss is sudden and total

However, the unsupervised calculus of MDI can be biased by the placement of the probe relative to the brain and skull's heterogeneities. The analysis was pursued by selecting particular regions of interest in the cortex and the thalamus as a reference.



In the reference region, the vascularization is kept constant at all time points with minor variations. The extracted ROI presents a sudden lack of microbubbles trajectory in the cortex just after the MCA occlusion (fig. 4.4B). The day after, the microvascularization returns to baseline with a dense population of trajectories.

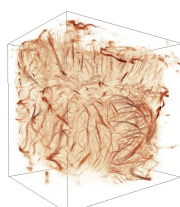
The MDI computation confirms the visual observation (fig. 4.4C). For the reference region, the average value and the standard deviation remained stable with a maximal value of 1,46 (std 0,93) at t+1h30. The MDI was more affected in the ischemic region with a drop of 87% (0,13 std 0,23) at t+30 min. The early reperfusion of the cortex raises the MDI to 0,39 (std 0,35) at 1h30. The low standard deviation indicates a homogenous density of restored microvessels. The day after, the MDI outreaches the control with a value of 1,97 (std 1,03).

2.4.4 The hemorrhagic model shows diffuse and progressive perfusion losses

Similarly, the hemorrhage model was imaged at different time points.

The hemorrhagic core can be identified in the volume rendering at D+1 (white arrows) (fig. 4.5A) surrounded by large blood vessels present at all time points (white arrows).

Within the first hours, the lack of perfusion seems to occur mainly in small vessels, with a loss of microbubbles trajectories mainly visible in the sagittal slices at t+30 min and t+1h30 (white arrows) (fig. 4.5B). The shaded and diffused mesh of trajectories disappeared the first day gradually and left a larger dark zone the day after. The hemorrhage location and volume were validated with a T₂ MRI sequence the day after (fig. 4.5C). A rounded shape appears hypointense on few slices with a 7 mm³ lesion.



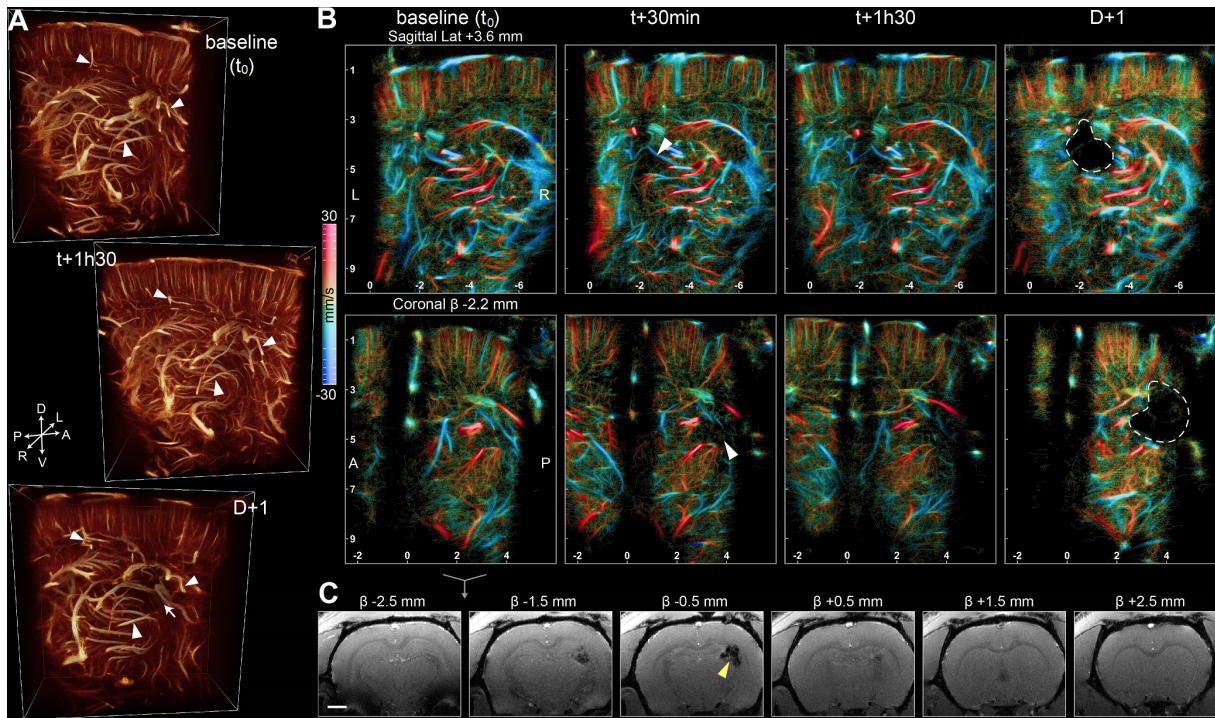


FIGURE 4.5 – Collagenase induced hemorrhage in the striatum observed with 3D ULM in the early phase.

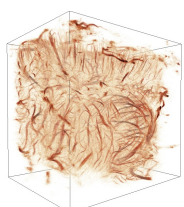
A. 3D renderings before, 1h30 minutes after stroke's induction and the day after.

B. Sagittal and coronal slices of 600 μm with velocity rendering at different timepoints. Hemorrhagic core wrapped with a white dot line. $v_{max} = 30$ mm/s, Upward flow : red, downward flows : blue.

C. T₂ weighted MRI at D+1. Scale bar : 2 mm.

The extraction of ROIs shows a constant and similar blood vessels organization in the thalamus as a reference for normalization (fig. 4.6A). The hemorrhagic ROI shows a progressive loss of small vessels in the first hours. At t+30 min and t+1h30, the largest vessels are quite stable, but the complex mesh with a low intensity disappears. This type of trajectories can be related to the capillary mesh. The day after, the tissue necrosis visible on MRI (fig. 4.5C) hinders the vascularization of any vessels (fig. 4.6A).

The MDI analysis confirms the stability of the reference region (fig. 4.6B) with a maximal variation of 23% at 1h30 (1,23 std 1,04). On the other side, the hemorrhagic ROI decreased gradually with a loss of 35% the first day (0,64 std 0,87 at 30 min and 0,61 std 0,87 at 1h30), and 74% the day after (0,26 std 0,56). The high standard deviations in the first two hours indicate both a high density associated with large vessels and a low intensity related to underperfused areas where capillaries are missing.



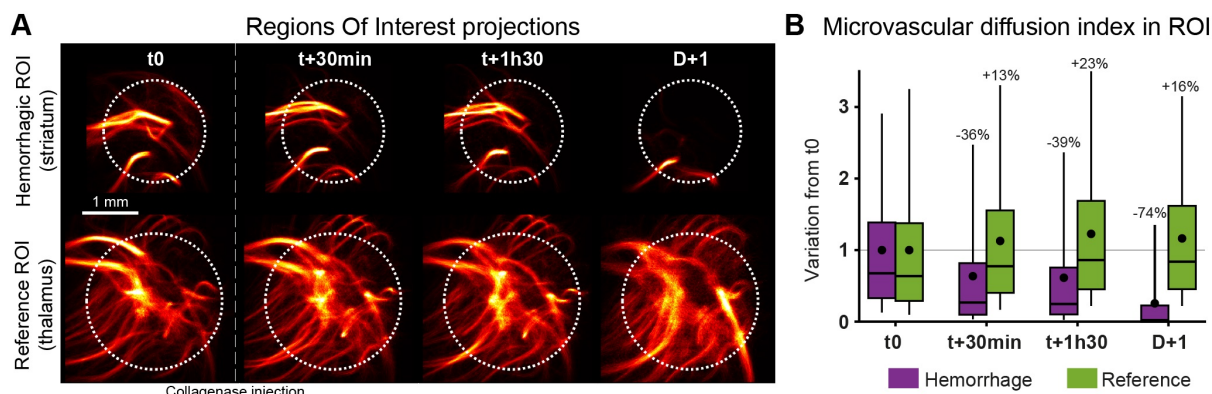


FIGURE 4.6 – Graduated perfusion loss of the hemorrhage model in the striatum.

A. Projection of the selected ROI in the cortex and thalamus as a reference.

B. MDI values for the ROI inside hemorrhagic core and the reference, normalized with t0. (N = 5)

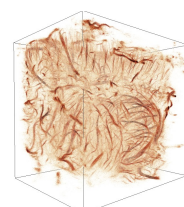
Box plot : mean (dot), median (line), 1 and 3 quartile (box), 5 and 95 % (whiskers).

2.4.5 Analysis with multiple animals

The supervised analysis was repeated on several animals : N = 4 for the ischemic model and N = 5 for the hemorrhagic model. All reference ROIs were located inside the thalamus, under the ischemic cortex and away from the collagenase injection site. For the hemorrhagic model, the ROI was adapted for each animal inside the center of the lesion.

In the ischemic stroke model (fig. 4.7A), all animals underwent a brutal and important loss of MDI the cortex ROI -88% (std 4%) at 30 min respect the control ROI in the thalamus. This massive loss correlates with the vascular territory downstream of the occluded MCA. The day after, most clots are no longer efficient, and all MCA have been reperfused ($+32\%$ std 48%).

In hemorrhagic models (fig. 4.7B), the behavior within the cohort is more contrasted. The average MDI loss at 30 min is -40% (std 14%) and drops to -47% the day after with an extended standard deviation of 44% . For the same hemorrhagic volume, the ULM volume did not reflect the lesion for one animal (lesion volumes $[4-13]\text{mm}^3$, $R^2=0,006$).



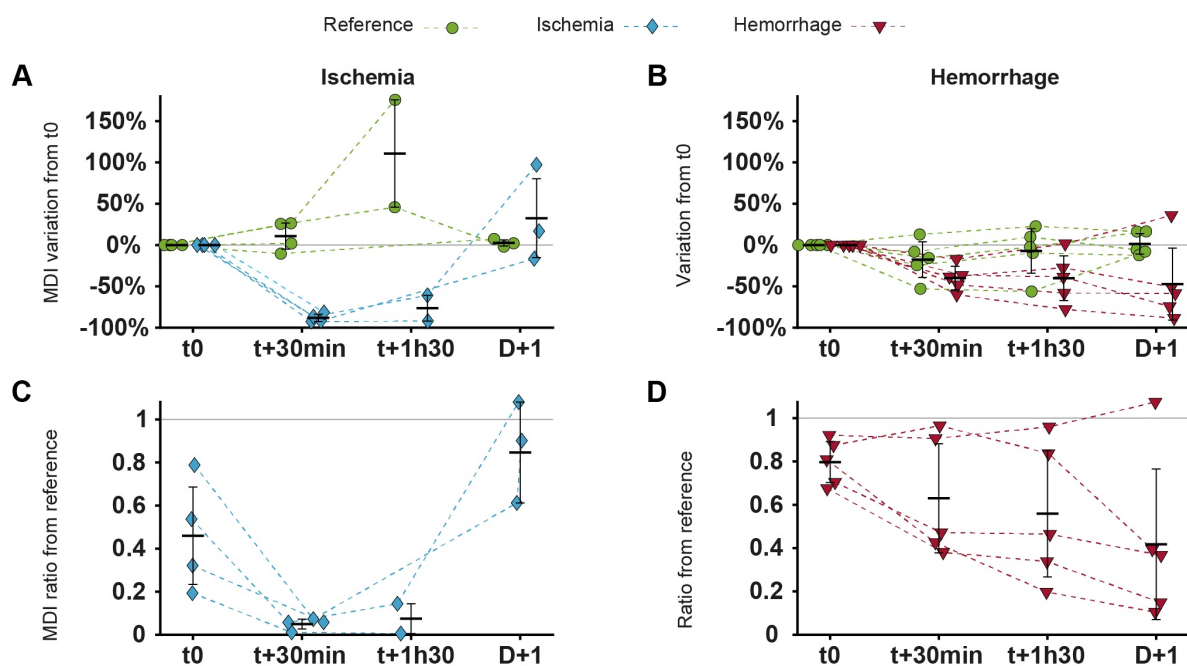


FIGURE 4.7 – Comparison ischemic and hemorrhagic model. Variation of the MDI respect to t0 for each ROI in the ischemic (A) and hemorrhagic (B) stroke and reference ROIs. Ratio between the ischemic (C) and hemorrhagic (D) strokes ROI and the reference region

Most of the conclusions have been drawn after normalization respected the healthy time point t0. However, in the clinic case, this timepoint is no longer accessible. The MDI of the stroke ROIs were then compared to the reference region.

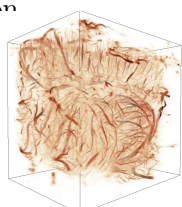
For ischemic stroke (fig. 4.7C), the MDI in the ischemic cortex is smaller than 0,1 compared to the thalamus during the first hours of the stroke (t+30 min : 0,05 std 0,02, t+1h30 : 0,07 std 0,07). The day after, the MDI increased respected to t0 with a mean value of 0,85 (std 0,23).

The hemorrhagic model (fig. 4.7D) suffers from a high standard deviation (0,25, 0,29, and 0,35). A slight tendency appears in several animals with a ratio lower than 0,5 with respect to the reference region with a progressive decrease (t+30 min : 0,43 std 0,04, t+1h30 : 0,33 std 0,11).

2.5 Discussion

Ischemic and hemorrhagic stroke management in the acute phase of the disease relies heavily on neuroimaging to identify, classify, measure, treat and monitor lesions. However, current neuroimaging solutions are incompatible with personalized medicine because over-booked by other pathologies, too expensive, and cannot be used at the bedside. Compact ultrasound imaging devices are emerging and could make possible individual monitoring of patients, but the quality of transcranial exploration remains insufficient for most tasks to this day with a lack of sensitivity and resolution. ULM could partly solve those issues by combining large field-of-views with acceptable resolution and sensitivity to the cerebral blood flows thanks to microbubbles.

In most animals of the study, a visual examination of the images was enough to determine whether the stroke was hemorrhagic or ischemic. Besides the obvious differences in injection



sites, the aspects and timing of the vascular alteration were also drastically different. Ischemia appeared as a well-defined vascular territory with a major loss and no temporal variations within the first hours (fig. 4.4). Hemorrhages appeared with a more diffused loss, not on any vascular or anatomical structures, worsening gradually in time (fig. 4.6).

In the cerebral hemorrhagic rat model, we observed the presence of diffused hypoperfused regions in the hyperacute stage (fig. 4.5). These regions did not match any anatomical structures with round or elongated shapes. It appeared to affect small vessels gradually in the early stages and a maximal loss the day after the hemorrhage induction. For small hemorrhage, the hypoperfused region was too small to be detected by ULM, and the MDI remained constant whereas the MRI confirmed the hemorrhage.

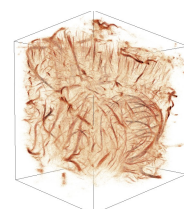
The imaging of MCA occlusion is more straightforward. A large and well-delimited area in the brain appeared completely non-perfused immediately after inducing the occlusion. This area also matched the perfusion territory of the MCA (fig. 4.3). It also fits with the lesion site as seen on T₂ weighted MRI at 24 h, which is in accordance with previous studies[41]. Some variations in perfusion can be observed in separated regions, although of a smaller extent and without causing any lesion.

The spatial comparison of MDI with the reference region shows an interesting tendency for ischemic stroke, with a drop of more than 85 % approx. (fig. 4.7) for all observations within the two first hours. Hemorrhagic strokes were more dependent on the location and shape of the lesion, but none of them underwent a loss higher than 80 %. These thresholds open new horizons for stroke classification but would require consolidated data and various types of strokes models to become a robust biomarker for selection.

In all animals, we were able to detect the presence of ischemic stroke and major hemorrhages. Still, in most situations, the lesion could only be partly observed because of the large shadowed regions in the center and side. This shadow originates from a thicker skull bone with complex heterogeneities affecting ultrasound propagation. This was particularly hurtful when imaging the side of the cortex fed by the MCA and limits the quantification of lesion extension. We already showed that tilting the probe at an angle could be a solution, although tedious, to image most shadowed regions. The same problem appeared in 2D human transcranial imaging with an improved resolution in a small part of the total field of view [19].

