



HAL
open science

Imagerie ultrarapide ultrasonore multiparamétrique 3D pour un meilleur diagnostic du cancer du sein

Jean-Baptiste Guillaumin

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Guillaumin. Imagerie ultrarapide ultrasonore multiparamétrique 3D pour un meilleur diagnostic du cancer du sein. Imagerie médicale. Université Paris sciences et lettres, 2022. Français. NNT : 2022UPSL077 . tel-04288823

HAL Id: tel-04288823

<https://pastel.hal.science/tel-04288823>

Submitted on 16 Nov 2023

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

**Imagerie ultrarapide ultrasonore multiparamétrique 3D
pour un meilleur diagnostic du cancer du sein**

Soutenue par

Jean-Baptiste Guillaumin

Le 14 novembre 2022

Ecole doctorale n° 391

**Sciences mécanique,
acoustique, électronique et
robotique**

Spécialité

Acoustique

Composition du jury :

Julien, DE ROSNY Directeur de recherche, CNRS	<i>Président</i>
Stéfan, CATHELIN Directeur de recherche, INSERM	<i>Rapporteur</i>
Émilie, FRANCESCHINI Chargé de recherche, CNRS	<i>Rapporteuse</i>
Lori, BRIDAL Directeur de recherche, CNRS	<i>Examinatrice</i>
Jean-François, AUBRY Directeur de recherche, CNRS	<i>Directeur de thèse</i>
Béatrice, BERTHON Chargé de recherche, INSERM	<i>Co-encadrante de thèse</i>

REMERCIEMENTS

C'est avec beaucoup d'émotion que se rédigent ces pages qui, bien qu'elles apparaissent au début du manuscrit, concluent une thèse. Au premier abord, un sujet de thèse semble être un travail solitaire. Il n'en est rien. La réussite d'une telle aventure n'est possible que par le concours et le soutien d'un très grand nombre de personnes. Je tiens donc à remercier toutes celles et ceux qui ont permis l'accomplissement de ce travail par leurs conseils, leur écoute et les non moins indispensables bons moments que nous avons partagés durant ces trois dernières années.

Je souhaite tout d'abord remercier **Emilie Franceschini** et **Stéfan Catheline** d'avoir accepté d'être rapporteurs pour ce travail. J'espère que vous y aurez trouvé des résultats et des questionnements faisant écho à vos travaux et qui vous auront intéressés. Un grand merci également à **Lori Bridal**, **Julien de Rosny** et **Anne Tardivon** d'avoir constitué mon jury et d'avoir pris le temps de vous pencher sur cette thèse.

Merci ensuite aux premiers responsables de ce projet, mes encadrants : **Jean-François Aubry** et **Béatrice Berthon**. Vous partagez et m'avez transmis les plus grandes qualités d'un chercheur : son enthousiasme et sa foi. C'est sûrement le plus bel enseignement que je retiendrai de cette thèse : pour obtenir des résultats, il faut d'abord y croire avant de pouvoir les démontrer, et non l'inverse. Jean-François, tu auras été au cours de ces trois ans un indéfectible soutien. Merci, d'avoir plongé dans l'imagerie pour suivre et guider ce travail. Chaque échange aura été un véritable plaisir. Béatrice, merci de m'avoir fait confiance et d'avoir toujours su m'encourager et indiquer le cap dans les moments où je ne savais plus où aller. Je rajoute à ce paragraphe mes plus sincères remerciements à **Mickaël Tanter**, directeur du laboratoire, qui m'a fait confiance lorsque je suis allé le voir à la fin d'une des incroyables conférences, dont il a le secret, pour m'introduire dans son laboratoire et me faire rencontrer Béatrice et Jean-François.

L'une des plus enrichissantes expériences de cette thèse aura été la collaboration avec l'Institut Curie et plus particulièrement avec le service d'anatomopathologie d'**Anne Vincent-Salomon**. Un grand merci pour l'accueil de toute l'équipe, médecins, techniciens et ingénieurs pendant mon passage parmi vous. J'ai énormément appris à vos côtés. En particulier, je voudrais remercier **Lounes Djerroudi**, **Charlotte Martinat**, **Martial Caly**, **Gabriel Champenois** et bien sûr Anne Vincent-Salomon pour notre collaboration.

Également, un immense merci à **Anne Tardivon** pour ces séances d'annotations fastidieuses mais indispensables et pour toutes tes explications sur la radiologie autour de viennoiseries. Ton expertise, ton aide et ta patience ont été indispensables pour la réalisation de pans entiers de cette thèse. Avec une telle équipe, rien ne semblait impossible. Quand nous doutions, votre énergie et votre envie de voir aboutir les méthodes que nous développons pour mieux soigner vos patients nous faisaient rebondir. Je voudrais vous faire part de ma grande admiration pour votre travail et votre engagement.

Un grand merci également à mes anciens collègues de Sorbonne Université avec qui j'ai effectué une mission doctorale au sein du département de la recherche et de l'innovation. **Lise Tourneux-Ravel, Yolima Fauchet, Lucas Ravaux et Yoann Haettich**. J'ai eu beaucoup de chance de pouvoir réaliser cette mission avec vous. Merci d'avoir pris le temps de me former et de m'ouvrir sur le vaste monde de la valorisation de la recherche.

Un immense merci à **Aymeric Nadjem et Bailey Leadford**, « la team » de stagiaires qui ont accepté de se lancer avec nous dans le projet et qui ont su donner tout son rythme à ma dernière année de thèse ! Merci pour tout. Bon courage pour ta thèse Aymeric, ne doute jamais que ta persévérance t'amènera au résultat, que ce soit celui que tu recherchais au départ ou un autre ! Bailey, I am sure you are now able to read the full acknowledgments in French! Thank you so much for your great work and all the best for this last year of study.

Un grand merci également à tous les chercheurs du laboratoire. En écrivant ces remerciements, je me rends compte qu'aucun d'entre vous n'aura échappé à mes questions durant ces trois années : **Mickaël** avec qui tout trouve une solution, **Clément** inventeur du BTI – excusez du peu, **Sophie** et son accompagnement pour l'expérimentation animale, **Thomas** et **Mathieu** pour le SWE, **Justine** pour ses conseils pour la soutenance et **Charlie** pour ses grandes qualités de pédagogue.

Aucune recherche au laboratoire ne serait possible sans le duo **Salima & Hinde** qui gèrent le labo avec toute la bienveillance et l'efficacité qu'il est possible d'imaginer. Merci à **Patricia**, véritable Mary Poppins du labo qui s'occupe avec amour de ses 60 enfants. Merci à **Fatou** pour ton sourire du matin. Un grand merci à nos collègues ingénieurs, **Philippe M.** plus-on-rajoute-de-trucs-sur-la-paillasse-plus-la-science-avance, **Florian**

grand magicien de la Verasonics, **Laurent** oui-tu-peux-rajouter-encore-10To-sur-Space, **Philippe A.** l'expert d'à peu près tout ce que vous aurez besoin de savoir, **Alexandre H.** celui qui maîtrisait les entrailles des machines et saura vous les expliquer et enfin **Hicham** qui détient le secret pouvoir de faire fonctionner une manip' qui ne fonctionne pas, quelle qu'elle soit. Merci à **Mai**, pilier du labo, étonnamment plus connue chez les doctorants pour ses talents au karaoké que pour son travail de jour. Merci à **Alexandre D.**, artiste du laboratoire qui transforme un tableau de données austère en une vision du futur grâce à ses représentations. Merci à **Nathalie** et **Lanto** de m'avoir appris les bonnes pratiques de la recherche animale et d'avoir pris tant soin de mes animaux.

Merci à mes co-bureaux pour avoir fait de ces quelques mètres carrés perdus au fond d'un couloir un lieu aussi agréable : **Daniel** pour son accueil, **Mohamed** plus fort que Schwartzky et inépuisable expert des Verasonics, **Thomas** pour nos débats animés, **David** pour nos discussions sur la vie comme les sciences, **Flora** pour ces trois années à partager nos goûters, nos histoires, nos discussions et bien sûr le dancefloor (hâte de voir ta thèse !), **Benjamin** le seul qui sait ce qu'on met dans les sondes, **Sam** l'homme qui révolutionnera les ondes par les maths, **Mathis** le futur héraut des bu-bulles et enfin **Henri**, tout repose sur toi à présent !

Merci à tous mes collègues et à présent amis du laboratoire, **Olivier** le maître de la vie sociale du labo, **Oscar** quel chemin parcouru ensemble, **Silvia** 🍷, **Jérôme et Claire** pour votre incroyable accueil et votre exemple, **Benoit** toujours en manip, **Victor** toujours plus de bulles, **Heiva** pour l'horoscope du jour, **Adrien-rasta**, **Cyprien** le gars en or, **Matthieu** mon cher co-doctorant, **Felipe** biologiste et codeur beau mélange, **Sofiane** l'enthousiaste, **Hugues** bientôt ton tour de soutenir, **Anatole** et le projet clinique le plus fou du labo, **Clara** négocie pour être plus souvent à Physmed, **Marta** pour nos pauses-craquages, **Noémi** celle qui montre le chemin, **Solène** la relève du SWE, **Thomas T.** startupper-scientifique-ambianceur rien que ça, **Lauriane** l'incarnation de la détermination et avec le sourire, **Youenn** même quand il rame il est heureux.

Bon courage à tous les « nouveaux » doctorants **Maxime, Nabil, Manon, Touka, Janie et Nicolas**. Vous allez vivre de grands moments.

Merci également à tous mes amis qui m'ont soutenu durant ces trois années et en particulier à **Greg, Clément, Lucile, Félix et Jeanne** pour nos moments de galèjade, au

Dubaiote pour le vent de révolte, à **Sophie** pour arriver à rendre tous les moments uniques, à **Sarah** la vie au soleil, à **Sam-coucou**, à **Adrien** le capitaine fidèle au poste, à **Elisabeth et Paul** les rois de la fêtes, à **Jeanne et Romain** pour nos bouffes/verres, à **Eliot** la plus grande des crevettes, à **Pauline** ne-brûle-pas-ma-maison, à **Quentin** et son bar très accueillant, à **Gabriel** Mr. Bond et au **Dr. Zaff**. Un grand merci à tous mes amis des Mines que je continue à voir avec autant de plaisir. Merci à mes camarades d'Avenir Climatique qui luttent pour que ce monde devienne plus convivial et ne s'embrase pas.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans évoquer ma belle-famille maralpino-britannique **Robin, Yoma, Cassie, Sarah, David et Elliot**. Un remerciement particulier aux trois derniers qui ont réussi l'exploit de relire en un temps record cette thèse pour éviter qu'elle ne soit truffée de fautes.

Merci à mes **affectueux grands-parents** pour tout leur amour et leurs encouragements. Merci à mes **fantastiques parents** de m'avoir soutenu contre vents et marées et de m'avoir appris que les seules choses qui comptent vraiment sont prendre soin des autres et profiter de tous les instants. Merci à mon **incroyable frère** qui par son intelligence, son humour parfois étrange et son inébranlable volonté me permet chaque jour de questionner le monde différemment.

Merci à **Nikki**, mon amour, avec qui j'ai partagé tant de bons moments et dont le soutien sans faille l'a même amené à relire maintes fois mon manuscrit et mes articles ! Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans t'avoir à mes côtés.

Bonne lecture et bon courage aux prochains !

Cette thèse a été réalisée avec le soutien financier de la fondation Bettencourt-Schueller et de l'ART Ultrasons biomédicaux de l'Inserm.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	3
Table des matières	7
Résumé de la thèse en français	11
English thesis summary	13
Liste des abréviations	15
Chapitre I Introduction	17
1 Le(s) cancer(s) du sein	19
1.1 État des lieux épidémiologique	19
1.1.1 Dans le monde	19
1.1.2 En France	21
1.2 Description	21
1.2.1 Le sein	21
1.2.2 Description générale du cancer et facteurs de risque.....	22
1.2.3 Types de tumeurs malignes	23
1.2.4 Développement et stades.....	24
1.2.5 Le microenvironnement tumoral	25
2 Dépistage et diagnostic dans le cancer du sein	26
2.1 Dépistage.....	26
2.2 Diagnostic.....	28
2.3 Rôle des techniques d'imagerie	29
3 Introduction aux ultrasons biomédicaux	29
3.1 Principes physiques fondamentaux	29
3.1.1 Introduction aux ondes.....	29
3.1.2 Ondes de compression et ondes de cisaillement.....	30
3.1.3 Des ultrasons à l'échographie	31
3.2 Développement et diffusion de l'échographie	33
3.2.1 Des premiers usages des ultrasons biomédicaux à l'image échographique	33
3.2.2 L'âge des ultrasons « ultrarapides »	35
3.2.3 De l'imagerie 2D à l'imagerie 4D.....	36
3.3 Diversité des paramètres d'imagerie échographique.....	40
3.3.1 Mode B « ultrarapide ».....	40
3.3.2 Élastographie par onde de cisaillement (SWE)	42
3.3.3 Doppler de puissance ultrarapide	48
3.3.4 Microscopie par localisation ultrasonore (ULM)	50
3.3.5 Imagerie du tenseur de rétrodiffusion (BTI)	55

4	Conclusion et objectifs de la thèse	60
5	Références du chapitre	62
	Chapitre II Imagerie du tenseur de rétrodiffusion en 3D par tomographie	67
1	Introduction et objectifs	69
2	Méthodes	71
2.1	Principe	71
2.1.1	Rappels théoriques du chapitre I et considérations pratiques	71
2.1.2	BTI par tomographie.....	71
2.2	Optimisation.....	74
2.3	Validation sur deux fantômes	74
2.3.1	Fantôme <i>in vitro</i>	75
2.3.2	Fantôme <i>ex vivo</i>	75
3	Résultats	76
3.1	Durée de la tomographie	76
3.2	Optimisation de la tomographie	77
3.3	Validation du BTI 3D par tomographie sur fantômes.....	78
3.3.1	Fantôme <i>in vitro</i>	78
3.3.2	Fantôme <i>ex vivo</i>	79
4	Discussion	81
5	Conclusion	83
6	Références du chapitre	84
	Chapitre III Fantôme d'imagerie multiparamétrique 3D	87
1	Introduction et objectifs	89
2	Méthodes	92
2.1	Fantôme	92
2.1.1	Fabrication	92
2.1.2	Préparation du fantôme pour l'imagerie	94
2.1.3	Inspection post-acquisition.....	94
2.2	Séquences multiparamétriques	95
2.2.1	Mise en place	95
2.2.2	SWE	95
2.2.3	Doppler ultrarapide	96
2.2.4	BTI	96
2.2.5	Mode B	97
3	Résultats	97
3.1	Réalisation de la séquence	97
3.2	SWE.....	97

3.3	Doppler ultrarapide	97
3.4	BTI.....	99
4	Discussion.....	99
5	Conclusion	101
6	Références du chapitre	102
Chapitre IV Analyse multiparamétrique de tumeurs humaines <i>ex vivo</i>		105
1	Introduction et objectifs.....	107
2	Méthodes.....	109
2.1	Inclusion des patients	109
2.2	Acquisition ultrasonore.....	110
2.2.1	Matériel	110
2.2.2	Estimation de la vitesse du son	111
2.2.3	Mode B	112
2.2.4	SWE.....	112
2.2.5	BTI	112
2.2.6	Représentation multiparamétrique 3D.....	114
2.3	Contour des tumeurs au mode B et zones	114
2.4	Analyse histologique.....	116
2.4.1	Coupes histologiques et contours de la tumeur	116
2.4.2	Estimation de l'orientation des fibres de collagène	116
2.5	Analyse statistique	117
3	Résultats.....	119
3.1	Représentation multiparamétrique	119
3.2	Contraste des paramètres dans et autour de la tumeur	120
3.3	Corrélation entre le BTI et l'orientation du collagène	121
3.4	Corrélation entre le BTI et les caractéristiques biopathologiques des cancers.....	121
3.4.1	Corrélations à partir des scores radial et tangent du BTI	121
3.4.2	Corrélation entre le BTI et le grade des carcinomes canauxaires invasifs.....	122
3.4.3	Corrélation entre le BTI et le statut des ganglions lymphatiques.....	123
4	Discussion.....	123
5	Conclusion	126
6	Références du chapitre	127
Chapitre V Imagerie préclinique multiparamétrique de tumeurs mammaires....		131
1	Introduction et objectifs.....	133
2	Méthodes.....	135
2.1	Modèle animal et protocole	135
2.2	Coupes histologiques.....	136

2.3	Acquisitions ultrasonores.....	138
2.3.1	Matériel et mise en place de l'imagerie.....	138
2.3.2	Synchronisation sur la respiration.....	140
2.3.3	Mode B, SWE, Doppler et BTI.....	140
2.3.4	ULM.....	141
2.4	Analyses.....	141
2.4.1	Définition des zones tumorales.....	141
2.4.2	SWE.....	143
2.4.3	Doppler ultrarapide.....	143
2.4.4	BTI.....	144
2.4.5	ULM.....	144
2.4.6	Analyse statistique.....	145
2.4.7	Analyse multiparamétrique comparative.....	145
3	Résultats.....	145
3.1	Suivi physiologique.....	145
3.2	Croissance tumorale.....	146
3.3	Analyses monomodales.....	147
3.3.1	SWE.....	147
3.3.2	Doppler ultrarapide.....	148
3.3.3	BTI.....	150
3.3.4	ULM.....	153
3.4	Étude de cas.....	156
3.4.1	Premier cas.....	156
3.4.2	Second cas.....	158
3.4.3	Troisième cas.....	160
4	Discussion.....	162
5	Conclusion.....	164
6	Références du chapitre.....	165
	Conclusion de la thèse.....	169
	Communications scientifiques.....	173

RÉSUMÉ DE LA THÈSE EN FRANÇAIS

L'imagerie ultrasonore est couramment utilisée en clinique pour le diagnostic du cancer du sein. Cependant, elle ne permet pas encore de différencier certaines tumeurs bénignes de cancers, ni de caractériser précisément le type de tumeur observé. Dans cette thèse, nous nous sommes donc intéressés aux potentiels apports de nouveaux modes ultrasonores développés par la recherche ces dernières années pour dépasser ces limites. Nous avons choisi d'effectuer notre imagerie en 3D pour décrire les tumeurs, parfois hétérogènes, dans toute leur complexité. Pour cela, nous avons développé une nouvelle approche tomographique à l'aide d'une sonde linéaire et d'un ensemble de moteurs. Ce choix a principalement été porté par la plus grande sensibilité des sondes linéaires par rapport aux sondes matricielles et leur plus grande disponibilité.

Le premier chapitre présente l'état de l'art et se concentre d'abord sur une présentation du cancer du sein. Sans être exhaustif, nous cherchons à montrer la diversité de la maladie puis à présenter les principales méthodes de dépistage et de diagnostic. Lors de sa progression, le cancer modifie l'environnement de nombreuses cellules non tumorales provoquant des remaniements importants en particulier de la vascularisation sanguine et de la structure des fibres de collagène. Après une courte introduction aux ultrasons biomédicaux, nous détaillons ensuite les modalités d'imagerie utilisées pendant cette thèse : le mode B pour l'image anatomique, l'élastographie par onde de cisaillement (*shear wave elastography* – SWE) pour la rigidité des tissus, le Doppler ultrarapide pour la vascularisation sanguine, la microscopie par localisation ultrasonore (*ultrasound localization microscopy* – ULM) pour la microvascularisation sanguine et l'imagerie du tenseur de rétrodiffusion (*backscatter tensor imaging* – BTI) pour l'orientation des fibres des tissus.

Le second chapitre de cette thèse propose une nouvelle méthode tomographique pour réaliser un BTI en 3D en utilisant une sonde linéaire et un jeu de moteurs. Nous montrons sur une série de fantômes ultrasonores que notre méthode de BTI est bien capable de mesurer l'orientation d'un milieu.

Le troisième chapitre décrit la mise au point d'un nouveau fantôme ultrasonore permettant de valider une séquence multiparamétrique 3D comprenant le BTI développé au chapitre II, un Doppler ultrarapide et un SWE.

Le quatrième chapitre teste notre méthode d'acquisition 3D (SWE - BTI) sur des tumeurs mammaires humaines *ex vivo*. En partenariat avec l'Institut Curie, nous apportons de premiers éléments de preuve que le BTI permet de repérer l'organisation des fibres de collagène dans les tumeurs mammaires. Par cette étude, nous montrons que le BTI pourrait également apporter de nouveaux biomarqueurs pertinents pour améliorer la caractérisation non invasive du cancer du sein.

Enfin, le dernier chapitre applique notre stratégie d'acquisition multiparamétrique (SWE - BTI - Doppler - ULM) *in vivo* sur des modèles précliniques transgéniques de cancer du sein. Nous montrons la faisabilité de notre méthode par tomographie. Durant sept semaines de croissance tumorale, pour chaque tumeur, nous avons mesuré la rigidité, cartographié la vascularisation et estimé l'orientation des tissus.

Ce travail représente une première étape en vue de l'utilisation de l'imagerie multiparamétrique ultrasonore 3D pour le diagnostic des tumeurs du sein en clinique. À terme, cette méthodologie pourrait permettre de réduire le nombre de biopsies et d'améliorer la prise en charge des patients grâce à une meilleure caractérisation précoce des tumeurs.

ENGLISH THESIS SUMMARY

Ultrasound imaging is commonly used in clinical practice for the diagnosis of breast cancer. However, it still does not allow us to discriminate benign tumors from cancers, nor to characterize precisely the type of tumor observed. In this PhD thesis, we evaluated the potential contributions of new ultrasound modalities developed in research in recent years to overcome these limitations. We chose to perform our imaging in 3D to describe in all their complexity the tumors, often heterogeneous. For this, we used a linear probe and a set of motors to perform tomographies and reconstruct volumes. This choice was mainly made because of the greater sensitivity of linear probes compared to matrix probes and their greater availability.

The first chapter presents the state of the art. It first focuses on a presentation of breast cancer. Without being comprehensive, we highlight the diversity of the disease and present the main screening and diagnostic methods. During its progression, a cancer modifies the behavior of many non-tumoral cells causing important changes in vascularization and the structure of collagen fibers. After a short introduction to biomedical ultrasound, we detail the imaging modalities that were used during this PhD thesis: B-mode for anatomical imaging, shear wave elastography (SWE) for tissue stiffness, ultrafast Doppler for vascularization, ultrasound localization microscopy (ULM) for microvascularization, and backscatter tensor imaging (BTI) for tissue fiber orientation.

The second chapter of this thesis introduces a new method to perform 3D BTI using a linear probe and a set of motors. We show on a series of ultrasound phantoms that our BTI method is able to measure the orientation of a medium.

The third chapter presents the development of a new ultrasound phantom allowing to validate a 3D multiparametric sequence including the BTI method developed in chapter II, ultrafast Doppler imaging and SWE.

The fourth chapter tests our 3D acquisition method (SWE - BTI) on *ex vivo* human tumors. In collaboration with the Institut Curie, we provide first evidence that BTI can identify collagen organization in tumors. We also demonstrate that BTI could provide new relevant biomarkers to improve the non-invasive characterization of cancer.

Finally, the last chapter applies our SWE - BTI - Doppler - ULM acquisition strategy *in vivo* to preclinical transgenic breast cancer models. We show the feasibility of our tomography-based method. During seven weeks of tumor growth, we measured the tumor's stiffness, vascularization and fiber orientation.

This work represents a first step towards the use of 3D multiparametric ultrasound imaging for clinical diagnosis of breast tumors. In the long run, this methodology could reduce the number of biopsies and improve patient care through early tumor characterization

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

4D : Quatre dimensions (3D + temps)

AF : Anisotropie fractionnelle (du BTI)

BI-RADS : *Breast imaging reporting and data system*

BTI : *Backscatter tensor imaging* (imagerie du tenseur de rétrodiffusion)

CEUS : *Contrast-enhanced ultrasound* (imagerie ultrasonore de contraste)

CI-TNS : Carcinome invasif de type non spécifique (autrefois carcinome canalaire invasif)

Co : Cohérence (du BTI)

dB : Décibel

DTI ou MR-DTI : *Magnetic resonance diffusion tensor imaging* (imagerie de diffusion par résonance magnétique)

ECG : Électrocardiogramme

EE : grade Elston-Ellis

ETI : *Elastic tensor imaging* (imagerie par tenseur élastique)

GEMM : *Genetic engineered mouse model* (modèle de souris génétiquement modifiée)

HES : Hématoxyline, éosine, safran

HER2 : *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain)

IRM : Imagerie par résonance magnétique

MMTV-PyVT : *Mouse Mammary Tumor Virus encoding the Polyoma Virus middle T* (Virus murin de tumeur mammaire encodant le virus polyoma middle T - équivalent à MMTV-PyMT)

PSF : *Point spread function* (fonction d'étalement du point)

RF : Radiofréquence (signal)

SACF : *Spatially averaged coherence factor* (facteur de cohérence moyenné spatialement)

SEM : *Standard error of the mean* (erreur type)

SHG(M) : *Second harmonic generation (microscopy)* (microscopie de seconde harmonique)

SLIM : *Spatial light interference microscopy* (microscopie spatiale à interférence lumineuse)

SLSC : *Short-lag spatial coherence* (cohérence spatiale sur faible intervalle*)

Liste des abréviations

SVD : *Singular value decomposition* (décomposition en valeurs singulières)

SWE : *Shear wave elastography* (élastographie par onde de cisaillement)

TACS : *Tumor-associated collagen signature* (signature du collagène associé à la tumeur*)

TG : Transgénique

TLV : Taille latérale des voxels

ULM : *Ultrasound localization microscopy* (microscopie par localisation ultrasonore)

VOI : *Volume of interest* (volume d'intérêt)

WT : *Wild-type* (type sauvage)

* : traductions françaises proposées dans cette thèse en l'absence de traduction antérieure retrouvée

Chapitre I

Introduction

1 LE(S) CANCER(S) DU SEIN

1.1 État des lieux épidémiologique

1.1.1 Dans le monde

En 2020, le cancer du sein était le type de cancer le plus répandu dans le monde avec plus de 2 261 000 cas (11,7 % des cancers), devant le cancer des poumons (2 207 000 cas). Chez les femmes, près d'un cancer sur quatre est un cancer du sein. La probabilité pour une femme de développer un cancer du sein avant 74 ans est de 5,20 %, et celle d'en décéder de 1,49 %. Bien que considéré comme un cancer de bon pronostic lorsque diagnostiqué à un stade précoce, plus de 685 000 personnes sont décédées d'un cancer du sein en 2020 (6,9 % des décès dus à un cancer). Ceci fait du cancer du sein le quatrième cancer le plus mortel derrière ceux des poumons, du foie et de l'estomac (Sung et al. 2021). Notons enfin que si le cancer du sein est principalement féminin, les hommes représentent environ 1 % des cas (Xu et al. 2021).

Pour comparer le taux d'incidence¹ en différents lieux ou à différentes époques, il est nécessaire de le normaliser selon l'âge de la population (*age-standardized rate* – ASR). Le taux fictif ainsi obtenu correspond au taux d'incidence qui aurait été observé pour une pyramide des âges donnée. En effet, l'âge de la population étant un facteur majeur influant sur le nombre de cancers, cette méthode permet de s'affranchir de ce biais (population vieillissante par exemple). Le résultat dépend alors de la pyramide des âges utilisée pour normaliser les données, variable selon les études.

Si l'on s'intéresse à la répartition géographique du cancer du sein, on constate que les taux d'incidence normalisés sont plus élevés en Amérique du Nord, en Océanie et en Europe par rapport à ceux en Amérique Latine, en Afrique et en Asie. En revanche, le taux de mortalité normalisé est plus élevé en Afrique que dans les autres continents (Figure 1, J. Ferlay et al., 2020). Ces comparaisons sont néanmoins à relativiser puisque le dépistage est très variable selon les pays. Ces chiffres démontrent la forte présence de la maladie sur l'ensemble des continents.

¹ L'incidence correspond au nombre de nouveaux cas sur une année. Le taux d'incidence est le nombre de cas sur une année rapporté à une taille de population (généralement à 100 000 habitants).

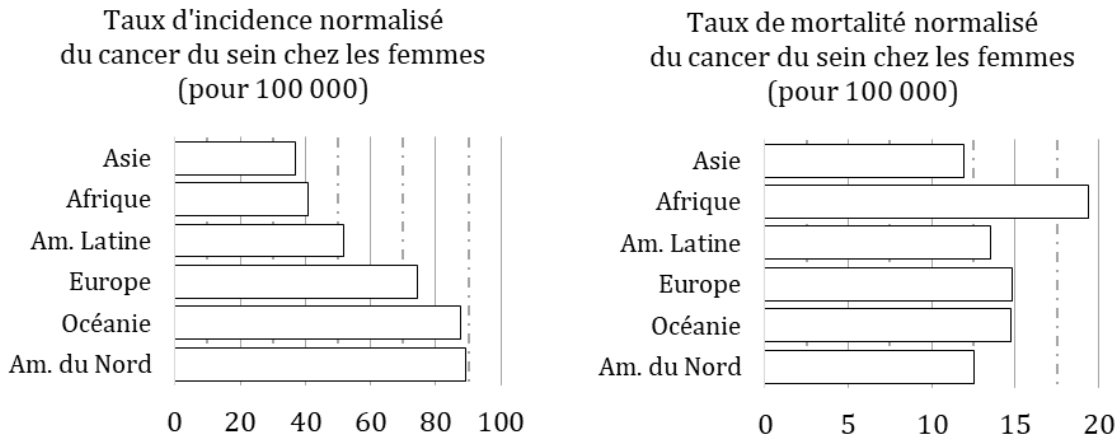


Figure 1 : Taux d'incidence et de mortalité normalisés par l'âge des populations du cancer du sein en 2020 chez les femmes sur les différents continents selon GLOBOCAN (J. Ferlay et al. 2020). Note : L'Amérique Latine contient également les Caraïbes.

Le taux d'incidence normalisé du cancer du sein augmente continuellement depuis 1990. Les pays africains et asiatiques enregistrent une forte hausse sur la période ; le taux d'incidence normalisé des pays européens stagne depuis 2000 et celui des pays américains décroît lentement depuis 1995. À l'inverse, le taux de mortalité normalisé décroît sur la même période. Cette décroissance générale cache toutefois de grandes disparités. En Europe et en Amérique, cette décroissance est forte, alors qu'en Afrique et en Asie le taux de mortalité augmente (Vos et al. 2020) (Figure 2). Par ailleurs, le nombre global de cancers du sein ne cesse d'augmenter chaque année, porté par l'augmentation du taux d'incidence normalisé par l'âge combiné à l'accroissement et au vieillissement de la population mondiale.

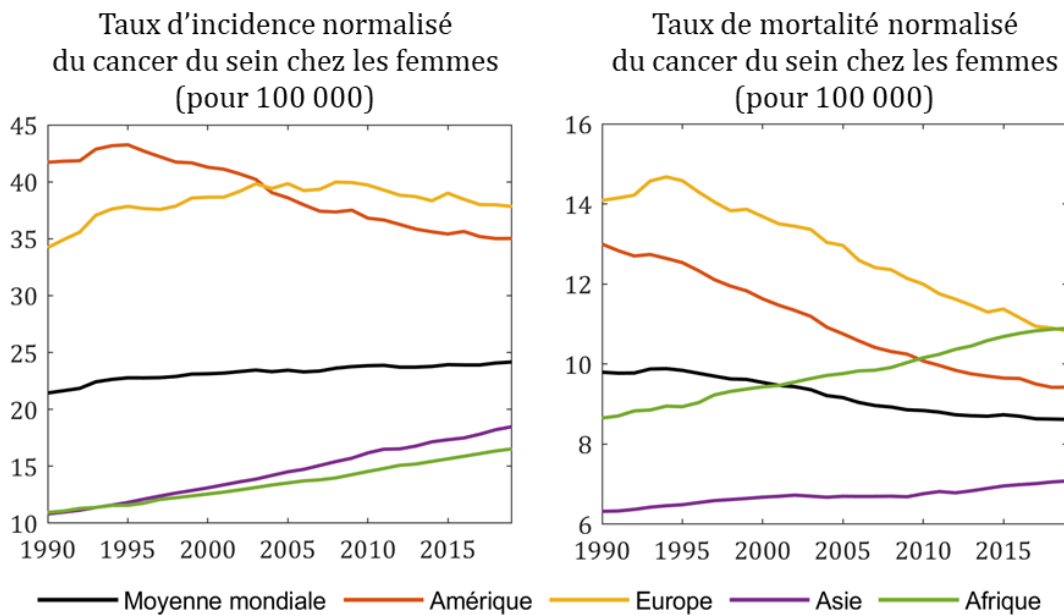


Figure 2 : Taux d'incidence et de mortalité normalisés selon l'âge des populations du cancer du sein chez les femmes en Amérique, Europe, Asie et Afrique et dans le monde. Données extraites du Global Health Data Exchange query tool (Vos et al. 2020)

1.1.2 En France

La France, comme le reste des pays occidentaux, compte un nombre plus important de cancers du sein que la moyenne mondiale. En 2020, on a recensé 58 083 nouveaux cas de cancers du sein et 14 183 décès. Le taux d'incidence normalisé chez les femmes était de 99 pour 100 000 contre 48 pour 100 000 en moyenne mondiale. Le taux de mortalité normalisé par l'âge chez les femmes était de 15,6 pour 100 000 contre 13,6 pour 100 000 en moyenne mondiale (Sung et al. 2021).

Le taux de mortalité normalisé¹ est en baisse depuis 1990. Le taux d'incidence normalisé était croissant entre 1990 et 2003 et diminue depuis (Vos et al. 2020) (Figure 3).

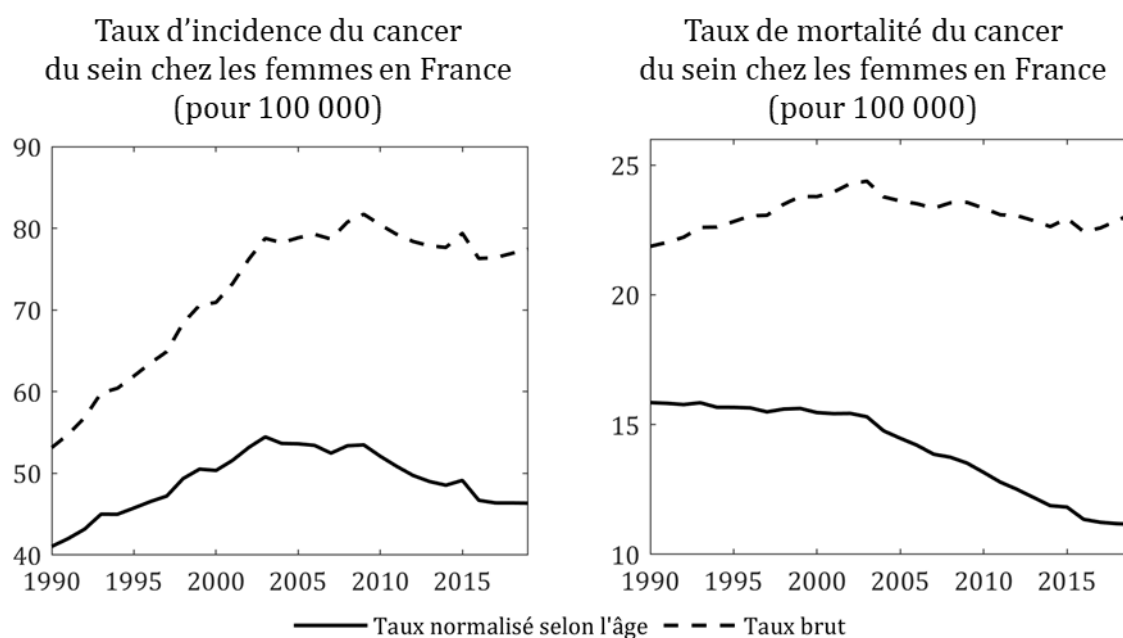


Figure 3 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein chez les femmes en France. Données extraites du Global Health Data Exchange query tool (Vos et al. 2020)

1.2 Description

1.2.1 Le sein

Le sein est un organe composé de canaux, de glandes, de graisse et d'autres tissus conjonctifs. Le réseau de canaux galactophores, organisé en ramifications, relie le mamelon aux lobules mammaires et permet l'acheminement du lait. Ces éléments sont entourés de tissu adipeux et d'autres tissus conjonctifs (Figure 4). Les hommes possèdent

¹ L'âge moyen de la population française est passé de 36,9 ans en 1991 à 41,7 ans en 2019 (Insee 2022). L'ASR permet de s'affranchir de l'influence du vieillissement.

également l'ensemble de ces structures, mais atrophiées, ce qui explique qu'ils puissent être atteints de cancers du sein.

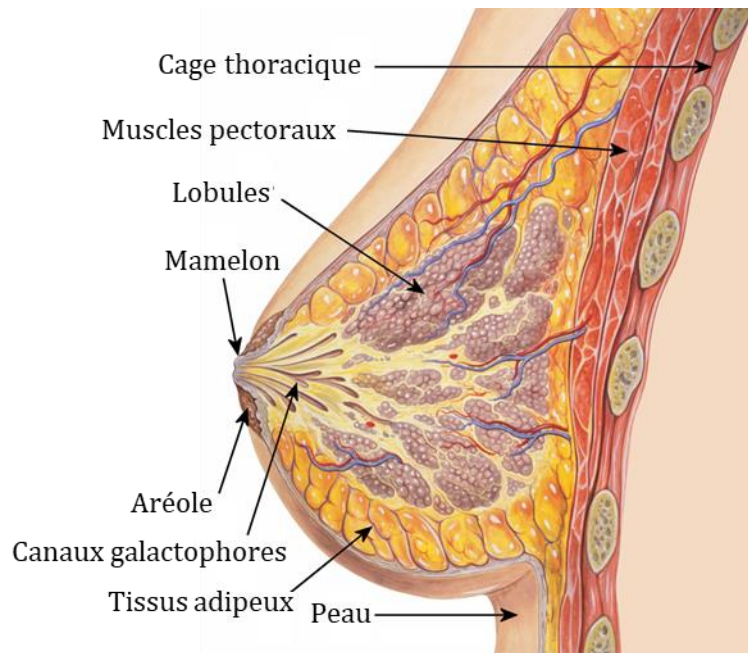


Figure 4 : Schéma anatomique du sein, de Patrick J. Lynch sous licence CC BY 3.0, traduction des légendes en français

1.2.2 Description générale du cancer et facteurs de risque

Lors de la division cellulaire, l'ADN (acide désoxyribonucléique, contenant le code génétique de la cellule) est parfois altéré. Des mécanismes de contrôle permettent normalement de réparer ou de détruire la cellule mutante. Si ces derniers échouent et que la mutation promeut la multiplication cellulaire, la cellule mutante va donner naissance à une tumeur, c'est-à-dire une excroissance de tissus. Cette tumeur peut être soit bénigne, comme c'est le cas pour les grains de beauté ou la plupart des kystes, soit maligne. Dans les cas malins, on parlera de cancers. Une partie des cellules de ces tumeurs pourra se détacher puis migrer pour se fixer sur un autre organe. Ce sont les métastases. La dénomination d'un cancer, dit « du sein » par exemple, est donnée selon l'emplacement de la tumeur d'origine, dite « tumeur primaire ».

La Haute Autorité de santé (HAS) a identifié plusieurs facteurs de risque pour le cancer du sein présentés dans le document « Dépistage et prévention du cancer du sein » (HAS 2015). En particulier, l'apparition d'un cancer du sein est corrélée à l'âge, à un antécédent de cancer du sein, à des antécédents familiaux de cancer du sein, à une irradiation thoracique à haute dose, ou encore à des mutations génétiques (principalement les mutations BRCA1 et BRCA2 pour *breast cancer* 1 et 2 portées par

1 femme sur 500). Certains facteurs sont fortement suspectés d'être liés à l'apparition du cancer du sein, tels qu'une densité mammaire importante après la ménopause ou la prise d'un traitement hormonal substitutif pendant la ménopause. D'autres facteurs sont aujourd'hui étudiés pour déterminer leur rôle dans l'apparition du cancer du sein, comme l'exposition à certains produits chimiques, certaines habitudes alimentaires (consommation d'alcool, alimentation riche en graisses animales...), la nulliparité¹ ou l'âge tardif à la première naissance (après 30 ans).

1.2.3 Types de tumeurs malignes

Les carcinomes² mammaires se subdivisent en différentes catégories. La première dépend des cellules qui ont donné naissance à la tumeur. Dans 70 % des cas, cette dernière est issue des canaux galactophores ; elle est dite canalaire. Dans 15 à 20 % des cas, la tumeur naît des cellules des lobules ; elle est alors dite lobulaire (World Health Organization 2020). Les cas restants représentent des formes rares de la maladie.

Les tumeurs malignes sont ensuite classées selon leur agressivité, on parle de grade. Il existe différentes échelles mais les plus utilisées sont celles de Scarff, Bloom and Richardson (SBR) ou d'Elston et Ellis (EE). Le grade dépend de paramètres anatomopathologiques des cellules : de la forme de leur noyau, de leur architecture et de leur activité mitotique. Un carcinome peu agressif sera noté de grade 1 (évolution lente) quand un carcinome très agressif sera noté de grade 3 (évolution rapide).

Enfin, l'analyse immunohistochimique évalue la réponse des cellules prélevées à l'œstrogène et à la progestérone (récepteurs hormonaux). Elle permet également de mesurer l'expression de la protéine HER2 (*human epidermal growth factor receptor-2*) et la présence de l'antigène Ki-67 (marqueur de prolifération). Ces scores permettent de classer les carcinomes dans les catégories « luminal A » ou « luminal B » (réponse hormonale positive de la tumeur à l'œstrogène ou à la progestérone³), « HER2+ »

¹ Femme n'ayant jamais accouché.

² Les carcinomes sont des tumeurs malignes développées à partir d'un tissu épithélial (comme la peau ou les muqueuses). Dans le cas du sein, on peut aussi parler d'adénocarcinomes puisque les tissus du sein sont constitués d'épithéliums glandulaires.

³ Si le score de Ki-67 ou de mitose est élevé ou si la tumeur est HER2 positive, le cancer sera classé luminal B. Sinon, il est classé luminal A. Les tumeurs de type luminal B sont plus proliférantes (agressives) que les tumeurs classées luminal A.

(présence de HER2), « triple négatif » (absence de réponse aux trois tests). Cette classification est pronostique et permet d'adapter le traitement.

1.2.4 Développement et stades

1.2.4.1 Phases pré-cancéreuses

Une augmentation du nombre de cellules mammaires n'est pas toujours signe de cancer. Dans un premier temps, quand la taille typique de la tumeur est de 2-3 mm, on parle d'hyperplasie. Si les cellules qui se multiplient s'avèrent anormales¹ lors de leur inspection au microscope, on parle d'hyperplasie atypique (plus précisément d'hyperplasie canalaire atypique ou d'hyperplasie lobulaire atypique selon les cellules concernées). La présence d'une hyperplasie atypique augmente le risque d'apparition d'un cancer du sein (Ma and Boyd 1992). Les patientes chez qui une hyperplasie atypique est détectée suivent par la suite un schéma de dépistage renforcé.

Lorsque des cellules sont identifiées comme cancéreuses mais présentes exclusivement dans les canaux ou les lobules sans rupture de la paroi de ces derniers, on parle de carcinomes *in situ*. De la même façon que pour les hyperplasies, ils se décomposent en carcinomes canaux *in situ* (CCIS) et carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS). Ils sont dénommés carcinomes de stade 0. Les CLIS sont considérés aujourd'hui comme bénins (Hortobagyi et al. 2017). Les CCIS demandent généralement un traitement afin d'éviter qu'ils ne se développent en cancers. Ils peuvent se propager à travers tout l'arbre galactophore et former des réseaux de plusieurs centimètres. Néanmoins, les choix thérapeutiques à ce stade sont moins lourds qu'aux stades suivants et le pronostic est excellent (mortalité de 3,3 % à 20 ans, rechutes comprises (Narod et al. 2015)).

1.2.4.2 Phases cancéreuses : l'invasion tumorale

Le début d'un cancer est caractérisé par la propagation des cellules tumorales en dehors des canaux galactophores ou des lobules. On parle alors de carcinome invasif. Lors de son développement la tumeur primaire grossit. Ensuite, certaines cellules cancéreuses se détachent pour former des métastases. Elles se déplacent d'abord dans le

¹ Les cellules sont considérées anormales sur la base de paramètres cytologiques et architecturaux. Il est également possible de réaliser des immunohistochimies complémentaires (CK5/6, CK8/18). Toutes ces analyses se font sur des échantillons biopsiés.

système lymphatique et se retrouvent dans les ganglions lymphatiques présents au niveau des aisselles avant de se propager dans d'autres organes du corps. Cette dernière phase correspond à un cancer métastasé et nécessite un traitement systémique de l'intégralité de l'organisme pour combattre les tumeurs secondaires.

La classification de référence des stades de cancer provient de *l'American Joint Committee on Cancer (AJCC)* dont la 8^{ème} et dernière mise à jour date de 2017. Elle permet d'estimer le pronostic du cancer et d'adapter la réponse thérapeutique. Elle dépend de la taille de la tumeur primaire T, de la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques N, de la présence de métastases distantes M mais aussi du type de tumeur (grade et type immunohistochimique, section 1.2.3). La classification complète est consultable dans l'édition régulièrement mise à jour de *l'AJCC Cancer staging manual* (Mahul B. Amin et al. 2017). En première approximation, on peut résumer de façon simplifiée l'organisation des stades de la manière suivante :

- Stade 1 : Tumeur primaire de petite taille (< 2 cm) et absence de métastases dans les ganglions lymphatiques
- Stade 2 : Tumeur de taille moyenne (2 à 5 cm) ou détection de métastases dans les ganglions lymphatiques
- Stade 3 : Présence importante de métastases dans les ganglions lymphatiques
- Stade 4 : Présence de métastases distantes

1.2.5 Le microenvironnement tumoral

Les cellules cancéreuses agissent sur leur microenvironnement ou stroma. Elles peuvent par exemple provoquer la nécrose de certaines zones et l'apparition de calcifications. Certaines modifications facilitent leur développement. La croissance tumorale favorise ainsi l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse), souvent de façon anarchique mais augmentant néanmoins son apport énergétique. La réorganisation de la matrice extracellulaire¹ joue également un rôle dans la capacité

¹ Constituée de l'ensemble des macromolécules extracellulaires, la matrice extracellulaire est structurée par des fibres de collagène et les filaments d'élastine. La structure, l'adhérence et le mouvement des cellules dépendent de ses propriétés.

de la tumeur à envahir la zone environnante. Ces phénomènes commencent dès le stade *in situ* et s'intensifient lors de la phase invasive.

Les fibroblastes associés aux cancers (*cancer-associated fibroblasts* – CAF) et les macrophages associés aux tumeurs (*tumor-associated macrophages* – TAM) sont également affectés par la proximité des cellules tumorales. Le rôle normal de ces cellules les conduirait à limiter la propagation du cancer. Cependant, les CAF et les TAM promeuvent la prolifération cellulaire ainsi que l'angiogenèse, et réorganisent la matrice extracellulaire. Ils sont ainsi partiellement responsables de la résistance au traitement de certaines tumeurs (Raskov et al. 2021).

Enfin, les cancers réorganisent les fibres de collagène qui composent la matrice extracellulaire. Les différentes réorganisations du collagène, appelées *tumor-associated collagen signatures* (TACS), semblent correspondre à différents stades de progression du cancer du sein. Dès le stade *in situ*, la tumeur augmente la densité du collagène de la matrice extracellulaire, provoquant une rigidification locale. Puis, lors du stade infiltrant, les fibres de collagène cessent d'entourer la tumeur (organisation tangente) pour former dans certaines zones des faisceaux normaux à la surface de la tumeur (Figure 5). Ces faisceaux seraient des promoteurs de l'invasion tumorale (Bourgot et al. 2020). La fonction précise de tous les TACS identifiés demeure un sujet de recherche ouvert en biologie (Brett et al. 2020 ; Xi et al. 2021).

2 DÉPISTAGE ET DIAGNOSTIC DANS LE CANCER DU SEIN

2.1 Dépistage

Dans de nombreux pays, un dépistage généralisé du cancer du sein est aujourd'hui en place. Il est justifié par la forte incidence du cancer du sein et l'amélioration du pronostic lorsque celui-ci est détecté dans une phase précoce. Sans ces dépistages, la plupart des cancers seraient découverts à des stades beaucoup plus avancés puisque les tumeurs sont pour la plupart indolores. En France par exemple, les femmes entre 50 et 74 ans sans facteurs de risque particuliers sont invitées tous les deux ans à participer à un dépistage.

Dans le cas général, le dépistage consiste en une mammographie (2 incidences de rayons X) et un examen clinique. Si l'image est classée comme normale ou bénigne par un

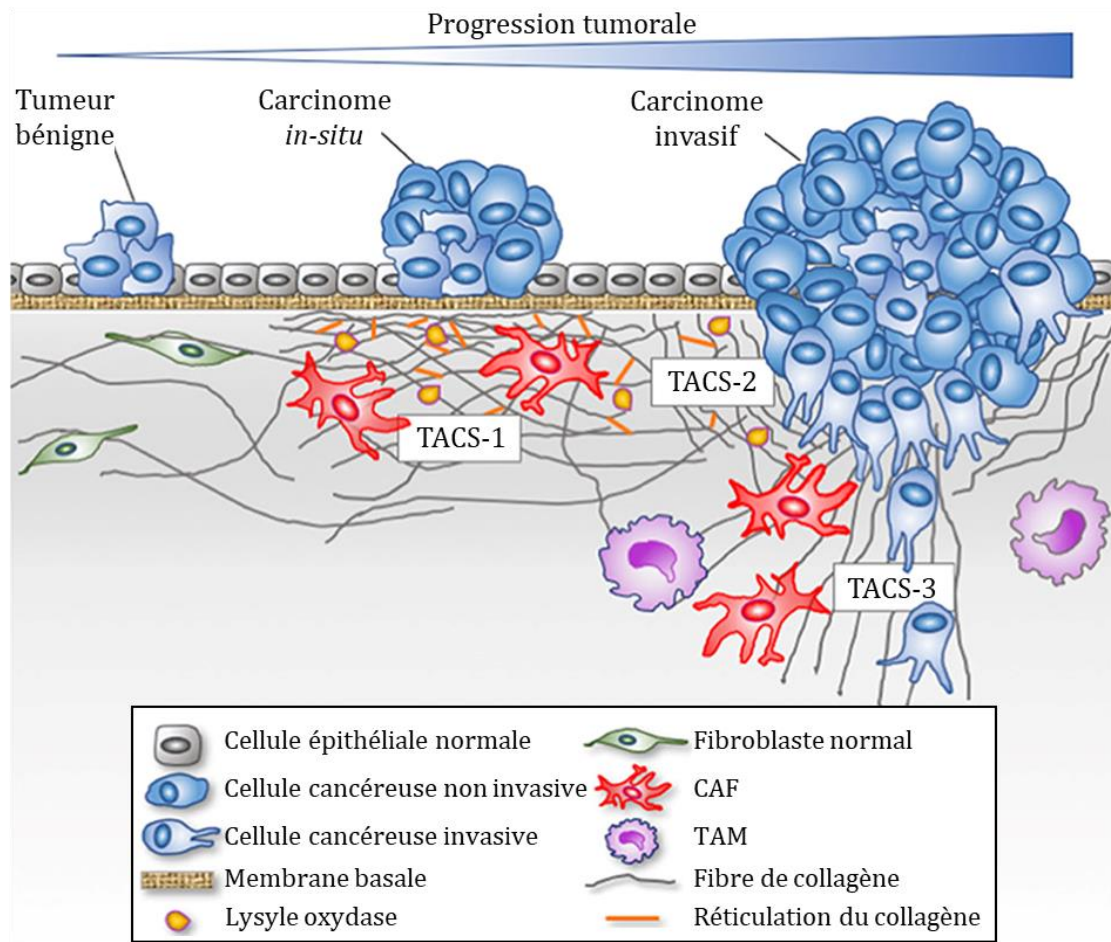


Figure 5 : Schéma du remodelage du microenvironnement lors de la progression tumorale dans le cancer du sein. Le passage d'une tumeur bénigne à un carcinome *in situ* est associé à une réorganisation progressive du microenvironnement tumoral. Le stade invasif est atteint lorsque la membrane basale est rompue permettant aux cellules de se propager à d'autres tissus. Dès le stade *in situ* les fibres de collagène se réorganisent. Lors du stade invasif, en plus des fibres de collagène parallèles à la tumeur (TACS-2), des faisceaux de fibres perpendiculaires à cette dernière (TACS-3) apparaissent. Ceux-ci favorisent la migration des cellules cancéreuses envahissantes. Schéma de Bourgot et al., 2020 sous licence CC-BY 4.0, traduction des légendes en français.

premier radiologue, alors une deuxième lecture est réalisée par un autre radiologue. En cas d'image suspecte, une étape de diagnostic commence.

Les techniques de dépistage reposent majoritairement sur leur grande sensibilité c'est-à-dire leur faible nombre de faux négatifs¹. Lors de cette étape, l'objectif de la mammographie est de repérer toute masse suspecte. En 2017-2018, 13,7 % des cancers détectés étaient au stade *in situ* (stade 0) et 77,2 % des cancers invasifs détectés n'avaient pas développé de métastases (stades 1-2-3). Néanmoins, la valeur prédictive positive² du dépistage avec la seule mammographie n'était que de 9,7 % (Santé Publique France 2021).

¹ La sensibilité d'un test correspond au nombre de cas positifs détectés (vrais positifs) divisé par le nombre de cas positifs réels (vrais positifs + faux négatifs).

² La valeur prédictive positive (VPP) correspond au nombre de cancers dépistés parmi les mammographies jugées positives en première ou deuxième lecture. En d'autres termes, seules 9,7 % des mammographies jugées à risque se sont finalement avérées être des cas de cancers.

2.2 Diagnostic

Lorsqu'au dépistage une masse est suspectée d'être cancéreuse, les radiologues cherchent à poser un premier diagnostic pour orienter la prise en charge. Pour cela, ils peuvent s'appuyer au besoin sur des examens complémentaires notamment des agrandissements ou de nouvelles incidences de la mammographie, une échographie ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) (HAS 2015).

L'interprétation des radiologues se fait selon l'échelle BI-RADS (*breast imaging-reporting and data system*) aussi appelée ACR (*American College of Radiology*) et comporte 5 + 2 niveaux (Tableau 1). Le classement est établi à partir de caractéristiques morphologiques de la masse suspecte identifiée sur les différentes imageries (forme, présence de calcifications...). À partir d'une image classée BI-RADS 4 correspondant à un risque de tumeur maligne estimée à plus de 2 %, une biopsie est effectuée pour fixer le diagnostic.

BI-RADS	Signification	Suivi	Probabilité de cancer
0	Résultat en attente	-	-
1	Imagerie normale (aucune anomalie détectée)	Aucun jusqu'au prochain dépistage	~0 %
2	Anomalie bénigne	Aucun jusqu'au prochain dépistage	~0 %
3	Anomalie probablement bénigne	Suivi à programmer à 6 mois	≤ 2 %
4	Anomalie indéterminée ou suspecte	Biopsie	> 2 %
5	Anomalie évocatrice d'un cancer	Biopsie	≥ 95 %
6	Anomalie classée comme maligne via biopsie	Traitement	-

Tableau 1 : Échelle BI-RADS

Les biopsies permettent d'obtenir des cellules de la tumeur suspecte pour les analyser en laboratoire d'histologie. Selon la taille du prélèvement, on parle de cytoponction, de microbiopsie ou de macrobiopsie.

Les pathologistes se servent des biopsies pour déterminer le type de la tumeur (section 1.2.3) et certains paramètres d'invasion locale vers les nerfs (infiltration périnerveuse) ou vers les vaisseaux sanguins (emboles vasculaires). Tous ces éléments permettent d'établir un diagnostic personnalisé et d'orienter les choix de traitement.

Néanmoins, cet examen est douloureux, stressant et chronophage. De plus, des traces de cancer ne sont trouvées que dans 28,6 % des biopsies réalisées (Lehman et al. 2017). Dans plus de deux tiers des cas, la biopsie pourrait donc être évitée.

2.3 Rôle des techniques d'imagerie

Comme discuté précédemment, l'examen radiologique constitue la première étape pour établir un diagnostic. La radiographie X est la plus utilisée et peut être complétée par des examens IRM ou ultrasonores. Plus les techniques d'imagerie permettront d'affiner le diagnostic, plus le nombre de biopsies inutiles pourra être diminué, réduisant par la même occasion le coût associé pour l'hôpital et le stress engendré pour les patientes. Cette thèse cherche à explorer l'apport que pourraient constituer de nouvelles approches en imagerie ultrasonore. Nous décrirons donc dans la suite de ce chapitre les différentes techniques d'imagerie par ultrason, avant de consacrer les chapitres suivants aux travaux de recherche réalisés durant cette thèse.

3 INTRODUCTION AUX ULTRASONS BIOMÉDICAUX

3.1 Principes physiques fondamentaux

3.1.1 Introduction aux ondes

Une onde est une « déformation, [un] ébranlement ou [une] vibration qui se propage dans un milieu donné » (Dictionnaire Le Robert, Edition 2022). En physique, le formalisme de l'équation d'onde a permis de regrouper des formes très diverses d'ondes qu'elles soient acoustiques (comme dans cette thèse), optiques, électromagnétiques ou plus récemment de matière (hypothèse de de Broglie) et gravitationnelles, sous une forme simple :

$$\frac{\partial^2 \Psi}{\partial t^2} = v^2 \frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} \quad (I.1)$$

Où Ψ est une grandeur physique (par exemple la pression) qui varie dans le temps t et l'espace x et v est la vitesse de l'onde. Cette double dépendance rend plus compliquée la représentation graphique des ondes, puisque :

- En chaque point x_i de l'espace, $\Psi(x_i, t)$ varie dans le temps définissant sa période temporelle T (en secondes) et de façon équivalente sa fréquence $f = 1/T$ (en Hertz) ou sa pulsation $\omega = 2\pi/T$ (en radians par seconde).
- En chaque instant t_i , $\Psi(x, t_i)$ varie dans l'espace définissant sa longueur d'onde λ (en mètres) et de façon équivalente son nombre d'onde $k = 2\pi/\lambda$ (en radians par mètre)

La longueur d'onde, la fréquence de l'onde et la vitesse de propagation de l'onde dans le milieu sont reliées par l'équation :

$$\lambda = v/f \quad (1.2)$$

Les ondes mécaniques comme les sons nécessitent la présence d'un milieu matériel pour se propager à la différence de la lumière qui peut se déplacer dans le vide. Un son n'est rien d'autre que la propagation d'une onde de pression, une alternance régulière de zones de surpression et de dépression (Figure 6). La fréquence des sons audibles par l'être humain varie de 20 Hz à 20 kHz. Au-delà de 20 kHz et jusqu'à 100 MHz, on parle « d'ultra-sons » (littéralement, « au-delà du son »).

