



HAL
open science

Neuroimagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation Ultrasonore

Noémi Renaudin

► **To cite this version:**

Noémi Renaudin. Neuroimagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation Ultrasonore. Neurosciences. Université Paris sciences et lettres, 2022. Français. NNT : 2022UPSLS017 . tel-04368450

HAL Id: tel-04368450

<https://pastel.hal.science/tel-04368450>

Submitted on 1 Jan 2024

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 (ESPCI Paris)

**Neuroimagerie fonctionnelle par Microscopie de
Localisation Ultrasonore**

Soutenue par

Noémi RENAUDIN

Le 27/04/2022

École doctorale n°391

**Sciences Mécaniques,
Acoustique, Électronique
et Robotique de Paris
(SMAER)**

Spécialité

Acoustique

Composition du jury :

LÉVÊQUE-FORT Sandrine Université Paris-Saclay	<i>Présidente du jury</i>
BOSSY Emmanuel Université Grenoble Alpes	<i>Rapporteur</i>
BOUBENEC Yves École Normale Supérieure	<i>Rapporteur</i>
VIVIEN Denis Université de Caen	<i>Examineur</i>
LEROY Valentin Université Paris-Diderot	<i>Examineur</i>
PEZET Sophie ESPCI - Paris Sciences et Lettres	<i>Examinatrice</i>
TANTER Mickael ESPCI - Paris Sciences et Lettres	<i>Directeur de thèse</i>
DEMENÉ Charlie ESPCI - Paris Sciences et Lettres	<i>Co-encadrant de thèse</i>

Résumé

L'avènement de la neuroimagerie a permis d'améliorer considérablement notre connaissance du fonctionnement cérébral. Alors que la plupart des modalités permettent, en exploitant le couplage neurovasculaire, d'imager la totalité du cerveau avec des résolutions spatiales de l'ordre du millimètre, enregistrer des réponses fonctionnelles à des échelles microscopiques reste le privilège des techniques électrophysiologiques ou optiques. Mais ces dernières ne peuvent accéder qu'à la surface du cerveau ou au voisinage direct de capteurs implantés dans les tissus, sans pouvoir couvrir de larges champs de vue. Récemment, la Microscopie de Localisation Ultrasonore (ULM), par la localisation de millions de microbulles injectées dans la vascularisation sanguine, a permis de résoudre le compromis entre résolution spatiale et profondeur de pénétration en imagerie ultrasonore. Le flux cérébrovasculaire a ainsi pu être imagé à des résolutions inférieures à 10 microns sur cerveau entier. Cependant, la durée d'acquisition nécessaire pour détecter des signaux dans les plus petits vaisseaux, de l'ordre de la minute, a restreint son application à une imagerie structurelle statique de la microvascularisation et empêché sa translation vers une modalité d'imagerie fonctionnelle.

Dans cette thèse, nous montrons que l'ULM peut être modifiée pour devenir une modalité d'imagerie dynamique. Elle permet alors d'étudier des hyperhémies fonctionnelles sur l'intégralité du cerveau de rat avec une résolution spatio-temporelle de (6,5 μm , 1s). En s'appuyant sur la répétition de plusieurs motifs de stimulation, cette Microscopie de Localisation Ultrasonore fonctionnelle permet de détecter les variations de flux sanguins et de vitesse jusque dans les vaisseaux intra-parenchymaux des régions activées. Nous nous intéressons aussi dans cette thèse à un nouveau paramètre en ULM : l'intensité de rétrodiffusion ultrasonore. Nous montrons comment ce paramètre peut être utilisé pour localiser les vaisseaux dans la direction hors plan en ULM 2D, fournissant une localisation en 3D des vaisseaux sanguins et des quantifications plus précises des vitesses de flux. Nous proposons aussi d'étudier ce nouveau paramètre dans le cadre d'une comparaison des signaux Doppler de puissance et ULM, signaux utilisés par les modalités de neuroimagerie fonctionnelle par ultrasons.

Mots clés : Ultrasons biomédicaux, Neuroimagerie, Imagerie fonctionnelle, Microscopie de Localisation Ultrasonore

Abstract

The advent of neuroimaging has profoundly increased our fundamental understanding of brain function. While most brain-wide functional imaging modalities exploit neurovascular coupling to map brain activity in millimetric resolutions, the recording of functional responses at microscopic scale in mammals remains the privilege of electrophysiological or optical approaches. But these are restricted to either the cortical surface or the immediate vicinity of implanted sensors. Recently, Ultrasound Localization Microscopy (ULM) solved the trade-off between spatial resolution and penetration depth by localizing millions of intravenously injected microbubbles. It achieved transcranial whole-brain imaging of cerebrovascular flow, up to micron scale. However, within microscopic vessels, the long acquisition time required to detect single microbubble signatures has so far restricted ULM application mainly to microvasculature structural imaging.

In this thesis we show that ULM can be modified to study functional hyperaemia dynamically during brain activation, reaching a (6.5 μ m, 1s) spatiotemporal resolution in deep cortical and subcortical regions of the rat brain. Using repetitive activation patterns, functional ULM discriminates blood flow and velocity variations during tasks in intraparenchymal and larger vessels of activated regions. We also investigate a new parameter in ULM : the intensity backscattered by microbubbles. We show that this parameter could be used to localize vessels in the out of plane dimension in 2D ULM, thereby providing a 3D localization and a more precise quantification of flow speeds. This parameter could also help us gaining knowledge on the physiological interpretation of the signals used by ultrasound neuroimaging modalities : power Doppler and ULM.

Keywords : Biomedical ultrasounds, Neuroimaging, Functional imaging, Ultrasound Localization Microscopy

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Emmanuel Bossy et Yves Boubenec d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse, ainsi que Denis Vivien, Sandrine Lévêque-Fort, Valentin Leroy et Sophie Pezet d'avoir accepté d'être membre du jury.

J'ai passé trois très belles années au laboratoire Physique pour la Médecine, car j'ai été particulièrement bien entourée.

Un immense merci à Mickaël et Charlie qui m'ont épaulée pendant trois ans. Merci à vous deux de m'avoir fait confiance et de m'avoir conduit sans me diriger (ou alors avec des gants de velours) et en me laissant autonome. Merci pour ces réunions qui étaient aussi intéressantes sur le plan scientifique que sympathiques. Merci pour votre pertinence et d'avoir su révéler les fils rouges à partir des analyses que je proposais avec un certain désordre. Merci d'avoir opposé à mon culte du doute l'enthousiasme face aux résultats et de m'avoir montré l'importance de cette attitude pour avancer en science : commencer par voir le potentiel avant les limites. Merci pour la bonne humeur dans laquelle nous avons travaillé pendant ces trois ans.

Merci Mickaël pour ta passion pour la science toujours intacte malgré des centaines de soumissions de papiers. Merci de m'avoir demandé en début de thèse quel sujet ou thématique me plairait et de m'avoir confié un sujet qui je crois me correspondait bien. Merci pour ton recul et ta faculté à voir ce qui est important et ce qu'il faut creuser. Merci pour ta connaissance impressionnante de la bibliographie et ton expertise. Merci pour ton énorme aide sur le papier et le temps que tu y as consacré malgré ton emploi du temps surchargé. Merci de m'avoir soutenue dans les demandes administratives qui me tenaient à cœur mais qui vous ont demandé de vous battre. Merci Charlie pour tes explications techniques claires et pertinentes. Merci pour ta perspicacité et tes idées d'analyses judicieuses. Merci pour le temps consacré à déchiffrer mes présentations mal voire non légendées. Merci de m'avoir dit en début de thèse d'arrêter de m'excuser. Merci de m'avoir dit quand le travail était intéressant ; des encouragements dont j'ai parfois besoin pour être rassurée.

Beaucoup d'autres personnes au laboratoire m'ont accordé du temps et des coups de mains. Un très grand merci à Sophie pour tout le temps passé avec moi en salle manip, à me faire découvrir le monde de l'expérimentation animale, pour ton énergie à la paillasse, ton temps extensible, tes relectures assidues de papiers, tes explications de neurobiologie. Encore désolée pour la centrifugeuse ! Un grand merci à Nathalie pour toute l'aide en expérimentation animale,

et la qualité de ton travail qui a permis la qualité de mes images. Un grand merci à Hicham, toujours disponible pour un service : aide à la CAO, à la calibration, me réconcilier avec les imprimantes... Merci à Florian Segura que j'ai beaucoup embêté avec mes problèmes de communication avec le monde informatique. Merci beaucoup à Momo, Rami et Silvia d'être venus de nombreuses fois me sauver de mes galères de Neuroscan en pleines manip. Merci à Oscar pour les questions et discussions sur l'ULM. Merci à Thomas Deffieux avec qui je n'ai pas travaillé directement mais pour son aide précieuse : le temps pris pour écrire une version de l'algo d'ULM plus propre, les propositions d'analyse, les petites manip à répétition sur Tricératops. Merci à Alex pour ces superbes vidéos qui permettent de magnifier et de communiquer beaucoup plus facilement ce que j'ai fait pendant trois ans. Merci à tous les thésards parce que je suis sûre de vous avoir déjà posé à tous au moins une question, notamment : Hugues et les tubes, Thomas et les normes thermiques, David et la segmentation des IRM, Benoît et la connectivité, Clem et les stims visuelles, Heiva et latex, Jérôme et le neuronav et la prés de séminaire doctorant sur le signal Doppler...

Merci à celles qui nous offrent un environnement de travail exceptionnel : Patricia et sa caverne d'ali baba, Salima, Hinde et Nicole pour toutes les démarches que vous faites pour nous, avec le sourire. Je ne vous ai pas facilité la tâche avec mes trajets à travers l'Europe! Je sais que cela vous a pris du temps et de l'énergie, merci pour votre compréhension. Merci à Maï pour tout ce que tu organises pour nous et de permettre à ce laboratoire d'aussi bien fonctionner. Par là, tu participes à offrir aux doctorants un très bon cadre de travail.

Voilà pour la cadre scientifique et technique. Mais si cette thèse a été une expérience agréable, c'est aussi beaucoup grâce à la bonne ambiance dans laquelle elle a été effectuée.

Je voudrais tout particulièrement remercier les doctorants avec lesquelles j'ai partagé mon bureau. Vous avez fait de cet espace un lieu de joie, de soutien et de confiance. Merci d'avoir supporté mes monologues et mes craquages. Florian d'avoir été le grand frère, Olivier et ses 1000 idées à la minute, Cyp' d'avoir suivi Olivier dans ces 1000 idées à la minute et d'avoir proposé les 1000 suivantes, bref de votre duo de choc, Solène et sa spontanéité rafraîchissante (tu vas faire une super thèse j'en suis sûre!).

Merci à tous les thésards et à cette dynamique que l'on a réussi à garder malgré des mois passés à distance, vous êtes tous des gens géniaux! Merci en particulier à :

Olivier, pour ton sens du service et de l'accueil incomparable, et pour le soutien permanent qu'on s'est accordé mutuellement sur ces trois années. Allez, j'ai cru comprendre que tu tenais à une deuxième phrase : merci d'avoir été mon wingman sur le dancefloor!

Sof', pour être à la fois cette personne avec laquelle on peut avoir des fou-rires et faire du sport avec détermination mais aussi la personne avec laquelle exprimer ses doutes et inquiétudes sans tabou.

Oscar d'être un bel exemple à suivre, à la fois sérieux sur les sujets qui le nécessitent, intéressant dans ses discussions, tout en sachant s'amuser et profiter des moments importants.

Rami pour ton humour intarissable, ta gentillesse, ton écoute quand je venais discuter de science

ou de non science. Merci!

Hugues pour avoir été une boussole, autant dans les chemins montagneux et les ravines qu'au labo où je me suis souvent tourné vers toi car ta confiance est souvent bonne conseillère.

Thomas Tiannot pour tes sourires du coin des yeux et des lèvres (j'espère en avoir créé un en écrivant cette ligne), pour ta gentillesse et tes marques de soutien toujours réalisées avec discrétion.

Cyp' pour être ce boute-en-train infatigable et attachant, mais surtout pour l'attention que tu portes aussi bien aux gens qu'au règne végétal.

Clem' pour m'avoir chambrée avec bonne humeur et ainsi m'avoir aidée à affuter ma défense, mais plus sérieusement pour l'effort et l'intérêt que tu portes à construire une amitié post-thèse. Silvia de m'avoir fait découvrir la culture italienne, ses expressions, sa cuisine, son vin, sa montagne... et tes mille plans parisiens!

Flo pour la confiance que tu m'as progressivement accordée, nos discussions en vérité, et ton humour prometteur.

Mais aussi bien sûr : Laura et son énergie, au travail comme pour s'amuser, Flora la reine du dancefloor et l'as du volant, Solène sa clarinette et ses rêves d'aventure, Heiva sa bonne humeur et ses parties de tennis, David et sa vie à 1000 à l'heure, Momo sa gentillesse et sa tête sur les photos, JB sa gentillesse et nos questionnements similaires sur la suite à donner à tout ça, Victor d'avoir été compréhensif dans mes premières expériences de travail avec un stagiaire, Salima ses pâtisseries et son côté maman protectrice, Hinde son courage et son sens du rap, Maï ses conseils swing et nos discussions philosophiques, Alex et sa force tranquille, Blons ses connaissances étendues et pour le tsipouro, Lauriane et Marta et leurs fou-rires communicatifs, Benoît ta discrétion et tes services, Thomas Bancel avec lequel on s'est suivi à distance mais toujours présent pour une petite discussion pour prendre des nouvelles, Jérôme et sa générosité, Mathis et son intérêt à apprendre, Felipe et sa maîtrise du spike ball, Haritha pour les cours de danse indienne, Haley pour les conseils arduino et de manips, et tous les autres. Merci à l'équipe des coureurs et des pauses café. Merci à l'équipe des débarouleurs, de la Corse et de la Grèce, c'était un bonheur de partager ces expériences avec vous ; ce n'est que partie remise j'espère!

Cette thèse coïncide aussi avec les années covid. Merci à tous ceux qui m'ont accueillie chez eux pour travailler, une partie de cette thèse a été faite chez vous! En particulier mes parents au Terrier, Marine en Bourgogne, Paul et Maïana en Bretagne et Erlé en Bretagne.

Merci à mes parents de m'avoir permis ce parcours de la petite maternelle au doctorat et pour leur curiosité intellectuelle; curiosité qui j'espère m'a été transmise et m'a sans doute amenée jusque-là. Merci pour cette maison du bonheur que vous nous avez construite au Terrier et dont beaucoup d'amis ont pu profiter aussi. Merci à mes frères que j'ai toujours le plaisir d'y retrouver. À ma maman qui en plus de s'être retrouvée confinée pour Noël parce que je lui ai transmis le Covid, en a en plus profité pour relire mon manuscrit de thèse à la recherche des fautes d'orthographe.

Un grand merci à mes amis grâce à qui j'ai pu souffler et prendre l'air en vadrouillant à

droite à gauche les week ends et vacances. En particulier, Olivier et Quentin dans les Alpes, Fanny en Bretagne, les lyonnais, Marine en Bourgogne, Nicolas et Adélie en Italie, Maïana en Ecosse, les Débarouleurs dans les Alpes françaises et Silvia dans les Alpes italiennes, Elise sur le chemin de Stevenson, les copains de Turfurussie en Espagne, les cousins dans le Berry. Aux copains sur Paris pour les pauses après le boulot. En particulier les rendez-vous de grimpe avec Maïana, Augustin, Léa et Adam; les cousines pour nos dîners, verres et papotages; Fanny et Claire et Louis pour les soirées restau et théâtre; Martin pour la grimpe et les bons repas; et tous les autres amis de prépa, d'école et de stage pour les verres ou autres.

Merci à tous! Et bonne lecture!