In the rest of the field of view, resolution and sensitivity were similar and described in a previous study, that is 30 μm in resolution and a sensitivity of 90 mm/s [30]. Smaller vessels and capillaries were not resolved on the images, although they still appear in a complex mesh. Indeed, microbubbles still pass through them but with a small probability. Yet, the localization precision limit and the lack of occurrences inhibit describing a proper vessel. Moreover, we have also shown that the slowest microbubbles are affected by the clutter filter process and are most likely unobservable with the current technique of acquisition and filtering.

Most quantitative indices built from ULM and contrast-enhanced data, in general, suffer from a lack of normalization. Indeed, although injections doses and animal vitals were kept as constant as possible, the circulating MB concentration still varies significantly and affects the accuracy of biomarkers based on intensity. Images of vascularization can also be thresholded



to highlight vessels and get a quantification of the cerebral blood volume. In addition to these limits, data generation and processing time remain high for an imaging modality that ought to be bedside. Acquisitions themselves last less than 7 minutes, but processing of more than 250 GB to reconstruct a unique ULM volume takes almost 4 hours. We believe this can be improved with faster implementations and that, ultimately, this will not limit clinical use.

A good indicator for the success of ULM in the clinical application is that microbubbles can be detected with current imaging settings as the contrast agents are already used in transcranial Doppler examinations. However, current clinical systems are not suited for high framerates and high data generations. Moreover, unlike conventional real-time ultrasound imaging, ULM requires a few minutes to complete the acquisition and may be repeated for another imaging plan. This may be mitigated by 2D probes that allow imaging a large field of view in a single acquisition with an investigation a posteriori.

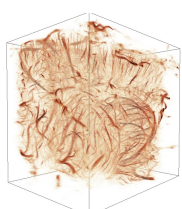
ULM consists of the detection of intravascular microbubbles and is fundamentally a vascular imaging modality. Recent studies showed outstanding results in clinical settings [19], [42]. In neuroimaging, angiography alone is often not appropriate to perform critical tasks. For example, in the hyperacute phase, it is crucial to determine if patients can receive thrombolytic treatment. Yet, a major counter indication to thrombolysis is the presence of cerebral hemorrhages, which are difficult to detect with angiography alone. One reason is its lack of resolution and sensitivity, slow-flowing or stagnant blood. We hypothesize that having a higher resolution will allow indirect detection of hemorrhages as diffuse areas with reduced perfusion. Our ambition is to generalize these results in humans to provide an acute phase biomarker capable of identifying hemorrhagic and ischemic stroke in the acute phase. It could open thrombolysis to a wider number of patients. With a compact system, we could even see it allow treatment to be performed in the pre-hospital phase. The safe application of ultrasound imaging could also benefit stroke monitoring with a bedside approach. The high availability of ultrasound scanners could lead to personalized patient monitoring.

2.6 Conclusion

Volumetric ULM is an emerging imaging technic that provides high resolution and sensitivity for brain vascular imaging with a simple and safe system. We demonstrated its relevant use for the diagnosis of induced strokes in rats. Its extension to human imaging associated with robust biomarkers could support current neuroimaging systems in stroke management.

2.7 Acknowledgements

This study was funded by the European Research Council under the European Union Horizon H2020 program (ERC Consolidator grant agreement No 772786-ResolveStroke) and performed with the technical and scientific support of the PhIND, ESPR, the institute Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C).



2.8 Contributions

All authors designed the research, A.C., V.H. and C.O. did the experiments, A.C. developed the acquisition sequence, ULM reconstruction, and analysis framework, A.C., V.H., C.O., O.C., D.V. analyzed the processed data. All the authors discussed the results and wrote the paper.

2.9 Disclosure

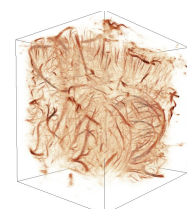
O.C. is depositor of the patent /FR2011/052810.

2.10 Competing interests

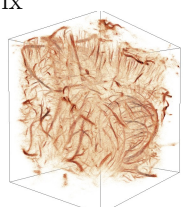
The authors have declared that no competing interest exists.

2.11 Bibliography

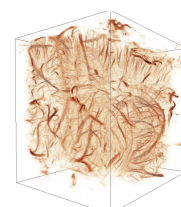
- [1] V. L. Feigin et al., "Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016," *The Lancet Neurology*, vol. 18, no. 5, pp. 459–480, May 2019, doi : 10.1016/S1474-4422(18)30499-X.
- [2] M. P. Lindsay et al., "World Stroke Organization (WSO) : Global Stroke Fact Sheet 2019," *International Journal of Stroke*, vol. 14, no. 8, pp. 806–817, Oct. 2019, doi : 10.1177/1747493019881353.
- [3] B. C. V. Campbell et al., "Ischaemic stroke," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 5, no. 1, p. 70, Dec. 2019, doi : 10.1038/s41572-019-0118-8.
- [4] S. D. Smith and C. J. Eskey, "Hemorrhagic Stroke," *Radiologic Clinics of North America*, vol. 49, no. 1, pp. 27–45, Jan. 2011, doi : 10.1016/j.rcl.2010.07.011.
- [5] J. Emberson et al., "Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke : a meta-analysis of individual patient data from randomised trials," *The Lancet*, vol. 384, no. 9958, pp. 1929–1935, Nov. 2014, doi : 10.1016/S0140-6736(14)60584-5.
- [6] E. Güresir, P. Schuss, H. Vatter, A. Raabe, V. Seifert, and J. Beck, "Decompressive craniectomy in subarachnoid hemorrhage," *Neurosurgical Focus*, vol. 26, no. 6, p. E4, Jun. 2009, doi : 10.3171/2009.3.FOCUS0954.
- [7] C. M. Schirmer, A. A. Ackil, and A. M. Malek, "Decompressive Craniectomy," *Neurocrit Care*, vol. 8, no. 3, pp. 456–470, Jun. 2008, doi : 10.1007/s12028-008-9082-y.
- [8] O. A. Berkhemer et al., "A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke," *New England Journal of Medicine*, vol. 372, no. 1, pp. 11–20, Jan. 2015, doi : 10.1056/NEJMoa1411587.
- [9] D. Birenbaum, L. W. Bancroft, and G. J. Felsberg, "Imaging in Acute Stroke," *West J Emerg Med*, vol. 12, no. 1, pp. 67–76, Feb. 2011.
- [10] R. G. Nogueira et al., "Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct," *New England Journal of Medicine*, vol. 378, no. 1, pp. 11–21, Jan. 2018, doi : 10.1056/NEJMoa1706442.
- [11] J. A. Frontera et al., "Defining Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage," *Stroke*, Jun. 2009, doi : 10.1161/STROKEAHA.108.544700.
- [12] C. J. Schrandt, S. S. Kazmi, T. A. Jones, and A. K. Dunn, "Chronic Monitoring of Vascular Progression after Ischemic Stroke Using Multiexposure Speckle Imaging and Two-Photon Fluorescence Microscopy," *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 35, no. 6, pp. 933–942, Jun. 2015, doi : 10.1038/jcbfm.2015.26.
- [13] J. D. Kirsch, M. Mathur, M. H. Johnson, G. Gowthaman, and L. M. Scoutt, "Advances in Transcranial Doppler US : Imaging Ahead," *RadioGraphics*, vol. 33, no. 1, pp. E1–E14, Jan. 2013, doi : 10.1148/rg.331125071.
- [14] K. Christensen-Jeffries et al., "Super-resolution Ultrasound Imaging," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 46, no. 4, pp. 865–891, Apr. 2020, doi : 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.11.013.
- [15] O. Couture, B. Besson, G. Montaldo, M. Fink, and M. Tanter, "Microbubble ultrasound super-localization imaging (MUSLI)," in *Ultrasonics Symposium (IUS), 2011 IEEE International, 2011*, pp. 1285–1287. doi : 10.1109/ULTSYM.2011.6293576.



- [16] O. Couture, M. Tanter, and M. Fink, "Method and Device for Ultrasound Imaging," Jun. 21, 2012 Accessed : Jul. 26, 2021. [Online]. Available : <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2012080614&tab=PCTBIBLIO>
- [17] O. Couture, V. Hingot, B. Heiles, P. Muleki-Seya, and M. Tanter, "Ultrasound Localization Microscopy and Super-Resolution : A State of the Art," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 65, no. 8, pp. 1304–1320, Aug. 2018, doi : 10.1109/TUFFC.2018.2850811.
- [18] C. Errico et al., "Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging," *Nature*, vol. 527, no. 7579, pp. 499–502, Nov. 2015, doi : 10.1038/nature16066.
- [19] C. Demené et al., "Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients," *Nat Biomed Eng*, vol. 5, no. 3, Art. no. 3, Mar. 2021, doi : 10.1038/s41551-021-00697-x.
- [20] D. E. Soulioti, D. Espindola, P. A. Dayton, and G. F. Pinton, "Super-Resolution Imaging Through the Human Skull," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 67, no. 1, pp. 25–36, Jan. 2020, doi : 10.1109/TUFFC.2019.2937733.
- [21] M. Tanter and M. Fink, "Ultrafast imaging in biomedical ultrasound," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 61, no. 1, pp. 102–119, Jan. 2014, doi : 10.1109/TUFFC.2014.2882.
- [22] C. Brunner et al., "A Platform for Brain-wide Volumetric Functional Ultrasound Imaging and Analysis of Circuit Dynamics in Awake Mice," *Neuron*, Oct. 2020, doi : 10.1016/j.neuron.2020.09.020.
- [23] J. A. Jensen et al., "SARUS : A synthetic aperture real-time ultrasound system," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 60, no. 9, pp. 1838–1852, Sep. 2013, doi : 10.1109/TUFFC.2013.2770.
- [24] L. Petrusca et al., "Fast Volumetric Ultrasound B-Mode and Doppler Imaging with a New High-Channels Density Platform for Advanced 4D Cardiac Imaging/Therapy," *Applied Sciences*, vol. 8, no. 2, p. 200, Jan. 2018, doi : 10.3390/app8020200.
- [25] J. Provost et al., "3D ultrafast ultrasound imaging in vivo," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 59, no. 19, pp. L1–L13, Oct. 2014, doi : 10.1088/0031-9155/59/19/L1.
- [26] S. Harput et al., "3-D Super-Resolution Ultrasound Imaging With a 2-D Sparse Array," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 67, no. 2, pp. 269–277, Feb. 2020, doi : 10.1109/TUFFC.2019.2943646.
- [27] B. Heiles et al., "Ultrafast 3D Ultrasound Localization Microscopy Using a 32x32 Matrix Array," *IEEE Trans. Med. Imaging*, vol. 38, no. 9, pp. 2005–2015, Sep. 2019, doi : 10.1109/TMI.2018.2890358.
- [28] B. Heiles et al., "Volumetric ultrasound localization microscopy of the whole brain microvasculature," Sep. 2021. doi : 10.1101/2021.09.17.460797.
- [29] J. A. Jensen et al., "Three-Dimensional Super-Resolution Imaging Using a Row–Column Array," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 67, no. 3, pp. 538–546, Mar. 2020, doi : 10.1109/TUFFC.2019.2948563.
- [30] A. Chavignon, B. Heiles, V. Hingot, C. Orset, D. Vivien, and O. Couture, "3D Transcranial Ultrasound Localization Microscopy in the Rat Brain with a Multiplexed Matrix Probe," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 2021, In press, doi : DOI : 10.1109/TBME.2021.3137265.
- [31] G. Llovera et al., "Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (pRCT) : Anti-CD49d treatment for acute brain ischemia," *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, no. 299, pp. 299ra121–299ra121, Aug. 2015, doi : 10.1126/scitranslmed.aaa9853.
- [32] C. Orset et al., "Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion," *Stroke*, vol. 38, no. 10, pp. 2771–2778, Oct. 2007, doi : 10.1161/STROKEAHA.107.487520.
- [33] C. Orset et al., "Efficacy of Alteplase in a Mouse Model of Acute Ischemic Stroke : A Retrospective Pooled Analysis," *Stroke*, vol. 47, no. 5, pp. 1312–1318, May 2016, doi : 10.1161/STROKEAHA.116.012238.
- [34] G. A. Rosenberg, S. Mun-Bryce, M. Wesley, and M. Kornfeld, "Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats," *Stroke*, vol. 21, no. 5, pp. 801–807, May 1990, doi : 10.1161/01.STR.21.5.801.
- [35] C. L. MacLellan et al., "Intracerebral Hemorrhage Models in Rat : Comparing Collagenase to Blood Infusion," *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 28, no. 3, pp. 516–525, Mar. 2008, doi : 10.1038/sj.jcbfm.9600548.
- [36] M. Bernal, B. Cunitz, D. Rohrbach, and R. Daigle, "High-frame-rate volume imaging using sparse-random-aperture compounding," *Phys. Med. Biol.*, vol. 65, no. 17, p. 175002, Sep. 2020, doi : 10.1088/1361-6560/ab9372.
- [37] J. Yu, H. Yoon, Y. M. Khalifa, and S. Y. Emelianov, "Design of a Volumetric Imaging Sequence Using a Vantage-256 Ultrasound Research Platform Multiplexed With a 1024-Element Fully Sampled Matrix



- Array," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 67, no. 2, pp. 248–257, Feb. 2020, doi : 10.1109/TUFFC.2019.2942557.
- [38] C. Demene et al., "Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 34, no. 11, pp. 2271–2285, Nov. 2015, doi : 10.1109/TMI.2015.2428634.
- [39] Y. Desailly, A.-M. Tissier, J.-M. Correas, F. Wintzenrieth, M. Tanter, and O. Couture, "Contrast enhanced ultrasound by real-time spatiotemporal filtering of ultrafast images," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 62, no. 1, pp. 31–42, Jan. 2017, doi : 10.1088/1361-6560/62/1/31.
- [40] E. A. Papp, T. B. Leergaard, E. Calabrese, G. A. Johnson, and J. G. Bjaalie, "Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain," *NeuroImage*, vol. 97, pp. 374–386, Aug. 2014, doi : 10.1016/j.neuroimage.2014.04.001.
- [41] V. Hingot et al., "Early Ultrafast Ultrasound Imaging of Cerebral Perfusion correlates with Ischemic Stroke outcomes and responses to treatment in Mice," *Theranostics*, vol. 10, no. 17, pp. 7480–7491, 2020, doi : 10.7150/thno.44233.
- [42] C. Huang et al., "Super-resolution ultrasound localization microscopy based on a high frame-rate clinical ultrasound scanner : an in-human feasibility study," *Phys. Med. Biol.*, vol. 66, no. 8, p. 08NT01, Apr. 2021, doi : 10.1088/1361-6560/abef45.

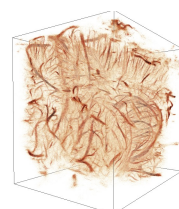


Conclusion et perspectives

1 Contributions personnelles

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été rendus possibles par grâce à l'expertise de toute une équipe. J'ai eu la chance de bénéficier du socle de connaissances de cette équipe active dans la communauté de l'ULM qui m'a permis de comprendre rapidement les concepts, difficultés et techniques pour cette imagerie bien spécifique. Bien que le concept soit finalement assez simple, de multiples facteurs entrent en jeu pour obtenir une image super-résolue représentative du sujet. Du modèle animal au traitement des images, en passant par l'acquisition des données, de nombreux paramètres doivent être ajustés pour trouver la bonne combinaison. Le temps de traitement devient alors un enjeu considérable lorsqu'il faut adapter les paramètres un à un. Cette expertise est acquise jour après jour en testant des combinaisons de paramètres pour améliorer les valeurs et les algorithmes et finalement obtenir une image représentative du sujet avec une meilleure résolution. L'imagerie 3D est encore plus exigeante : le concept est le même, mais son implémentation est beaucoup plus complexe, avec des nouvelles contraintes liées à l'acquisition, la gestion et le traitement des données. Les quantités de données sont décuplées et entraînent des calculs chronophages qui nécessitent des implémentations et des choix des paramètres astucieux.