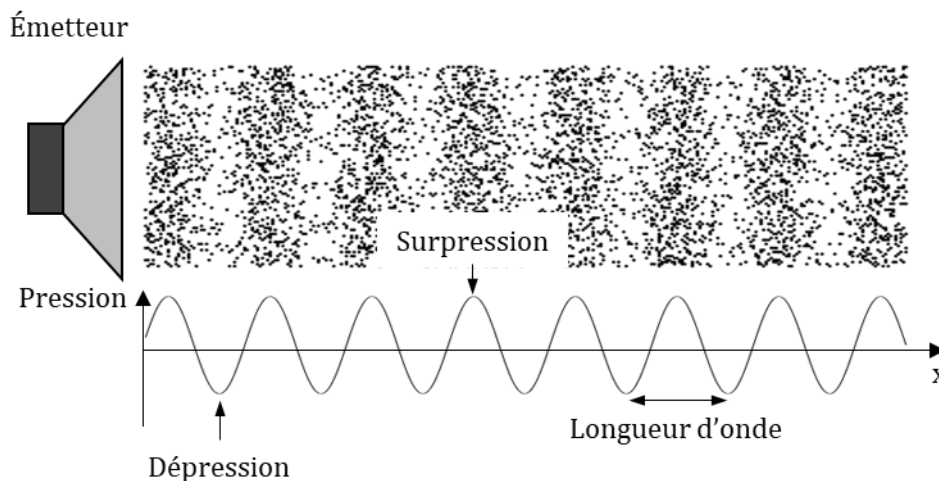


Figure 6 : Les ondes sonores déforment le milieu qu'elles traversent en faisant alterner des zones de surpression et des zones de dépression. Les points noirs représentent les particules présentes dans le milieu.

3.1.2 Ondes de compression et ondes de cisaillement

Lorsque la compression du milieu se produit dans la même direction que la propagation on parle d'onde longitudinale. À l'inverse, il existe des ondes de cisaillement, le plus souvent transversales c'est-à-dire déformant le milieu qu'elles traversent perpendiculairement à leur direction de propagation. L'exemple typique d'une onde de

le cisaillement transversale est une vague : les molécules d'eau se déplacent verticalement alors que la vague se propage à l'horizontale (Figure 7). Bien que moins communes, il existe également des ondes de compression transversales et des ondes de cisaillement longitudinales (Catheline et Benech 2015).

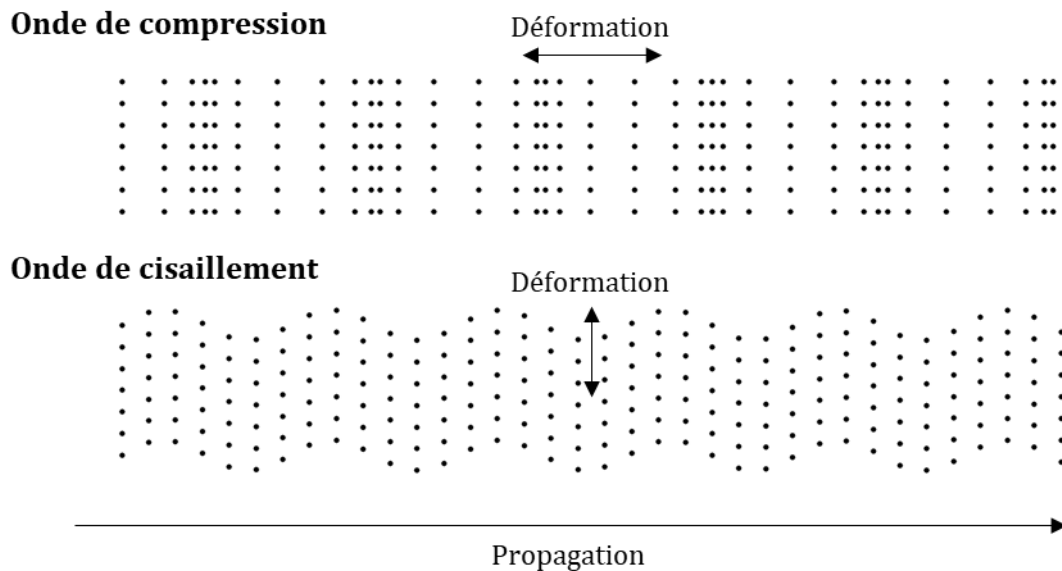


Figure 7 : Schéma d'une onde de compression et d'une onde de cisaillement. Les points noirs représentent les particules du milieu.

3.1.3 Des ultrasons à l'échographie

L'échographie est une méthode qui vise à mesurer l'écho produit par l'émission d'une onde ultrasonore dans un milieu. Elle est principalement utilisée pour effectuer des contrôles non-destructifs dans l'industrie et pour l'imagerie des tissus mous.

L'échographie biomédicale se pratique grâce à une sonde constituée d'éléments vibrants, les transducteurs. Ces composants piézoélectriques sont commandés électroniquement et généralement répartis le long d'une ligne. En leur imposant une tension électrique variable, il est possible de les faire se dilater ou se rétracter ce qui génère une onde transmise au milieu adjacent (mode émission). À l'inverse, lorsque l'écho de l'onde ainsi produite revient sur les transducteurs, elle les déforme légèrement. Cela provoque la génération d'un courant qui peut être enregistré (mode réception), comme illustré sur la Figure 8.

En pratique, l'échographie est capable de capter l'écho de tissus jusqu'à une profondeur d'un peu plus d'une centaine de longueurs d'onde. Au-delà, l'atténuation de l'onde due à son absorption par le milieu devient trop forte et il est difficile de capter un

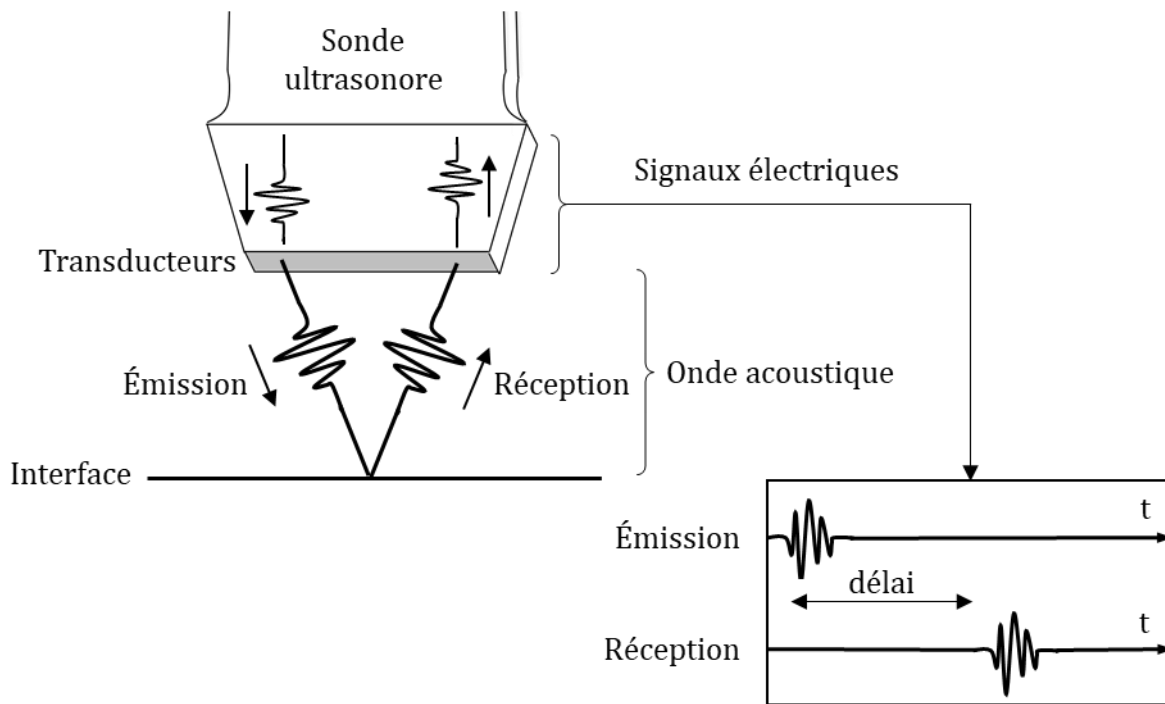


Figure 8 : Un courant électrique traverse la sonde ultrasonore pour exciter les transducteurs. Ces derniers vont émettre une onde ultrasonore. À la rencontre d'une interface, une partie de l'onde est réfléchiée. L'écho produit revient alors vers la sonde et excite de nouveau les transducteurs qui génèrent un signal électrique. Si l'on connaît la vitesse des ultrasons dans le milieu, le temps mis par l'onde pour faire l'aller-retour permet de déterminer la distance entre l'interface et la sonde.

signal suffisant pour la reconstitution d'une image. On choisit donc des sondes de grande longueur d'onde (i.e. de basse fréquence 3-5 MHz) pour imager les structures profondes et de petite longueur d'onde (i.e. de haute fréquence 8-15 MHz) pour les structures superficielles, car la taille des pixels formant l'image est du même ordre de grandeur que la longueur d'onde d'émission.

La profondeur de propagation des ondes dépend des interfaces rencontrées sur leur chemin. On parle d'interface quand l'impédance acoustique Z (en $\text{Pa}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ou rayl) varie brutalement. Dans le cas d'une onde plane progressive, l'impédance est égale au produit de la masse volumique ρ et de la vitesse du son v . Une variation d'impédance acoustique forte entre deux milieux aura pour effet de réfléchir presque toute l'onde ¹. Par conséquent, la zone située en-dessous de cette interface sera presque invisible aux ultrasons (Figure 9). Dans l'imagerie médicale, ce phénomène se produit par exemple dans le cas d'interfaces de type tissus mous/tissus osseux. Il est alors extrêmement difficile d'imager les organes sous les os, en particulier le cerveau.

¹Entre un milieu M_1 d'impédance Z_1 et un milieu M_2 d'impédance Z_2 , le coefficient de réflexion énergétique est $R = \left(\frac{Z_2 - Z_1}{Z_1 + Z_2}\right)^2$ et le coefficient de transmission énergétique est $T = \frac{4Z_1 Z_2}{(Z_1 + Z_2)^2}$.
Si $Z_1 \gg Z_2$ ou $Z_2 \gg Z_1$ alors $R \approx 1$ et $T \approx 0$.

Afin de constituer une image dite en mode B, l'enveloppe du signal reçu est convertie en pixels de différents niveaux de gris selon l'intensité de l'écho. Ainsi, une interface qui renvoie beaucoup d'énergie apparaîtra blanche alors qu'une absence de signal se traduira

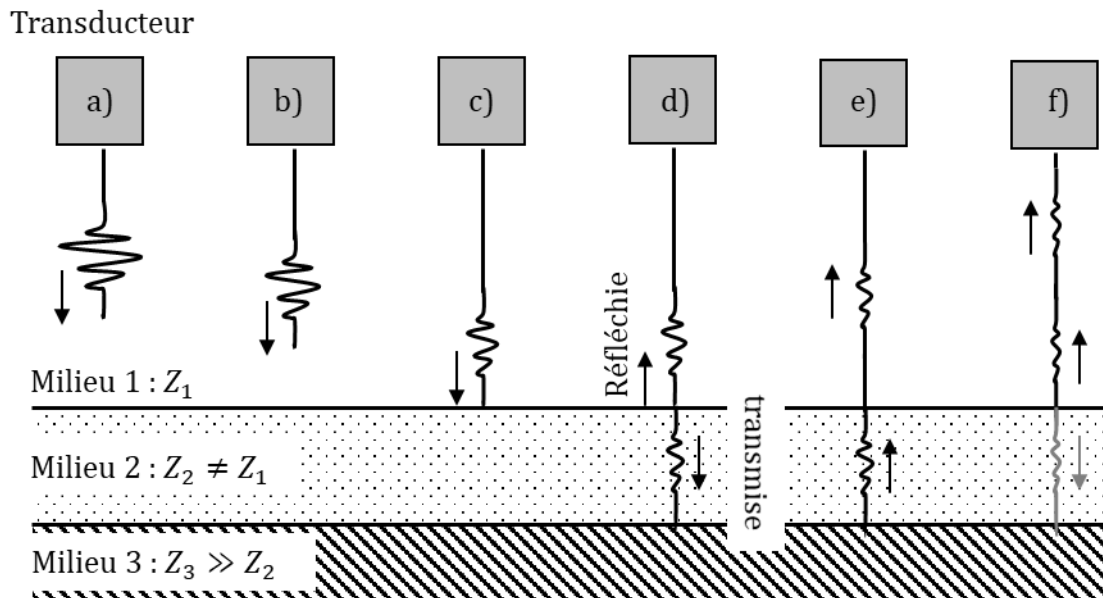


Figure 9 : a-c) L'onde émise par le transducteur est atténuée au fur et à mesure qu'elle se propage. c-d) Lorsqu'elle atteint une interface, une partie de l'onde est transmise et l'autre est réfléchie. Une différence importante de l'impédance acoustique entre deux milieux empêche l'onde de se transmettre dans le milieu 3. e-f) L'écho revient vers le transducteur qui va alors tenir le rôle de récepteur. Des multi-réflexions (en gris) existent mais sont le plus souvent négligées.

par un pixel noir (Figure 10). Sous les hypothèses de (i) considérer la vitesse des ultrasons constante dans le corps humain et de (ii) négliger les multiples réflexions, on peut alors considérer une équivalence temps – distance des échos. Ainsi, il est possible d'estimer d'où proviennent les signaux reçus et de reconstituer une image en 2D du milieu représentant ses interfaces.

Les images échographiques, même d'un milieu macroscopiquement homogène, ont un « grain » particulier ; on parle de tavelure ou *speckle*. Ces motifs proviennent des interférences entre les diffuseurs dont la taille caractéristique est inférieure à la longueur d'onde. Ils sont donc caractéristiques du milieu.

3.2 Développement et diffusion de l'échographie

3.2.1 Des premiers usages des ultrasons biomédicaux à l'image échographique

L'échographie et le sonar reposent sur les mêmes principes. Alors que ce dernier a été mis au point pendant la Première Guerre mondiale (Chilowsky and Langevin 1920), les ultrasons médicaux ne se sont véritablement développés qu'à partir des années 1970.

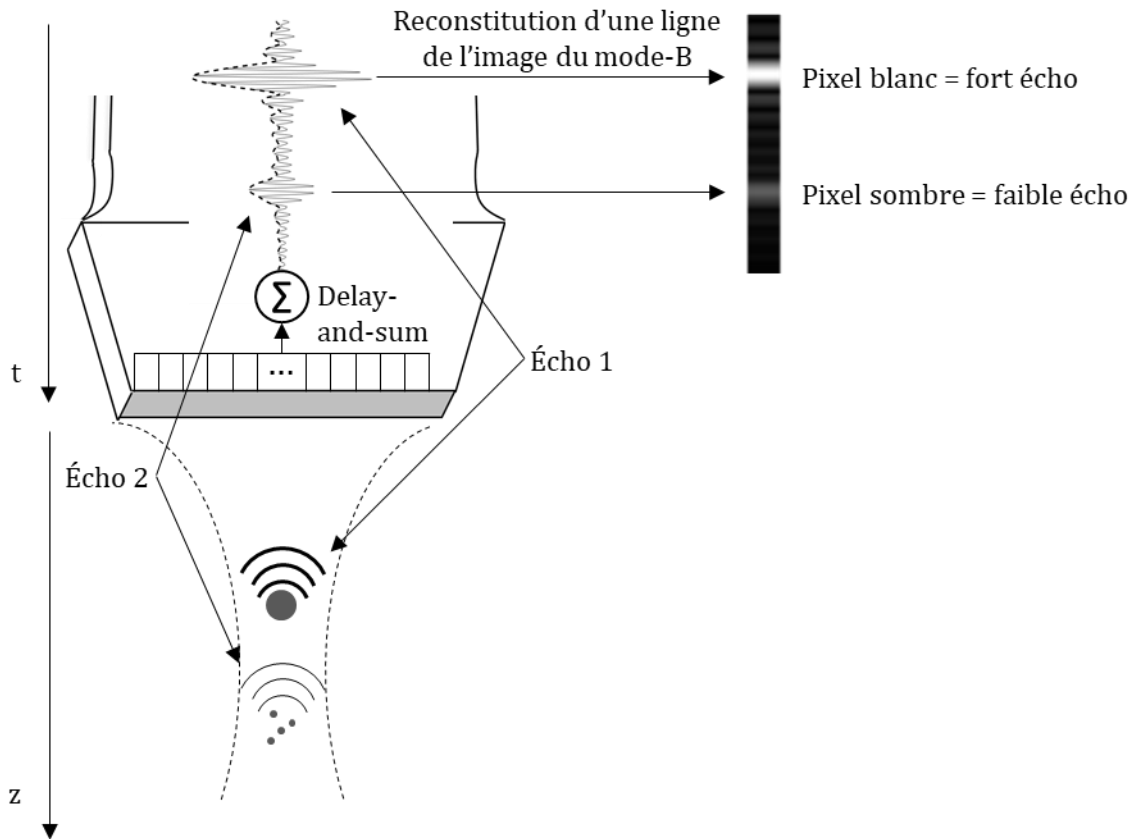


Figure 10 : L'onde émise par la sonde est focalisée le long d'une ligne grâce à une loi de retard parabolique entre les transducteurs. Les différentes interfaces présentes sur cette ligne renvoient des échos d'intensités variables. Ces échos sont transformés en signaux électriques par les transducteurs. Les signaux sont alors sommés en ajoutant un délai pour prendre en compte la position du transducteur par rapport au point d'intérêt. On reconstruit enfin la ligne du mode B correspondant en affichant un pixel clair pour les hautes intensités et un pixel sombre pour les intensités plus faibles.

Les premiers sonars n'apportaient qu'une information sur la distance de l'obstacle sur lequel le faisceau ultrasonore se réfléchissait. De la même façon, les premiers échographes fonctionnaient en mode A (pour Amplitude - *A-mode* en anglais). Une sonde mono-élément envoyait une onde ultrasonore focalisée le long d'une ligne et captait l'écho renvoyé. Cela ne donnait pas encore une image mais un signal 1D : le signal radiofréquence (RF). Les premières données médicales ont été constituées par la représentation de ce signal 1D en fonction du temps : le mode TM (pour Temps-Mouvement - *M-mode* en anglais). La profondeur de l'image correspond à l'image formée sur la ligne sous la sonde ; la largeur de l'image correspond aux différentes acquisitions successives. Ce mode permet de voir le déplacement des structures se trouvant sous la sonde. Enfin, le développement de sondes linéaires multi-éléments composées de 50 à 200 transducteurs a permis l'apparition du mode B (pour Brillance - *B-mode* en anglais). Ce mode est encore aujourd'hui le plus utilisé en clinique. Il permet d'obtenir une image en niveaux de gris de l'ensemble de la zone se trouvant sous la sonde. Par convention,

les images sont toujours présentées avec la sonde en haut, telle que l'axe vertical correspond à la profondeur et l'axe horizontal à la largeur de la sonde (Figure 11). Le succès de l'échographie en clinique provient de son coût modéré, de sa portabilité et de son caractère totalement non invasif et non ionisant.

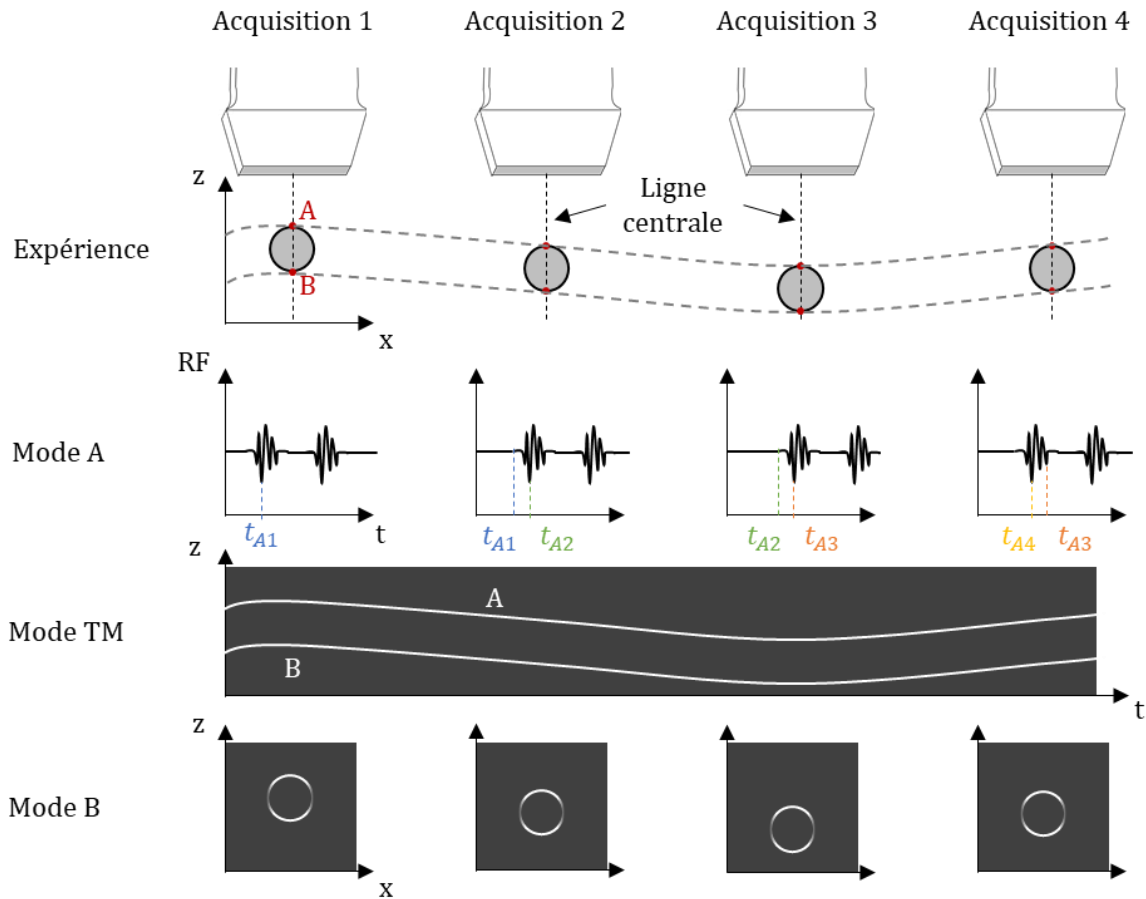


Figure 11 : Schéma des différences entre les modes A, TM et B. Dans l'expérience présentée, le milieu est composé d'une sphère pleine homogène oscillant dans l'eau. En mode A, les ultrasons sont focalisés le long de la ligne centrale de la sonde. Un écho est émis lorsque l'onde atteint le point A et le point B. Quand la sphère s'éloigne, l'écho est reçu plus tard. Le mode TM affiche la trace des échos reçus sur la ligne centrale, ici les échos des points A et B. Les interfaces apparaissent blanches et les milieux homogènes noirs. Le mode B reconstruit l'image 2D à chaque acquisition.

3.2.2 L'âge des ultrasons « ultrarapides »

Le mode B « historique » fonctionne en temps réel à environ 50 images par seconde. Cette cadence est fixée par le choix d'une focalisation ligne à ligne et par la physique : elle correspond au temps nécessaire pour que l'onde fasse tous les allers-retours nécessaires à la formation de l'image¹. La fluidité de l'imagerie obtenue est comparable à celle des

¹ Soient $v = 1500$ m/s la vitesse des ultrasons dans le corps humain, $d = 7,5$ cm la profondeur de la zone à imager et $n = 200$ le nombre de transducteurs de la sonde. Les ultrasons mettront $t = 2d/v = 0,1$ ms pour effectuer un aller-retour. Le mode B est constitué d'une ligne par transducteur. Il faudra donc 200 émissions-réceptions pour former une image. Cela correspond à une fréquence d'imagerie de 50 Hz sans prendre en compte le temps de traitement des données.

téléviseurs et suffisante pour de nombreux diagnostics, mais ne permet pas de capter certains phénomènes rapides que nous détaillerons dans la section 3.3.

Cette limite de résolution temporelle a été dépassée grâce à l'avènement des ultrasons ultrarapides et le concept de focalisation à la réception après l'émission d'ondes planes et non focalisées. L'émission d'une seule onde plane permet d'insonifier l'ensemble du milieu. Puis, la focalisation se fait lors du traitement des signaux reçus par l'adaptation numérique des retards sur chaque transducteur. Dès la fin des années 1970, différents groupes ont travaillé sur de nouvelles méthodes permettant une cadence d'imagerie de l'ordre de 1000 Hz (Bruneel et al. 1977 ; Delannoy et al. 1979 ; Shattuck et al. 1984). Ces premiers systèmes étaient complexes, combinant de l'acoustique et de l'optique. Ils étaient limités par la technologie de l'époque qui ne permettait pas l'enregistrement numérique rapide du signal reçu par des dizaines de transducteurs. Au début des années 1990, le besoin de suivre le déplacement rapide d'ondes de cisaillement dans les tissus pour des visées de mesures ultrasonores d'élasticité des tissus pousse le développement des premiers systèmes ultrarapides reconstruisant une image à l'aide de quelques ondes planes au lieu de 200 focalisations (Sandrin et al. 1999 ; Sandrin et al. 2002 ; Tanter et al. 2002). On approche alors de cadences d'imagerie de l'ordre de 10 000 Hz. Au début des années 2000, les améliorations technologiques permettent d'acquérir et de traiter ces acquisitions en temps réel. L'obtention d'images à cette fréquence sera à l'origine du développement d'autres nouvelles modalités comme le Doppler ultrarapide qui vont considérablement élargir le potentiel de l'imagerie ultrasonore (Tanter and Fink 2014).

3.2.3 De l'imagerie 2D à l'imagerie 4D

Certains examens ne peuvent se contenter d'une coupe 2D et nécessitent l'inspection d'un volume complet. C'est le cas par exemple pour l'évaluation de la taille fœtale, du volume d'une cavité cardiaque ou d'une tumeur. Plus généralement, une imagerie 3D permet de voir un organe dans toute sa complexité et sa variabilité, là où une coupe 2D ne sera par essence qu'une représentation partielle. Depuis les débuts de l'échographie, des méthodes ont été proposées pour reconstruire des volumes complets. Plus complexes et plus coûteuses, elles ne commencent à se diffuser dans la pratique clinique que depuis quelques années et demeurent un sujet de recherche à part entière.

Pour cette introduction, après une présentation des principales caractéristiques des sondes ultrasonores, nous détaillerons deux types de méthodes d'acquisition 3D. Les premières concatènent des images afin de recréer des volumes ; les secondes réalisent des émissions-réceptions ultrasonores dans tout l'espace et permettent de réaliser des images en 3D temps réel (4D).

3.2.3.1 Sondes échographiques linéaires et matricielles

Les sondes échographiques linéaires sont utilisées pour obtenir une image 2D rectangulaire de telle sorte que l'image obtenue corresponde à la zone se situant sous la sonde. Dans les cas où l'ouverture doit être limitée (par exemple si l'on souhaite placer la sonde entre deux côtes), on préfère utiliser des sondes courbes utilisant des ondes divergentes ce qui permet d'augmenter la taille latérale de l'image avec la profondeur. Les sondes linéaires sont constituées d'une barrette de transducteurs. La distance entre deux éléments est appelée pitch. On définit le repère de la sonde (Figure 12) tel que :

- l'azimut X correspond à la ligne formée par les transducteurs
- l'élévation Y correspond à la perpendiculaire de l'azimut dans le plan formé par la barrette
- la profondeur Z correspond à la direction de propagation des ultrasons

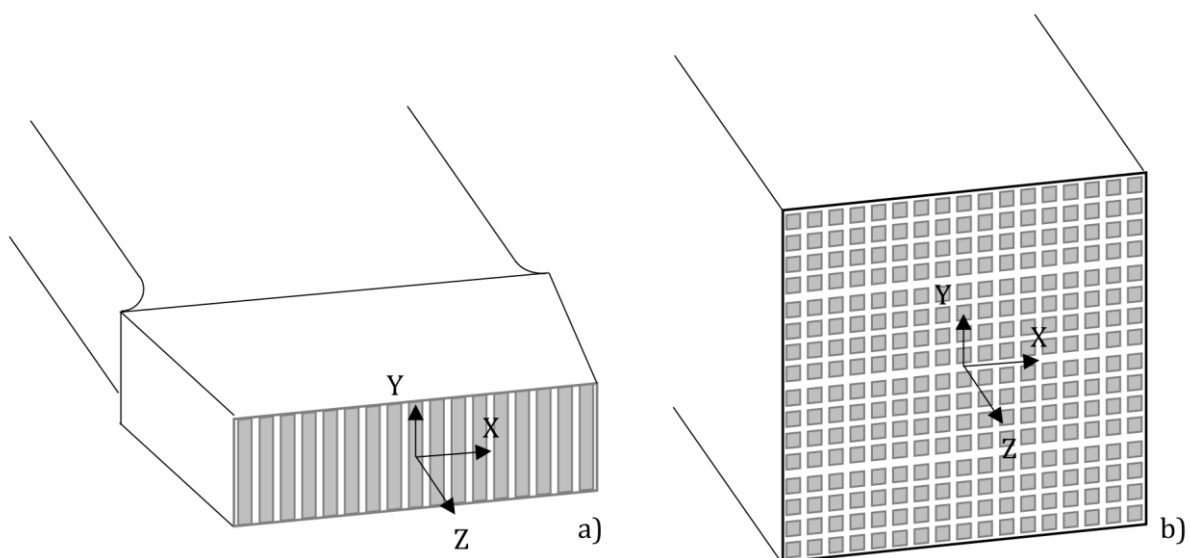


Figure 12 : Schéma d'une sonde linéaire (a) et d'une sonde matricielle (b). Les transducteurs (en gris) de la sonde linéaire sont répartis sur la dimension azimutale X et sont plus grands en élévation Y. Dans le cas de la sonde matricielle, les transducteurs sont carrés.

3.2.3.2 Acquisitions ultrasonores 3D par concaténation

Les images en mode B représentent des coupes du milieu. Un volume peut donc être reconstitué à partir de plusieurs de ces images prises avec un pas régulier. Ceci est un avantage par rapport à d'autres techniques comme les rayons X qui produisent des images par projection. D'une certaine façon, le médecin qui passe une sonde linéaire le long d'un organe réalise mentalement une reconstruction 3D. De façon plus standardisées, plusieurs méthodes, que nous appellerons « tomographies » dans la suite de ce manuscrit, ont été proposées pour reconstituer des volumes à partir de coupes 2D (Figure 13). Nous citerons en exemple ici celles qui :

- enregistrent ou mesurent le déplacement de la sonde grâce à un bras mécanique sur laquelle elle est fixée (Eaton et al. 1979 ; Geiser et al. 1982 ; Sawada et al. 1983 ; Raichlen et al. 1986) ;
- fixent la sonde à un ou plusieurs moteurs pour contrôler son déplacement (Pretorius et al. 1992 ; Picot et al. 1993) ;
- intègrent un moteur autour ou dans la sonde afin de déplacer les transducteurs (Klein et al. 1992 ; Martin et al. 1986).

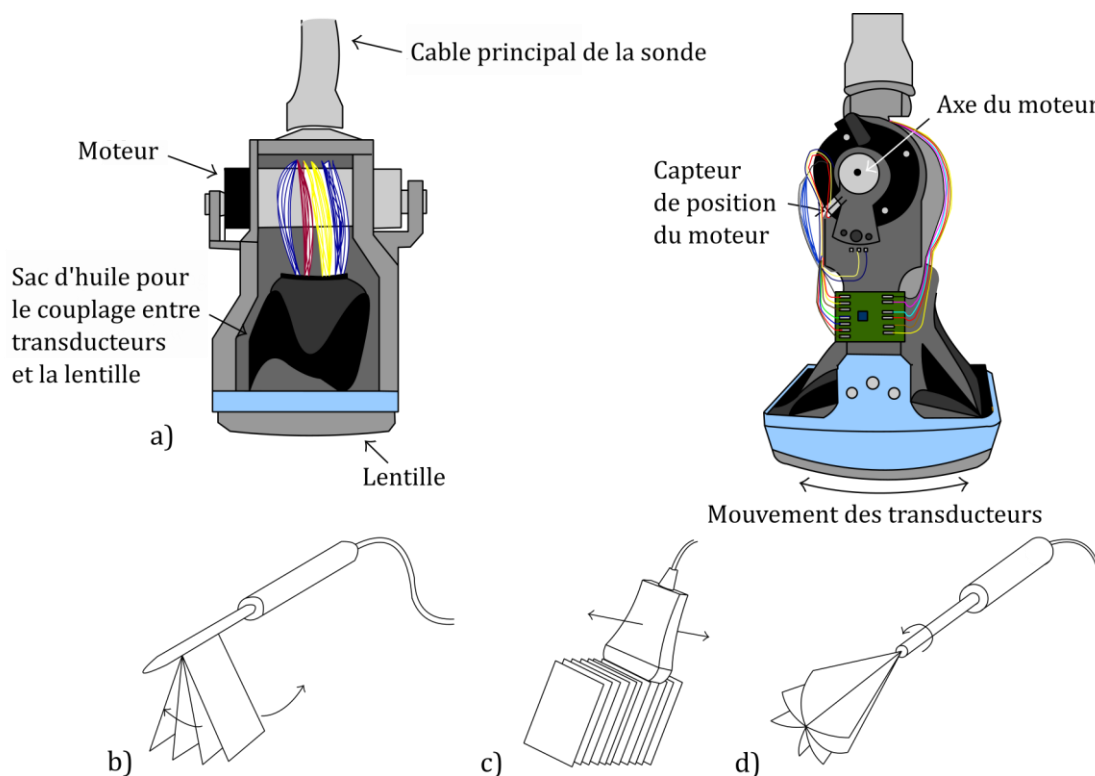


Figure 13 : Description de quelques systèmes de tomographie ultrasonore a) sonde avec système motorisé intégré, b) scan par rotation de type 1, c) scan linéaire, d) scan par rotation de type 2 [figure adaptée de (Huang and Zeng 2017) sous licence CC BY – traduction des légendes en français]

3.2.3.3 Acquisitions ultrasonores 4D

Au lieu de reconstruire un volume coupe par coupe, il est également possible de concevoir des sondes capables d'insonifier tout un volume en une seule émission et de capter les échos provenant de l'ensemble de la zone. On parle alors d'acquisition 4D car un volume 3D entier peut être imagé au cours du temps. Il « suffit » pour cela d'utiliser une sonde matricielle sur laquelle les transducteurs sont répartis sur une surface. On parle alors de sondes matricielles. Néanmoins, des problèmes physiques se posent rapidement. En particulier, pour pouvoir commander indépendamment un grand nombre de transducteurs (typiquement autour de 100 x 100), il faut que chacun d'entre eux soit relié à un câble différent. Or dans les échographes actuels, on ne peut connecter que 64 à 512 voies électroniques, bien loin des 10 000 nécessaires pour de telles sondes.

Pour contourner ces limites, d'autres méthodes ont été proposées afin de réaliser des volumes ultrasonores. La méthode la plus simple consiste à associer en élévation plusieurs rangées (typiquement 3) de transducteurs disposés linéairement. Ce sont les sondes 1.25D. Un multiplexeur peut être ajouté pour connecter les différentes rangées ce qui permet de commander intégralement la sonde sans augmenter le nombre de voies. Cette méthode est quasi-4D puisque les différentes rangées de transducteurs sont utilisées les unes après les autres mais dans un délai faible par rapport à celui nécessaire pour réaliser un mouvement mécanique. Parmi les autres solutions proposées, nous citerons les matrices parcimonieuses (*sparse array*) qui consistent à n'avoir qu'un faible nombre de transducteurs dispersés sur une surface ainsi que les matrices RCA (*row and column addressing*) qui consistent en un adressage orthogonal par ligne et par colonne d'un réseau matriciel.

3.2.3.4 Comparaison entre les méthodes de concaténation et 4D

Les méthodes d'imagerie 3D par concaténation reposent sur des technologies plus matures et surtout sur des sondes plus sensibles que les méthodes 4D. En effet, les sondes linéaires sont composées de transducteurs rectangulaires qui sont un ordre de grandeur plus grand en élévation qu'en latéral (Figure 12). Cela leur permet d'avoir une grande surface active tout en conservant une faible taille latérale permettant d'obtenir une bonne focalisation en azimuth. Une grande surface permet d'émettre un signal électrique plus puissant et donc d'augmenter le ratio signal sur bruit. Dans le cas des sondes matricielles, les transducteurs sont carrés car la focalisation doit être équivalente dans les deux

directions du plan de la sonde. Afin de conserver une bonne résolution, les transducteurs des sondes matricielles sont donc plus petits ce qui réduit leur sensibilité. De plus, à nombre de voies égales, les sondes linéaires permettent de mieux focaliser les ondes émises et reçues dans leur plan principal d'imagerie ce qui optimise leur résolution et évite les artefacts.

Les méthodes 4D reconstituent des volumes plus rapidement que les méthodes par tomographie, puisqu'aucun mouvement mécanique n'est nécessaire. Elles donnent donc la possibilité de faire un suivi dans le temps à une cadence rapide alors que les méthodes par reconstruction mettent plusieurs minutes pour reconstruire un volume. En insonifiant tout un volume en une seule fois, ces méthodes permettent aussi d'être moins sensibles aux artefacts de mouvement. Cependant elles restent complexes, coûteuses et peu disponibles.

À moyen terme, les progrès techniques des matériaux utilisés dans les sondes ainsi que l'amélioration de la puissance de calcul et leur diminution en coût pourraient néanmoins permettre aux technologies 4D de s'imposer. Plus rapides et moins dépendantes de l'opérateur, elles amélioreraient la qualité des examens cliniques. La meilleure façon de réaliser une acquisition directe 3D reste à ce jour un sujet de recherche sans consensus et qui dépend des applications visées. La méthode d'imagerie 4D qui s'imposera devra offrir suffisamment de versatilité pour pouvoir utiliser la grande variété des modalités ultrasonores, simplement, en temps réel et à un coût raisonnable.

3.3 Diversité des paramètres d'imagerie échographique

Cette section présente les différentes modalités ultrasonores utilisées au cours de cette thèse. Chacune d'entre elles a fait l'objet de nombreuses thèses et travaux de recherche. Il s'agira donc ici de les introduire via leur intérêt clinique puis d'en expliquer les principes généraux. Toutes les explications sont données pour des sondes linéaires classiques mais les principes physiques restent identiques pour des sondes matricielles.

3.3.1 Mode B « ultrarapide »

Le mode B permet la réalisation d'images en nuances de gris avec une résolution de l'ordre de la longueur d'onde utilisée (50 à 300 μm). En réalisant des images de l'intérieur du corps humain, il permet aux radiologues de suivre la croissance des fœtus et de diagnostiquer de nombreuses maladies qui modifient l'organisation des tissus (apparition

de tumeurs, déchirure ligamentaire ou musculaire...). Il se décompose en deux phases : l'émission d'une onde ultrasonore et la réception de son écho. Le mode B ultrarapide consiste à réaliser ces images à une cadence supérieure au kilohertz. Il est alors possible de suivre des événements très rapides indispensables à des examens quantitatifs tels que l'élastographie par onde de cisaillement (section 3.3.2), la microscopie ultrasonore de localisation (section 3.3.4), et contribuant à améliorer la qualité du Doppler de puissance (section 3.3.3) et de l'imagerie du tenseur de rétrodiffusion (section 3.3.5).

La phase d'émission consiste en l'envoi de plusieurs ondes planes (typiquement de 3 à 40) légèrement inclinées (inclinaison maximale généralement comprise entre 5° et 20°). La phase de réception correspond à l'enregistrement des signaux temporels reçus sur chaque transducteur. On réalise un couple « émission – réception » pour chaque onde plane. Généralement les signaux sont stockés sous forme complexe, on parle de démodulation en phase / quadrature de phase (*In-phase / Quadrature* – IQ). La partie réelle est l'amplitude du signal I ; la partie imaginaire correspond à l'amplitude du signal décalée d'un quart de période Q. Cette notation permet de transporter à la fois l'information sur l'amplitude et sur la phase du signal (Figure 14).

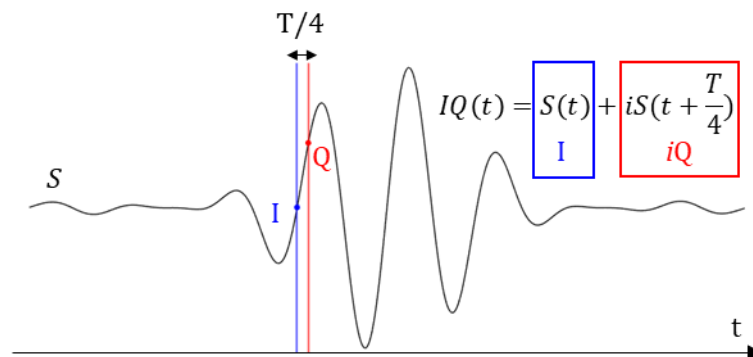


Figure 14 : Les signaux IQ correspondent à une série de nombres complexes qui prennent en partie réelle la valeur de l'amplitude du signal et en partie imaginaire la valeur de l'amplitude en quadrature (c'est-à-dire décalé d'un quart de période)

L'image en mode B ultrarapide se construit pixel par pixel. Pour chaque onde plane, le temps mis par l'onde pour faire l'aller-retour entre chaque transducteur et le pixel d'intérêt est estimé. Puis, pour chaque onde plane, les signaux IQ correspondants à l'écho renvoyé par le pixel sur chaque transducteur sont identifiés en faisant l'hypothèse que la vitesse du son est constante dans le milieu. La somme de ces signaux complexes correspond à la valeur complexe du pixel et leur module donne l'intensité (le niveau de gris) qui sera affiché sur l'image en mode B. (Figure 15). La matrice des pixels complexes

est parfois appelée par abus de langage « image IQ » du mode B. Si le pixel a renvoyé un fort écho alors la valeur du module sera grande et il sera affiché en blanc. À l'inverse, si le pixel n'a renvoyé que peu d'écho alors la valeur du module des signaux correspondants sera faible et il sera affiché en noir.

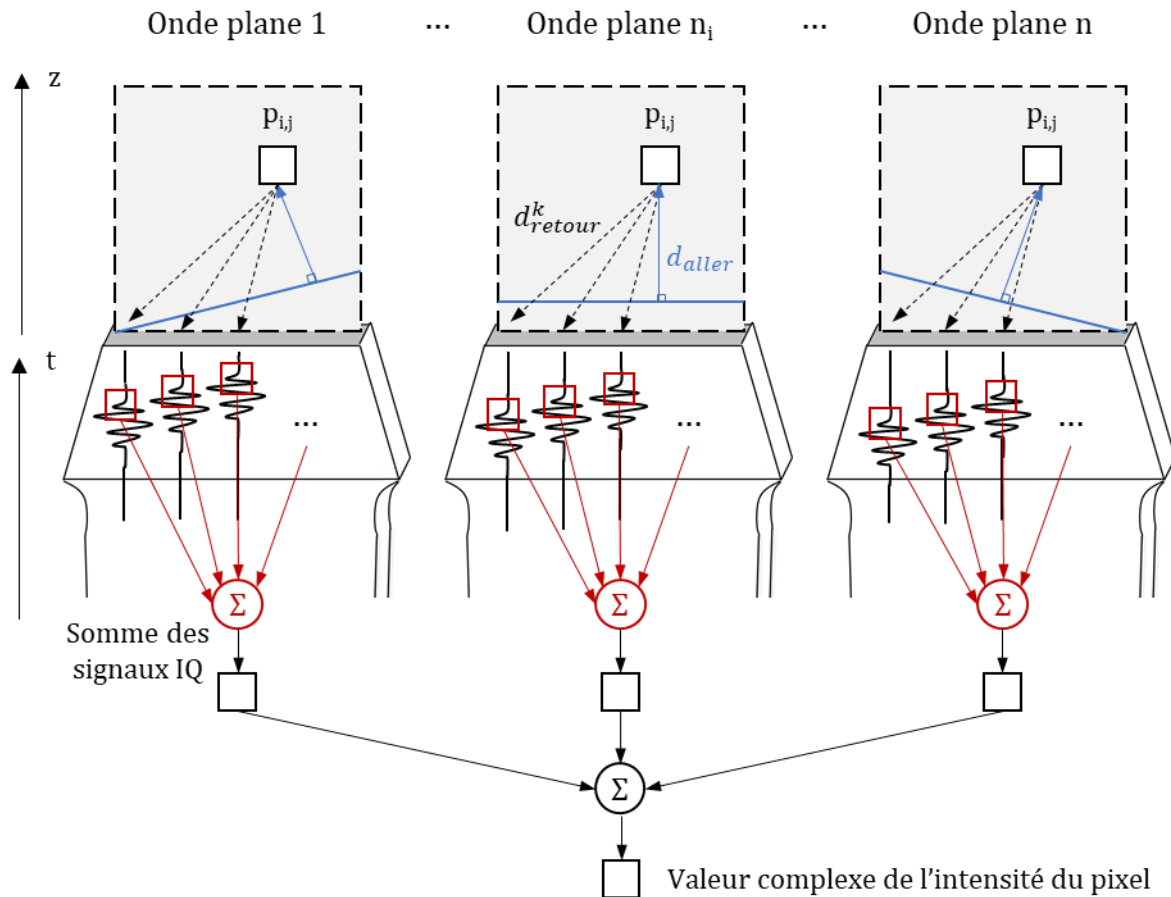


Figure 15 : Pour chaque pixel p_{ij} de l'image à reconstruire, on détermine la distance que chaque onde plane met pour aller au pixel (d_{aller}^k) et revenir sur chaque transducteur k de la sonde (d_{retour}^k). Sous l'hypothèse que la vitesse du son dans le milieu est constante (généralement 1540 m/s pour le corps humain), il est possible de trouver le signal correspondant au temps d'un aller-retour pour chaque transducteur. Les signaux IQ correspondants sont alors sommés pour obtenir la valeur complexe correspondant à ce pixel. Le mode B ultrarapide est ainsi l'affichage du module de tous ces pixels.

3.3.2 Élastographie par onde de cisaillement (SWE)

L'élastographie permet une mesure *in vivo* de la rigidité des tissus. Dans la pratique clinique, elle est notamment utilisée pour obtenir un contraste entre des zones de rigidité différente et réaliser des mesures quantitatives de la rigidité dans des tumeurs du foie, du sein, de la thyroïde, des reins ou de la prostate (Sigrist et al. 2017). Elle a été la première application des ultrasons ultrarapides au-delà du mode B (Tanter and Fink 2014). Dans le cadre du cancer du sein, la technique a été appliquée à la différenciation des tumeurs

cancéreuses et bénignes, ce qui a permis d'augmenter la spécificité¹ de l'imagerie ultrasonore pour le dépistage du cancer du sein de 61,1 % à 78,5 % (Berg et al. 2012).

Les tissus mous (peau, muscles, tissus glandulaires...) du corps humain ont la particularité d'être quasi-incompressibles mais faciles à déformer par cisaillement. Leur module d'élasticité isostatique K est donc plus élevé que leur module de cisaillement μ (Tableau 2). En effet, un plongeur soumis à plusieurs fois la pression atmosphérique ne se comprimera pas (incompressibilité) mais sa peau se déformera facilement.

Type de tissus	Module d'élasticité isostatique (K en Pa)	Module de cisaillement (μ en Pa)
Os	$\sim 10^{10}$	$10^9 - 10^{10}$
Cartilage, épiderme	$\sim 10^9$	$10^7 - 10^8$
Derme, nodules palpables, muscles contractés, tissus conjonctifs	$\sim 10^9$	$10^5 - 10^6$
Tissus mammaire glandulaire, foie, muscle détendu, gras	$\sim 10^9$	$10^3 - 10^4$

Tableau 2 : Propriétés mécaniques des principaux tissus du corps humain d'après A.P. Sarvazyan et al. 1995

Le principe de l'élastographie repose sur l'évaluation de la vitesse de déplacement des ondes de cisaillement dans les tissus mous. En effet, en négligeant le module de cisaillement devant le module d'élasticité isostatique, il est possible de relier la vitesse d'une onde de cisaillement se propageant dans un tissu mou à sa rigidité (module d'Young E) :

$$E = 3\mu = 3\rho v_{\text{cisaillement}}^2 \quad (1.3)$$

La séquence ultrasonore se décompose en plusieurs étapes. D'abord, on vient exciter le milieu pour créer une onde de cisaillement. Puis, on image la propagation de cette onde grâce aux ultrasons ultrarapides. Enfin, la vitesse de l'onde est estimée en chaque pixel pour en déduire la rigidité locale.

3.3.2.1 Création de l'onde de cisaillement

Pour créer une onde de cisaillement, plusieurs approches ont été proposées avec des vibreurs mécaniques (Krouskop et al. 1987), des sources acoustique grâce à la pression de radiation (Bercoff et al. 2004 ; Mostafa Fatemi and James F. Greenleaf 1998 ;

¹ La spécificité correspond à la probabilité d'obtenir un résultat négatif chez les patients qui n'ont pas de cancer. Plus la spécificité est faible, plus le radiologue estime à tort que la masse était un cancer.

Nightingale et al. 2002 ; Sarvazyan et al. 1998), ou des sources électromagnétiques grâce la force de Lorentz (Grasland-Mongrain et al., 2013 ; Muthupillai et al. 1996) ou un échauffement local induit par des lasers (Noroy et al. 1995). Certaines méthodes se passent de la création d'une onde de cisaillement en utilisant celles naturellement générées dans le corps humain par le cœur (Gallot et al., 2011 ; Konofagou et al. 2000). Les avantages et inconvénients de ces méthodes sont discutés dans Giammarinaro et al. 2018.

La méthode la plus utilisée en pratique est l'élastographie par onde de cisaillement (*supersonic shear imaging* ou *shear wave elastography* – SWE) (Bercoff et al. 2004) qui utilise la pression de radiation acoustique pour obtenir des mesures reproductibles, sans dépendance au cycle cardiaque et avec une même sonde pour générer et suivre l'onde de cisaillement. Elle consiste à focaliser le faisceau ultrasonore en différents points le long d'une ligne en apportant suffisamment d'énergie pour que la pression de radiation génère une onde de cisaillement (Figure 16). Cela passe par une durée de focalisation « longue », de l'ordre de 100 μ s.

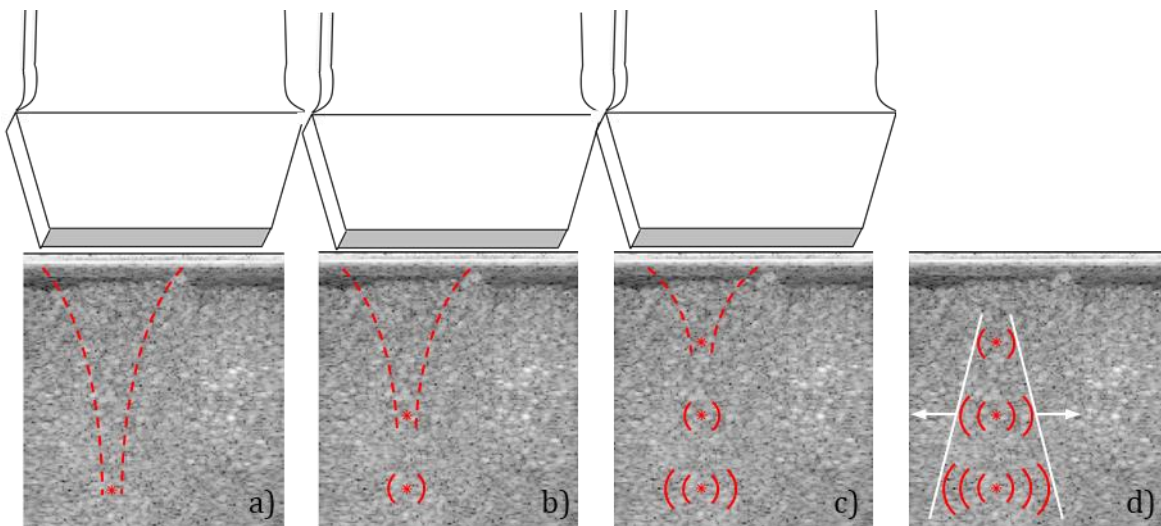


Figure 16 : La première étape de l'imagerie SWE consiste à focaliser un faisceau ultrasonore pendant un temps assez long (typiquement 100 μ s) en différents points le long d'une ligne de la zone d'intérêt (a-c). L'énergie déposée génère une onde de cisaillement. Cette imagerie est parfois appelée « supersonique » car le temps mis pour passer d'un point de focalisation à un autre est inférieur au temps mis par l'onde de cisaillement pour parcourir la même distance. d) Les différentes ondes s'additionnent pour former une onde de cisaillement légèrement conique (en blanc) qui se propage des deux côtés de la ligne de focalisation.

3.3.2.2 Imager l'onde de cisaillement

Imager l'onde de cisaillement grâce aux ultrasons ultrarapides est possible car elle se déplace beaucoup moins vite que les ultrasons (qui sont des ondes de compression). En effet, en négligeant la dispersion et sous l'hypothèse que le module d'élasticité isostatique K est très grand devant le module de cisaillement μ ce qui est vérifié pour tous les tissus mous (Tableau 2) on a (Bercoff 2004) :

$$v_{\text{cisaillement}} \simeq \sqrt{\frac{\mu}{\rho}} \text{ et } v_{\text{compression}} \simeq \sqrt{\frac{K}{\rho}} \quad (1.4)$$

Pour des valeurs typiques $K = 10^9$ Pa, $\rho = 1000$ kg/m³ et $\mu \in [10^3, 10^6]$, la vitesse des ondes de compression est de l'ordre de 1000 m/s et la vitesse des ondes de cisaillement comprise entre 1 et 30 m/s.

Une cadence de plusieurs milliers de Hertz permet de réaliser quelques dizaines d'images de l'onde de cisaillement avant que cette dernière ne quitte le champ de vue de la sonde (variable selon la sonde et la rigidité des tissus). Le mouvement provoqué par le passage de l'onde est toutefois trop faible pour être mesuré directement avec l'imagerie en mode B, même ultrarapide. Une étape de prétraitement est nécessaire.

Les diffuseurs présents dans le milieu suivent la déformation de l'onde de cisaillement. Dans le cas du SWE, l'onde se propage latéralement selon l'axe X. Par conséquent, les diffuseurs subissent un mouvement parallèle à l'axe de la profondeur Z. Au niveau du passage de l'onde de cisaillement, d'une image ultrarapide à la suivante, les diffuseurs présents dans un même pixel vont donc légèrement se rapprocher ou s'éloigner de la sonde. La valeur complexe du pixel d'une image de mode B à la suivante sera légèrement déphasée. En effet, les ultrasons auront parcouru un peu plus ou un peu moins de chemin pour atteindre les mêmes diffuseurs que pour l'image précédente (Figure 17). En pratique, pour détecter l'onde, il est donc nécessaire de mesurer le déphasage du signal de chaque pixel (x, z) entre deux images prises à t_k et t_{k+1} (Figure 18) :

$$\Delta\phi_{x,y}(t_k) = \arg(IQ(x, z, t_{k+1}) * \overline{IQ}(x, z, t_k)) \quad (1.5)$$

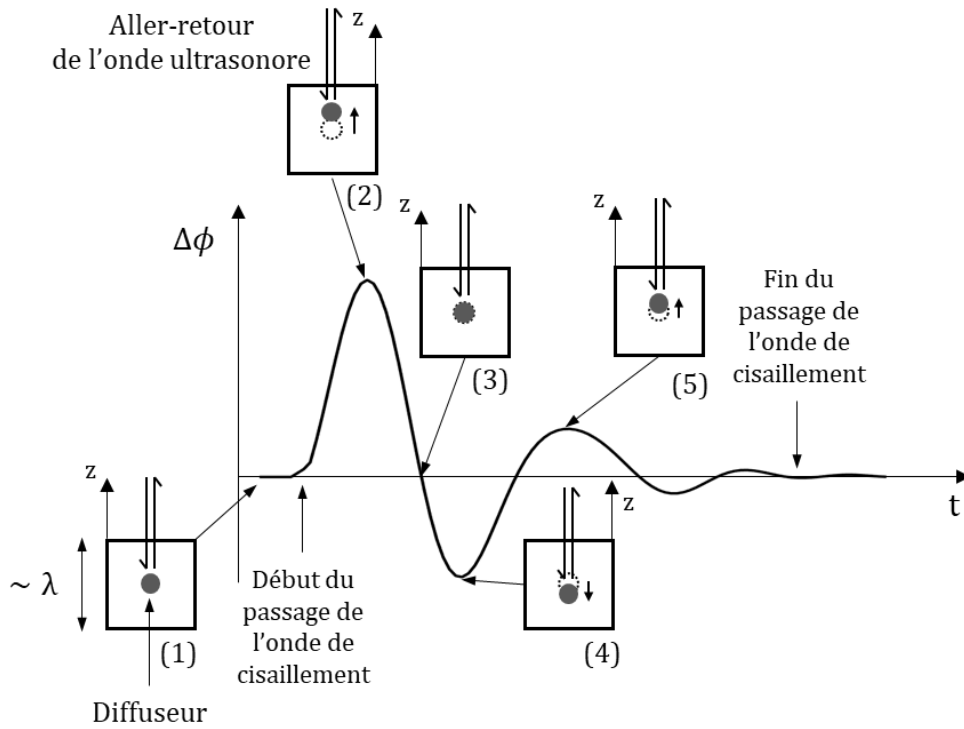


Figure 17 : Soit un diffuseur localisé au niveau d'un pixel de l'image (1). Lors du passage de l'onde de cisaillement, le diffuseur va légèrement monter et redescendre le long de l'axe Z (2-5) tout en restant dans l'espace du pixel. Puisque le chemin parcouru par l'onde ultrasonore pour effectuer l'aller-retour du diffuseur à la sonde est légèrement modifié, sa phase en réception va osciller. Pour le pixel considéré, l'écart des phases entre une image et la suivante va donc également osciller.