Table des matières

Résumé	1
Abstract	3
Remerciements	5
Introduction	13
Références	17
Chapitre 1 - État de l'art : Modalités de Neuroimagerie fonctionnelle et Imagerie ultrasonore vasculaire	19
1.1 Modalités de neuroimagerie fonctionnelle	20
1.1.1 Aperçu de l'anatomie cérébro-vasculaire	20
1.1.2 Signaux physiologiques utilisés par la neuroimagerie fonctionnelle	24
1.1.3 Modalités de neuroimagerie fonctionnelle	25
1.2 Imagerie vasculaire par ultrasons	32
1.2.1 Imagerie ultrasonore	32
1.2.2 Imagerie conventionnelle et imagerie ultrarapide	32
1.2.3 Imagerie ultrasonore ultrarapide et développement de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS)	35
1.2.4 Imagerie ultrasonore ultrarapide et développement de la Microscopie par Localisation Ultrasonore (ULM)	39
1.3 Objectifs de la thèse	43
1.3.1 Imagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation ultrasonore (fULM) : preuve de concept	43
1.3.2 Étude et quantification de l'hyperhémie fonctionnelle par fULM	43
1.3.3 Imagerie de l'intensité de rétrodiffusion en Microscopie de Localisation Ultrasonore	43
Références	44
Chapitre 2 - Microscopie de Localisation Ultrasonore fonctionnelle : preuve de concept	51
2.4 Introduction	52

2.4.1	La Microscopie par Localisation Ultrasonore : une modalité d'imagerie statique	52
2.4.2	Des premiers pas vers une imagerie dynamique	52
2.4.3	Objectifs du chapitre	53
2.5	Développement de l'imagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation Ultrasonore : Obtenir des données ULM dynamiques	54
2.5.1	Obtenir des données ULM dynamiques pour étudier une activité cérébrale : protocole expérimental	54
2.5.2	Obtenir des données ULM dynamiques pour étudier une activité cérébrale : traitement des données	56
2.6	Développement de l'imagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation Ultrasonore : imager sur le cerveau entier une hyperhémie fonctionnelle à une précision micrométrique	61
2.6.1	Cartes d'activation par analyse par corrélation	61
2.6.2	Cartes d'activation par analyse par Décomposition en Valeurs Singulières	63
2.6.3	Comparaison des deux méthodes d'analyse	70
2.7	Caractérisation de la technique d'imagerie	71
2.7.1	Résolution temporelle	71
2.7.2	Résolution spatiale et correction du mouvement	73
2.7.3	Sensibilité	75
2.8	Limites et pistes d'améliorations	77
2.8.1	Correction de mouvement	77
2.8.2	Améliorer la sensibilité	77
2.8.3	Investiguer d'autres méthodes d'analyse	81
2.8.4	Extension à la 3D	81
2.9	Conclusion du chapitre	82
2.10	Annexe : protocole expérimental détaillé	83
	Références	85
Chapitre 3 - Étude et quantification de l'hyperhémie fonctionnelle par fULM		87
3.11	Introduction	88
3.11.1	Complexité de la régulation vasculaire cérébrale	88
3.11.2	L'imagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation Ultrasonore dans le paysages des autres modalités de neuroimagerie fonctionnelle	93
3.11.3	Objectifs du chapitre	94
3.12	Reproductibilité et validation	95
3.12.1	Réponse fULM moyenne dans la zone activée	95
3.12.2	Analyse statistique sur le comportement des artérioles et des veinules pendant une hyperhémie fonctionnelle	96
3.13	Outils d'analyse en fULM	100

3.13.1 Raffiner la réponse en tirant parti de la résolution spatiale : étude par compartiments vasculaires	100
3.13.2 Raffiner la réponse en tirant parti de la résolution spatiale : étude par arbres vasculaires	103
3.13.3 Étude de la variation en profondeur	108
3.13.4 Imagerie large champ et en profondeur	111
3.14 Limites actuelles et pistes d'amélioration	114
3.15 Perspectives	116
3.15.1 Vers l'imagerie fonctionnelle clinique transcrânienne?	116
3.15.2 Vers d'autres applications que la stimulation fonctionnelle? Cas de la dépression corticale envahissante	122
3.16 Conclusion du chapitre	125
Références	127
Chapitre 4 : Imagerie de rétrodiffusion en Microscopie de Localisation Ultrasonore	133
4.17 Introduction	134
4.18 Amplitude de rétrodiffusion et 3D	137
4.18.1 Variations de l'intensité ultrasonore dans l'espace 3D	137
4.18.2 Amplitude rétrodiffusée par les MBs et information 3D : principe et illustrations	138
4.18.3 Localisation 3D et mesure de vitesse absolue par imagerie de l'amplitude de rétrodiffusion	143
4.19 Signal ULM et signal Doppler de puissance	153
4.19.1 Signal Doppler de puissance	153
4.20 Conclusion du chapitre	161
Références	162
Conclusion	163
Acronymes	165
Publications et Congrès	167

Introduction

Imagerie médicale et neurosciences

La pratique de l'examen médical mobilise différents sens pour explorer le corps : on peut citer le toucher avec la palpation qui remonte à la haute antiquité voire à la préhistoire, ou l'audition avec la place essentielle du stéthoscope inventé par Laennec au début du XIX^e siècle (LAENNEC, 1819). Mais de tous les sens, la vue occupe une place particulièrement importante. Le médecin et le biologiste se sont en effet toujours largement reposés sur l'observation et la visualisation pour étudier les relations entre structures anatomiques et fonctions biologiques, et pour détecter et traiter les maladies.

Voir ce qui est externe, visible, mais aussi ce qui est interne, de prime abord invisible. Voir grand, mais aussi voir petit. En médecine, les objets visualisables couvrent une large gamme d'échelle, de la molécule ou cellule unique à des organes complets et des systèmes d'organes, en passant par une variété de tissus et d'interfaces. Ces objets possèdent des propriétés biophysiques, biomécaniques et physiologiques ainsi que des attributs fonctionnels différents.

Historiquement, ces visualisations ont d'abord été directes, via la chirurgie ou la biopsie. La dissection du corps humain, apparue au XII^e et XIII^e siècle a constitué pendant près de 600 ans le mode principal d'observation. Les illustrations issues de ces dissections, telles que celles de Vésale dans *De humani corporis fabrica* (VÉSALE (1514-1564), 1543), représentent la forme, la taille et la position relative des différents organes humains, et la nature potentielle des interactions anatomie/fonction. La chirurgie sur le vivant ou la dissection sur le mort ont ainsi longtemps constitué la seule façon de s'aventurer à l'intérieur du corps humain, jusqu'à la révolution de l'imagerie médicale.

Au XX^e siècle, s'est en effet développée une nouvelle forme d'exploration qui ne s'appuie plus sur le scalpel mais sur l'application de la physique et de la chimie moderne. La découverte par Röntgen des rayons X (RÖNTGEN, 1896) marque généralement le début de cette ère, cette découverte ayant été rapidement appliquée à des fins médicales comme pour la radiographie des poumons. Mais c'est dans les années 1970s que commence réellement l'essor de l'imagerie médicale moderne, avec les premiers CT (Computed Tomography) scans et le développement de l'imagerie par résonance magnétique et de l'échographie. L'imagerie médicale regroupe

ainsi les moyens d'acquisition et de restitution d'images du corps humain à partir de différents phénomènes physiques. Les principaux phénomènes physiques utilisés sont l'atténuation des rayons X, la résonance magnétique nucléaire, la réflexion d'ondes ultrasonores et l'atténuation, réflexion ou émission de photons.

La première application des ultrasons comme outil de diagnostic médical remonte à 1942, quand les frères Dussik, un neurologue et un physicien, ont essayé de détecter des tumeurs cérébrales en faisant se propager des ondes ultrasonores dans le cerveau humain (Karl Theo DUSSIK, 1942, K. T. DUSSIK, 1952). La première image échographique est publiée en 1952 par Wild et Reid (WILD et J. M. REID, 1952, WILD et John M. REID, 1954), mais ce n'est que dans les années 1970s que l'échographie prend véritablement son envol. Par son faible coût, sa portabilité et son caractère non invasif, elle est aujourd'hui l'examen d'imagerie médicale le plus dispensé dans le monde. Sa capacité à avoir une information sur les flux sanguins et son caractère temps réel en font une modalité reine en cardiologie et lui offre un nouveau rôle avec le développement récent des opérations minimalement invasives guidées par imagerie. Son innocuité explique sa prévalence pour les examens gynécologiques et obstétricaux. Récemment, un changement de paradigme concernant la méthode d'acquisition des images a permis de faire tomber plusieurs des limites traditionnelles de l'imagerie ultrasonore (TANTER et FINK, 2014). L'avènement de l'imagerie ultrasonore ultrarapide a ainsi permis d'atteindre des résolutions temporelles de l'ordre de la milliseconde, spatiales de l'ordre de 5 micromètres et d'observer des flux sanguins de l'ordre du mm/s. L'exploration de nouveaux champs d'investigation physiologiques, jusque-là inaccessibles, est aujourd'hui possible.

Parallèlement au développement de cette imagerie dite médicale, l'imagerie biologique a suivi une évolution s'accéléralant aussi à la fin du XX^e siècle : invention du microscope et premières observations de cellules au XVI^e siècle, révolution des protéines fluorescentes dans les années 1980s (CHALFIE et al., 1994), développement de la microscopie confocale et multi-photons (DENK, STRICKLER et WEBB, 1990) dans les années 1990s et apparition des microscopes de super-résolution à partir de 2006. Ces derniers permettent d'imager des objets d'une taille inférieure à 250 nanomètres in vivo.

Tous ces développements extraordinaires ont pu voir le jour grâce aux progrès concomitants de l'informatique.

La possibilité d'exploration in vivo et pendant le fonctionnement apparaît comme particulièrement séduisante pour le cerveau.

De nombreux philosophes, médecins et scientifiques s'intéressent depuis des siècles au fonctionnement du cerveau et à son lien avec la pensée. Dans un traité médical de l'Égypte antique (papyrus Edwin Smith, environ 1 500 avant J.-C.), on peut déjà trouver des descriptions de lésions affectant le système nerveux, une description des méninges, du liquide cébrospinal et des pulsations intracrâniennes. Hippocrate (IV-V^e siècle avant J.-C.) fait du cerveau le siège de l'intelligence et de la sensation.

La découverte de la bioélectricité au XVIII^e siècle, par le physicien et médecin Lujji Galvani,

marque véritablement le début des études sur le fonctionnement du système nerveux. Le lien entre l'activité cérébrale et le flux sanguin local trouve quant à lui son origine dans les travaux d'Angelo Mosso en Italie au XIX^e siècle; ce dernier remarque que les pulsations du cerveau augmentent localement chez les sujets étudiés au moment de leur implication dans une tâche cérébrale. Cette relation physiologique est ensuite explorée en 1890 par les travaux de Roy et Sherrington (ROY et SHERRINGTON, 1890). Dans la deuxième moitié du XIX^e siècle, Broca et Wernicke établissent le rôle d'aires spécifiques du système nerveux dans des fonctions dites supérieures, à partir de l'étude des lésions cérébrales (BROCA et al., 1861).

Plusieurs des révolutions récentes dans l'histoire de ce qui portera le nom de neurosciences sont le fruit de l'avènement de l'imagerie biologique et médicale. La découverte du microscope permet à Purkinje de visualiser pour la première fois les cellules du système nerveux en 1837, et à Golgi et Ramon y Cajal de décrire la structure et l'organisation des neurones (DROUIN, PILOQUET et PÉREON, 2015). À la fin du XX^e siècle, l'imagerie cérébrale bouleverse la discipline en participant notamment à l'essor des neurosciences cognitives. Elle permet d'examiner comment la fonction cérébrale peut supporter des activités mentales.

Une des difficultés des neurosciences actuelles est d'articuler les nombreuses questions qui entourent encore le fonctionnement cérébral. Certains neuroscientifiques étudient les briques de base du système nerveux pour reconstituer le fonctionnement de l'ensemble (approche ascendante). Les spécialistes du comportement étudient de leur côté les manifestations externes du système nerveux en action pour comprendre son organisation et son fonctionnement (approche descendante). Mais ils sont rapidement confrontés à un ensemble croissant de connaissances mobilisant des concepts complexes issus de la neurophysiologie, de la biologie cellulaire, de la génétique... L'imagerie cérébrale fonctionnelle se situe quelque part au carrefour de ces deux approches, car elle permet de déterminer où une fonction cognitive précise est réalisée dans le système nerveux en mesurant divers corrélats de l'activité neuronale lorsque le sujet réalise une tâche donnée.

Voir l'activité de l'ensemble du cerveau à des échelles microscopiques ?

Pour citer Sydney Brenner, prix Nobel de physiologie et médecine en 2002 : « Progress in science depends on new techniques, new discoveries and new ideas, probably in that order. » La perspective historique qui vient d'être dressée illustre ainsi l'intrication entre développement des techniques, ici celui de l'imagerie médicale et biologique, et évolution de la médecine et des neurosciences. Grâce aux technologies d'imagerie modernes, les capacités d'investigation se sont démultipliées. Mais des phénomènes aussi fondamentaux que la régulation fine de la circulation cérébrale en lien avec l'activité cérébrale ne sont pas encore parfaitement décrits; entre autres car les modalités existantes ne possèdent pas toutes les performances requises pour pouvoir visualiser des phénomènes spatio-temporels aussi complexes.

L'imagerie ultrasonore, en changeant de paradigme avec l'imagerie ultrarapide depuis les

années 2000s, se dote de la capacité d'aller explorer de nouveaux territoires. L'objectif principal de cette thèse est de développer une nouvelle modalité de neuroimagerie fonctionnelle par ultrasons, qui repose sur le principe de la Microscopie de Localisation Ultrasonore. Après avoir dressé un état de l'art des techniques de neuroimagerie fonctionnelle et des nouvelles modalités d'imagerie en échographie permises par l'imagerie ultrarapide, une preuve de concept de cette nouvelle modalité sera établie grâce à un protocole expérimental et une méthode d'analyse dédiée.

La suite de ce manuscrit sera consacrée à l'application de cette nouvelle modalité à l'étude de l'activité cérébrale fonctionnelle. On s'attachera à valider les quantifications obtenues et à proposer des méthodes d'analyses et des marqueurs spécifiques de cette nouvelle modalité de neuroimagerie fonctionnelle.


Comprendre en profondeur la physique du signal d'origine mesuré est crucial pour fournir l'interprétation physiologique la plus juste. On introduira pour finir un nouveau type d'imagerie en Microscopie de Localisation Ultrasonore, l'imagerie de l'intensité de rétrodiffusion. On verra comment ce nouveau paramètre peut nous permettre de préciser les quantifications hémodynamiques obtenues jusqu'alors et pourrait aider à une meilleure interprétation des signaux ultrasonores utilisés par la neuroimagerie fonctionnelle par ultrasons.

Redonnons la parole à Brenner pour le mot de la fin : « Innovation comes only from an assault on the unknown. I think one of the things about creativity is not to be afraid of saying the wrong thing. »

Références

- BROCA, Paul et al. (1861). « Perte de la parole, ramollissement chronique et destruction partielle du lobe antérieur gauche du cerveau ». In : *Bull Soc Anthropol* 2.1, p. 235-238.
- CHALFIE, M. et al. (11 fév. 1994). « Green fluorescent protein as a marker for gene expression ». In : *Science (New York, N.Y.)* 263.5148, p. 802-805. ISSN : 0036-8075. DOI : 10.1126/science.8303295.
- DENK, W., J. H. STRICKLER et W. W. WEBB (6 avr. 1990). « Two-photon laser scanning fluorescence microscopy ». In : *Science (New York, N.Y.)* 248.4951, p. 73-76. ISSN : 0036-8075. DOI : 10.1126/science.2321027.
- DROUIN, Emmanuel, Philippe PILOQUET et Yann PÉRÉON (1^{er} juin 2015). « The first illustrations of neurons by Camillo Golgi ». In : *The Lancet Neurology* 14.6. Publisher : Elsevier, p. 567. ISSN : 1474-4422, 1474-4465. DOI : 10.1016/S1474-4422(15)00051-4. URL : [https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422\(15\)00051-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422(15)00051-4/fulltext) (visité le 29/12/2021).
- DUSSIK, K. T. (1952). « [Additional results of ultrasonic investigation of brain diseases] ». In : *Acta Neurochirurgica* 2.3, p. 379-401. ISSN : 0001-6268. DOI : 10.1007/BF01405828.
- DUSSIK, Karl Theo (1^{er} déc. 1942). « Über die Möglichkeit, hochfrequente mechanische Schwingungen als diagnostisches Hilfsmittel zu verwerten ». In : *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 174.1, p. 153-168. ISSN : 0303-4194. DOI : 10.1007/BF02877929. URL : <https://doi.org/10.1007/BF02877929> (visité le 29/12/2021).
- LAENNEC, René-Théophile-Hyacinthe (1781-1826) Auteur du texte (1819). *De l'auscultation médiate ou Traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur, fondé principalement sur ce nouveau moyen d'exploration. Tome 2 / par R. T. H. Laënnec,...* URL : <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k98759b> (visité le 29/12/2021).
- RÖNTGEN, M. (1896). « Sur une nouvelle espèce de rayons ». In : *J. Phys. Theor. Appl.* 5.1, p. 101-108. DOI : 10.1051/jphystap:018960050010100. URL : <https://hal.archives-ouvertes.fr/jpa-00239851> (visité le 29/12/2021).
- ROY, C. S. et C. S. SHERRINGTON (jan. 1890). « On the Regulation of the Blood-supply of the Brain ». In : *The Journal of Physiology* 11.1, p. 85-158.17. ISSN : 0022-3751. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1514242/> (visité le 29/12/2021).
- TANTER, Mickael et Mathias FINK (jan. 2014). « Ultrafast imaging in biomedical ultrasound ». In : *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 61.1. Conference Name : IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, p. 102-119. ISSN : 1525-8955. DOI : 10.1109/TUFFC.2014.2882.
- VÉSALE (1514-1564), André (1543). *De humani corporis fabrica*. URL : https://data.bnf.fr/fr/17769669/andre_vesale_de_humani_corporis_fabrica/ (visité le 29/12/2021).
- WILD, J. J. et J. M. REID (29 fév. 1952). « Application of echo-ranging techniques to the determination of structure of biological tissues ». In : *Science (New York, N.Y.)* 115.2983, p. 226-230. ISSN : 0036-8075. DOI : 10.1126/science.115.2983.226.

WILD, J. J. et John M. REID (1^{er} mai 1954). « Echographic Visualization of Lesions of the Living Intact Human Breast ». In : *Cancer Research* 14.4. Publisher : American Association for Cancer Research Section : Articles, p. 277-283. ISSN : 0008-5472, 1538-7445. URL : <https://cancerres.aacrjournals.org/content/14/4/277> (visité le 29/12/2021).



Chapitre 1 - État de l'art : Modalités de Neuroimagerie fonctionnelle et Imagerie ultrasonore vasculaire

1.1 Modalités de neuroimagerie fonctionnelle

1.1.1 Aperçu de l'anatomie cérébro-vasculaire

Le cerveau est un organe très complexe qui forme avec la moelle épinière et le nerf optique le système nerveux central. Il collecte et traite toutes les informations du système nerveux périphérique et permet le contrôle des organes et des émotions.

Deux grands types de cellules composent le tissu cérébral : les neurones, qui permettent le transport d'information par influx nerveux depuis et vers des régions plus ou moins distantes du cerveau ou de l'organisme, et les cellules gliales qui assurent des fonctions très variées, principalement liées au support des neurones et de leurs fonctions. Les neurones (figure 1.1) sont constitués d'un corps cellulaire, de dendrites (structures longues et fines qui branchent depuis le corps cellulaire) et d'un axone (longue fibre permettant de se connecter à d'autres neurones au niveau des dendrites par le biais d'une synapse). Parmi la grande diversité des cellules gliales, on peut citer les astrocytes qui sont les plus fréquentes et permettent de lier les vaisseaux sanguins aux neurones et de maintenir l'environnement chimique des synapses.

On distingue dans le tissu neuronal la substance grise, composée d'une grande densité de corps cellulaires neuronaux et d'une faible densité d'axones, elle correspond à des régions de contrôle actif et de perception; et la substance blanche avec des proportions inversées, spécialisée dans la communication entre différentes régions de substance grise.