La première partie de cette thèse, sur l'imagerie 2D, a tenté de poser des bases pour partager cette expertise. C'est un travail qui a demandé beaucoup de temps et de réflexion pour un résultat qui peut sembler simple. Mais c'est aussi cette simplicité qui a vocation à poser des bases pour la communauté et avoir un socle solide, compréhensible et évolutif. Une importance particulière a été portée sur le choix et l'élaboration des simulations pour qu'elles soient accessibles, réalistes, reproductibles et quantifiables : associées aux bonnes métriques, elles comparent les algorithmes de localisation objectivement. Les scores finaux ont pour but de conseiller l'utilisateur qui souhaite utiliser l'ULM. Plus qu'une comparaison d'algorithmes de localisation, ce travail a une dimension pédagogique avec le partage des méthodes de traitement ULM que nous utilisons ainsi que des données d'exemple. Nous espérons que n'importe quelle équipe familière avec l'imagerie ultrasonore puisse mettre en place l'ULM en un temps restreint et partager sa recherche autant sur l'animal, que sur la partie ultrasonores ou le traitement.



La deuxième partie de cette thèse a été l'implémentation de l'imagerie 3D avec un système simple. L'imagerie 3D haute cadence n'était encore pas très répandue dans la communauté de par la complexité des systèmes nécessaires. Grâce aux nouveaux équipements disponibles sur le marché, j'ai pu mettre en place une séquence d'acquisition avec un système simple multiplexé, sans modifications technologiques. La difficulté a été de s'adapter aux conditions spécifiques de l'imagerie ULM : une cadence d'imagerie élevée et un temps d'acquisition allongé pour l'imagerie *in vivo*. Des petites avancées proposées comme la sommation synthétique ou la combinaison particulière des sous-ouvertures ont été les clés pour la réussite de cette implémentation. Sans ces deux avancées, la cadence d'imagerie aurait été dégradée et la quantité de données décuplée. Une fois le système mis en place, le traitement ULM 3D a été rapide avec l'aide de mon collègue Baptiste Heiles qui avait déjà mis au point la méthode avec une autre machine 3D. Son expertise, ses conseils, et nos multiples échanges nous ont challengé pour améliorer la compréhension de chacune des étapes basiques, pour qu'elles puissent être plus précises, robustes, et rapides. Beaucoup d'étapes *a priori* simples ont nécessité plusieurs itérations avant d'être concluantes et efficaces pour obtenir le niveau actuel. Ces étapes ont nécessité à chaque fois de nombreux jours de calculs. Au début de ma thèse, le temps de traitement était d'au moins une demi-journée pour tester un paramètre sur un jeu de données *in vivo*. Et une fois les données traitées, la comparaison n'est pas triviale de par la taille des données à comparer : les traces, les images 3D, les tranches de volumes, les vitesses...

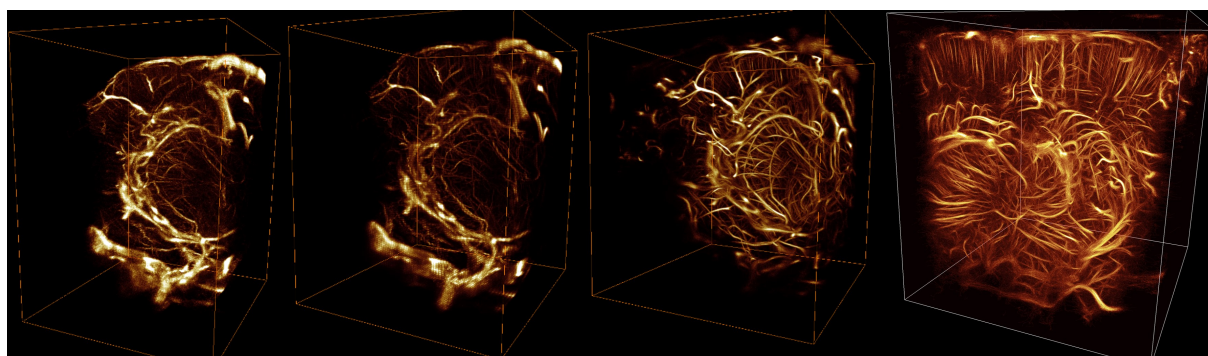
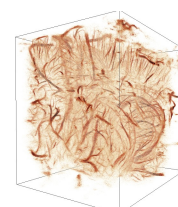


FIGURE 5.8 – Évolution de l'ULM 3D au cours de la thèse. Les trois premières images sont issues des mêmes données, seul le traitement a été amélioré.

C'est en ce sens que l'imagerie 3D est plus exigeante à mettre en place, à aborder, à analyser par rapport l'imagerie 2D qui est beaucoup plus rapide, explicite et visuelle. Mais c'est aussi en ce sens que l'imagerie 3D est plus riche avec de nouvelles perspectives d'application *in vivo*.

La troisième et dernière partie est l'application directe des précédents chapitres. Elle conclut la mise en place de l'ULM 3D avec une démonstration sur un modèle pré-clinique. Cette étude a été plus délicate car elle requiert des connaissances biologiques et animales, mais tout aussi passionnantes par la confrontation à la complexité du règne animal.

Les travaux réalisés sur le diagnostic de l'AVC ont montré des résultats encourageants pour l'identification de l'ischémie cérébrale. Les biomarqueurs établis semblent caractériser les hémor-



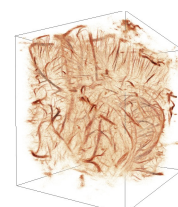
ragies importantes et les ischémies avec une modalité d'imagerie non invasive, non irradiante et potentiellement hautement disponible. C'est une première étape pour une finalité chez l'homme qui nécessite encore beaucoup de travail tant sur la translation à l'échelle humaine, que sur l'élaboration de biomarqueurs discriminants et robustes.

2 La réalité de l'ULM

La plupart des techniques d'imagerie sont basées sur une observation : l'appareil génère une image (ensemble de pixels ordonnés) qui est interprétée par l'utilisateur telle quelle. L'ULM est une technique basée sur des événements : le processus génère en ensemble de traces qui sont obtenues par plusieurs étapes de traitement. La difficulté est alors de savoir sur quel objet travaille-t-on : quels sont les résultats de ce traitement ? Sont-ils réels ou des artefacts ? Sont-ils représentatifs de l'objet imagé ou une sous-population spécifique ? L'échantillonnage est-il suffisant temporellement et spatialement ? Tant de questions qui nécessitent encore d'être étudiées, discutées, argumentées.

Les résultats obtenus dans ce manuscrit témoignent d'une organisation vasculaire du cerveau cohérente avec la littérature pour les principaux troncs vasculaires, artérioles et veinules. Cependant, à une échelle plus petite, celle des capillaires, la caractérisation de l'enchevêtrement de trajectoires individuelles est moins évidente : sont-elles réellement le passage d'une microbulle ? Ou la jonction artificielle par les algorithmes de plusieurs microbulles à des instants successifs dans un espace intravasculaire infime ? La démonstration *in vitro* est réalisable, mais ne rend pas compte de la complexité induite chez l'animal. Le modèle dans l'embryon de poulet permettrait une confrontation optique pour qualifier chacune des localisations obtenues par l'ULM mais aussi celles manquantes, ainsi que la concordance des traces obtenues avec les trajectoires réelles des microbulles et la vascularisation. Certaines équipes ont désormais une très bonne maîtrise du modèle et confrontent les résultats de l'ULM avec la réalité optique [Lok, 2021 ; Tang, 2020 ; Schoen, 2021 ; Huang, 2020]. Ce modèle pourrait être la suite de l'étude menée sur les algorithmes de localisation en ajoutant les effets du tracking sur un modèle *in vivo* aussi complexe.

L'accès à une résolution fine et la spécificité au milieu intravasculaire pousse l'ULM dans ses retranchements pour imager le lit capillaire, lieu des échanges moléculaires entre le sang et les cellules, neurones... Les résultats en 2D et 3D évoqués rendent compte d'un enchevêtrement parfois chaotique de traces de microbulles. Ces traces ne semblent pas être identifiables à des trajectoires réelles de microbulles de par leur géométrie. Certains éléments peuvent expliquer ces résultats comme un échantillonnage insuffisant : la probabilité de passage des microbulles dans ces vaisseaux est infime. La précision de localisation atteint également ses limites à cette échelle ($<10\mu\text{m}$). Elle pourrait être améliorée avec des fréquences d'imagerie plus élevées, mais au détriment de la pénétration, quantité de données, résonance des microbulles... Enfin, une autre limite pourrait être la sensibilité même du système à cette population de microbulles : lentes et en milieu confiné. Les traitements d'images utilisés ici exploitent la corrélation spatio-temporelle pour exalter le signal des microbulles en mouvement au détriment des flux lents. Des



techniques non linaires pourraient pallier à ce manque, mais avec un compromis sur la fréquence utilisée (la résolution) et la gamme de résonance des microbulles. D'autre part, le confinement de ces microbulles dans les vaisseaux fins (d'une taille proche de celle des microbulles) diminue également leur signal par rapport au bruit. Des études sur les microbulles dans des microcanaux rendent compte d'une perte de résonance et d'échogénicité à ces échelles de vaisseaux [Sassaroli, 2005 ; Thomas, 2013]. C'est peut-être un des points limitant pour accéder à une échelle plus petite qui nécessitera encore des innovations technologiques et biochimiques.

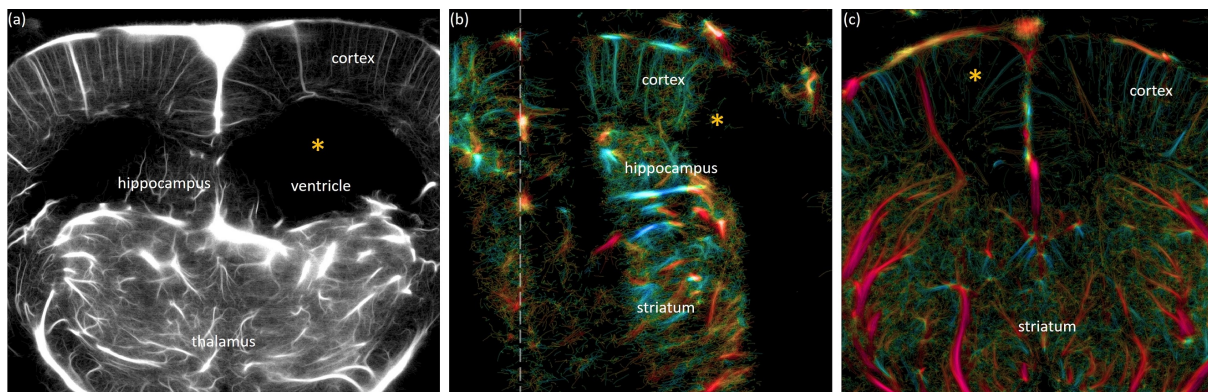


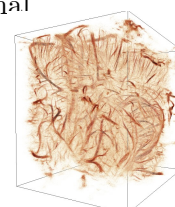
FIGURE 5.9 – Absence de capillaires en imagerie ULM dans certaines zones du cerveau (étoiles jaunes) : (a) dans les ventricules dilatés d'un cerveau de rat avec craniectomie (imagerie 2D), (b) dans la partie ischémisée du cortex de rat, (c) dans le cortex de rat avec craniectomie ayant entraînée une hémorragie sous-arachnoïdienne avec vasospasme.

Et pourtant, les résultats *in vivo* sont en faveur de la détection du réseau capillaire complexe, pas nécessairement sous la forme de trajectoires uniques de microbulles, mais comme un enchevêtrement de liens. Certains modèles, dont la physiologie est connue, corroborent l'observation. Par exemple dans les ventricules dilatés d'un rat [fig. 5.9a], l'absence totale de détection tend à prouver que les trajectoires obtenues ailleurs sont bien reliées à des événements de localisation de microbulles même si chaque trace ne représente pas nécessairement la trajectoire d'une unique microbulle. Dans le cortex ischémisé de rat [fig. 5.9b], en dehors de zones d'aberration du crâne, une zone totalement noire se dessine en suivant les contours anatomiques de la région. Lors d'une hémorragie sous-arachnoïdienne [fig. 5.9c], les vasospasmes ont un effet de constriction des vaisseaux bloquant la circulation sanguine. L'ULM 3D permettrait alors une imagerie indirecte du réseau capillaire avec une résolution équivalente à celle des artérioles/veinules : elle permettrait de détecter les endroits avec ou sans perfusion de ce réseau capillaire.

En dépit de ces limitations, les études publiées par les équipes internationales affichent des descriptions de la microvascularisation *in vivo* pertinentes avec des quantifications sur des modèles pathologiques.

3 Ambitions pour l'ULM

L'ULM a donc encore beaucoup de pistes de recherche et d'amélioration. Une rétrospective des dernières années atteste d'une évolution rapide pour l'imagerie chez le petit animal



[fig. 5.10]. Que ce soit en transcrânien ou avec crâne intact, les progrès ont été rapides en l'espace de cinq années. On peut espérer des nouveautés sur différents aspects de cette méthode d'imagerie comme l'application pour le diagnostic médical, par exemple la dégénérescence chez le petit animal [Lowerison, 2021] ou l'hypoxie dans les tumeurs [Lowerison, 2020]. Avec les multiples études sur la correction de mouvement, d'aberration, l'imagerie des organes troncs (foie, reins, pancréas, cœur) s'améliore et pourra permettre d'obtenir une résolution et sensibilité proche de celle dans le cerveau en transcrânien. Les nouvelles techniques de détection résolvent des concentrations de microbulles de plus en plus élevées, réduisant la quantité de données et les temps de traitement. Il y a fort à penser que l'imagerie ULM en temps réel sera possible dans quelques années, facilitant l'expérience utilisateur et son champ d'application. Le passage à l'imagerie 3D devrait aussi se généraliser rapidement. Récemment, plusieurs équipes se sont munies d'échographes 3D hautes cadences et vont très certainement les utiliser pour l'ULM 3D avec une nouvelle perspective d'imagerie sur un champ de vue large pour les géométries complexes, et des vitesses non-biaisées. Les nouvelles techniques d'imagerie 3D avec sonde parcimonieuse ou lignes-colonnes offrent des nouvelles caractéristiques d'imagerie avec des cadences plus élevés ou des champs de vue élargis et contribuent à démocratiser l'imagerie 3D avec des systèmes abordables.

Tous ces développements amélioreront certainement l'imagerie pour l'humain. Les premiers résultats [Demené, 2021] (cerveau) [Huang, 2021] (foie, pancréas, reins, seins) sont en train de construire un socle solide pour démontrer la réalisation et la pertinence clinique de cette méthode d'imagerie. Malheureusement le passage de la paille au lit du patient nécessite un développement additionnel et des procédures de sécurité qui peuvent ralentir la recherche.

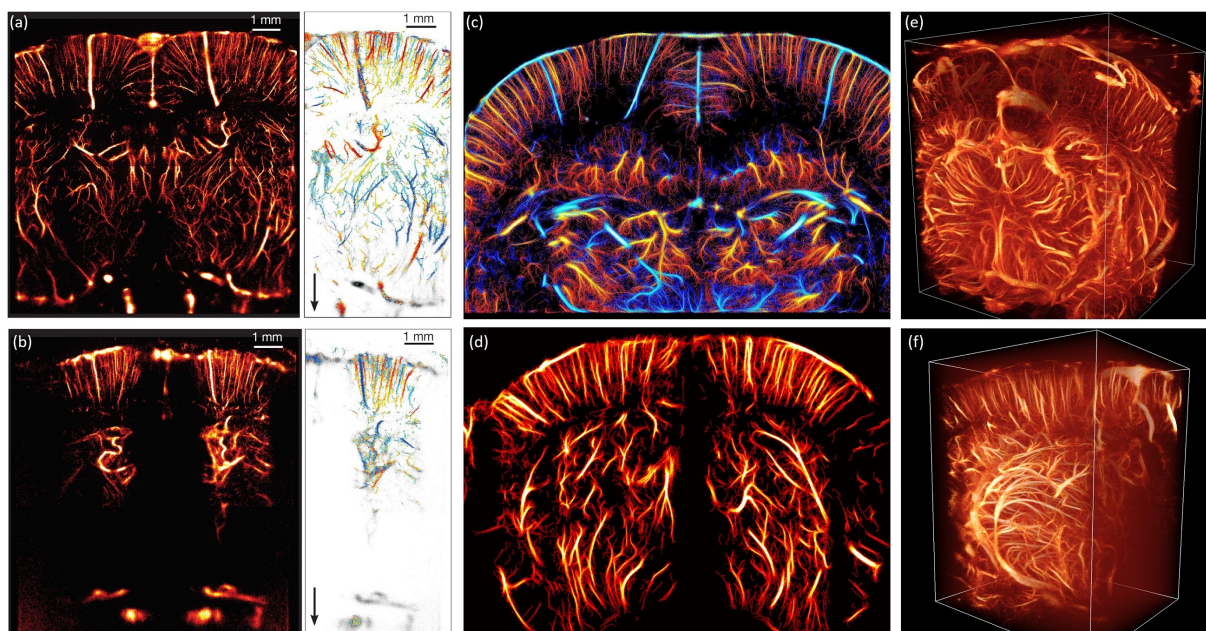
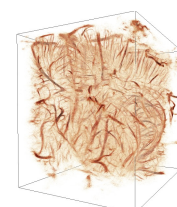


FIGURE 5.10 – Évolution de ULM dans le cerveau : (a) rat avec crâne aminci et (b) crâne intact [Errico, 2015], (c) rat avec craniectomie [Couture, 2018], (d) souris avec crâne intact [Hingot, 2020], (e) rat avec craniectomie en 3D et (f) avec crâne intact [Chavignon, 2021].