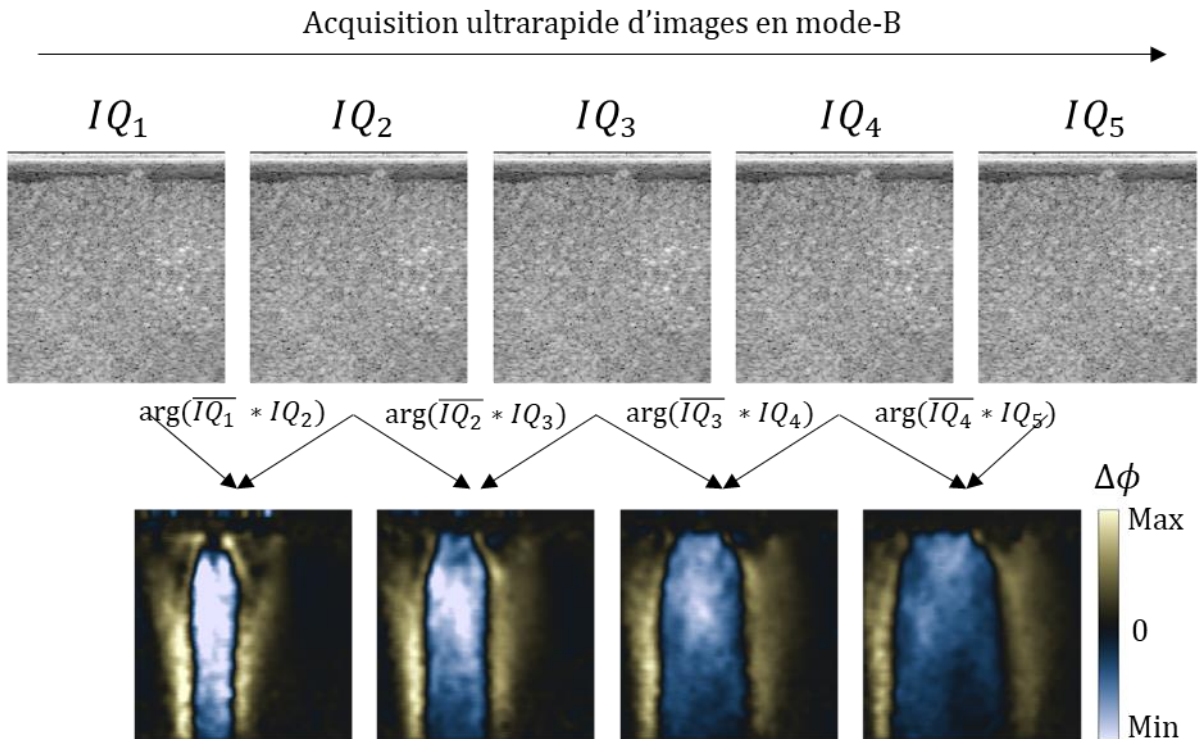


Figure 18 : Le mouvement généré par l'onde de cisaillement est trop faible pour être perçu sur les images en mode B (IQ_1 à IQ_5). Il est néanmoins possible de percevoir la propagation de l'onde grâce à l'argument de la multiplication point par point du conjugué d'une image par l'image suivante – c'est-à-dire par la mesure du déphasage.

3.3.2.3 Estimer la vitesse de l'onde de cisaillement

À partir des cartes de déphasage, il est possible de calculer la vitesse de l'onde de cisaillement en chaque pixel. Pour cela, il faut mesurer le temps mis par l'onde pour passer d'un pixel se trouvant en amont à un pixel se trouvant en aval de notre pixel d'intérêt. Ce délai peut être estimé avec précision en effectuant la corrélation croisée des fonctions de déphasage des deux pixels (Figure 19).

3.3.2.4 Considérations pratiques

En pratique, pour réaliser une carte complète, il est nécessaire de réaliser plusieurs lignes de focalisations décalées sur l'ensemble de l'axe X. En effet, il existe un temps incompressible entre la phase de focalisation et le début de l'imagerie. À la première image, l'onde a donc déjà parcouru une petite distance depuis sa position initiale sans qu'il ait été possible d'enregistrer son passage. Pour reconstruire l'information manquante, on combine deux images ou plus en décalant la ligne de focalisation.

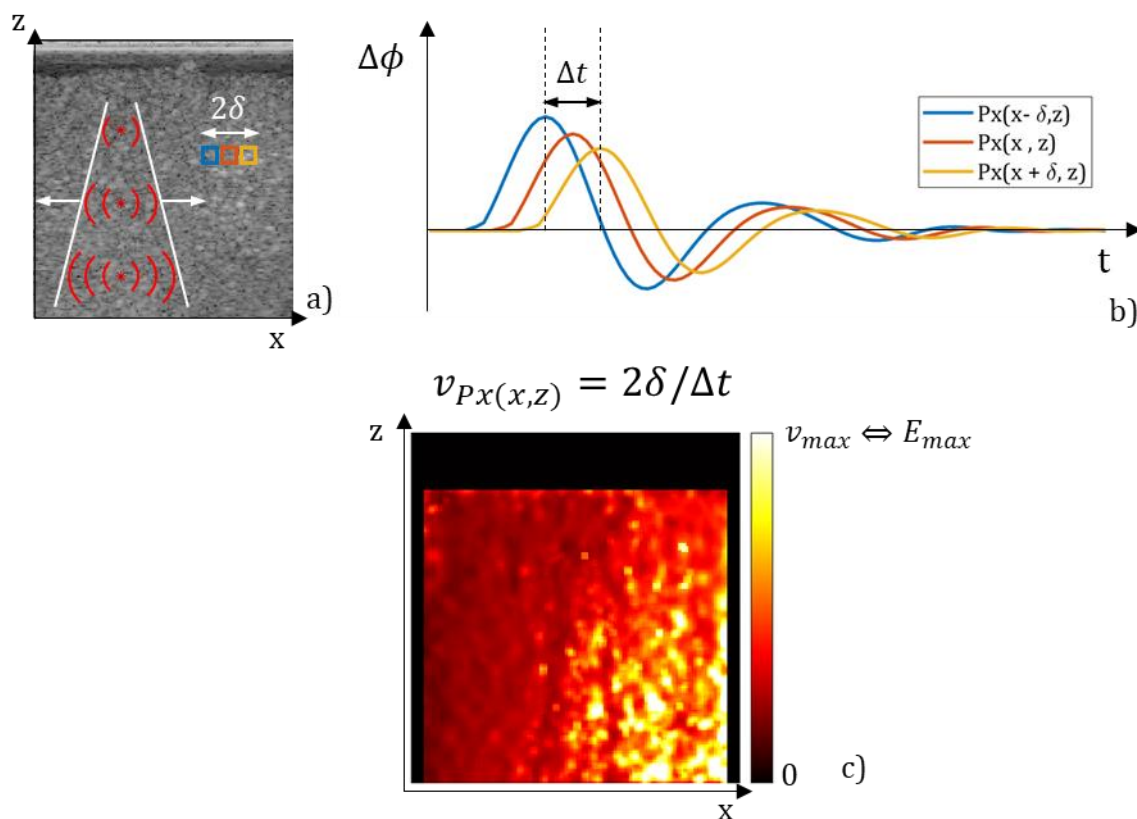


Figure 19 : a) Pour chaque pixel d'intérêt (en orange), deux pixels distants de δ en latéral sont choisis de part et d'autre (généralement δ vaut un pixel). b) On peut estimer le temps mis par l'onde de cisaillement pour passer du premier pixel amont (bleu) au pixel aval (jaune) en faisant une corrélation croisée des déphasages dans le temps. c) Cela permet de déduire la vitesse de l'onde dans le pixel. En le faisant pour chaque pixel on peut reconstituer une carte de rigidité et percevoir des contrastes invisibles au mode B : ici, la partie droite du milieu est plus rigide que la partie gauche. La partie supérieure de l'image, correspondant à la couche d'eau entre le fantôme et la sonde, est masquée puisqu'aucune onde de cisaillement ne peut s'y propager.

3.3.3 Doppler de puissance ultrarapide

Le Doppler de puissance est une technique d'imagerie ultrasonore qui permet de mesurer les flux sanguins. Son utilisation clinique couplée au mode B est très fréquente pour une grande diversité de pathologies telles que les thromboses veineuses, les sténoses et moins systématiquement pour l'évaluation de la vascularisation de certains organes (foie, rein...) ou de tumeurs (Martinoli et al. 1998). Le Doppler de puissance permet également de mesurer l'activité cérébrale grâce au couplage neuro-vasculaire, c'est-à-dire l'augmentation locale du volume sanguin liée à une augmentation d'activité neuronale (Macé et al. 2011). L'utilisation des ultrasons « ultrarapides » pour le Doppler de puissance a permis d'augmenter sa sensibilité et sa cadence d'imagerie, rendant possible le suivi de phénomènes rapides y compris dans de petits capillaires (Bercoff et al. 2011).

3.3.3.1 Principes physiques

L'effet Doppler (ou Doppler-Fizeau) est connu depuis le milieu du 19^{ème} siècle. Il peut s'énoncer comme suit : soient une onde de fréquence f_1 émise dans un repère R_1 et un observateur se trouvant dans un repère R_2 ayant une vitesse v non nulle par rapport au repère R_1 , alors la fréquence de l'onde perçue par l'observateur f_2 sera différente de la fréquence d'émission dans le repère R_1 , telle que :

$$f_2 = \frac{f_1}{1 - \frac{v}{c}} \quad (1.6)$$

Où c est la vitesse de l'onde dans le milieu et $v > 0$ quand les deux repères se rapprochent.

Dans le cas de l'échographie, si un diffuseur est en mouvement lorsque l'onde ultrasonore vient à son contact, il renverra une onde avec en première approximation une modification de fréquence proportionnelle à la vitesse du diffuseur. Il est alors possible de mesurer la vitesse des diffuseurs, qu'ils proviennent de tissus ou de cellules présentes dans le sang. Le signal renvoyé par les tissus étant beaucoup plus important que celui renvoyé par les cellules sanguines, il est nécessaire de le filtrer pour accéder aux informations du flux sanguin. Le paragraphe suivant détaille une méthode pour réaliser un tel filtre.

3.3.3.2 Le Doppler de puissance ultrarapide en pratique

Le Doppler de puissance ultrarapide, désigné simplement comme « Doppler ultrarapide » dans la suite de cette thèse, a été pour la première fois utilisé en 2011 (Bercoff et al. 2011). En pratique, ce n'est pas la fréquence qui est directement calculée mais le décalage temporel du signal reçu par les transducteurs lorsqu'un réflecteur s'éloigne ou se rapproche de ces derniers. De la même façon que pour l'élastographie par onde de cisaillement, un mouvement de quelques microns d'un réflecteur suffit à introduire un décalage de phase mesurable de l'onde réfléchie (Figure 17). Ce décalage de phase se retrouve dans la valeur du pixel du mode B complexe dans lequel le mouvement a eu lieu.

Afin de mesurer ce déplacement, on réalise quelques centaines d'images n_t à cadence ultrarapide (>1 kHz) en mode B (de dimension n_x, n_z) formées comme expliqué dans la section 3.3.1. Ces images sont alors réorganisées en matrice de Casorati (S) de dimension $(n_z \times n_x, n_t)$ sur laquelle on applique un filtre de décomposition en valeurs singulières (*singular value decomposition* – SVD) pour séparer la matrice en différents modes :

$$S = U\Delta V^* \quad (1.7)$$

Où Δ est une matrice diagonale de dimension (n_t, n_t) – sous l'hypothèse $n_t < n_z \times n_x$ toujours vérifiée en pratique – dans laquelle chaque facteur de la diagonale λ_i correspond au poids du mode i . U est une matrice de dimension $(n_z \times n_x, n_t)$ dans laquelle chaque colonne i décrit la position spatiale du mode i . Enfin V est une matrice de dimension (n_t, n_t) dans laquelle chaque ligne i décrit l'évolution temporelle du mode i . $*$ est la transposée conjuguée. Puisque $n_t < n_z \times n_x$, on obtient grâce à cette décomposition n_t modes que l'on classe par valeurs singulières λ_i décroissantes (Figure 20).

Afin de faire apparaître le déplacement des flux, il faut ensuite supprimer le signal provenant des tissus. Les nombreux pixels des tissus ont des mouvements semblables dans le temps ce qui leur donne une grande cohérence spatio-temporelle. Les valeurs singulières qui leur sont associées sont donc élevées. En pratique, pour reconstituer le Doppler ultrarapide, on calcule la matrice $S^f = U\Delta^f V^*$ où les k premières valeurs propres de Δ ont été tronquées. La détermination de la valeur de k n'est pas triviale et se fait souvent manuellement. Enfin, le Doppler ultrarapide est reconstitué en sommant le carré du module de chacune des images ainsi formées (Figure 21).

3.3.4 Microscopie par localisation ultrasonore (ULM)

Comme expliqué dans la section 3.1.3, les images en mode B sont reconstruites avec une taille de pixel de l'ordre de la longueur d'onde. Le Doppler ultrarapide, reconstruit à partir de ces images a donc un échantillonnage identique. Dans la pratique clinique, pour les organes profonds, la longueur d'onde est comprise entre 0,5 et 1 mm. Pour les organes superficiels, la longueur d'onde est comprise entre 0,1 et 0,5 mm. La microscopie par localisation ultrasonore (*ultrasound microscopy localization* – ULM) s'affranchit de cette limite pour l'étude de flux sanguins avec une résolution jusqu'à 15 μm (Errico et al. 2015). Cette méthode permet d'étudier la circulation des flux jusqu'aux capillaires. Bien que la technique soit récente, de nombreuses applications sont actuellement étudiées en préclinique et en clinique, telles que le diagnostic d'accidents vasculaires cérébraux (Demené et al. 2021 ; Hingot et al. 2020), de maladies cardiaques (Demeulenaere et al.

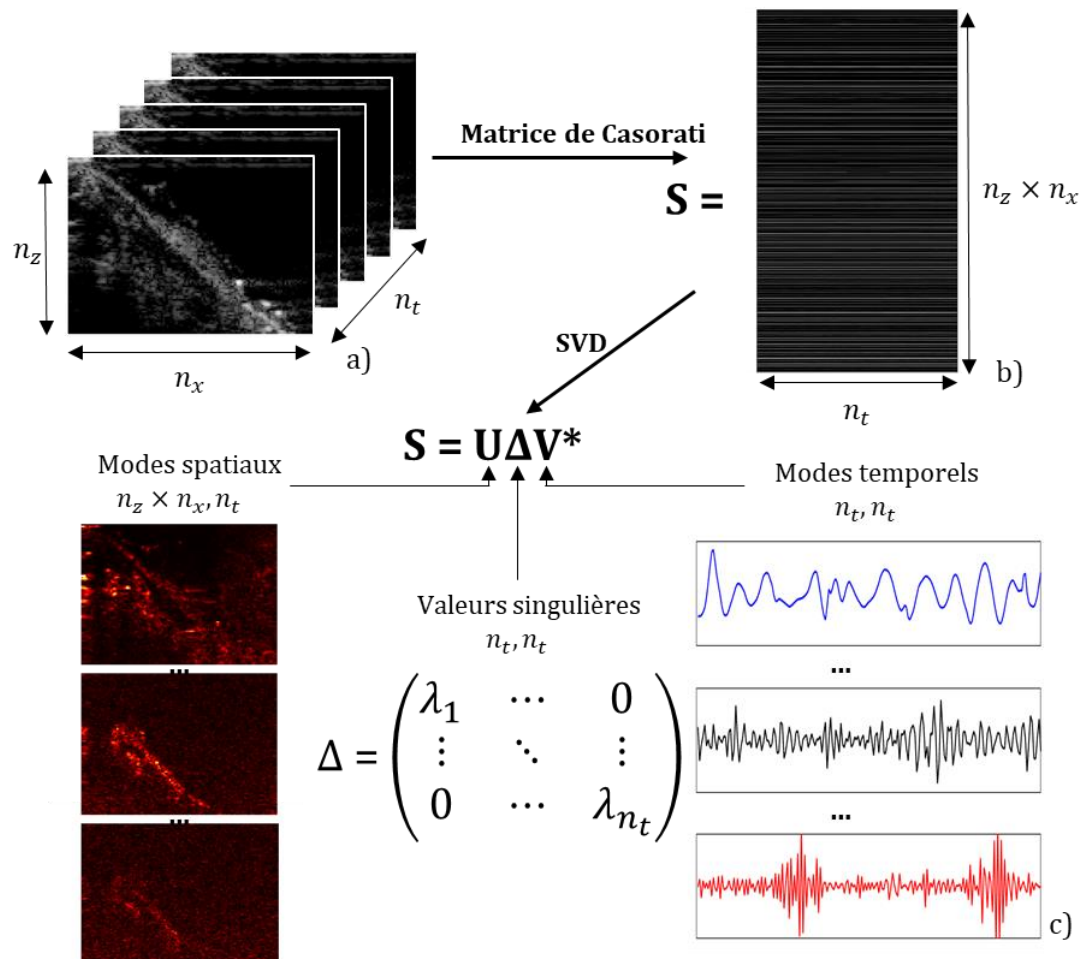


Figure 20 : Étapes pour réaliser la décomposition en valeurs singulières (SVD) d'une acquisition. a) On réalise n_t acquisitions. b) Les acquisitions sont réorganisées en matrice de Casorati. c) On décompose la matrice de Casorati grâce à la SVD en une matrice U contenant les modes spatiaux, une matrice V contenant les modes temporels et une matrice diagonale Δ contenant les valeurs singulières, c'est-à-dire les poids, associés à chaque mode.

Suppression des modes correspondants aux tissus $\Delta \rightarrow \Delta^f =$

$$\begin{pmatrix} 0 & \dots & \dots & \dots & \dots & 0 \\ \vdots & \ddots & & & & \vdots \\ \vdots & & 0 & & & \vdots \\ \vdots & & & \lambda_{k+1} & & \vdots \\ \vdots & 0 & & & \ddots & 0 \\ 0 & \dots & \dots & \dots & 0 & \lambda_{n_t} \end{pmatrix}$$

$$S^f = U\Delta^fV^*$$

$$Dop(z, x) = \sum_{t=1}^{n_t} |S^f(z, x, t)|^2$$

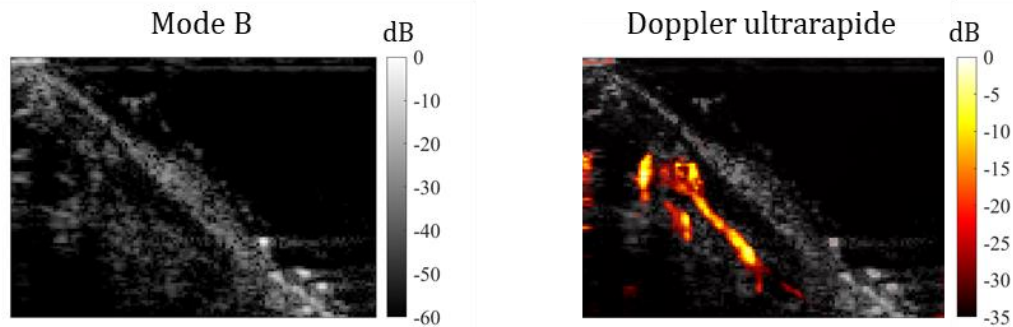


Figure 21 : Le Doppler ultrarapide se reconstitue en supprimant les k premiers modes correspondant aux tissus trouvés lors de la SVD. Il permet de visualiser la présence de flux sanguins invisibles au mode B.

2022) et l'étude de la vascularisation des tumeurs (Lin et al. 2017 ; Lowerison et al. 2020 ; Opacic et al. 2018).

3.3.4.1 Principes théoriques

L'ULM s'inspire de la microscopie par localisation optique qui a valu à trois de ses inventeurs, Eric Betzig, Stefan Hell et William E. Moerner le prix Nobel de Chimie en 2014 (Möckl et al. 2014). Que ce soit en optique ou en acoustique, un point source est perçu avec un certain étalement qui dépend de la longueur d'onde : c'est la fonction d'étalement du point (*point spread function* – PSF). La taille de cet étalement limite la résolution de l'image puisque chaque point apparaît comme une tache. En connaissant la forme de la PSF, il est néanmoins possible de retrouver la position théorique du point source qui l'a produite. En pratique, cela peut être difficile à réaliser puisqu'un grand nombre de points sources peuvent se trouver à une distance inférieure à la taille de la PSF. Il est alors impossible de les différencier. Il faut donc trouver un moyen de les faire émettre de façon différée pour pouvoir identifier le signal d'un point unique.

En optique, cette méthode a été implémentée en faisant clignoter des sources fluorescentes. À chaque acquisition, les points sources émetteurs sont alors suffisamment éloignés pour que leurs PSF ne soient pas superposées. De nombreuses acquisitions successives sont réalisées permettant d'enregistrer les PSF de tous les points fluorescents qui clignent les uns après les autres et donc d'identifier leur position précise. Ainsi il est

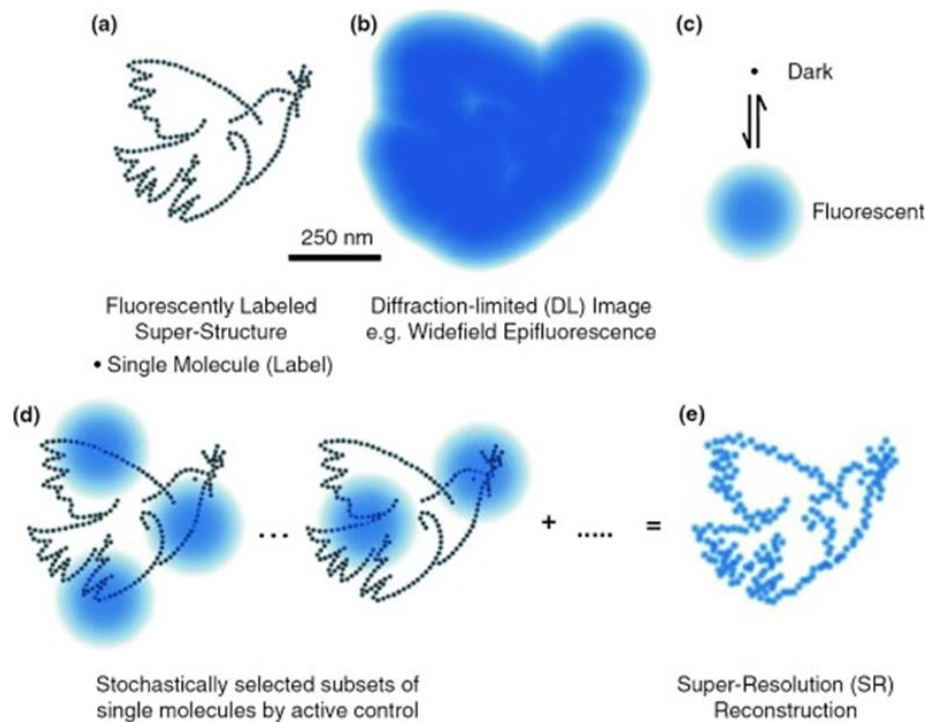


Figure 22 : Schéma du fonctionnement de la microscopie par localisation présenté pour l'optique. a) Des points sources constituent une image (ici La Paloma de la Paz, P. Picasso, 1961). b) La distance entre deux points est inférieure à la limite de diffraction rendant le dessin invisible avec une méthode d'imagerie conventionnelle. c-d) En faisant émettre chaque point de façon asynchrone (par fluorescence pour l'optique), il est possible de trouver la position individuelle de chaque point source. e) La somme dans le temps de l'ensemble des positions des points sources permet de reconstituer une image super résolue (au sens où sa résolution dépasse la limite de diffraction). Ce schéma a été reproduit de (Möckl et al. 2014) avec la permission de Springer Nature.

possible de reconstituer une image dont la résolution n'est plus limitée que par la précision de la localisation du point source (Figure 22).

En acoustique, ce sont des microbulles de quelques micromètres de diamètre qui jouent le rôle des points sources. Ces bulles sont très échogènes : elles apparaissent comme des points brillants à l'image. Si la concentration de ces bulles dans le système sanguin est suffisamment faible pour pouvoir retrouver leur PSF individuelle, il est possible de déterminer leur position avec une précision d'environ 15 μm . De plus, contrairement à l'optique, les points sources sont en mouvement. Ils peuvent donc être suivis sur plusieurs images ce qui permet d'estimer leur vitesse. Bien que la démonstration ne soit pas établie à ce jour, il est généralement considéré que la vitesse des bulles permet de remonter à la vitesse lagrangienne des flux sanguins.

Le principal désavantage de cette méthode est son temps d'acquisition. Pour pouvoir reconstruire la vascularisation complète, il faut avoir repéré et suivi une bulle en chaque point de l'arbre vasculaire. Or, plus le vaisseau est petit et plus la probabilité d'y observer une bulle est faible. Par conséquent, il est nécessaire de réaliser des images sur plusieurs

minutes voire dizaines de minutes afin de reconstituer la vascularisation la plus fine. Le temps de calcul est important et nécessite le traitement de dizaines de milliers d'images.

3.3.4.2 Acquisition des images

Les microbulles sont introduites dans la circulation sanguine par injection intraveineuse. L'injection peut être rapide et précéder la séquence d'acquisition (bolus) ou bien, grâce à la pose d'un cathéter, être lente et continue. La première solution est la plus simple à mettre en place mais les bulles disparaissent au bout de quelques minutes ce qui empêche la réalisation de longues acquisitions.

L'acquisition est répartie en blocs de quelques centaines d'images en mode B (Figure 23a) à une cadence ultrarapide. Cela permet de suivre les bulles dans leur mouvement. La durée du bloc dépend du phénomène que l'utilisateur souhaite observer : il est par exemple possible d'imager seulement une partie du cycle cardiaque ou du cycle respiratoire.

3.3.4.3 Filtrage

La première étape de l'ULM consiste à améliorer la visualisation des bulles. En effet, le signal de ces dernières est partiellement masqué par le signal du tissu. Pour cela, une méthode efficace consiste à réaliser une décomposition en éléments singuliers, de la même manière que pour le Doppler (section 3.3.3.2 et Figure 23b). Les bulles ayant une forte cohérence entre elles, le seuil à appliquer sur la SVD est souvent plus faible que pour un Doppler classique. Ce filtrage se fait sur chacun des blocs indépendamment.

3.3.4.4 Localisation et suivi des bulles

La seconde étape consiste à identifier les bulles. Dans le cas de l'ULM 2D, chaque bulle apparaît comme une tache sur chaque image et se déplace dans le temps. Si nous reconstruisons un volume (Z,X,T) où (Z,X) correspondent aux deux dimensions spatiales et T à la dimension temporelle (toutes les images d'un bloc), les bulles forment alors des structures géométriquement proches de vaisseaux sanguins. Pour isoler les bulles du bruit, il est alors possible d'utiliser un filtre conçu pour détecter la vascularisation (Jerman et al. 2016) dont l'implémentation en 3D est disponible sur Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, États-Unis). Une corrélation point par point avec

la PSF type attendue pour les microbulles peut ensuite être réalisée. Cette méthode permet avec une très grande précision de calculer la position des bulles dans l'espace grâce à l'interpolation des maximums locaux de cette carte de corrélation.

Un algorithme de suivi de particules (Jean-Yves Tinevez 2019) permet de regrouper les positions successives d'une même bulle. On appelle « trace » d'une bulle le chemin parcouru entre chacune des positions ainsi identifiées.

3.3.4.5 Reconstruction

Comme les bulles ne se déplacent que dans les vaisseaux, leur trace y est également confinée. L'addition d'un grand nombre de traces permet de reconstruire avec fidélité la forme de l'arbre vasculaire.

En pratique, la carte de la vascularisation est générée en comptant le nombre de traces passant dans des pixels d'environ $10\ \mu\text{m}$ (limite de la résolution). Les vaisseaux dans lesquels de nombreuses bulles passent apparaissent donc avec de plus grandes valeurs.

Chaque trace laissée par une bulle permet également de remonter à la vitesse locale du flux dans le plan d'imagerie. Il est donc possible d'attribuer une vitesse lagrangienne à chaque pixel égale à la moyenne de la vitesse des bulles les traversant (Figure 23 c).

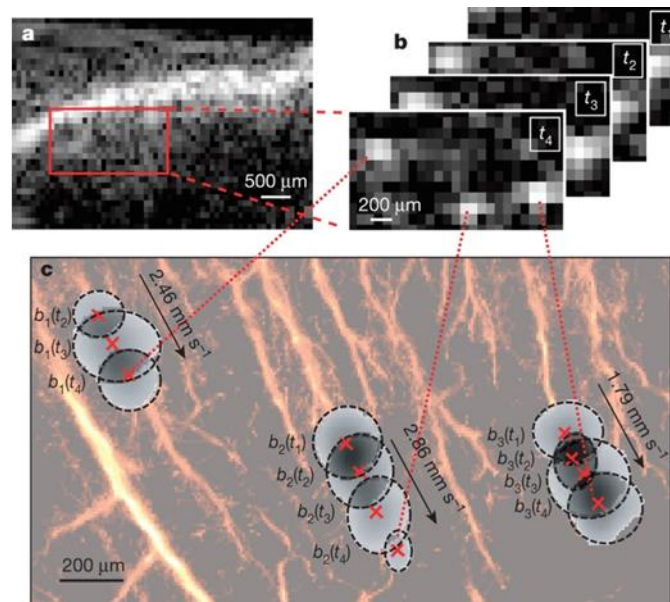


Figure 23 : Schéma de principe de l'ULM reproduit avec la permission de Springer Nature Customer Service Centre GmbH (Errico et al. 2015). a) Image en mode B. b) Agrandissement de l'image en mode B pour quatre temps différents avec un filtrage spatial faisant apparaître les bulles. c) La position centrale (croix rouges) de chaque bulle est estimée en déconvoluant l'écho de chaque bulle avec la PSF. Le suivi de milliers de bulles permet de reconstruire la carte de la vascularisation (en arrière-plan). La vitesse locale de chaque bulle est également mesurée.

3.3.5 Imagerie du tenseur de rétrodiffusion (BTI)

L'imagerie du tenseur de rétrodiffusion (*backscatter tensor imaging – BTI*) est une modalité ultrasonore permettant de mesurer l'orientation locale d'un milieu. Cette technique a été proposée au début des années 1990 (Mallart and Fink 1991) puis mise en place sur des tissus en 1D (Papadacci et al. 2014) et en 3D (Papadacci et al. 2017) notamment pour mesurer l'orientation des fibres du myocarde. Le BTI repose sur les changements de cohérence spatiale de l'onde rétrodiffusée. Plus un milieu est organisé et plus la cohérence de l'onde réfléchi est importante. Mesurer la cohérence spatiale de l'onde reçue permet donc d'obtenir une information sur l'organisation locale d'un milieu.

D'autres modes utilisent la cohérence spatiale pour caractériser les tissus vivants comme par exemple la cohérence spatiale sur faible intervalle¹ (*short-lag spatial coherence – SLSC*) testée sur des masses tumorales (Wiacek et al. 2020). Néanmoins, n'ayant pas fait l'objet d'une implémentation pendant cette thèse, ils ne seront pas présentés plus en détail. Le lecteur intéressé pourra se reporter à l'analyse de la littérature très complète de Long et al., 2022.

3.3.5.1 Cohérence spatiale

La cohérence spatiale est une fonction qui caractérise le degré de similitude d'une onde $\Psi(M, t)$ en deux points de l'espace. Si, aux points M_1 et M_2 , les fonctions $\Psi(M_1, t)$ et $\Psi(M_2, t)$ varient dans le temps de façon similaire, alors la cohérence entre ces deux points sera élevée. Mathématiquement, la cohérence spatiale d'une onde entre deux points est donc simplement la corrélation de l'onde enregistrée aux deux points. En considérant l'onde comme un processus aléatoire, la cohérence spatiale R peut s'écrire :

$$R(M_1, M_2) = \langle \Psi(M_1), \Psi^*(M_2) \rangle \quad (1.8)$$

Où $\langle . \rangle$ est la moyenne d'ensemble et $*$ est le complexe conjugué. Sous les hypothèses que (i) les diffuseurs du milieu se comportent comme des diffuseurs de Rayleigh, (ii) que l'expérience se déroule dans les conditions de l'approximation de Fresnel et (iii) que $M_1 = (x_1, 0)$ et $M_2 = (x_2, 0)$ – c'est-à-dire que les points de mesure se situent sur la surface de la sonde ultrasonore, ce qui est toujours le cas – on peut alors montrer que (Long et al., 2022) :

¹ Traduction en français proposée dans le cadre de cette thèse

$$R(M_1, M_2, z) = \frac{\chi(f)}{z^4} R_{\tilde{O}}(x_1 - x_2) \quad (1.9)$$

Où $R(M_1, M_2, z)$ est la cohérence spatiale entre les points M_1 et M_2 provenant du signal rétrodiffusé depuis la profondeur z , χ est la fonction de diffusion des diffuseurs à la fréquence f , x_1 et x_2 sont les positions latérales des points M_1 et M_2 et $R_{\tilde{O}}$ est la fonction d'autocorrélation de la fonction $\tilde{O}(M) = O(M)e^{j\pi f x^2/zc}$ avec O la fonction d'ouverture de la sonde, c la célérité de l'onde dans le milieu et M de coordonnées (x, z) .

Ce résultat montre que la fonction de cohérence ne dépend que de la distance latérale $(x_1 - x_2)$ entre les points de mesure et non de leur position absolue. De plus, dans le cas d'une sonde linéaire, la fonction d'ouverture est une fonction rectangle donc son autocorrélation $R_{\tilde{O}}$ est une fonction triangle. Par conséquent, d'après (1.9), la cohérence est proportionnelle à une fonction triangle.

3.3.5.2 Théorème de Van Cittert-Zernike

Le théorème de Van Cittert-Zernike provient de l'optique. Il stipule que la cohérence spatiale dans le champ lointain est donnée par la transformée de Fourier de la distribution de l'intensité de la source. En pratique, il est utilisé pour retrouver la forme de la source à partir de la mesure de la cohérence spatiale dans le plan de l'observateur. En 1991, le théorème est adapté pour l'échographie (Mallart and Fink 1991) comme suit. Dans un milieu constitué de réflecteurs répartis de façon aléatoire, la tache focale peut être vue comme une source virtuelle incohérente. La cohérence spatiale observée au niveau des transducteurs est donc la transformée de Fourier de la distribution d'intensité à la tache focale. Plus spécifiquement, dans le cas d'une sonde linéaire émettant une onde focalisée, l'intensité de la tache focale est un sinus cardinal au carré. La cohérence spatiale de l'onde émise par cette source virtuelle est, d'après le théorème de Van Cittert-Zernike, sa transformée de Fourier : une fonction triangulaire (Figure 24). On retrouve le résultat énoncé dans la section précédente.

De plus, il a été montré expérimentalement que dans le cas d'une distribution non aléatoire des diffuseurs, la cohérence de l'onde rétrodiffusée était plus importante que dans le cas d'une distribution aléatoire (Derode and Fink 1993). Ainsi, plus les diffuseurs sont ordonnés, plus la cohérence sera élevée. À l'inverse, la présence d'aberrations, par exemple à cause d'une mauvaise hypothèse sur la vitesse du son dans le milieu, abaissera le niveau de cohérence (Figure 25).

3.3.5.3 Implémentation de l'imagerie du tenseur de rétrodiffusion

Le BTI vise à reconstruire l'orientation locale du milieu. Pour cela, il évalue la cohérence spatiale de l'onde rétrodiffusée dans différentes directions. Si le milieu est isotrope alors les diffuseurs sont organisés de la même façon dans toutes les directions et la cohérence spatiale de l'onde est identique dans toutes les directions. En revanche, si le milieu est anisotrope, les diffuseurs sont organisés dans une direction particulière. La valeur de la cohérence spatiale selon cette direction sera plus importante. Ce principe permet de retrouver l'orientation de diffuseurs y compris à une échelle inférieure à la longueur d'onde.

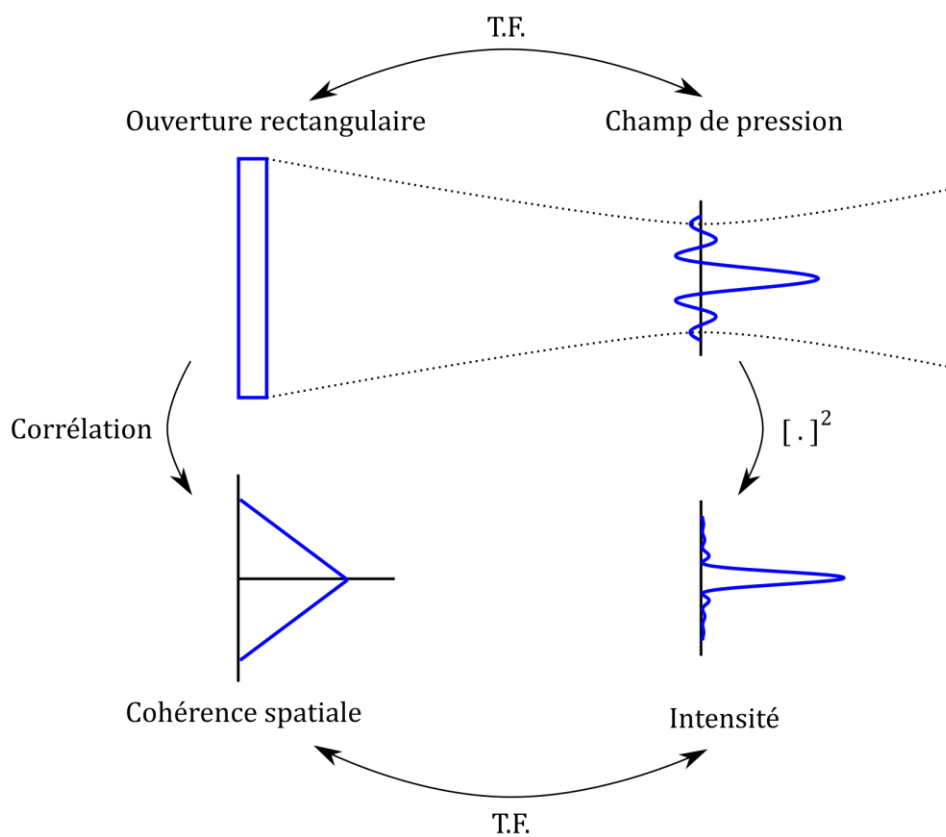


Figure 24 : Dans le cas d'une sonde linéaire, l'ouverture est rectangulaire, menant à un champ de pression en forme de sinus cardinal (par transformée de Fourier - T.F.). L'intensité est obtenue en mettant au carré le champ de pression. La cohérence spatiale est la T.F. de l'intensité ou l'autocorrélation de la fonction d'ouverture : ici une fonction triangulaire. Figure adaptée de Long et al, 2022 avec la permission de l'éditeur Elsevier.

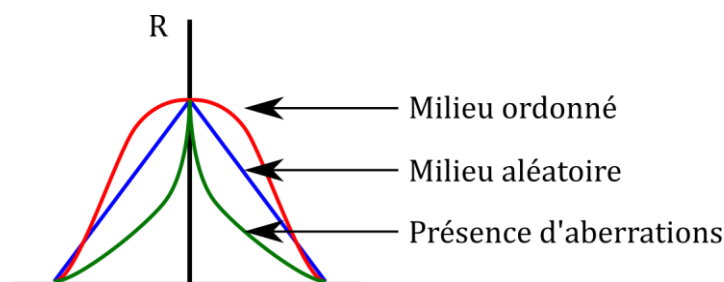


Figure 25 : Schéma de la cohérence spatiale R théorique dans le cas d'un milieu homogène ordonné (rouge), d'un milieu homogène aléatoire (bleu) et lorsque que des aberrations sont présentes (vert)

La phase d'acquisition du BTI consiste à focaliser l'onde en chaque point d'intérêt M et à enregistrer les signaux RF reçus en retour par la sonde positionnée dans différentes orientations par rapport au milieu (Figure 26).

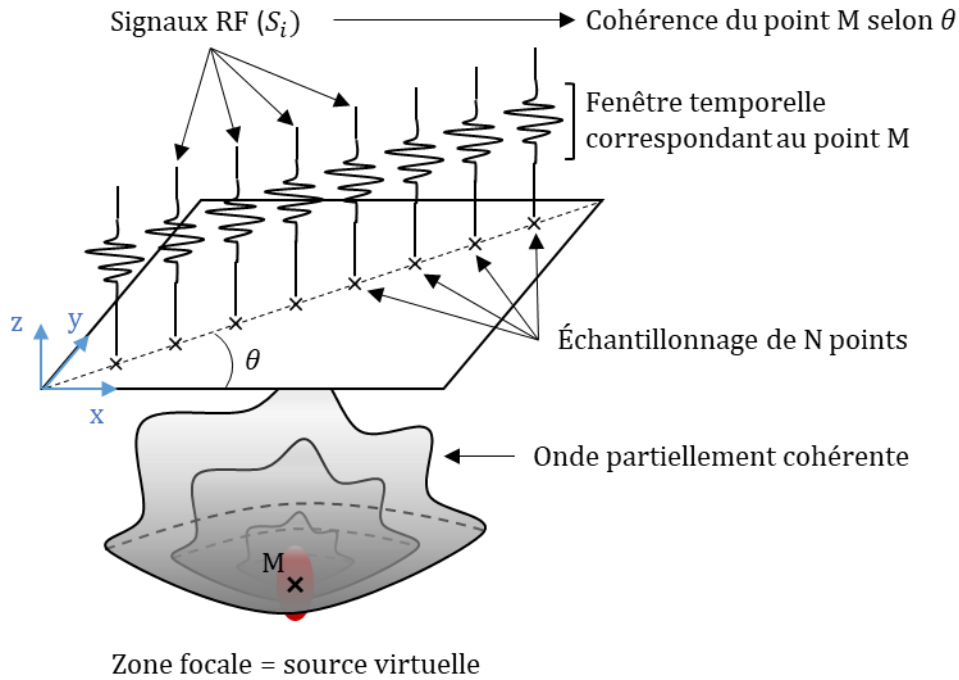


Figure 26 : Schéma de l'acquisition des signaux permettant le calcul du facteur de cohérence selon l'orientation θ . La ligne en pointillés correspond à l'axe sur lequel la sonde ultrasonore est positionnée. L'échantillonnage (croix noires) se fait sur chacun des transducteurs de la sonde.

La phase de traitement correspond au calcul de la corrélation des signaux RF obtenus le long d'une ligne dans le plan XY afin de calculer la cohérence de l'onde dans la direction de cette ligne. En pratique, ce n'est pas la fonction de cohérence qui est mesurée mais le facteur de cohérence (Papadacci et al. 2014) d'un point M selon l'orientation θ de la sonde. Le facteur de cohérence est défini comme l'énergie cohérente de l'onde reçue divisée par l'énergie incohérente :

$$C_{\theta}(M) = \frac{\sum_{T_1^M}^{T_2^M} \left| \sum_{i=1}^N S_i(t) \right|^2}{N \sum_{i=1}^N \sum_{T_1^M}^{T_2^M} |S_i(t)|^2} \quad (I.10)$$

Où $[T_1^M, T_2^M]$ est la fenêtre temporelle centrée sur le temps nécessaire à l'onde ultrasonore pour réaliser un aller-retour entre les transducteurs et le point M . Elle est généralement égale à quelques périodes afin de moyennner suffisamment le signal. S_i est le signal reçu sur le transducteur i provenant du point M .

On effectue la mesure de la cohérence spatiale selon différentes orientations θ de la sonde par rapport au milieu pour un point M donné. Ces mesures forment une ellipse sur

un diagramme polaire. Plus le milieu est isotrope et plus l'ellipse se rapprochera d'un cercle. Un milieu très anisotrope formera une ellipse très fine orientée dans la même direction que les diffuseurs du milieu. En approximant le diagramme obtenu à une ellipse il est possible de calculer les trois paramètres principaux du BTI :

- l'orientation donnée par l'angle du grand axe ;
- la cohérence C_0 donnée par la valeur du demi grand-axe ;
- l'anisotropie fractionnelle $AF = \sqrt{2} \sqrt{(C_{//} - \bar{C})^2 + (C_{\perp} - \bar{C})^2} / \sqrt{C_{//}^2 + C_{\perp}^2}$.

Où $C_{//}$ est la valeur du demi grand-axe de l'ellipse, C_{\perp} la valeur du demi petit-axe et \bar{C} la valeur moyenne de la cohérence sur toutes les orientations mesurées (Figure 27).

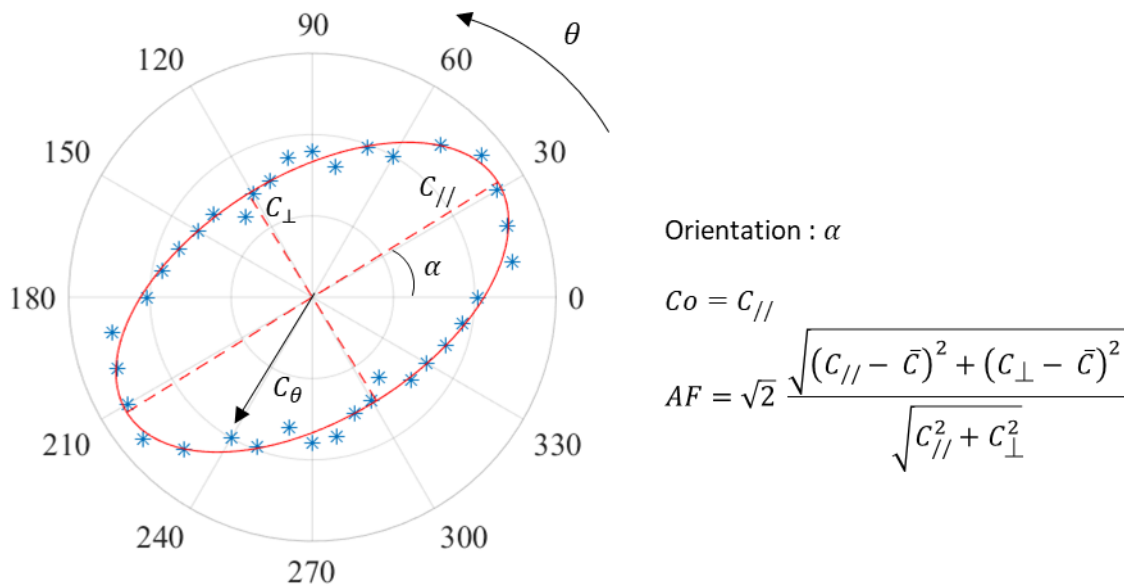


Figure 27 : Mesures quantitatives obtenues par BTI. Les facteurs de cohérence obtenus à différents angles θ sont approximés à une ellipse (ligne rouge). On considère que le milieu est orienté selon l'angle de l'ellipse α . La cohérence globale C_0 est prise égale au maximum de cohérence, soit le demi grand-axe de l'ellipse. Le niveau d'anisotropie AF est estimé en comparant la valeur des grand et petit axes à la valeur moyenne de cohérence.

3.3.5.4 Limites et perspectives

En théorie, il est possible de reconstituer une ellipsoïde de cohérence en 3D et pas simplement une ellipse de cohérence en 2D (Figure 27). Cela permettrait de trouver les trois composantes spatiales de l'orientation du milieu mais impliquerait de faire des mesures dans plusieurs plans et pas seulement dans XY (Figure 26) en orientant une sonde linéaire ou matricielle dans différentes directions de l'espace. En pratique, cela est très difficile à réaliser *in vivo* puisque l'imagerie d'un organe donné ne peut se faire que d'un nombre limité de points de vue (pour éviter les obstacles comme les os et ne pas être

trop loin). C'est pourquoi le BTI est reconstruit à partir d'une ellipse de cohérence réalisée dans un seul plan XY. Par conséquent, l'orientation mesurée des diffuseurs correspond à une projection dans ce plan. À l'inverse, les techniques comme l'imagerie du tenseur de diffusion en résonance magnétique permettent d'obtenir l'orientation du milieu en trois dimensions mais demeurent chères et peu disponibles. Il a néanmoins été montré que la technique du BTI pouvait permettre de mesurer la troisième composante de l'orientation dans le cas de petits angles azimutaux (Turquin 2019).

Le BTI est dit « 1D » ou « 3D » selon la zone sur laquelle il reconstruit l'information [orientation – Co – AF]. Les travaux précédemment publiés utilisaient une sonde linéaire pour le BTI 1D et une sonde matricielle pour le BTI 3D.

4 CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

Nous avons d'abord vu dans cette première partie que le cancer du sein était un enjeu de santé mondiale. Nous avons présenté les différentes formes de la maladie et rappelé l'importance d'un dépistage précoce pour une meilleure prise en charge des malades. Nous avons également décrit les principaux remodelages tissulaires lors de la croissance tumorale. En particulier, la matrice extracellulaire constituée de fibres de collagène se densifie et se réoriente. Pour assurer la captation des éléments essentiels à son développement, la tumeur génère de nouveaux vaisseaux sanguins dans et autour de la tumeur (angiogenèse). Ces modifications sont autant de marqueurs intéressants pour l'imagerie médicale.

L'échographie est déjà couramment utilisée en complément des mammographies (rayons X) pour le diagnostic du cancer du sein. Le mode B permet d'identifier les masses suspectes et les radiologues utilisent l'échelle BI-RADS pour estimer le risque que les tumeurs identifiées soient cancéreuses. En cas de doute, une biopsie est réalisée pour poser le diagnostic définitif. Dans la plupart des cas, il revient négatif. Il existe donc un véritable besoin de mieux identifier les biomarqueurs présents pour éviter les biopsies inutiles. Le développement de nouvelles techniques échographiques associé à la diffusion de l'échographie 3D pourrait permettre la détection de nouveaux indicateurs.

L'élastographie par onde de cisaillement (SWE) a montré son efficacité pour améliorer le diagnostic des tumeurs du sein. Cette méthode permet de capter la densification de la

matrice extracellulaire caractéristique des tumeurs malignes. Elle permet de repérer certains cas bénins comme les kystes (poches de liquide) qui sont mous. Cette méthode, largement étudiée en 2D, pourrait permettre de trouver de nouveaux biomarqueurs en s'intéressant à l'entièreté du volume tumoral.

L'imagerie Doppler ultrarapide détecte les flux des vaisseaux sanguins. Bien que régulièrement utilisée pour l'étude de la croissance tumorale, elle n'est à ce jour que très peu appliquée dans la pratique clinique par manque de biomarqueurs simples et fiables. L'imagerie Doppler 2D permet d'estimer la quantité de vaisseaux mais ne suffit pas à révéler l'architecture complexe tridimensionnelle qu'ils forment.

La microscopie par localisation ultrasonore (ULM) reconstruit la vascularisation sanguine avec une résolution de l'ordre de 10 μm . Cette récente technique permet de détecter les vaisseaux les plus fins issus de l'angiogenèse tumorale mais nécessite l'injection d'un agent de contraste et plusieurs minutes d'acquisition.

Enfin, l'imagerie du tenseur de rétrodiffusion (BTI) pourrait permettre de retrouver l'orientation des fibres de collagène de la matrice extracellulaire et ainsi mieux diagnostiquer les stades et les comportements des cancers.

L'échographie regroupe une grande variété de techniques qui gagnent à être combinées pour améliorer le diagnostic des radiologues. L'échelle BI-RADS est d'ailleurs régulièrement mise à jour pour intégrer de nouveaux paramètres afin de mieux classer les tumeurs suspectées d'être des cancers.

Ce manuscrit présente un travail de recherche sur de nouveaux biomarqueurs échographiques pour l'amélioration du diagnostic du cancer du sein. Pour cela, dans une première partie, nous exposerons une nouvelle méthode permettant de réaliser un BTI 3D efficacement à l'aide d'une sonde linéaire. Ensuite, nous présenterons un nouveau fantôme permettant de valider notre protocole d'acquisition échographique 3D couplant SWE, BTI, Doppler et mode B. Nous montrerons alors la faisabilité et l'intérêt de cette méthode d'imagerie dans une étude *ex vivo* (sans imagerie de flux) sur des tumeurs du sein de patients inclus dans un protocole clinique à l'Institut Curie. Enfin, nous terminerons par une étude préclinique montrant la faisabilité du protocole multiparamétrique complet pour l'imagerie longitudinale de tumeurs *in vivo* sur un modèle murin.

5 RÉFÉRENCES DU CHAPITRE

- Bercoff J. L'imagerie échographique ultrarapide et son application à l'étude de la viscoélasticité du corps humain [phdthesis]. ESPCI ParisTECH, 2004 [cited 2020 Apr 3]. Available from: <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00001041>
- Bercoff J, Montaldo G, Loupas T, Savery D, Mézière F, Fink M, Tanter M. Ultrafast compound doppler imaging: providing full blood flow characterization. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* 2011;58:134–147.
- Bercoff J, Tanter M, Fink M. Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* 2004;51:396–409.
- Berg WA, Cosgrove DO, Doré CJ, Schäfer FKW, Svensson WE, Hooley RJ, Ohlinger R, Mendelson EB, Balu-Maestro C, Locatelli M, et al. Shear-wave Elastography Improves the Specificity of Breast US: The BE1 Multinational Study of 939 Masses. *Radiology Radiological Society of North America*, 2012;262:435–449.
- Bourgot I, Primac I, Louis T, Noël A, Maquoi E. Reciprocal Interplay Between Fibrillar Collagens and Collagen-Binding Integrins: Implications in Cancer Progression and Metastasis. *Frontiers in Oncology* 2020 [cited 2022 May 31];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.01488>
- Brett EA, Sauter MA, Machens H-G, Duscher D. Tumor-associated collagen signatures: pushing tumor boundaries. *Cancer Metab* 2020;8:14.
- Bruneel C, Torguet R, Rouvaen KM, Bridoux E, Nongaillard B. Ultrafast echotomographic system using optical processing of ultrasonic signals. *Appl Phys Lett American Institute of Physics*, 1977;30:371–373.
- Catheline S, Benech N. Longitudinal shear wave and transverse dilatational wave in solids. *The Journal of the Acoustical Society of America Acoustical Society of America*, 2015;137:EL200–EL205.
- Chilowsky C, Langevin P. Procédés et appareils pour la production de signaux sous-marins dirigés et pour la localisation à distance d'obstacles sous-marins. 1920 [cited 2022 Jan 4]. Available from: <https://patents.google.com/patent/FR502913A/fr>
- Delannoy B, Torguet R, Bruneel C, Bridoux E, Rouvaen JM, Lasota H. Acoustical image reconstruction in parallel-processing analog electronic systems. *Journal of Applied Physics American Institute of Physics*, 1979;50:3153–3159.
- Demené C, Robin J, Dizeux A, Heiles B, Pernot M, Tanter M, Perren F. Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients. *Nat Biomed Eng* 2021;5:219–228.
- Demeulenaere O, Sandoval Z, Mateo P, Dizeux A, Villemain O, Gallet R, Ghaleh B, Deffieux T, Deméné C, Tanter M, et al. Coronary Flow Assessment Using 3-Dimensional Ultrafast Ultrasound Localization Microscopy. *JACC: Cardiovascular Imaging* 2022;15:1193–1208.
- Derode A, Fink M. Spatial coherence of ultrasonic speckle in composites. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* 1993;40:666–675.

- Eaton LW, Maughan WL, Shoukas AA, Weiss JL. Accurate volume determination in the isolated ejecting canine left ventricle by two-dimensional echocardiography. *Circulation* American Heart Association, 1979;60:320–326.
- Errico C, Pierre J, Pezet S, Desailly Y, Lenkei Z, Couture O, Tanter M. Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature* Nature Publishing Group, 2015;527:499–502.
- Gallot T, Catheline S, Roux P, Brum J, Benech N, Negreira C. Passive elastography: shear-wave tomography from physiological-noise correlation in soft tissues. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* 2011;58:1122–1126.
- Geiser EA, Christie Jr. LG, Conetta DA, Conti CR, Gossman GS. A mechanical arm for spatial registration of two-dimensional echocardiographic sections. *Catheterization and Cardiovascular Diagnosis* 1982;8:89–101.
- Giammarinaro B, Zorgani A, Catheline S. Shear-Wave Sources for Soft Tissues in Ultrasound Elastography. *IRBM* 2018;39:236–242.
- Grasland-Mongrain P, Catheline S, Souchon R, Cartellier F, Zorgani A, Montalescot S, Chapelon J-Y, Lafon C. Imaging of shear waves induced by Lorentz force in soft solids. 2013 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS) Prague, Czech Republic: IEEE, 2013. pp. 1158–1161. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6724850/>
- HAS. Dépistage et prévention du cancer du sein. 2015.
- Hingot V, Brodin C, Lebrun F, Heiles B, Chagnot A, Yetim M, Gauberti M, Orset C, Tanter M, Couture O, et al. Early Ultrafast Ultrasound Imaging of Cerebral Perfusion correlates with Ischemic Stroke outcomes and responses to treatment in Mice. *Theranostics* 2020;10:7480–7491.
- Hortobagyi GN, Connolly JL, D’Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, Weaver DL, Winchester DJ, Giuliano A. Breast. In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershengwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR, eds. *AJCC Cancer Staging Manual* Cham: Springer International Publishing, 2017 [cited 2022 May 8]. pp. 589–636. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40618-3_48
- Huang Q, Zeng Z. A Review on Real-Time 3D Ultrasound Imaging Technology. *BioMed Research International Hindawi*, 2017;2017:e6027029.
- Insee. Insee, estimations de population. 2022 [cited 2022 Feb 11]. Available from: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2381476>
- J. Ferlay, M Ervik, F Lam, M Colombet, L Mery, M Piñeros, A Znaor, I Soerjomataram, F Bray. Global Cancer Observatory: Cancer Today. 2020 [cited 2022 Feb 10]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>
- Jean-Yves Tinevez. simpletracker. 2019 [cited 2022 Jul 28]. Available from: <https://fr.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/34040-simpletracker>
- Jerman T, Pernus F, Likar B, Spiclin Z. Enhancement of Vascular Structures in 3D and 2D Angiographic Images. *IEEE Trans Med Imaging* 2016;35:2107–2118.