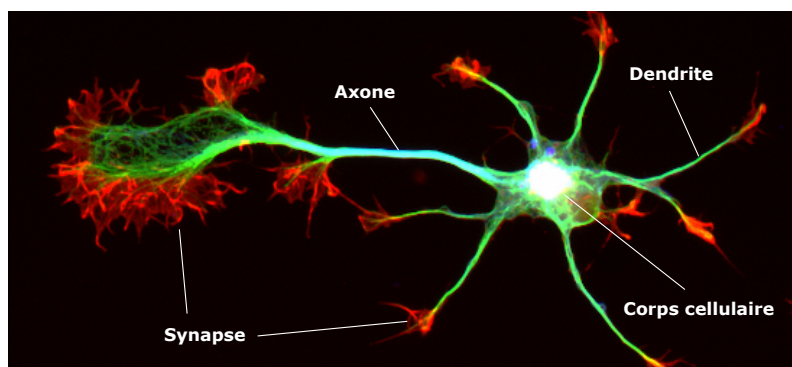


FIGURE 1.1 – Image de microscopie de fluorescence d'un neurone (immunomarquage : prolongement axonal et dendritique en vert, synapses en rouge), ©INSERM / SAOUDI YASMINA

Anatomiquement, l'encéphale désigne le système nerveux central contenu dans la boîte crânienne (c'est souvent ce qui est appelé le cerveau par le profane, et ce sera aussi le cas dans le reste du document). Il est constitué :

- du cerveau (télencéphale et diencephale), la partie la plus étendue.
Le télencéphale est composé de deux hémisphères quasiment symétriques et contient le cortex cérébral et plusieurs structures sous-corticales dont l'hippocampe, les gan-

glions de la base et le bulbe olfactif. On distingue quatre lobes (lobe frontal, pariétal, temporal et occipital) ; la distinction repose surtout sur l'anatomie mais des caractéristiques fonctionnelles différentes peuvent aussi être attribuées à chacun. Le cortex cérébral correspond à la couche la plus externe du télencéphale, composée de substance grise. Il peut être séparé en plusieurs aires fonctionnelles dont les principales sont le cortex moteur, le cortex somatosensoriel, le cortex associatif, le cortex visuel et le cortex auditif. Il est composé de six couches, qui se différencient par la densité et le type de neurones, et dont les épaisseurs varient en fonction de la zone fonctionnelle. Il correspond aux fonctions cérébrales de plus haut niveau.

Le diencephale est quant à lui principalement composé du thalamus, qui intervient notamment dans des fonctions de relais entre les hémisphères cérébraux et le tronc cérébral ; et de l'hypothalamus, qui régule de nombreuses fonctions biologiques essentielles comme le sommeil, la faim, la soif, la libération d'hormones.

- du cervelet, situé sous le cerveau. Il est principalement responsable de la coordination des muscles, du maintien de la posture et de l'équilibre.
- du tronc cérébral, qui joue le rôle de relais entre le cerveau et le cervelet d'une part et la moelle épinière de l'autre. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions automatiques comme la respiration, le rythme cardiaque, le maintien de la température corporelle, les cycles de sommeil, la digestion, la déglutition...

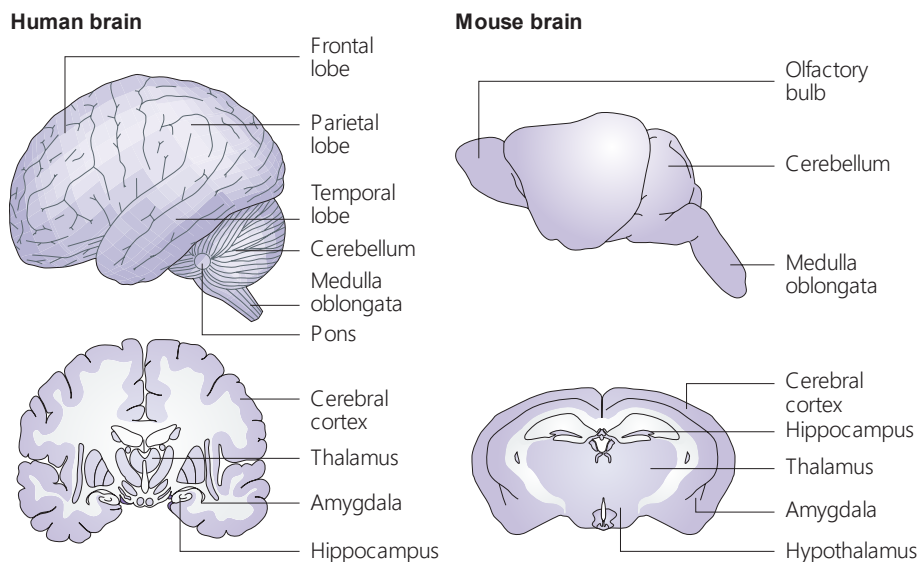


FIGURE 1.2 – Cerveau humain et cerveau de souris. D'une masse environ 2 700 fois plus grande que le cerveau de souris, le cerveau humain se distingue surtout par les circonvolutions de son cortex cérébral, qui augmentent sa surface. D'après CRYAN et HOLMES, 2005.

Si l'on considère les espèces en terme d'évolution, beaucoup de structures cérébrales sont conservées mais leur taille et leur forme peuvent grandement varier. On s'intéressera principalement au cerveau humain et à celui du rongeur, présentés en figure 1.2. S'il paraissent

très différents au premier regard, la plupart des caractéristiques sont conservées chez les deux espèces. La différence la plus marquante est la présence de circonvolutions (gyri et sulci) au niveau du cortex humain.

Le cerveau est approvisionné en sang par quatre larges artères (figure 1.3A) : deux artères carotides internes et deux artères vertébrales, qui se rejoignent au niveau du polygone de Willis à la base du cerveau. De là, les artères cérébrales antérieures (ACA), les artères cérébrales moyennes (MCA) et les artères cérébrales postérieures (PCA) irriguent des territoires différents du cerveau. L'anastomose circulaire formée par le polygone de Willis assure la robustesse de l'irrigation cérébrale dans le cas d'un blocage ou d'un dommage de l'une des artères approvisionnant le cerveau.

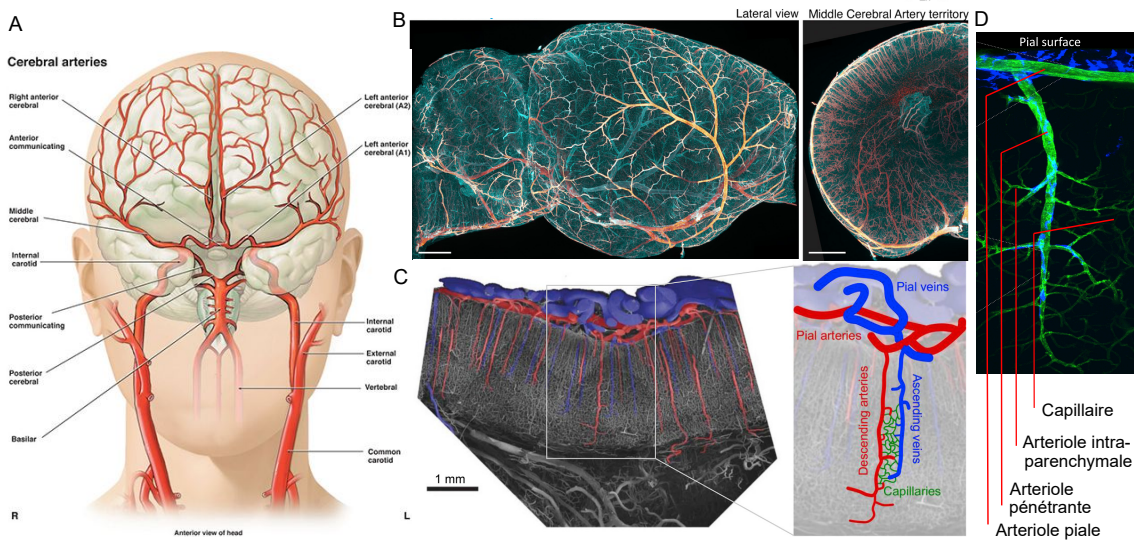


FIGURE 1.3 – Arbre cérébrovasculaire. (A) Schéma représentant les principales artères irriguant le cerveau humain. (www.anatomynote.com) (B) Réseau artériel pial (gauche) et sur une coupe coronale (droite) d'un cerveau de souris, vu par microscopie à nappe de lumière, adapté de KIRST et al., 2020. (C) Structure de la vascularisation corticale. Gauche : Microscopie par balayage électronique d'un cortex visuel de primate non humain. Droite : Représentation schématique de la vascularisation corticale. Adapté de HIRSCH et al., 2012 et SCHMID et al., 2019. (D) Image de microscopie d'une artériole piale, d'après IADECOLA, 2017

Les artères cérébrales (ACA, MCA, PCA) se ramifient pour former le réseau pial qui couvre toute la surface du cortex (figure 1.3B). Les artères plongent ensuite perpendiculairement à la surface dans le cortex (artères pénétrantes) (figure 1.3C). Les artères pénétrantes peuvent varier significativement en termes de profondeur de pénétration et de forme; la plupart présentent cependant de nombreuses bifurcations à différentes profondeurs permettant de nourrir le lit capillaire. Ces artères pénétrantes se ramifient en artérioles, artérioles pré-capillaires ou capillaires, la description n'étant pas toujours constante dans la littérature (Fig.1.3D). On considère généralement que les vaisseaux entourés de cellules musculaires lisses sont des artérioles, que

les vaisseaux qui n'ont pas à proximité de cellules exprimant la α -Smooth Muscle Actin (qui permet la contractilité) sont des capillaires; les artérioles pré-capillaires ou artérioles intra-parenchymales désignent tout ce qui est intermédiaire. Pour classifier un segment vasculaire, on utilise souvent son ordre de bifurcation ou branchement à partir de l'artériole pénétrante. Les capillaires forment un réseau très complexe et entremêlé représentant environ 41% du volume total vasculaire; le flux sanguin y est très hétérogène.

Après avoir fourni l'oxygène et les nutriments aux tissus au niveau des capillaires, le sang est drainé par des veinules ascendantes, qui remontent perpendiculairement à la surface du cortex. Là, le réseau pial veineux situé au-dessus du réseau pial artériel permet de collecter tout le sang veineux dans des sinus veineux, d'où le sang désoxygéné quitte le cerveau vers le cœur.

Les flux sanguins couvrent une large gamme de vitesse sur l'arbre vasculaire. Chez le rat, les vitesses peuvent atteindre 50 cm/s dans les grosses artères (carotides et vertébrales), elles sont de 10 à 25 mm/s dans les artérioles corticales et de l'ordre de 0.5 mm/s dans les capillaires de moins de 10 μ m (avec une forte dispersion). Comme montré dans PIECHNIK, CHIARELLI et JEZZARD, 2008 en figure 1.4, le ratio entre vitesse des flux et diamètre du vaisseau est conservé chez les différentes espèces.

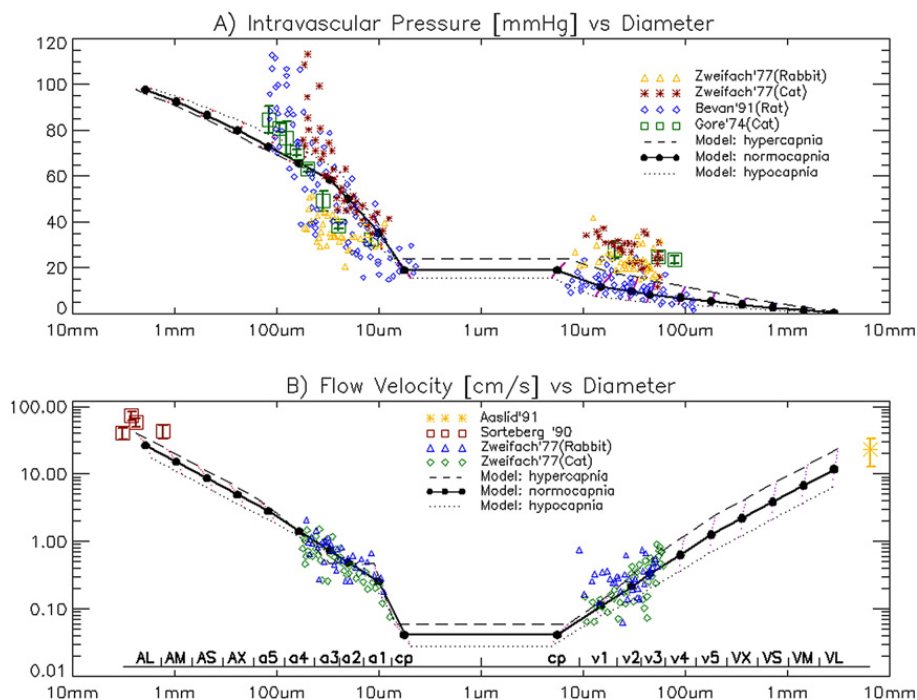


FIGURE 1.4 – Conservation du rapport vitesse / diamètre vasculaire. Distribution de la pression (A) et de la vitesse moyenne (B) dans l'arbre vasculaire. Les points indiquent des données expérimentales issues de la littérature ou des mesures directes dans des modèles animaux ou des études en Doppler transcranien ultrasonore humain. D'après PIECHNIK, CHIARELLI et JEZZARD, 2008

1.1.2 Signaux physiologiques utilisés par la neuroimagerie fonctionnelle

L'imagerie neuro-fonctionnelle consiste à étudier le cerveau en action : elle mesure les variations d'un signal produit par l'activité cérébrale. Plusieurs types de signaux peuvent faire l'objet d'un tel suivi.

Activité électrique : neurone et potentiel d'action

La transmission d'information dans le cerveau repose sur un signal électrique transmis dans les neurones sous forme d'un potentiel d'action qui se propage le long des axones. Ce potentiel d'action est créé par des différences de concentrations ioniques de part et d'autres de la membrane du neurone. S'intéresser au signal électrique permet ainsi une mesure directe de l'activité cérébrale.

Activité synaptique

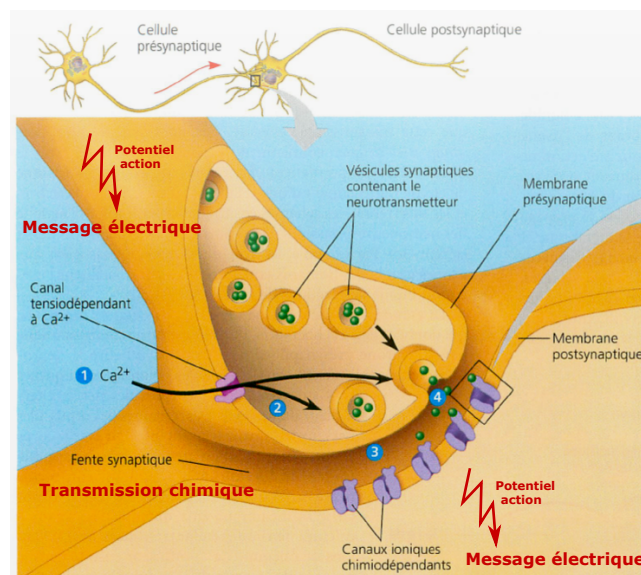


FIGURE 1.5 – Transmission de l'information au niveau d'une synapse chimique (<https://edu.ge.ch/decandolle/sites/localhost.decandolle/files/dia-sn6-synapses.pdf>).

Entre deux neurones, la transmission se fait au niveau des synapses. La majorité de celles-ci (99% des synapses du système nerveux central) sont des synapses chimiques (figure 1.5). L'arrivée du potentiel d'action au niveau de la membrane pré-synaptique entraîne un changement de polarité de la membrane (1), qui provoque l'ouverture de canaux calcium (2). L'augmentation du calcium dans la membrane pré-synaptique (3) déclenche la libération de neurotransmetteurs dans l'espace synaptique (4); ces neurotransmetteurs arrivent par diffusion au niveau de la membrane post-synaptique. Là ils se fixent à des protéines réceptrices entraînant l'ouverture ou la fermeture de canaux ioniques. S'ensuit une modification de la conductance du neurone post-synaptique et éventuellement la création d'un potentiel d'action, et sa propagation le long

de la membrane. Ainsi, la concentration en calcium au niveau des membranes synaptiques est un indicateur de la transmission d'un signal nerveux.

Activité vasculaire : couplage neurovasculaire

Bien que le cerveau ne représente que 2% de la masse corporelle, sa consommation en oxygène et en nutriments atteint 20% de la consommation totale. Il n'existe pas de réservoir dans le cerveau permettant d'y stocker de l'énergie, le cerveau est donc approvisionné pour ses besoins énergétiques (principalement oxygène et glucose) par la circulation sanguine. La dynamique et la diversité des demandes en énergies sont telles que la distribution sanguine doit pouvoir s'adapter en continu. Suite à l'activation d'une zone du cerveau, un couplage entre l'activité neuronale et le flux sanguin permet une augmentation du débit sanguin (hyperhémie fonctionnelle) dans la zone activée.

S'intéresser au signal sanguin peut donc être une méthode indirecte pour suivre l'activité neuronale. Il est à noter que la réponse hémodynamique est plus lente que l'activation neuronale, limitant potentiellement la résolution temporelle de ces technologies. La connaissance précise des réponses hémodynamiques ou vasculaires d'intérêt est nécessaire pour pouvoir remonter à la réponse électrique sous-jacente. On reviendra plus en détail sur ce couplage neurovasculaire dans le chapitre 3 (section 3.11.1).

Activité métabolique

Lors de l'activation d'une zone du cerveau, l'activité des cellules y augmente et donc sa consommation énergétique, en particulier la consommation de glucose par les neurones. Suivre l'activité de ces différents métabolismes est une façon indirecte d'étudier une activation neuronale.

1.1.3 Modalités de neuroimagerie fonctionnelle

Les principales modalités de neuroimagerie fonctionnelle sont décrites ici succinctement. On décrira tout d'abord des modalités qui mesurent directement l'activité électrique, avant d'aborder les modalités qui permettent d'imager le cerveau entier et sont utilisées en imagerie clinique et préclinique, pour finir par les modalités optiques, utilisées en imagerie préclinique principalement, qui permettent des études spatio-temporelles fines de la réponse fonctionnelle. Cette progression se fait en allant vers des résolutions spatiales croissantes.

1.1.3.1 Modalités mesurant directement l'activité électrique

ÉlectroEncéphaloGraphie (EEG)

En électroencéphalographie, le champ électrique induit par un ensemble de potentiels d'action (correspondant à la décharge de quelques milliers voire millions de neurones) est mesuré grâce à des électrodes placées sur le cuir chevelu. La résolution temporelle est très

bonne, de l'ordre de la milliseconde (ms), mais localiser spatialement les sources des activités électriques est très complexe, notamment pour les régions les plus profondes. Elle est non invasive (sauf utilisation d'électrodes implantées) et facile à mettre en place et est en pratique très utilisée dans le diagnostic de l'épilepsie (SMITH, 2005).