Le transfert vers l'imagerie humaine se fera avec une diminution de la fréquence d'imagerie. Agissant comme un dézoom, le champ de vue est augmenté au détriment de la résolution. Au début de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler sur une sonde 2D dédiée à l'humain pour l'ULM dans le cerveau. Elle est composée de 1024 éléments de 500 μm de côté avec une fréquence centrale de 1,5 MHz ($\lambda = 1,0 \text{ mm}$). Ces caractéristiques lui permettent théoriquement d'insonifier un large champ de vue avec des ondes divergentes (sonde *phased array*). Cette sonde doit pouvoir être placée sur l'os de la fenêtre temporale et imager une large zone du cerveau. Ce travail de recherche est la suite du projet ERC *ResolveStroke* et est mené conjointement par mes collègues Antoine Coudert et Louise Denis.

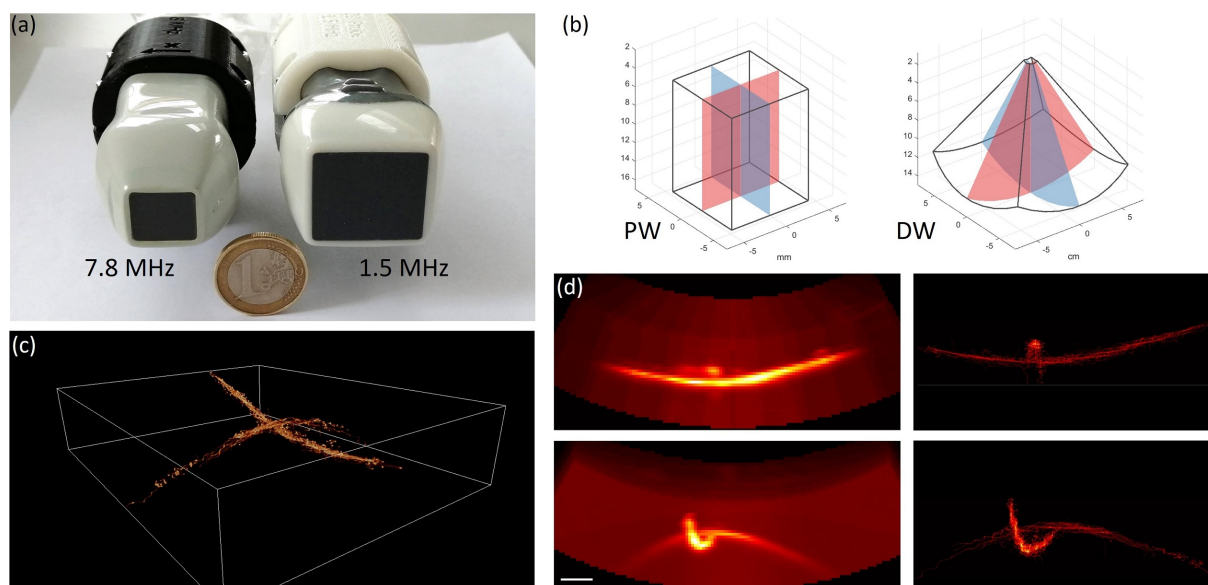
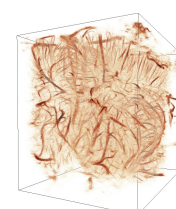


FIGURE 5.11 – (a) Sondes matricielles 32×32 haute et basse fréquence. (b) Champ de vue pour la sonde haute fréquence (PW : *plane waves*), et basse fréquence (DW : *diverging waves*). (c) ULM avec la sonde basse fréquence : superposition de deux canaux dans l'eau. (d) projections latérale et en élévation. (Barre d'échelle : 5 mm)

L'avènement de l'imagerie moléculaire ouvre également une nouvelle tournure. Avec l'ingénierie des microbulles fonctionnalisées [Li, 2019], ou des nano-gouttes [Zhang, 2019], l'imagerie super-résolue peut être rendue spécifique au milieu biologique ou à la délivrance de médicament avec une résolution améliorée par rapport aux ultrasons classiques.

L'ULM est une technologie encore très récente et ses ambitions sont encore loin d'être définies. Les objets obtenus, les trajectoires, sont une source d'informations extrêmement riches et encore inexploitées. Les thématiques de segmentation et squelettisation sont en lien avec le domaine des mathématiques et la topologie. Elles permettraient une compréhension fine de la dynamique des flux dans les architectures vasculaires aussi complexes. Les résolutions temporelles et spatiales méritent également un approfondissement pour aboutir à des biomarqueurs spécifiques de la biologie, physiologie et même neurologie. L'enjeu est à la fois de les mettre en place, de les prouver, mais aussi de comprendre et prendre en compte les biais des objets sur lesquels repose l'ULM telle qu'elle est définie actuellement.



4 Vers l'ULM clinique

L'application clinique en routine est encore lointaine. Les premiers résultats chez l'humain confortent son utilisation et les essais sur les animaux montrent un réel intérêt de cette technologie dans un contexte pathologique, en particulier pour le diagnostic de l'AVC, ou les tumeurs.

Un certain nombre de freins doivent encore être levés pour convaincre le corps médical de son utilisation généralisée. Les machines utilisées en recherche sont assez spécifiques et pas toujours adaptées pour l'imagerie humaine en termes de cadence d'imagerie et de gestion des données. Les temps d'acquisition devraient être réduits sans perte de résolution ni sensibilité. De même, les temps de traitement sont aujourd'hui encore beaucoup trop longs pour l'échelle clinique. Ce point-là pourrait être résolu avec les grandes compagnies d'échographes qui sont maintenant capable de faire de l'imagerie 3D avec un rendu quasi-temps réel. L'implémentation de l'ULM sur ce type de machine pourrait réduire considérablement les temps de calcul avec des processus dédiés et spécifiques.

L'étude du cerveau humain est particulièrement intéressante par la complexité de la microvascularisation avec le couplage neurovasculaire et toutes les pathologies qui peuvent s'y développer. Elle se heurte cependant à une difficulté supplémentaire : la barrière de l'os qui peut dans certains cas empêcher l'imagerie par ultrasons. Des développements supplémentaires seront certainement nécessaires pour améliorer le contraste et la sensibilité dans les vaisseaux du cerveau. On peut citer les approches par correction d'aberration [Demené, 2021 ; Soulioti, 2020] ou les méthodes non-linéaires pour s'affranchir du signal linéaire des structures osseuses.

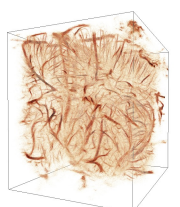
Les pistes de recherche devraient également s'orienter sur l'extraction d'informations des trajectoires des microbulles pour caractériser les flux vasculaires. Des biomarqueurs doivent être conçus avec et pour les médecins pour faire exprimer ces traces sur des pathologies particulières. La collaboration doit se faire avec le corps médical dès maintenant, après les multiples démonstrations de cette technologie.

C'est un travail long, partagé entre différents acteurs technologiques, scientifiques, médicaux, industriels. La recherche sur ce domaine avance vite avec des nouveautés proposées par les différentes équipes internationales chaque année. Les collaborations hospitalo-universitaires accélèrent le transfert clinique et devraient aboutir dans les prochaines années à des démonstrations robustes de son application et pertinence pour l'imagerie médicale.

5 Et après ?

D'ici une dizaine d'années, on peut imaginer que la technologie sera mature et peut-être présente dans les parcours médicaux en soutien des autres modalités d'imagerie. En 2D ou 3D, elle pourra être utilisée pour caractériser la vascularisation en remplacement de l'IRM ou l'angiographie aux rayons X.

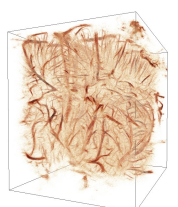
Un sujet d'application pourrait être le suivi de l'angiogenèse dans les tumeurs pour établir le stade de développement tumoral. L'utilisation des ultrasons pourrait aussi être couplée à une imagerie spécifique avec des particules fonctionnalisées ou avec les ultrasons thérapeutiques.



Au-delà de l'imagerie du réseau vasculaire, l'information quantitative des particules imagées donnera probablement accès à des constantes physiologiques nouvelles ou déjà accessibles de manière invasive, comme la pression artérielle, avec une résolution et sensibilité plus élevées.

Aujourd'hui, l'intérêt de cette modalité d'imagerie est sa résolution spatiale et temporelle, mais aussi son caractère accessible et disponible. À l'échelle de quelques décennies, les améliorations sur les IRM et scanners devraient certainement réduire les coûts, l'encombrement et l'invasivité. Les systèmes de santé des pays à fort indice de développement humain auront réussi à couvrir suffisamment les territoires de grands imageurs pour pallier au manque de disponibilité et d'accessibilité. Ces systèmes offriront *a priori* de meilleures performances pour l'imagerie du cerveau avec un champ de vue total, une résolution améliorée et pas de contrainte d'absorption du crâne. Pour l'IRM, on peut citer le projet Iseult (CEA, NeuroSpin) qui vise à développer un scanner très haut champ (11,7 Tesla) accédant ainsi à une très haute résolution spatiale et temporelle.

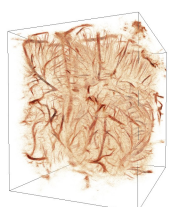
Finalement, le principe de microscopie par localisation pourra aussi être transféré à d'autres modalités d'imagerie. Rappelons que l'ULM est issue de l'imagerie optique (SMLM). De nouvelles modalités d'imagerie devraient apparaître avec des spécificités à des réseaux particuliers, pathologies ou encore aux tâches fonctionnelles avec une meilleure résolution spatiale, temporelle, et sensibilité.



Le mot de la fin

Au cours de ces trois années de thèse, je me suis lancé dans l'aventure de la super-résolution ultrasonore. J'espère avoir contribué et partagé mes expériences et connaissances avec la communauté. L'apprentissage se fait autant en partageant qu'en recevant des autres.

C'est ainsi que se clôt ce manuscrit et mes travaux de recherche. J'espère que ma contribution ne sera pas vaine et inspirera les prochains qui se lanceront dans l'aventure de la *superloc*. Que ce travail ne soit pas un "tout ça pour ça".



Liste des publications

Articles à comité de lecture

A Chavignon, B Heiles, V Hingot, C Orset, D Vivien, O Couture. "*3D transcranial Ultrasound Localization Microscopy in rat brain with a multiplexed matrix probe*". IEEE Transactions on Biomedical Engineering (en édition).

DOI: [10.1109/TBME.2021.3137265](https://doi.org/10.1109/TBME.2021.3137265)

B Heiles*, **A Chavignon***, V Hingot, P Lopez, E Teston, O Couture. "*Performance benchmarking of microbubble-localization algorithms for ultrasound localization microscopy*". Nature Biomedical Engineering (en édition), *contribution égale.

V Hingot, **A Chavignon**, B Heiles, O Couture. "*Measuring image resolution in Ultrasound Localization Microscopy*". IEEE Transactions on Medical Imaging, 2021 Jul 19.

DOI: [10.1109/TMI.2021.3097150](https://doi.org/10.1109/TMI.2021.3097150)

Articles en préparation

A Chavignon, V Hingot, C Orset, D Vivien, O Couture. "*3D transcranial Ultrasound Localization Microscopy discriminates between ischemic and hemorrhagic stroke at the early phase*". Theranostics (en révision).

B Heiles, **A Chavignon**, A Bergel, V Hingot, H Serroune, D Maresca, S Pezet, M Pernot, M Tanter, O Couture. "*Volumetric ultrasound localization microscopy of the whole brain microvasculature*". (en préparation) & bioRxiv.

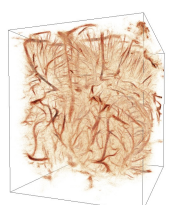
DOI: [10.1101/2021.09.17.460797](https://doi.org/10.1101/2021.09.17.460797)

Conférences internationales (premier auteur)

A Chavignon*, B Heiles*, V Hingot, O Couture. "*Single particle localization algorithms for Ultrasound Localization Microscopy (ULM) in silico and in vivo*". 25th European symposium on Ultrasound Contrast Imaging, Rotterdam, 2020 (poster), *contribution égale.

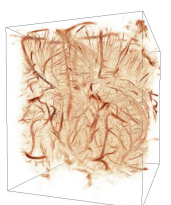
A Chavignon, B Heiles, V Hingot, O Couture. "*3D Transcranial Ultrasound Localization Microscopy in Rat with a Multiplexed Matrix Probe*". IEEE International Ultrasonics Symposium, 2020 (oral).

A Chavignon, B Heiles, V Hingot, O Couture. "*3D Transcranial Ultrasound Localization Microscopy in Rat with a Multiplexed Matrix Probe*". 26th European symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 2021 (oral).



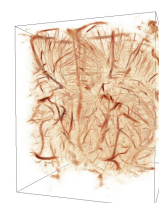
A Chavignon, V Hingot, C Orset, D Vivien, O Couture. "*Volumetric ultrasound localization microscopy differentiates acute strokes in the rat brain*". 7th European Stroke Organisation Conference (ESOC), 2021 (poster).

A Chavignon, V Hingot, C Orset, D Vivien, O Couture. "*Differentiation of acute stroke with noninvasive Volumetric Ultrasound Localization Microscopy in the rat brain*". IEEE International Ultrasonics Symposium, 2021 (oral), finaliste du *Student Award Competition*.