- Klein H-M, Günther RW, Verlande M, Schneider W, Vorwerk D, Kelch J, Hamm M. 3D-surface reconstruction of intravascular ultrasound images using personal computer hardware and a motorized catheter control. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1992;15:97–101.
- Konofagou E, D'hooge J, Ophir J. Cardiac elastography-a feasibility study. 2000 IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings An International Symposium (Cat No00CH37121) San Juan, Puerto Rico: IEEE, 2000. pp. 1273–1276. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/921555/>
- Krouskop TA, Dougherty, D. R., Vinson, F. S. A pulsed Doppler ultrasonic system for making noninvasive measurements of the mechanical properties of soft tissue. 1987;8
- Lehman CD, Arao RF, Sprague BL, Lee JM, Buist DSM, Kerlikowske K, Henderson LM, Onega T, Tosteson ANA, Rauscher GH, et al. National Performance Benchmarks for Modern Screening Digital Mammography: Update from the Breast Cancer Surveillance Consortium. *Radiology* 2017;283:49–58.
- Lin F, Shelton SE, Espíndola D, Rojas JD, Pinton G, Dayton PA. 3-D Ultrasound Localization Microscopy for Identifying Microvascular Morphology Features of Tumor Angiogenesis at a Resolution Beyond the Diffraction Limit of Conventional Ultrasound. *Theranostics* 2017;7:196–204.
- Long J, Trahey G, Bottenus N. Spatial Coherence in Medical Ultrasound: A Review. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2022;48:975–996.
- Lowerison MR, Huang C, Lucien F, Chen S, Song P. Ultrasound localization microscopy of renal tumor xenografts in chicken embryo is correlated to hypoxia. *Sci Rep Nature Publishing Group*, 2020;10:2478.
- Ma L, Boyd NF. Atypical hyperplasia and breast cancer risk: a critique. *Cancer Causes Control* 1992;3:517–525.
- Macé E, Montaldo G, Cohen I, Baulac M, Fink M, Tanter M. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat Methods Nature Publishing Group*, 2011;8:662–664.
- Mahul B. Amin, Stephen B. Edge, Frederick L. Greene, David R. Byrd, Robert K. Brookland, Mary Kay Washington, Jeffrey E. Gershenwald, Kenneth R. Hess, Carolyn C. Compton, Daniel C. Sullivan, et al., eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 2017 [cited 2022 Jul 30]. Available from: <https://link.springer.com/book/9783319406176>
- Mallart R, Fink M. The van Cittert–Zernike theorem in pulse echo measurements. *The Journal of the Acoustical Society of America* 1991;90:2718–2727.
- Martin RW, Bashein G, Zimmer R, Sutherland J. An endoscopic micromanipulator for multiplanar transesophageal imaging. *Ultrasound in Medicine & Biology* 1986;12:965–975.
- Martinoli C, Pretolesi F, Crespi G, Bianchi S, Gandolfo N, Valle M, Derchi LE. Power Doppler sonography: clinical applications. *European Journal of Radiology* 1998;27:S133–S140.
- Möckl L, Lamb DC, Bräuchle C. Super-resolved Fluorescence Microscopy: Nobel Prize in Chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William E. Moerner. *Angew Chem Int Ed* 2014;53:13972–13977.
- Mostafa Fatemi, James F. Greenleaf. Ultrasound-Stimulated Vibro-Acoustic Spectrography. *Science* 1998;82–85.

- Muthupillai R, Rossman PJ, Lomas DJ, Greenleaf JF, Riederer SJ, Ehman RL. Magnetic resonance imaging of transverse acoustic strain waves. *Magnetic Resonance in Medicine* 1996 ; 36:266–274.
- Narod SA, Iqbal J, Giannakeas V, Sopik V, Sun P. Breast Cancer Mortality After a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ. *JAMA Oncology* 2015;1:888–896.
- Nightingale K, Soo MS, Nightingale R, Trahey G. Acoustic radiation force impulse imaging: in vivo demonstration of clinical feasibility. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2002;28:227–235.
- Noroy M-H, Royer D, Fink MA. Shear-wave focusing with a laser-ultrasound phased-array. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* 1995;42:981–988.
- Opacic T, Dencks S, Theek B, Piepenbrock M, Ackermann D, Rix A, Lammers T, Stickeler E, Delorme S, Schmitz G, et al. Motion model ultrasound localization microscopy for preclinical and clinical multiparametric tumor characterization. *Nat Commun* 2018;9:1527.
- Papadacci C, Finel V, Provost J, Villemain O, Bruneval P, Gennisson J-L, Tanter M, Fink M, Pernot M. Imaging the dynamics of cardiac fiber orientation in vivo using 3D Ultrasound Backscatter Tensor Imaging. *Sci Rep* 2017;7:1–9.
- Papadacci C, Tanter M, Pernot M, Fink M. Ultrasound backscatter tensor imaging (BTI): analysis of the spatial coherence of ultrasonic speckle in anisotropic soft tissues. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2014;61:986–996.
- Picot PA, Rickey DW, Mitchell R, Rankin RN, Fenster A. Three-dimensional colour doppler imaging. *Ultrasound in Medicine & Biology* 1993;19:95–104.
- Pretorius DH, Nelson TR, Jaffe JS. 3-dimensional sonographic analysis based on color flow Doppler and gray scale image data: a preliminary report. *Journal of Ultrasound in Medicine* 1992;11:225–232.
- Raichlen JS, Trivedi SS, Herman GT, John Sutton MGSt, Reicher N. Dynamic three-dimensional reconstruction of the left ventricle from two-dimensional echocardiograms. *Journal of the American College of Cardiology* 1986;8:364–370.
- Raskov H, Orhan A, Gaggar S, Gögenur I. Cancer-Associated Fibroblasts and Tumor-Associated Macrophages in Cancer and Cancer Immunotherapy. *Front Oncol* 2021;11:668731.
- Sandrin L, Catheline S, Tanter M, Hennequin X, Fink M. Time-Resolved Pulsed Elastography with Ultrafast Ultrasonic Imaging. *Ultrason Imaging SAGE Publications Inc*, 1999;21:259–272.
- Sandrin L, Tanter M, Catheline S, Fink M. Shear modulus imaging with 2-D transient elastography. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2002;49:426–435.
- Santé Publique France. Indicateurs nationaux de performance du programme de dépistage du cancer du sein sur la période 2017-2018. 2021 [cited 2022 May 6]. Available from: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-sein/articles/indicateurs-nationaux-de-performance-du-programme-de-depistage-du-cancer-du-sein-sur-la-periode-2017-2018>

- Sarvazyan AP, Rudenko OV, Swanson SD, Fowlkes JB, Emelianov SY. Shear wave elasticity imaging: a new ultrasonic technology of medical diagnostics. *Ultrasound in Medicine & Biology* 1998;24:1419–1435.
- Sarvazyan AP, Skovoroda AR, Emelianov SY, Fowlkes JB, Pipe JG, R.S. Adler, R.B. Buxton, P.L. Carson. Biophysical bases of elasticity imaging. *Acoustical Imaging* 1995;Vol. 21.
- Sawada H, Fujii J, Kato K, Onoe M, Kuno Y. Three dimensional reconstruction of the left ventricle from multiple cross sectional echocardiograms. Value for measuring left ventricular volume. *Heart BMJ Publishing Group Ltd*, 1983;50:438–442.
- Shattuck DP, Weinshenker MD, Smith SW, von Ramm OT. Explososcan: A parallel processing technique for high speed ultrasound imaging with linear phased arrays. *The Journal of the Acoustical Society of America* 1984;75:1273–1282.
- Sigrist RMS, Liau J, Kaffas AE, Chammas MC, Willmann JK. Ultrasound Elastography: Review of Techniques and Clinical Applications. *Theranostics* 2017;7:1303–1329.
- Sung H, Jacques Ferlay, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2021;71:209–249.
- Tanter M, Bercoff J, Sandrin L, Fink M. Ultrafast compound imaging for 2-D motion vector estimation: application to transient elastography. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2002;49:1363–1374.
- Tanter M, Fink M. Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2014;61:102–119.
- Turquin E. Imagerie tissulaire ultrasonore 3D pour l'étude de l'anisotropie locale du muscle cardiaque. Université de Lyon, 2019.
- Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, Abbasi-Kangevari M, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdelalim A, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* 2020;396:1204–1222.
- Wiacek A, Oluyemi E, Myers K, Mullen L, Bell MAL. Coherence-Based Beamforming Increases the Diagnostic Certainty of Distinguishing Fluid from Solid Masses in Breast Ultrasound Exams. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2020;46:1380–1394.
- World health organization. WORLD CANCER REPORT: cancer research for cancer development. S.l.: IARC, 2020.
- Xi G, Guo W, Kang D, Ma J, Fu F, Qiu L, Zheng L, He J, Fang N, Chen J, et al. Large-scale tumor-associated collagen signatures identify high-risk breast cancer patients. *Theranostics* 2021;11:3229–3243.
- Xu S, Liu Y, Zhang T, Zheng J, Lin W, Cai J, Zou J, Chen Y, Xie Y, Chen Y, et al. The Global, Regional, and National Burden and Trends of Breast Cancer From 1990 to 2019: Results From the Global Burden of Disease Study 2019. *Frontiers in Oncology* 2021 [cited 2022 Feb 10];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2021.689562>

Chapitre II
Imagerie du tenseur
de rétrodiffusion en 3D
par tomographie

1 INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Comme décrit dans le chapitre I, les cancers du sein réorganisent la matrice extracellulaire de leur environnement pendant leur croissance. Il a été démontré que l'organisation des fibres de collagène (selon la classification en *tumor associated collagen signature* – TACS) est un marqueur lié au stade de la tumeur et au taux de survie (Conklin et al. 2011). La microscopie de seconde harmonique (*second harmonic generation microscopy* – SHGM) est la principale méthode d'imagerie pour étudier les fibres de collagène (Brown et al. 2003 ; Keikhosravi et al. 2014). Il existe d'autres méthodes indirectes comme la microscopie spatiale à interférence lumineuse (*spatial light interference microscopy* – SLIM) (Majeed et al. 2017) et l'imagerie de diffusion par résonance magnétique (*magnetic resonance diffusion tensor imaging* – MR-DTI) (Kakkad et al. 2016 ; Luo et al. 2019). La SHGM et la SLIM sont principalement utilisées *ex vivo* ou pour des zones superficielles en raison de leur faible capacité de pénétration. La MR-DTI est coûteuse et sa disponibilité est limitée. Par conséquent, une alternative moins chère, plus portable et plus largement applicable serait d'une grande utilité pour améliorer le suivi *in vivo* des patients.

Récemment, des recherches dans le domaine des ultrasons ont été menées pour résoudre ce problème. Deux méthodes, l'imagerie par tenseur élastique (*elastic tensor imaging* – ETI) (Chatelin et al. 2014 ; Correia et al. 2018 ; Lee et al. 2012) et l'imagerie par tenseur de rétrodiffusion (*backscatter tensor imaging* – BTI) (Chatelin et al. 2014 ; Papadacci et al. 2014), permettent d'estimer l'anisotropie des tissus mous et ainsi leurs orientations. Ces méthodes sont portables, peu coûteuses et non invasives. L'ETI évalue l'anisotropie mécanique du milieu à l'aide d'ondes de cisaillement. Tout comme l'élastographie par onde de cisaillement (*shear wave elastography* – SWE), les ondes ultrasonores sont focalisées en plusieurs zones afin de générer des ondes de cisaillement. Une acquisition ultrasonore ultrarapide est ensuite réalisée pour estimer la vitesse des ondes qui est liée à la rigidité du milieu. L'ETI permet ensuite la reconstruction d'une carte d'anisotropie de la rigidité. Cette méthode a démontré une bonne précision sur des organes tels que les muscles qui ont des propriétés mécaniques très anisotropes. Néanmoins, elle n'a pas été testée sur des milieux complexes avec des orientations de

fibres hétérogènes. Enfin, l'ETI nécessite d'envoyer plus d'énergie dans le milieu que le BTI.

Le BTI estime la cohérence spatiale de l'onde ultrasonore rétrodiffusée par le tissu imagé. Plus un tissu est organisé, plus la cohérence spatiale de l'onde rétrodiffusée est grande. Les premières implémentations du BTI (Li et al. 2019 ; Papadacci et al. 2014 ; Turquin et al. 2017) ont été capables d'évaluer l'orientation du milieu le long d'une ligne perpendiculaire au centre de la barrette de transducteurs. Fixée à un moteur rotatif, une sonde linéaire tournait autour de son axe central. La comparaison de la cohérence spatiale obtenue pour différents angles de sonde permettait alors de déterminer l'orientation du milieu à différentes profondeurs le long de l'axe de rotation. Nous l'appellerons BTI 1D dans ce chapitre. Plus récemment, une nouvelle méthode a permis de réaliser un BTI 3D en évaluant la cohérence spatiale de l'onde ultrasonore rétrodiffusée par un volume grâce à une sonde matricielle de 1024 éléments (Papadacci et al. 2017). L'orientation des fibres d'un cœur de porc a été évaluée avec succès en quelques millisecondes dans un petit volume (typiquement inférieur à 10 mm x 10 mm) sous la sonde en utilisant quatre échographes Verasonics. Le BTI 1D n'étant capable de donner des informations pertinentes que pour les tissus homogènes par couches, une reconstruction 3D est essentielle pour comprendre des structures complexes.

Le BTI 3D paraît être une modalité prometteuse pour proposer aux praticiens de nouveaux biomarqueurs ultrasonores pertinents pour le diagnostic du cancer du sein. Mais les sondes matricielles de par leur design ont une sensibilité réduite et nécessitent d'encombrants équipements ce qui limite leur utilisation clinique. Ainsi, ce chapitre propose une nouvelle méthode pour réaliser un BTI 3D pour la caractérisation des lésions tissulaires *ex vivo*, en utilisant une sonde linéaire et un jeu de moteurs. La largeur minimale du volume d'intérêt (VOI) a été fixée à 20 mm. La méthode a été testée avec succès sur des fantômes ultrasonores conçus au laboratoire.

2 MÉTHODES

2.1 Principe

2.1.1 Rappels théoriques du chapitre I et considérations pratiques

La cohérence spatiale d'une onde rétrodiffusée par un milieu dépend de l'organisation des réflecteurs disposés dans ce milieu. Ainsi, l'objectif du BTI est d'estimer la cohérence spatiale d'une onde rétrodiffusée dans différentes directions afin de déterminer l'orientation α (correspondant à la direction dans laquelle la cohérence est maximale), la cohérence Co (assimilée au degré d'organisation du milieu) et l'anisotropie fractionnelle AF (assimilée à la directionnalité) du milieu en chaque voxel d'un VOI. Le facteur de cohérence se calcule en divisant l'énergie cohérente de l'onde reçue par l'énergie incohérente :

$$C_{\theta}(M) = \frac{\sum_{T_1^M}^{T_2^M} \left| \sum_{i=1}^N S_i(t) \right|^2}{N \sum_{i=1}^N \sum_{T_1^M}^{T_2^M} |S_i(t)|^2} \quad (\text{II.1})$$

Où S_i est le signal reçu sur le transducteur i provenant du point M , et $[T_1^M, T_2^M]$ est une fenêtre temporelle, longue de cinq périodes, centrée sur le temps nécessaire à l'onde ultrasonore pour réaliser un aller-retour entre les transducteurs et le point M . Pour une vitesse du son de 1540 m/s et une fréquence centrale de 5,2 MHz, la fenêtre temporelle équivaut spatialement à environ 1,5 mm.

Dans la pratique, le signal peut être bruité et on utilise un facteur de cohérence spatialement moyenné (*spatially averaged coherence factor* – SACF) :

$$SACF_{\theta}(M) = \frac{1}{\text{card}(\mathcal{M})} \sum_{k \in \mathcal{M}} C_{\theta}(M_k) \quad (\text{II.2})$$

Où \mathcal{M} est l'ensemble des points M_k dans une petite zone autour du point d'intérêt M .

2.1.2 BTI par tomographie

La méthode de BTI par tomographie consiste à mesurer pour chaque point M d'un volume la cohérence en fonction de θ en faisant pivoter une sonde linéaire de ce même angle θ (Figure 28) et en la déplaçant pour couvrir l'intégralité du VOI.

Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un système échographique Verasonics à 256 voies (Verasonics, Kirkland, Washington, États-Unis) équipé d'une sonde linéaire à 128 éléments (L7-4, Philips - ATL, Amsterdam, Pays-Bas, pitch 0,298 mm, largeur de bande 4-7 MHz). La sonde a été utilisée à sa fréquence centrale (5,2 MHz). La distance focale de la sonde était de 25 mm. Une acquisition consistait en 101 ondes planes inclinées avec un pas angulaire de $0,4^\circ$ de -20° à $+20^\circ$ par rapport aux transducteurs. En réception, un nombre F constant (distance focale divisée par l'ouverture de la sonde) a été choisi égal à 1,5 comme dans les travaux précédents afin de pouvoir comparer la cohérence en différents points de l'image (Papadacci et al. 2014). La sonde était fixée à un jeu de moteurs permettant trois degrés de liberté en translation (VT 80, Physik Instrumente, Karlsruhe, Allemagne) et un degré en rotation (DT 80, Physik Instrumente, Karlsruhe, Allemagne). Toutes les mesures d'angle dans ce chapitre ont été effectuées dans le plan XY dans le sens direct par rapport à l'axe X ($\theta = 0^\circ$). L'axe Z correspond à la direction de propagation des ultrasons (Figure 28 a).

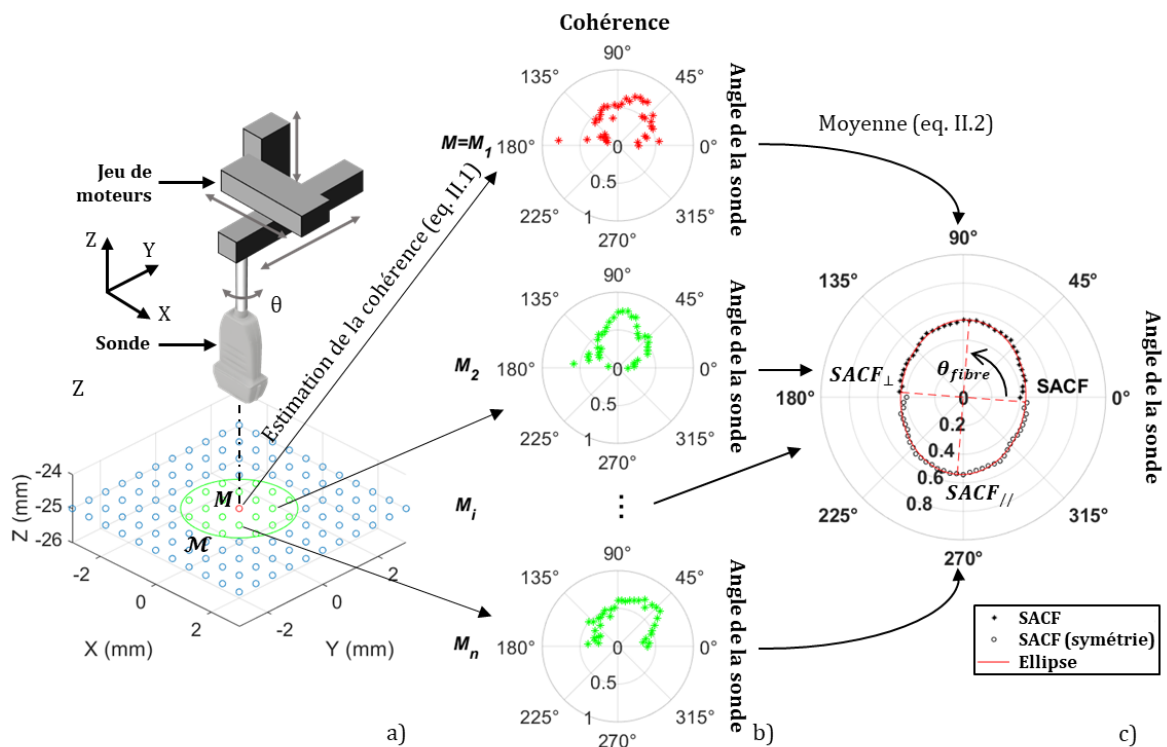


Figure 28 : Description du BTI par tomographie a) Pour différents angles de la sonde θ (de 0° à 175° et variant par pas de 5° , soit 36 angles), la sonde ultrasonore insonifie le milieu sur chaque point d'un ensemble ($M_i \in \mathcal{M}$ - en vert) autour du point d'intérêt (M - en rouge). Cela conduit à l'évaluation de 36 facteurs de cohérence par point. b) Ellipses de cohérence (graphiques polaires des facteurs de cohérence à différents angles de la sonde) pour les différents points $M_i \in \mathcal{M}$. c) Le facteur de cohérence spatialement moyenné (SACF) est calculé en faisant la moyenne des facteurs de cohérence des points $M_i \in \mathcal{M}$. Les points de données pour $\theta > 175^\circ$ sont déterminés par symétrie. Enfin, une ellipse est estimée (ligne rouge). Son grand axe indique l'orientation du milieu (θ_{fibre}). La $SACF_{\perp}$ et la $SACF_{//}$ représentent respectivement la moitié du grand axe et la moitié du petit axe.

Le nombre d'acquisitions nécessaire pour réaliser une tomographie en BTI 3D par tomographie a été calculé pour différents VOI (largeur de 10 à 35 mm) et tailles de voxel (taille latérale variant de la moitié à trois fois le pitch de la sonde) afin de trouver le meilleur compromis par rapport au temps d'acquisition. Le nombre d'acquisitions a été calculé pour un pas angulaire de 5° .

Nous avons effectué une analyse BTI 3D dans un cylindre de diamètre variable de 35 mm de profondeur. La taille de voxel était de 0,298 mm dans les dimensions latérales, soit la taille du pitch de la sonde, et de 1 mm dans la dimension de la profondeur. Puisque la fenêtre de moyennage pour calculer le facteur de cohérence était de 1,5 mm (eq. II.1), il y avait un recouvrement dans la direction Z. L'analyse BTI nécessite l'acquisition et le stockage des signaux radiofréquences (RF) pour tous les éléments de la sonde pendant que le réseau de transducteurs est positionné au-dessus des points d'intérêt et à différents angles (dans notre cas, nous avons choisi 36 angles, de 0 à 175° avec un pas de 5° , voir le paragraphe suivant). Pour réaliser une tomographie rapide, il a été supposé qu'une petite erreur par rapport à la taille de la tache focale à la focale en élévation (1 mm) pouvait être tolérée lors du positionnement de notre sonde. L'hypothèse était que cela ne modifierait pas de manière significative les signaux rétrodiffusés mais réduirait considérablement le nombre d'acquisitions nécessaires. Pour chacune des 36 positions angulaires de la sonde, nous avons réalisé une tomographie linéaire avec un pas adaptatif entre chaque plan

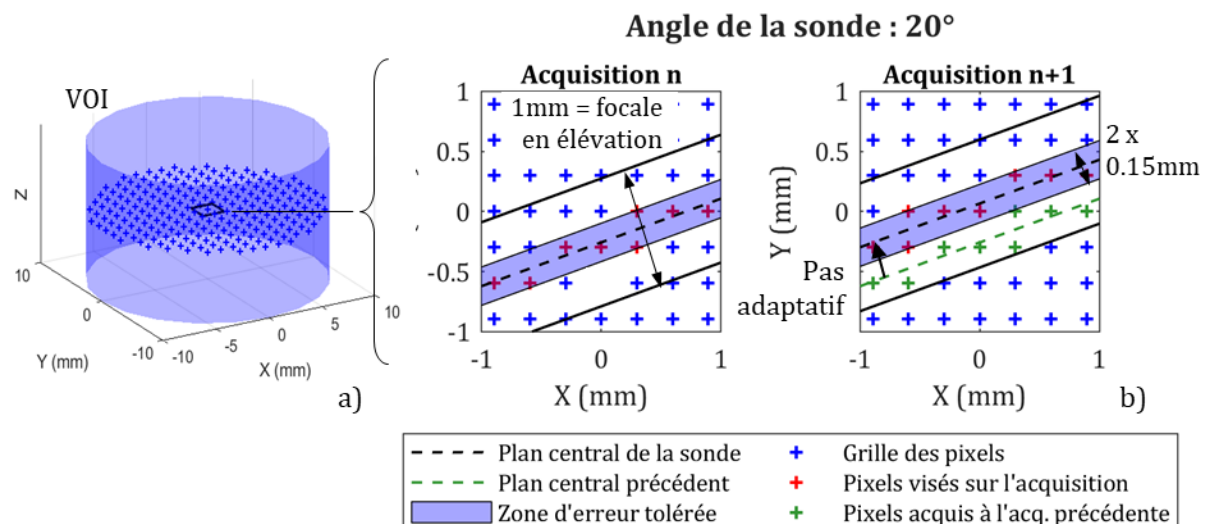


Figure 29 : Description de la méthode de tomographie. a) Schéma du VOI cylindrique dans lequel les pixels sont représentés dans un plan ($z = \text{constant}$). Le carré noir délimite la limite du zoom représenté en b). b) Description des étapes de la tomographie pour un exemple avec un angle de la sonde à 20° . Pour chaque position, nous considérons que les signaux RF provenant des points (en rouge) qui sont éloignés de moins de 0,15 mm du plan central de la sonde sont équivalents aux signaux qui auraient été reçus avec la sonde parfaitement au-dessus d'eux. Le pas adaptatif entre chaque acquisition est calculé de manière à n'imager qu'une seule fois chaque point avec chaque angle de la sonde.

d'acquisition distribué dans la direction de l'élévation. Le pas a été choisi pour garantir l'enregistrement d'une unique acquisition RF pour chaque angle de la sonde au-dessus de chaque point d'intérêt tel que la distance entre le plan central de la sonde et la position des voxels mesurés (points rouges dans la Figure 29b) reste inférieure à une erreur tolérée de 0,15 mm.

2.2 Optimisation

Plus le pas angulaire de la sonde est petit, plus le nombre de points reconstituant l'ellipse de cohérence sur le diagramme polaire est élevé (Figure 28b-c). Une ellipse centrée sur l'origine, ce qui est le cas ici, est complètement définie avec trois points. Cependant, nous avons supposé que le bruit empêcherait une représentation correcte de l'ellipse avec seulement trois points. Nous avons donc décidé d'utiliser un pas angulaire de 5° (36 points pour reconstituer l'ellipse) et de l'utiliser comme référence pour évaluer d'autres pas angulaires plus grossiers pour une optimisation ultérieure éventuelle.

Pour chaque voxel des VOI dans nos deux expériences, l'orientation du BTI α , l'AF et la Co ont été évaluées avec un sous-échantillonnage des mêmes données (pas angulaires : 5°, 10°, 15°, 20°, 30°, 45°, 60°). Le calcul a été effectué avec une $SACF(M)$ moyennée sur un disque de diamètre $d = 1,5$ mm dans le plan XY, soit sur les points définis par l'ensemble :

$$\mathcal{M}(M) = \{M_k(x_k, y_k, z_k) | (x_k - x_M)^2 + (y_k - y_M)^2 \leq \left(\frac{d}{2}\right)^2, z_k = z_M\} \quad (\text{II.3})$$

Ensuite, nous avons calculé la moyenne de la valeur absolue de la différence de l'orientation du BTI, de l'AF et de la Co pour tous les différents pas angulaires de la sonde par rapport à notre référence (pas angulaire de 5°).

2.3 Validation sur deux fantômes

Nous décrivons ci-dessous deux fantômes *in vitro* et *ex vivo* afin de tester la méthode proposée. Le premier fantôme, *in vitro*, est un tube entouré d'un fil représentant l'organisation tangente de fibres tissulaires autour de canaux galactophores. Le second fantôme, *ex vivo*, est composé de deux morceaux de viande fibreuse orientés perpendiculairement l'un à l'autre. Il nous permet de vérifier la sensibilité de la méthode à des diffuseurs contenus dans les tissus vivants.

2.3.1 Fantôme *in vitro*

Un premier fantôme *in vitro* a été conçu pour vérifier la possibilité de détecter le changement d'orientation de fibres dans un milieu contenant des diffuseurs mimant les propriétés des tissus biologiques dans une configuration s'approchant de certaines structures cancéreuses. Une inclusion cylindrique de 10 mm de diamètre composée d'agar-agar (6 % – réf : 20768, VWR International, Louvain, Belgique) et de gélatine (15 % – réf : 24350, VWR International, Louvain, Belgique) a été entourée d'un fil de 0,1 mm (Berkley® FireLine fused MicroIce crystal, Pure fishing, Columbia, Caroline du Sud, États-Unis) et entourée d'une matrice, un gel moins rigide, composée d'agar-agar (1 %) et de gélatine (2 %) (Dang et al. 2011).

Quelques gouttes d'encre bleue ont été ajoutées à l'inclusion pour améliorer son contraste visuel par rapport à la matrice. Avant la gélification, 1 % d'agar-agar a été ajouté à l'inclusion et à la matrice pour imiter la présence de diffuseurs dans le tissu (Figure 30).

Pour chaque point M du VOI (diamètre 20 mm, profondeur 35 mm – permettant d'imager l'intégralité du cylindre), la $SACF(M)$ a été calculée sur un disque de diamètre $d = 1,5$ mm dans le plan XY selon l'équation (II.3).

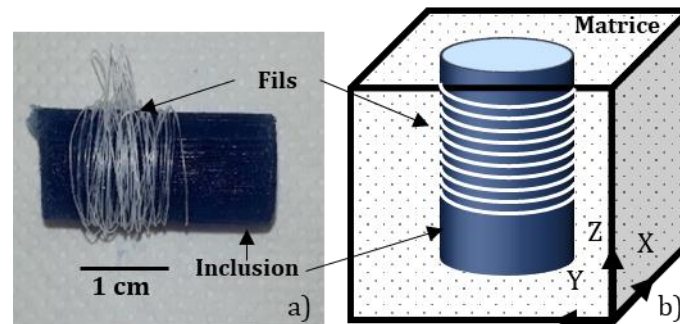


Figure 30 : Schéma du fantôme *in vitro* avec des fils enroulés autour d'un gel cylindrique bleu en agar-agar-gélatine. a) Photo de l'inclusion prise avant de la placer dans la matrice. b) Schéma du fantôme avec une matrice en agar-agar-gélatine entourant l'inclusion cylindrique bleue visible en (a).

2.3.2 Fantôme *ex vivo*

Un second fantôme *ex vivo* a été réalisé pour tester notre méthode. Ce fantôme, complémentaire au premier, permet de se rapprocher au plus près des conditions biologiques au prix d'un compromis sur la connaissance précise de l'organisation des tissus. Deux morceaux de viande fibreuse ont été placés l'un sur l'autre et immergés dans un gel de gélatine (6,5 %) pour prévenir des mouvements pendant l'imagerie. La pièce de viande, de la hampe de bœuf, a été choisie de manière à présenter une organisation

homogène et visuellement facilement discernable des fibres. La direction principale des fibres du morceau supérieur a été estimée visuellement à $90^\circ \pm 10^\circ$ c'est-à-dire parallèle à l'axe Y. La pièce inférieure a été positionnée perpendiculairement à la première ($0^\circ \pm 10^\circ$) (Figure 31).

Nous avons réalisé quatre acquisitions différentes. Entre chaque acquisition, nous avons pivoté le fantôme de $30^\circ \pm 0,5^\circ$ (rotations : 0° , 30° , 60° , 90°) à l'aide d'un goniomètre.

Le VOI était un cylindre de 20 mm de diamètre et 35 mm de profondeur comme pour le fantôme *in vitro*. Pour la visualisation, la SACF a été calculée sur un disque de 1,5 mm de diamètre dans le plan XY comme pour le fantôme *in vitro*. Pour l'analyse de l'orientation, la SACF a été calculée sur tous les points d'une profondeur donnée (i.e. $\mathcal{M}(M) = \{M_k(x_k, y_k, z_k) \mid z_k = z_M\}$).

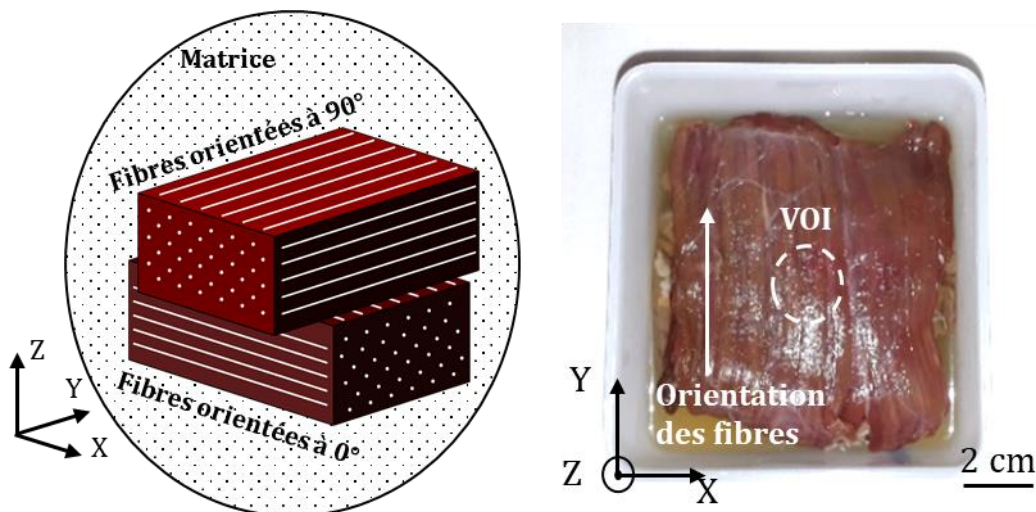


Figure 31 : Schéma et image du fantôme de tissu bovin. Deux morceaux de viande fibreuse sont empilés perpendiculairement et immergés dans une matrice de gélatine. Le morceau supérieur (respectivement inférieur) est parallèle à l'axe Y (respectivement l'axe X) pour la première acquisition BTI. L'orientation des fibres a été estimée visuellement (flèche blanche). Le champ de vue est représenté par un cercle en pointillés.

3 RÉSULTATS

3.1 Durée de la tomographie

Le temps nécessaire pour réaliser une tomographie complète a été évalué pour différents VOI et différentes tailles latérales des voxels (TLV) (Tableau 3). Pour notre configuration, la durée d'une étape de la tomographie (déplacement-acquisition-transfert des données) était de 0,4 s pour des acquisitions sur 35 mm de profondeur. Suite à ces

estimations, nous avons décidé de réaliser nos tomographies sur un champ de vue de 20 mm de diamètre avec une TLV de 0,298 mm (égale au pitch de la sonde). Une TLV plus petite augmenterait inutilement le temps de post-traitement puisque, d'une part la tache focale fait environ trois fois la taille du pitch en élévation, et d'autre part, l'erreur tolérée dans le positionnement de la sonde est égale à $\pm 0,15$ mm (soit une amplitude proche du pitch). Cela permet de maintenir la durée totale en dessous de 20 minutes tout en assurant une résolution suffisante pour évaluer la *SACF* sur un grand nombre de points.

VOI \ TLV	cylindre 10 mm		cylindre 15 mm		cylindre 20 mm		cylindre 25 mm		cylindre 30 mm		cylindre 35 mm	
	# acq	Temps (min)	# acq	Temps (min)	# acq	Temps (min)	# acq	Temps (min)	# acq	Temps (min)	# acq	Temps (min)
Pitch/2	1224	8	1830	12	2446	16	3058	20	3680	25	4294	29
Pitch	1182	8	1790	12	2390	16	2982	20	3586	24	4190	28
Pitchx2	1076	7	1660	11	2224	15	2796	19	3388	23	3964	26
Pitchx3	964	6	1528	10	2120	14	2648	18	3224	21	3768	25

Tableau 3 : Nombre d'acquisitions (# acq) et durée nécessaires pour réaliser un BTI 3D par tomographie selon la taille du volume d'intérêt (VOI) et de la taille latérale des voxels (TLV) avec un positionnement de la sonde calculé avec une erreur tolérée de la moitié du pitch.

3.2 Optimisation de la tomographie

Afin d'optimiser le temps et le nombre d'acquisitions nécessaires pour réaliser notre méthode, nous avons étudié l'effet qu'aurait eu une acquisition avec un pas angulaire plus grand. À mesure que ce dernier augmente, l'ellipse de cohérence est reconstituée avec moins de points et devient donc plus sensible au bruit. Les mesures d'orientation du BTI, de Co et d'AF s'éloignent alors de la référence obtenue avec un pas de 5° (Figure 32). Cependant, le changement moyen d'orientation est inférieur à $5,1^\circ$ pour nos deux expériences quand le pas angulaire reste inférieur à 15° (Figure 32a). Le changement moyen d'AF varie entre 0 et 0,14 (score moyen d'AF pour le fantôme d'agar-agar-gélatine : 0,33, pour le tissu bovin : 0,25). Jusqu'à 15° de pas angulaire, les changements d'AF restent inférieurs à 0,02 (Figure 32b). Enfin, le changement moyen de Co varie entre 0 et 0,13 (score moyen de Co pour le fantôme d'agar-agar-gélatine : 0,52, pour le tissu bovin : 0,60). Sous un pas angulaire de 15° , les changements de Co restent inférieurs à 0,01 (Figure 32c).

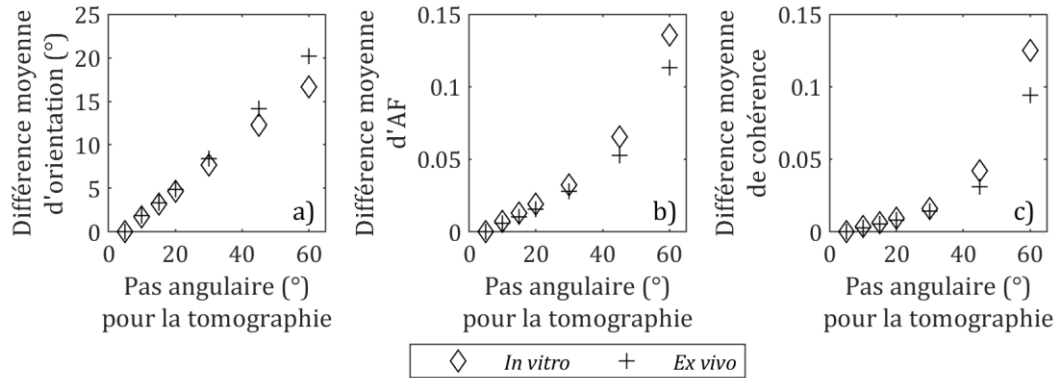


Figure 32 : Effet du pas angulaire du BTI par tomographie sur l'orientation, la Co et l'AF. Dans les deux expériences (in vitro et ex vivo), les différences entre les trois composantes du BTI (orientation, cohérence, AF) ont été évaluées pour chaque point du VOI avec différents pas angulaires pour la rotation de la sonde (5°, 10°, 15°, 20°, 30°, 45°, 60°). Les changements moyens par rapport à la référence (pas de 5°) sont représentés. Le changement moyen de l'AF (b) doit être comparé à l'AF moyenne du fantôme in vitro (0,33) et ex vivo (0,25). La variation moyenne de la Co (c) doit être comparée à la Co moyenne dans le fantôme in vitro (0,52) et ex vivo (0,60). En-dessous d'un pas angulaire de 15°, les différences moyennes des trois composantes restent très faibles pour nos deux exemples.

3.3 Validation du BTI 3D par tomographie sur fantômes

3.3.1 Fantôme *in vitro*

Une représentation du BTI 3D du fantôme *in vitro* a été reconstruite. Elle est illustrée en Figure 33a à l'aide du filtre *glyph* de Paraview (Kitware, Clifton Park, États-Unis, version 5.8.1) (Ayachit 2015). Ce filtre affiche des lignes orientées et colorées selon l'angle obtenu en chaque point. La longueur de la ligne est proportionnelle à l'AF à la puissance 6 afin de forcer le contraste pour améliorer la visualisation. La Figure 33a montre une AF élevée dans une zone circulaire correspondant à l'emplacement des fils circulaires. Le changement de couleur continu le long de ces points indique que la méthode est capable de détecter les changements d'orientation continus des fils dans ce plan.

Pour évaluer la précision de notre méthode, nous avons défini une zone d'intérêt T_α couvrant une portion angulaire avec une ouverture de 22,5° (Figure 33b). Pour couvrir l'intégralité du VOI, cette zone a été tournée par pas de 5° autour du centre de l'inclusion circulaire pour couvrir les portions angulaires comprises entre $\alpha = 0^\circ$ et $\alpha = 355^\circ$. Nous avons calculé la *SACF* moyenne dans chaque T_α sur toutes les profondeurs où les fils étaient visibles (11 mm) sur l'image 3D en mode B, comme illustré dans la coupe 2D du mode B de la Figure 33b. Nous en avons déduit l'orientation correspondante du milieu.

Comme les fils étaient tangents à l'inclusion, l'orientation attendue pour chaque T_α était $\alpha + 90^\circ$. Sur la Figure 33b, les angles mesurés pour chaque T_α sont très proches de

ces valeurs. L'angle moyen entre l'orientation principale du milieu dans T_α et α était bien de $90,0^\circ$ (écart-type : $10,2^\circ$).

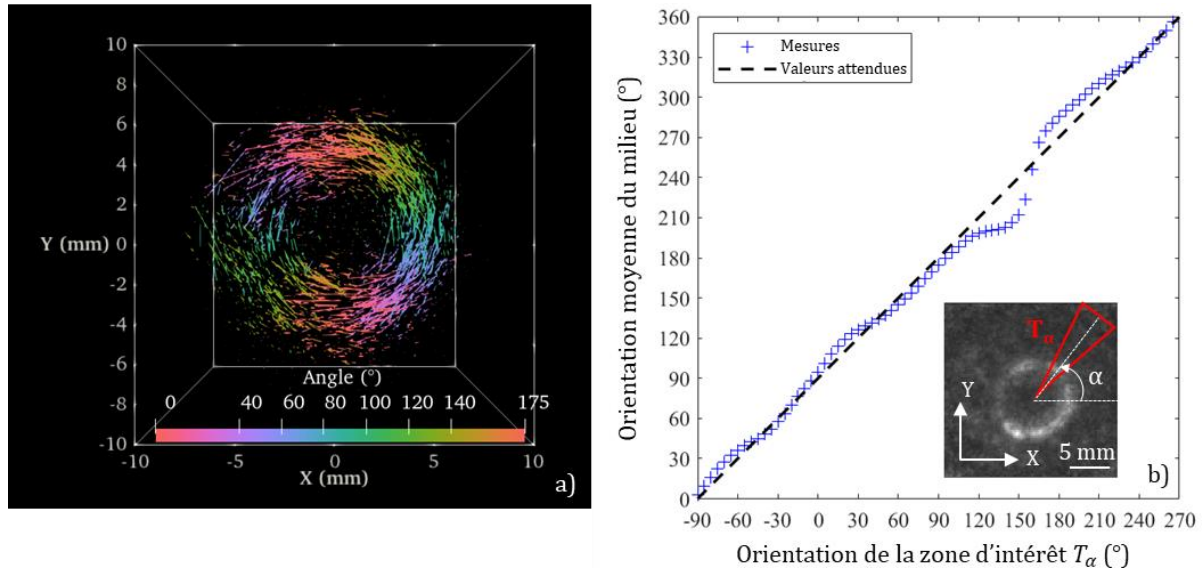


Figure 33 : Validation du BTI 3D sur fantôme de gel. Représentation 3D de l'information BTI obtenue pour le fantôme de gel à l'aide du logiciel Paraview. Les couleurs et les orientations de chaque ligne correspondent à l'orientation mesurée des fils et leur longueur correspond à l'AF. b) Orientation moyenne du milieu évalué sur T_α mesurée pour chaque angle α . L'image en échelle de gris est un mode B du fantôme de fils circulaires à la profondeur des fils.

3.3.2 Fantôme *ex vivo*

L'imagerie en mode B a permis de différencier nettement les deux morceaux de viande. Le morceau supérieur se situait entre 9 et 25 mm de profondeur. Une fine couche de gel était visible en-dessous et le morceau de viande inférieur occupait le bas de l'image. Les Figure 34a-d représentent la carte BTI 3D du fantôme via le filtre *stream tracer* de Paraview 5.8.1 (Ayachit 2015). Ce filtre génère des lignes de champ à partir de l'orientation locale du tissu obtenue avec le BTI. Dans la Figure 34a-d, les deux morceaux de viande orientés perpendiculairement sont clairement visibles. De plus, la rotation de 30° effectuée entre chaque acquisition est aussi identifiable d'une image à une autre.

La SACF a été évaluée sur une zone correspondant à tous les points à une profondeur donnée, soit l'intégralité du disque de 20 mm de diamètre. L'orientation trouvée pour chaque profondeur est représentée en Figure 34e. Dans la position initiale (rotation : 0°), les valeurs attendues étaient de $90^\circ \pm 10^\circ$ (direction Y) au-dessus d'une profondeur de 25 mm (morceau supérieur) et de $0^\circ \pm 10^\circ$ (direction X) pour tous les points en-dessous de 25 mm (morceau inférieur). Le Tableau 4 résume les résultats obtenus pour toutes les configurations (rotations de 0° , 30° , 60° , 90°). L'orientation du BTI était conforme aux valeurs attendues pour les quatre acquisitions.

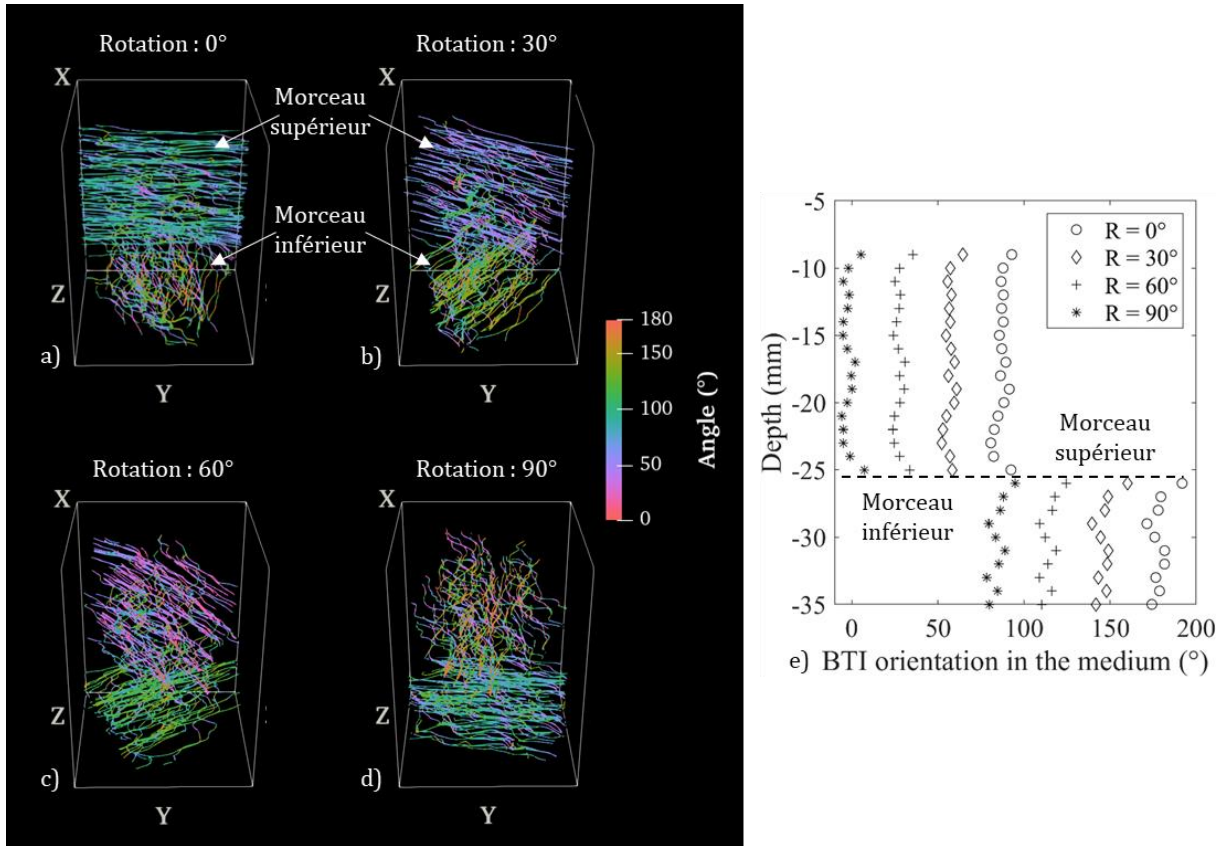


Figure 34 : a-d) Représentation avec le filtre stream line de Paraview des résultats du BTI 3D obtenus pour le fantôme de tissu ex vivo. Les couleurs correspondent à l'orientation locale du BTI. Entre chaque acquisition, le modèle a été tourné de 30°. e) Orientation moyenne mesurée dans le milieu à chaque profondeur. Avant la rotation ($R = 0^\circ$), les valeurs attendues étaient de 90° pour le morceau supérieur et de 180° pour le morceau inférieur. À chaque rotation, les valeurs attendues diminuaient de 30° . Les résultats obtenus avec le BTI 3D sont cohérents avec les valeurs attendues.

	Angle	Morceau supérieur	Morceau inférieur
Rotation : 0°	Attendu	$90^\circ \pm 10^\circ$	$0^\circ \pm 10^\circ$
	Mesuré	$87,2^\circ \pm 3,2^\circ$	$-1,0^\circ \pm 5,3^\circ$
Rotation : 30°	Attendu	$60^\circ \pm 10^\circ$	$150^\circ \pm 10^\circ$
	Mesuré	$57,2^\circ \pm 2,9^\circ$	$147,1^\circ \pm 5,4^\circ$
Rotation : 60°	Attendu	$30^\circ \pm 10^\circ$	$120^\circ \pm 10^\circ$
	Mesuré	$27,8^\circ \pm 3,2^\circ$	$114,9^\circ \pm 4,6^\circ$
Rotation : 90°	Attendu	$0^\circ \pm 10^\circ$	$90^\circ \pm 10^\circ$
	Mesuré	$-1,7^\circ \pm 3,6^\circ$	$84,9^\circ \pm 4,8^\circ$

Tableau 4 : Orientations des tissus du fantôme de bœuf selon la rotation du fantôme (attendues vs mesurées)

4 DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avons proposé une nouvelle méthode pour réaliser un BTI 3D par tomographie qui sera utilisée dans toute la suite de cette thèse. Cette technique permet de diminuer le temps d'acquisition et la quantité de données générées par rapport à une « tomographie exhaustive » qui consisterait en une rotation complète de la sonde au-dessus de chaque colonne de voxels, c'est-à-dire une série de BTI 1D. En effet, cette méthode non optimisée aurait nécessité jusqu'à 127 620 acquisitions pour un champ de vue de 20 mm de large et, dans notre cas, aurait duré 14 heures et généré 5,1 To de données. Par rapport à une « tomographie exhaustive », notre « tomographie rapide » a réduit le nombre d'acquisitions d'un facteur 53 pour un VOI correspondant à un cylindre de 20 mm (Tableau 5) grâce à la tolérance de petites erreurs dans le placement de la sonde pendant la tomographie. À titre de comparaison, la durée d'acquisition de la MR-DTI varie de 5 minutes à 1 heure (Lope-Piedrafita 2018 ; Ranzenberger and Snyder 2021 ; Salama et al. 2018), et de 5 à 15 minutes dans la pratique clinique (Soares et al. 2013). La durée du BTI 3D pourrait être diminuée en utilisant des disques SSD (*solid-state drive*) pour transférer les données et en augmentant la tolérance à l'erreur dans le positionnement de la sonde. Enfin, l'augmentation du pas angulaire de la sonde de 5° à 15° permettrait de diviser par trois le temps d'acquisition et la taille de données tout en assurant un niveau de précision comparable.

		Nombre d'acquisitions	Durée	Taille des données
Cylindre de 20 mm	Tomographie exhaustive	127 620	14 h	5,1 TB
	Tomographie rapide	2 390	16 min	0,10 TB

Tableau 5 : Exemples du nombre d'acquisitions, de la durée et de la taille des données générées pour une « tomographie exhaustive » (répétitions de BTI 1D) et une « tomographie rapide » (méthode proposée dans le chapitre)

Nous avons choisi d'effectuer une tomographie avec une sonde linéaire et non matricielle afin d'obtenir une installation plus compacte (un seul échographe Verasonics au lieu de quatre pour les sondes matricielles). Cela était nécessaire pour ne pas impacter le travail des équipes et s'adapter à l'espace disponible restreint du laboratoire de pathologie dans lequel l'étude présentée au chapitre IV allait être menée. De même, pour l'étude *in vivo* présentée au chapitre V, cette solution permettait d'anesthésier les animaux sur des durées plus courtes. Les sondes linéaires sont également plus sensibles que la sonde matricielle à 1024 canaux utilisée dans les études précédentes par notre groupe.

Le VOI balayé au cours de cette procédure était suffisamment large pour étudier les tumeurs mammaires de petite et moyenne taille. La fenêtre temporelle ($T_2 - T_1$) correspondait à 1,5 mm et pourrait être optimisée pour améliorer la résolution spatiale. Bien que les fibres de collagène mesurent $\sim 1 \mu\text{m}$ en largeur et $\sim 10 \mu\text{m}$ en longueur (Ouellette et al. 2021), elles sont organisées en TACS sur des échelles de quelques centaines de micromètres à près de trois millimètres (Xi et al. 2021). Notre méthode BTI 3D mesure la cohérence spatiale dans une zone de quelques longueurs d'onde (minimum $300 \mu\text{m}$) contenant de très nombreuses fibres de collagènes organisées de façon similaire. Elle devrait ainsi être sensible *a minima* aux TACS les plus grands. Les futurs travaux pourraient se concentrer sur l'amélioration de la résolution afin de détecter des structures plus petites allant jusqu'à une échelle d'environ $100 \mu\text{m}$.

La principale limite du BTI 3D par rapport à la MR-DTI est l'impossibilité de détecter l'orientation du milieu dans la direction de propagation des ultrasons (axe Z). En effet, l'orientation donnée par cette méthode est la projection de l'orientation des fibres dans les plans parallèles à la sonde (plan XY). Les tumeurs et leur microenvironnement étant des structures 3D complexes, cette limite est importante. Néanmoins, nous avons supposé que l'orientation de la sonde par rapport à la tumeur ne changerait pas radicalement les principales caractéristiques du BTI (Co, AF, orientation par rapport à la frontière de la tumeur). Ces mesures « plan par plan » sont comparables aux méthodes cliniques réalisées par les pathologistes qui évaluent des tumeurs entières en examinant des coupes histologiques. De plus, des études précédentes utilisant une sonde matricielle suggèrent que cette limite pourrait être dépassée et qu'il serait possible de mesurer l'orientation du milieu en trois dimensions (Turquin et al. 2019), mais seulement pour de petits angles azimutaux. Si ces résultats sont confirmés, la principale limite du BTI 3D pour une application aux cancers serait alors levée.

5 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons montré que le BTI 3D peut être mis en œuvre avec succès en utilisant une sonde linéaire et un ensemble de moteurs. Nos résultats ont été validés sur deux fantômes contrôlés (fantôme d'agar-agar-gélatine et fantôme de viande de bœuf). Le protocole proposé permet de réaliser une acquisition BTI 3D en moins de 20 minutes avec un champ de vision large de 20 mm. Cela serait suffisant pour analyser des tumeurs détectées préalablement par des techniques d'imagerie ultrasonore plus conventionnelle comme l'élastographie et pourrait venir en appui à d'autres modalités étudiées pour leur aide au diagnostic comme l'imagerie Doppler. Pour cela, nous avons mis en place une méthodologie permettant d'effectuer une acquisition multiparamétrique ultrasonore 3D à l'aide d'une sonde linéaire couplant SWE, BTI, Doppler ultrarapide et mode B. Pour tester cette nouvelle méthode, un nouveau fantôme multiparamétrique, présenté dans le chapitre suivant, a été développé.

6 RÉFÉRENCES DU CHAPITRE

- Brown E, McKee T, diTomaso E, Pluen A, Seed B, Boucher Y, Jain RK. Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nat Med* 2003;9:796–800.
- Chatelin S, Bernal M, Deffieux T, Papadacci C, Flaud P, Nahas A, Boccara C, Gennisson J-L, Tanter M, Pernot M. Anisotropic polyvinyl alcohol hydrogel phantom for shear wave elastography in fibrous biological soft tissue: a multimodality characterization. *Phys Med Biol* 2014;59:6923–6940.
- Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, Pehlke CA, Eliceiri KW, Provenzano PP, Friedl A, Keely PJ. Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma. *The American Journal of Pathology* 2011;178:1221–1232.
- Correia M, Deffieux T, Chatelin S, Provost J, Tanter M, Pernot M. 3D elastic tensor imaging in weakly transversely isotropic soft tissues. *Phys Med Biol* 2018;63:155005.
- Dang J, Frisch B, Lasaygues P, Zhang D, Tavernier S, Felix N, Lecoq P, Auffray E, Varela J, Mensah S, et al. Development of an Anthropomorphic Breast Phantom for Combined PET, B-Mode Ultrasound and Elastographic Imaging. *IEEE Trans Nucl Sci* 2011;58:660–667.
- Kakkad S, Zhang J, Akhbardeh A, Jacob D, Krishnamachary B, Solaiyappan M, Jacobs MA, Raman V, Leibfritz D, Glunde K, et al. Collagen fibers mediate MRI-detected water diffusion and anisotropy in breast cancers. *Neoplasia* 2016;18:585–593.
- Keikhosravi A, Bredfeldt JS, Sagar AK, Eliceiri KW. Second-harmonic generation imaging of cancer. *Methods in Cell Biology Elsevier*, 2014 [cited 2021 Oct 19]. pp. 531–546. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124201385000288>
- Lee W-N, Larrat B, Pernot M, Tanter M. Ultrasound elastic tensor imaging: comparison with MR diffusion tensor imaging in the myocardium. *Phys Med Biol* 2012;57:5075–5095.
- Li S, Mousavi P, White PJ. Ultrasound backscattered tensor imaging of the brain: an ex vivo feasibility study. In: Ruiters NV, Byram BC, eds. *Medical Imaging 2019: Ultrasonic Imaging and Tomography* San Diego, United States: SPIE, 2019 [cited 2021 Mar 25]. p. 37. Available from: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/10955/2512806/Ultrasound-backscattered-tensor-imaging-of-the-brain--an-ex/10.1117/12.2512806.full>
- Lope-Piedrafita S. Diffusion Tensor Imaging (DTI). In: García Martín ML, López Larrubia P, eds. *Preclinical MRI* New York, NY: Springer New York, 2018 [cited 2021 Nov 15]. pp. 103–116. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7531-0_7

- Luo J, Hippe DS, Rahbar H, Parsian S, Rendi MH, Partridge SC. Diffusion tensor imaging for characterizing tumor microstructure and improving diagnostic performance on breast MRI: a prospective observational study. *Breast Cancer Res* 2019;21:102.
- Majeed H, Okoro C, Kajdacsy-Balla A, Toussaint KC, Popescu G. Quantifying collagen fiber orientation in breast cancer using quantitative phase imaging. *J Biomed Opt* 2017;22:046004.
- Ouellette JN, Drifka CR, Pointer KB, Liu Y, Lieberthal TJ, Kao WJ, Kuo JS, Loeffler AG, Eliceiri KW. Navigating the Collagen Jungle: The Biomedical Potential of Fiber Organization in Cancer. *Bioengineering Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2021;8:17.
- Papadacci C, Finel V, Provost J, Villemain O, Bruneval P, Gennisson J-L, Tanter M, Fink M, Pernot M. Imaging the dynamics of cardiac fiber orientation in vivo using 3D Ultrasound Backscatter Tensor Imaging. *Sci Rep* 2017;7:1–9.
- Papadacci C, Tanter M, Pernot M, Fink M. Ultrasound backscatter tensor imaging (BTI): analysis of the spatial coherence of ultrasonic speckle in anisotropic soft tissues. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2014;61:986–996.
- Ranzenberger LR, Snyder T. *Diffusion Tensor Imaging*. StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021 [cited 2021 Nov 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537361/>
- Salama GR, Heier LA, Patel P, Ramakrishna R, Magge R, Tsiouris AJ. Diffusion Weighted/Tensor Imaging, Functional MRI and Perfusion Weighted Imaging in Glioblastoma—Foundations and Future. *Front Neurol* 2018;8:660.
- Soares JM, Marques P, Alves V, Sousa N. A hitchhiker’s guide to diffusion tensor imaging. *Front Neurosci* 2013;7:31.
- Turquin E, Petrusca L, Bernard O, Viallon M, Liebgott H, Varray F. Local Orientation Imaging for Tissue Structure Using Ultrasound Imaging. *IRBM* 2017;38:298–303.
- Turquin E, Petrusca L, Viallon M, Liebgott H, Varray F. Full 3D anisotropic estimation of tissue in ultrasound imaging. 2019 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS) Glasgow, United Kingdom: IEEE, 2019 [cited 2021 Feb 1]. pp. 56–59. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/8925855/>
- Xi G, Guo W, Kang D, Ma J, Fu F, Qiu L, Zheng L, He J, Fang N, Chen J, et al. Large-scale tumor-associated collagen signatures identify high-risk breast cancer patients. *Theranostics* 2021;11:3229–3243.