MagnétoEncéphaloGraphie (MEG)

La magnétoencéphalographie exploite quant à elle les variations des champs magnétiques résultants des champs électriques (COHEN, 1968), mesurées par des magnétomètres. Elle peut avoir une meilleure résolution spatiale que l'EEG, les champs magnétiques subissant moins de distorsions par le crâne et la peau, mais est une solution moins portable et plus chère (elle nécessite de travailler dans un environnement blindé). La résolution temporelle est similaire (ms).

L'EEG et la MEG apparaissent aussi comme complémentaires, présentant des sensibilités différentes aux différentes sources intra cérébrales.

Potentiel Champ Local (LFP)

Utilisé en imagerie préclinique, le potentiel champ local (MONESSON-OLSON, TROCONIS et TRAPANI, 2014) mesure, grâce à l'implantation de micro électrodes, le potentiel électrique dans le voisinage direct des neurones (et non à la surface du crâne comme en EEG), ce qui en fait une technique invasive. Contrairement à l'EEG et la MEG, il permet la mesure de signaux de populations de neurones très localisées et en profondeur. Sa résolution temporelle de l'ordre de la ms.

1.1.3.2 Modalités indirectes sur cerveau entier

Imagerie fonctionnelle par Résonance Magnétique (fMRI)

La modalité de référence pour la neuroimagerie fonctionnelle est l'Imagerie fonctionnelle par Résonance Magnétique. L'imagerie par résonance magnétique s'appuie sur les propriétés magnétiques des tissus, et permet en particulier de détecter un afflux sanguin par un changement du taux d'oxygénation de l'hémoglobine. Dans la zone activée, l'apport en sang oxygéné (oxyhémoglobine, diamagnétique) et le relargage de sang désoxygéné (désoxyhémoglobine, paramagnétique) modifie les propriétés magnétiques locales. Le suivi du signal BOLD (Blood Oxygenation Level Dependant) permet ainsi de suivre l'activité neuronale de façon indirecte (LOGOTHETIS et al., 2001). L'IRM fonctionnelle consiste ainsi à utiliser dans un IRM des séquences spécifiques qui favorisent le contraste BOLD.

La résolution spatiale est de l'ordre de 500 μm , la résolution temporelle de l'ordre du Hertz. La sensibilité peut être assez faible obligeant souvent à moyenniser les signaux sur plusieurs essais pour gagner en rapport signal sur bruit (SNR). C'est une technologie coûteuse et encombrante et qui nécessite que le sujet imagé soit immobile, mais qui permet d'imager le cerveau entier,

que ce soit en clinique ou en préclinique, et de façon non invasive. L'IRM fonctionnelle est assez peu utilisée en routine clinique, par exemple pour le diagnostic ou le traitement à l'hôpital, mais elle est la référence pour des études en neurosciences et notamment en sciences cognitives.

Tomographie par Émission de Positons (PET)

La tomographie par émissions de positons est une technique de médecine nucléaire qui utilise l'injection d'un composé radioactif associé à un métabolisme particulier (PHELPS, 2000, DREVETS et al., 1997). En pratique, on utilise un atome radioactif auquel on lie une molécule impliquée dans un métabolisme précis et on mesure l'accumulation de ce traceur. On a alors accès à sa localisation et à son intensité (concentration en traceur). Pour le suivi de l'activité cérébrale, on utilise souvent la 18F-FDG (fluorodésoxyglucose marqué au fluor 18), un sucre semblable au glucose rendu radioactif, qui permet de suivre la consommation en glucose par les neurones. En recherche, on peut aussi utiliser l'oxygène 15 dont l'accumulation est liée à la réponse hémodynamique. L'avantage de cette technique vient de la possibilité d'utiliser des traceurs spécifiques de certains neurorécepteurs et donc de mécanismes spécifiques.

D'une résolution spatiale limitée (de plusieurs millimètres), elle est souvent associée à une autre modalité anatomique comme le CT ou l'IRM. Elle permet d'imager l'ensemble du cerveau, et sa résolution temporelle est de la dizaine de secondes voir la minute. Elle peut être utilisée en routine clinique pour le diagnostic des maladies cérébrales dégénératives.

1.1.3.3 Modalités optiques

Enfin, les modalités optiques permettent d'atteindre une résolution spatio-temporelle exceptionnelle. Cependant, la faible profondeur de pénétration des techniques optiques et leur caractère souvent invasif en font des modalités principalement réservées à un usage préclinique (sauf le fNIRS, mais au prix d'une moins bonne résolution spatiale) et à une étude locale ou en surface du cerveau. On décrit ici certaines d'entre elles.

Imagerie optique fonctionnelle du signal intrinsèque

La réflectance des tissus à des longueurs d'ondes de 600 à 650 nanomètres (nm) est enregistrée grâce à une caméra CCD (Charge Coupled Device, assure la conversion d'un signal lumineux en un signal électrique), et permet de détecter ses modifications pendant une activité cérébrale du fait de la réponse hémodynamique (HILLMAN, 2007). La résolution spatiale est de quelques microns, mais la faible profondeur d'imagerie restreint cette technique aux mesures en surface du cerveau avec craniotomie et par là même à l'imagerie préclinique.

Imagerie optique par colorant sensible au potentiel (VSDOI)

Utilisée en imagerie préclinique, cette modalité optique utilise des colorants fluorescents sensibles à la tension pour révéler l'activité d'une population de neurones corticaux (FEREZOU, BOLEA et PETERSEN, 2006). La résolution spatiale peut aller jusqu'au micron et la résolution

temporelle est inférieure à la milliseconde. C'est une technique invasive qui nécessite l'ouverture du crâne pour l'injection des colorants. La profondeur d'imagerie est limitée à quelques micromètres.

Imagerie calcique et microscopie biphotonique

L'imagerie calcique s'appuie sur le suivi de l'augmentation de calcium pendant la transmission synaptique. Elle repose sur l'utilisation d'indicateurs calciques, comme des colorants, et l'utilisation d'un système d'imagerie pour le suivre (caméras CCD, microscopes confocaux, et aujourd'hui la microscopie biphotonique principalement). L'imagerie calcique par microscopie biphotonique a révolutionné le domaine de l'imagerie calcique et est aujourd'hui une des technologies de référence pour la recherche en neurosciences : elle permet d'observer en temps réel l'activation neuronale au niveau du neurone unique avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde. La microscopie biphotonique, initialement démontrée en 1990 (DENK, STRICKLER et WEBB, 1990), combine les principes de microscopie à fluorescence et de l'absorption à deux photons. Elle excite des colorants fluorescents à une fréquence lumineuse (généralement dans le proche infrarouge, pour laquelle la diffusion et l'absorption sont plus faibles) plus petite que celle émise. Les colorants à base de dextran permettent de révéler les vaisseaux sanguins. Sa profondeur de pénétration permet d'atteindre la centaine de micromètres (600 μm) et elle n'est pas utilisée en clinique.

Spectroscopie fonctionnelle dans le proche infrarouge (fNIRS)

Il s'agit d'une technique d'imagerie optique qui détecte les changements d'absorption dans le proche infrarouge grâce à une paire émetteur/capteur optique (FERRARI et QUARESIMA, 2012). La lumière traverse le crâne et diffuse dans le cortex. Malgré une atténuation significative, les variations de l'absorption dues à des modifications locales du ratio oxyhémoglobine/désoxyhémoglobine résultent dans des modulations de l'intensité de la lumière émergente (les deux types d'hémoglobine ne présentant pas les mêmes coefficients d'absorption). L'utilisation d'une lumière qui entre en régime de diffusion explique que l'on obtient des champs de vue plus grands que pour les autres modalités optiques, au détriment d'une moins bonne résolution spatiale.

Cette technique est notamment utilisée en clinique dans le cas de l'imagerie fonctionnelle chez le nouveau-né, le crâne n'étant encore pas trop épais et les autres modalités d'imagerie fonctionnelle n'étant souvent pas adaptées (l'IRM nécessite l'immobilité du sujet). Elle dispose d'une bonne résolution temporelle (de l'ordre de 10 ms), mais est limitée à l'imagerie du cortex et à une résolution spatiale de l'ordre du centimètre.

Imagerie fonctionnelle photoacoustique (fPA)

L'imagerie photoacoustique consiste à détecter des ultrasons générés par l'absorption d'énergie lumineuse, généralement produite par des impulsions laser (WANG et al., 2003, ZHANG et al., 2006). Dans le cerveau, le principal absorbant est l'hémoglobine, ce qui permet de réaliser

de l'imagerie vasculaire et de détecter des hyperhémies. On distingue principalement l'imagerie photoacoustique à résolution acoustique, qui permet une plus grande profondeur de pénétration (centimètre) mais une résolution guidée par la longueur d'onde acoustique (100 μm), et la photoacoustique à résolution optique (quelques μm) mais avec une profondeur de pénétration plus faible. Cette modalité, utilisée exclusivement en imagerie préclinique, est non invasive (contrairement aux autres méthodes optiques sauf le fNIRS). Les dispositifs de détection acoustique combinée à une source laser peuvent être assez complexes et coûteux et ne sont pas souvent utilisés sur l'animal éveillé.



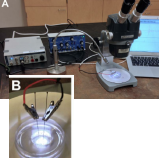


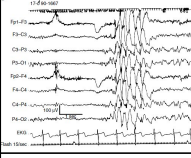
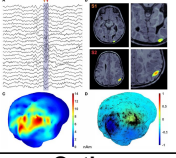
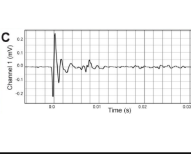
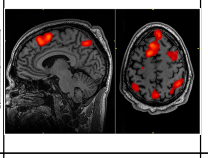
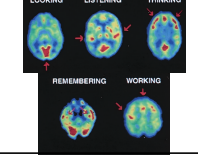
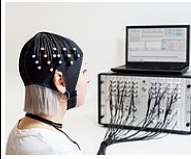
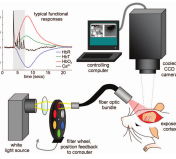
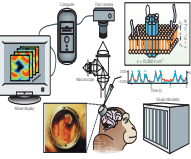
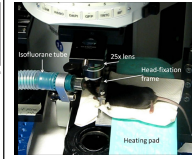
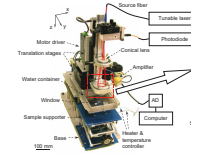
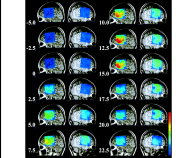
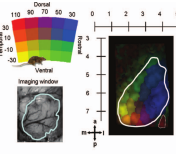
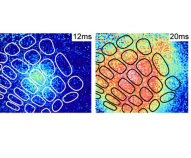
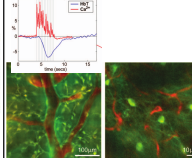
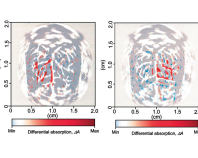
Modalité	EEG	MEG	LFP	fMRI	PET
Paramètre mesuré	Activité électrique	Activité électrique	Activité électrique	Activité vasculaire Signal BOLD (magnétisme)	Activité vasculaire Consommation glucose / oxygène
Pénétration Rés. spt. Rés. tps	Surface cm ms	Surface cm ms	Local X ms	Cerveau entier mm s	Cerveau entier qq mm - cm 10 s - min
Utilisation	Clinique	Clinique	Préclinique	Pré & Clinique	Pré & Clinique
Invasif	Non invasif	Non invasif	Invasif	Non invasif	Non invasif, radioactif
Encombrement, coût	Portable Faible coût	Non portable	Portable Faible coût	Non Portable Coût élevé	Non Portable Coût élevé
Illustration dispositif					
Illustration signal					
Modalité	fNIRS	Optique intrinsèque	VSDOI	Biphotons	fPA
Paramètre mesuré	Activité vasculaire absorption hémoglobine	Activité vasculaire Réflectance	Activité électrique Polarisation mem- brane plasmique	Activité synaptique et vasculaire Ca ²⁺ & RBC	Activité vasculaire [hémoglobine], saturation Oxygène
Pénétration Rés. spt. Rés. tps	Surface cm 10 ms	Surface qq µm X	Surface µm ms	Surface 10 µm ms	Surface 100µm 100 µs
Utilisation	Clinique	Préclinique	Préclinique	Préclinique	Préclinique
Invasif	Non invasif	Invasif	Invasif	Invasif	Non invasif
Encombrement, coût	Portable	Portable	Portable	Portable	Portable mais complexe (laser)
Illustration dispositif					
Illustration signal					

FIGURE 1.6 – Résumé des caractéristiques des principales modalités d’imagerie fonctionnelle. Illustrations dispositif : MEG : © MEG / CEA-Leti Clinatec; LFP : MONESSON-OLSON, TROCONIS et TRAPANI, 2014; fMRI& fNIRS : licence Wikimedia Commons; PET : licence Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0; Optique intrinsèque : HILLMAN, 2007; VSDOI : GRINVALD et HILDESHEIM, 2004; Biphotons, CAO et al., 2013; fPA, ZHANG et al., 2006. Illustration signal : EEG : crise épileptique chez une enfant, BAYRAK, KARLIK et FATMA, 2010; MEG : Crise épileptique, traces MEG pendant un pic épileptique (A), IRM avec activité MEG en couleur (B), activité MEG moyenne pendant un pic (C), Potentiel scalaire U HHD cartographié sur la surface corticale (D), KHAN et al., 2014; LFP : Trace représentative d’un potentiel champ chez une larve de zebrafish en réponses à un stimulus tactile, MONESSON-OLSON, TROCONIS et TRAPANI, 2014;

fMRI : Activations dans le cortex frontal bilatéral et supérieur et dans le cortex pariétal bilatéral supérieur, GRANER et al., 2013; PET : Métabolisme du glucose en réponse à différentes tâches (croissant du bleu au jaune au rouge), PHELPS, 2000; fNIRS : Cartes d'hémoglobine totale (couleur) superposées sur des cartes IRM (gris), activation dans l'aire de Broca (aire frontale inférieure gauche) en réponse à une tâche de génération de mots pendant 17s , FERRARI et QUARESIMA, 2012; Optique intrinsèque : Rétinotopie construite à partir des réponses en hémoglobine totale chez le rat, GIAS et al., 2005; VSDOI : réponse à une stimulation des vibrisses chez la souris anesthésiée, FERZOU, BOLEA et PETERSEN, 2006; Biphotons : Réponse hémodynamique et calcique à l'échelle du neurone unique (haut), Imagerie à 2 canaux, signal neuronal en vert et vasculaire en rouge (bas), HILLMAN, 2007; fPA : réponse hémodynamique en réponse à une stimulation des vibrisses de rat à gauche et à droite, WANG et al., 2003.

1.2 Imagerie vasculaire par ultrasons

1.2.1 Imagerie ultrasonore

Le principe de l'échographie est d'envoyer des ondes ultrasonores, dont la fréquence est comprise entre la centaine de kHz et quelques MHz, dans le corps humain avec une sonde dédiée. Ces ondes interagissent avec les tissus et une partie est rétrodiffusée ou réfléchi vers la sonde. Le délai entre la réception de l'écho et l'émission permet de localiser la structure à l'origine de l'écho en faisant l'hypothèse d'une vitesse de propagation constante dans les tissus (fixée autour de 1 540 m/s). L'intensité des échos reçus permet de caractériser l'échogénicité de l'organe, i.e. sa capacité à rétrodiffuser les ondes ultrasonores (qui dépend de la masse volumique du tissu, de son module de compressibilité et de sa microstructure). Elle est représentée en niveau de gris sur les images en Mode Brillance (BMode). Ces images échographiques sont caractérisées par un aspect granuleux, le speckle. Il est dû à des interférences constructives et destructives créées par des petits diffuseurs distribués de façon aléatoire dans l'espace et ne représente pas de façon directe la microstructure du tissu.

L'utilisation d'ondes ultrasonores est notamment justifiée par leur capacité à imager en profondeur avec une bonne résolution spatiale. La longueur d'onde à 15MHz est de l'ordre de la centaine de microns, ce qui permet d'imager de petites structures. De plus, les ultrasons sont faiblement atténués dans les tissus biologiques (notamment par rapport aux ondes lumineuses), et ils peuvent se propager à des profondeurs de l'ordre de la dizaine de centimètres en restant dans un régime de diffusion simple (contrairement aux ondes lumineuses).

La formation d'une image échographique suppose trois étapes principales : une étape d'émission des ultrasons, une étape de réception des échos, et une étape de reconstruction de l'image pour attribuer les échos à chaque point du plan d'imagerie. En pratique, on utilise une barrette de transducteurs piézoélectriques : à l'émission, ces transducteurs sont excités électriquement pour créer une impulsion ultrasonore (quelques arches de sinusoïdes) ; à la réception ces cristaux piézoélectriques se déforment en recevant les échos ultrasonores, ce qui génère un courant électrique. La séquence ultrasonore correspond à la façon dont les ultrasons sont envoyés puis récupérés. On distingue notamment l'imagerie conventionnelle qui repose sur une séquence d'ondes focalisées et l'imagerie ultrarapide qui repose sur l'utilisation d'ondes planes.

1.2.2 Imagerie conventionnelle et imagerie ultrarapide

En échographie conventionnelle, le milieu à imager est sondé ligne par ligne, successivement. Pour cela, on applique des délais bien choisis sur les éléments de la barrette (loi de délais hyperbolique) de façon à créer une onde qui se focalise sur une ligne spécifique (figure 1.7). Puis on applique une nouvelle loi de délais qui permet la focalisation sur une ligne adjacente. L'image est ainsi balayée par lignes successives jusqu'à la couverture complète du champ de vue. Il s'agit

de la focalisation à l'émission, étape aussi appelée formation de faisceau ou « beamforming » à l'émission.

Entre chaque tir (correspondant à la focalisation sur une ligne), on passe à la partie réception pendant laquelle tous les échos sont récupérés sur chaque transducteur. Les signaux bruts sont appelés RF (signaux Radio Fréquence). En considérant que toute l'énergie se situe sur une ligne et donc que les échos reçus proviennent de sources situées sur cette ligne, la contribution de chaque point de la ligne est calculée en sommant les signaux reçus par chaque élément, en ayant appliqué la loi de retard correspondant à la profondeur du point. Il s'agit de l'étape de formation de voies, ou beamforming en réception, par délais et somme (figure 1.7).