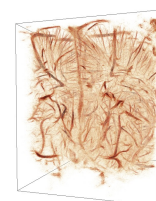


Bibliographie

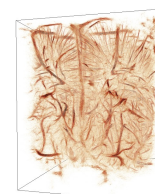
- [Ackermann, 2016] Dimitri ACKERMANN et Georg SCHMITZ. « Detection and Tracking of Multiple Microbubbles in Ultrasound B-Mode Images ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 63.1 (2016), p. 72-82 (cf. p. 47, 49).
- [Anandakrishnan, 2021] Nanditha ANANDAKRISHNAN, Hang YE, Zipeng GUO, Zhaowei CHEN, Kyle I. MENTKOWSKI, Jennifer K. LANG et al. « Fast Stereolithography Printing of Large-Scale Biocompatible Hydrogel Models ». *Advanced Healthcare Materials* 10.10 (2021), p. 2002103 (cf. p. 57).
- [Anfray, 2021] Antoine ANFRAY, Camille BRODIN, Antoine DRIEU, Fanny POTZEHA, Basile DALARUN, Véronique AGIN et al. « Single- and two- chain tissue type plasminogen activator treatments differentially influence cerebral recovery after stroke ». *Experimental Neurology* 338 (2021), p. 113606 (cf. p. 16).
- [Averkiou, 2020] Michalakis A. AVERKIOU, Matthew F. BRUCE, Jeffrey E. POWERS, Paul S. SHEERAN et Peter N. BURNS. « Imaging Methods for Ultrasound Contrast Agents ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 46.3 (2020), p. 498-517 (cf. p. 45).
- [Banterle, 2013] Niccolò BANTERLE, Khanh Huy BUI, Edward A. LEMKE et Martin BECK. « Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy ». *Journal of Structural Biology* 183.3 (2013), p. 363-367 (cf. p. 55).
- [Baranger, 2021] Jerome BARANGER, Charlie DEMENE, Alice FREROT, Flora FAURE, Catherine DELANOË, Hicham SERROUNE et al. « Bedside functional monitoring of the dynamic brain connectivity in human neonates ». *Nature Communications* 12.1 (2021), p. 1080 (cf. p. 35, 36).
- [Basude, 2001] Raghuvver BASUDE et Margaret A. WHEATLEY. « Generation of ultraharmonics in surfactant based ultrasound contrast agents : use and advantages ». *Ultrasonics* 39.6 (2001), p. 437-444 (cf. p. 45).
- [Bendok, 2012] Bernard R. BENDOK, éd. *Hemorrhagic and ischemic stroke : medical, imaging, surgical, and interventional approaches ; [plus e-content online]*. New York : Thieme, 2012 (cf. p. 4, 6, 10).
- [Bercoff, 2004] J. BERCOFF, M. TANTER et M. FINK. « Supersonic shear imaging : a new technique for soft tissue elasticity mapping ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 51.4 (2004), p. 396-409 (cf. p. 34).
- [Bercoff, 2011] Jeremy BERCOFF. « Ultrafast Ultrasound Imaging ». *Ultrasound Imaging - Medical Applications*. Sous la dir. d'Oleg MININ. InTech, 2011 (cf. p. 26, 33, 34).
- [Bernal, 2020] Miguel BERNAL, Bryan CUNITZ, Daniel ROHRBACH et Ron DAIGLE. « High-frame-rate volume imaging using sparse-random-aperture compounding ». *Physics in Medicine & Biology* 65.17 (2020), p. 175002 (cf. p. 67).
- [Betzig, 2006] Eric BETZIG, George H. PATTERSON, Rachid SOUGRAT, O. Wolf LINDWASSER, Scott OLENYCH, Juan S. BONIFACINO et al. « Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution ». *Science* 313.5793 (2006), p. 1642-1645 (cf. p. 39).
- [Birenbaum, 2011] Dale BIRENBAUM, Laura W. BANCROFT et Gary J. FELSBERG. « Imaging in Acute Stroke ». *Western Journal of Emergency Medicine* 12.1 (2011), p. 67-76 (cf. p. 10, 14).
- [Bokor, 2001] Daniela BOKOR, John B. CHAMBERS, Peter J. REES, Timothy G. K. MANT, Franco LUZZANI et Alberto SPINAZZI. « Clinical Safety of SonoVue™, a New Contrast Agent for Ultrasound Imaging, in Healthy Volunteers and in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease ». *Investigative Radiology* 36.2 (2001), p. 104-109 (cf. p. 44).
- [Bouakaz, 2002] Ayache BOUAKAZ, Sigmund FRIGSTAD, Folkert J TEN CATE et Nico de JONG. « Super harmonic imaging : a new imaging technique for improved contrast detection ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 28.1 (2002), p. 59-68 (cf. p. 45).



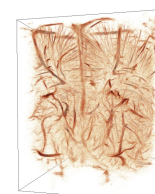
- [Brown, 2019] Jemma BROWN, Kirsten CHRISTENSEN-JEFFRIES, Sevan HARPUR, Ge ZHANG, Jiaqi ZHU, Christopher DUNSBY et al. « Investigation of Microbubble Detection Methods for Super-Resolution Imaging of Microvasculature ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 66.4 (2019), p. 676-691 (cf. p. 46, 48).
- [Brunner, 2020] Clément BRUNNER, Micheline GRILLET, Arnau SANS-DUBLANC, Karl FARROW, Théo LAMBERT, Emilie MACÉ et al. « A Platform for Brain-wide Volumetric Functional Ultrasound Imaging and Analysis of Circuit Dynamics in Awake Mice ». *Neuron* 108.5 (2020), 861-875.e7 (cf. p. 35, 68).
- [Burns, 2000] Peter N. BURNS, Stephanie R. WILSON et David Hope SIMPSON. « Pulse Inversion Imaging of Liver Blood Flow : Improved Method for Characterizing Focal Masses with Microbubble Contrast ». *Investigative Radiology* 35.1 (2000), p. 58 (cf. p. 45).
- [Campbell, 2019] Bruce C. V. CAMPBELL, Deidre A. DE SILVA, Malcolm R. MACLEOD, Shelagh B. COUTTS, Lee H. SCHWAMM, Stephen M. DAVIS et al. « Ischaemic stroke ». *Nature Reviews Disease Primers* 5.1 (2019), p. 70 (cf. p. 4).
- [Chan, 2011] Vincent CHAN et Anahi PERLAS. « Basics of Ultrasound Imaging ». *Atlas of Ultrasound-Guided Procedures in Interventional Pain Management*. Sous la dir. de Samer N. NAROUZE. New York, NY : Springer, 2011, p. 13-19 (cf. p. 22).
- [Christensen-Jeffries, 2017a] Kirsten CHRISTENSEN-JEFFRIES, Jemma BROWN, Paul ALJABAR, Mengxing TANG, Christopher DUNSBY et Robert J. ECKERSLEY. « 3-D In Vitro Acoustic Super-Resolution and Super-Resolved Velocity Mapping Using Microbubbles ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 64.10 (2017), p. 1478-1486 (cf. p. 60).
- [Christensen-Jeffries, 2015] Kirsten CHRISTENSEN-JEFFRIES, Richard J. BROWNING, Meng-Xing TANG, Christopher DUNSBY et Robert J. ECKERSLEY. « In Vivo Acoustic Super-Resolution and Super-Resolved Velocity Mapping Using Microbubbles ». *IEEE Transactions on Medical Imaging* 34.2 (2015), p. 433-440 (cf. p. 40-42, 46-48, 50).
- [Christensen-Jeffries, 2020] Kirsten CHRISTENSEN-JEFFRIES, Olivier COUTURE, Paul A. DAYTON, Yonina C. ELDAR, Kullervo HYNYNEN, Fabian KIESSLING et al. « Super-resolution Ultrasound Imaging ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 46.4 (2020), p. 865-891 (cf. p. 58).
- [Christensen-Jeffries, 2017b] Kirsten CHRISTENSEN-JEFFRIES, Sevan HARPUR, Jemma BROWN, Peter N. T. WELLS, Paul ALJABAR, Christopher DUNSBY et al. « Microbubble Axial Localization Errors in Ultrasound Super-Resolution Imaging ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 64.11 (2017), p. 1644-1654 (cf. p. 48).
- [Christiansen, 2015] Thomas Lehrmann CHRISTIANSEN, Morten Fischer RASMUSSEN, Jan Peter BAGGE, Lars Nordahl MOESNER, Jørgen Arendt JENSEN et Erik Vilain THOMSEN. « 3-D imaging using row-column-addressed arrays with integrated apodization— part ii : transducer fabrication and experimental results ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 62.5 (2015), p. 959-971 (cf. p. 67).
- [Claron, 2021] Julien CLARON, Vincent HINGOT, Isabelle RIVALS, Line RAHAL, Olivier COUTURE, Thomas DEFFIEUX et al. « Large-scale functional ultrasound imaging of the spinal cord reveals in-depth spatiotemporal responses of spinal nociceptive circuits in both normal and inflammatory states ». *Pain* 162.4 (2021), p. 1047-1059 (cf. p. 57).
- [CNAM, 2018] CNAM. *Points repère 50 - L'activité des médecins libéraux à travers la CCAM*. Rapp. tech. 50. Caisse Nationale d'Assurance Maladie, 2018 (cf. p. 21).
- [Cobbold, 2007] R. S. C. COBBOLD. *Foundations of Biomedical Ultrasound*. Oxford university press. T. 350. 2007 (cf. p. 24, 27, 149).
- [Cormier, 2021] Philippe CORMIER, Jonathan PORÉE, Chloé BOURQUIN et Jean PROVOST. « Dynamic Myocardial Ultrasound Localization Angiography ». *IEEE Transactions on Medical Imaging* (2021), p. 1-1 (cf. p. 54).
- [Correia, 2018] M CORREIA, T DEFFIEUX, S CHATELIN, J PROVOST, M TANTER et M PERNOT. « 3D elastic tensor imaging in weakly transversely isotropic soft tissues ». *Physics in Medicine & Biology* 63.15 (2018), p. 155005 (cf. p. 66).
- [Correia, 2016] Mafalda CORREIA, Jean PROVOST, Mickael TANTER et Mathieu PERNOT. « 4D ultrafast ultrasound flow imaging : in vivo quantification of arterial volumetric flow rate in a single heartbeat ». *Physics in Medicine and Biology* 61.23 (2016), p. L48-L61 (cf. p. 66).
- [Cosgrove, 2010] David COSGROVE et Nathalie LASSAU. « Imaging of perfusion using ultrasound ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 37.1 (2010), p. 65-85 (cf. p. 30, 31, 45).
- [Couture, 2012] O. COUTURE, M. FINK et M. TANTER. « Ultrasound contrast plane wave imaging ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 59.12 (2012) (cf. p. 46).



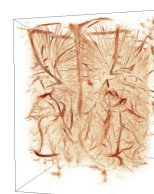
- [Couture, 2009] Olivier COUTURE, Souad BANNOUF, Gabriel MONTALDO, Jean-François AUBRY, Mathias FINK et Mickael TANTER. « Ultrafast Imaging of Ultrasound Contrast Agents ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 35.11 (2009), p. 1908-1916 (cf. p. 35).
- [Couture, 2011] Olivier COUTURE, Benoit BESSON, Gabriel MONTALDO, Mathias FINK et Mickael TANTER. « Microbubble ultrasound super-localization imaging (MUSLI) ». *Ultrasonics Symposium (IUS), 2011 IEEE International*. IEEE, 2011, p. 1285-1287 (cf. p. 40, 41, 54).
- [Couture, 2018] Olivier COUTURE, Vincent HINGOT, Baptiste HEILES, Pauline MULEKI-SEYA et Mickael TANTER. « Ultrasound Localization Microscopy and Super-Resolution : A State of the Art ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 65.8 (2018), p. 1304-1320 (cf. p. 28, 49, 57, 179).
- [Couture, 2010] Olivier COUTURE, Mickael TANTER et Mathias FINK. « Method and Device for Ultrasound Imaging ». US20130301382A1. 2010 (cf. p. 40).
- [Dabrowski, 2001] Waldemar DABROWSKI, Joy DUNMORE-BUYZE, H. Neale CARDINAL et Aaron FENSTER. « A real vessel phantom for flow imaging : 3-d doppler ultrasound of steady flow ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 27.1 (2001), p. 135-141 (cf. p. 62).
- [Deffieux, 2021] Thomas DEFFIEUX, Charlie DEMENÉ et Mickael TANTER. « Functional Ultrasound Imaging : A New Imaging Modality for Neuroscience ». *Neuroscience* (2021) (cf. p. 34).
- [Demene, 2015] Charlie DEMENE, Thomas DEFFIEUX, Mathieu PERNOT, Bruno-Felix OSMANSKI, Valerie BIRAN, Jean-Luc GENNISSON et al. « Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity ». *IEEE Transactions on Medical Imaging* 34.11 (2015), p. 2271-2285 (cf. p. 35, 46).
- [Demené, 2021] Charlie DEMENÉ, Justine ROBIN, Alexandre DIZEUX, Baptiste HEILES, Mathieu PERNOT, Mickael TANTER et al. « Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients ». *Nature Biomedical Engineering* 5.3 (2021), p. 219-228 (cf. p. 55, 56, 60, 179, 181).
- [Demené, 2016] Charlie DEMENÉ, Elodie TIRAN, Lim-Anna SIEU, Antoine BERGEL, Jean Luc GENNISSON, Mathieu PERNOT et al. « 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography ». *NeuroImage* 127 (2016), p. 472-483 (cf. p. 63).
- [Dencks, 2019] Stefanie DENCKS, Marion PIEPENBROCK, Tatjana OPACIC, Barbara KRAUSPE, Elmar STICKELER, Fabian KIESSLING et al. « Clinical Pilot Application of Super-Resolution US Imaging in Breast Cancer ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 66.3 (2019), p. 517-526 (cf. p. 59).
- [Denk, 1990] W. DENK, J. H. STRICKLER et W. W. WEBB. « Two-photon laser scanning fluorescence microscopy ». *Science* 248.4951 (1990), p. 73-76 (cf. p. 17).
- [Desailly, 2013] Yann DESAILLY, Olivier COUTURE, Mathias FINK et Mickael TANTER. « Sono-activated ultrasound localization microscopy ». *Applied Physics Letters* 103.17 (2013), p. 174107 (cf. p. 40, 41, 47, 57, 60).
- [Desailly, 2015] Yann DESAILLY, Juliette PIERRE, Olivier COUTURE et Mickael TANTER. « Resolution limits of ultrafast ultrasound localization microscopy ». *Physics in Medicine and Biology* 60.22 (2015), p. 8723-8740 (cf. p. 48, 54).
- [Desailly, 2017] Yann DESAILLY, Anne-Marie TISSIER, Jean-Michel CORREAS, Frédéric WINTZENRIETH, Mickaël TANTER et Olivier COUTURE. « Contrast enhanced ultrasound by real-time spatiotemporal filtering of ultrafast images ». *Physics in Medicine and Biology* 62.1 (2017), p. 31-42 (cf. p. 35, 46).
- [Diehl, 2001] K. H. DIEHL, R. HULL, D. MORTON, R. PFISTER, Y. RABEMAMPIANINA, D. SMITH et al. « A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes ». *Journal of applied toxicology : JAT* 21.1 (2001), p. 15-23 (cf. p. 44).
- [Downey, 1996] Dónal B DOWNEY, David A NICOLLE, Morris F LEVIN et Aaron FENSTER. « Three-dimensional ultrasound imaging of the eye ». *Eye* 10.1 (1996), p. 75-81 (cf. p. 62).
- [Errico, 2016] Claudia ERRICO, Bruno-Félix OSMANSKI, Sophie PEZET, Olivier COUTURE, Zsolt LENKEI et Mickael TANTER. « Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultra-sensitive Doppler ». *NeuroImage* 124 (2016), p. 752-761 (cf. p. 35).
- [Errico, 2015] Claudia ERRICO, Juliette PIERRE, Sophie PEZET, Yann DESAILLY, Zsolt LENKEI, Olivier COUTURE et al. « Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging ». *Nature* 527.7579 (2015), p. 499-502 (cf. p. 42, 44, 46-48, 55, 56, 179).
- [Ertürk, 2012] Ali ERTÜRK, Klaus BECKER, Nina JÄHRLING, Christoph P MAUCH, Caroline D HOJER, Jackson G EGEN et al. « Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO ». *Nature Protocols* 7.11 (2012), p. 1983-1995 (cf. p. 18, 19).