Chapitre III

Fantôme d'imagerie multiparamétrique 3D

1 INTRODUCTION ET OBJECTIFS

En imagerie médicale, les « fantômes » sont des objets mimant les propriétés de tout ou partie d'un organe pour une ou plusieurs modalités d'imagerie. En recherche, ils permettent de tester de nouvelles séquences d'imagerie. En clinique, ils sont utilisés par les médecins pour se former à certains gestes. Le but est d'obtenir un maximum d'informations et de pratique avant de passer sur un patient. Notre objectif ici a été de vérifier la capacité d'une séquence ultrasonore multiparamétrique 3D à évaluer la rigidité du milieu via l'élastographie par onde de cisaillement (SWE), la présence et la morphologie de la vascularisation via le Doppler ultrarapide et l'organisation de diffuseurs via l'imagerie du tenseur de rétrodiffusion (BTI). En cohérence avec l'ensemble de cette thèse, le fantôme a été conçu en prenant pour référence les propriétés d'un cancer du sein. Le choix des modalités ultrasonores provient de trois remaniements importants des tissus lors de l'apparition d'une tumeur mammaire : la rigidification de la tumeur et de sa zone péri-tumorale, l'angiogenèse et la réorganisation des fibres de collagène autour de la tumeur (Kaushik et al. 2016).

Les fantômes pour l'imagerie ultrasonore visent à reproduire quatre propriétés fondamentales d'un milieu : la vitesse de propagation du son (m/s), la densité (kg/m^3), l'atténuation ($\text{dB.cm}^{-1}.\text{MHz}^{-1}$) et l'impédance acoustique (Mrayl). En moyenne, pour les tissus mous du corps humain, la vitesse du son est de 1561 m/s, la densité de 1043 kg/m^3 , l'atténuation de $0,54 \text{ dB.cm}^{-1}.\text{MHz}^{-1}$ et l'impédance acoustique de 1,63 Mrayl. Pour le sein, la vitesse du son varie autour de 1510 m/s, la densité de 1020 kg/m^3 , l'atténuation de $0,75 \text{ dB.cm}^{-1}.\text{MHz}^{-1}$ et l'impédance acoustique de 1,54 Mrayl (Culjat et al. 2010). Ces valeurs peuvent fluctuer selon la densité mammaire, les seins pouvant être plus ou moins adipeux ou fibreux. La plupart des fantômes sont des hydrogels. Ils sont notamment fabriqués à base d'agar-agar, de gélatine, de polyacrylamide, de polyuréthane ou d'alcool polyvinylique (Culjat et al. 2010).

La norme IEC 60601-2-37:2007 recommande une formulation pour la fabrication d'un fantôme mimant les tissus. Le fantôme proposé est constitué de 82,95 % (massique) d'eau distillée, 11,23 % de glycérol, 3,02 % d'agar-agar, 0,88 % d'alumine $0,3 \mu\text{m}$, 0,94 % d'alumine $3 \mu\text{m}$, 0,53 % de carbure de silicium $37 \mu\text{m}$ et 0,47 % de chlorure de benzalkonium (pour la conservation). D'après la norme, les propriétés de ce fantôme sont

proches de celles des tissus avec : 1540 m/s pour la vitesse du son, 1050 kg/m³ pour la densité, 0,5 dB.cm⁻¹.MHz⁻¹ pour l'atténuation et 1,6 Mrayl pour l'impédance acoustique.

Le SWE, une modalité introduite par Bercoff et al., 2004, permet d'estimer la rigidité des tissus en mesurant la vitesse de propagation d'une onde de cisaillement. Le SWE 3D a été étudié par la suite (Pernot et al. 2006) mais n'a pas à ce jour montré d'amélioration notable dans le diagnostic des tumeurs du sein par rapport au SWE 2D (Choi et al. 2017 ; Lee et al. 2013 ; Tian et al. 2017 ; Youk et al. 2013). Les fantômes utilisés pour tester le SWE présentent soit une rigidité homogène calibrée, soit de multiples zones de rigidités différentes. Dans ce dernier cas, les différentes rigidités sont obtenues en faisant varier la concentration de polymère dans le gel ; une concentration plus importante étant associée à une plus grande rigidité (Bercoff et al. 2004 ; Dang et al. 2011).

Le Doppler de puissance permet de mettre en évidence la présence de vaisseaux. L'apparition du Doppler de puissance ultrarapide, appelé Doppler ultrarapide dans ce manuscrit, a permis d'augmenter la sensibilité de la méthode et de détecter des flux plus faibles dans des vaisseaux plus petits (Bercoff et al. 2011). Si les techniques de Doppler 2D permettent d'identifier la densité de vaisseaux dans une zone, elles ne peuvent pas étudier l'architecture complexe de la vascularisation qui se déploie en 3D. Les fantômes de flux utilisent des tubes ou des cavités dans lesquelles s'écoule un fluide contenant des diffuseurs. Il est à noter que les tubes peuvent parfois réfléchir une partie importante des ultrasons sur leur paroi et par conséquent diminuer le ratio signal sur bruit dans la zone située en-dessous. Une préférence est donc généralement accordée aux fantômes de flux « sans paroi ». Pour les réaliser, un cylindre est inséré dans le gel avant sa solidification puis retiré pour faire circuler par la suite un fluide mimant le sang (Oglat et al. 2018 ; Rickey et al. 1995). Le fantôme doit cependant être suffisamment rigide pour ne pas s'effondrer lors du retrait du cylindre.

Enfin, le BTI permet d'évaluer l'orientation des tissus mous (Papadacci et al. 2014). La méthode existe en 1D (Papadacci et al. 2014) et en 3D (Papadacci et al. 2017). Les seuls fantômes ayant été proposés dans la littérature évaluent l'orientation du milieu en se basant sur une anisotropie créée dans un gel de PVA déformé (Chatelin et al. 2014), le long de fils (Turquin et al. 2017) ou dans des tissus *ex vivo* et *in vivo* (Papadacci et al. 2017). Néanmoins, il est impossible de contrôler précisément l'orientation des diffuseurs dans les fantômes produits avec des tissus biologiques. De plus, ces fantômes se

conservent mal dans le temps. L'anisotropie des fantômes synthétiques proposés dans les travaux antérieurs était homogène (orientation unique) dans tout le fantôme quand les diffuseurs étaient plus petits que la longueur d'onde, et variable quand les diffuseurs, par exemple des fils, étaient plus grands. Il était donc intéressant de proposer un nouveau fantôme, plus représentatif des tissus vivants, présentant une microstructure complexe avec des diffuseurs petits par rapport à la longueur d'onde.

Plusieurs approches sont possibles afin de réaliser des acquisitions 3D avec les ultrasons. La méthode la plus simple consiste à translater mécaniquement une sonde linéaire pour reconstruire le volume tranche par tranche. Elle dégrade néanmoins la résolution puisque les sondes linéaires focalisent mal en élévation. Pour diminuer cette anisotropie, il est possible de réaliser une tomographie multiple : les scans sont alors effectués plusieurs fois en faisant tourner la sonde sur elle-même. Cela permet une meilleure focalisation au prix d'une augmentation du temps de scan (Demené et al. 2016). Enfin, il est possible d'utiliser des réseaux de transducteurs en 2D (sondes matricielles, sondes *row-column addressed* – RCA) mais ces méthodes nécessitent un matériel coûteux et peu disponible.

Le travail proposé dans ce chapitre vise à réaliser le premier fantôme multiparamétrique pour le SWE, le Doppler ultrarapide et le BTI afin de tester une séquence 3D par tomographie pour le suivi du cancer du sein. Cette même séquence sera utilisée dans les chapitres IV et V pour le suivi des cancers *ex vivo* chez l'humain et *in vivo* chez le petit animal. La recherche présentée dans ce chapitre a été réalisée en collaboration avec Bailey Leadford, stagiaire au laboratoire Physique pour la Médecine pendant trois mois, qui a co-conçu la méthode pour la réalisation du gel et fabriqué les tests sous ma supervision.

2 MÉTHODES

2.1 Fantôme

2.1.1 Fabrication

2.1.1.1 Objectif

La conception du fantôme devait permettre d'obtenir une zone plus rigide que la matrice (contraste SWE), d'injecter un fluide dans un vaisseau de diamètre contrôlé sans paroi (Doppler ultrarapide) et d'orienter de petits diffuseurs selon des directions variables et contrôlées (BTI). Afin de maîtriser cette orientation, nous avons utilisé une poudre de fer placée dans un champ magnétique. À notre connaissance, un seul autre fantôme ultrasonore a été proposé utilisant un champ magnétique pour orienter des diffuseurs afin d'en mesurer l'orientation (Barber and Zemp 2017). Le schéma du fantôme est présenté en Figure 35.

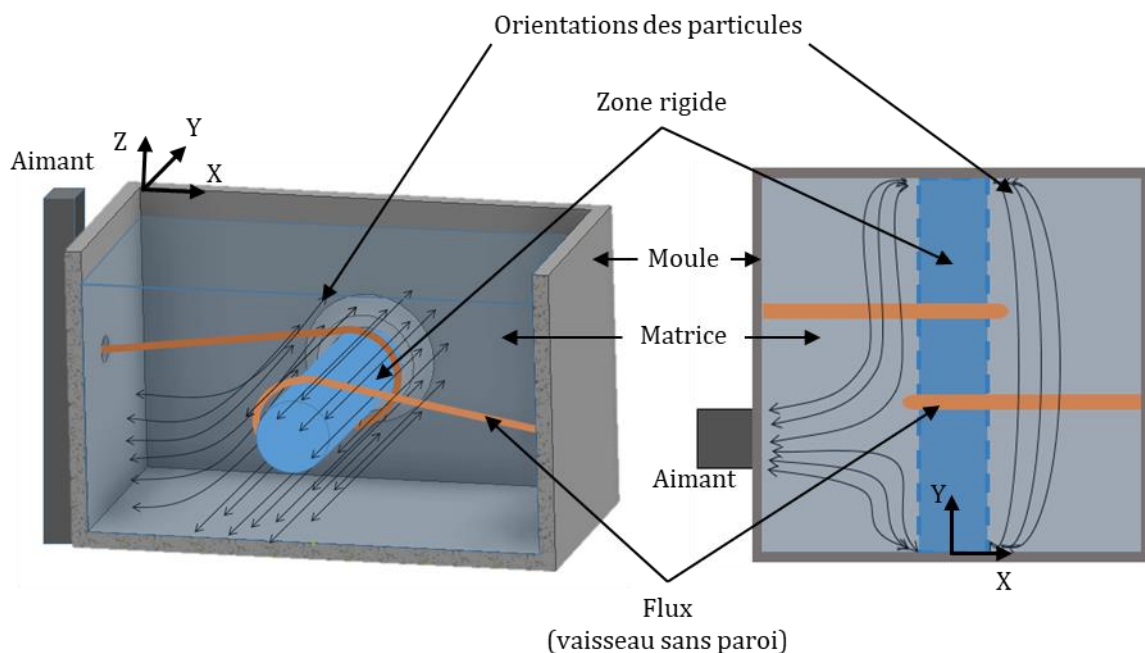


Figure 35 : Schéma du fantôme multiparamétrique, vu en coupe de côté (à gauche) et de haut (à droite). Le moule a les rebords légèrement au-dessus du niveau du gel pour contenir l'eau servant au couplage acoustique entre la sonde et le fantôme. Le rôle de l'aimant pour orienter les diffuseurs dans le milieu sera discuté dans la suite.

2.1.1.2 Moule

Un moule, imprimé en 3D (Prusa research, Prague, Tchéquie) en acide polylactique (PLA) par la technique de dépôt de fil fondu (*fused filament fabrication*), a spécialement été conçu pour la réalisation de ce fantôme. Ce dernier consistait en deux

parties amovibles. La première était une boîte rectangulaire avec trois ouvertures : deux d'entre elles permettaient de placer les connecteurs qui servaient à insérer le cathéter pour créer un vaisseau dans le fantôme ; la dernière ouverture servait à insérer la seconde partie du moule, un cylindre creux. Afin d'orienter les diffuseurs magnétiques placés dans le fantôme, plusieurs petits aimants cubiques de 5 mm (réf : W-05-N50-N, supermagnete, Gottmadingen, Allemagne) étaient disposés dans le tube. Le fin cathéter (1 mm de diamètre externe) était enroulé autour du cylindre (Figure 36). Après avoir coulé la matrice, le cylindre a été enlevé pour couler à sa place un gel plus rigide que la matrice. Enfin, le cathéter a été retiré afin de créer une cavité dans laquelle un fluide mimant le sang pouvait être injecté lors des séquences d'imagerie.

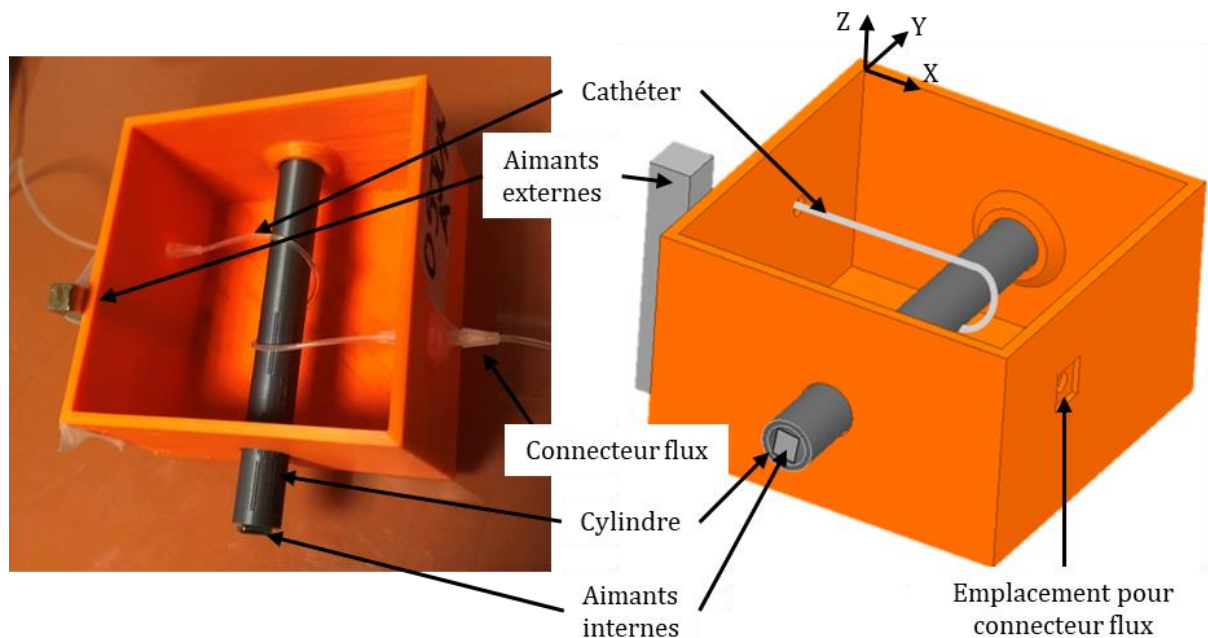


Figure 36 : Photo et schéma du moule servant à la réalisation du fantôme multiparamétrique

2.1.1.3 Étape I : matrice

La première étape de réalisation du gel a consisté en la préparation d'une matrice peu rigide contenant des diffuseurs avec une orientation contrôlée. L'hydrogel servant de matrice a été préparé dans un bécher dans lequel ont été mélangés 78,1 % (tous les % sont exprimés en rapport de masse) d'eau distillée, 10,4 % de glycérine (réf : 24386, VWR International, Louvain, Belgique), 1,78 % d'agar-agar (réf : 20768, VWR International, Louvain, Belgique) et 0,44 % de chlorure de benzalkonium 50 % (mon-droguiste, Charmont, France). La solution a ensuite été dégazée, puis chauffée sur une plaque chauffante à 90°C sous agitation magnétique. Une fois la température atteinte, le bécher a

été retiré de la plaque chauffante et laissé à refroidir jusqu'à 50° sous agitation magnétique. Le barreau magnétique a ensuite été retiré puis 9,26 % de poudre de fer de diamètre max 36 µm (Werth metallpulver, Erfurt, Allemagne) ont été ajoutés et mélangés manuellement jusqu'à ce que les particules de fer restent en suspension. Une attention particulière a été portée au fait de ne pas incorporer de bulles d'air. Quand la solution a commencé à gélifier, elle a été versée dans un moule, préparé comme sur la Figure 36. Le temps de repos avant la seconde étape était d'au moins 30 minutes.

2.1.1.4 Étape II : inclusion

Une fois le gel solidifié, les aimants externes et le cylindre ont été retirés. Puis, pour réaliser l'inclusion, les mêmes étapes ont été réalisées en modifiant les quantités de réactifs : eau distillée (77,0 %), glycérine (10,4 %), agar-agar (2,82 %), poudre de fer (9,34 %), chlorure de benzalkonium (0,44 %). Cette solution a été versée dans l'inclusion laissée vide par le cylindre. Après au moins 30 minutes à température ambiante, le cathéter a été retiré afin d'obtenir un vaisseau sans paroi.

2.1.2 Préparation du fantôme pour l'imagerie

Avant l'imagerie, une fine couche d'eau distillée était placée sur le fantôme afin d'assurer le couplage acoustique entre la sonde ultrasonore et le fantôme. Une solution de fluide pour test Doppler (Model 707, ATS laboratories, Bridgeport, Connecticut, États-Unis) était alors injectée à l'aide d'un pousse-seringue (KD Scientific, Holliston, Massachusetts, États-Unis) avec un débit de 0,5 mL/min pendant toute la durée des acquisitions.

2.1.3 Inspection post-acquisition

Afin de comparer les résultats du BTI obtenus lors de nos acquisitions, le fantôme a été découpé en tranches de 4 mm le long de l'axe Z. Ces tranches ont ensuite été inspectées à l'aide d'un microscope numérique DOM-1001 (RWD, San Diego, Californie, États-Unis).

2.2 Séquences multiparamétriques

2.2.1 Mise en place

La séquence d'imagerie a été réalisée par un système d'acquisition Vantage (Kirkland, Washington, États-Unis). La sonde utilisée a été fabriquée pour une utilisation préclinique (Vermont, Tours, France), centrée à 15,6 MHz, avec un écart inter-élément de 0,11 mm et une distance focale en élévation de 8 mm. Dans le chapitre V, cette même sonde a été utilisée pour l'expérimentation sur modèle murin. La sonde était placée dans un porte-sonde spécialement imprimé en 3D et fixé à un jeu de moteurs permettant trois degrés de liberté en translation (VT 80, Physik Instrumente, Karlsruhe, Allemagne) et un degré en rotation (DT 80, Physik Instrumente, Karlsruhe, Allemagne). Les séquences présentées ci-dessous ont été réalisées les unes après les autres sans aucune modification de l'installation.

2.2.2 SWE

Le SWE 3D a été reconstruit à partir de 49 acquisitions de SWE 2D espacées d'un pas de 0,25 mm dans trois orientations différentes (0°, 45°, 90°). Pour chaque acquisition 2D, neuf ondes de cisaillement réparties sur la largeur de la sonde ont été générées. Chaque onde de cisaillement a été produite avec cinq focalisations en différentes profondeurs (entre 6 et 16 mm) pendant 6,5 μ s à 25 V à une fréquence de 13 MHz. Après la création de chaque onde de cisaillement, une séquence d'imagerie ultrarapide a été effectuée pour suivre la propagation de l'onde : 25 images ont été formées à une fréquence de 8333 Hz. Chaque image a été créée à partir de trois ondes planes émises à 15,625 MHz et orientées à -3°, 0°, 3°.

La vitesse de l'onde de cisaillement a ensuite été estimée pour chaque pixel plan par plan (chapitre I) et le SWE 3D a été reconstitué en moyennant les valeurs obtenues dans les différents plans. Cette méthode de reconstruction permet d'obtenir une carte de rigidité 3D avec une résolution plus isotrope (Demené et al. 2016) afin de ne pas introduire de biais selon une direction. En contrepartie, l'anisotropie mécanique n'a pas été mesurée. Une validation 2D a été faite dans un plan à l'aide d'un Aixplorer équipé d'une sonde SL10-2 (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France).

2.2.3 Doppler ultrarapide

De même que pour le SWE, le Doppler ultrarapide 3D a été reconstruit à partir de 49 acquisitions espacées de 0,25 mm prises dans trois orientations différentes (0°, 45°, 90°). Chaque plan a été réalisé à partir de l'acquisition de 200 images à 1000 Hz chacune obtenue avec 11 ondes planes orientées de -5° à +5° (pas de 1°) à 15 V.

Le Doppler ultrarapide a été reconstruit en 2D selon la méthode présentée au chapitre I en coupant les cinq premières valeurs propres de la SVD. Le volume Doppler a ensuite été reconstitué en moyennant les valeurs obtenues à chaque acquisition.

La valeur du rayon du vaisseau a été estimée en binarisant l'image, en sélectionnant le vaisseau (le plus grand volume continu extrait par la binarisation) et en réalisant une fermeture morphologique du volume binarisé dans Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, États-Unis). Ces étapes ont permis d'obtenir un masque du vaisseau sans artefact ni voxel vide. Par la suite, la position du squelette a été calculée grâce à la fonction *bwskel* de Matlab. Pour chaque voxel du squelette, on estime la valeur du rayon local en prenant la plus courte distance entre le voxel et les pixels hors du masque.

2.2.4 BTI

La méthode BTI est celle présentée au chapitre II, à la différence que la sonde utilisée ici était plus haute fréquence. Par conséquent, le volume d'intérêt (VOI) était un cylindre de 14 mm de diamètre et de 15 mm de profondeur. Par ailleurs, le pas angulaire de la sonde a été fixé à 10°. Ce pas est un compromis entre temps et qualité d'acquisition demeurant sous le seuil de 15° fixé au chapitre précédent avec des fantômes. Pour le calcul du BTI, le facteur de cohérence spatialement moyenné (*spatially averaged coherence factor* – SACF) a été évalué sur un cylindre de diamètre (plan XY) $d = 0,55$ mm et de hauteur (axe Z) $h = 2$ mm dans un seul plan proche du centre ($z_c = 10$ mm) du cylindre estimé visuellement au mode B :

$$\mathcal{M}(M) = \{M_k(x_k, y_k, z_k) | (x_k - x_M)^2 + (y_k - y_M)^2 \leq \left(\frac{d}{2}\right)^2, |z_k - z_c| \leq \frac{h}{2}\} \quad (\text{III. 1})$$

Où \mathcal{M} est l'ensemble des points M_k dans une petite zone autour du point d'intérêt M.

Plusieurs zones ont été scannées pour le BTI. Puis, suite à l'inspection du fantôme au microscope (2.1.3), une zone dont l'orientation était suffisamment caractéristique pour être simplement comparée avec l'orientation obtenue par BTI a été identifiée.

2.2.5 Mode B

Le mode B 3D a été reconstruit à partir d'une moyenne de l'intégralité des acquisitions du BTI.

3 RÉSULTATS

3.1 Réalisation de la séquence

Dans les conditions de l'expérience, il a fallu 7 minutes pour réaliser le SWE 3D, 8 minutes pour le Doppler ultrarapide 3D et 6 minutes pour le BTI 3D. Le temps d'acquisition total est donc de 21 minutes pour un champ de vue de 14 mm de diamètre et de 15 mm de profondeur.

3.2 SWE

Les cartes de SWE (Figure 37) ont permis de distinguer clairement l'inclusion de la matrice. La valeur de la vitesse de l'onde de cisaillement dans l'inclusion (zone en pointillés blancs) était de 8,87 m/s en moyenne (médiane : 8,86 m/s, écart-type - σ : 1,41 m/s). Dans la matrice (zone en pointillés rouges), la vitesse moyenne de l'onde de cisaillement était de 6,19 m/s (médiane : 6,25 m/s, σ : 0,431 m/s).

Les valeurs trouvées à l'aide de la séquence de l'Aixplorer était de plus de 10 m/s (en saturation) dans l'inclusion et de 7,2 m/s (σ : 0,3 m/s) dans la matrice.

3.3 Doppler ultrarapide

Le vaisseau était facilement discernable à l'œil nu (Figure 38). La valeur moyenne du Doppler ultrarapide dans le vaisseau, calculée dans le volume binarisé (section 2.2.3) était de -42,3 dB (σ : 12,4 dB) contre -78,4 dB (σ : 8,96 dB) en dehors du vaisseau, c'est-à-dire partout sauf dans le volume binarisé (Figure 38). La mesure du diamètre moyen du vaisseau était de 0,978 mm (σ : 0,162 mm, interquartile : 0,276 mm).

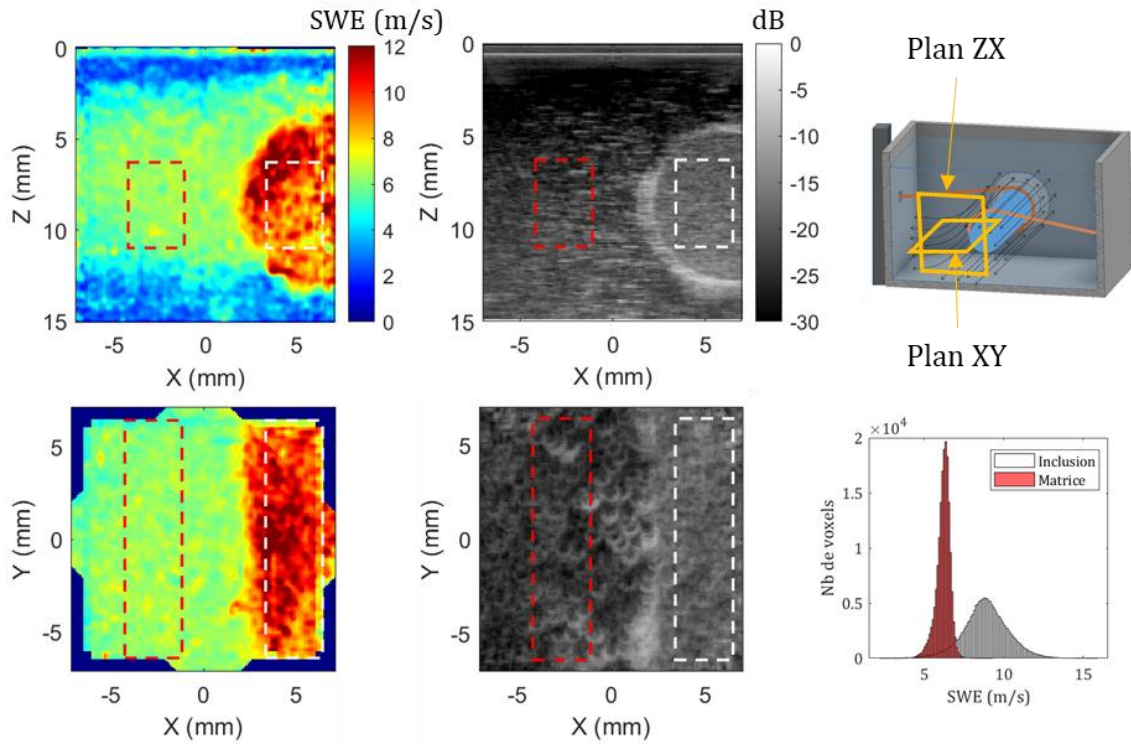


Figure 37 : Représentation de deux coupes du SWE 3D dans deux plans orthogonaux (plans ZX et XY) avec mode B correspondant. L'histogramme représente les valeurs de vitesse des voxels se trouvant dans les zones en pointillés rouges (matrice) et blancs (inclusion). Les deux distributions sont nettement séparées.

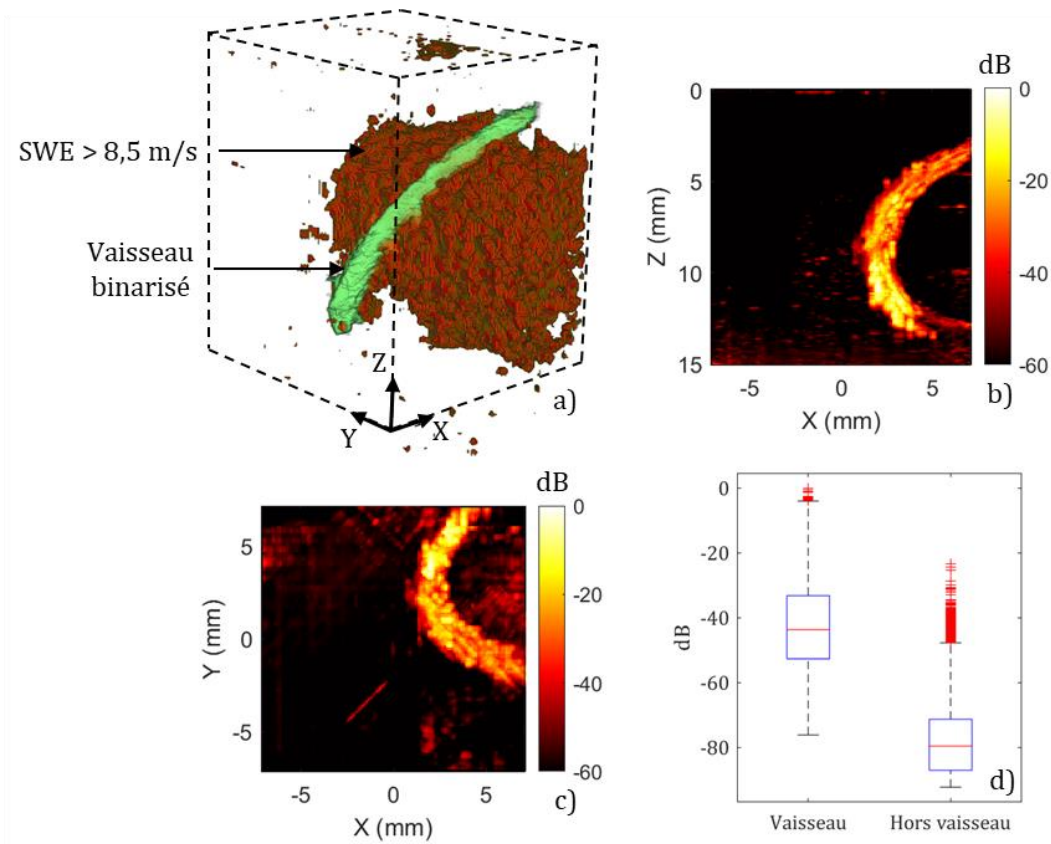


Figure 38 : a) Représentation biparamétrique 3D du vaisseau binarisé (vert) et des zones dans lesquelles la vitesse de l'onde de cisaillement dépasse 8,5 m/s (rouge). Le volume en pointillés correspond au champ de vue. b) et c) Projection de l'intensité maximale dans les plans ZX et XY. d) Valeurs du Doppler ultrarapide dans les voxels se trouvant dans le vaisseau binarisé et en dehors. La médiane des valeurs dans le vaisseau est de -43,7 dB (interquartile : 19,5 dB). En dehors du vaisseau, elle est de -79,6 dB (interquartile : 15,7 dB).

3.4 BTI

L'inclusion était située entre 6 et 15 mm de profondeur. L'orientation des particules de fer dans la zone située dans le coin $X > 0$ et $Y > 0$ du fantôme (Figure 39) était clairement définie de façon radiale proche du vaisseau. Le BTI a été calculé en moyennant les points dans toute la profondeur entre 9 mm et 11 mm.

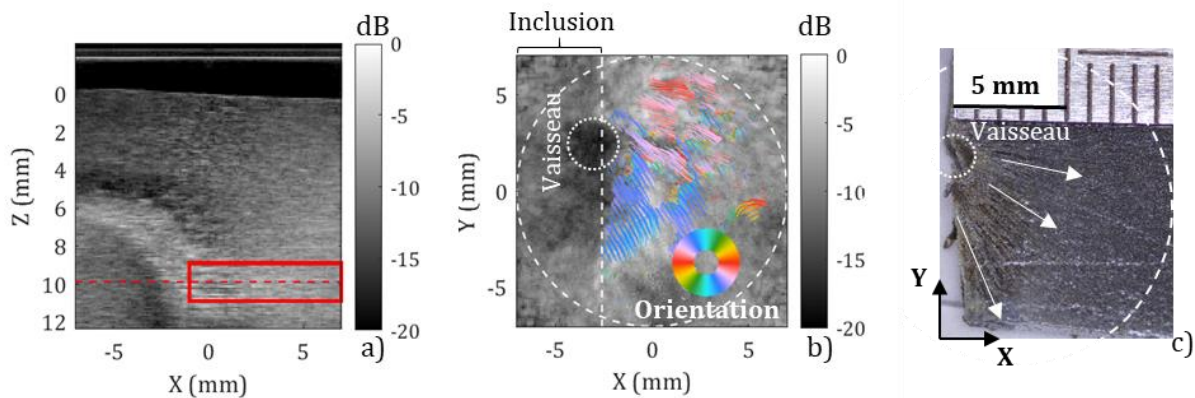


Figure 39 : a) Mode B obtenu dans le plan ZX à partir de l'acquisition 3D. L'inclusion rigide se trouve en bas à gauche. Le rectangle rouge correspond à la profondeur sur laquelle la SACF a été calculée. Les pointillés rouges correspondent au plan médian représenté dans le mode B en b). b) Mode B obtenu dans le plan XY à partir de l'acquisition 3D. L'inclusion se trouve à gauche de l'image. On repère également le vaisseau (petit cercle en pointillés blancs rapprochés). L'orientation trouvée par le BTI est superposée en couleurs. Chaque ligne correspond à une ligne de champ tracée à partir de la carte du BTI sur laquelle les points pour lesquels l'AF était inférieure à 0,1 et la Co inférieure à 0,6 ont été retirés. Chaque ligne est colorée selon son orientation globale. Le grand cercle blanc indique le champ de vue du BTI. c) Coupe du fantôme entre 8 et 12 mm de profondeur. Les flèches indiquent l'orientation visible des particules de fer. Le grand cercle blanc indique approximativement le champ de vue de l'acquisition BTI.

4 DISCUSSION

Ce chapitre présente le premier fantôme multiparamétrique permettant d'évaluer les modalités de SWE, de Doppler ultrarapide et de BTI. Ce fantôme a également permis de tester notre séquence multiparamétrique et de valider chaque composante individuellement.

Le fantôme présentait deux zones de rigidité distinctes, différenciables avec l'Aixplorer, que notre méthode a également permis de séparer. À l'Aixplorer, la vitesse de l'onde de cisaillement mesurée était plus élevée qu'avec notre méthode (+16 % dans la matrice, non évaluable dans la zone rigide). Cela pourrait être dû à la précision de la méthode de l'ordre de 10% (Deffieux et al. 2009), à la rigidité élevée du fantôme qui saturait la mesure à l'Aixplorer ou encore aux différentes fréquences employées générant des ondes de cisaillement de fréquences différentes dont la vitesse est variable en cas de dispersion

dans le milieu (Deffieux et al. 2009). Une comparaison plus poussée des valeurs de rigidité entre notre méthode et celle de l'Aixplorer pourrait être effectuée.

Le fantôme était plus rigide que les tissus mammaires sains pour lesquels la vitesse de l'onde de cisaillement est comprise entre 1 et 3 m/s (chapitre I, Tableau 2). Les tumeurs peuvent avoir des rigidités très variables et hétérogènes allant de zones peu rigides (vitesse de l'onde de cisaillement ~ 2 m/s) à des zones très rigides (vitesse de l'onde de cisaillement > 10 m/s) (Evans et al. 2012 ; Shi et al. 2018). Une amélioration du fantôme consisterait à ajouter des zones moins rigides pour se rapprocher des tissus mammaires. Néanmoins, cette modification risquerait de rendre le fantôme moins durable et de rendre la cavité servant à mimer le vaisseau instable.

La cavité parcourant le fantôme a permis de faire passer un fluide imitant le sang le long d'une géométrie 3D complexe. La cavité ne s'est pas effondrée après le retrait du cathéter et aucune fuite n'a été observée pendant l'expérience. Notre méthode de Doppler ultrarapide 3D a correctement reconstruit le vaisseau. La mesure du diamètre du vaisseau était seulement 2 % inférieure au résultat attendu. De plus, la morphologie du vaisseau reconstitué par notre méthode correspondait visiblement à celle de la cavité. Le diamètre du vaisseau a été fixé à 1 mm pour correspondre à ceux du sein humain qui s'échelonnent d'environ 5 μm à 4 mm (He et al. 2006). Les vaisseaux relevant de la néo-angiogenèse des tumeurs se situent quant à eux entre 10^0 et 10^2 μm . Un futur fantôme pourrait donc inclure plusieurs cavités dont certaines plus petites, de l'ordre de 0,1 mm de diamètre, pour mieux imiter ces vaisseaux. Néanmoins, la résolution spatiale des ultrasons, dans notre cas 0,1 mm, ne permettrait pas de mesurer précisément le diamètre.

Enfin, le principe consistant à créer une microstructure avec une orientation contrôlée grâce à une poudre de fer et à l'application d'un champ magnétique a été validé. Certaines zones du fantôme n'ont pas présenté l'orientation attendue (Figure 35 et Figure 39) ce qui pourrait être dû à une trop grande viscosité du gel lors de la préparation restreignant l'alignement des particules selon le champ magnétique. Ce défaut du fantôme n'a pas empêché la validation du BTI puisqu'il a été possible de vérifier que l'orientation mesurée au BTI était bien similaire à celle des diffuseurs grâce à des coupes visualisées au microscope. Par ailleurs, les particules ont eu tendance à se regrouper proche de l'aimant laissant des zones vides en d'autres endroits. Ainsi, le fantôme pourrait être amélioré par

un contrôle plus fin de l'organisation des diffuseurs ce qui permettrait de réaliser une étude quantitative de la précision du BTI.

5 CONCLUSION

Ce travail démontre la possibilité de réaliser un fantôme multiparamétrique pour le SWE, le Doppler ultrarapide et le BTI et valide notre méthode d'acquisition et de traitement multiparamétrique 3D pour ces trois modalités. Dans les deux chapitres suivants, la méthode présentée et validée ici sera utilisée pour la caractérisation des tumeurs mammaires afin de vérifier la pertinence des modes ultrasonores choisis pour l'amélioration du diagnostic du cancer du sein.

6 RÉFÉRENCES DU CHAPITRE

- Barber QM, Zemp RJ. Ultrasound Scattering Anisotropy Visualization With Ultrasound Tomography. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* 2017;64:335–339.
- Bercoff J, Montaldo G, Loupas T, Savery D, Mézière F, Fink M, Tanter M. Ultrafast compound doppler imaging: providing full blood flow characterization. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* 2011;58:134–147.
- Bercoff J, Tanter M, Fink M. Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* 2004;51:396–409.
- Chatelin S, Bernal M, Deffieux T, Papadacci C, Flaud P, Nahas A, Boccara C, Gennisson J-L, Tanter M, Pernot M. Anisotropic polyvinyl alcohol hydrogel phantom for shear wave elastography in fibrous biological soft tissue: a multimodality characterization. *Phys Med Biol* 2014;59:6923–6940.
- Choi HY, Sohn Y-M, Seo M. Comparison of 3D and 2D shear-wave elastography for differentiating benign and malignant breast masses: focus on the diagnostic performance. *Clinical Radiology* 2017;72:878–886.
- Culjat MO, Goldenberg D, Tewari P, Singh RS. A Review of Tissue Substitutes for Ultrasound Imaging. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2010;36:861–873.
- Dang J, Frisch B, Lasaygues P, Zhang D, Tavernier S, Felix N, Lecoq P, Auffray E, Varela J, Mensah S, et al. Development of an Anthropomorphic Breast Phantom for Combined PET, B-Mode Ultrasound and Elastographic Imaging. *IEEE Trans Nucl Sci* 2011;58:660–667.
- Deffieux T, Montaldo G, Tanter M, Fink M. Shear Wave Spectroscopy for In Vivo Quantification of Human Soft Tissues Visco-Elasticity. *IEEE Trans Med Imaging* 2009;28:313–322.
- Demené C, Tiran E, Sieu L-A, Bergel A, Gennisson JL, Pernot M, Deffieux T, Cohen I, Tanter M. 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *NeuroImage* 2016;127:472–483.
- Evans A, Whelehan P, Thomson K, Brauer K, Jordan L, Purdie C, McLean D, Baker L, Vinnicombe S, Thompson A. Differentiating benign from malignant solid breast masses: value of shear wave elastography according to lesion stiffness combined with greyscale ultrasound according to BI-RADS classification. *Br J Cancer Nature Publishing Group*, 2012;107:224–229.
- He Y, Shirazaki M, Liu H, Himeno R, Sun Z. A numerical coupling model to analyze the blood flow, temperature, and oxygen transport in human breast tumor under laser irradiation. *Computers in Biology and Medicine* 2006;36:1336–1350.
- IEC 60601-2-37:2007. Medical Electrical Equipment—Part 2-37: Particular Requirements for the Basic Safety and Essential Performance of Ultrasonic

- Medical Diagnostic and Monitoring Equipment. International Electrotechnical Commission. Available from: <https://webstore.iec.ch/publication/2652>
- Kaushik S, Pickup MW, Weaver VM. From transformation to metastasis: deconstructing the extracellular matrix in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2016;35:655–667.
- Lee SH, Chang JM, Kim WH, Bae MS, Cho N, Yi A, Koo HR, Kim SJ, Kim JY, Moon WK. Differentiation of benign from malignant solid breast masses: comparison of two-dimensional and three-dimensional shear-wave elastography. *Eur Radiol* 2013;23:1015–1026.
- Oglat AA, Matjafri MZ, Suardi N, Oqlat MA, Abdelrahman MA, Oqlat AA, Farhat OF, Alkhateb BN, Abdalrheem R, Ahmad MS, et al. Chemical Items Used for Preparing Tissue-Mimicking Material of Wall-Less Flow Phantom for Doppler Ultrasound Imaging. *J Med Ultrasound* 2018;26:123–127.
- Papadacci C, Finel V, Provost J, Villemain O, Bruneval P, Gennisson J-L, Tanter M, Fink M, Pernot M. Imaging the dynamics of cardiac fiber orientation in vivo using 3D Ultrasound Backscatter Tensor Imaging. *Sci Rep* 2017;7:1–9.
- Papadacci C, Tanter M, Pernot M, Fink M. Ultrasound backscatter tensor imaging (BTI): analysis of the spatial coherence of ultrasonic speckle in anisotropic soft tissues. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2014;61:986–996.
- Pernot M, Deffieux T, Gennisson J-L, Tanter M, Fink M, Sinkus R, Annic P, Cudeiro F, Montaldo G, Bercoff J. 4J-5 A 3D Elastography System Based on the Concept of Ultrasound-Computed Tomography for In Vivo Breast Examination. 2006 IEEE Ultrasonics Symposium Vancouver, BC, Canada: IEEE, 2006 [cited 2022 Jul 16]. pp. 1037–1040. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/4152125/>
- Rickey DW, Picot PA, Christopher DA, Fenster A. A wall-less vessel phantom for Doppler ultrasound studies. *Ultrasound in Medicine & Biology* 1995;21:1163–1176.
- Shi X-Q, Li J, Qian L, Xue X, Li J, Wan W. Correlation between elastic parameters and collagen fibre features in breast lesions. *Clinical Radiology* 2018;73:595.e1-595.e7.
- Tian J, Liu Q, Wang X, Xing P, Yang Z, Wu C. Application of 3D and 2D quantitative shear wave elastography (SWE) to differentiate between benign and malignant breast masses. *Sci Rep Nature Publishing Group*, 2017;7:41216.
- Turquin E, Petrusca L, Bernard O, Viallon M, Liebgott H, Varray F. Local Orientation Imaging for Tissue Structure Using Ultrasound Imaging. *IRBM* 2017;38:298–303.
- Youk JH, Gweon HM, Son EJ, Chung J, Kim J-A, Kim E. Three-dimensional shear-wave elastography for differentiating benign and malignant breast lesions: comparison with two-dimensional shear-wave elastography. *Eur Radiol* 2013;23:1519–1527.

Chapitre IV

Analyse multiparamétrique de tumeurs humaines *ex vivo*

1 INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Après avoir développé une séquence ultrasonore multiparamétrique 3D (chapitre III), nous proposons dans ce chapitre de l'appliquer à des cancers du sein humain *ex vivo* afin de tester sa faisabilité et d'évaluer son intérêt diagnostique.

Actuellement, la recherche en imagerie médicale pour le cancer du sein poursuit deux objectifs principaux. D'une part, les radiologues ont besoin d'outils améliorés pour mieux distinguer les lésions bénignes des lésions malignes de manière non invasive. Ainsi, en rendant l'imagerie plus spécifique, le nombre de biopsies inutiles pourrait être réduit. Ce prélèvement de tissus est nécessaire pour établir un diagnostic définitif pour toutes les lésions catégorisées BI-RADS 4 ou 5 correspondant à un risque de cancer estimé supérieur à 2 %. Cette technique invasive est fiable mais souffre d'un taux élevé de résultats bénins. En effet, seuls 28,6 % conduisent à un diagnostic de cancer (Lehman et al. 2017), ce qui cause aux femmes un stress inutile et une possible perte de confiance dans le dépistage du cancer du sein. D'autre part, des modalités d'imagerie non invasives capables de caractériser les cancers du sein aideraient les médecins à prendre des décisions de traitement adaptées aux patients plus rapidement. Le travail présenté dans ce chapitre se concentre sur ce dernier point en évaluant l'intérêt d'une approche ultrasonore multiparamétrique en 3D pour la caractérisation des signatures biopathologiques des cancers du sein. Pour cet objectif, nous avons cherché à combiner différentes modalités d'imagerie ultrasonore complémentaires au sein d'un même protocole d'acquisition.

L'échographie est couramment utilisée pour les femmes présentant un examen clinique anormal, une lésion suspecte sur les mammographies ou ayant des seins denses. Plusieurs modes échographiques sont utilisés ou étudiés pour améliorer le diagnostic du cancer du sein. En complément du mode B, l'élastographie par ondes de cisaillement (SWE) est déjà largement déployée en clinique pour différencier les masses bénignes des masses malignes (Evans et al. 2012 ; Tanter et al. 2008). La capacité du SWE à caractériser le stade des carcinomes (Bae et al. 2017) et les sous-types immunohistochimiques (Denis et al. 2016) reste un sujet de recherche.

Par ailleurs, l'angiogenèse étant l'un des mécanismes fondamentaux de la croissance tumorale, différents modes échographiques sont étudiés pour évaluer les propriétés de la

vascularisation tels que différentes techniques d'imagerie Doppler (dont le Doppler ultrarapide), l'imagerie ultrasonore de contraste (*contrast-enhanced ultrasound – CEUS*) (Stanzani et al. 2014), la microscopie de localisation ultrasonore (ULM) (Opacic et al. 2018) ou la superbe imagerie microvasculaire (*superb microvascular imaging – SMI*) (Zhan et al. 2016).

Enfin, d'autres techniques récentes explorent l'organisation microscopique des tissus en se basant sur la cohérence de l'onde ultrasonore rétrodiffusée, comme la cohérence spatiale sur faible intervalle (*short-lag spatial coherence – SLSC*) (Wiacek et al. 2020) proche de l'imagerie du tenseur de rétrodiffusion (BTI). Pour rappel du chapitre I, les fibres de collagène structurent les tissus et influencent le développement du cancer et sa propagation vers d'autres organes (Dai et al. 2020 ; Ouellette et al. 2021). Des études ont montré des liens entre les propriétés des fibres de collagène et la survie des malades (Conklin et al. 2011 ; Morkunas et al. 2021), l'invasion des cellules cancéreuses (Sprague et al. 2021), et la récurrence après un carcinome canalaire *in situ* (CCIS) (Conklin et al. 2011 ; Sprague et al. 2021 ; Toss et al. 2019). Au moins huit motifs d'organisation des fibres de collagène caractéristiques des tumeurs, les TACS (*tumor associated collagen signatures*, chapitre I section 1.2.5) ont été décrits à différentes échelles allant de 100 μm à quelques millimètres (Xi et al. 2021). Cependant, les techniques actuelles d'évaluation des TACS reposent sur l'imagerie optique, comme par exemple l'analyse d'images à partir de coupes histologiques colorées, l'imagerie de seconde harmonique (*second-harmonic generation microscopy – SHG*), la microscopie deux photons (*two-photon microscopy*) et la fluorescence (Zunder et al. 2020). Ces méthodes nécessitent des biopsies ou sont limitées aux tissus superficiels. Des travaux récents dans le domaine de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont montré que l'imagerie par diffusion (*diffusion-weighted imaging – DWI* ou *diffusion tensor imaging – DTI*) (Egnell et al. 2020 ; Kakkad et al. 2016) est corrélée aux propriétés du collagène. Toutefois, l'IRM demeure une méthode coûteuse et peu disponible. Elle est, de surcroît, rarement utilisée pour le dépistage du cancer du sein, contrairement à l'échographie. À notre connaissance, aucun travail n'a cependant validé la capacité des ultrasons à déterminer l'organisation des fibres de collagène dans les tumeurs mammaires.

Dans ce chapitre, le protocole d'imagerie multiparamétrique présenté au chapitre précédent a été appliqué à des tumeurs *ex vivo* du sein humain. Cette étude visait à

reconstruire grâce aux ultrasons une représentation multiparamétrique 3D de tumeurs associant anatomie, élasticité et organisation des tissus, à valider le lien entre le BTI et l'organisation des fibres de collagène visibles sur les coupes histologiques ainsi qu'à rechercher de nouveaux marqueurs pertinents pour le diagnostic. Il est à noter que l'imagerie de vascularisation est absente de cette étude car inapplicable aux tissus *ex vivo*.

Le travail exposé dans ce chapitre a été réalisé au service de pathologie de la Pr. Anne Vincent-Salomon à l'Institut Curie (Paris, France) avec la collaboration de la Dr. Anne Tardivon, radiologue (annotation des données), du Dr. Lounes Djerroudi, pathologiste (analyse), de la Dr. Charlotte Martinat, ingénieure (collecte des données cliniques) ainsi qu'avec l'ensemble des médecins et techniciens du service de pathologie qui nous ont appuyés pour le repérage des tumeurs au sein des pièces opératoires.

2 MÉTHODES

2.1 Inclusion des patients

Conformément à la réglementation française, tous les participants de cette étude ont fourni leur consentement écrit autorisant l'accès à leurs données médicales à des fins de recherche. Un comité d'évaluation interne à l'Institut Curie pour les études sur les données des patients (CRI data) a autorisé l'utilisation et le transfert des données cliniques pertinentes. Le groupe de travail thématique (GTT) « sein » de l'Institut Curie a approuvé l'ensemble des procédures. Les données cliniques pertinentes (âge, grade de la tumeur, type de tumeur...) ont été extraites des rapports médicaux anonymisés et établis par les pathologistes.

Nous avons inclus toutes les mastectomies et tumorectomies¹⁴ sans chimiothérapie néoadjuvante¹⁵ réalisées pendant les sept semaines de l'étude, à l'exception de celles requises par le pathologiste pour un diagnostic immédiat. Notre méthode d'imagerie multiparamétrique a ainsi été appliquée sur 98 tumeurs.

La position des tumeurs a été estimée par palpation et par imagerie en mode B. Sur les 98 cas, trois cas ont été exclus : le premier a été retiré car le tissu dans les sections

¹⁴ Lorsque tout le sein est retiré on parle de mastectomie. Lorsqu'une partie seulement du sein est retirée, on parle de tumorectomie.

¹⁵ Chimiothérapie effectuée avant l'opération chirurgicale

histologiques était trop fragmenté pour effectuer notre analyse d'images (section 2.4) et les deux autres parce qu'il n'y avait pas de tumeur dans la mastectomie selon les rapports des pathologistes. Une radiologue expérimentée a vérifié ultérieurement les acquisitions menant à l'exclusion de 31 cas pour lesquels aucune masse n'était détectable au mode B. Notre analyse a donc porté sur 64 cas validés. La description de la cohorte, y compris les informations sur le grade, le statut ganglionnaire (avec ou sans métastases), le statut des récepteurs d'œstrogène et de HER2 pour les 52 cas invasifs validés, se trouve dans le Tableau 6.

	Cas inclus	Sur les carcinomes invasifs seulement	
N	64 (incl. 3 hommes)	Grade (EE)	
		G1	10 (19,2%)
Âge		G2	36 (69,2%)
Moyenne (années)	62,8	G3	6 (11,5%)
Fourchette (années)	40 - 88	pN	
Type histologique		N+	8 (15,4%)
Canalaire TNS	34 (53,1%)	N-	42 (80,8%)
Canalaire <i>in situ</i>	12 (18,8%)	Nx	2 (3,8%)
Lobulaire infiltrant	9 (14,1%)	ER	
Autres infiltrant	9 (14,1%)	ER+	50 (96,2%)
Taille tumorale		ER-	2 (3,8%)
Médiane (mm)	16	HER2	
Interquartile (mm)	15	HER2+	6 (11,5%)
		HER2-	46 (88,5%)

Tableau 6 : Description de la cohorte comportant le nombre de prélèvements (N), l'âge et le type de cancer des patients (TNS = type non spécifique) ainsi que la taille des tumeurs. La caractérisation des carcinomes en termes de grade (EE = Elston-Ellis), de présence de métastases dans les ganglions lymphatiques (pN – Nx signifie non évalué), et du statut des récepteurs œstrogène (ER) et HER2 a été réalisée sur les 52 cas de carcinomes invasifs.

2.2 Acquisition ultrasonore

2.2.1 Matériel

Le système d'acquisition ultrasonore était identique à celui présenté au chapitre III. En revanche, la sonde utilisée était, comme au chapitre II, une sonde linéaire L7-4 (Philips - ATL, Amsterdam, Pays-Bas, pitch 0,298 mm, largeur de bande 4-7 MHz) comportant 128 éléments, choisie pour sa sensibilité d'imagerie et sa capacité à supporter une forte puissance à l'émission. La fréquence de transmission était de 5,2 MHz

(fréquence centrale). La distance focale de la sonde était de 25 mm. Cette dernière était fixée au même dispositif motorisé qu'aux chapitres précédents permettant trois degrés de translation (X-Y-Z) (VT 80, Physik Instrumente, Karlsruhe, Allemagne) et un degré de rotation (θ dans le plan XY) (DT 80, Physik Instrumente, Karlsruhe, Allemagne). Le porte-sonde était adapté à la sonde employée.

Les tissus mammaires étaient placés dans un sac en plastique (TissueSAFE®, Milestone Medical, Sorisole, Italie) et mis sous vide immédiatement après leur résection. Le sac était ensuite immergé dans de l'eau distillée pour assurer le couplage acoustique et permettre à la sonde de se déplacer au-dessus sans le toucher (Figure 40).

Par convention, l'axe Z est l'axe vertical. L'axe X est aligné avec la dimension latérale de la sonde et l'axe Y correspond à l'élévation lorsque $\theta = 0^\circ$ (position initiale). Chaque acquisition était faite de manière à ce que la tumeur soit proche du centre du volume imagé.

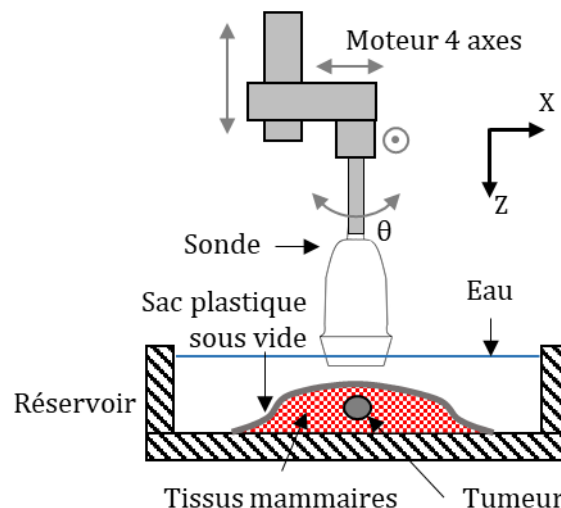


Figure 40 : Schéma du montage de l'acquisition. Les tissus mammaires étaient placés dans un sac plastique sous vide et immergés sous l'eau. Attachée à un moteur quatre axes, la sonde linéaire pouvait se déplacer sans les toucher afin de scanner le volume d'intérêt.