En imagerie conventionnelle, les cadences d'imagerie sont typiquement de quelques dizaines d'Hertz (vitesse limitée par $\frac{c}{2z * n_{lignes}}$, avec c la célérité des ondes ultrasonores et z la profondeur d'imagerie) pour des profondeurs d'une dizaine de centimètres.

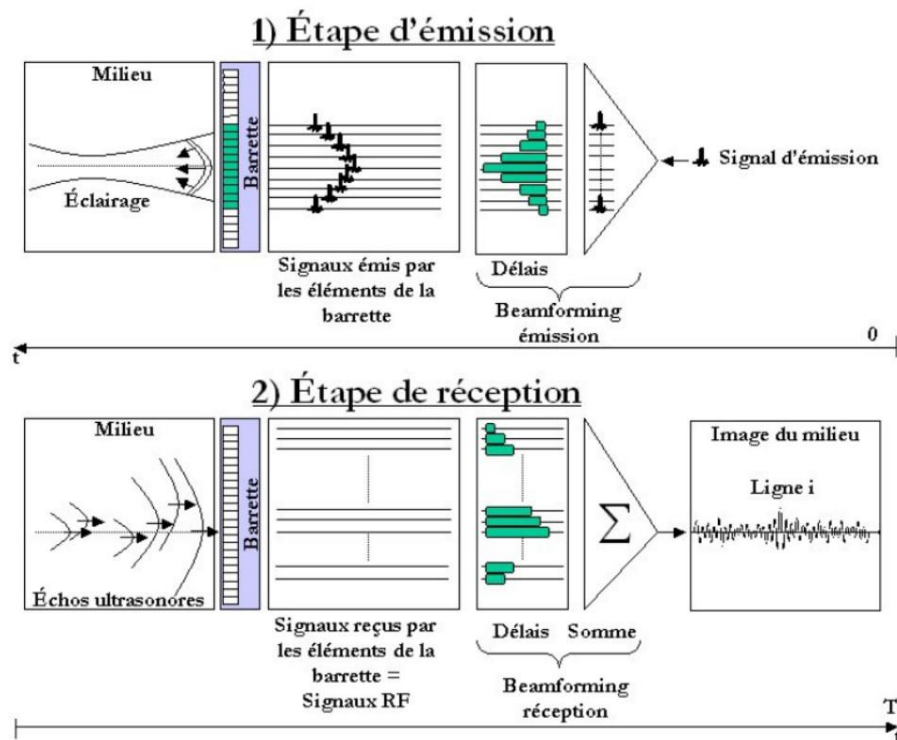


FIGURE 1.7 – Principe de l'imagerie ultrasonore conventionnelle : émission d'un signal focalisé (1) et beamforming des échos de la ligne éclairée par l'émission focalisée. D'après BERCOFF, 2004

L'imagerie ultrarapide repose sur un changement complet de paradigme. Il s'agit ici d'envoyer des ondes planes qui insonifient l'ensemble du champ de vue (figure 1.8), et non plus des ondes focalisées sur une ligne. Cette méthode, initialement proposée par (SHATTUCK et al., 1984) a été validée expérimentalement par M. TANTER et al., 2002. Tous les diffuseurs présents dans le milieu vont rétrodiffuser des échos, et non plus uniquement ceux situés sur une ligne. Une étape de beamforming, similaire à celle utilisée en imagerie conventionnelle, mais appliquée cette

fois-ci à toute l'image, permet de recréer l'image. Si le principe est similaire, l'implémentation elle requiert un changement radical de l'électronique d'acquisition puisque cela nécessite de stocker les échos enregistrés sur chaque transducteur, pour appliquer un beamforming avec des lois de délais propres à chaque position de l'image.

Avec cette méthode, une seule émission suffit pour reconstruire toute l'image. Il en résulte des cadences d'imagerie bien plus élevées (limitées par $\frac{c}{2z}$), de l'ordre de quelques milliers de Hertz pour des profondeurs de quelques dizaines de centimètres. De là vient le nom d'imagerie ultrarapide, laquelle a d'ailleurs été développée à l'origine pour imager la propagation d'une onde de cisaillement (M. TANTER et al., 2002), à une vitesse de l'ordre du m/s et qui ne peut pas être suivie par imagerie conventionnelle du fait de sa cadence limitée.

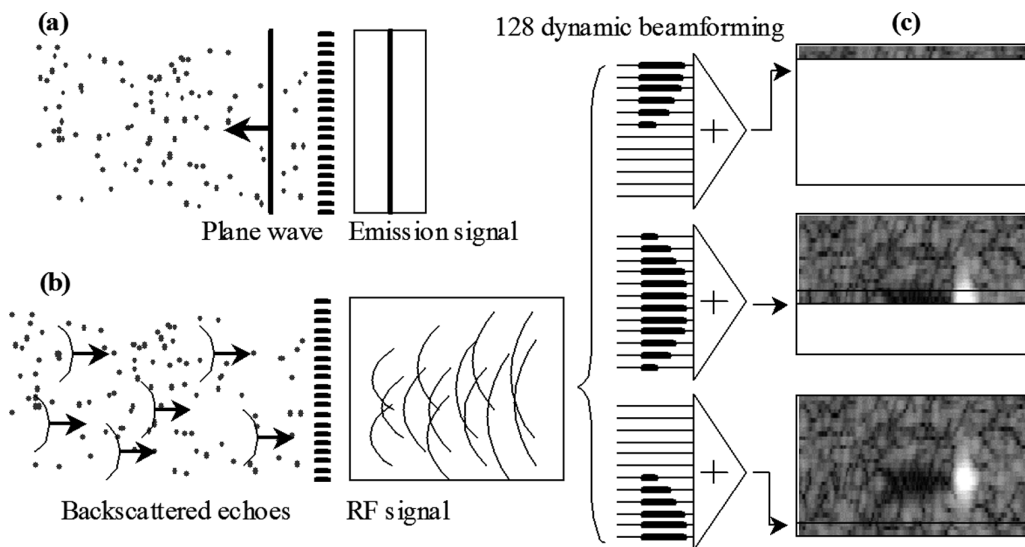


FIGURE 1.8 – Principe de l'imagerie ultrasonore ultrarapide : émission d'une onde plane (a), réception des échos issus de l'ensemble du milieu (b) et beamforming de tous ces échos avec des lois de délai spécifiques pour chaque ligne. Issu de MONTALDO et al., 2009

Cependant, cette méthode présente toujours une focalisation en réception mais a perdu la focalisation en émission. Ce manque de focalisation en émission conduit à une dégradation de l'image, en termes de contraste et de résolution spatiale. Cette focalisation peut cependant être recréée de façon synthétique en émettant des ondes planes à différents angles et en combinant de façon cohérente les images beamformées de chaque onde plane. L'imagerie ultrarapide par ondes planes inclinées a été introduite par M. TANTER et al., 2002, et a été étendue avec sommation cohérente (coherent compounding) par MONTALDO et al., 2009.

Montaldo et al. (MONTALDO et al., 2009) ont comparé les images BMode obtenues par imagerie par ondes focalisées et par imagerie par ondes planes avec compounding : des images équivalentes en contraste et résolution sont obtenues en imagerie par ondes planes avec une cadence d'imagerie (donnée par $\frac{c}{2z * n_{angles}}$) multipliée par un facteur allant de 10 à 100 selon le nombre d'angles utilisés (figure 1.9).

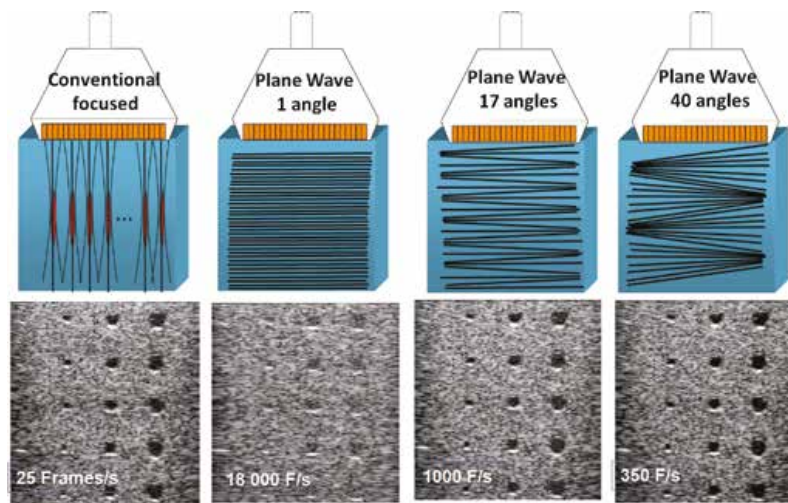


FIGURE 1.9 – Séquences d'imagerie ultrasonore conventionnelle et ultrarapide sur un fantôme (4 cm de profondeur) présentant des régions anéchoïques. De gauche à droite : imagerie conventionnelle focalisée (128 lignes et 4 profondeurs de focalisation) ; imagerie par ondes planes ; imagerie par ondes planes avec compound sur 17 angles ; imagerie par ondes planes avec compound sur 40 angles. D'après Mickael TANTER et FINK, 2014

1.2.3 Imagerie ultrasonore ultrarapide et développement de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS)

Le Doppler ultrasonore, largement utilisé en clinique, est un mode d'imagerie basé sur la répétition de pulses ultrasonores pour mesurer le déplacement du sang. C'est la technique la plus utilisée pour étudier la circulation sanguine dans le cœur, les artères, les reins ou le foie. Cependant, le manque de sensibilité du Doppler ultrasonore utilisant l'imagerie conventionnelle a restreint ses applications à l'étude des plus gros flux, au dépend de la micro circulation. En 2011 (BERCOFF et al., 2011, MACÉ et al., 2011), de nouvelles séquences basées sur l'utilisation d'un Doppler ultrarapide puis des méthodes d'analyses permettant d'extraire efficacement le signal sanguin du signal du tissu ont permis l'avènement d'une nouvelle modalité d'imagerie fonctionnelle, permettant d'imager et d'étudier les variations de volume sanguin dans la micro vascularisation sans agents de contraste. Cette section explicite le principe de la séquence ultrasonore et les méthodes d'analyses permettant de réaliser de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS).

Principe de l'imagerie Doppler de puissance

Quand un pulse ultrasonore traverse un vaisseau sanguin, une petite partie de l'énergie est rétrodiffusée par les globules rouges (RBC) et la sonde enregistre ces échos. Le principe d'une séquence d'imagerie Doppler est de répéter ces émissions pulsées pour détecter le mouvement de ces RBC en étudiant les variations temporelles des signaux rétrodiffusés successifs.

Considérons un diffuseur se déplaçant à une vitesse v avec un angle θ par rapport à l'axe

du faisceau. Il se rapproche entre deux impulsions de $\Delta z = \frac{vcos\theta}{PRF}$ et son écho est donc reçu avec un décalage $\Delta\tau = \frac{2\Delta z}{c_0} = \frac{2vcos\theta}{c_0 PRF}$, où c_0 désigne la vitesse des ondes ultrasonores dans le milieu, et PRF (Pulse Repetition Frequency) la fréquence des tirs ultrasonores.

Si on s'intéresse au signal RF correspondant à une profondeur d (correspondant à un temps d'écoute $t_I = \frac{2d}{c_0}$), le signal obtenu par l'échantillonnage des RF à t_I va alors osciller à une fréquence égale à la fréquence Doppler $\frac{2f_0vcos\theta}{c_0}$, proportionnelle à la vitesse de déplacement vertical du diffuseur. On notera que pour avoir une valeur correcte de la vitesse, il faut respecter le théorème de Nyquist et échantillonner le signal avec une PRF suffisante par rapport à la vitesse du diffuseur. En pratique, les flux sont correctement échantillonnés s'ils ont une vitesse maximale de $v_{max} = \frac{c_0 PRF}{4f_0cos\theta}$.

Si le signal échantillonné à t_I est proportionnel à la vitesse, il ne permet pas de connaître la direction de déplacement des RBCs (vers la sonde ou s'éloignant de la sonde). À partir de ces signaux RF, on peut construire un signal complexe, appelé signal IQ, par démodulation IQ (In-phase/Quadrature), qui permet de lever cette ambiguïté. Pour chaque profondeur, il s'agit d'échantillonner une première fois le signal RF à t_I , avec $t_I = \frac{2d}{c_0}$, c'est le signal en phase, puis une deuxième fois avec un décalage d'un quart de période de pulse $t_Q = t_I + \frac{f_0}{4}$, c'est le signal en quadrature de phase. On écrit ensuite le signal IQ complexe comme : $IQ_k = I_k + jQ_k$. Dans le cas de diffuseurs se dirigeant vers la sonde, le signal en quadrature semble précéder le signal en phase et inversement pour le cas de diffuseurs se déplaçant en s'éloignant de la sonde; les signaux IQ tourneront dans des sens opposés dans le plan complexe.

Ce signal contient le signal de tous les diffuseurs en mouvement, à la fois les RBCs du flux sanguin mais aussi tous les diffuseurs du tissu, lequel a pu bouger pendant l'acquisition. Le signal est d'ailleurs généralement largement dominé par le signal du tissu. L'énergie rétrodiffusée par le flux est en effet de 10 à 50 dB plus faible, selon la fréquence ultrasonore utilisée. L'étape suivante consiste donc à filtrer le signal du tissu, en appliquant des filtres de réjection du signal du tissu (ce qu'on appelle souvent un "clutter filtering", clutter signifiant fouillis, désordre...). Une des méthodes classiquement utilisées est l'application d'un filtre passe haut, basée sur un a priori spectral : le tissu bouge plus lentement que les flux sanguins, le spectre de Fourier du tissu est donc a priori centré sur une fréquence proche de zéro alors que le signal des diffuseurs sur la fréquence Doppler.

De ce signal filtré, on extrait généralement deux paramètres : la vitesse axiale pour chaque pixel, que l'on appelle le Doppler couleur, et l'intensité moyenne du signal pour chaque pixel (équation 1.1), que l'on appelle le Doppler de puissance.

$$I(x, z) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |IQ_F(x, z, t_i)|^2 \quad (1.1)$$

où N correspond au nombre d'échantillons temporels et IQ_F au signal IQ filtré.

Le Doppler de puissance est plus robuste au bruit et au repliement de spectre, il est plus sensible aux petits flux. Il ne donne pas d'information sur la vitesse du sang mais sur un autre

paramètre hémodynamique d'intérêt : le volume sanguin cérébral (CBV). Dans des conditions d'hématocrite constante, le Doppler de puissance est proportionnel en première approximation au CBV.

Doppler ultrarapide

La séquence de Doppler conventionnelle repose sur l'utilisation de pulses d'émissions focalisées. Afin d'avoir une fréquence d'échantillonnage suffisante pour imager des flux sanguins allant jusqu'à 50 mm/s (cas de l'imagerie d'un cerveau de rat), le théorème de Nyquist impose une fréquence d'acquisition des images Doppler de l'ordre du kHz. Si l'on considère une région d'intérêt de 2 cm de profondeur, il n'est pas possible d'acquérir toute l'image en maintenant une telle fréquence (cadence maximale pour une sonde de 128 lignes de $c/(128 \times 2z) = 300$ Hz). L'image est donc divisée en blocs (typiquement 8 à 16 dans les échographes standards) correspondant à un nombre limité de lignes et chaque bloc est scanné à la bonne fréquence d'échantillonnage avant de passer à la ligne suivante. Puis le Doppler de puissance est obtenu en filtrant le signal du tissu et en calculant l'intensité moyenne (équation 1.1) pour chaque pixel. L'estimation du Doppler de puissance sera donc désynchronisée entre les différents blocs.

La séquence de Doppler ultrarapide, introduite par BERCOFF et al., 2011, repose quant à elle sur l'émission d'ondes planes pulsées suivant différents angles, puis sommées de façon cohérentes. La cadence d'imagerie maximale est cette fois-ci fixée par $\frac{c}{2z * n_{angles}}$, le choix du nombre d'angles offrant un compromis ajustable entre qualité de l'imagerie et cadence d'imagerie. Le signal Doppler de puissance est ensuite obtenu comme en Doppler conventionnel (filtrage du signal du tissu puis calcul de l'intensité moyenne). Pour des applications nécessitant une bonne cadence d'imagerie, comme l'imagerie des flux rapides par exemple, le nombre d'angles peut être réduit. Pour imager des flux lents pour lesquels des cadences d'imagerie plus faibles suffisent, le nombre d'angles peut être augmenté pour gagner en résolution spatiale, en contraste et en sensibilité.

Un apport extrêmement important de l'imagerie ultrarapide est qu'elle permet de mettre en place des filtres de réjection du signal du tissu bien plus efficaces, grâce au nombre très important d'échantillons spatio-temporels sur lesquels ces filtres sont appliqués. Cela accentue encore le gain en sensibilité permis par le Doppler ultrarapide. De plus, de nouveaux filtres ont été développés pour être appliqués à ces données présentant un grand nombre d'échantillons spatio-temporels. En effet, les filtres passe haut ne permettent pas une séparation efficace dans le cas où une partie des spectres se superposent (flux lents ou mouvements des tissus plus rapides). Pour dépasser cette limitation, DEMENÉ, DEFFIEUX et al., 2015 ont introduit en 2015 un filtre basé sur une décomposition en valeur singulière (SVD) des IQ. Cette idée se base sur un a priori spatial sur le mouvement des tissus et des flux en plus de l'a priori spectral explicité plus haut. En effet, on peut considérer que le mouvement du tissu implique un mouvement similaire pour les différents diffuseurs d'un même tissu, alors que la position relative des globules rouges au sein des vaisseaux est en constante évolution. Ainsi le signal du tissu a une cohérence spatiale

plus élevée que le signal de flux. La décomposition en valeurs singulière permet d'exploiter et la cohérence spatiale et la cohérence temporelle pour séparer les signaux des tissus et du flux, et permet un gain en sensibilité considérable, notamment pour la détection des petits flux sanguins (de l'ordre de 1 mm/s) et pour la suppression des artefacts de tissu.