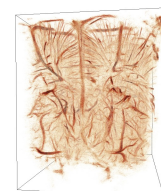
- [Ertürk, 2014] Ali ERTÜRK, Daniel LAFKAS et Cecile CHALOUNI. « Imaging Cleared Intact Biological Systems at a Cellular Level by 3DISCO ». *Journal of Visualized Experiments* 89 (2014), p. 51382 (cf. p. 18).
- [Faez, 2012] Telli FAEZ, Ilya SKACHKOV, Michel VERSLUIS, Klazina KOOIMAN et Nico de JONG. « In Vivo Characterization of Ultrasound Contrast Agents : Microbubble Spectroscopy in a Chicken Embryo ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 38.9 (2012), p. 1608-1617 (cf. p. 57).
- [Feigin, 2019] Valery L. FEIGIN, Emma NICHOLS, Tahiya ALAM, Marlena S. BANNICK, Ettore BEGHI, Natacha BLAKE et al. « Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 ». *The Lancet Neurology* 18.5 (2019), p. 459-480 (cf. p. 5).
- [Fenster, 2001] Aaron FENSTER, Dónal B. DOWNEY et H. Neale CARDINAL. « Three-dimensional ultrasound imaging ». *Physics in Medicine and Biology* 46.5 (2001), R67-R99 (cf. p. 62, 63).
- [Fernandez, 2003] A.T. FERNANDEZ, K.L. GAMMELMARK, J.J. DAHL, C.G. KEEN, R.C. GAUSS et G.E. TRAHEY. « Synthetic elevation beamforming and image acquisition capabilities using an 8 /spl times/ 128 1.75D array ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 50.1 (2003), p. 40-57 (cf. p. 63).
- [Flesch, 2017] M. FLESCH, M. PERNOT, J. PROVOST, G. FERIN, A. NGUYEN-DINH, M. TANTER et al. « 4Din vivoultrafast ultrasound imaging using a row-column addressed matrix and coherently-compounded orthogonal plane waves ». *Physics in Medicine and Biology* 62.11 (2017), p. 4571-4588 (cf. p. 67).
- [Foiret, 2017] Josquin FOIRET, Hua ZHANG, Tali ILOVITSH, Lisa MAHAKIAN, Sarah TAM et Katherine W. FERRARA. « Ultrasound localization microscopy to image and assess microvasculature in a rat kidney ». *Scientific Reports* 7.1 (2017) (cf. p. 57).
- [Forsberg, 2000] F. FORSBERG, W. T. SHI et B. B. GOLDBERG. « Subharmonic imaging of contrast agents ». *Ultrasonics* 38.1 (2000), p. 93-98 (cf. p. 45).
- [Foster, 2000] F. Stuart FOSTER. « Transducer materials and probe construction ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 26 (2000), S2-S5 (cf. p. 64).
- [Frinking, 2020] Peter FRINKING, Tim SEGERS, Ying LUAN et François TRANQUART. « Three Decades of Ultrasound Contrast Agents : A Review of the Past, Present and Future Improvements ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 46.4 (2020), p. 892-908 (cf. p. 43, 50).
- [Fry, 1978] F. J. FRY et J. E. BARGER. « Acoustical properties of the human skull ». *The Journal of the Acoustical Society of America* 63.5 (1978), p. 1576-1590 (cf. p. 24).
- [Gallot, 2011] Thomas GALLOT, Stefan CATHELIN, Philippe ROUX, Javier BRUM, Nicolas BENECH et Carlos NEGREIRA. « Passive elastography : shear-wave tomography from physiological-noise correlation in soft tissues ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 58.6 (2011), p. 1122-1126 (cf. p. 34).
- [Gennisson, 2013] J. -L. GENNISSON, T. DEFFIEUX, M. FINK et M. TANTER. « Ultrasound elastography : Principles and techniques ». *Diagnostic and Interventional Imaging*. Ultrasound elastography 94.5 (2013), p. 487-495 (cf. p. 34).
- [Gennisson, 2015] Jean-luc GENNISSON, Jean PROVOST, Thomas DEFFIEUX, Clément PAPADACCI, Marion IMBAULT, Mathieu PERNOT et al. « 4-D ultrafast shear-wave imaging ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 62.6 (2015), p. 1059-1065 (cf. p. 66).
- [Gessner, 2009] Ryan GESSNER, Marc LUKACS, Mike LEE, F. Stuart FOSTER et Paul A. DAYTON. « High-resolution, high-contrast ultrasound imaging using a prototype dual-frequency transducer in-vitro and in-vivo studies ». *2009 IEEE International Ultrasonics Symposium*. Rome, Italy : IEEE, 2009, p. 275-278 (cf. p. 45).
- [Gessner, 2013] Ryan C. GESSNER, C. Brandon FREDERICK, F. Stuart FOSTER et Paul A. DAYTON. « Acoustic Angiography : A New Imaging Modality for Assessing Microvasculature Architecture ». *International Journal of Biomedical Imaging* 2013 (2013), p. 1-9 (cf. p. 45).
- [Gilja, 1995] Odd Helge GILJA, Alf Inge SMIEVOLL, Nils THUNE, Knut MATRE, Trygve HAUSKEN, Svein ØDEGAARD et al. « In vivo comparison of 3D ultrasonography and magnetic resonance imaging in volume estimation of human kidneys ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 21.1 (1995), p. 25-32 (cf. p. 62).
- [Goertz, 2005] D.E. GOERTZ, E. CHERIN, A. NEEDLES, R. KARSHAFIAN, A.S. BROWN, P.N. BURNS et al. « High frequency nonlinear B-scan imaging of microbubble contrast agents ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 52.1 (2005), p. 65-79 (cf. p. 45).
- [Goldberg, 1994] Barry B. GOLDBERG, Ji-Bin LIU et Flemming FORSBERG. « Ultrasound contrast agents : A review ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 20.4 (1994), p. 319-333 (cf. p. 45).



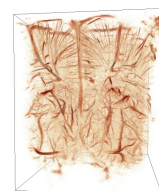
- [Hamilton, 2010] Nicola B. HAMILTON, David ATTWELL et Catherine N. HALL. « Pericyte-mediated regulation of capillary diameter : a component of neurovascular coupling in health and disease ». *Frontiers in Neuroenergetics* 2 (2010) (cf. p. 16).
- [Hanahan, 2000] Douglas HANAHAN et Robert A. WEINBERG. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100.1 (2000), p. 57-70 (cf. p. 58).
- [Hansen, 2016] Kristoffer B. HANSEN, Carlos A. VILLAGÓMEZ-HOYOS, Jens Christian BRASEN, Konstantinos DIAMANTIS, Vassilis SBOROS, Charlotte Mehlin SØRENSEN et al. « Robust microbubble tracking for super resolution imaging in ultrasound ». *2016 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*. 2016, p. 1-4 (cf. p. 47, 48, 57).
- [Hardy, 2021] Erwan HARDY, Jonathan PORÉE, Hatim BELGHARBI, Chloé BOURQUIN, Frederic LESAGE et Jean PROVOST. « Sparse channel sampling for ultrasound localization microscopy (SPARSE-ULM) ». *Physics in Medicine & Biology* (2021) (cf. p. 56).
- [Harpur, 2018] Sevan HARPUR, Kirsten CHRISTENSEN-JEFFRIES, Jemma BROWN, Yuanwei LI, Katherine J. WILLIAMS, Alun H. DAVIES et al. « Two-Stage Motion Correction for Super-Resolution Ultrasound Imaging in Human Lower Limb ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 65.5 (2018), p. 803-814 (cf. p. 53, 59).
- [Harpur, 2020] Sevan HARPUR, Piero TORTOLI, Robert J. ECKERSLEY, Chris DUNSBY, Meng-Xing TANG, Kirsten CHRISTENSEN-JEFFRIES et al. « 3-D Super-Resolution Ultrasound Imaging With a 2-D Sparse Array ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 67.2 (2020), p. 269-277 (cf. p. 57, 67-69).
- [Heel, 2005] Marin van HEEL et Michael SCHATZ. « Fourier shell correlation threshold criteria ». *Journal of Structural Biology* 151.3 (2005), p. 250-262 (cf. p. 55).
- [Heiles, 2019a] Baptiste HEILES. « 3D Ultrasound Localization Microscopy ». Ph.D. dissertation. Paris, France : PSL Research University, 2019 (cf. p. 49, 55-57, 68-70, 144).
- [Heiles, 2021a] Baptiste HEILES, Arthur CHAVIGNON, Antoine BERGEL, Vincent HINGOT, Hicham SERROUNE, David MARESCA et al. *Volumetric ultrasound localization microscopy of the whole brain microvasculature*. Rapp. tech. 2021, p. 2021.09.17.460797 (cf. p. 66, 69, 70, 144).
- [Heiles, 2021b] Baptiste HEILES, CHAVIGNON, ARTHUR, Vincent HINGOT, LOPEZ, PAULINE, TESTON, ELIOTT et Olivier COUTURE. « Open Platform for Ultrasound Localization Microscopy : performance assessment of localization algorithms ». *Nature Biomedical Engineering* (2021) (cf. p. 47-49, 55, 58, 150).
- [Heiles, 2019b] Baptiste HEILES, Mafalda CORREIA, Vincent HINGOT, Mathieu PERNOT, Jean PROVOST, Mickael TANTER et al. « Ultrafast 3D Ultrasound Localization Microscopy Using a 32x32 Matrix Array ». *IEEE Transactions on Medical Imaging* 38.9 (2019), p. 2005-2015 (cf. p. 66, 69, 70).
- [Heiss, 2017] Wolf-Dieter HEISS et Olivier Zaro WEBER. « Validation of MRI Determination of the Penumbra by PET Measurements in Ischemic Stroke ». *Journal of Nuclear Medicine* 58.2 (2017), p. 187-193 (cf. p. 13).
- [Helmchen, 2005] Fritjof HELMCHEN et Winfried DENK. « Deep tissue two-photon microscopy ». *Nature Methods* 2.12 (2005), p. 932-940 (cf. p. 17).
- [Hess, 2006] Samuel T. HESS, Thanu P. K. GIRIRAJAN et Michael D. MASON. « Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy ». *Biophysical Journal* 91.11 (2006), p. 4258-4272 (cf. p. 38, 39).
- [Hingot, 2021] V. HINGOT, A. CHAVIGNON, B. HEILES et O. COUTURE. « Measuring Image Resolution in Ultrasound Localization Microscopy ». *IEEE Transactions on Medical Imaging* 40.12 (2021), p. 3812-3819 (cf. p. 54-56).
- [Hingot, 2020] Vincent HINGOT, Camille BRODIN, Florent LEBRUN, Baptiste HEILES, Audrey CHAGNOT, Mervé YETIM et al. « Early Ultrafast Ultrasound Imaging of Cerebral Perfusion correlates with Ischemic Stroke outcomes and responses to treatment in Mice ». *Theranostics* 10.17 (2020), p. 7480-7491 (cf. p. 58, 59, 179).
- [Hingot, 2019] Vincent HINGOT, Claudia ERRICO, Baptiste HEILES, Line RAHAL, Mickael TANTER et Olivier COUTURE. « Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localization Microscopy ». *Scientific Reports* 9.1 (2019), p. 2456 (cf. p. 44, 46, 47, 49, 52, 54, 57, 69, 150).
- [Hingot, 2017] Vincent HINGOT, Claudia ERRICO, Mickael TANTER et Olivier COUTURE. « Subwavelength motion-correction for ultrafast ultrasound localization microscopy ». *Ultrasonics* 77 (2017), p. 17-21 (cf. p. 41, 53, 54, 56).



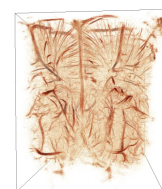
- [Hlushchuk, 2020] Ruslan HLUSHCHUK, David HABERTHÜR, Petr SOUKUP, Sebastien F. BARRÉ, Oleksiy-Zakhar KHOMA, Johannes SCHITTY et al. « Innovative high-resolution microCT imaging of animal brain vasculature ». *Brain Structure and Function* 225.9 (2020), p. 2885-2895 (cf. p. 19, 20, 107).
- [Holbek, 2017a] Simon HOLBEK, Caroline EWERTSEN, Hamed BOUZARI, Michael Johannes PIHL, Kristoffer Lindskov HANSEN, Matthias Bo STUART et al. « Ultrasonic 3-D Vector Flow Method for Quantitative *In Vivo* Peak Velocity and Flow Rate Estimation ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 64.3 (2017), p. 544-554 (cf. p. 66).
- [Holbek, 2017b] Simon HOLBEK, Kristoffer Lindskov HANSEN, Hamed BOUZARI, Caroline EWERTSEN, Matthias Bo STUART, Carsten THOMSEN et al. « Common Carotid Artery Flow Measured by 3-D Ultrasonic Vector Flow Imaging and Validated with Magnetic Resonance Imaging ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 43.10 (2017), p. 2213-2220 (cf. p. 66).
- [Holbek, 2015] Simon HOLBEK, Michael Johannes PIHL, Caroline EWERTSEN, Michael Bachmann NIELSEN et Jørgen Arendt JENSEN. « In vivo 3-D vector velocity estimation with continuous data ». *2015 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*. 2015, p. 1-4 (cf. p. 66).
- [Hölscher, 2005] Thilo HÖLSCHER, Wilko G. WILKENING, Patrick D. LYDEN et Robert F. MATTREY. « Transcranial ultrasound angiography (tUSA) : A new approach for contrast specific imaging of intracranial arteries ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 31.8 (2005), p. 1001-1006 (cf. p. 31).
- [Hu, 2010] Song HU et Lihong V. WANG. « Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature ». *Journal of Biomedical Optics* 15.1 (2010), p. 011101 (cf. p. 17).
- [Huang, 2020] Chengwu HUANG, Matthew R. LOWERISON, Joshua D. TRZASKO, Armando MANDUCA, Yoram BRESLER, Shanshan TANG et al. « Short Acquisition Time Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging via Microbubble Separation ». *Scientific Reports* 10.1 (2020), p. 6007 (cf. p. 53, 57, 58, 177).
- [Huang, 2021] Chengwu HUANG, Wei ZHANG, Ping GONG, U-Wai LOK, Shanshan TANG, Tinghui YIN et al. « Super-resolution ultrasound localization microscopy based on a high frame-rate clinical ultrasound scanner : an in-human feasibility study ». *Physics in Medicine & Biology* 66.8 (2021), 08NT01 (cf. p. 53, 59, 179).
- [Ignee, 2016] Andre IGNEE, Nathan S. S. ATKINSON, Gudrun SCHUESSLER et Christoph F. DIETRICH. « Ultrasound contrast agents ». *Endoscopic Ultrasound* 5.6 (2016), p. 355-362 (cf. p. 30).
- [Imbault, 2017] Marion IMBAULT, Dorian CHAUVET, Jean-Luc GENNISSON, Laurent CAPELLE et Mickael TANTER. « Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity ». *Scientific Reports* 7.1 (2017), p. 7304 (cf. p. 35).
- [Jährling, 2009] Nina JÄHRLING, Klaus BECKER et Hans-Ulrich DODT. « 3D-reconstruction of blood vessels by ultramicroscopy ». *Organogenesis* 5.4 (2009), p. 227-230 (cf. p. 19).
- [Jensen, 2013] J. A. JENSEN, Hans HOLTEN-LUND, R. T. NILSSON, M. HANSEN, U. D. LARSEN, R. P. DOMSTEN et al. « SARUS : A synthetic aperture real-time ultrasound system ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 60.9 (2013), p. 1838-1852 (cf. p. 66, 69).
- [Jensen, 1991] Jørgen Arendt JENSEN. « A model for the propagation and scattering of ultrasound in tissue ». *The Journal of the Acoustical Society of America* 89.1 (1991), p. 182-190 (cf. p. 21).
- [Jensen, 2020] Jørgen Arendt JENSEN, Martin Lind OMMEN, Sigrid Husebo OYGARD, Mikkel SCHOU, Thomas SAMS, Matthias Bo STUART et al. « Three-Dimensional Super-Resolution Imaging Using a Row-Column Array ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 67.3 (2020), p. 538-546 (cf. p. 54, 56, 68, 69).
- [Jong, 2009] Nico de JONG, Marcia EMMER, Annemieke van WAMEL et Michel VERSLUIS. « Ultrasonic characterization of ultrasound contrast agents ». *Medical & Biological Engineering & Computing* 47.8 (2009), p. 861-873 (cf. p. 44, 45).
- [Jorgensen, 1998] Steven M. JORGENSEN, Omer DEMIRKAYA et Erik L. RITMAN. « Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 275.3 (1998), H1103-H1114 (cf. p. 19).
- [Keller, 2015] Philipp J. KELLER et Misha B. AHRENS. « Visualizing Whole-Brain Activity and Development at the Single-Cell Level Using Light-Sheet Microscopy ». *Neuron* 85.3 (2015), p. 462-483 (cf. p. 18).
- [Kirsch, 2013] Jonathan D. KIRSCH, Mahan MATHUR, Michele H. JOHNSON, Gunabushanam GOWTHAMAN et Leslie M. SCOUTT. « Advances in Transcranial Doppler US : Imaging Ahead ». *RadioGraphics* 33.1 (2013), E1-E14 (cf. p. 14, 15, 31).
- [Kuhn, 1955] H. W. KUHN. « The Hungarian method for the assignment problem ». *Naval Research Logistics Quarterly* 2.1-2 (1955), p. 83-97 (cf. p. 49).