2.2.2 Estimation de la vitesse du son

Avant chaque acquisition multiparamétrique, la vitesse du son a été estimée au centre de la sonde proche de la focale afin d'optimiser la précision de la méthode de calcul du BTI. La méthode utilisée est celle décrite dans l'étude d'Imbault et al., 2017:

- i. La sonde émettait 101 ondes planes (inclinaison avec un pas angulaire de $0,4^\circ$ de -20° à $+20^\circ$).

- ii. La cohérence spatiale de la ligne centrale de notre image était ensuite calculée pour différentes valeurs de la vitesse du son (entre 1400 et 1600 m/s) lors de la reconstruction du mode B.

La vitesse du son dans le milieu était estimée égale à celle donnant la cohérence maximale lors de la phase (ii). La vitesse ainsi trouvée était par la suite employée dans toutes les acquisitions suivantes pour calculer les délais en émission et en réception.

2.2.3 Mode B

Le mode B a été réalisé à partir de l'acquisition BTI comme au chapitre III.

2.2.4 SWE

Le SWE a consisté en 3 scans linéaires à 0°, 45° et 90° comme au chapitre III. Chaque scan comprenait entre 21 et 41 acquisitions (médiane de 27 acquisitions) selon la taille de la tumeur, avec un pas de 1 mm. À chaque position, sept ondes de cisaillement ont été générées et réparties linéairement le long de l'axe de la sonde. Chaque onde de cisaillement a été induite par cinq focalisations de 80 μ s à 60 V avec un facteur d'utilisation (*duty cycle*) de 100 % et un nombre F de 1,5. Elles ont été suivies par imagerie ultrarapide avec 26 images à 2516 Hz. Pour chaque image, cinq ondes planes ont été émises avec un pas de 4° allant de -8° à +8°.

Le SWE 3D a été reconstruit en faisant la moyenne de tous les plans SWE dans les différentes orientations comme dans le chapitre III.

2.2.5 BTI

Le BTI 3D a été réalisé selon la méthode présentée au chapitre II. Le volume scanné par le BTI correspondait à un cylindre de 25 mm de diamètre et de 35 mm de profondeur. Le temps d'acquisition était d'environ 20 minutes (chapitre II).

Après obtention de l'information d'orientation locale du milieu grâce au BTI, un « score radial » a été défini (équation IV.2) pour caractériser l'organisation des tissus autour de la tumeur détectée par notre méthode. Ce score est proche de 1 lorsque l'orientation trouvée par le BTI est normale au bord de la tumeur (structure tissulaire en « étoile » partant de la tumeur) et de 0 lorsque l'orientation y est tangente (structure tissulaire « enveloppant » la tumeur). Ce score a été calculé sur tous les plans XY contenant une partie du centre de la tumeur, tel que défini dans la section 2.3. Les plans supérieurs et

inférieurs n'ont donc pas été pris en compte pour éviter les effets de bord. Pour chaque plan (Z), nous avons défini un champ de vecteurs « purement radial » ($\Theta_z(x, y)$) comme référence en deux étapes :

- i. l'orientation θ_k^z de la normale de chaque pixel k sur le bord de la tumeur a été déterminé en utilisant le gradient puis converti en un nombre complexe $e^{i\theta_k^z}$ avec un module de 1.
- ii. pour chaque pixel (x, y) dans le plan, nous avons calculé l'argument de la somme de tous les nombres complexes calculés en i avec un poids diminuant avec la distance entre le pixel (x, y) et le k^{ème} point du bord de la tumeur $d_k^z(x, y)$:

$$\Theta_z(x, y) = \arg \left(\sum_{k \in \mathcal{B}_z} e^{-d_k^z(x, y)} e^{i\theta_k^z} \right) \quad (\text{IV. 1})$$

Où \mathcal{B}_z est l'ensemble des pixels de la bordure de la tumeur dans le plan Z.

Enfin, le score radial a été défini pour chaque voxel (x, y, z) en pondérant le cosinus de la différence entre l'orientation locale α_z et celle de la référence purement radiale par la valeur d'anisotropie fractionnelle (AF) locale dans chaque pixel :

$$S_{radial}^{BTI}(x, y, z) = | AF(x, y, z) \times \cos(\alpha_z(x, y) - \Theta_z(x, y)) | \quad (\text{IV. 2})$$

Les scores radiaux globaux sont donnés par la moyenne de l'ensemble des S_{radial}^{BTI} de tous les pixels d'une zone donnée dans tous les plans centraux XY (voir section 2.3 pour la définition des zones) normalisés par la somme de toutes les valeurs d'AF correspondantes :

$$S_{radial}^{BTI} = \frac{\sum_{x, y, z \in \mathcal{P}} S_{radial}^{BTI}(x, y, z)}{n \sum_{x, y, z \in \mathcal{P}} AF(x, y, z)} \quad (\text{IV. 3})$$

Où \mathcal{P} est l'ensemble des n points situés dans la zone considérée dans tous les plans sélectionnés (plans centraux).

Le score tangent local et le score tangent global ont été définis de manière similaire :

$$S_{tangent}^{BTI}(x, y, z) = | AF(x, y, z) \times \sin(\alpha_z(x, y) - \Theta_z(x, y)) | \quad (\text{IV. 4})$$

$$S_{tangent}^{BTI} = \frac{\sum_{x, y, z \in \mathcal{P}} S_{tangent}^{BTI}(x, y, z)}{n \sum_{x, y, z \in \mathcal{P}} AF(x, y, z)} \quad (\text{IV. 5})$$

2.2.6 Représentation multiparamétrique 3D

Les représentations 3D des tumeurs ont été reconstruites à partir des valeurs du mode B dans tout le champ de vue, du SWE dans la tumeur (zone union) et, de l'orientation et de l'AF du BTI dans la frontière de la tumeur en utilisant Houdini FX Version 19.0.531 (SideFX, Toronto, Ontario, Canada). Les zones sont définies ci-dessous (section 2.3).

2.3 Contour des tumeurs au mode B et zones

Les tumeurs ont été contourées par une radiologue dès lors qu'elles étaient visibles au mode B à l'aide d'une application Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, États-Unis), réalisée pour le projet (Figure 41) et permettant de dessiner le contour de la tumeur tous les 1 mm dans deux directions perpendiculaires. Les deux volumes ainsi créés sont nommés « volume X » et « volume Y » selon l'orientation de la normale aux plans dans lequel le contour était effectué. Les différentes zones sur lesquelles les analyses ont été réalisées sont définies comme suit :

- Intersection : intersection des volumes X et Y
- Union : union des volumes X et Y
- Cœur : homothétie de 50 % de l'intersection par rapport au barycentre de la tumeur
- Zone péri-tumorale : anneau de 5 mm entourant l'union
- Frontière : anneau de 2 mm de part et d'autre de la limite de l'union

Par ailleurs, les « tissus distants » correspondent aux tissus situés au-delà de la zone péri-tumorale (Figure 42).

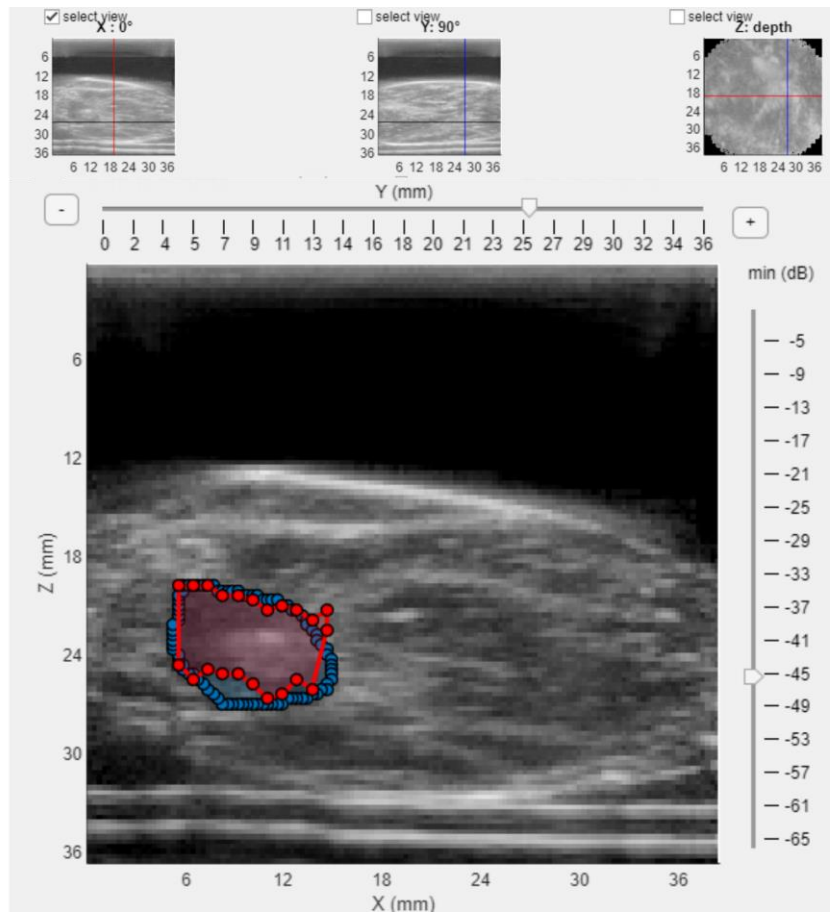


Figure 41 : Application Matlab permettant de réaliser le contour de la tumeur plan par plan dans deux directions. En haut, les coupes de la tumeur sont affichées dans trois plans perpendiculaires. Au centre, le mode B dans le plan X. En bleu, le contour de la tumeur réalisé dans le plan X. En rouge, le contour de la tumeur réalisé sur les coupes des plans Y. Note : les deux traits horizontaux en profondeur correspondent au réservoir dans lequel se trouvent les tissus mammaires.

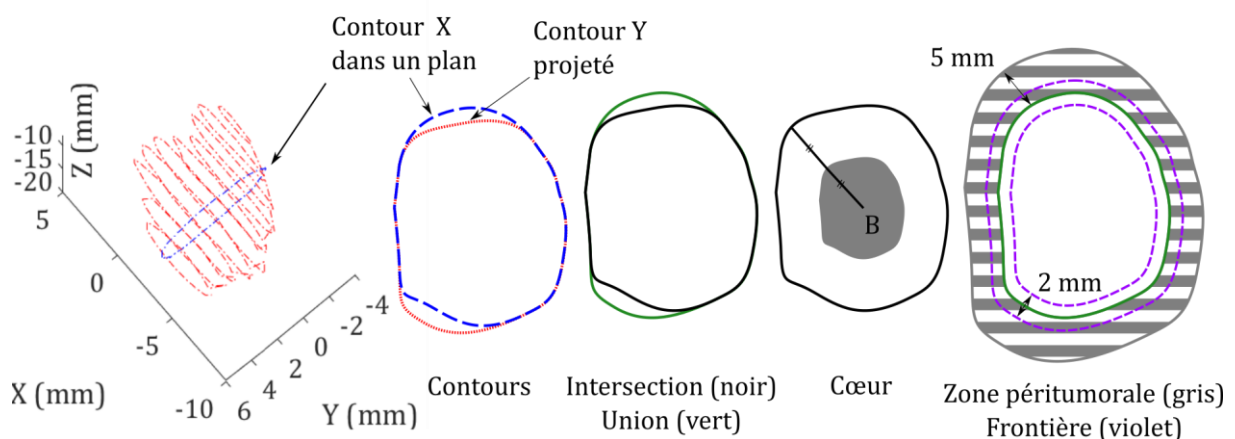


Figure 42 : Schéma des différentes zones étudiées. La tumeur est contourée dans deux directions (X et Y) donnant deux volumes. L'intersection et l'union des volumes servent de références pour la zone tumorale. Le cœur correspond à une homothétie de 0,5 de l'intersection. La zone péri tumorale correspond à un anneau de 5 mm au-delà de l'union. La frontière correspond à un anneau de 2 mm de part et d'autre de la limite de l'union. Enfin, les tissus distants correspondent à la zone située au-delà de la zone péri tumorale.

2.4 Analyse histologique

2.4.1 Coupes histologiques et contours de la tumeur

Le protocole pour l'analyse immunohistochimique des tumeurs du sein était celui utilisé par l'équipe de pathologie de l'Institut Curie dans leur pratique clinique standard. Toutes les tumeurs ont été fixées dans du formaldéhyde à 10 % pendant 36 heures et incluses dans des blocs de paraffine (*formalin fixed paraffin embedded* – FFPE). Les échantillons ont ensuite été découpés en fines sections de 3 μm et colorés en HES c'est-à-dire avec de l'hématoxyline de Mayer (Dako, réactif de coloration histologique S3309, Santa Clara, Californie, États-Unis), de l'éosine (RAL Diagnostics, Martillac, France) et du safran (RAL Diagnostics, Martillac, France).

Pour tous les cas validés, une coupe représentative a été sélectionnée par un pathologiste qui a également confirmé notre segmentation manuelle de la zone tumorale sur cette dernière. De même que pour l'échographie (section 2.3), la zone péri-tumorale a été définie comme la zone autour du contour de la tumeur jusqu'à + 5 mm et la frontière comme la zone comprise dans une bande de 2 mm de part et d'autre du bord de la tumeur.

2.4.2 Estimation de l'orientation des fibres de collagène

L'orientation locale et la densité des fibres de collagène ont été estimées à partir des coupes histologiques grâce à un processus d'analyse d'images mis en place dans le cadre de cette thèse. Tout d'abord, les fibres de collagène (Figure 43 a, en orange) ont été segmentées en utilisant un seuil dans l'espace couleur HSV (Figure 43 b1). Ensuite, la transformée de Radon a été calculée sur chaque patch de 1,5 mm x 1,5 mm de l'image (environ $10^2 - 10^3$ pixels dans chaque dimension) avec un pas angulaire de 10° . Une ellipse a alors été ajustée (Ohad Gal 2021) au tracé polaire de la valeur maximale de la transformée de Radon selon l'angle de sa projection (Figure 43 b2).

Enfin, l'orientation locale α des fibres a été estimée égale à l'orientation de l'axe principal de l'ellipse en y ajoutant 90° ¹⁶. L'intensité des fibres I a été définie comme la moitié de la valeur du grand axe de l'ellipse (Figure 43 b3).

¹⁶ Par construction, la transformée de Radon est maximale lorsque la fibre est perpendiculaire à la projection.

Comme pour le BTI, un champ vectoriel Θ correspondant à une orientation « radiale pure » a été créé (Figure 43 c).

Enfin, un score radial pour les sections histologiques a été défini comme suit :

$$S_{radial}^{histo}(x, y) = |I(x, y) \times \cos(\alpha(x, y) - \Theta(x, y))| \quad (IV. 6)$$

Le score radial global est donné par la moyenne de l'ensemble des S_{radial}^{histo} de tous les pixels de la zone considérée dans la section histologique sélectionnée, divisée par la somme de toutes les valeurs d'intensité :

$$S_{radial}^{histo} = \frac{\sum_{x,y \in \mathcal{P}} S_{radial}^{histo}(x, y)}{n \sum_{x,y \in \mathcal{P}} I(x, y)} \quad (IV. 7)$$

Où \mathcal{P} est l'ensemble des n points de la zone considérée.

2.5 Analyse statistique

La comparaison des valeurs du SWE et du BTI dans les différentes zones des tumeurs (cœur, union, frontière, zone péri-tumorale), présentée dans la section 3.2, a été réalisée avec le test-t de Student. La corrélation entre le score radial des fibres de collagène évalué sur les coupes histologiques et le score radial de BTI (section 3.3) a été calculée en utilisant la corrélation de Pearson. Enfin, les différences statistiques entre les différents groupes formés sur la base des caractéristiques pathologiques (section 3.4) ont été évaluées avec le test-t de Welch, une variante du test-t de Student ne supposant pas que les distributions ont des variances égales.

Les tests sont considérés non significatifs (n.s.) si $p \geq 0,05$. La notation suivante est utilisée pour indiquer le degré de significativité : « * » si $p < 0,05$, « ** » si $p < 0,01$, « *** » si $p < 0,001$, « >*** » si $p < 0,0001$.

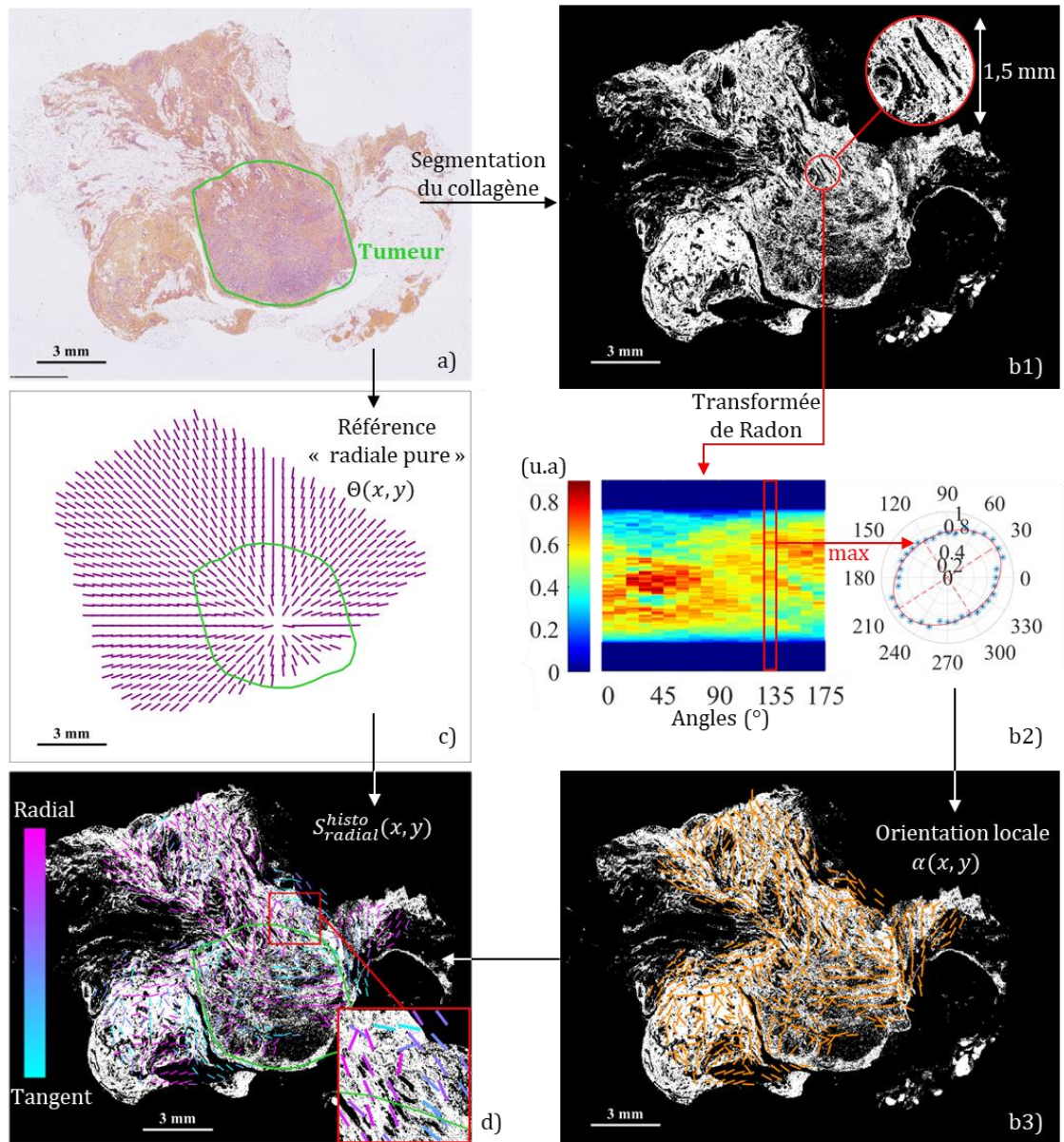


Figure 43 : Estimation de l'orientation du collagène sur une coupe histologique d'une tumeur canalaire TNS (grade 2, ER+, HER2-). a) Coupe histologique typique. b1) Seuil pour créer un masque des fibres de collagène. b2) La transformée de Radon est effectuée sur des patches de 1,5 mm x 1,5 mm du masque. Chaque point du diagramme polaire correspond au maximum de la transformée de Radon (ρ) pour l'orientation du patch (θ). Une ellipse est alors ajustée. L'orientation de son grand axe permet de déduire l'orientation du collagène dans le patch. La valeur de son demi-grand axe donne l'intensité I . b3) Carte avec l'orientation locale. c) Carte de la référence « radiale pure ». d) Orientation locale, comme en b3, avec une échelle de couleur correspondant au score radial.

3 RÉSULTATS

3.1 Représentation multiparamétrique

La méthode développée dans ce chapitre a permis une représentation 3D des mesures effectuées par les trois modalités utilisées (mode B, SWE et BTI) pour chaque tumeur. Un exemple des différentes représentations est visible en Figure 44.

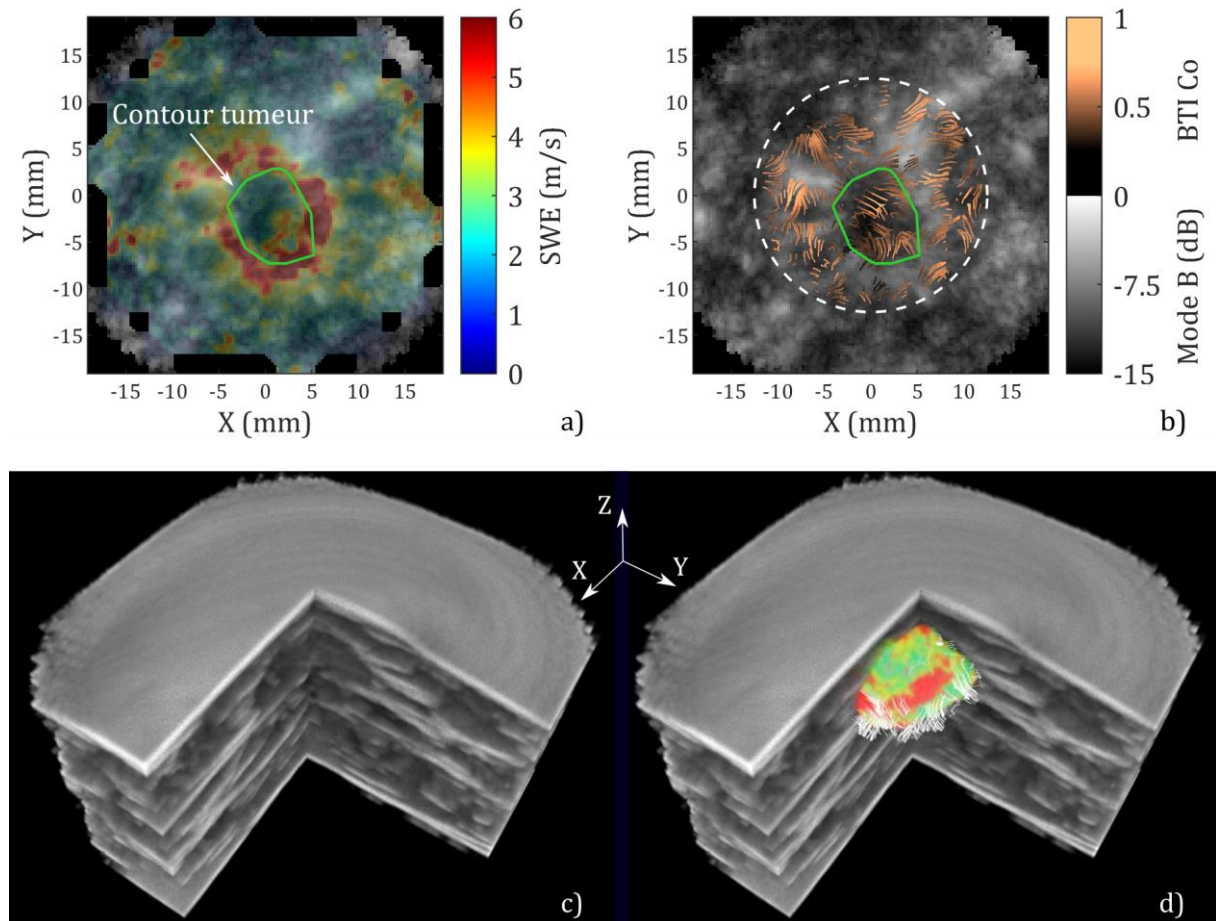


Figure 44 : Représentation multiparamétrique 3D d'une tumeur canalaire de TNS (grade 3, ER+, HER+). a) SWE superposé au mode B sur une coupe horizontale. b) Orientation du BTI (seuil BTI AF > 0,2) représentée avec la fonction streamline de Matlab. La couleur cuivre donne le niveau de BTI Co local sur chaque fibre ainsi déterminée. c) Coupe en mode B 3D (la tumeur correspond à une zone plus sombre au centre). d) Représentation multiparamétrique 3D avec le mode B, le SWE dans l'union et l'orientation du BTI à la frontière.

3.2 Contraste des paramètres dans et autour de la tumeur

Les valeurs du SWE étaient significativement plus élevées ($p < 10^{-4}$) dans la zone péri-tumorale que dans la tumeur, son cœur, et les tissus distants (Figure 45 a). Le BTI Co était significativement ($p < 10^{-6}$) plus faible à l'intérieur de la tumeur qu'à l'extérieur, (Figure 45 b). Au contraire, le BTI AF était significativement ($p < 6 \times 10^{-3}$) plus grand à l'intérieur de la tumeur qu'à l'extérieur (Figure 45 c).

	SWE (m/s)				BTI Co				BTI AF			
	M	σ	min	max	M	σ	min	max	M	σ	min	max
Cœur	2,78	0,856	1,46	5,32	0,403	0,110	0,066	0,648	0,360	0,156	0,138	0,892
Union	3,24	0,773	1,65	5,29	0,428	0,081	0,130	0,546	0,349	0,100	0,237	0,674
Zone péri-tumor.	3,69	1,04	2,00	7,68	0,487	0,054	0,267	0,576	0,293	0,057	0,186	0,483
Tissus distants	3,12	0,793	2,00	5,74	0,487	0,052	0,353	0,586	0,303	0,051	0,145	0,417

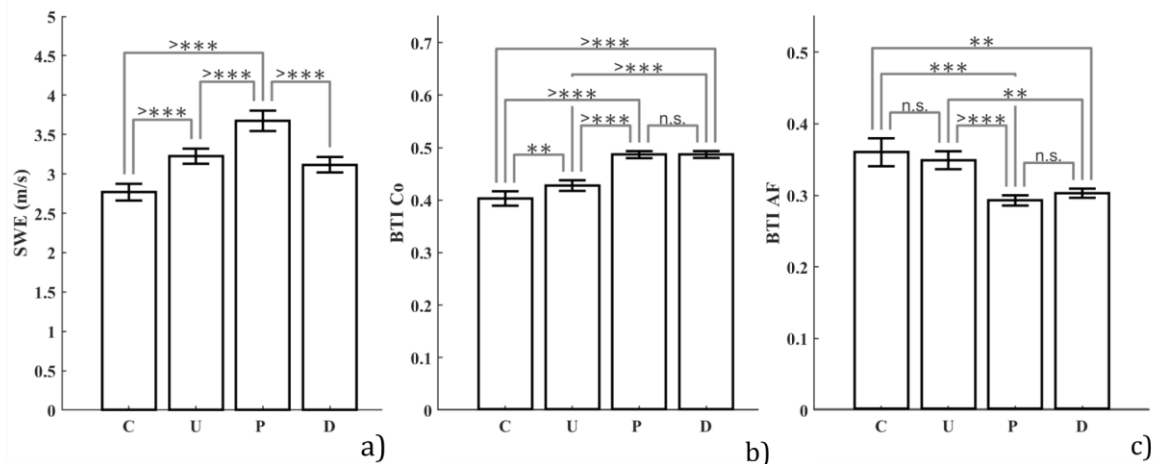


Figure 45 : Tableau des moyennes M, écarts-types σ , minimums et maximums du SWE (a), BTI Co (b) et BTI AF (c) dans les différentes zones. Diagrammes à barres des moyennes des différents paramètres mesurés dans le cœur de la tumeur C, dans l'union U, dans la zone péri-tumorale P et dans les tissus distants D. Les barres d'erreur correspondent à la SEM calculée sur les $N = 64$ tumeurs. a) La rigidité est la plus importante dans la zone péri-tumorale. b) La Co est plus faible dans la tumeur qu'à l'extérieur. c) L'AF est plus élevée dans la tumeur qu'à l'extérieur.

3.3 Corrélation entre le BTI et l'orientation du collagène

Les scores radiaux calculés avec le BTI (S_{radial}^{BTI}) et avec les coupes histologiques (S_{radial}^{histo}) dans la zone péri-tumorale étaient corrélés, (Figure 46). Le coefficient de corrélation de Pearson entre les deux variables était égal à 0,48 avec une valeur p significative ($p < 10^{-4}$).

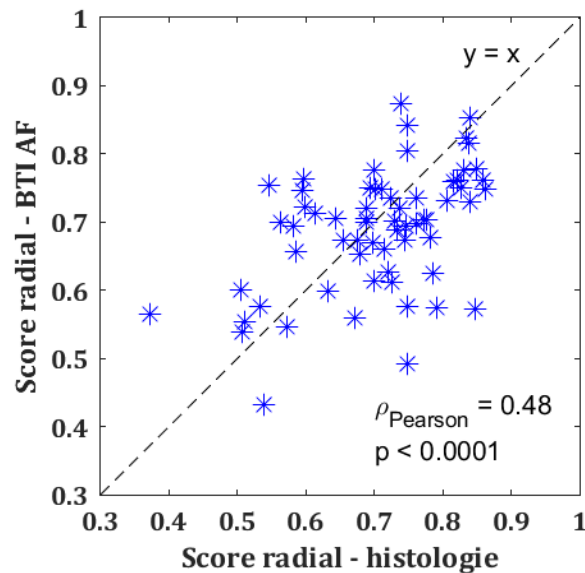


Figure 46 : Score radial calculé à partir du BTI AF en fonction du score radial calculé à partir des fibres de collagène détectées sur les coupes histologiques. Une corrélation significative a été trouvée ($p < 0.0001$) sur $N = 64$ tumeurs.

3.4 Corrélation entre le BTI et les caractéristiques biopathologiques des cancers

3.4.1 Corrélations à partir des scores radial et tangent du BTI

Le rapport a été évalué entre les scores radial et tangent du BTI $S_{radial}^{BTI} / S_{tangent}^{BTI}$ dans la frontière et la zone péri-tumorale selon le stade d'invasivité et le statut HER2 des tumeurs afin d'évaluer l'intérêt de ce score comme marqueur diagnostique (Tableau 7).

Le score moyen $S_{radial}^{BTI} / S_{tangent}^{BTI}$ était plus élevé dans les cas invasifs que dans les cas *in situ*, dans la frontière comme dans la zone péri-tumorale. Les tissus entourant les carcinomes *in situ* étaient donc plutôt enveloppants quand ceux des cas invasifs étaient plus radiaux.

Dans la frontière, le score moyen $S_{radial}^{BTI} / S_{tangent}^{BTI}$ était significativement plus élevé pour les cas HER2- par rapports aux cas HER2+. En revanche, dans la zone péri-tumorale, le score était équivalent quel que soit le statut HER2.

		<i>in situ</i>	invasif	HER2-	HER2+	
$S_{radial}^{BTI} / S_{tangente}^{BTI}$	Frontière	M	0,933	1,10	1,12	0,917
		σ	0,231	0,356	0,368	0,179
		p-val	0,058		0,046 (*)	
	Zone péritumorale	M	1,09	1,28	1,29	1,25
		σ	0,205	0,384	0,386	0,397
		p-val	0,022 (*)		0,847	

Tableau 7 : Valeurs des moyennes M et écarts-types σ du score $S_{radial}^{BTI} / S_{tangente}^{BTI}$ dans la frontière et la zone péritumorale pour les cas *in situ*, invasifs, HER2- et HER2+. Les carcinomes invasifs sont plus stellaires (score $S_{radial}^{BTI} / S_{tangente}^{BTI}$ grand) que les carcinomes *in situ*. Dans la frontière, les tumeurs HER2- sont plus stellaires que les tumeurs HER2+.

3.4.2 Corrélation entre le BTI et le grade des carcinomes canaux invasifs

La différence entre la cohérence moyenne du BTI dans la zone péritumorale et le cœur de la tumeur s'est avérée être un marqueur pertinent du grade EE des carcinomes canaux invasifs TNS (CI-TNS). Ce score était significativement plus élevé pour les CI-TNS de grade 1 que pour les CI-TNS de grades 2 et 3. Bien que non significatif ($p = 0,069$), ce score était plus élevé pour le grade 2 que pour le grade 3. Dans notre étude, le SWE n'a pas pu révéler une telle différence (Figure 47).

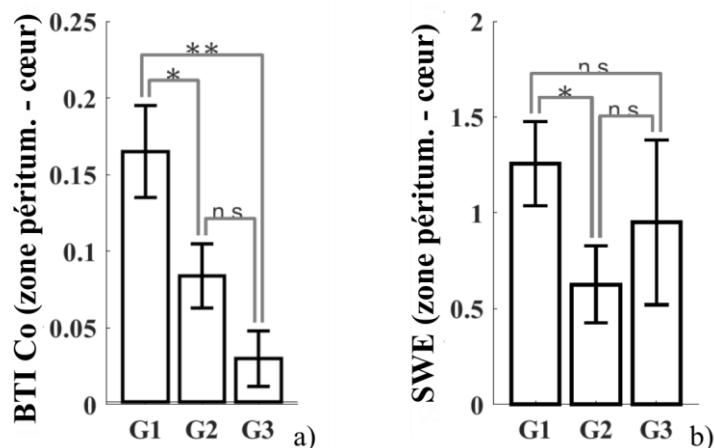


Figure 47 : a) Différence moyenne du BTI Co entre la zone péritumorale et le cœur des tumeurs CI-TNS pour chacun des grades. b) Idem mais avec les scores SWE. Grade 1 (G1) : N = 9, Grade 2 (G2) : N = 20, Grade 3 (G3) : N = 5. Les barres d'erreur correspondent à la SEM.

3.4.3 Corrélation entre le BTI et le statut des ganglions lymphatiques

Enfin, pour les carcinomes invasifs, la différence de l'écart-type de l'AF et de la Co dans la partie externe de la tumeur (intersection sauf cœur) entre les cas ayant des métastases dans les ganglions lymphatiques (pN+) et ceux sans métastases (pN-) était significative (Tableau 8).

			pN-	pN+
Écart-type de l'AF dans les tumeurs	Zone intersection sauf cœur	M	0,180	0,154
		σ	0,039	0,018
		p-val	0,0073 (**)	
Écart-type de la Co dans les tumeurs	Zone intersection sauf cœur	M	0,102	0,090
		σ	0,020	0,007
		p-val	0,0051 (**)	

Tableau 8 : Valeurs des moyennes M et écarts-types σ de l'écart-type de l'AF et de la Co dans la zone « intersection sauf cœur ». L'écart-type des valeurs de l'AF et de la Co était plus grand pour les tumeurs sans métastase que pour les tumeurs avec métastases.

4 DISCUSSION

Dans cette étude, 64 carcinomes mammaires humains *ex vivo* ont été examinés par trois modalités ultrasonores différentes (mode B, SWE et BTI). Nous avons reconstitué une représentation multiparamétrique 3D des tumeurs, montré que les marqueurs quantitatifs basés sur le SWE et le BTI étaient différents à l'intérieur et à l'extérieur des tumeurs, que l'orientation tissulaire déterminée à l'aide du BTI était corrélée avec l'orientation des fibres de collagène visibles sur les coupes histologiques correspondantes. Enfin, nous avons mis en évidence de nouveaux marqueurs prometteurs pour détecter certaines caractéristiques immuno-histochimiques utilisées pour le diagnostic du cancer du sein.

Loin d'être accessoire, la création d'une représentation multiparamétrique en 3D du mode B, du SWE et de l'orientation BTI permet de visualiser simultanément tous ces paramètres en chaque point du volume, ce qui pourrait constituer un outil utile pour les radiologues.

La rigidité des tissus était plus élevée dans la zone péri-tumorale que dans la tumeur et les tissus distants. Ce résultat du SWE, connu sous le nom de *stiff rim* (anneau rigide) (Xu

et al. 2021), est cohérent avec les tests nanomécaniques réalisés sur des biopsies humaines et des modèles animaux (Plodinec et al. 2012). Pour la première fois, le BTI a été évalué sur des cancers. La Co était plus faible à l'intérieur qu'à l'extérieur de la tumeur. Ce résultat est en accord avec les simulations de cohérence spatiale réalisées pour des tissus humains comprenant une tumeur totalement anéchoïque (Pinton et al. 2014). Dans ces simulations, la cohérence spatiale, mesurée par l'intermédiaire de la fonction de cohérence spatiale, était plus faible dans la zone de la lésion que dans celles alentour. Cette comparaison est à relativiser puisqu'en pratique clinique, les tumeurs mammaires sont plus ou moins hypoéchoïques selon leur structure mais pas complètement anéchoïques. Nous avons également montré que l'AF était plus élevée à l'intérieur de la tumeur qu'à l'extérieur. Une future étude pourrait vérifier que cette mesure résulte bien d'une organisation plus anisotrope à l'intérieur de la tumeur et identifier les structures impliquées.

L'orientation des tissus déterminée au BTI était corrélée avec l'orientation des fibres de collagène évaluée sur une coupe histologique représentative. Des travaux complémentaires pourraient être menés pour confirmer ce premier résultat comme par exemple l'examen de la structure des fibres de collagène en 3D en utilisant davantage de coupes ou d'autres techniques d'imagerie (comme la SHG). Si ce résultat est validé, le BTI pourrait être le premier outil capable d'évaluer *in vivo* avec précision et sur plusieurs centimètres de profondeur certains des TACS. Il pourrait également être utilisé pour suivre l'évolution des différents TACS pendant la croissance tumorale ou à la suite de la prise d'un traitement.

Le BTI a montré des résultats prometteurs pour caractériser les tumeurs. Tout d'abord, il a été capable d'identifier une organisation plus radiale (i) pour les cancers invasifs que pour les carcinomes *in situ* et (ii) pour les cancers HER2- que pour les HER2+. Le résultat (i) est cohérent avec l'apparition de TACS 3 pendant le stade invasif (Bourgot et al. 2020). Ensuite, l'écart-type des valeurs d'AF et de Co dans la partie externe des cancers invasives était significativement différent pour les cas dont les ganglions lymphatiques contenaient des métastases (cancer métastasés) par rapport à ceux sans métastases. Enfin, la Co différait dans les CI-TNS de grade 1 par rapport aux grades supérieurs. Ces scores

pourraient aider les cliniciens dans leurs choix de traitement sans qu'une biopsie soit nécessaire, en particulier dans le cas de lésions multifocales¹⁷.

L'ensemble de ces résultats devront être confirmés sur des cohortes plus importantes. Des études plus approfondies devront être réalisées pour expliquer les résultats énoncés dans ce chapitre.

La faisabilité *in vivo* de la méthode devra aussi être validée. Dans cette étude, l'acquisition multiparamétrique complète (avec installation) durait environ 45 minutes. Ce temps pourrait être réduit en utilisant des disques SSD ou M2. Néanmoins, plusieurs minutes sans mouvement seraient encore nécessaires pour réaliser l'imagerie multiparamétrique. Ainsi, pour un passage *in vivo*, le développement d'une stratégie complémentaire de minimisation des mouvements entre les différentes acquisitions sera essentiel.

Pour un passage en clinique, l'utilisation d'une sonde matricielle permettrait de réduire la durée de l'imagerie à quelques secondes. Bien qu'étudiées par différents groupes pour de nombreuses applications (Demeulenaere et al. 2022a ; Demeulenaere et al. 2022b ; Tonni et al. 2015 ; Wang et al. 2015), ces sondes sont encore assez peu sensibles et nécessitent des systèmes échographiques complexes. En particulier, leur capacité à produire des mesures de BTI a déjà été montrée dans des organisations tissulaires bien ordonnées comme les parois cardiaques (Papadacci et al. 2017) mais devra être vérifiée pour des cas plus complexes.

Enfin, notre approche modulaire pourrait permettre l'ajout d'autres modes d'imagerie telles que le Doppler ultrarapide (Dizeux et al. 2017) ou d'autres analyses comme l'échographie quantitative (*quantitative ultrasound* – QUS).

¹⁷ On parle de cancer multifocal lorsque plusieurs tumeurs cancéreuses apparaissent dans le même sein.

5 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons réalisé une acquisition ultrasonore multiparamétrique 3D en mode B, SWE et BTI sur 64 cancers du sein humain *ex vivo*. Nous avons montré que la rigidité et les paramètres du BTI (Co, AF et orientation locale) fournissent des informations pertinentes pour la caractérisation des tumeurs mammaires, l'organisation de leur microenvironnement, le stade du cancer (*in situ* vs invasif), le statut HER2, le grade de la tumeur et le statut des ganglions lymphatiques. Ces résultats préliminaires valident le principe d'une imagerie multiparamétrique ultrasonore pour une meilleure caractérisation du cancer du sein. Cependant, cette étude s'est limitée à des prélèvements *ex vivo*. Par conséquent, nous nous proposons au chapitre suivant de valider la robustesse de notre approche *in vivo* de d'ajouter au protocole d'acquisition l'imagerie vasculaire.

6 RÉFÉRENCES DU CHAPITRE

- Bae JS, Chang JM, Lee SH, Shin SU, Moon WK. Prediction of invasive breast cancer using shear-wave elastography in patients with biopsy-confirmed ductal carcinoma in situ. *Eur Radiol* 2017;27:7–15.
- Bourgot I, Primac I, Louis T, Noël A, Maquoi E. Reciprocal Interplay Between Fibrillar Collagens and Collagen-Binding Integrins: Implications in Cancer Progression and Metastasis. *Frontiers in Oncology* 2020 [cited 2022 May 31];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.01488>
- Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, Pehlke CA, Eliceiri KW, Provenzano PP, Friedl A, Keely PJ. Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma. *The American Journal of Pathology* 2011;178:1221–1232.
- Dai J, Wang Y, Gong J, Yao Y. Biointerface anisotropy modulates migration of breast cancer cell. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2020;190:110973.
- Demeulenaere O, Bertolo A, Pezet S, Ialy-Radio N, Osmanski B, Papadacci C, Tanter M, Deffieux T, Pernot M. In vivo whole brain microvascular imaging in mice using transcranial 3D Ultrasound Localization Microscopy. *eBioMedicine* 2022a;79:103995.
- Demeulenaere O, Sandoval Z, Mateo P, Dizeux A, Villemain O, Gallet R, Ghaleh B, Deffieux T, Deméné C, Tanter M, et al. Coronary Flow Assessment Using 3-Dimensional Ultrafast Ultrasound Localization Microscopy. *JACC: Cardiovascular Imaging* 2022b;15:1193–1208.
- Denis M, Gregory A, Bayat M, Fazzio RT, Whaley DH, Ghosh K, Shah S, Fatemi M, Alizad A. Correlating Tumor Stiffness with Immunohistochemical Subtypes of Breast Cancers: Prognostic Value of Comb-Push Ultrasound Shear Elastography for Differentiating Luminal Subtypes. *PLoS One* 2016 [cited 2020 Mar 30];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5077080/>
- Egnell L, Vidić I, Jerome NP, Bofin AM, Bathen TF, Goa PE. Stromal Collagen Content in Breast Tumors Correlates With In Vivo Diffusion-Weighted Imaging: A Comparison of Multi b-Value DWI With Histologic Specimen From Benign and Malignant Breast Lesions. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2020;51:1868–1878.
- Evans A, Whelehan P, Thomson K, Brauer K, Jordan L, Purdie C, McLean D, Baker L, Vinnicombe S, Thompson A. Differentiating benign from malignant solid breast masses: value of shear wave elastography according to lesion stiffness combined with greyscale ultrasound according to BI-RADS classification. *Br J Cancer Nature Publishing Group*, 2012;107:224–229.
- Imbault M, Faccinnetto A, Osmanski B-F, Tissier A, Deffieux T, Gennisson J-L, Vilgrain V, Tanter M. Robust sound speed estimation for ultrasound-based hepatic steatosis assessment. *Phys Med Biol* 2017;62:3582–3598.

- Kakkad S, Zhang J, Akhbardeh A, Jacob D, Krishnamachary B, Solaiyappan M, Jacobs MA, Raman V, Leibfritz D, Glunde K, et al. Collagen fibers mediate MRI-detected water diffusion and anisotropy in breast cancers. *Neoplasia* 2016;18:585–593.
- Lehman CD, Arao RF, Sprague BL, Lee JM, Buist DSM, Kerlikowske K, Henderson LM, Onega T, Tosteson ANA, Rauscher GH, et al. National Performance Benchmarks for Modern Screening Digital Mammography: Update from the Breast Cancer Surveillance Consortium. *Radiology* 2017;283:49–58.
- Morkunas M, Zilenaite D, Laurinaviciene A, Treigys P, Laurinavicius A. Tumor collagen framework from bright-field histology images predicts overall survival of breast carcinoma patients. *Sci Rep* 2021;11:15474.
- Ohad Gal. fit_ellipse. MATLAB Central File Exchange, 2021 [cited 2021 Feb 16]. Available from: https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/3215-fit_ellipse
- Opacic T, Dencks S, Theek B, Piepenbrock M, Ackermann D, Rix A, Lammers T, Stickeler E, Delorme S, Schmitz G, et al. Motion model ultrasound localization microscopy for preclinical and clinical multiparametric tumor characterization. *Nat Commun* 2018;9:1527.
- Ouellette JN, Drifka CR, Pointer KB, Liu Y, Lieberthal TJ, Kao WJ, Kuo JS, Loeffler AG, Eliceiri KW. Navigating the Collagen Jungle: The Biomedical Potential of Fiber Organization in Cancer. *Bioengineering Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2021;8:17.
- Papadacci C, Finel V, Provost J, Villemain O, Bruneval P, Gennisson J-L, Tanter M, Fink M, Pernot M. Imaging the dynamics of cardiac fiber orientation in vivo using 3D Ultrasound Backscatter Tensor Imaging. *Sci Rep* 2017;7:1–9.
- Pinton G, Trahey G, Dahl J. Spatial coherence in human tissue: implications for imaging and measurement. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* 2014;61:1976–1987.
- Plodinec M, Loparic M, Monnier CA, Obermann EC, Zanetti-Dallenbach R, Oertle P, Hyotyla JT, Aebi U, Bentires-Alj M, Lim RYH, et al. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nature Nanotech* 2012;7:757–765.
- Sprague BL, Vacek PM, Mulrow SE, Evans MF, Trentham-Dietz A, Herschorn SD, James TA, Surachaicharn N, Keikhosravi A, Eliceiri KW, et al. Collagen Organization in Relation to Ductal Carcinoma *In Situ* Pathology and Outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2021;30:80–88.
- Stanzani D, Chala LF, de Barros N, Cerri GG, Chammas MC. Can Doppler or contrast-enhanced ultrasound analysis add diagnostically important information about the nature of breast lesions? *Clinics (Sao Paulo)* 2014;69:87–92.
- Tanter M, Bercoff J, Athanasiou A, Deffieux T, Gennisson J-L, Montaldo G, Muller M, Tardivon A, Fink M. Quantitative Assessment of Breast Lesion Viscoelasticity:

- Initial Clinical Results Using Supersonic Shear Imaging. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2008;34:1373–1386.
- Tonni G, Martins WP, Guimarães Filho H, Araujo Júnior E. Role of 3-D Ultrasound in Clinical Obstetric Practice: Evolution Over 20 Years. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2015;41:1180–1211.
- Toss MS, Miligy IM, Gorringer KL, AlKawaz A, Mittal K, Aneja R, Ellis IO, Green AR, Roxanis I, Rakha EA. Geometric characteristics of collagen have independent prognostic significance in breast ductal carcinoma in situ: an image analysis study. *Mod Pathol* Nature Publishing Group, 2019;32:1473–1485.
- Wang H, Kaneko OF, Tian L, Hristov D, Willmann JK. Three-dimensional Ultrasound Molecular Imaging of Angiogenesis in Colon Cancer using a Clinical Matrix Array Ultrasound Transducer. *Invest Radiol* 2015;50:322–329.
- Wiacek A, Oluyemi E, Myers K, Mullen L, Bell MAL. Coherence-Based Beamforming Increases the Diagnostic Certainty of Distinguishing Fluid from Solid Masses in Breast Ultrasound Exams. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2020;46:1380–1394.
- Xi G, Guo W, Kang D, Ma J, Fu F, Qiu L, Zheng L, He J, Fang N, Chen J, et al. Large-scale tumor-associated collagen signatures identify high-risk breast cancer patients. *Theranostics* 2021;11:3229–3243.
- Xu Y, Gong H, Hu B, Hu B. Role of “Stiff Rim” sign obtained by shear wave elastography in diagnosis and guiding therapy of breast cancer. *Int J Med Sci* 2021;18:3615–3623.
- Zhan J, Diao X-H, Jin J-M, Chen L, Chen Y. Superb Microvascular Imaging—A new vascular detecting ultrasonographic technique for avascular breast masses: A preliminary study. *European Journal of Radiology* 2016;85:915–921.
- Zunder SM, Gelderblom H, Tollenaar RA, Mesker WE. The significance of stromal collagen organization in cancer tissue: An in-depth discussion of literature. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2020;151:102907.

Chapitre V
Imagerie préclinique
multiparamétrique
de tumeurs mammaires

1 INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Au-delà de son utilisation pour le dépistage et le diagnostic de maladies chez l'humain, l'imagerie médicale *in vivo* est un outil indispensable à la recherche fondamentale et appliquée. Elle permet aux biologistes de suivre l'évolution du vivant en temps réel et dans la durée au lieu de d'euthanasier des animaux pour pouvoir prélever les tissus à analyser. Cela permet de se conformer au principe des « 3R »¹⁸ en réduisant le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un résultat donné. Par ailleurs, l'imagerie permet d'étudier des mécanismes biologiques *in situ* et de suivre leur évolution sans les perturber.

La recherche sur le cancer du sein s'appuie sur une variété de modèles précliniques. Le modèle le plus utilisé est le modèle murin pour sa proximité avec l'Homme, sa simplicité d'utilisation et son faible coût. Néanmoins, certains modèles de tumeurs ont été développés chez d'autres espèces comme le poisson-zèbre (Mercatali et al. 2016 ; Ren et al. 2017), l'embryon de poulet (Jarrosson et al. 2021), les chats (Rosen et al. 2020), les chiens (Antuofermo et al. 2007), les tupaïas (Xia et al. 2014), les primates non humains (Dewi and Cline 2021)...

Différentes familles de modèles existent selon la méthode d'induction de la tumeur : les allogreffes (greffes de tumeurs d'un autre animal de l'espèce), les xéno-greffes (greffes de tumeurs humaines – abrégées CDX pour *Cell line-Derived Xenograft* ou PDX pour *Patient Derived Xenograft*), les modifications génétiques (apparition spontanée de la tumeur – abrégées GEMM pour *Genetic Engineered Mouse Models*). Peu coûteuses et très reproductibles, les greffes permettent de facilement suivre l'évolution tumorale puisque le lieu d'apparition de la tumeur est fixé par l'expérimentateur. Néanmoins, pour que la tumeur puisse se développer dans ces modèles, les souris doivent être immunodéprimées alors même que l'impact du système immunitaire sur les tumeurs est important. En outre, ces modèles ne reproduisent pas correctement les interactions entre le

¹⁸ Le principe des « 3R » est à la base de la démarche éthique sur l'expérimentation animale. Il stipule que le nombre d'animaux utilisé doit être limité au minimum (« Réduire »), que les études *in vitro* ou *in silico* doivent être privilégiées par rapport aux études sur animaux (« Remplacer »), que toute douleur ou détresse de l'animal doit être supprimée, réduite ou soulagée (« Raffiner »).

microenvironnement et la tumeur (Sharpless and DePinho 2006). Les GEMM permettent de dépasser ces limites.

Le modèle GEMM de tumeurs mammaires le plus utilisé aujourd'hui est le MMTV-PyMT (Attalla et al. 2021) exprimant l'oncogène viral « Polyoma middle T » à travers le vecteur du virus promoteur de tumeurs mammaires MMTV (Guy et al. 1992). La progression et la morphologie tumorales dans ce modèle sont comparables à celles d'un cancer canalaire (Lin et al. 2003) et proches d'un luminal B (Pfefferle et al. 2013).

Comme présenté au chapitre I, l'échographie 3D par concaténation de plans 2D offre de nombreux avantages par rapport à l'échographie 4D, en particulier en termes de simplicité de mise en place et de sensibilité. Les limites théoriques et pratiques ont déjà été discutées aux chapitres I et III. Lors d'une expérience *in vivo*, il est nécessaire de réduire au maximum le mouvement de la zone imagée entre deux acquisitions. Les glandes mammaires se trouvent sur la partie ventrale de l'animal et bougent donc de plusieurs millimètres avec sa respiration. Pour limiter ces artefacts il est possible de réaliser une synchronisation sur la respiration afin d'effectuer les acquisitions au moment le plus stable du cycle respiratoire (Demené et al. 2019).

Ce chapitre vise à démontrer la possibilité de réaliser efficacement une imagerie ultrasonore multiparamétrique 3D *in vivo* pour suivre la croissance tumorale sur plusieurs semaines, et générer une base de données multiparamétrique de tumeurs mammaires pour l'analyse croisée de l'élastographie par onde de cisaillement (SWE), de l'imagerie du tenseur de rétrodiffusion (BTI) et de l'imagerie vasculaire (Doppler ultrarapide et ULM).

Le travail présenté ici a été réalisé en collaboration avec Aymeric Nadjem, stagiaire en support à l'acquisition des données et à l'analyse ainsi que le Dr. Alexandre Dizeux, ingénieur, qui a réalisé l'injection des microbulles. La partie histologie a été menée en partenariat avec l'Institut Curie et en particulier avec l'aide du Dr. Lounes Djerroudi (lecture des lames), de Martial Caly (protocole, inclusion), de Gabriel Champenois et de l'équipe de pathologie expérimentale (coupe des lames et numérisation).

2 MÉTHODES

2.1 Modèle animal et protocole

L'expérience décrite dans ce chapitre s'appuie sur le protocole validé par le Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale Paris Centre et Sud sous le nom « Imagerie multiparamétrique du cancer du sein par ultrasons ultrarapides ». La population comportait 26 souris femelle de souche FVB/N dont 20 transgéniques (TG) MMTV-PyVT 634Mul/J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, États-Unis) abrégées MMTV-PyMT¹⁹ et six non porteuses de la mutation (type sauvage ou *wild-type* WT). Les animaux sont arrivés au laboratoire âgés de cinq semaines (S5). Après acclimatation, ils ont été rasés et épilés (crème dépilatoire visage & zones sensibles, Netline, CCD, Paris, France) sur leur zone thoracique et ventrale. Six jours par semaine, les animaux ont été pesés, la présence de masse tumorale déterminée par palpation. La taille des tumeurs a été estimée visuellement ou mesurée pour vérifier qu'elle ne dépassait pas 17 mm (point limite). Les souris possèdent cinq paires de mamelles numérotées de 1 à 5 en partant de la plus antérieure (Figure 48). Notre séquence d'imagerie a été réalisée sur chaque animal de façon hebdomadaire. Les souris TG ont été réparties en deux groupes : le groupe A constitué de six animaux pour lesquels l'imagerie s'est faite sur la 4^{ème} mamelle gauche (notée 4G), et le groupe B constitué de 14 animaux pour lesquels l'imagerie a été réalisée sur la première mamelle dans laquelle une tumeur était découverte. Tant qu'aucune tumeur n'était détectable, la 4^{ème} mamelle gauche était imagée. Les animaux WT étaient répartis en deux groupes de trois à partir de la deuxième semaine d'imagerie : le premier groupe était imagé en 4G et le second sur la 1^{ère} mamelle droite (1D).

Chaque animal a été imagé une fois par semaine à partir de la semaine 6 (S6) et jusqu'à son euthanasie. Le protocole est décrit dans le diagramme de la Figure 49. Au besoin, la zone ventrale était épilée à nouveau avant l'imagerie. Pour chaque expérience, l'animal était endormi à l'isoflurane (Isoflurin®, Axience, Pantin, France) à 2,5 % pendant l'induction puis à 1,5 % pendant l'acquisition, mélangé à 0,4 L/min d'air et 0,2 L/min d'O₂. Lors de l'acquisition ULM (expérience terminale), la quantité d'isoflurane était ajustée entre 1,2 % et 2 % (Figure 49) selon les animaux afin de ralentir le rythme respiratoire tout en s'assurant de l'absence de danger (repérée par une respiration irrégulière ou

¹⁹ Dans la littérature ce même modèle est également parfois appelé MMTV-PyVMT ou MMTV-MT.

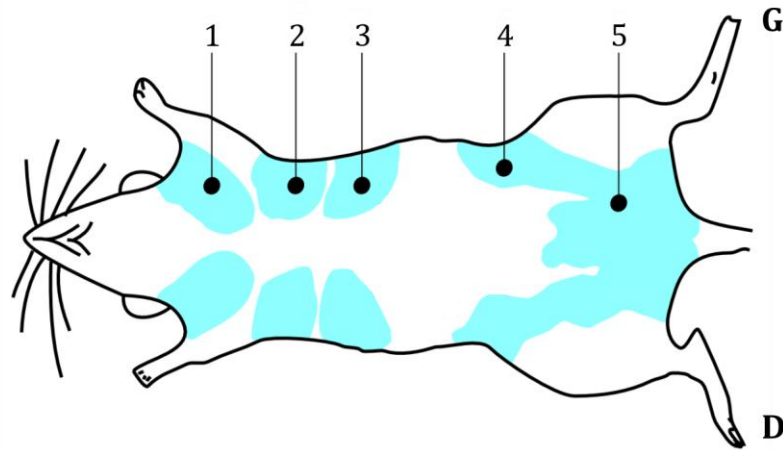


Figure 48 : Position des glandes mammaires chez la souris numérotées de 1 à 5. Les glandes 1-3 sont les glandes thoraciques et les glandes 4-5 les glandes inguinales. Les zones bleues correspondent aux coussinets adipeux mammaires (mammary fat pad). Adapté de (Eriksson et al. 2014) [modifications vers le français, ajout de « G » et « D »] – CC-BY 4.0

anormale). Durant l'acquisition, les animaux étaient positionnés sur le dos sur une plaque chauffante à 37,5°C afin de limiter l'hypothermie induite par l'anesthésie (Figure 51). De l'ocry-gel (TVM, Lempdes, France) était appliqué sur les yeux des animaux pour limiter l'assèchement oculaire. Afin de contrôler les fréquences respiratoire et cardiaque ainsi que la température des animaux, un capteur de pression (placé dans le tuyau de respiration), des électrodes et une sonde rectale étaient reliés à un système AD Instruments (Dunedin, Nouvelle-Zélande) comportant un spiromètre, un bio amplificateur et un Power Lab 8/35.