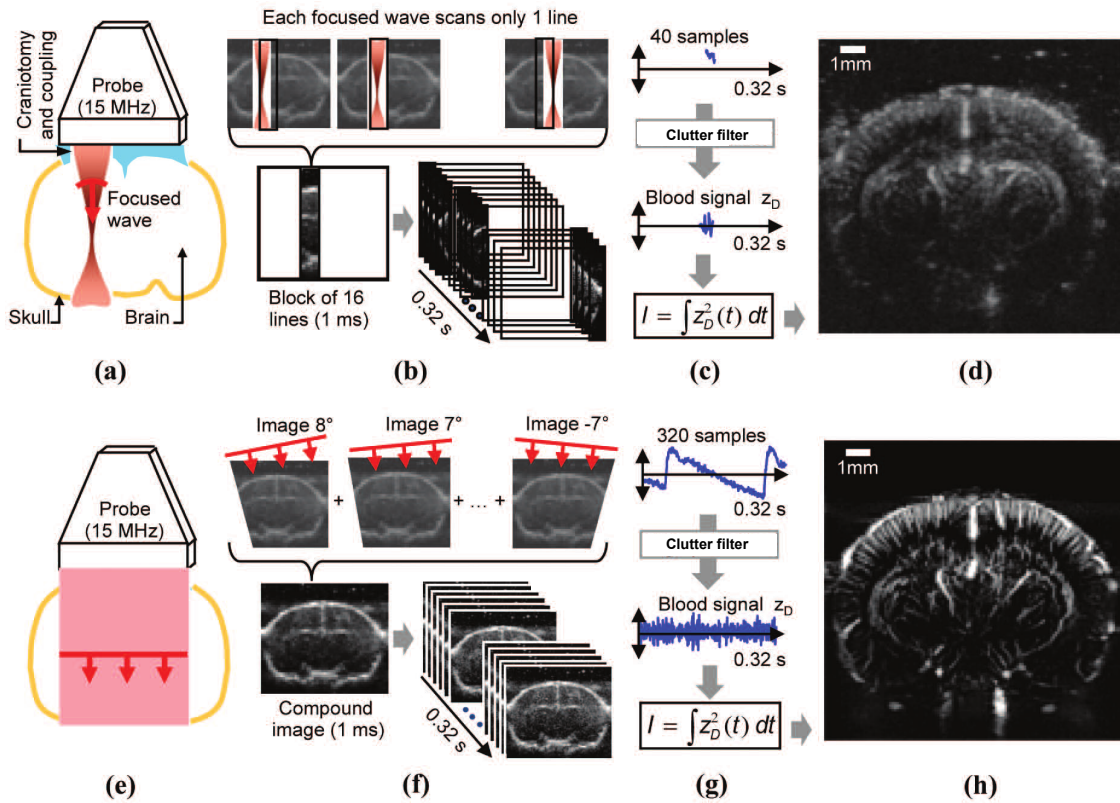


FIGURE 1.10 – Comparaison entre le Doppler conventionnel (ligne du haut) et le Doppler ultrarapide (ligne du bas) pour une durée d'acquisition équivalente. (a) Représentation schématique du dispositif expérimental, émissions d'ondes ultrasonores focalisées. (b) Séquence d'acquisition. L'image est divisée en blocs de 16 lignes. Chaque bloc est scanné ligne par ligne en moins d'une ms. Chaque bloc est scanné 40 fois à 1 kHz pour une durée totale d'acquisition de 0.32 s. (c) Traitement du signal : pour chaque pixel, on obtient un signal de 40 échantillons, un filtre passe haut permet de rejeter le signal du tissu. L'intensité moyenne du signal sanguin est ensuite calculée. (d) Image Doppler de puissance obtenue en Doppler conventionnel. (e) Le dispositif expérimental est le même mais des ondes planes ultrasonores sont utilisées. (f) Séquence d'acquisition : 16 ondes planes sont envoyées avec des angles différents pour obtenir une image compound en moins d'une ms. Une image Doppler est calculée à partir de 320 images compound acquises en 0.32 s. (g) Traitement du signal identique mais avec 320 échantillons temporels. (h) Image Doppler de puissance obtenue en Doppler ultrarapide.

Imagerie fUS

L'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) repose sur l'utilisation d'une séquence de Doppler ultrarapide pour étudier les variations temporelles de CBV dans le cerveau lors d'une activité cérébrale (via le couplage neurovasculaire). Dans la preuve de concept réalisée en 2011 par

MACÉ et al., 2011, une hyperhémie fonctionnelle dans le cortex primaire somatosensoriel et le thalamus suite à une stimulation des vibrisses (figure 1.11) a pu être détectée, ainsi que la propagation d'une crise d'épilepsie. Depuis, beaucoup d'applications ont vu le jour, notamment chez des animaux modèles variés en études précliniques (DIZEUX et al., 2019, RAU et al., 2018, BIMBARD et al., 2018, KOHLHAUER et al., 2015), ou pour de l'imagerie chez l'animal éveillé et se déplaçant librement (SIEU et al., 2015, URBAN et al., 2015), mais aussi en clinique chez le nouveau né (DEMENÉ, PERNOT et al., 2014) ou chez l'adulte en peropératoire (IMBAULT et al., 2017). Elle a aussi permis l'imagerie de la connectivité cérébrale (OSMANSKI et al., 2014).

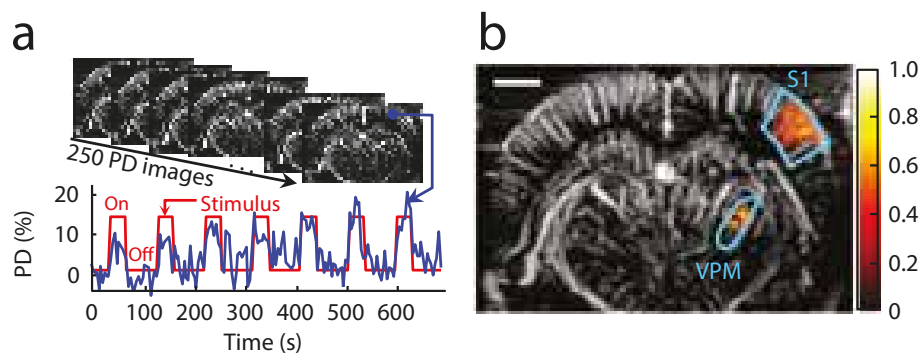


FIGURE 1.11 – Imagerie fUS d'une stimulation des vibrisses de rat. (a) 250 images de Doppler ultrarapide sont acquises dans un plan coronal pendant une stimulation des vibrisses. Le tracé du signal Doppler dans une zone activée montre une augmentation relative pendant les périodes de stimulation. (b) Carte d'activation obtenue par corrélation du signal Doppler avec le motif de stimulation. S1 : cortex primaire somatosensoriel, cortex en tonneau; VPM : noyau ventro-postero-medial du thalamus. D'après MACÉ et al., 2011

1.2.4 Imagerie ultrasonore ultrarapide et développement de la Microscopie par Localisation Ultrasonore (ULM)

On a longtemps considéré que la limite de résolution spatiale d'un système d'imagerie était fixée, selon la loi d'Abbe, par la limite de diffraction à la moitié d'une longueur d'onde. Dans le cas d'un Doppler ultrarapide appliqué à l'imagerie du cerveau d'un petit animal (à 15 MHz) par exemple, la résolution spatiale obtenue est de la centaine de microns. Cette résolution ne permet pas de résoudre les plus petits vaisseaux (par exemple, les artérioles pénétrantes dans un cerveau de rat mesurent environ 20 μm de diamètre).

L'idée de la super-résolution en imagerie optique

De nouvelles techniques en imagerie optique, désignées sous le nom de microscopie de super-résolution, ont cependant permis de franchir cette limite : la microscopie STED (Stimulated Emission Depletion, EGGELING et al., 2009), fPALM (fluorescence Photoactivated Localization Microscopy, BETZIG et al., 2006) et STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, RUST, BATES et ZHUANG, 2006), qui ont valu un prix Nobel à Betzig, Hell et Moerner en 2014.

Elles reposent sur la détection et la localisation sub-longueur d'onde de sources individuelles. L'idée est la suivante : si elles se trouvent à moins d'une demi-longueur d'onde, deux sources ponctuelles ne peuvent pas être distinguées car leur réponse par le système d'imagerie vont interférer. Mais une source isolée peut, seule, être localisée avec une précision qui n'est pas limitée par la limite de diffraction mais par le rapport signal sur bruit du système d'imagerie. L'objectif devient donc de créer des sources isolées. Le fPALM repose ainsi sur l'illumination stochastique de fluorophores sur différentes images, leur localisation, puis l'accumulation de leur position sur des centaines d'images. Il devient alors possible d'atteindre des résolutions une centaine de fois inférieures à la longueur d'onde, ce qui permet d'imager les membranes cellulaires et certaines petites organelles (figure 1.12).

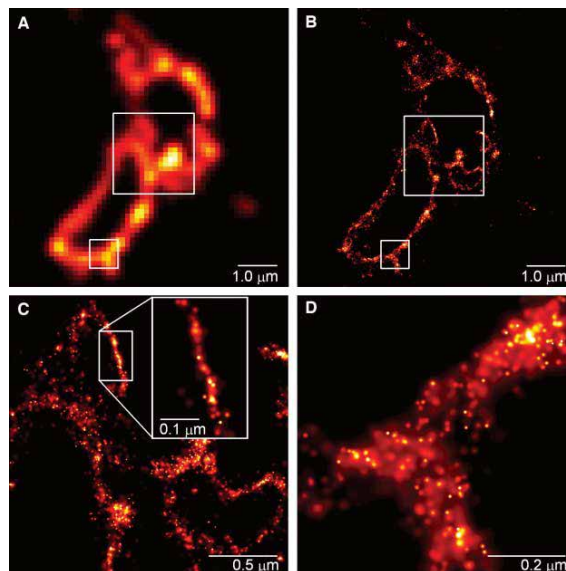


FIGURE 1.12 – (A) Image de microscopie de fluorescence par réflexion totale interne d'une membrane cellulaire, résolution de 200 nm. (B-D) fPALM de la même membrane cellulaire, précision de localisation de 2-25 nm, zooms successifs. D'après BETZIG et al., 2006

Transition aux ultrasons : principe de la Microscopie de Localisation Ultrasonore (ULM)

Une analogie peut être dressée entre les modalités optiques et les modalités ultrasonores, les deux étant fondamentalement gouvernées par la même équation de propagation des ondes. Les deux modalités sont limitées conventionnellement à une résolution de la demi-longueur d'onde, et présentent un compromis entre qualité de l'image et cadence d'imagerie. L'imagerie ultrasonore focalisée a beaucoup de points communs avec la microscopie confocale et l'imagerie ultrasonore par onde plane avec la microscopie plein champ. Enfin, l'utilisation d'agents de contraste est répandue pour les deux modalités, comme en microscopie de fluorescence en optique ou en CEUS (Contrast Enhanced Ultrasound) en ultrasons. Les techniques de super-résolution en optique ont ainsi pu être adaptées pour l'imagerie ultrasonore.

Les agents utilisés pour créer des sources isolées en ultrasons seront des microbulles (MBs) de gaz de 1 à 5 micromètres de diamètre, déjà utilisées en routine pour rehausser le contraste

dans la circulation sanguine du fait de la grande différence d'impédance acoustique entre le gaz et les tissus. Ces bulles étant très petites devant la longueur d'onde, elles se comportent comme des diffuseurs de Rayleigh, comme des sources ponctuelles. L'idée est d'utiliser ces microbulles de la même façon que les fluorophores pour le fPALM. Il s'agit d'injecter une concentration faible de ces microbulles pour qu'elles restent assez distantes et donc puissent être considérées comme isolées, et d'utiliser l'imagerie ultrasonore ultrarapide pour les localiser sur les images et suivre leur mouvement à fréquence ultrarapide. Les premières preuves de concepts ont été réalisées in vitro dans des fantômes de micro-vaisseaux (COUTURE et al., 2011 et DESAILLY et al., 2013).

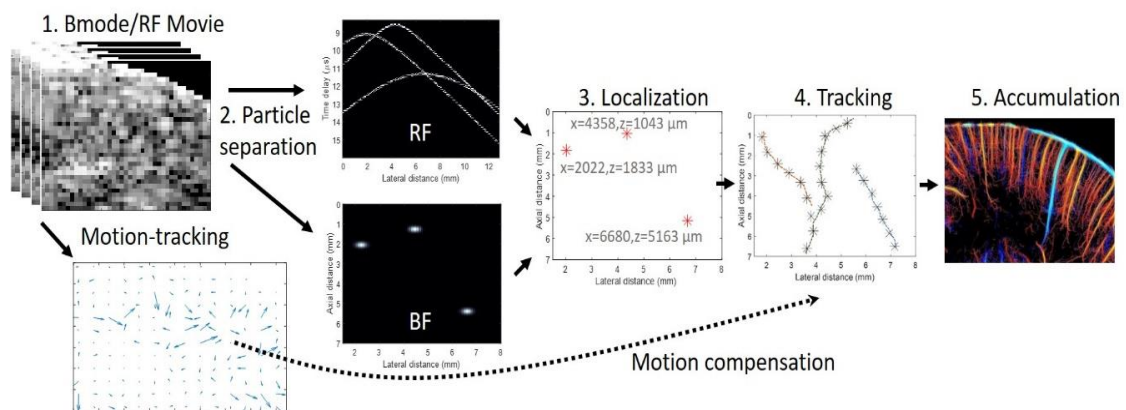


FIGURE 1.13 – Étapes principales de l'algorithme d'ULM. (1) Des images IQ beamformées ou des données RF sont acquises pendant l'injection de microbulles. (2) Une étape de filtrage permet de séparer le signal des microbulles du signal du tissu. (3) Les centroïdes des hyperboles (sur signaux RF) ou des PSF (signaux IQ beamformés) engendrées par les microbulles sont localisés. (4) L'appariement des différentes localisations sur des images successives permet de calculer les vecteurs vitesse de déplacement des microbulles. (5) Les positions des microbulles de toute l'acquisition sont accumulées pour créer une image de la vascularisation.

Les étapes sont les suivantes, résumées sur le schéma 1.13 :

- Injection de microbulles dans la circulation sanguine, par bolus ou de façon continue, dans des concentrations inférieures à celles choisies pour une utilisation comme agents de contraste.
- Acquisition d'un film BMode par échographie ultrarapide puis séparation du signal des bulles du signal du tissu. Typiquement, on utilise une séquence ultrarapide par ondes planes puis un filtrage SVD sur les données IQs. On obtient alors des images de bulles (une image toutes les millisecondes typiquement), bien identifiables et isolées.
- Localisation des bulles : Il s'agit ici de localiser les centroïdes des bulles visibles sur les images BMode. Une bulle isolée se comporte comme un diffuseur de Rayleigh, son image sur le BMode est une fonction bien connue, la réponse impulsionnelle spatiale (ou PSF pour Point Spread Function, elle décrit la réponse d'un système d'imagerie à une source ponctuelle), dont on peut localiser le centre à une échelle sub-longueur d'onde. Plusieurs stratégies ont été développées dans les algorithmes de localisation, avec un compromis entre précision de la localisation et

coût de calcul (HEILES, 2019). La plupart des techniques utilisent l'interpolation des images beamformées, et cherchent le centre comme le maximum. On peut aussi éventuellement localiser le centroïde de l'hyperbole directement sur les données RF.

- Tracking : les premières versions d'ULM représentaient les cartes comme la superposition de toutes les positions détectées, par analogie avec ce qui est fait en optique. Plus tard, l'idée a été introduite par ERRICO et al., 2015 et CHRISTENSEN-JEFFRIES et al., 2015 de suivre la position des bulles au cours du temps, et ce à très grande cadence grâce à l'imagerie ultrarapide. Cela permet d'avoir, en plus d'une carte de la vascularisation super-résolue, des cartes quantitatives de vitesses de déplacement des bulles, assimilées à la vitesse du flux dans le réseau vasculaire. Cela permet aussi de proposer des filtrages efficaces en supprimant les détections ayant des comportements non compatibles avec ceux d'une bulle dans un vaisseau (par exemple avec une vitesse trop élevée).

Applications

Chez le rat, la preuve de concept in vivo réalisée par ERRICO et al., 2015 a permis d'imager des vaisseaux avec une résolution de 8 μm pour une longueur d'onde d'imagerie de 100 μm . Depuis, l'ULM a été utilisée pour imager différents organes en imagerie préclinique (rein FOIRET et al., 2017, vaisseaux superficiels CHRISTENSEN-JEFFRIES et al., 2015). Certaines équipes ont aussi essayé d'extraire des biomarqueurs pertinents sur la micro vascularisation, comme LIN et al., 2017 pour des tumeurs de rats. L'ULM a aussi été appliquée en imagerie clinique (HUANG et al., 2020) et même récemment à travers le crâne (DEMENÉ, ROBIN et al., 2021). Elle a aussi été étendue à l'imagerie 3D (LIN et al., 2017 et HEILES, 2019).

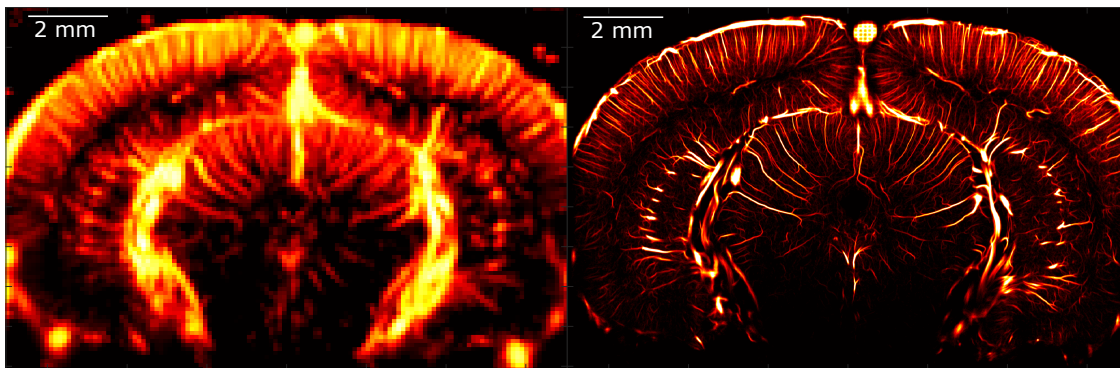


FIGURE 1.14 – Gauche : image Doppler de puissance d'une coupe coronale de cerveau de rat. Droite : image ULM de la même coupe coronale.