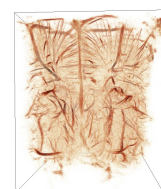
- [Li, 2019] Bo LI, Rachida AID-LAUNAI, Marie-Noëlle LABOUR, Alina ZENYCH, Maya JUENET, Christine CHOQUEUX et al. « Functionalized polymer microbubbles as new molecular ultrasound contrast agent to target P-selectin in thrombus ». *Biomaterials* 194 (2019), p. 139-150 (cf. p. 180).
- [Light, 2001] Edward D LIGHT, Salim F IDRIS, Patrick D WOLF et Stephen W SMITH. « Real-time three-dimensional intracardiac echocardiography ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 27.9 (2001), p. 1177-1183 (cf. p. 64).
- [Lin, 2017] Fanglue LIN, Sarah E. SHELTON, David ESPÍNDOLA, Juan D. ROJAS, Gianmarco PINTON et Paul A. DAYTON. « 3-D Ultrasound Localization Microscopy for Identifying Microvascular Morphology Features of Tumor Angiogenesis at a Resolution Beyond the Diffraction Limit of Conventional Ultrasound ». *Theranostics* 7.1 (2017), p. 196-204 (cf. p. 58, 60).
- [Lindsay, 2019] M Patrice LINDSAY, Bo NORRVING, Ralph L SACCO, Michael BRAININ, Werner HACKE, Sheila MARTINS et al. « World Stroke Organization (WSO) : Global Stroke Fact Sheet 2019 ». *International Journal of Stroke* 14.8 (2019), p. 806-817 (cf. p. 5).
- [Lohmaier, 2004] Stefan LOHMAIER, Alexander GHANEM, Christian VELTMANN, Torsten SOMMER, Matt BRUCE et Klaus TIEMANN. « In vitro and in vivo studies on continuous echo-contrast application strategies using SonoVue in a newly developed rotating pump setup ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 30.9 (2004), p. 1145-1151 (cf. p. 44).
- [Lok, 2021] U.-Wai LOK, Chengwu HUANG, Ping GONG, Shanshan TANG, Lulu YANG, Wei ZHANG et al. « Fast super-resolution ultrasound microvessel imaging using spatiotemporal data with deep fully convolutional neural network ». *Physics in Medicine & Biology* 66.7 (2021), p. 075005 (cf. p. 57, 177).
- [Lowe, 2011] Lisa H. LOWE et Zachary BAILEY. « State-of-the-Art Cranial Sonography : Part 1, Modern Techniques and Image Interpretation ». *American Journal of Roentgenology* 196.5 (2011), p. 1028-1033 (cf. p. 29).
- [Lowerison, 2020] Matthew R. LOWERISON, Chengwu HUANG, Fabrice LUCIEN, Shigao CHEN et Pengfei SONG. « Ultrasound localization microscopy of renal tumor xenografts in chicken embryo is correlated to hypoxia ». *Scientific Reports* 10.1 (2020), p. 2478 (cf. p. 58, 59, 179).
- [Lowerison, 2021] Matthew R. LOWERISON, Nathiya Chandra SEKARAN, Wei ZHANG, Zhijie DONG, Xi CHEN, Daniel A. LLANO et al. « Aging-related cerebral microvascular changes visualized using Ultrasound Localization Microscopy in the living mouse ». *bioRxiv* (2021), p. 2021.06.04.447141 (cf. p. 58, 59, 179).
- [Mace, 2013] Emilie MACE, Gabriel MONTALDO, Bruno-Felix OSMANSKI, Ivan COHEN, Mathias FINK et Mickael TANTER. « Functional ultrasound imaging of the brain : theory and basic principles ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 60.3 (2013), p. 492-506 (cf. p. 34).
- [Macé, 2011] Emilie MACÉ, Gabriel MONTALDO, Ivan COHEN, Michel BAULAC, Mathias FINK et Mickael TANTER. « Functional ultrasound imaging of the brain ». *Nature Methods* 8.8 (2011), p. 662-664 (cf. p. 34, 35).
- [Maïer, 2018] Benjamin MAÏER, Perrine BOURSIN et Mikael MAZIGHI. « Phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux, chaque minute compte ». *Soins* 63.828 (2018), p. 28-31 (cf. p. 6).
- [Martin, 2014] K. Heath MARTIN, Brooks D. LINDSEY, Jianguo MA, Mike LEE, Sibol LI, F. Stuart FOSTER et al. « Dual-Frequency Piezoelectric Transducers for Contrast Enhanced Ultrasound Imaging ». *Sensors* 14.11 (2014), p. 20825-20842 (cf. p. 45).
- [Martina, 2005] Alberto Della MARTINA, Karsten MEYER-WIETHE, Eric ALLÉMANN et Günter SEIDEL. « Ultrasound Contrast Agents for Brain Perfusion Imaging and Ischemic Stroke Therapy ». *Journal of Neuroimaging* 15.3 (2005), p. 217-232 (cf. p. 31).
- [Matrone, 2014] Giulia MATRONE, Alessandro S. SAVOIA, Marco TERENCE, Giosuè CALIANO, Fabio QUAGLIA et Giovanni MAGENES. « A volumetric CMUT-based ultrasound imaging system simulator with integrated reception and μ -beamforming electronics models ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 61.5 (2014), p. 792-804 (cf. p. 65).
- [Meyer-Wiethe, 2009] Karsten MEYER-WIETHE, Fabrizio SALLUSTIO et Rolf KERN. « Diagnosis of Intracerebral Hemorrhage with Transcranial Ultrasound ». *Cerebrovascular Diseases* 27.Suppl. 2 (2009), p. 40-47 (cf. p. 15).
- [Milecki, 2021] Leo MILECKI, Jonathan POREE, Hatim BELGHARBI, Chloe BOURQUIN, Rafat DAMSEH, Patrick DELAFONTAINE-MARTEL et al. « A Deep Learning Framework for Spatiotemporal Ultrasound Localization Microscopy ». *IEEE Transactions on Medical Imaging* (2021), p. 1-1 (cf. p. 48, 53, 56, 57).
- [Montaldo, 2009] G. MONTALDO, M. TANTER, J. BERCOFF, N. BENECH et M. FINK. « Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 56.3 (2009), p. 489-506 (cf. p. 32, 33).



- [Montaldo, 2004] Gabriel MONTALDO, Mickaël TANTER et Mathias FINK. « Revisiting iterative time reversal processing : Application to detection of multiple targets ». *The Journal of the Acoustical Society of America* 115.2 (2004), p. 776-784 (cf. p. 34).
- [Muir, 2006] Keith W MUIR, Alastair BUCHAN, Rudiger von KUMMER, Joachim ROTHER et Jean-Claude BARON. « Imaging of acute stroke ». *The Lancet Neurology* 5.9 (2006), p. 755-768 (cf. p. 10).
- [Munkres, 1957] James MUNKRES. « Algorithms for the Assignment and Transportation Problems ». *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics* 5.1 (1957), p. 32-38 (cf. p. 49).
- [Nelson, 1998] Thomas R. NELSON et Dolores H. PRETORIUS. « Three-dimensional ultrasound imaging ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 24.9 (1998), p. 1243-1270 (cf. p. 62).
- [Nemoto, 2000] Edwin M. NEMOTO, Howard YONAS et Amin KASSAM. « Clinical experience with cerebral oximetry in stroke and cardiac arrest ». *Critical Care Medicine* 28.4 (2000), p. 1052-1054 (cf. p. 15).
- [Newsome, 2020] Isabel G. NEWSOME et Paul A. DAYTON. « Visualization of Microvascular Angiogenesis Using Dual-Frequency Contrast-Enhanced Acoustic Angiography : A Review ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 46.10 (2020), p. 2625-2635 (cf. p. 45).
- [Nogueira, 2018] Raul G. NOGUEIRA, Ashutosh P. JADHAV, Diogo C. HAUSSEN, Alain BONAFE, Ronald F. BUDZIK, Parita BHUVA et al. « Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct ». *New England Journal of Medicine* 378.1 (2018), p. 11-21 (cf. p. 6).
- [O'Reilly, 2013] Meaghan A. O'REILLY et Kullervo HYNYNEN. « A super-resolution ultrasound method for brain vascular mapping : Super-resolution ultrasound method for brain vascular mapping ». *Medical Physics* 40.11 (2013), p. 110701 (cf. p. 40, 41, 60).
- [Ommen, 2018] Martin Lind OMMEN, Mikkel SCHOU, Rujing ZHANG, Carlos Armando VILLAGÓMEZ HOYOS, Jorgen Arendt JENSEN, Niels Bent LARSEN et al. « 3D Printed Flow Phantoms with Fiducial Markers for Super-Resolution Ultrasound Imaging ». *2018 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*. 2018, p. 1-9 (cf. p. 57).
- [Opacic, 2018] Tatjana OPACIC, Stefanie DENCKS, Benjamin THEEK, Marion PIEPENBROCK, Dimitri ACKERMANN, Anne RIX et al. « Motion model ultrasound localization microscopy for preclinical and clinical multiparametric tumor characterization ». *Nature Communications* 9.1 (2018), p. 1527 (cf. p. 49, 58, 59).
- [Orset, 2007] Cyrille ORSET, Richard MACREZ, Alan R. YOUNG, Didier PANTHOU, Eduardo ANGLES-CANO, Eric MAUBERT et al. « Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion ». *Stroke* 38.10 (2007), p. 2771-2778 (cf. p. 16).
- [Osmanski, 2014] B. F. OSMANSKI, C. MARTIN, G. MONTALDO, P. LANIÈCE, F. PAIN, M. TANTER et al. « Functional ultrasound imaging reveals different odor-evoked patterns of vascular activity in the main olfactory bulb and the anterior piriform cortex ». *NeuroImage* 95 (2014), p. 176-184 (cf. p. 35).
- [Papadacci, 2017] Clement PAPANACCI, Victor FINEL, Jean PROVOST, Olivier VILLEMMAIN, Patrick BRUNEVAL, Jean-Luc GENNISSON et al. « Imaging the dynamics of cardiac fiber orientation in vivo using 3D Ultrasound Backscatter Tensor Imaging ». *Scientific Reports* 7.1 (2017), p. 830 (cf. p. 66).
- [Parthasarathy, 2012] Raghuvver PARTHASARATHY. « Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers ». *Nature Methods* 9.7 (2012), p. 724-726 (cf. p. 47).
- [Petrusca, 2018] Lorena PETRUSCA, François VARRAY, Rémi SOUCHON, Adeline BERNARD, Jean-Yves CHAPELON, Hervé LIEBGOTT et al. « Fast Volumetric Ultrasound B-Mode and Doppler Imaging with a New High-Channels Density Platform for Advanced 4D Cardiac Imaging/Therapy ». *Applied Sciences* 8.2 (2018), p. 200 (cf. p. 66).
- [Pinton, 2011] Gianmarco PINTON, Jean-Francois AUBRY, Emmanuel BOSSY, Marie MULLER, Mathieu PERNOT et Mickael TANTER. « Attenuation, scattering, and absorption of ultrasound in the skull bone : Absorption of ultrasound in the skull bone ». *Medical Physics* 39.1 (2011), p. 299-307 (cf. p. 24).
- [Prager, 2010] R W PRAGER, U Z IJAZ, A H GEE et G M TREECE. « Three-dimensional ultrasound imaging ». *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H : Journal of Engineering in Medicine* 224.2 (2010), p. 193-223 (cf. p. 64).
- [Provost, 2014] Jean PROVOST, Clement PAPANACCI, Juan Esteban ARANGO, Marion IMBAULT, Mathias FINK, Jean-Luc GENNISSON et al. « 3D ultrafast ultrasound imaging *in vivo* ». *Physics in Medicine and Biology* 59.19 (2014), p. L1-L13 (cf. p. 64, 66, 69).
- [Provost, 2015] Jean PROVOST, Clement PAPANACCI, Charlie DEMENE, Jean-Luc GENNISSON, Mickael TANTER et Mathieu PERNOT. « 3-D ultrafast doppler imaging applied to the noninvasive mapping of blood vessels in Vivo ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 62.8 (2015), p. 1467-1472 (cf. p. 66).



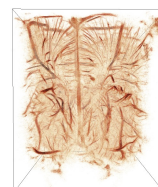
- [Purkayastha, 2012] Sushmita PURKAYASTHA et Farzaneh SOROND. « Transcranial Doppler Ultrasound : Technique and Application ». *Seminars in neurology* 32.4 (2012), p. 411-420 (cf. p. 15).
- [Rabut, 2019] Claire RABUT, Mafalda CORREIA, Victor FINEL, Sophie PEZET, Mathieu PERNOT, Thomas DEFFIEUX et al. « 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents ». *Nature Methods* 16.10 (2019), p. 994-997 (cf. p. 35, 66).
- [Rabut, 2020] Claire RABUT, Jérémy FERRIER, Adrien BERTOLO, Bruno OSMANSKI, Xavier MOUSSET, Sophie PEZET et al. « Pharmaco-fUS : Quantification of pharmacologically-induced dynamic changes in brain perfusion and connectivity by functional ultrasound imaging in awake mice ». *NeuroImage* 222 (2020), p. 117231 (cf. p. 35).
- [Ramm, 1991] O.T. von RAMM, S.W. SMITH et H.G. PAVY. « High-speed ultrasound volumetric imaging system. II. Parallel processing and image display ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 38.2 (1991), p. 109-115 (cf. p. 62).
- [Rasmussen, 2015] Morten Fischer RASMUSSEN, Thomas Lehrmann CHRISTIANSEN, Erik Vilain THOMSEN et Jørgen Arendt JENSEN. « 3-D imaging using row-column-addressed arrays with integrated apodization - part i : apodization design and line element beamforming ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 62.5 (2015), p. 947-958 (cf. p. 67).
- [Renier, 2014] Nicolas RENIER, Zhuhao WU, David J. SIMON, Jing YANG, Pablo ARIEL et Marc TESSIER-LAVIGNE. « iDISCO : A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging ». *Cell* 159.4 (2014), p. 896-910 (cf. p. 18).
- [Roldan-Valadez, 2014] Ernesto ROLDAN-VALADEZ et Mariana LOPEZ-MEJIA. « Current concepts on magnetic resonance imaging (MRI) perfusion-diffusion assessment in acute ischaemic stroke : a review & an update for the clinicians ». *The Indian Journal of Medical Research* 140.6 (2014), p. 717-728 (cf. p. 12).
- [Roux, 2016] Emmanuel ROUX. « 2D sparse array optimization and operating strategy for real-time 3D ultrasound imaging ». These de doctorat. Lyon, 2016 (cf. p. 65).
- [Roux, 2018] Emmanuel ROUX, François VARRAY, Lorena PETRUSCA, Christian CACHARD, Piero TORTOLI et Hervé LIEBGOTT. « Experimental 3-D Ultrasound Imaging with 2-D Sparse Arrays using Focused and Diverging Waves ». *Scientific Reports* 8.1 (2018) (cf. p. 66, 67).
- [Rubin, 1994] J M RUBIN, R O BUDE, P L CARSON, R L BREE et R S ADLER. « Power Doppler US : a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. ». *Radiology* 190.3 (1994), p. 853-856 (cf. p. 30).
- [Rust, 2006] Michael J. RUST, Mark BATES et Xiaowei ZHUANG. « Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) ». *Nature Methods* 3.10 (2006), p. 793-796 (cf. p. 39).
- [Sandrin, 1999] L SANDRIN, S. CATHELINE, M. TANTER, X. HENNEQUIN et M. FINK. « Time-Resolved Pulsed Elastography with Ultrafast Ultrasonic Imaging ». *Ultrasonic Imaging* 21.4 (1999), p. 259-272 (cf. p. 34).
- [Sassaroli, 2005] E SASSAROLI et K HYNYNEN. « Resonance frequency of microbubbles in small blood vessels : a numerical study ». *Physics in Medicine and Biology* 50.22 (2005), p. 5293-5305 (cf. p. 178).
- [Sauvage, 2018] J SAUVAGE, M FLESCHE, G FÉRIN, A NGUYEN-DINH, J PORÉE, M TANTER et al. « A large aperture row column addressed probe for *in vivo* 4D ultrafast doppler ultrasound imaging ». *Physics in Medicine & Biology* 63.21 (2018), p. 215012 (cf. p. 67).
- [Sauvage, 2020] Jack SAUVAGE, Jonathan PORÉE, Claire RABUT, Guillaume FÉRIN, Martin FLESCHE, Bogdan ROSINSKI et al. « 4D Functional Imaging of the Rat Brain Using a Large Aperture Row-Column Array ». *IEEE Transactions on Medical Imaging* 39.6 (2020), p. 1884-1893 (cf. p. 67).
- [Saver, 2006] Jeffrey L. SAVER. « Time Is Brain—Quantified ». *Stroke* 37.1 (2006), p. 263-266 (cf. p. 5).
- [Schneider, 1999] Michel SCHNEIDER. « Characteristics of SonoVue trade mark ». *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* 16.7, Pt 2 (1999), p. 743-746 (cf. p. 30, 43).
- [Schoen, 2021] Scott SCHOEN, Zhigen ZHAO, Ashley ALVA, Chengwu HUANG, Shigao CHEN et Costas ARVANITIS. « Morphological Reconstruction Improves Microvessel Mapping in Super-Resolution Ultrasound ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 68.6 (2021), p. 2141-2149 (cf. p. 57, 177).
- [Seidel, 2009] Günter SEIDEL et Stephen MEAIRS. « Ultrasound Contrast Agents in Ischemic Stroke ». *Cerebrovascular Diseases* 27.2 (2009), p. 25-39 (cf. p. 15, 31).
- [Seidel, 2002] Günter SEIDEL et Karsten MEYER. « Impact of ultrasound contrast agents in cerebrovascular diagnostics ». *European Journal of Ultrasound* 16.1 (2002), p. 81-90 (cf. p. 31).
- [Shattuck, 1984] David P. SHATTUCK, Marc D. WEINSHENKER, Stephen W. SMITH et Olaf T. von RAMM. « Explosocan : A parallel processing technique for high speed ultrasound imaging with linear phased arrays ». *The Journal of the Acoustical Society of America* 75.4 (1984), p. 1273-1282 (cf. p. 32).