À la fin de la dernière acquisition, 200 µL de pentobarbital (Euthasol®, Dechra, Northwich, Royaume-Uni) étaient injectés par voie intrapéritonéale et sous anesthésie. Après une dislocation cervicale (double euthanasie), les tumeurs étaient prélevées et encrées afin de retrouver leur orientation anatomique).

L'ensemble des 142 acquisitions et 26 euthanasies ont été réparties comme expliqué dans le Tableau 9.

2.2 Coupes histologiques

Afin de proposer une comparaison à la mesure d'orientation des tissus par BTI, des lames histologiques ont été réalisées à partir d'échantillons prélevés à la fin de la dernière séance d'imagerie pour chaque tumeur imagée. Le protocole a été défini avec les experts de l'Institut Curie pour correspondre aux méthodes utilisées en routine dans la pratique

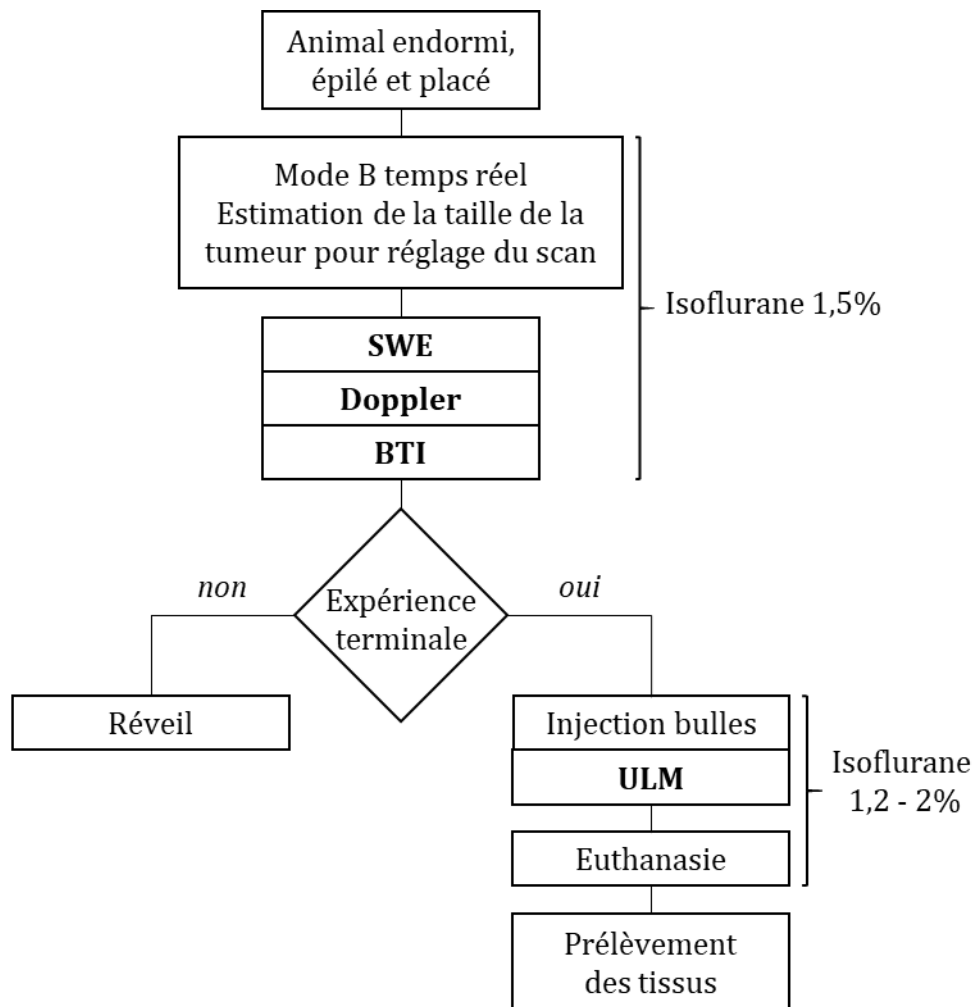


Figure 49 : Diagramme récapitulatif des actions lors de chaque expérience.

Âge des souris	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
Imagerie	∅	6 WT 20 TG	6 WT 20 TG	6 WT 19 TG	6 WT 18 TG	6 WT 17 TG	6 WT 10 TG	2 TG
Euthanasie	∅	∅	1 TG	1 TG	1 TG	7 TG	6WT 8 TG	2 TG

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des expériences d'imagerie et des dates d'euthanasie des 26 animaux.

clinique pour le diagnostic des tumeurs du sein. Il comprend cinq étapes décrites ci-dessous et résumées dans la Figure 50.

D'abord, les échantillons ont été fixés dans du formaldéhyde 4 % tamponné pH 7 (MM France - Microm, Brignais, France) pendant un à huit jours avant d'être apportés à l'Institut Curie. Puis, ils ont de nouveau été immergés pendant huit heures supplémentaires dans une même solution de formaldéhyde à température ambiante.

Ensuite, l'imprégnation a été réalisée en automate (ASP300S, Leica Biosystems, Nussloch, Allemagne) avec des cycles nocturnes de 12h incluant les substitutions progressives de formaldéhyde, d'éthanol à 50° (Carlo Erba Reagents, Cornaredo, province de Milan, Italie), d'éthanol à 100 % (même fournisseur), de xylène (même fournisseur), et de paraffine (Leica Biosystems, Nussloch, Allemagne). Enfin, les prélèvements ont été inclus dans des cassettes à l'aide d'un automate d'inclusion TES-99 (Medite, Burgdorf, Allemagne).

Les blocs de paraffine contenant les tissus ont alors été refroidis au congélateur (-20°C) puis coupés au microtome (Thermo HM 340E, Eprelia, Kalamazoo, Michigan, États-Unis), équipé d'une lame de type Surgipath DB80 LX (Leica Biosystems, Nussloch, Allemagne) en ruban régulier de 3 µm d'épaisseur. Le ruban était ensuite déposé à la surface d'un bain-marie thermostaté (réf. 1451, Sakura, Alphen aan den Rijn, Pays-Bas) rempli d'eau distillée à 38°C afin de défriper le tissu fraîchement coupé. Après contrôle de la qualité de la coupe et de l'intégrité du prélèvement, le ruban était récupéré du bain-marie et placé au centre d'une lame de verre (KP-3041, Klinipath, VWR, Radnor, Pennsylvanie, États-Unis). Une coupe a été conservée tous les 100 µm jusqu'à épuisement du prélèvement.

Les lames ont enfin été placées à l'horizontal dans une étuve pour histologie à ventilation forcée (SVF100, Bio-Optica, Milan, Italie), à 58°C pendant 1h pour compléter le séchage avant coloration hématoxyline (Dako, Réactif S330930, Santa Clara, Californie, États-Unis), éosine (RAL Diagnostics, Martillac, France), safran (RAL Diagnostics, Martillac, France) (HES) dans un automate DRS 2000 (Sakura, Alphen aan den Rijn, Pays-Bas)

Pour faciliter leur lecture et leur conservation, les lames ont été numérisées à l'aide d'un scanner Hamamatsu NanoZoomer S360MD (Hamamatsu, Japon).

2.3 Acquisitions ultrasonores

2.3.1 Matériel et mise en place de l'imagerie

L'imagerie a été réalisée à l'aide du même équipement présenté au chapitre III soient un système Verasonics Vantage (Kirkland, Washington, États-Unis) et une sonde centrée à 15,6 MHz (Vermont, Tour, France). La sonde était placée dans un porte-sonde spécialement imprimé en 3D et fixé à un jeu de moteurs permettant trois degrés de liberté

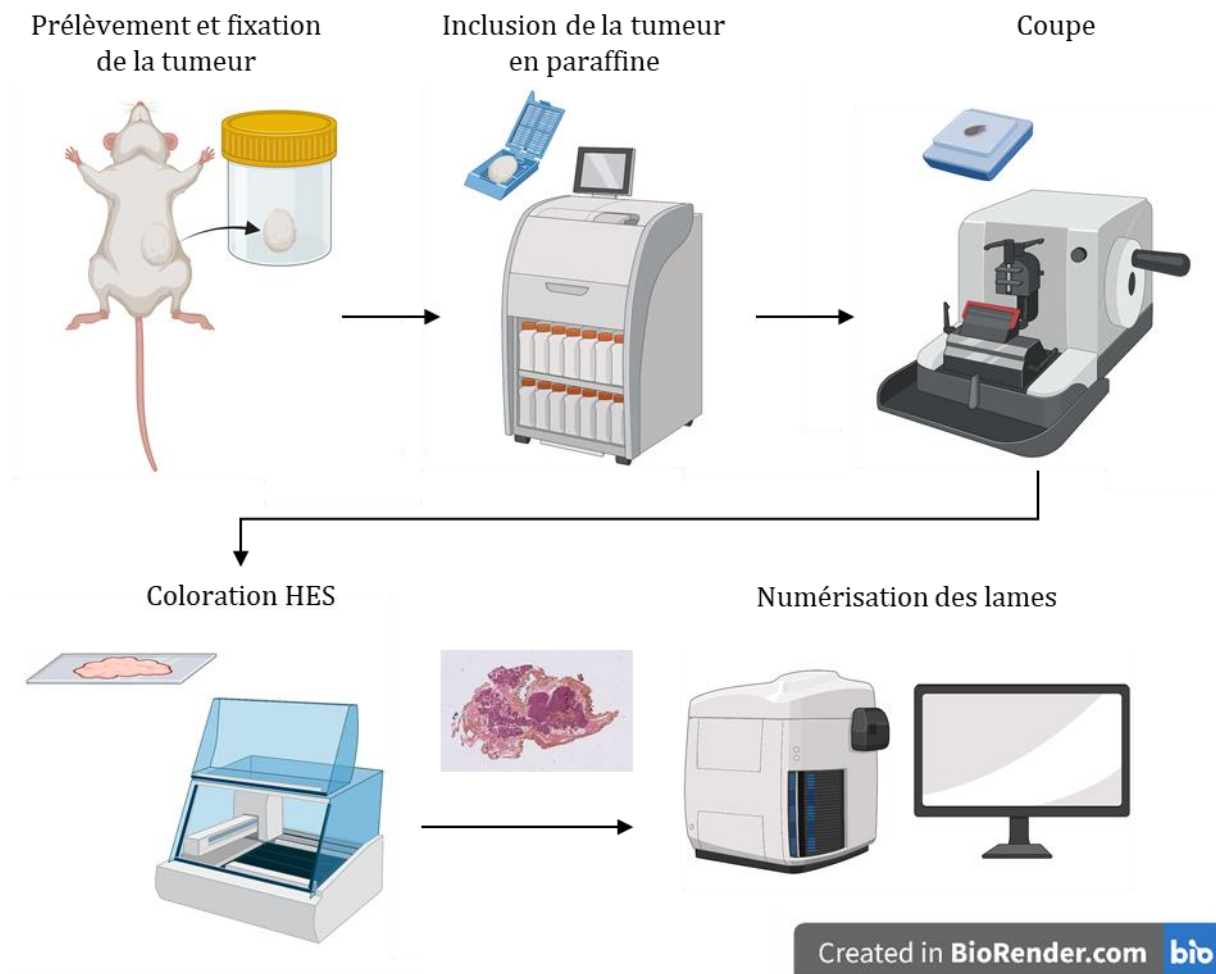


Figure 50 : Processus d'obtention des coupes histologiques. La tumeur est prélevée et fixée dans du formaldéhyde. Puis, elle est placée dans une cassette et dans un automate pour être déshydratée et incluse en paraffine. Ce « bloc » de paraffine contenant la tumeur peut être ensuite coupé à l'aide d'un microtome. Les lames de tissus obtenues sont alors réhydratées et colorées en HES avant d'être numérisées.

en translation (VT 80, Physik Instrumente, Karlsruhe, Allemagne) et un degré en rotation (DT 80, Physik Instrumente, Karlsruhe, Allemagne) dans le plan XY (Figure 51).

Afin d'assurer le couplage acoustique entre la sonde et l'animal, une poche d'eau (film plastique) était placée au-dessus de ce dernier. L'interface entre la poche et l'animal était assurée par une fine couche de gel échographique. Un circuit fermé permettait d'injecter de l'eau chaude dans la poche afin que la température y reste constante à 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) tout en gardant un niveau d'eau stable (Figure 51).

Pour chaque animal, la sonde était centrée par rapport à la tumeur ou, en l'absence de tumeur détectée, au-dessus de la mamelle visée. La vitesse du son était ensuite estimée comme expliqué au chapitre IV (Imbault et al. 2017). La séquence 3D présentée au chapitre III incluant BTI, Doppler ultrarapide et SWE était ensuite réalisée.

Lors de l'expérience terminale, une séquence de microscopie par localisation ultrasonore (ULM) 2D était réalisée à la suite des autres modalités (Figure 49).

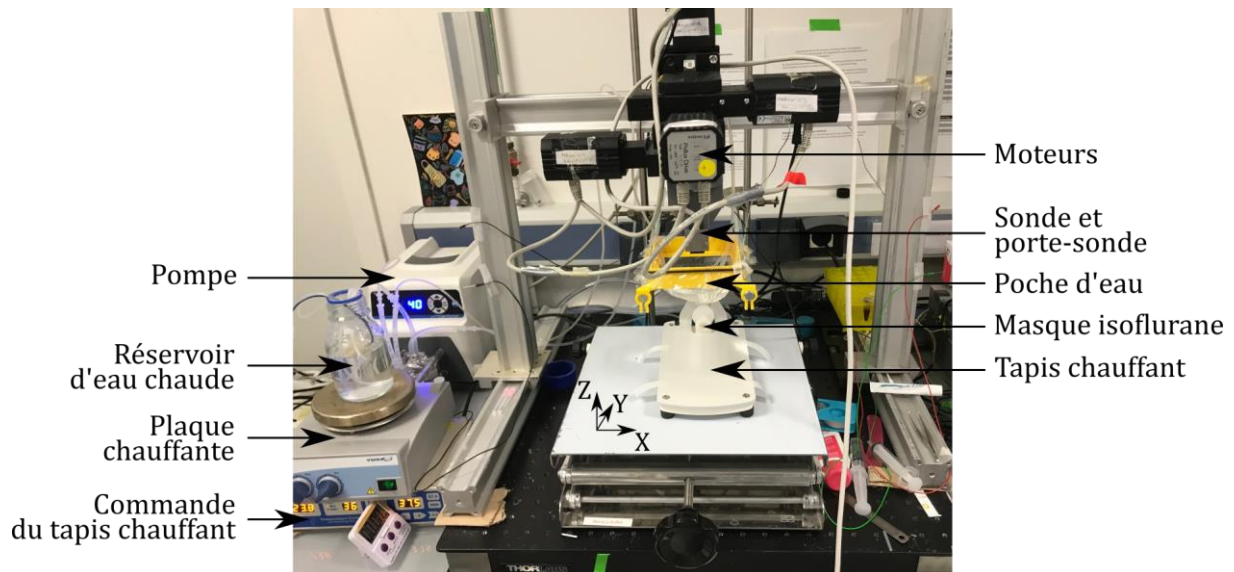


Figure 51 : Photo du montage expérimental. La pompe permet de faire circuler l'eau entre le réservoir, où elle est maintenue en température grâce à la plaque chauffante, et la poche d'eau qui sera placée sur la souris.

2.3.2 Synchronisation sur la respiration

Afin de limiter les artefacts et la perte de résolution dus aux mouvements respiratoires et cardiaques, les séquences ultrasonores ont été synchronisées avec les plateaux de la respiration et de l'électrocardiogramme (ECG). Pour cela, avant chaque acquisition dans un nouveau plan, l'échographe attendait un signal envoyé par le système AD Instruments pour commencer l'acquisition. Ce dernier détectait les pics de pression de la respiration et l'onde R du cycle cardiaque. Un délai était manuellement choisi selon les fréquences respiratoire et cardiaque de chaque animal pour que les acquisitions aient lieu pendant les phases les plus stables de la respiration et soient synchronisées sur le cycle cardiaque (Figure 52).

2.3.3 Mode B, SWE, Doppler et BTI

La séquence d'imagerie mode B, SWE, Doppler ultrarapide et BTI est présentée au chapitre III. Seules les modifications par rapport à ce chapitre sont détaillées ci-après. Le nombre de plans réalisés pour le SWE et le Doppler dépendait de la taille de la tumeur et variait entre 21 et 53 plans (espacés de 0,25 mm).

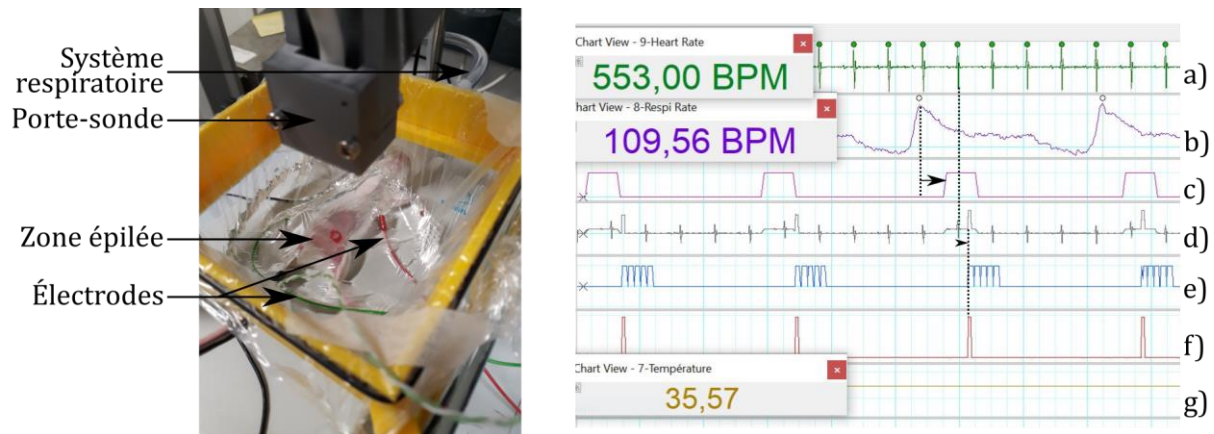


Figure 52 : Photo du montage (gauche) avec animal anesthésié. Le rond rouge visible sur la souris est une marque au feutre pour aider au placement de la sonde, ici autour de la mamelle 4G. Copie d'écran du logiciel Labchart, AD Instruments (droite). a) ECG. b) Respiration enregistrée via le système d'arrivée d'air. c) Zone de plateau estimée après le pic de la respiration. d) Somme des signaux c et d. f) Signal envoyé au système Verasonics pour lancer l'acquisition. e) Signal de sortie du système Verasonics indiquant le moment de l'acquisition. g) Température de l'eau de la poche d'eau située au-dessus de la souris. Les délais (flèches noires) étaient réglés manuellement selon les rythmes cardiaque et respiratoire.

La profondeur des cinq focalisations pour générer l'onde de cisaillement était ajustée manuellement pour chaque tumeur. L'imagerie ultrarapide pour suivre l'onde de cisaillement a été réalisée à une fréquence de 5000 Hz avec cinq ondes planes orientées de -8° à $+8^\circ$ (pas de 2°).

2.3.4 ULM

Le principe de la méthode d'ULM est décrit au Chapitre I. L'acquisition avait lieu dans un seul plan, au centre de la tumeur. Une rotation de 0° , 45° ou 90° pouvait être effectuée pour se placer dans un plan dans lequel le Doppler ultrarapide détectait une vascularisation plus dense. Ensuite, $120 \mu\text{L} \pm 20 \mu\text{L}$ d'une solution de microbulles d'hexafluorure de soufre (SonoVue®, Bracco, Milan, Italie) étaient injectés par voie intraveineuse par la queue de l'animal. Cent cinquante blocs de 250 images étaient réalisés à une cadence d'imagerie de 2778 Hz. Chaque acquisition d'un bloc était synchronisée sur les cycles respiratoire et cardiaque selon la méthode présentée en 2.3.2. Chaque image était réalisée à partir de neuf ondes planes (orientées entre -4° et $+4^\circ$ avec un pas de 1°).

2.4 Analyses

2.4.1 Définition des zones tumorales

Les zones tumorales sont définies de la même façon que dans le chapitre IV. La même application Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, États-Unis) a été utilisée mais adaptée afin de dessiner un contour de la tumeur tous les $300 \mu\text{m}$ (et non tous les

1 mm). Pour rappels, deux volumes de la tumeur sont réalisés (volume X et volume Y) et permettent de définir les zones suivantes (les tailles des zones ont été adaptées par rapport au chapitre précédent) :

- Intersection : intersection de volumes X et Y
- Union : union des volumes X et Y
- Cœur : homothétie de 50 % de l'intersection par rapport au barycentre de la tumeur
- Zone péri-tumorale : anneau de 3 mm entourant l'union
- Frontière : anneau de 1 mm de part et d'autre de la limite de l'union

Par ailleurs, une zone cylindrique, dite zone contrôle, est définie pour toutes les acquisitions. Centrée sur la mamelle visée, elle correspond aux 3 mm les plus superficiels de l'animal sur un diamètre de 5 mm (Figure 53).

Le volume tumoral est considéré égal à la moyenne des volumes de l'union et de l'intersection. Les tumeurs ont été réparties en trois groupes en fonction de leur taille (petites tumeurs $< 15 \text{ mm}^3$, moyennes tumeurs $\geq 15 \text{ mm}^3$ et $< 50 \text{ mm}^3$, grandes tumeurs $\geq 50 \text{ mm}^3$).

La valeur du grand axe de l'union et de l'intersection est définie comme la distance maximale entre deux points de la surface de ces volumes. La valeur du grand axe de la tumeur est prise égale à la moyenne du grand axe de l'union et de l'intersection.

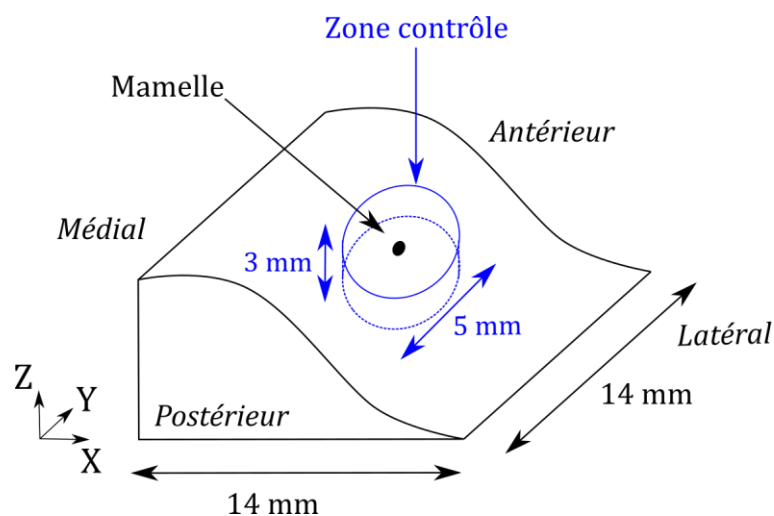


Figure 53 : Schéma de la zone contrôle, un cylindre déformé de 3 mm dans la profondeur et de 5 mm de diamètre autour de la mamelle.

2.4.2 SWE

Les volumes SWE ont, comme au chapitre III, été reconstitués en moyennant les trois acquisitions réalisées à 0°, 45° et 90°.

Pour chaque acquisition, la vitesse moyenne de l'onde de cisaillement a été évaluée dans la zone contrôle. Elle a été mesurée dans le cœur, l'union, la frontière et la zone péri-tumorale pour les acquisitions contenant une tumeur visible au mode B.

2.4.3 Doppler ultrarapide

Les volumes du Doppler ultrarapide ont été reconstitués en moyennant les trois acquisitions réalisées à 0°, 45° et 90°. Puis, les vaisseaux ont été segmentés (Figure 54) à partir du logarithme du volume Doppler reconstitué. Un filtre permettant de reconnaître les structures tubulaires, *vesselness3D* (Tim Jerman 2017), a été appliqué au volume. Ce filtre renvoie un volume de même taille où chaque pixel contient la probabilité de présence d'une structure tubulaire. À cause du mode de reconstruction, des formes tubulaires ont été perçues par le filtre sur le bord de notre volume. Ces artefacts ont été retirés en réalisant une ouverture morphologique avec des éléments très longs. Le masque correspondant à chacune des zones étudiées (2.4.1) a ensuite été appliqué. Le volume ainsi obtenu a été binarisé avec un seuil fixé à 0,2. Ce seuil a été choisi empiriquement après comparaison visuelle entre le volume du Doppler ultrarapide et les vaisseaux ainsi segmentés.

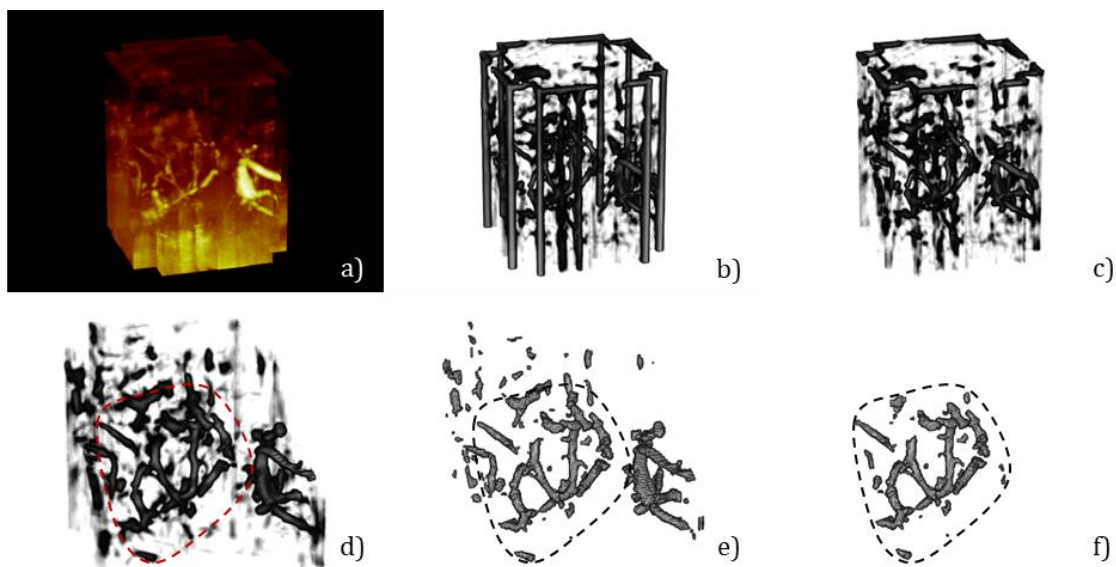


Figure 54 : Prétraitement des données Doppler. a) Volume Doppler ultrarapide. b) Volume après filtre *vesselness3D*. c) Idem après suppression des artefacts de bord. d) Idem uniquement dans la souris (suppression des artefacts dans la zone entre la sonde et la souris). e) Volume précédent binarisé. f) Volume uniquement dans la tumeur (contour de la tumeur en pointillés).

La densité de vaisseaux sanguins dans chaque zone est calculée en divisant le nombre de pixels segmentés avec la binarisation par le nombre total de pixels de la zone. La densité moyenne de vaisseaux sanguins a été évaluée, d'une part, dans la zone contrôle pour les acquisitions sur les souris WT et TG sans tumeur détectée et, d'autre part, dans le cœur, l'union, la frontière et la zone péri-tumorale pour toutes les acquisitions contenant une tumeur visible au mode B.

2.4.4 BTI

Le post-traitement du BTI est similaire en tout point à celui du chapitre III. Il permet d'obtenir en chaque point du volume d'intérêt la cohérence (Co), l'anisotropie fractionnelle (AF) et l'orientation des diffuseurs. Le score radial/tangent ($S_{radial}^{BTI} / S_{tangent}^{BTI}$) est défini au chapitre IV et est calculé de façon identique. Pour les cas avec tumeur, la référence pour l'orientation « radiale pure » est toujours le contour de la tumeur quelle que soit la zone sur laquelle est ensuite évalué le score. Pour les où aucune tumeur n'a été détecté, la référence pour l'orientation est le contour du cylindre de la zone contrôle.

Les représentations du BTI dans les parties 3.3.3 et 3.4 ont été réalisées grâce au filtre *streamline* de Matlab. Ce filtre permet de tracer les lignes de champ d'un champ de vecteur. Les fibres n'ont été tracées qu'aux endroits où l'AF était supérieure à 0,3. Les fibres ont été colorées selon la valeur de la Co.

Comme pour le SWE et le Doppler ultrarapide, une analyse comparative a été effectuée entre les valeurs moyennes de la Co et de l'AF mesurée au BTI dans les différentes zones définies en 2.4.1 pour les souris avec tumeur et dans la zone contrôle pour les souris sans tumeur.

2.4.5 ULM

Le code de post-traitement de l'ULM a été développé au laboratoire Physique pour la Médecine et est expliqué en détail dans les références suivantes (Errico et al. 2015 ; Renaudin et al. 2022). Le principe de l'analyse est brièvement rappelé avec les valeurs clés ci-dessous.

Sur chaque bloc de 150 images, un filtre SVD avec un seuil de 30 a été appliqué pour retirer le signal du tissu. Puis, un second filtre (*vesselness3D*, Tim Jerman 2017) a été

utilisé pour repérer les zones de passage des bulles (paramètre d'échelle pour la taille attendue des vaisseaux $\sigma = [0,05; 0,13; 0,2]$ mm). Les bulles ont ensuite été détectées en considérant les pixels pour lesquels la corrélation avec la fonction d'étalement du point (PSF) dépassait 0,6. Pour éviter les artefacts, les bulles repérées sur moins de huit images consécutives ont été supprimées. Enfin, pour limiter l'effet de flou lié aux mouvements résiduels, les chemins tracés par les bulles étaient recalés, tous les cinq blocs, par rapport à l'ensemble des chemins précédemment trouvés.

De même que pour le Doppler ultrarapide, la densité vasculaire de chaque zone a été calculée.

2.4.6 Analyse statistique

L'ensemble des tests statistiques présentés dans ce chapitre sont des tests-t de Student. Sur tous les graphiques, la significativité est représentée par « n.s. » si $p > 0,05$, « * » si $p \leq 0,05$, « ** » si $p \leq 0,01$, « *** » si $p \leq 0,001$, « >*** » si $p \leq 0,0001$.

2.4.7 Analyse multiparamétrique comparative

Une analyse multiparamétrique comparative sur trois cas est présentée comportant une lame obtenue en histologie ainsi qu'une coupe représentative pour les paramètres ultrasonores.

Par ailleurs, une représentation 3D du BTI dans l'union et la zone péri-tumorale, du SWE dans l'union ainsi que du Doppler binarisé dans l'union et la zone péri-tumorale a été réalisée sur Matlab

3 RÉSULTATS

3.1 Suivi physiologique

La masse des souris TG augmentait continuellement chaque semaine beaucoup plus rapidement que la masse des souris WT. La masse moyenne des souris TG lors du début de l'expérimentation (S6) était de 18,0 g (écart-type - $\sigma = 0,777$ g) contre 18,6 g ($\sigma = 0,960$ g) pour les souris WT. Cinq semaines plus tard (S11), la masse moyenne des souris TG était de 20,9 g ($\sigma = 1,12$ g) contre 19,9 g ($\sigma = 0,817$ g) pour les souris WT ce qui correspond, à une augmentation moyenne de la masse des souris TG de 2,75 g ($\sigma =$

0,919 g) contre 1,24 g ($\sigma = 0,604$ g) pour les souris WT (Figure 55). La différence entre la prise de masse des souris TG et WT est significative dès la semaine 8 (Tableau 10).

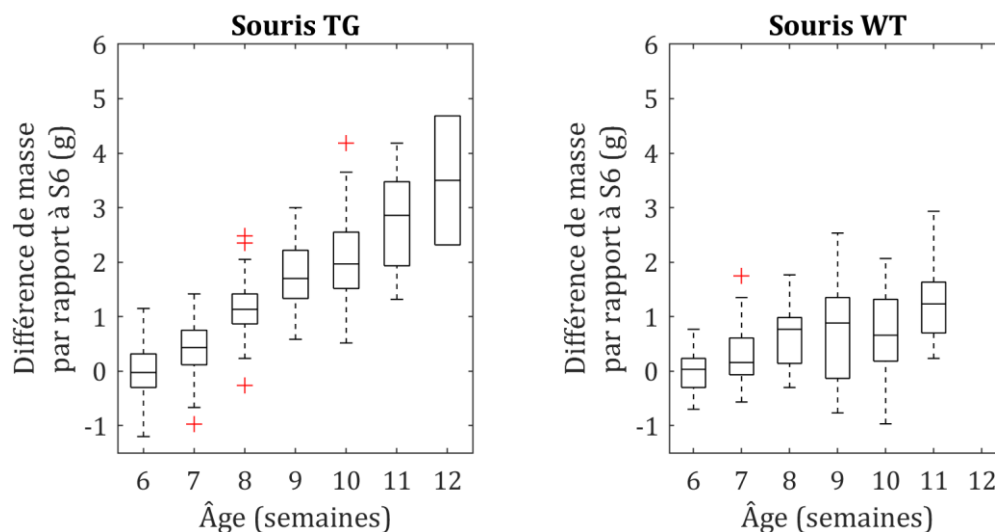


Figure 55 : Diagramme en boîte de la prise de masse des souris. Chaque boîte représente l'intégralité des masses mesurées quotidiennement dont est déduite la masse initiale (moyenne des masses de la S6) pour chaque animal. La masse augmente plus rapidement chez les souris TG que chez les souris WT. Les boîtes à moustache représentent la médiane (trait central), les quartiles (haut et bas de la boîte) et les valeurs extrêmes (petite barre horizontale). Les croix rouges représentent les valeurs considérées aberrantes par la fonction boxplot de Matlab.

	S6	S7	S8	S9	S10	S11
Test-t de Student (p-value) TG vs WT	1,00	0,23	$5,6 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-14}$	$5,7 \times 10^{-14}$	$3,8 \times 10^{-9}$

Tableau 10 : P-values du test-t de Student comparant la masse des souris TG et des souris WT à chaque semaine, comme présenté dans la Figure 55.

3.2 Croissance tumorale

Toutes les souris TG ont développé des tumeurs. Le grand axe des tumeurs observées était compris entre 2 et 15 mm (Figure 56) pour un volume compris entre 1 mm³ et 357 mm³.

Sur l'ensemble des 142 acquisitions réalisées, 79 tumeurs dont 28 avec un volume inférieur à 15 mm³, 28 avec un volume compris entre 15 mm³ et 50 mm³, et 23 avec un volume supérieur à 50 mm³ ont été imagées. Sur les 20 acquisitions terminales réalisées sur souris TG, 11 tumeurs avaient un volume inférieur à 50 mm³ et 9 avaient un volume supérieur.

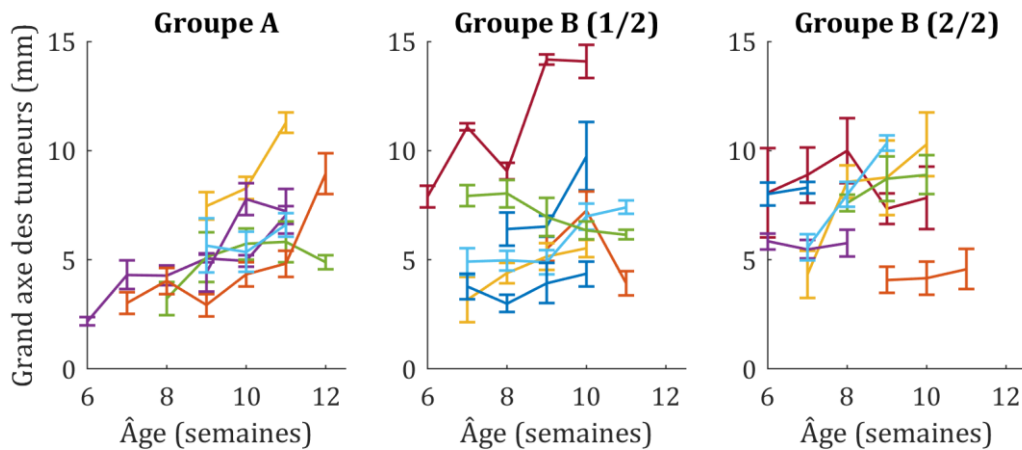


Figure 56 : Évolution de la taille tumorale pour les souris du groupe A (tumeur en 4G) et B (position de la tumeur aléatoire). Le groupe B est séparé en deux graphiques pour faciliter la lecture. Chaque ligne représente une tumeur pour une souris. La ligne débute à la détection de la tumeur et se termine à l'euthanasie de l'animal. La valeur du grand axe de la tumeur correspond à la moyenne entre le grand axe trouvé pour les volumes union et intersection. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs du grand axe trouvées dans ces deux volumes.

3.3 Analyses monomodales

Le temps typique de chaque expérience incluant la préparation de l'animal et son imagerie était de 1h à 1h30 pour les expériences non terminales et de 1h30 à 2h pour les expériences terminales (avec ULM, hors euthanasie). Toutes les tumeurs ont pu être imagées une fois en ULM et au moins trois fois en SWE, Doppler ultrarapide et BTI. Pour chacune de ces trois dernières modalités, un exemple de représentation est affiché sur la même tumeur puis une analyse sur les valeurs moyennes est effectuée.

3.3.1 SWE

Un exemple de SWE 3D sur trois semaines est présenté en Figure 57. On y voit la tumeur grandir et se rigidifier au cours des semaines.

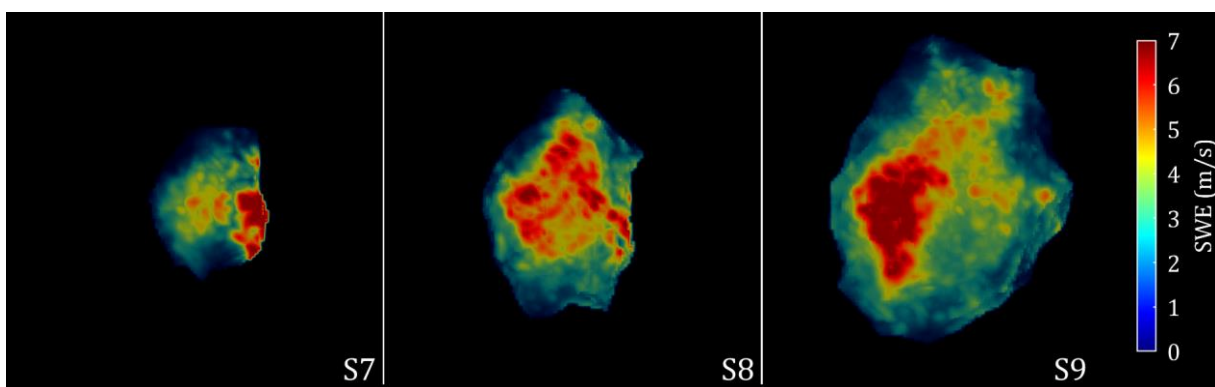


Figure 57 : Exemple de SWE 3D dans une tumeur (union) sur 3 semaines consécutives.

Les mesures de rigidité moyennes sont représentées dans la Figure 58. Quelle que soit la zone considérée, la rigidité moyenne augmentait avec la taille de la tumeur. La moyenne

des valeurs du SWE était de 2,19 m/s ($\sigma = 0,35$ m/s) dans la zone contrôle, 2,79 m/s ($\sigma = 0,75$ m/s) dans le cœur, 2,53 m/s ($\sigma = 0,52$ m/s) dans l'union, 2,44 m/s ($\sigma = 0,47$ m/s) dans la frontière et de 2,53 m/s ($\sigma = 0,29$ m/s) dans la zone péri-tumorale.

L'analyse statistique résumée sur la Figure 58 montre qu'il n'y avait pas de différence significative entre les valeurs pour les petites et moyennes tumeurs. Elle met aussi en évidence que, dans l'union et la frontière, les petites tumeurs n'étaient pas significativement plus rigides que la zone contrôle, mais le devenaient lorsque leur volume augmentait.

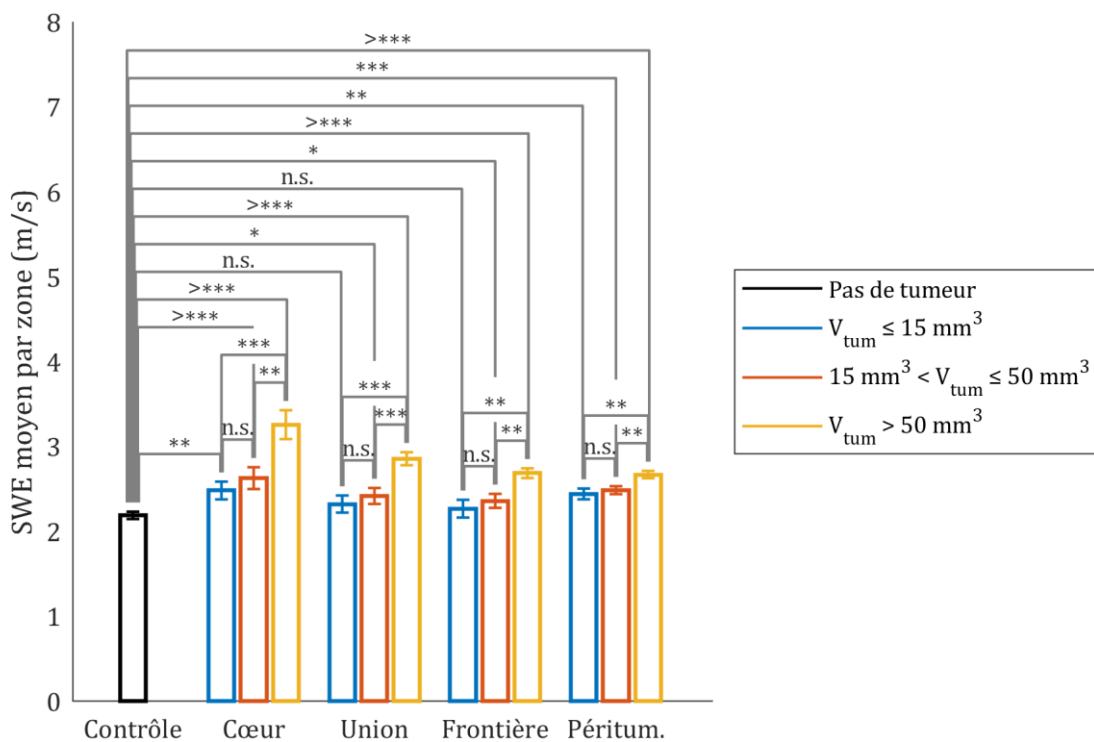


Figure 58 : Vitesse moyenne de l'onde de cisaillement évaluée en différentes zones pour les cas avec tumeur et dans la zone contrôle pour les acquisitions sans tumeur ($N = 63$ dont 36 acquisitions sur WT et 27 acquisitions sur TG). Les barres d'erreur représentent la SEM.

3.3.2 Doppler ultrarapide

Un exemple de Doppler ultrarapide 3D sur trois semaines est proposé en Figure 59. La vascularisation semble plus importante à la frontière de la tumeur, particulièrement en S9.

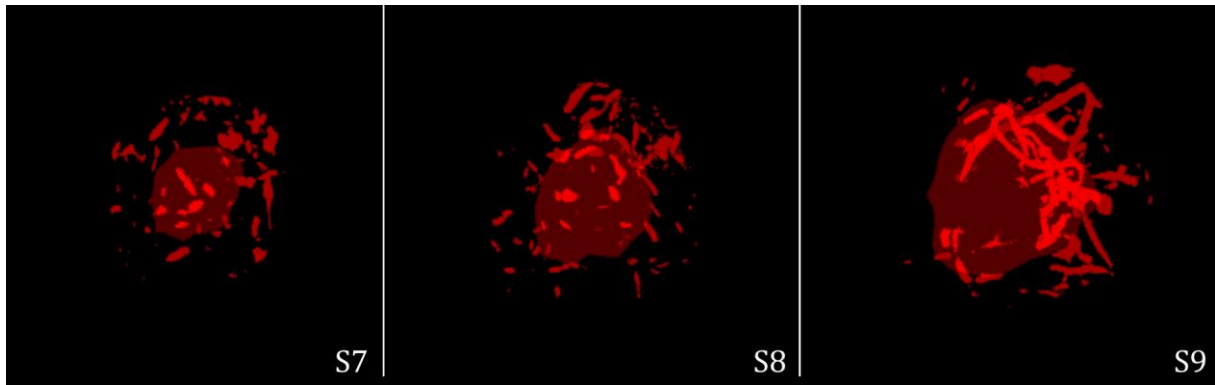


Figure 59 : Exemple de Doppler ultrarapide 3D binarisé d'une tumeur sur trois semaines consécutives. La zone transparente correspond à la tumeur (union) telle que contourée au mode B.

Les mesures de densité vasculaire moyenne sont présentées à la Figure 60. La densité moyenne de vaisseaux sanguins était de 3,8 % ($\sigma = 2,2\%$) dans la zone contrôle, 5,8 % ($\sigma = 8,5\%$) dans le cœur, 3,4 % ($\sigma = 3,2\%$) dans l'union, 2,9 % ($\sigma = 2,5\%$) dans la frontière et de 2,7 % ($\sigma = 1,6\%$) dans la zone péri-tumorale.

Les valeurs n'étaient pas significativement différentes selon la taille de la tumeur sauf dans la zone péri-tumorale où la densité moyenne augmentait légèrement entre les moyennes et les grandes tumeurs.

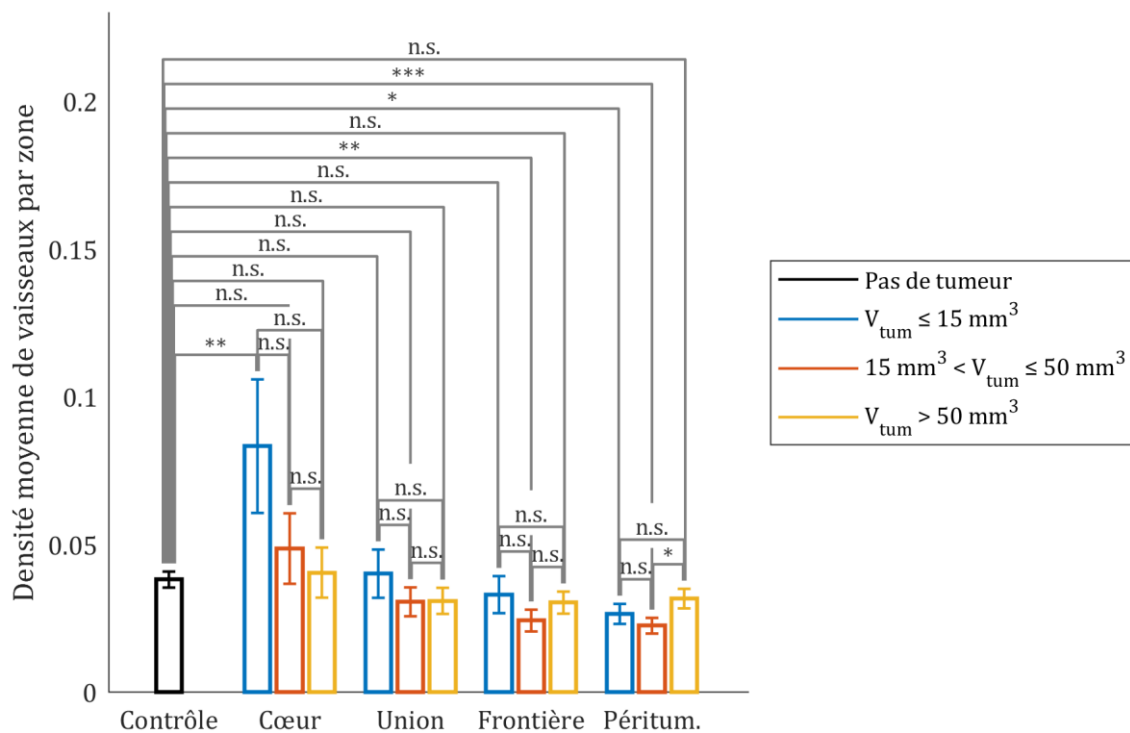


Figure 60 : Densité vasculaire moyenne évaluée en différentes zones par Doppler ultrarapide 3D pour les cas avec tumeur et dans la zone contrôle pour les acquisitions sans tumeur (N = 63 dont 36 acquisitions sur WT et 27 acquisitions sur TG). Les barres d'erreur représentent la SEM.

3.3.3 BTI

3.3.3.1 Cohérence et anisotropie fractionnelle

Un exemple de BTI 3D sur trois semaines est donné en Figure 61. À mesure que la tumeur grossit, les tissus aux alentours se réorganisent.

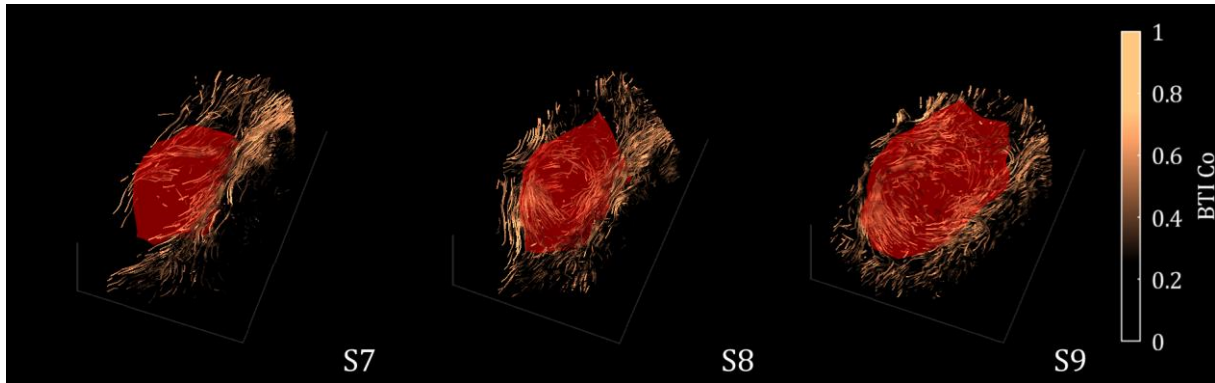


Figure 61 : Exemple de BTI 3D réalisée sur une tumeur sur trois semaines consécutives. La zone transparente rouge correspond à la tumeur (union) telle que contourée au mode B.

Les mesures de cohérence et d'anisotropie fractionnelle par BTI sont détaillées dans la Figure 62. La cohérence moyenne était de 0,47 ($\sigma = 0,05$) dans la zone contrôle, 0,52 ($\sigma = 0,10$) dans le cœur, 0,51 ($\sigma = 0,05$) dans l'union, 0,49 ($\sigma = 0,04$) dans la frontière et de 0,41 ($\sigma = 0,05$) dans la zone péri-tumorale.

L'anisotropie fractionnelle moyenne était de 0,39 ($\sigma = 0,04$) dans la zone contrôle, 0,24 ($\sigma = 0,15$) dans le cœur, 0,29 ($\sigma = 0,09$) dans l'union, 0,33 ($\sigma = 0,06$) dans la frontière et de 0,44 ($\sigma = 0,05$) dans la zone péri-tumorale.

Dans l'ensemble des zones, la cohérence décroît avec la taille de la tumeur et l'anisotropie fractionnelle croît, de façon souvent significative.

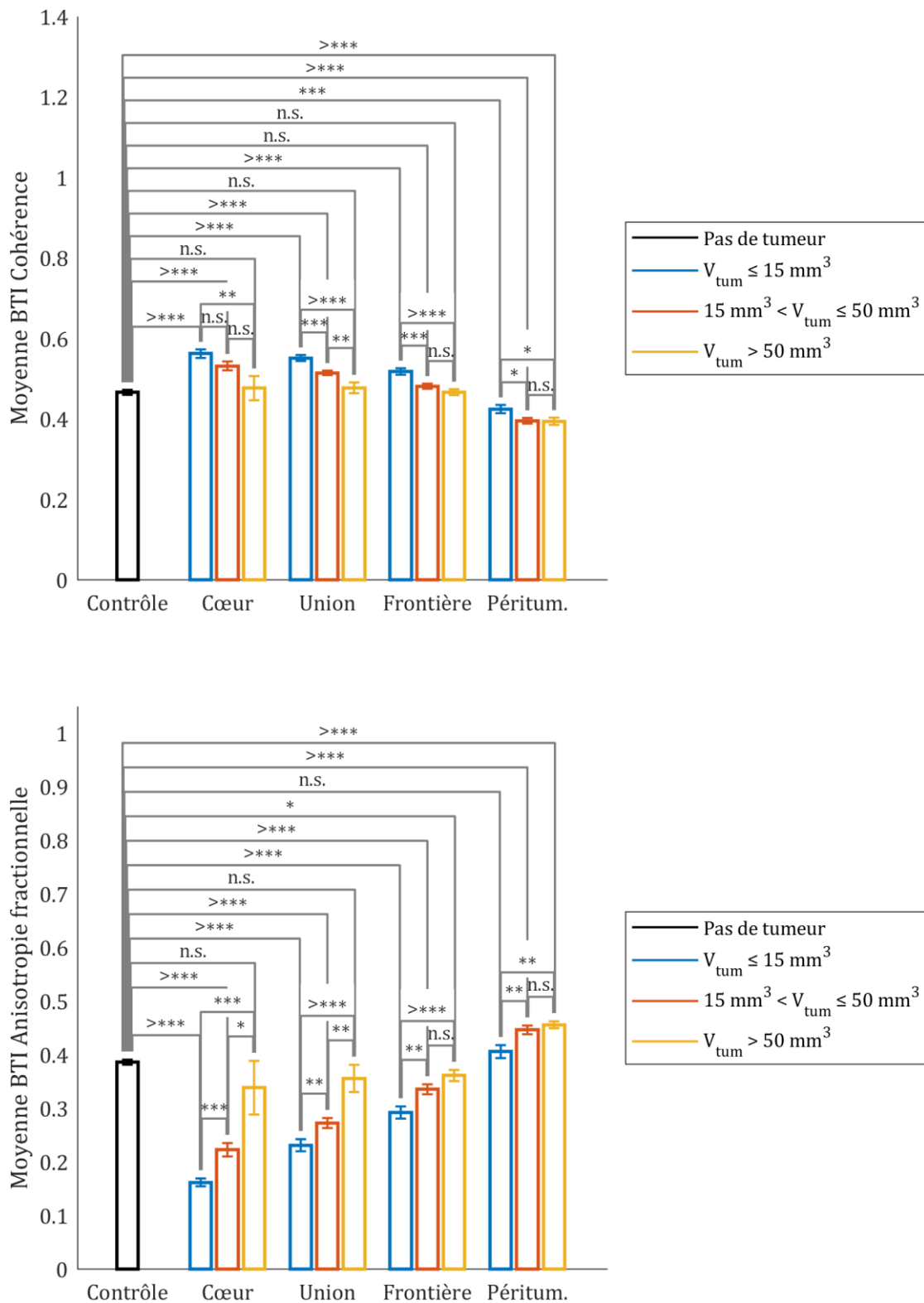


Figure 62 : Moyenne des scores de cohérence et d'anisotropie fractionnelle par BTI évalués en différentes zones pour les cas avec tumeur et dans la zone contrôle pour les acquisitions sans tumeur (N = 63 dont 36 acquisitions sur WT et 27 acquisitions sur TG). Les barres d'erreur représentent la SEM.

3.3.3.2 Score radial/tangent

Le score $S_{radial}^{BTI} / S_{tangent}^{BTI}$ était de 0,90 ($\sigma = 0,11$) dans la zone contrôle, 0,90 ($\sigma = 0,36$) dans le cœur, 0,75 ($\sigma = 0,17$) dans l'union, 0,70 ($\sigma = 0,14$) dans la frontière et de 0,92 ($\sigma = 0,24$) dans la zone péri tumorale.

Dans l'union et la frontière, le rapport $S_{radial}^{BTI} / S_{tangent}^{BTI}$ était significativement plus faible que dans la zone contrôle ce qui indique des tissus plus parallèles au bord de la tumeur. Aucun écart significatif n'a été observé selon la taille des tumeurs. Cependant, dans la zone frontière les p-values entre les petites et les grandes tumeurs et entre les moyennes et les grandes tumeurs étaient proches du seuil de significativité.