La figure 1.14 compare la même coupe coronale d'un cerveau de rat imagé avec une sonde à 15 MHz (longueur d'onde de 100 μm) en Doppler de puissance (gauche) ou en ULM (droite) avec une résolution de 6.5 μm pour illustrer le grain en résolution spatiale : il est désormais possible de résoudre les vaisseaux individuellement (jusqu'aux pré-capillaires).

1.3 Objectifs de la thèse

Cette thèse vise au développement d'une nouvelle modalité de neuroimagerie fonctionnelle présentant des propriétés complémentaires aux modalités déjà existantes et présentées dans la première partie de ce chapitre d'état de l'art. Cette nouvelle modalité d'imagerie repose sur l'imagerie ultrasonore ultrarapide, et en particulier la Microscopie de Localisation Ultrasonore, présentées dans la deuxième partie de ce chapitre d'état de l'art.

Cet objectif cadre peut être séparé en trois sous-objectifs correspondant aux trois chapitres suivants de ce manuscrit.

1.3.1 Imagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation ultrasonore (fULM) : preuve de concept

Si la Microscopie de Localisation Ultrasonore (ULM) a complètement bouleversé les échelles spatiales observables en ultrasons, cette modalité est aujourd'hui réservée à des applications statiques : il n'y a pas de suivi temporel de l'activité hémodynamique. Elle n'a donc pas été utilisée comme une technique d'imagerie fonctionnelle jusqu'à aujourd'hui, car les durées d'acquisition des images sont trop longues.

Le chapitre 2 de ce manuscrit a pour objectif d'expliquer le développement d'un protocole expérimental et d'une méthode de traitement des données ULM dédiés qui permettront de transformer l'ULM en une modalité dynamique et plus particulièrement en une modalité de neuroimagerie fonctionnelle.

1.3.2 Étude et quantification de l'hyperhémie fonctionnelle par fULM

Il s'agira dans le chapitre 3 d'appliquer la méthode développée dans le chapitre 2 pour étudier des réponses hémodynamiques à des activations fonctionnelles. L'objectif de ce chapitre sera donc à la fois de se confronter aux indicateurs donnés par d'autres modalités d'imagerie fonctionnelle pour valider notre méthode, et de proposer des outils d'analyses spécifiques à notre technique.

1.3.3 Imagerie de l'intensité de rétrodiffusion en Microscopie de Localisation Ultrasonore

Dans ce dernier chapitre, l'objectif sera d'étudier un paramètre non exploité jusqu'à présent en Microscopie de Localisation Ultrasonore : l'intensité rétrodiffusée par les microbulles. On verra comment il pourrait permettre de raffiner les algorithmes de localisation 2D en apportant une information sur la position des vaisseaux dans la troisième dimension de l'espace. Il sera aussi utilisé dans le cadre d'une comparaison entre le signal Doppler de puissance et le signal ULM.

Références

- BAYRAK, Şengül, Bekir KARLIK et Demirezen FATMA (5 juin 2010). *Comparison Feature Extraction and Neural Networks Algorithms for Epileptic Seizure Detection*.
- BERCOFF, Jeremy (1^{er} jan. 2004). « L' imagerie échographique ultrarapide et son application à l'étude de la viscoélasticité du corps humain ». These de doctorat. Paris 7. URL : <http://www.theses.fr/2004PA077203> (visité le 07/03/2022).
- BERCOFF, Jeremy et al. (jan. 2011). « Ultrafast compound doppler imaging : providing full blood flow characterization ». In : *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 58.1. Conference Name : IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, p. 134-147. ISSN : 1525-8955. DOI : 10.1109/TUFFC.2011.1780.
- BETZIG, E. et al. (15 sept. 2006). « Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution ». In : *Science* 313.5793, p. 1642-1645. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1127344. URL : <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1127344> (visité le 09/07/2021).
- BIMBARD, Célian et al. (28 juin 2018). « Multi-scale mapping along the auditory hierarchy using high-resolution functional UltraSound in the awake ferret ». In : *eLife* 7. Sous la dir. d'Andrew J KING. Publisher : eLife Sciences Publications, Ltd, e35028. ISSN : 2050-084X. DOI : 10.7554/eLife.35028. URL : <https://doi.org/10.7554/eLife.35028> (visité le 16/03/2021).
- CAO, Vania Y. et al. (5 jan. 2013). « In Vivo Two-photon Imaging Of Experience-dependent Molecular Changes In Cortical Neurons ». In : *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 71, e50148. ISSN : 1940-087X. DOI : 10.3791/50148. URL : <https://www.jove.com/v/50148/in-vivo-two-photon-imaging-experience-dependent-molecular-changes> (visité le 13/12/2021).
- CHRISTENSEN-JEFFRIES, Kirsten et al. (fév. 2015). « In Vivo Acoustic Super-Resolution and Super-Resolved Velocity Mapping Using Microbubbles ». In : *IEEE Transactions on Medical Imaging* 34.2. Conference Name : IEEE Transactions on Medical Imaging, p. 433-440. ISSN : 1558-254X. DOI : 10.1109/TMI.2014.2359650.
- COHEN, David (23 août 1968). « Magnetoencephalography : Evidence of Magnetic Fields Produced by Alpha-Rhythm Currents ». In : *Science* 161.3843. Publisher : American Association for the Advancement of Science, p. 784-786. DOI : 10.1126/science.161.3843.784. URL : <https://www.science.org/doi/10.1126/science.161.3843.784> (visité le 08/12/2021).
- COUTURE, Olivier et al. (oct. 2011). « Microbubble ultrasound super-localization imaging (MUSLI) ». In : *2011 IEEE International Ultrasonics Symposium*. 2011 IEEE International Ultrasonics Symposium. ISSN : 1948-5727, p. 1285-1287. DOI : 10.1109/ULTSYM.2011.6293576.
- CRYAN, John F. et Andrew HOLMES (sept. 2005). « The ascent of mouse : advances in modelling human depression and anxiety ». In : *Nature Reviews Drug Discovery* 4.9, p. 775-790. ISSN : 1474-1776, 1474-1784. DOI : 10.1038/nrd1825. URL : <http://www.nature.com/articles/nrd1825> (visité le 08/12/2021).
- DEMENÉ, Charlie, Thomas DEFFIEUX et al. (nov. 2015). « Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity ». In : *IEEE*


- Transactions on Medical Imaging* 34.11. Conference Name : IEEE Transactions on Medical Imaging, p. 2271-2285. ISSN : 1558-254X. DOI : 10.1109/TMI.2015.2428634.
- DEMENÉ, Charlie, Mathieu PERNOT et al. (juin 2014). « Ultrafast Doppler reveals the mapping of cerebral vascular resistivity in neonates ». In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 34.6, p. 1009-1017. ISSN : 0271-678X. DOI : 10.1038/jcbfm.2014.49. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4050246/> (visité le 08/07/2019).
- DEMENÉ, Charlie, Justine ROBIN et al. (mars 2021). « Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients ». In : *Nature Biomedical Engineering* 5.3. Bandiera_abtest : a Cg_type : Nature Research Journals Number : 3 Primary_atype : Research Publisher : Nature Publishing Group Subject_term : Biomedical engineering;Ultrasound Subject_term_id : biomedical-engineering;ultrasound, p. 219-228. ISSN : 2157-846X. DOI : 10.1038/s41551-021-00697-x. URL : <https://www.nature.com/articles/s41551-021-00697-x> (visité le 18/11/2021).
- DENK, W., J. H. STRICKLER et W. W. WEBB (6 avr. 1990). « Two-photon laser scanning fluorescence microscopy ». In : *Science (New York, N.Y.)* 248.4951, p. 73-76. ISSN : 0036-8075. DOI : 10.1126/science.2321027.
- DESAILLY, Yann et al. (21 oct. 2013). « Sono-activated ultrasound localization microscopy ». In : *Applied Physics Letters* 103.17, p. 174107. DOI : 10.1063/1.4826597. URL : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02481847> (visité le 27/12/2021).
- DIZEUX, Alexandre et al. (déc. 2019). « Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates ». In : *Nature Communications* 10.1. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/s41467-019-09349-w. URL : <http://www.nature.com/articles/s41467-019-09349-w> (visité le 14/09/2020).
- DREVETS, Wayne C. et al. (avr. 1997). « Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders ». In : *Nature* 386.6627, p. 824-827. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/386824a0. URL : <http://www.nature.com/articles/386824a0> (visité le 09/07/2021).
- EGGELING, Christian et al. (26 fév. 2009). « Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell ». In : *Nature* 457.7233, p. 1159-1162. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature07596. URL : <http://www.nature.com/articles/nature07596> (visité le 09/07/2021).
- ERRICO, Claudia et al. (nov. 2015). « Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging ». In : *Nature* 527.7579. Number : 7579 Publisher : Nature Publishing Group, p. 499-502. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature16066. URL : <https://www.nature.com/articles/nature16066> (visité le 03/03/2021).
- FEREZOU, Isabelle, Sonia BOLEA et Carl C.H. PETERSEN (mai 2006). « Visualizing the Cortical Representation of Whisker Touch : Voltage-Sensitive Dye Imaging in Freely Moving Mice ». In : *Neuron* 50.4, p. 617-629. ISSN : 08966273. DOI : 10.1016/j.neuron.2006.03.043. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627306002704> (visité le 02/08/2019).
- FERRARI, Marco et Valentina QUARESIMA (1^{er} nov. 2012). « A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application ». In :

- NeuroImage* 63.2, p. 921-935. ISSN : 1053-8119. DOI : 10.1016/j.neuroimage.2012.03.049. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811912003308> (visité le 21/07/2021).
- FOIRET, Josquin et al. (déc. 2017). « Ultrasound localization microscopy to image and assess microvasculature in a rat kidney ». In : *Scientific Reports* 7.1, p. 13662. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-017-13676-7. URL : <http://www.nature.com/articles/s41598-017-13676-7> (visité le 17/12/2021).
- GIAS, C. et al. (1^{er} jan. 2005). « Retinotopy within rat primary visual cortex using optical imaging ». In : *NeuroImage* 24.1, p. 200-206. ISSN : 1053-8119. DOI : 10.1016/j.neuroimage.2004.08.015.
- GRANER, John et al. (4 mars 2013). « Functional MRI in the Investigation of Blast-Related Traumatic Brain Injury ». In : *Frontiers in Neurology* 4, p. 16. ISSN : 1664-2295. DOI : 10.3389/fneur.2013.00016. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586697/> (visité le 13/12/2021).
- GRINVALD, Amiram et Rina HILDESHEIM (nov. 2004). « VSDI : a new era in functional imaging of cortical dynamics ». In : *Nature Reviews Neuroscience* 5.11, p. 874-885. ISSN : 1471-003X, 1471-0048. DOI : 10.1038/nrn1536. URL : <http://www.nature.com/articles/nrn1536> (visité le 10/12/2021).
- HEILES, Baptiste (20 déc. 2019). « 3D Ultrasound Localization Microscopy ». Thèse de doct. PSL Research University. URL : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02478291> (visité le 17/12/2021).
- HILLMAN, Elizabeth M. C. (2007). « Optical brain imaging in vivo : techniques and applications from animal to man ». In : *Journal of biomedical optics* 12.5, p. 051402. ISSN : 1083-3668. DOI : 10.1117/1.2789693. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2435254/> (visité le 10/12/2021).
- HIRSCH, Sven et al. (1^{er} juin 2012). « Topology and Hemodynamics of the Cortical Cerebrovascular System ». In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32.6. Publisher : SAGE Publications Ltd STM, p. 952-967. ISSN : 0271-678X. DOI : 10.1038/jcbfm.2012.39. URL : <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.39> (visité le 08/12/2021).
- HUANG, Chengwu et al. (déc. 2020). « Short Acquisition Time Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging via Microbubble Separation ». In : *Scientific Reports* 10.1, p. 6007. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-020-62898-9. URL : <http://www.nature.com/articles/s41598-020-62898-9> (visité le 08/12/2021).
- IADecOLA, Costantino (sept. 2017). « The Neurovascular Unit Coming of Age : A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease ». In : *Neuron* 96.1, p. 17-42. ISSN : 08966273. DOI : 10.1016/j.neuron.2017.07.030. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627317306529> (visité le 27/07/2020).
- IMBAULT, Marion et al. (déc. 2017). « Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity ». In : *Scientific Reports* 7.1, p. 7304. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-017-06474-8. URL : <http://www.nature.com/articles/s41598-017-06474-8> (visité le 08/12/2021).

- KHAN, Sheraz et al. (2014). « Encoding Cortical Dynamics in Sparse Features ». In : *Frontiers in Human Neuroscience* 8, p. 338. ISSN : 1662-5161. DOI : 10.3389/fnhum.2014.00338. URL : <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2014.00338> (visité le 13/12/2021).
- KIRST, Christoph et al. (fév. 2020). « Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain Vasculature ». In : *Cell* 180.4, 780-795.e25. ISSN : 00928674. DOI : 10.1016/j.cell.2020.01.028. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420301094> (visité le 08/12/2021).
- KOHLHAUER, Matthias et al. (oct. 2015). « Hypothermic Total Liquid Ventilation Is Highly Protective Through Cerebral Hemodynamic Preservation and Sepsis-Like Mitigation After Asphyxial Cardiac Arrest ». In : *Critical Care Medicine* 43.10, e420-430. ISSN : 1530-0293. DOI : 10.1097/CCM.0000000000001160.
- LIN, Fanglue et al. (1^{er} jan. 2017). « 3-D Ultrasound Localization Microscopy for Identifying Microvascular Morphology Features of Tumor Angiogenesis at a Resolution Beyond the Diffraction Limit of Conventional Ultrasound ». In : *Theranostics* 7.1, p. 196-204. ISSN : 1838-7640. DOI : 10.7150/thno.16899. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5196896/> (visité le 17/12/2021).
- LOGOTHETIS, Nikos K et al. (2001). « Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal ». In : 412, p. 8.
- MACÉ, Emilie et al. (août 2011). « Functional ultrasound imaging of the brain ». In : *Nature Methods* 8.8, p. 662-664. ISSN : 1548-7105. DOI : 10.1038/nmeth.1641. URL : <http://www.nature.com/articles/nmeth.1641> (visité le 29/08/2019).
- MONESSON-OLSON, Bryan D., Eileen L. TROCONIS et Josef G. TRAPANI (15 oct. 2014). « Recording Field Potentials From Zebrafish Larvae During Escape Responses ». In : *Journal of Undergraduate Neuroscience Education* 13.1, A52-A58. ISSN : 1544-2896. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4281049/> (visité le 13/12/2021).
- MONTALDO, G. et al. (mars 2009). « Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography ». In : *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 56.3, p. 489-506. ISSN : 0885-3010. DOI : 10.1109/TUFFC.2009.1067. URL : <http://ieeexplore.ieee.org/document/4816058/> (visité le 18/07/2019).
- OSMANSKI, Bruno-Félix et al. (déc. 2014). « Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution ». In : *Nature Communications* 5.1, p. 5023. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms6023. URL : <http://www.nature.com/articles/ncomms6023> (visité le 08/12/2021).
- PHELPS, M. E. (1^{er} août 2000). « Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.16, p. 9226-9233. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.97.16.9226. URL : <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.97.16.9226> (visité le 13/12/2021).
- PIECHNIK, Stefan K., Peter A. CHIARELLI et Peter JEZZARD (jan. 2008). « Modelling vascular reactivity to investigate the basis of the relationship between cerebral blood volume and flow under CO2 manipulation ». In : *NeuroImage* 39.1, p. 107-118. ISSN : 10538119. DOI :

- 10.1016/j.neuroimage.2007.08.022. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811907007616> (visité le 18/11/2021).
- RAU, Richard et al. (déc. 2018). « 3D functional ultrasound imaging of pigeons ». In : *NeuroImage* 183, p. 469-477. ISSN : 1095-9572. DOI : 10.1016/j.neuroimage.2018.08.014.
- RUST, Michael J., Mark BATES et Xiaowei ZHUANG (oct. 2006). « Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution ». In : *Nature methods* 3.10, p. 793-795. ISSN : 1548-7091. DOI : 10.1038/nmeth929. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2700296/> (visité le 09/07/2021).
- SCHMID, Franca et al. (août 2019). « Vascular density and distribution in neocortex ». In : *NeuroImage* 197, p. 792-805. ISSN : 10538119. DOI : 10.1016/j.neuroimage.2017.06.046. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811917305165> (visité le 08/12/2021).
- SHATTUCK, D. P. et al. (avr. 1984). « Explososcan : a parallel processing technique for high speed ultrasound imaging with linear phased arrays ». In : *The Journal of the Acoustical Society of America* 75.4, p. 1273-1282. ISSN : 0001-4966. DOI : 10.1121/1.390734.
- SIEU, Lim-Anna et al. (sept. 2015). « EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats ». In : *Nature Methods* 12.9, p. 831-834. ISSN : 1548-7091, 1548-7105. DOI : 10.1038/nmeth.3506. URL : <http://www.nature.com/articles/nmeth.3506> (visité le 08/12/2021).
- SMITH, S.J.M. (2005). « EEG in the diagnosis, classification, and management of patients with epilepsy ». In : *Neurology in Practice* 76.2, p. ii2-ii7. ISSN : 1473-7086. DOI : 10.1136/jnnp.2005.069245.
- TANTER, M. et al. (oct. 2002). « Ultrafast compound imaging for 2-D motion vector estimation : application to transient elastography ». In : *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 49.10. Conference Name : IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, p. 1363-1374. ISSN : 1525-8955. DOI : 10.1109/TUFFC.2002.1041078.
- TANTER, Mickael et Mathias FINK (jan. 2014). « Ultrafast imaging in biomedical ultrasound ». In : *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 61.1. Conference Name : IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, p. 102-119. ISSN : 1525-8955. DOI : 10.1109/TUFFC.2014.2882.
- URBAN, Alan et al. (sept. 2015). « Real-time imaging of brain activity in freely moving rats using functional ultrasound ». In : *Nature Methods* 12.9, p. 873-878. ISSN : 1548-7091, 1548-7105. DOI : 10.1038/nmeth.3482. URL : <http://www.nature.com/articles/nmeth.3482> (visité le 11/03/2021).
- WANG, Xueding et al. (1^{er} juill. 2003). « Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain ». In : *Nature Biotechnology* 21.7. Publisher : Nature Publishing Group, p. 803. ISSN : 1087-0156. DOI : 10.1038/nbt839. URL : <http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=edsgao&AN=edsgcl.190182349&lang=fr&site=eds-live> (visité le 08/12/2021).
- ZHANG, Hao F et al. (1^{er} juill. 2006). « Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging ». In : *Nature Biotechnology* 24.7. Publisher : Nature Publi-

shing Group, p. 848. ISSN : 1087-0156. DOI : 10.1038/nbt1220. URL : <http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=edsgao&AN=edsgcl.191182812&lang=fr&site=eds-live> (visité le 08/12/2021).