- [Shih, 2012] Andy Y SHIH. « Two-Photon Microscopy as a Tool to Study Blood Flow and Neurovascular Coupling in the Rodent Brain » (2012), p. 33 (cf. p. 16-18).
- [Siepmann, 2011] Monica SIEPMANN, Georg SCHMITZ, Jessica BZYL, Moritz PALMOWSKI et Fabian KIESSLING. « Imaging tumor vascularity by tracing single microbubbles ». *2011 IEEE International Ultrasonics Symposium*. Orlando, FL, USA : IEEE, 2011, p. 1906-1909 (cf. p. 40, 41, 48, 51, 53).
- [Sloun, 2020] Ruud J. G. van SLOUN, Regev COHEN et Yonina C. ELDAR. « Deep Learning in Ultrasound Imaging ». *Proceedings of the IEEE* 108.1 (2020), p. 11-29 (cf. p. 47, 57).
- [Sloun, 2019] Ruud J.G. van SLOUN, Oren SOLOMON, Matthew BRUCE, Zin Z KHAING, Yonina C. ELDAR et Massimo MISCHI. « Deep Learning for Super-resolution Vascular Ultrasound Imaging ». *ICASSP 2019 - 2019 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP)*. Brighton, United Kingdom : IEEE, 2019, p. 1055-1059 (cf. p. 47).
- [Smith, 1991] S.W. SMITH, H.G. PAVY et O.T. von RAMM. « High-speed ultrasound volumetric imaging system. I. Transducer design and beam steering ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 38.2 (1991), p. 100-108 (cf. p. 62, 64, 67).
- [SNITEM, 2017] SNITEM. *Les insuffisances en matière d'équipements d'imagerie médicale en France : étude sur les délais d'attente pour un rendez-vous IRM en 2017*. Rapp. tech. SNITEM, 2017 (cf. p. 13).
- [Solomon, 2019] Oren SOLOMON, Ruud J. G. van SLOUN, Hessel WIJKSTRA, Massimo MISCHI et Yonina C. ELDAR. « Exploiting Flow Dynamics for Superresolution in Contrast-Enhanced Ultrasound ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 66.10 (2019), p. 1573-1586 (cf. p. 49).
- [Soloukey, 2020] Sadaf SOLOUKEY, Arnaud J. P. E. VINCENT, Djaina D. SATOER, Frits MASTIK, Marion SMITS, Clemens M. F. DIRVEN et al. « Functional Ultrasound (fUS) During Awake Brain Surgery : The Clinical Potential of Intra-Operative Functional and Vascular Brain Mapping ». *Frontiers in Neuroscience* 13 (2020) (cf. p. 35, 36).
- [Song, 2018a] Pengfei SONG, Armando MANDUCA, Joshua D. TRZASKO, Ronald E. DAIGLE et Shigao CHEN. « On the Effects of Spatial Sampling Quantization in Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 65.12 (2018), p. 2264-2276 (cf. p. 48).
- [Song, 2018b] Pengfei SONG, Joshua D. TRZASKO, Armando MANDUCA, Runqing HUANG, Ramanathan KADIRVEL, David F. KALLMES et al. « Improved Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging with Spatiotemporal Nonlocal Means Filtering and Bipartite Graph-Based Microbubble Tracking ». *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control* 65.2 (2018), p. 149-167 (cf. p. 46, 47, 49, 55).
- [Soulioti, 2020] Danai E. SOULIOTI, David ESPINDOLA, Paul A. DAYTON et Gianmarco F. PINTON. « Super-Resolution Imaging Through the Human Skull ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 67.1 (2020), p. 25-36 (cf. p. 60, 181).
- [Stride, 2003] E STRIDE et N SAFFARI. « Microbubble ultrasound contrast agents : A review ». *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H : Journal of Engineering in Medicine* 217.6 (2003), p. 429-447 (cf. p. 45).
- [Susaki, 2014] Etsuo A. SUSAKI, Kazuki TAINAKA, Dimitri PERRIN, Fumiaki KISHINO, Takehiro TAWARA, Tomonobu M. WATANABE et al. « Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis ». *Cell* 157.3 (2014), p. 726-739 (cf. p. 18).
- [Svoboda, 2006] Karel SVOBODA et Ryohei YASUDA. « Principles of Two-Photon Excitation Microscopy and Its Applications to Neuroscience ». *Neuron* 50.6 (2006), p. 823-839 (cf. p. 18).
- [Taghavi, 2021] Iman TAGHAVI, Sofie Bech ANDERSEN, Carlos Armando Villagómez HOYOS, Michael Bachmann NIELSEN, Charlotte Mehlin SØRENSEN et Jørgen Arendt JENSEN. « In vivo Motion Correction in Super Resolution Imaging of Rat Kidneys ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* (2021), p. 1-1 (cf. p. 53-55, 57).
- [Tang, 2020] Shanshan TANG, Pengfei SONG, Joshua D. TRZASKO, Matthew LOWERISON, Chengwu HUANG, Ping GONG et al. « Kalman Filter-Based Microbubble Tracking for Robust Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 67.9 (2020), p. 1738-1751 (cf. p. 49, 57, 177).
- [Tanter, 2002] M. TANTER, J. BERCOFF, L. SANDRIN et M. FINK. « Ultrafast compound imaging for 2-D motion vector estimation : application to transient elastography ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 49.10 (2002), p. 1363-1374 (cf. p. 32, 34).
- [Thomas, 2013] David H. THOMAS, Vassilis SBOROS, Marcia EMMER, Hendrik VOS et Nico DE JONG. « Microbubble oscillations in capillary tubes ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 60.1 (2013), p. 105-114 (cf. p. 178).



- [Tomer, 2014] Raju TOMER, Li YE, Brian HSUEH et Karl DEISSEROTH. « Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues ». *Nature Protocols* 9.7 (2014), p. 1682-1697 (cf. p. 19).
- [Tong, 1996] S. TONG, D. B. DOWNEY, H. N. CARDINAL et A. FENSTER. « A three-dimensional ultrasound prostate imaging system ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 22.6 (1996), p. 735-746 (cf. p. 62).
- [Ueda, 2020] Hiroki R. UEDA, Ali ERTÜRK, Kwanghun CHUNG, Viviana GRADINARU, Alain CHÉDOTAL, Pavel TOMANCAK et al. « Tissue clearing and its applications in neuroscience ». *Nature Reviews Neuroscience* 21.2 (2020), p. 61-79 (cf. p. 18).
- [Viessmann, 2013] O M VIESSMANN, R J ECKERSLEY, K CHRISTENSEN-JEFFRIES, M X TANG et C DUNSBY. « Acoustic super-resolution with ultrasound and microbubbles ». *Physics in Medicine and Biology* 58.18 (2013), p. 6447-6458 (cf. p. 40, 41).
- [Wang, 2012] L. V. WANG et S. HU. « Photoacoustic Tomography : In Vivo Imaging from Organelles to Organs ». *Science* 335.6075 (2012), p. 1458-1462 (cf. p. 17).
- [Wang, 2018] Shiyi WANG, John A. HOSSACK et Alexander L. KLIBANOV. « Targeting of microbubbles : contrast agents for ultrasound molecular imaging ». *Journal of Drug Targeting* 26.5-6 (2018), p. 420-434 (cf. p. 45).
- [Wildes, 1997] D.G. WILDES, R.Y. CHIAO, C.M.W. DAFT, K.W. RIGBY, L.S. SMITH et K.E. THOMENIUS. « Elevation performance of 1.25D and 1.5D transducer arrays ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 44.5 (1997), p. 1027-1037 (cf. p. 63).
- [Wilson, 2010] Stephanie R. WILSON et Peter N. BURNS. « Microbubble-enhanced US in Body Imaging : What Role? ». *Radiology* 257.1 (2010), p. 24-39 (cf. p. 30, 31).
- [Wygant, 2009] I. O. WYGANT, N. S. JAMAL, H. J. LEE, A. NIKOOZADEH, O. ORALKAN, M. KARAMAN et al. « An integrated circuit with transmit beamforming flip-chip bonded to a 2-D CMUT array for 3-D ultrasound imaging ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 56.10 (2009), p. 2145-2156 (cf. p. 65).
- [Xiong, 2017] Benyi XIONG, Anan LI, Yang LOU, Shangbin CHEN, Ben LONG, Jie PENG et al. « Precise Cerebral Vascular Atlas in Stereotaxic Coordinates of Whole Mouse Brain ». *Frontiers in Neuroanatomy* 11 (2017), p. 128 (cf. p. 146, 147).
- [Yao, 2013] Junjie YAO et Lihong V. WANG. « Photoacoustic Microscopy ». *Laser & photonics reviews* 7.5 (2013), 10.1002/lpor.201200060 (cf. p. 17).
- [Yu, 2020] Jaesok YU, Heechul YOON, Yousuf M. KHALIFA et Stanislav Y. EMELIANOV. « Design of a Volumetric Imaging Sequence Using a Vantage-256 Ultrasound Research Platform Multiplexed With a 1024-Element Fully Sampled Matrix Array ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 67.2 (2020), p. 248-257 (cf. p. 68).
- [Zhang, 2019] Ge ZHANG, Sevan HARPUT, Hanyu HU, Kirsten CHRISTENSEN-JEFFRIES, Jiaqi ZHU, Jemma BROWN et al. « Fast Acoustic Wave Sparsely Activated Localization Microscopy : Ultrasound Super-Resolution Using Plane-Wave Activation of Nanodroplets ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 66.6 (2019), p. 1039-1046 (cf. p. 55, 180).
- [Zhang, 2018] Ge ZHANG, Sevan HARPUT, Shengtao LIN, Kirsten CHRISTENSEN-JEFFRIES, Chee Hau LEOW, Jemma BROWN et al. « Acoustic wave sparsely activated localization microscopy (AWSALM) : Super-resolution ultrasound imaging using acoustic activation and deactivation of nanodroplets ». *Applied Physics Letters* 113.1 (2018), p. 014101 (cf. p. 51, 57).
- [Zhang, 2021] Wei ZHANG, Matthew R. LOWERISON, Zhijie DONG, Rita J. MILLER, Krista A. KELLER et Pengfei SONG. « Super-Resolution Ultrasound Localization Microscopy on a Rabbit Liver VX2 Tumor Model : An Initial Feasibility Study ». *Ultrasound in Medicine & Biology* (2021) (cf. p. 53).



RÉSUMÉ

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une perte subite de la vascularisation d'une partie du cerveau. Une prise en charge rapide réduit considérablement les pertes neuronales et séquelles à long terme. Les hémorragies cérébrales et infarctus cérébraux représentent les principaux types d'AVC avec des symptômes similaires mais des traitements très spécifiques. Le diagnostic précoce est primordial et nécessite une imagerie du cerveau en profondeur à travers le crâne. Le développement de la microscopie par localisation ultrasonore (ULM) a ouvert de nouvelles possibilités pour l'imagerie vasculaire en améliorant le contraste, la résolution et la profondeur de pénétration de l'échographie. Des microbulles sont injectées dans le sang et localisées pour reconstruire la microvascularisation en quelques minutes.

L'objectif général de cette thèse est l'application de l'ULM 3D pour le diagnostic non invasif de l'AVC en phase précoce. Une première étude porte sur une comparaison quantitative des algorithmes de localisation ultrasonore pour l'imagerie 2D. Un ensemble de métriques normées et de jeux de données universels ont été établis pour évaluer les différents algorithmes avec des critères objectifs et reproductibles. Puis un système d'ULM 3D a été développé pour pallier à la projection en élévation de l'imagerie 2D et élargir le champ de vue. En utilisant une sonde multiplexée, une angiographie d'un cerveau de rat a été réalisée in vivo avec un système commercial. Une résolution de quelques dizaines de microns a été obtenue à travers le crâne, réduisant au minimum l'impact de l'imagerie sur la physiologie de l'animal en vue d'une étude pré-clinique. Enfin, ce système a été utilisé pour imager des AVC induits sur une cohorte de rats. Il a prouvé sa capacité à distinguer les effets d'une ischémie par rapport à une hémorragie sur la vascularisation du cerveau. Cette première étude montre la pertinence d'une telle imagerie pour le diagnostic en phase précoce de l'AVC chez l'humain par ULM volumétrique en s'affranchissant des contraintes et disponibilités de l'IRM et du scanner.

MOTS CLÉS

Microscopie par localisation ultrasonore, super-résolution, algorithmes de localisation, microvascularisation du cerveau, imagerie 3D, sonde échographique multiplexée, accident vasculaire cérébral, hémorragie cérébrale, ischémie cérébrale

ABSTRACT

A stroke is a sudden loss of vascularization of a part of the brain. Patients must receive medical care within the first hour to reduce neuronal loss and long-term sequelae. Most strokes are hemorrhagic or ischemic, with similar symptoms but specific treatments. Early-phase diagnosis becomes vital and requires deep brain imaging through the skull bone.

The development of Ultrasound Localization Microscopy (ULM) has widened applications for microvascular imaging by improving contrast, resolution, and penetration depth. Microbubbles are injected into the blood flow and localized to reconstruct the microvessels within few minutes.

The main objective of this thesis is the application of 3D ULM for non-invasive stroke diagnosis in the early phase.

A first study focuses on a quantitative comparison of localization algorithms for 2D ultrasound imaging. A set of standardized metrics and unified datasets were established to evaluate various algorithms with objective and reproducible criteria.

Then a volumetric ULM system was set up to overcome the elevation projection of 2D imaging and increase the field of view. We performed a 3D angiography of a rat brain in vivo with a commercial scanner and a multiplexed ultrasonic probe.

A few tens of micrometers resolution was obtained through the skull bone. This method didn't induce major modifications of the animal's physiology and can be used for a pre-clinical study. Finally, this system was used to image induced strokes in a cohort of rats. It proved its ability to distinguish the effects of ischemia versus hemorrhage on brain vascularization. This first study shows the relevance of such imaging for the early diagnosis of stroke in humans by volumetric ULM, without the constraints and availability of MRI and CT.

KEYWORDS

Ultrasound localization microscopy, super-resolution, localisation algorithms, brain microvascularization, 3D imaging, multiplexed ultrasound probe, stroke, cerebral hemorrhage, cerebral ischemia