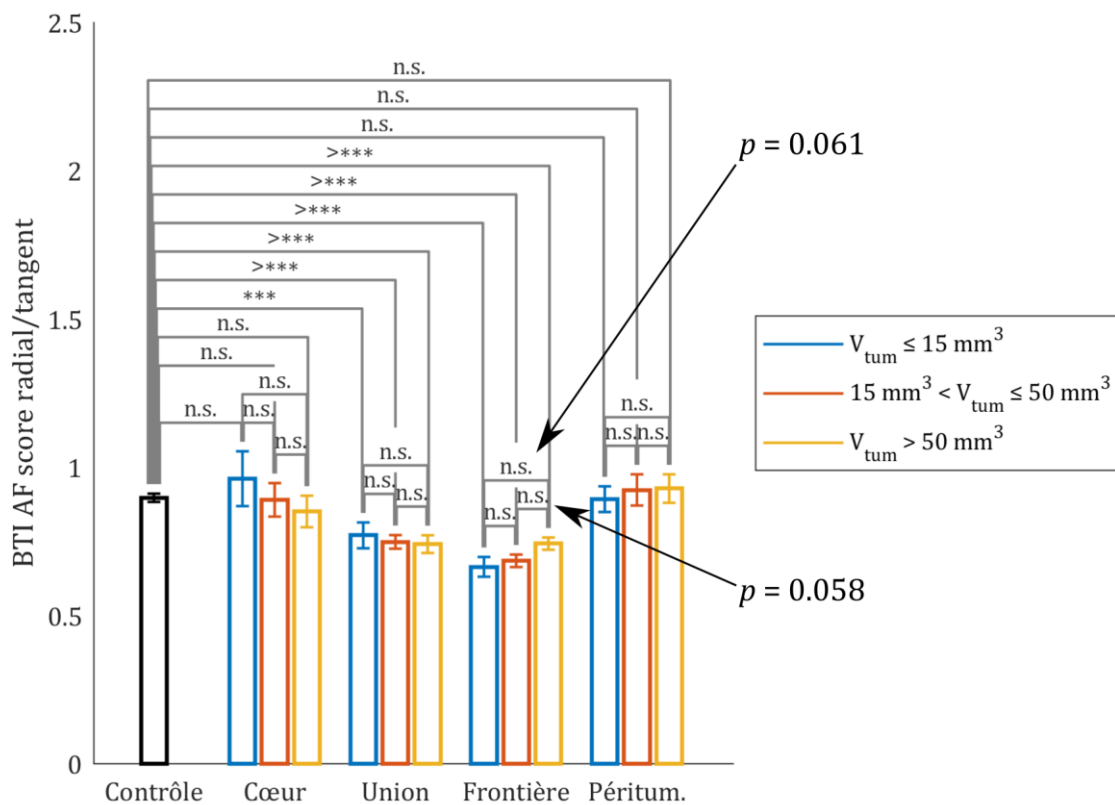


Figure 63 : Moyenne des scores $S_{radial}^{BTI} / S_{tangent}^{BTI}$ par BTI évalués en différentes zones pour les cas avec tumeur et dans la zone contrôle pour les acquisitions sans tumeur ($N = 63$ dont 36 acquisitions sur WT et 27 acquisitions sur TG). Les barres d'erreur représentent la SEM.

3.3.4 ULM

3.3.4.1 Visualisation

Pour chacune des 26 souris, une image ULM des densités de bulles a été reconstruite. Douze exemples sont présentés en Figure 64. Certaines tumeurs étaient très vascularisées en leur centre (ex : Figure 64 a, c). D'autres étaient vascularisées principalement à leur périphérie (ex : Figure 64 b, d, h). Les images permettent de retrouver des vaisseaux de quelques dizaines de micromètres et d'analyser leurs flux et leur morphologie (Figure 65).

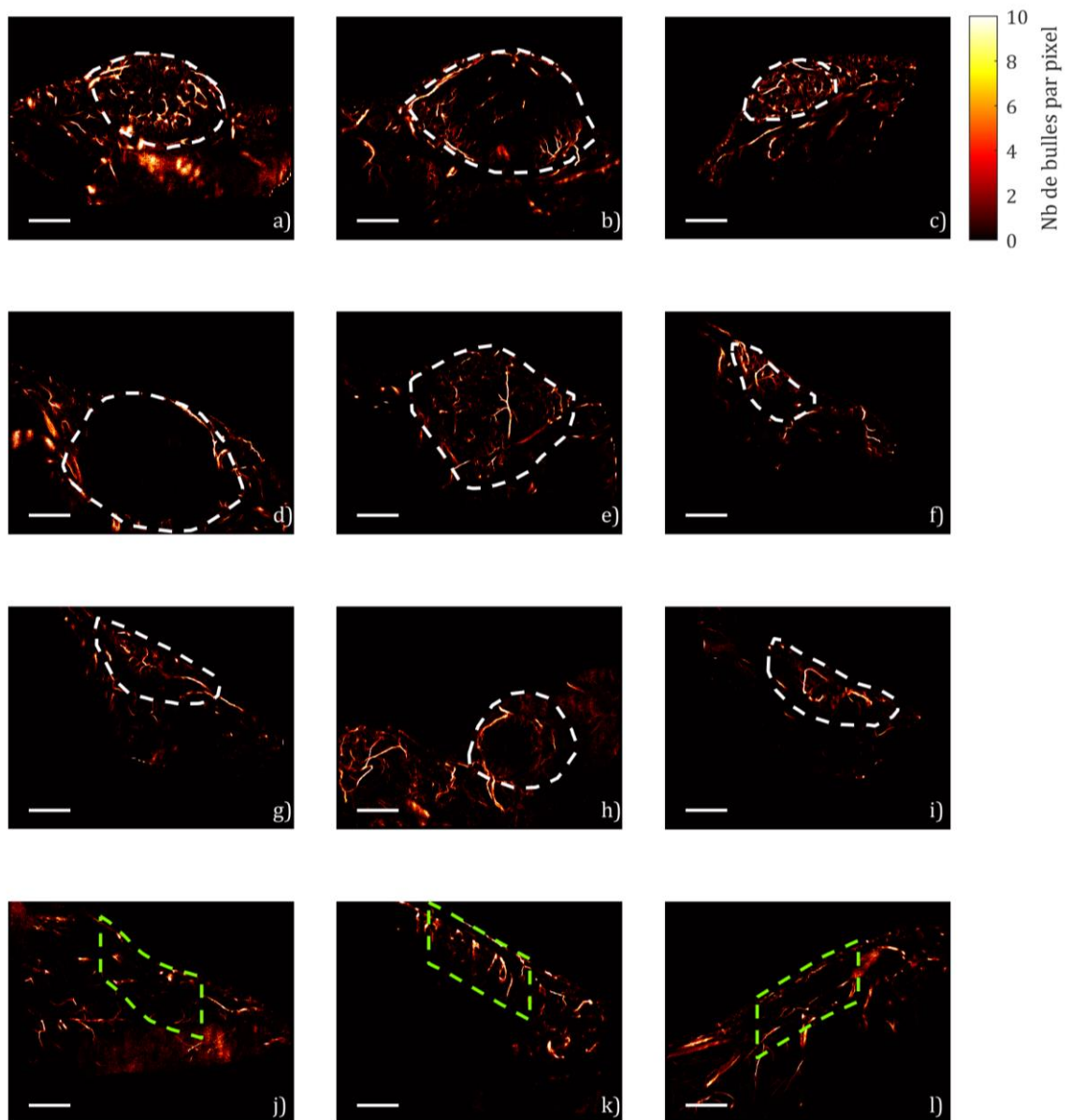


Figure 64 : Carte ULM des densités de bulles pour 12 acquisitions. La barre blanche mesure 2 mm. Les images (a-i) correspondent à des souris TG avec tumeur et les images (i-l) à des WT. La ligne blanche en pointillés représente le contour de la tumeur réalisé d'après le mode B. La ligne verte en pointillés correspond à la zone contrôle pour les souris WT. Sur l'image h) on peut observer une deuxième tumeur (sans contour, à la gauche de la première) car l'acquisition se situe entre deux mamelles proches.

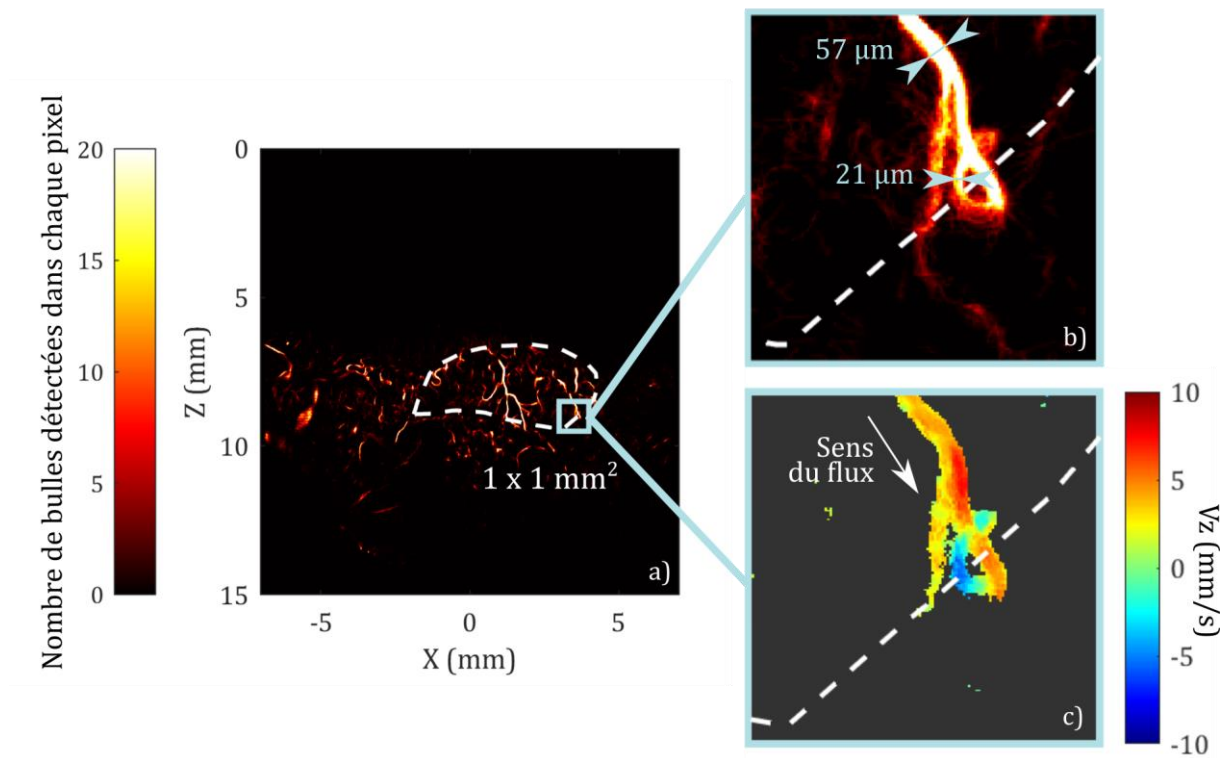


Figure 65 : a) Carte ULM des densités de bulles dans toute l'image et (b) sur un zoom de 1 mm x 1 mm. La ligne blanche en pointillés représente le contour de la tumeur réalisé d'après le mode B. c) La vitesse selon l'axe Z des bulles montre que le vaisseau visible en zoom à la périphérie de la tumeur réalise une boucle.

3.3.4.2 Quantification de la densité de la vascularisation

La densité vasculaire moyenne par ULM était de 5,2 % ($\sigma = 1,9$ %) dans la zone contrôle, 7,4 % ($\sigma = 5,2$ %) dans le cœur, 6,3 % ($\sigma = 3,7$ %) dans l'union, 5,2 % ($\sigma = 3,6$ %) dans la frontière et de 2,8 % ($\sigma = 2,1$ %) dans la zone péri tumorale.

La densité de vaisseaux augmentait de façon significative dans la frontière et la zone péri tumorale entre les petites/moyennes tumeurs et les grandes (Figure 66). De plus, elle était plus importante en ULM qu'au Doppler ultrarapide. La décorrélation entre les deux modalités s'observait plus nettement quand les tumeurs étaient thoraciques (mamelles 1-2-3).

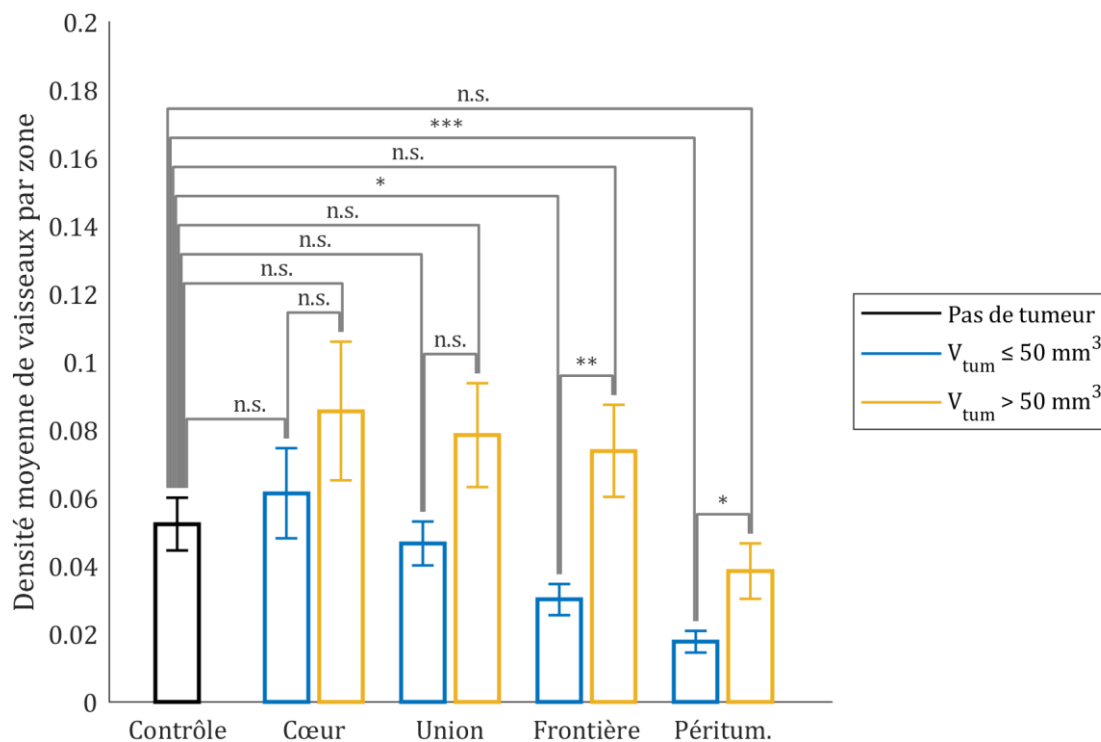


Figure 66 : Densité vasculaire moyenne évaluée par ULM 2D pour les souris TG dans différentes zones ($N = 11$ pour les petites et moyennes tumeurs, $N = 9$ pour les grandes tumeurs) et dans la zone centrale pour les acquisitions sur WT ($N = 6$). Les barres d'erreur représentent la SEM.

3.4 Étude de cas

3.4.1 Premier cas

Le premier cas proposé, une tumeur de la mamelle 1G, concerne la plus grande masse qui a été observée (coupe centrale : Figure 67, 3D : Figure 68). En S10 (avant euthanasie), son volume était de 357 mm³ pour un grand axe de 14,1 mm (probablement légèrement sous-estimé car une partie de la tumeur était hors champ). Au mode B, la tumeur était particulièrement homogène et sombre.

Sur le BTI, une orientation tangente était visible autour de la tumeur et quelques fibres étaient détectées dans la partie postérieure de la tumeur ($y < 0$). Les valeurs de l'AF et de la Co étaient respectivement de 0,57 et de 0,35 dans l'union, et de 0,43 et de 0,45 dans la zone péri-tumorale. Elles étaient proches de la moyenne des tumeurs pour la zone péri-tumorale (écart inférieur à 10 %) mais éloignées pour l'union. Cette tumeur avait une AF beaucoup plus élevée (+96,6 %) et une Co beaucoup plus faible (-31 %) que la moyenne.

Le SWE montrait une tumeur moyennement rigide dans l'ensemble. La vitesse moyenne des ondes de cisaillement était de 2,44 m/s dans l'union (-3,6 % par rapport à la moyenne des tumeurs), et de 2,58 m/s dans la zone péri-tumorale (+2,0 % par rapport à la moyenne des tumeurs). Cependant, sur la coupe (Figure 67 c) et sur le volume (Figure 68 b), une zone à la bordure de la tumeur en externe apparaissait plus rigide. La représentation 3D a également révélé une bande rigide traversant la tumeur. Le reste de la tumeur s'avérait très peu rigide.

La densité vasculaire était plus faible que la moyenne des tumeurs observées. Dans l'union, elle était de 2,0 % selon le Doppler ultrarapide (-41,2 % par rapport à la moyenne des tumeurs) et de 2,3 % selon l'ULM (-63,5 % par rapport à la moyenne des tumeurs - représentation en Figure 64 d). Sur le Doppler 3D ultrarapide, le réseau vasculaire apparaissait plus important à la frontière de la tumeur.

La coupe histologique montrait une tumeur composée principalement de liquide (zone rose claire). Cela pourrait expliquer en partie la faible vascularisation trouvée au Doppler ultrarapide puisque cette zone ne contenait pas de vaisseaux. En dehors de ce liquide, la zone tumorale était constituée de très peu de cellules du microenvironnement. Elle contenait en particulier peu de collagène. Cela est cohérent avec les faibles valeurs de Co

trouvées et la faible rigidité du tissu. Il était difficile d'établir une direction des tissus sur la coupe sauf autour de la tumeur où une couche de muscle était visible. De même les fibres repérées par BTI se situent principalement sur le tour de la tumeur.

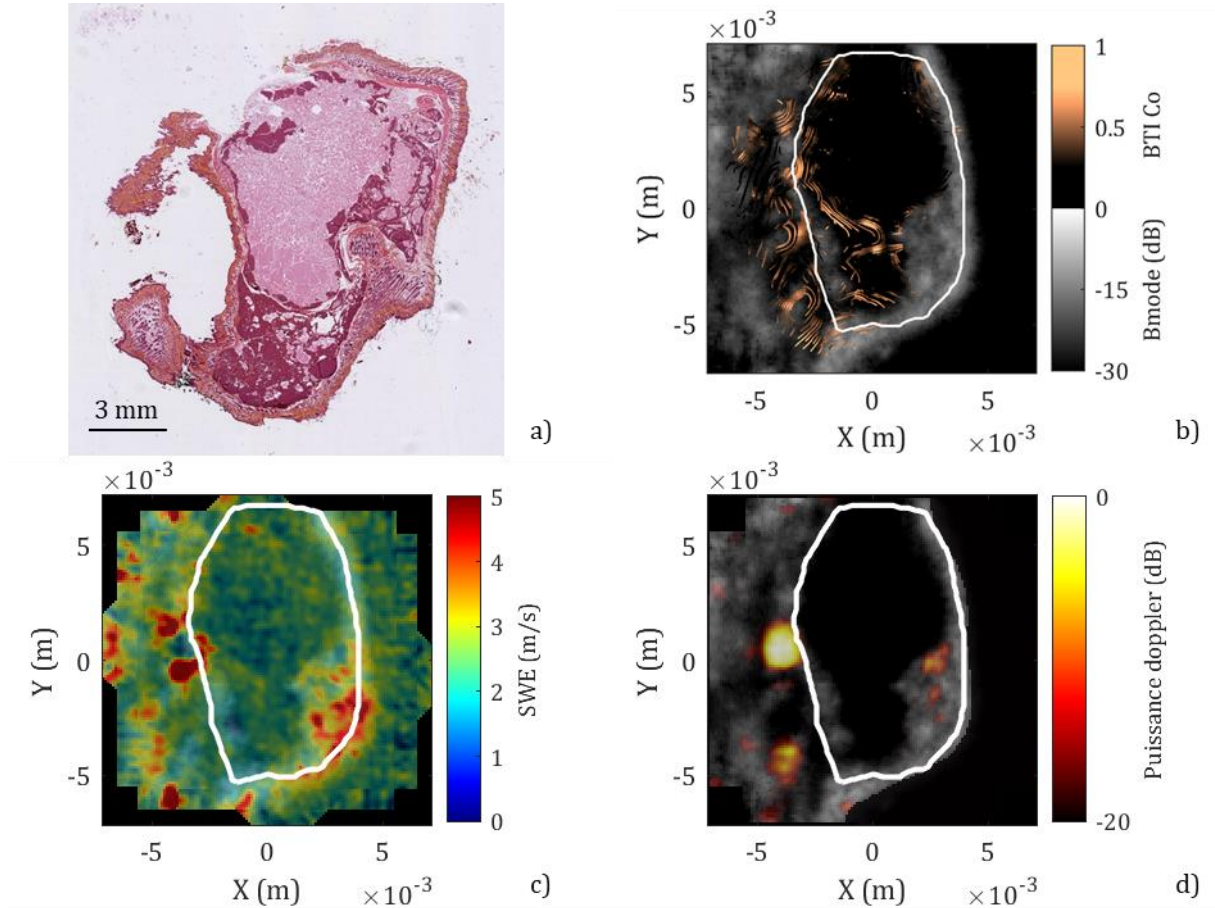


Figure 67 : Étude de cas 1 d'une souris TG à S10. a) Coupe histologique en HES. La zone rose claire est un liquide sécrété par la tumeur. La zone rose foncée correspond aux cellules tumorales. Autour de la tumeur on peut voir la peau avec notamment du collagène (orange) et des tiges pilaires (canaux visibles). b) BTI. c) SWE. d) Doppler ultrarapide. Le mode B est affiché en arrière-plan sur chaque modalité et le contour de la tumeur est représenté en blanc.

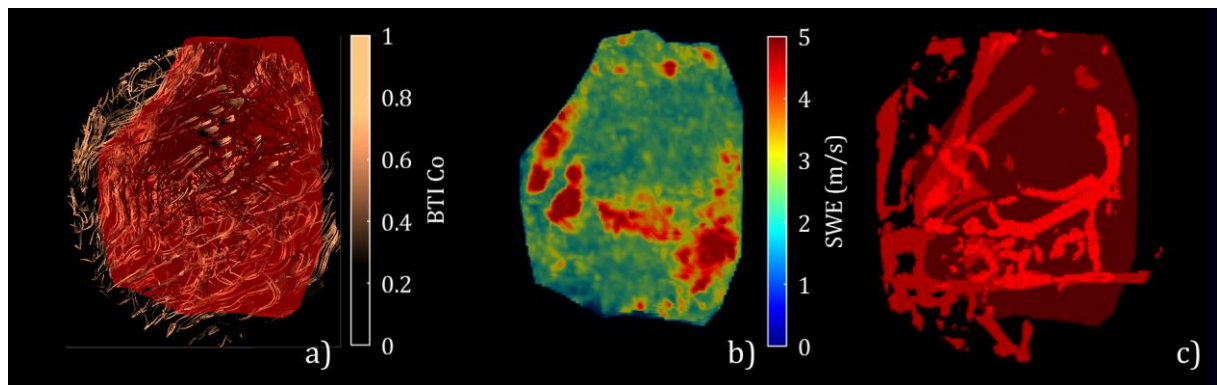


Figure 68 : Représentation 3D (vue de dessus) du premier cas. a) BTI, b) SWE, c) Doppler ultrarapide binarisé

3.4.2 Second cas

Le second cas proposé est un exemple typique de grande tumeur (coupe centrale : Figure 69, 3D : Figure 70). La masse se trouvait sur la mamelle 2D. En S9 (avant euthanasie), son volume était de 220 mm³ pour un grand axe de 10,4 mm. Au mode B, la tumeur apparaissait hétérogène.

Les fibres repérées grâce au BTI étaient principalement visibles au bord de la tumeur avec une orientation tangente. Certaines étaient également visibles au centre de la tumeur. Les valeurs de l'AF et de la Co étaient respectivement de 0,27 et de 0,50 dans l'union, et de 0,47 et de 0,35 dans la zone péri-tumorale. Ces valeurs étaient proches des moyennes (écart inférieur à 7 %) sauf pour la Co dans la zone péri-tumorale qui était plus basse (-14,6 %).

La carte SWE montrait une tumeur très rigide. La vitesse moyenne des ondes de cisaillement était de 3,40 m/s dans l'union (+34,4 % par rapport à la moyenne des tumeurs), et de 2,56 m/s dans la zone péri-tumorale (+1,2 % par rapport à la moyenne des tumeurs).

La densité vasculaire dans l'union était un peu plus faible que la moyenne des tumeurs. Elle était de 2,9 % selon le Doppler ultrarapide (-14,7 %) et de 6,2 % selon l'ULM (-1,6 % - représentation en Figure 64 b).

La coupe histologique révélait une tumeur principalement composée de cellules tumorales avec peu d'autres éléments constituant le microenvironnement. Cela pourrait expliquer l'importante rigidité et le niveau moyen de Co, d'AF et de vascularisation. Quelques poches de liquide ont été retrouvées. Un fascia (tissu conjonctif) entourant la tumeur bien délimitée était visible et pourrait être à l'origine de l'orientation tangente des fibres repérées au BTI à la frontière de la tumeur entourant la masse. Au Doppler 3D il était possible de constater que la plupart des vaisseaux proches de la tumeur semblaient venir de la même zone (antéro-interne).

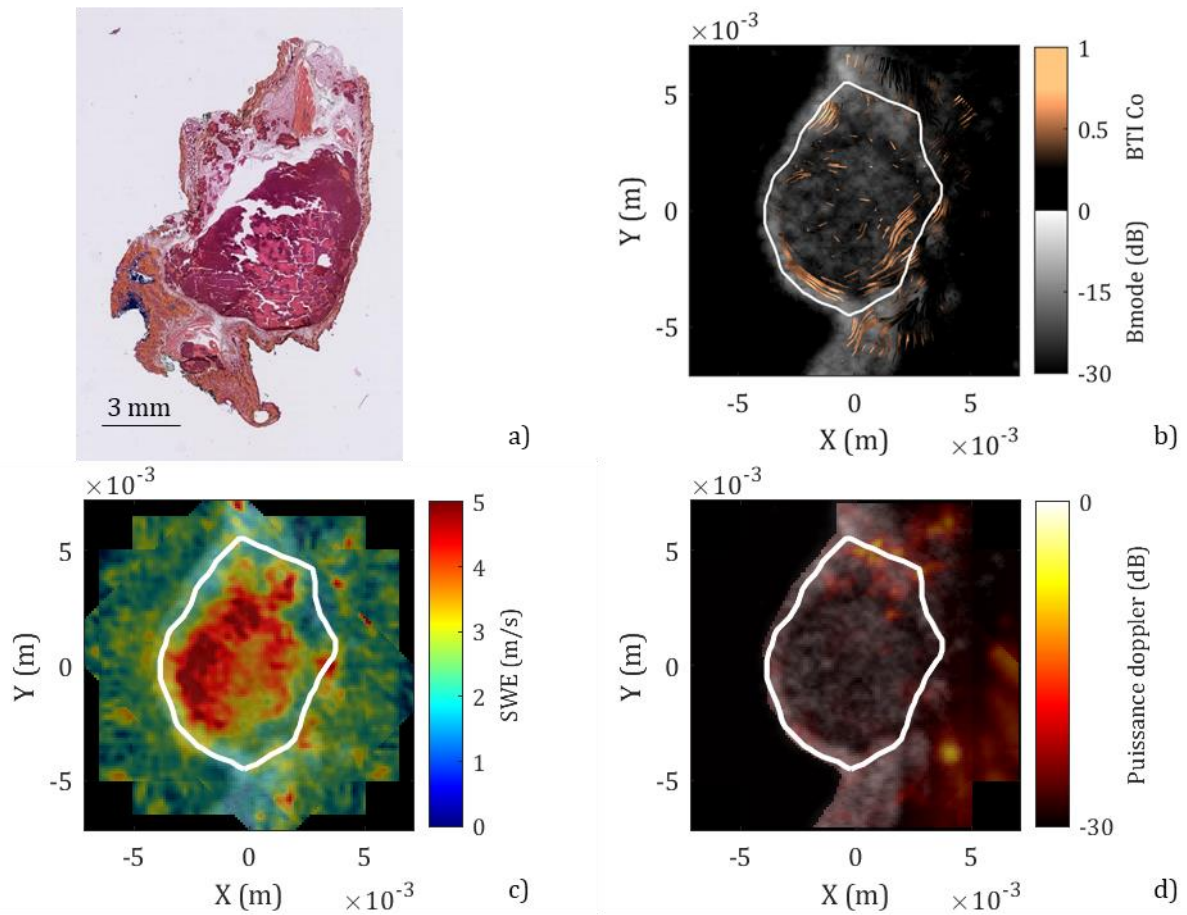


Figure 69 : Étude de cas 2 d'une souris TG à S9. a) Coupe histologique en HES. La zone rose claire est un liquide sécrété par la tumeur. La zone rose foncée correspond aux cellules tumorales. Autour de la tumeur on peut voir la peau avec notamment du collagène (orange) et des tiges pilaires (canaux visibles). Dans la partie supérieure, le faisceau rose correspond à un muscle b) BTI. c) SWE. d) Doppler ultrarapide. Le mode B est affiché en arrière-plan sur chaque modalité et le contour de la tumeur est représenté en blanc.

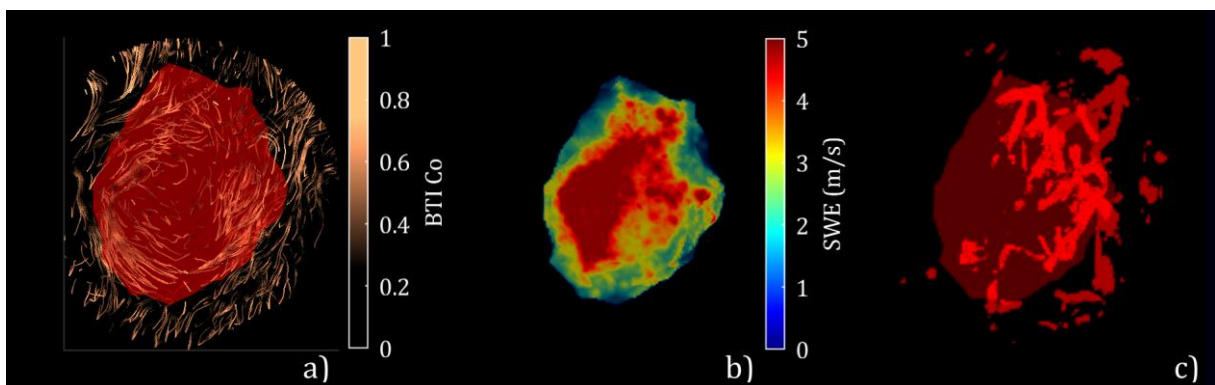


Figure 70 : Représentation 3D (vue de dessus) du second cas. a) BTI, b) SWE, c) Doppler ultrarapide binarisé

3.4.3 Troisième cas

Le dernier cas présenté est un exemple de tumeur moyenne, observée sur la mamelle 4G (coupe centrale : Figure 71, 3D : Figure 72). En S11 (avant euthanasie), son volume était de 32,5 mm³ pour un grand axe de 7,0 mm. Au mode B, la tumeur était hétérogène.

Le BTI détectait moins de fibres dans la tumeur que dans les deux autres cas étudiés. Les valeurs de l'AF et de la Co étaient respectivement de 0,23 et de 0,46 dans l'union, et de 0,42 et de 0,40 dans la zone péri-tumorale. Dans l'union, les valeurs de l'AF et de la Co étaient plus faibles que la moyenne (respectivement -20,7 % et -9,8 %) tandis que, dans la zone péri-tumorale, elles étaient proches des valeurs moyennes (écart inférieur à 4,5 %).

La rigidité était plus faible que pour les autres tumeurs. La vitesse moyenne était de 1,95 m/s dans l'union (-22,9 %), et de 2,26 m/s dans la zone péri-tumorale (-10,7 %).

Enfin la densité vasculaire dans l'union était de 5,6 % selon le Doppler ultrarapide et de 5,4 % selon l'ULM (représentée en Figure 64 i). Elle était donc plus importante que la moyenne des tumeurs selon le Doppler (+64,7 %) mais plus faible selon l'ULM (-14,3 %). Le Doppler 3D montrait qu'un vaisseau traversait la tumeur de part en part.

Différentes poches de liquides (en rose claire) et d'amas de cellules tumorales denses (en violet) et d'adipocytes (en blanc) étaient visibles sur la coupe histologique. La présence de ces derniers pourrait expliquer la faible rigidité observée au SWE et la faible valeur de Co et d'AF par rapport à la moyenne. On peut également supposer que la présence de vastes zones d'adipocytes permet aux vaisseaux de s'y infiltrer plus facilement. Comme dans les deux exemples précédents, le microenvironnement tumoral est très limité. Les scores de Co et d'AF restaient proches des valeurs moyennes. La tumeur était très nettement délimitée par un fascia. Bien que moins nette que dans les deux exemples précédents, l'orientation du BTI à la frontière semblait également suivre le contour de la tumeur.

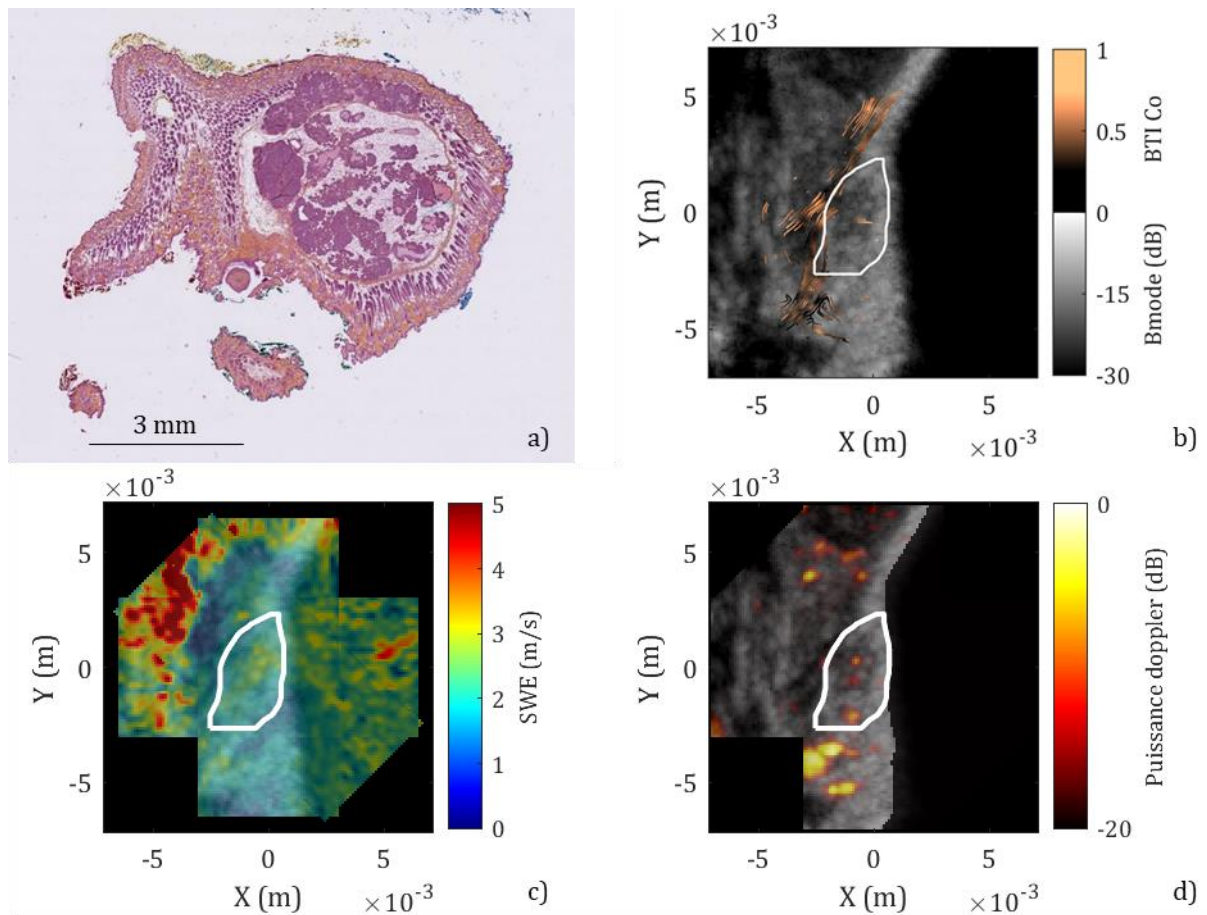


Figure 71 : Étude de cas 3 d'une souris TG à S11. a) Coupe histologique en HES. La zone rose foncée correspond aux cellules tumorales. La zone blanche au centre correspond aux adipocytes. Autour de la tumeur il est possible de voir la peau constituée notamment du collagène (orange) et de tiges pilaires (canaux visibles). b) BTI. c) SWE. d) Doppler ultrarapide. Le mode B est affiché en arrière-plan sur chaque modalité et le contour de la tumeur est représenté en blanc.

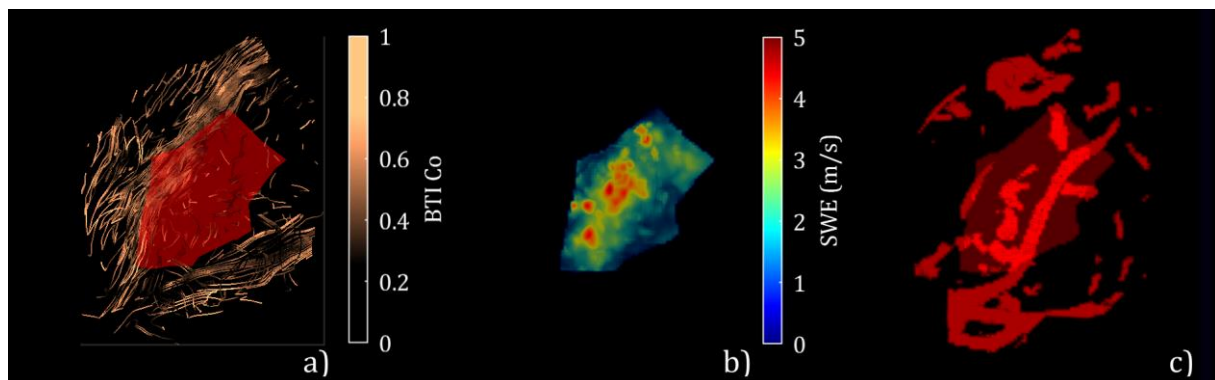


Figure 72 : Représentation 3D (vue de dessus) du troisième cas. a) BTI, b) SWE, c) Doppler ultrarapide binarisé

4 DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'il était possible de réaliser *in vivo* notre méthodologie d'acquisition ultrasonore multiparamétrique 3D. Cette méthode nous a permis de suivre l'évolution du SWE, BTI et Doppler ultrarapide au cours de la croissance tumorale de 20 souris TG sur six semaines.

Aucun animal n'est décédé accidentellement et aucun point limite n'a été atteint. Des acquisitions multimodales ont pu être réalisées pour toutes les tumeurs détectées grâce au protocole, ce qui confirme sa faisabilité d'un point de vue technique. L'augmentation de la masse des souris TG par rapport aux WT confirme l'apparition des tumeurs. Néanmoins, sans avoir étudié l'intégralité des tumeurs apparues (potentiellement une par mamelle), il est impossible de relier directement cette prise de masse à la masse tumorale imagée.

Toutes les souris TG ont développé des tumeurs visibles au mode B dont le suivi a pu commencer au plus tard en S9 et durer au minimum 3 semaines consécutives.

Les résultats du SWE ont montré une augmentation de la rigidité avec la taille de la tumeur, ce qui est concordant avec la littérature (Chamming's et al. 2013). Dans le cas des petites tumeurs, la rigidité de l'union et de la zone frontière n'étaient pas significativement différentes de celle de la zone contrôle. Cependant, pour ces mêmes tumeurs il était possible de détecter une différence significative entre la rigidité de la zone contrôle et celles du cœur ou de la zone péri-tumorale. Dans le cœur de la tumeur, l'écart-type des valeurs de rigidité était plus grand que dans les autres zones traduisant une dispersion plus importante (Figure 58). Cette grande variabilité pourrait s'expliquer par l'absence ou la présence selon les cas d'un cœur nécrotique, peu rigide (Chamming's et al. 2013).

L'imagerie Doppler ultrarapide a été plus délicate à construire, en particulier pour les tumeurs se situant sur les mamelles thoraciques (numérotées de 1 à 3). En effet, le Doppler est non seulement sensible aux mouvements respiratoires, plus importants dans cette zone, mais aussi à la présence du cœur dont les battements rapides ajoutent des artefacts. Par conséquent, bien que la technique utilisée permette théoriquement de déceler la microvascularisation (Demené et al. 2016), il est probable que les plus petits vaisseaux n'aient pas été bien repérés dans certains cas. La méthode de reconstruction de

la tomographie du Doppler ultrarapide présentée dans Demené et al., 2019, et illustrée pour des xénogreffes de tumeurs pourrait permettre d'améliorer la détection de ces vaisseaux. Une augmentation significative de la densité vasculaire entre les moyennes et petites tumeurs dans la zone péri tumorale (angiogenèse) a tout de même pu être observée. Le Doppler ultrarapide 3D permet de représenter l'arbre vasculaire dans et autour de la tumeur ce qui est impossible avec de simples coupes 2D.

Le BTI a été testé ici pour la première fois sur des tumeurs *in vivo*. Dans toutes les zones, plus les tumeurs étaient grandes plus la Co diminuait et l'AF augmentait. Cette évolution était plus marquée dans le cœur et l'union de la tumeur que dans la zone péri tumorale. Cela pourrait être dû à une organisation plus anarchique donc aléatoire des structures qui composent la tumeur au fur et à mesure de sa croissance. À la frontière, le score $S_{radial}^{BTI} / S_{tangent}^{BTI}$ était inférieur à 1, ce qui signifie que les tumeurs étaient plus tangentées que radiales. Ce score était cohérent avec les observations faites sur les coupes histologiques dans lesquelles les fibres de collagène ou une couche de muscle encapsulaient la plus grande partie de la tumeur. Si l'augmentation (non significative dans notre étude) du score $S_{radial}^{BTI} / S_{tangent}^{BTI}$ avec la taille de la tumeur se confirmait, il pourrait s'agir d'un marqueur de l'apparition de TACS-3, c'est-à-dire de fibres de collagène radiales favorisant l'invasion tumorale.

Les souris MMTV-PyMT sont un modèle fréquemment utilisé pour étudier l'interaction entre la tumeur et son milieu. Néanmoins, elles ont beaucoup moins de collagène dans leurs glandes mammaires que les humains ce qui rend plus difficile la comparaison entre le BTI et les coupes histologiques. En effet, ces dernières ne comportaient pas ou peu d'orientations facilement identifiables. De futures études pourraient s'appuyer sur des modèles ajoutant aux souris MMTV-PyMT la mutation $Col1a1^{tmJae}$ (qui promeut la production de collagène). Des travaux précédents dans lesquels différentes TACS avaient été identifiés (Provenzano et al. 2008) ont utilisé ce type de modèle génétiquement modifié. L'objectif de ce travail étant de prouver la faisabilité de notre méthode multiparamétrique, ces modèles n'avaient pas été choisis du fait de leur coût et de leur complexité.

À notre connaissance, cette étude ULM est la première sur GEMM et la première préclinique sur un modèle de cancer du sein. Les études précédentes sur modèle murin ont utilisé des greffes sous-cutanées de tumeurs non mammaires (Lin et al. 2017 ; Opacic

et al. 2018). De premières études cliniques de faisabilité ont été réalisées chez l'humain pour les tumeurs du sein (Dencks et al. 2019 ; Huang et al. 2021 ; Opacic et al. 2018). L'expérience décrite dans ce chapitre prouve la faisabilité de la méthode qui a permis de différencier des vaisseaux proches de quelques dizaines de micromètres de large malgré les mouvements respiratoires. Comme pour le Doppler ultrarapide, elle a montré que la densité vasculaire augmentait dans la frontière et la zone péri-tumorale avec le volume des tumeurs. La densité de vaisseaux trouvés avec l'ULM 2D était supérieure à celle du Doppler ultrarapide 3D. Cela peut venir du choix du plan ou d'une meilleure détection des vaisseaux avec l'ULM. L'imagerie ULM a également décelé des structures morphologiques caractéristiques de l'évolution anarchique des vaisseaux sanguins tumoraux.

Les coupes histologiques ont permis de valider visuellement les données obtenues avec les modalités ultrasonores. Les tumeurs contenant beaucoup de liquide ou d'adipocytes étaient peu rigides. Les représentations du BTI faisaient ressortir une orientation des tissus plus marquée aux bords des tumeurs pouvant correspondre aux seules zones, les fascias et les muscles sous-cutanés, dont l'orientation était facilement identifiable sur les coupes histologiques. Les fibres de collagène étaient très peu denses dans la tumeur. Leur orientation n'a donc pas pu être comparée au BTI. La faible présence de grands vaisseaux sanguins observables dans les coupes histologiques rendait la comparaison qualitative avec le Doppler ultrarapide ou l'ULM difficile. Une estimation quantitative automatique de la densité vasculaire sur les coupes histologiques pourrait permettre de comparer et de valider ces deux modalités ultrasonores.

5 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous montrons qu'il est possible de réaliser en moins d'une heure et demie notre méthode multiparamétrique *in vivo* malgré les mouvements. Le SWE et l'ULM donnent des résultats cohérents avec la littérature. La méthode de reconstruction du Doppler ultrarapide pourrait être encore améliorée pour limiter les artefacts. Pour la première fois, le BTI et l'ULM ont été réalisées sur des GEMM. Les résultats obtenus par ces techniques identifient des structures tissulaires et vasculaires caractéristiques de l'évolution tumorale. Ce travail a permis de générer la première base de données ultrasonores multiparamétriques *in vivo* incluant le BTI pour le suivi de croissance tumorale chez un modèle de cancer du sein.

6 RÉFÉRENCES DU CHAPITRE

- Antuofermo E, Miller MA, Pirino S, Xie J, Badve S, Mohammed SI. Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs—A Model of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2007;16:2247–2256.
- Attalla S, Taifour T, Bui T, Muller W. Insights from transgenic mouse models of PyMT-induced breast cancer: recapitulating human breast cancer progression in vivo. *Oncogene* Nature Publishing Group, 2021;40:475–491.
- Chamming's F, Latorre-Ossa H, Le Frère-Belda MA, Fitoussi V, Quibel T, Assayag F, Marangoni E, Autret G, Balvay D, Pidial L, et al. Shear wave elastography of tumour growth in a human breast cancer model with pathological correlation. *Eur Radiol* 2013;23:2079–2086.
- Demené C, Payen T, Dizeux A, Barrois G, Gennisson J-L, Bridal L, Tanter M. 3-D Longitudinal Imaging of Tumor Angiogenesis in Mice in Vivo Using Ultrafast Doppler Tomography. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2019;45:1284–1296.
- Demené C, Tiran E, Sieu L-A, Bergel A, Gennisson JL, Pernot M, Deffieux T, Cohen I, Tanter M. 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *NeuroImage* 2016;127:472–483.
- Dencks S, Piepenbrock M, Opacic T, Krauspe B, Stickeler E, Kiessling F, Schmitz G. Clinical Pilot Application of Super-Resolution US Imaging in Breast Cancer. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2019;66:517–526.
- Dewi FN, Cline JM. Nonhuman primate model in mammary gland biology and neoplasia research. *Lab Anim Res* 2021;37:3.
- Eriksson P-O, Aaltonen E, Jr RP, Lauritzson P, Miyazaki H, Pietras K, Månsson S, Hansson L, Leander P, Axelsson O. Novel Nano-Sized MR Contrast Agent Mediates Strong Tumor Contrast Enhancement in an Oncogene-Driven Breast Cancer Model. *PLOS ONE* Public Library of Science, 2014;9:e107762.
- Errico C, Pierre J, Pezet S, Desailly Y, Lenkei Z, Couture O, Tanter M. Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature* Nature Publishing Group, 2015;527:499–502.
- Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *1992*;12:8.
- Huang C, Zhang W, Gong P, Lok U-W, Tang S, Yin T, Zhang X, Zhu L, Sang M, Song P, et al. Super-resolution ultrasound localization microscopy based on a high frame-rate clinical ultrasound scanner: an in-human feasibility study. *Phys Med Biol* IOP Publishing, 2021;66:08NT01.

- Imbault M, Faccinnetto A, Osmanski B-F, Tissier A, Deffieux T, Gennisson J-L, Vilgrain V, Tanter M. Robust sound speed estimation for ultrasound-based hepatic steatosis assessment. *Phys Med Biol* 2017;62:3582–3598.
- Jarrosson L, Costechareyre C, Gallix F, Ciré S, Gay F, Imbaud O, Teinturier R, Marangoni E, Aguéra K, Delloye-Bourgeois C, et al. An avian embryo patient-derived xenograft model for preclinical studies of human breast cancers. *iScience* 2021;24:103423.
- Lin EY, Jones JG, Li P, Zhu L, Whitney KD, Muller WJ, Pollard JW. Progression to Malignancy in the Polyoma Middle T Oncoprotein Mouse Breast Cancer Model Provides a Reliable Model for Human Diseases. *The American Journal of Pathology* 2003;163:2113–2126.
- Lin F, Shelton SE, Espíndola D, Rojas JD, Pinton G, Dayton PA. 3-D Ultrasound Localization Microscopy for Identifying Microvascular Morphology Features of Tumor Angiogenesis at a Resolution Beyond the Diffraction Limit of Conventional Ultrasound. *Theranostics* 2017;7:196–204.
- Mercatali L, La Manna F, Groenewoud A, Casadei R, Recine F, Miserocchi G, Pieri F, Liverani C, Bongiovanni A, Spadazzi C, et al. Development of a Patient-Derived Xenograft (PDX) of Breast Cancer Bone Metastasis in a Zebrafish Model. *IJMS* 2016;17:1375.
- Opacic T, Dencks S, Theek B, Piepenbrock M, Ackermann D, Rix A, Lammers T, Stickeler E, Delorme S, Schmitz G, et al. Motion model ultrasound localization microscopy for preclinical and clinical multiparametric tumor characterization. *Nat Commun* 2018;9:1527.
- Pfefferle AD, Herschkowitz JI, Usary J, Harrell JC, Spike BT, Adams JR, Torres-Arzayus MI, Brown M, Egan SE, Wahl GM, et al. Transcriptomic classification of genetically engineered mouse models of breast cancer identifies human subtype counterparts. 2013;16.
- Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L, Rueden CT, White JG, Keely PJ. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Medicine* 2008;6:11.
- Ren J, Liu S, Cui C, Dijke P ten. Invasive Behavior of Human Breast Cancer Cells in Embryonic Zebrafish. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 2017;e55459.
- Renaudin N, Demené C, Dizeux A, Ialy-Radio N, Pezet S, Tanter M. Functional ultrasound localization microscopy reveals brain-wide neurovascular activity on a microscopic scale. *Nat Methods Nature Publishing Group*, 2022;19:1004–1012.
- Rosen S, Brisson BK, Durham AC, Munroe CM, McNeill CJ, Stefanovski D, Sørenmo KU, Volk SW. Intratumoral collagen signatures predict clinical outcomes in feline mammary carcinoma. Cukierman E, ed. *PLoS ONE* 2020;15:e0236516.
- Sharpless NE, DePinho RA. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov Nature Publishing Group*, 2006;5:741–754.

Tim Jerman. Jerman Enhancement Filter. 2017 [cited 2022 Jul 28]. Available from:
<https://github.com/timjerman/JermanEnhancementFilter>

Xia H-J, He B-L, Wang C-Y, Zhang H-L, Ge G-Z, Zhang Y-X, Lv L-B, Jiao J-L, Chen C.
PTEN/PIK3CA genes are frequently mutated in spontaneous and
medroxyprogesterone acetate-accelerated 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-
induced mammary tumours of tree shrews. *European Journal of Cancer*
2014;50:3230–3242.

Conclusion de la thèse

Conclusion

Cette thèse s'inscrit dans la continuité des recherches menées depuis plusieurs années au laboratoire Physique pour la Médecine afin de mettre au point des techniques d'imagerie ultrasonores innovantes et de les apporter au chevet du patient. Elle combine ainsi différentes techniques d'échographie développées au laboratoire dans le but de caractériser des tumeurs du sein pour proposer une aide au diagnostic : l'élastographie par onde de cisaillement (SWE), le Doppler ultrarapide, l'imagerie du tenseur de rétrodiffusion (BTI) et la microscopie par localisation ultrasonore (ULM). Nous nous sommes particulièrement intéressés à une imagerie 3D permettant de mieux prendre en considération l'hétérogénéité des tissus. La principale nouveauté de cette thèse réside dans l'association de ces modalités en 3D appliquée au cas du cancer du sein. Nous avons développé un protocole multiparamétrique 3D applicable à l'imagerie de tumeurs mammaires et capable d'identifier des biomarqueurs pour améliorer le diagnostic de la maladie. Plusieurs étapes ont été franchies pour atteindre ces résultats.

D'abord, nous avons mis au point une nouvelle méthode pour réaliser une imagerie du tenseur de rétrodiffusion en 3D par tomographie. Nous avons montré sur des fantômes simples que cette approche était réalisable en un temps raisonnable (< 20 min). Puis, nous avons fabriqué un fantôme unique en son genre permettant de tester notre séquence multiparamétrique. La validation de notre méthode ayant été réalisée, nous avons pu l'appliquer *ex vivo* sur des tumeurs humaines (Institut Curie) et *in vivo* sur un modèle préclinique. Ces expériences ont prouvé la faisabilité de la méthode proposée en utilisation réelle.

Un autre objectif de cette thèse était d'évaluer si le BTI pouvait permettre de mesurer l'orientation des fibres de collagène des tumeurs. Au chapitre IV, nous avons montré que l'évaluation de cette orientation par BTI était corrélée aux structures détectables sur les lames histologiques. Puis au chapitre V, nous avons comparé le BTI reconstruit en 3D sur quelques cas représentatifs avec des lames histologiques. Des études complémentaires devront être menées pour optimiser les paramètres du BTI et déterminer précisément la taille des structures qu'il est capable de repérer. Par ailleurs, la capacité du BTI à détecter l'orientation dans toutes les directions de l'espace (en particulier en azimut) devrait être examinée dans de futurs travaux.

L'étude *ex vivo* présentée au chapitre IV a permis d'identifier plusieurs nouveaux biomarqueurs potentiels pour le diagnostic du cancer du sein. Ces résultats devront bien

Conclusion

entendu être validés en concevant des expériences spécifiques pour chacun d'eux sur un nombre de cas plus important. Par ailleurs, des études *in vivo* humaines devront être menées pour vérifier que les résultats obtenus sont identiques. Elles permettront également de tester le Doppler ultrarapide et l'ULM. L'évolution technologique dans le domaine étant rapide, il sera alors nécessaire de décider si les séquences doivent être implémentées sur des sondes matricielles ou si la combinaison d'une sonde linéaire couplée à un moteur reste préférable. En effet, si les échographes permettant de commander des sondes matricielles deviennent suffisamment compacts et disponibles, il sera alors possible de réaliser ces modalités 3D plus rapidement, sans devoir utiliser une structure motorisée.

Dans le dernier chapitre, l'étude préclinique *in vivo* a démontré la faisabilité de notre méthode par tomographie malgré le mouvement respiratoire. Pour un passage en clinique, les mouvements pourraient être fortement diminués par un système de maintien du sein comme pour une mammographie. Au-delà de l'application clinique, les méthodes proposées pourraient aussi apporter un nouvel outil aux méthodes précliniques de suivi de croissance tumorale. Dans notre étude, les principales limitations rencontrées sont venues de la reconstruction 3D du Doppler ultrarapide qui devra être améliorée pour limiter les artefacts liés au cœur.

Enfin, les bases de données multiparamétriques générées pendant cette thèse, uniques en leur genre, continueront à être un objet d'études au laboratoire pour tenter de révéler et comprendre les relations qui pourraient exister entre les différents modes échographiques étudiés et la structure microscopique sous-jacente des tumeurs. Ces données pourraient également permettre d'entraîner des modèles d'apprentissage supervisé pour appuyer le diagnostic et la caractérisation des cancers du sein.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

Guillaumin J-B, Djerroudi L, Aubry J-F, Tardivon A, Tanter M, Vincent-Salomon A, Berthon B. Proof of Concept of 3-D Backscatter Tensor Imaging Tomography for Non-invasive Assessment of Human Breast Cancer Collagen Organization. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2022;48:1867–1878.

Guillaumin J-B, Djerroudi L, Aubry J-F, Tardivon A, Dizeux, A., Tanter M, Vincent-Salomon A, Berthon B. Biopathological characterization and grade assessment of breast cancer with 3D multiparametric ultrasound combining shear wave elastography and backscatter tensor imaging, *en relecture*.

Présentations orales lors de conférences internationales

Guillaumin J-B, Aubry J-F, Tanter M, Berthon B. A new approach for 3D assessment of Backscatter Tensor Imaging for evaluating tissue fiber structures. EMIM 2021, Göttingen, Allemagne.

Guillaumin J-B, Aubry J-F, Tanter M, Berthon B. A novel strategy for 3D imaging of tissue fiber structure. IEEE IUS 2021, online.

Guillaumin J-B, Aubry J-F, Tanter M, Berthon B. 3D ultrasound-based multiparametric imaging for the monitoring of structural and functional characteristics of growing breast tumors in a MMTV-PyVT murine model. IEEE IUS 2022, Venise, Italie.

Présentation de poster lors de conférences internationales

Guillaumin J-B, Djerroudi L, Aubry J-F, Tardivon A, Tanter M, Vincent-Salomon A, Berthon B. Non-invasive ultrasound imaging of the fiber structure in breast cancer: an ex-vivo pilot study, poster presentation. EACR-ESOI 2021, online.

RÉSUMÉ

En France, environ une femme sur dix développera un cancer du sein au cours de sa vie. Les méthodes d'imagerie actuelles repèrent très efficacement des tumeurs suspectes mais elles ne permettent pas de les caractériser avec précision. Pour cette étape de diagnostic, un prélèvement de tissus (biopsie) reste nécessaire.

Dans cette thèse, nous avons proposé une approche couplant de nouveaux modes échographiques permettant de détecter les vaisseaux sanguins, la rigidité et l'organisation des tissus. Ces analyses sans aucun danger pourraient nous permettre de mieux caractériser les tumeurs et ainsi nous aider à poser des diagnostics plus précoces.

Par des expériences menées sur des cancers *ex vivo* et *in vivo*, nous montrons d'une part, qu'il est possible de réaliser ces acquisitions multiparamétriques de façon efficace en 3D, et d'autre part que les caractéristiques ainsi mesurées sont bien corrélées aux observations microscopiques réalisées par les médecins pour poser le diagnostic.

MOTS CLÉS

imagerie par ultrasons ultrarapides, imagerie 3D, imagerie multiparamétrique, analyse de larges données, cancer

ABSTRACT

In France, approximately one in ten women will develop a breast cancer during their lifetime. Current imaging methods are very effective in identifying suspicious tumors but do not allow for their precise characterization. For this diagnostic step, a tissue sample (biopsy) is necessary.

In this thesis, we provided an approach coupling new ultrasound modes to detect blood vessels, stiffness and tissue organization. These completely safe analyses could allow us to better characterize tumors and thus help us make earlier diagnoses.

With the experiments carried out on *ex vivo* and *in vivo* cancers, on the one hand, we demonstrate that these multiparametric acquisitions can be efficiently performed in 3D, and on the other hand, that the characteristics measured using this method correspond to the microscopic observations made by doctors in order to establish a diagnosis.

KEYWORDS

ultrafast ultrasound imaging, 3D imaging, multiparametric imaging, big data, cancer