Chapitre 2 - Microscopie de Localisation Ultrasonore fonctionnelle : preuve de concept

2.4 Introduction

2.4.1 La Microscopie par Localisation Ultrasonore : une modalité d'imagerie statique

L'ULM a permis de dépasser le compromis entre résolution spatiale et profondeur de pénétration. Elle présente un excellent compromis entre rapport signal sur bruit, résolution spatiale et champ de vue, et est d'ailleurs la seule modalité d'imagerie capable d'imager à une échelle microscopique l'intégralité d'un cerveau de rongeur. Mais sa méthode de formation des images, qui requiert l'accumulation de milliers de positions de microbulles isolées, limite très fortement sa résolution temporelle.

HINGOT, ERRICO, HEILES et al., 2019 analyse cette particularité due à la méthode d'acquisition des images ULM. C'est en fait le flux qui dicte le temps d'acquisition nécessaire, puisqu'il faut laisser le temps aux microbulles de parcourir toute la vascularisation que l'on souhaite imager. Le temps nécessaire à attendre pour être sûr d'avoir au moins une bulle qui parcourt un vaisseau dépend de la probabilité de présence d'une bulle dans ce vaisseau, qui elle-même est liée à la valeur du flux dans ce vaisseau. Plus le flux dans un vaisseau est élevé, plus un nombre important de bulles va parcourir ce vaisseau et donc moins de temps il faudra attendre pour être sûr qu'au moins une bulle l'ait parcouru et ait pu être localisée. On comprend ainsi qu'une carte des gros vaisseaux peut être obtenue très rapidement (dizaine de secondes) mais que pour être sensible aux petits flux et donc obtenir une carte de la micro vascularisation, le temps d'acquisition est plus élevé (de l'ordre de la minute).

Le papier conclut sur un compromis entre résolution spatiale et temps d'acquisition. Nous proposons ici de l'aborder plutôt sous l'idée d'un compromis entre sensibilité aux petits flux (petits vaisseaux) et temps d'acquisition. En effet, la méthode de localisation a une précision (à SNR fixé) qui ne dépend pas directement du nombre de bulles passées et donc du temps d'acquisition. En présence d'une bulle isolée, la résolution provient uniquement de la qualité de la localisation de son maximum à une échelle sub-pixel, qu'elle soit dans un gros vaisseau ou dans un petit vaisseau. En revanche, le temps d'acquisition pour être sûr de détecter une microbulle est plus grand pour un petit vaisseau, et on a donc bien un compromis entre sensibilité et temps d'acquisition.

2.4.2 Des premiers pas vers une imagerie dynamique

Ces longs temps d'acquisition justifient l'absence d'études temporelles en ULM jusqu'à présent. En effet, les cartes obtenues décrivent la vascularisation et les champs de vitesse moyens sur toute l'acquisition. Des premières études ont cependant récemment commencé à séparer plusieurs comportements temporels dans les données ULM. C'est le cas de DEMENÉ et al., 2021 qui a isolé des profils de vitesses différents en systole et en diastole en séparant l'acquisition en deux jeux de données : un premier correspondant à toutes les MBs détectées autour des pics

systoliques et un deuxième à celles autour de la diastole. L'identification de la diastole et de la systole a été réalisée en estimant la vitesse par des techniques de corrélation croisées sur les données IQs (KASAI et al., 1985) qui seront détaillées en 2.7.2.

Récemment, à l'aide d'un suivi électrocardiogramme (ECG) permettant d'identifier le cycle cardiaque, des données ULM dynamiques ont été développées et utilisées par CORMIER et al., 2021 et BOURQUIN et al., 2021 pour faire des mesures hémodynamiques de la pulsatilité, en recalant les données de plusieurs cycles sur une cycle cardiaque moyen unique grâce au profil ECG.

2.4.3 Objectifs du chapitre

Ce chapitre est dédié à présenter un protocole expérimental et une méthode de traitement des données ultrasonores qui permette de transformer l'ULM en une modalité d'imagerie dynamique capable de suivre une hyperhémie fonctionnelle. Concrètement il s'agit combiner des stimulations sensorielles pour activer des zones du cerveau, à l'injection de microbulles dans la micro-vascularisation pour pouvoir imager grâce à l'ULM des modifications des paramètres hémodynamiques. Afin de contourner le compromis entre temps d'acquisition et sensibilité aux petits flux, la méthodologie repose sur la répétition de plusieurs stimuli pour augmenter le nombre de bulles détectées par seconde.

2.5 Développement de l'imagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation Ultrasonore : Obtenir des données ULM dynamiques

2.5.1 Obtenir des données ULM dynamiques pour étudier une activité cérébrale : protocole expérimental

Les expérimentations ont été menées sur des rats adultes sous anesthésie (figure 2.15). Une craniotomie permet de placer la sonde ultrasonore sur le cerveau au-dessus des zones activées. On désigne par X l'axe selon la sonde et Z l'axe en profondeur. Un cathéter inséré dans la jugulaire permet l'injection des microbulles. Deux types de stimulation sont utilisées. Des stimulations sensorielles qui consistent en la stimulation des vibrisses à 10 Hz, et des stimulations visuelles correspondant à des flash lumineux de LED à 3 Hz. Typiquement des stimulations de 30 secondes précédées de 30 secondes de repos et suivies de 10 secondes de retour à la ligne de base sont utilisées.

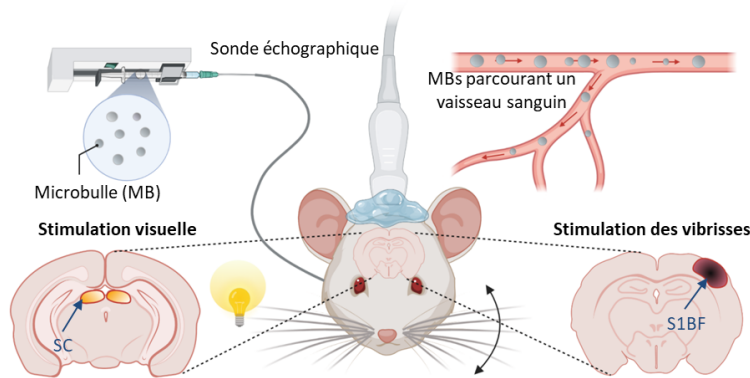


FIGURE 2.15 – Montage expérimental pour l'imagerie ultrasonore d'un plan coronal du cerveau d'un rat anesthésié pendant une stimulation des vibrisses ou une stimulation visuelle, et recevant une injection continue de microbulles (MBs) en intraveineuse. SC : Colliculus supérieur; S1BF : Cortex somatosensoriel, partie cortex en tonneau

Animaux	Séquences imagerie		Stimulation	
Rat (Sprague-Dawley) Anesthésie : IP metomidine et ketamine Procédures : - Craniotomie - Cathéter dans la veine jugulaire - Injection continue à 3,5mL/h de MBs (Sonovue) par la jugulaire		fUS		
	Sonde	Sonde linéaire 128 éléments 15,625MHz	Sonde linéaire 128 éléments 15,625MHz	Stimulation sensorielle : - Stimulation vibrisses (10Hz) - Stimulation visuelle : Flash LED à 3Hz Motif type : 30s repos 30s stimulation 10s repos Répétition : N= 20
	Acquisition	11 ondes planes (-10;2:10°) 25V PRF 5500Hz Blocs de 200 images Acquisition continue	5 ondes planes (-5/-2/0/2/5°) 8V PRF 5000Hz Blocs de 400 images Acquisition continue	
Traitement	Doppler de puissance par bloc de 200 images Cadence Doppler : 500Hz	Localisation super-résolue et tracking par blocs de 400 images Cadence : 1000Hz		

FIGURE 2.16 – Résumé des principaux paramètres du protocole expérimental.

Le protocole consiste à faire une première expérience de stimulation sensorielle suivie par imagerie fUS sans injection de microbulles pour choisir le plan d'imagerie et vérifier qu'une réponse fonctionnelle est bien enregistrée suite à la stimulation. Le même protocole de stimulation est ensuite utilisé en injectant en parallèle des microbulles dans la circulation sanguine pour réaliser un suivi par imagerie ULM. Le protocole détaillé est placé en annexe 2.10. Les paramètres d'importance sont résumés dans le tableau 2.16.

L'injection se fait de manière continue grâce à un pousse seringue. Cela permet d'obtenir un nombre stable de microbulles détectées au cours de l'acquisition (figure 2.17).

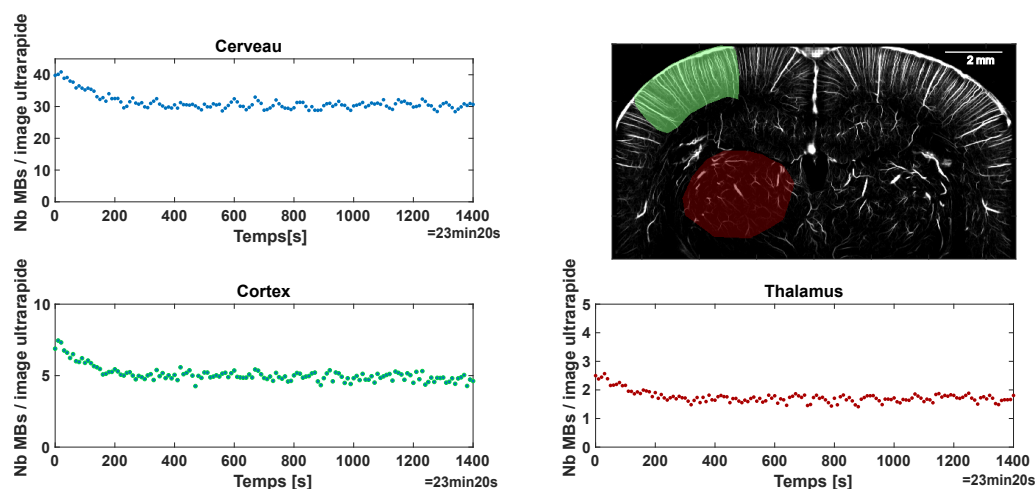


FIGURE 2.17 – Exemple de profil d'injection continue. Le nombre de MBs détectées sur chaque image ultrarapide sur tout le cerveau ou dans des régions d'intérêt, comme le cortex ou le thalamus, reste stable.

Stimulations sensorielles

La déflexion des vibrisses provoque un potentiel d'action dans des neurones sensoriels du nerf trigéminal, transmis au tronc cérébral, qui relaye ensuite l'information sensorielle jusqu'au thalamus (plus précisément dans le VPM : noyau thalamique ventro-postéro-médial). De là, des neurones thalamo-corticaux projettent dans le cortex en tonneau du cortex primaire somato-sensoriel (S1BF), figure 2.18A. Ces projections arrivent principalement dans la couche neuronale 4. Il existe une représentation somatotopique conservé dans le tronc cérébral, le thalamus puis le cortex. Dans le cortex, chaque vibrisse est associée à une colonne corticale, appelée tonneau.

Pour les stimulations visuelles, la lumière est d'abord collectée à la surface de la rétine de l'œil, l'information transite ensuite par le nerf optique jusqu'à plusieurs noyaux sous corticaux. Au niveau du chiasme optique, les deux nerfs optiques provenant de chaque œil se croisent de telle sorte que l'information qui arrive dans un hémisphère cérébral provient de l'œil contralatéral. Une partie des fibres des nerfs optiques arrive dans les Corps Géniculés Latéraux (LGN) qui pré-traitent l'information visuelle avant de l'envoyer au cortex visuel (avec la majorité des projections dans la couche neuronale 4). Les autres fibres aboutissent dans le Colliculus Supérieur (SC), figure 2.18B.

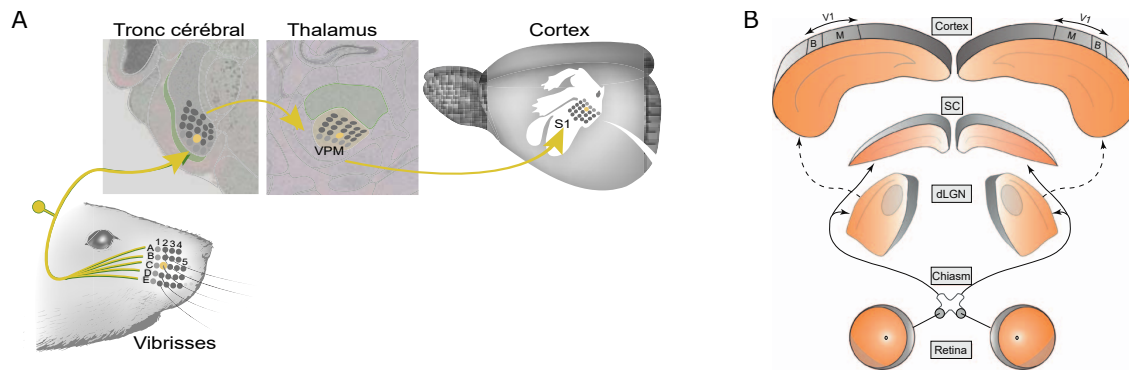


FIGURE 2.18 – (A) Voie somato-sensorielle pour la stimulation de vibrisses, adapté de STAIGER et PETERSEN, 2021. (B) Voie optique, d’après HUBERMAN et NIELL, 2011.

Pour les plans d’imagerie choisis, on s’attend à voir des activations, donc des augmentations du flux sanguin, dans le S1BF et le VPM pour les stimulations de vibrisses et le SC pour les stimulations visuelles.

2.5.2 Obtenir des données ULM dynamiques pour étudier une activité cérébrale : traitement des données

L’objectif est d’obtenir des données temporelles à partir des données ULM. Ainsi, au lieu d’accumuler les positions des microbulles de l’ensemble de l’acquisition et créer une seule carte ULM statique (représentant le nombre total de bulles passées dans chaque pixel pendant le temps total d’acquisition ou leur vitesse moyenne, figure 2.19), il s’agit d’utiliser une fenêtre glissante pour l’accumulation (de largeur Δt_f et de pas Δt_p) afin de construire une carte dynamique.

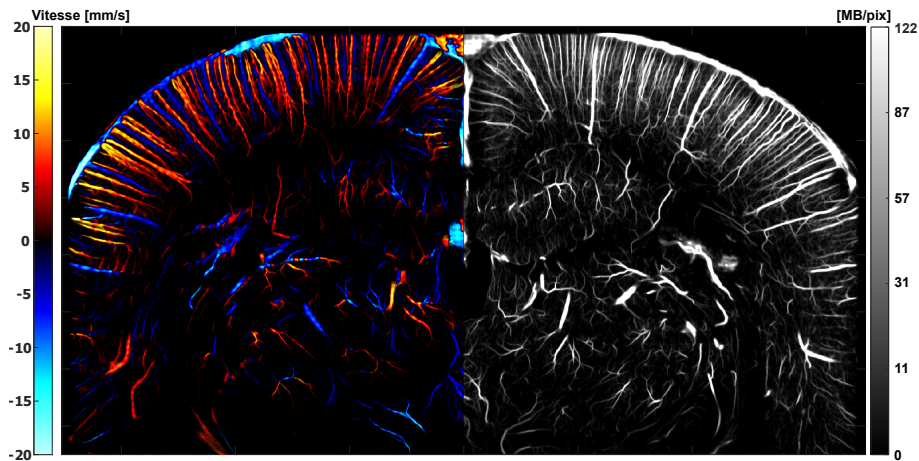


FIGURE 2.19 – La localisation et le traçage des microbulles sur toute l’acquisition permet de créer des cartes de la vascularisation en vitesse des microbulles (gauche) et en nombre de bulles (droite) pour 23 minutes d’acquisition à une résolution de $6.5 \mu\text{m}$.

Pour cela, on construit un premier groupe de cartes ULM dynamiques $MB^T(x,z,t)$ et $V^T(x,z,t)$

décrivant les cartes dynamiques en nombre de bulles et en vitesse respectivement. La valeur d'un pixel pour la matrice $MB^r(x,z,t)$ correspond au nombre de bulles qui ont traversé le pixel pendant la fenêtre temporelle centrée sur t et de largeur Δt_f $[t_i - \Delta t_f/2 : t_i + \Delta t_f/2]$, et le pixel de la matrice V^r correspond à leur vitesse moyenne (figure 2.20 gauche). Ces matrices sont sous la forme $M^r(N_x, N_z, N_t^r)$ où :

$$N_t^r = \frac{\Delta t_{acq}}{\Delta t_p} = \frac{N_{motif} * \Delta t_{motif}}{\Delta t_p} \quad (2.2)$$

Avec :

Δt_{acq} : durée totale de l'acquisition Δt_p : pas temporel de la fenêtre glissante
 Δt_f : largeur de la fenêtre glissante N_{motif} : nombre de répétitions du motif de stimulation
 Δt_{motif} : durée du motif de stimulation

On fera référence pour parler de ce premier groupe de matrices dynamiques $M^r(N_x, N_z, N_t^r)$ aux données ULM temporelles brutes.

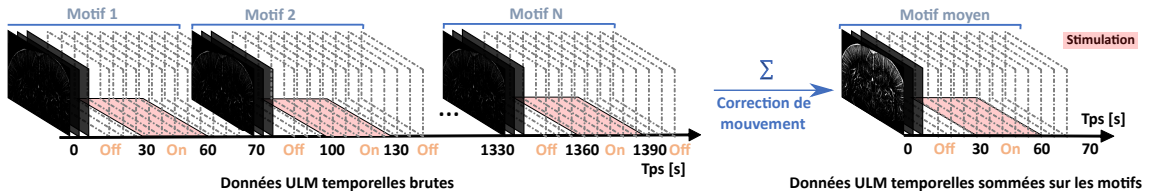


FIGURE 2.20 – Méthode de création des données ULM dynamiques. Un premier jeu de cartes 2D ULM dynamiques (appelées "Données ULM temporelles brutes") est créé en utilisant une fenêtre temporelle glissante pour accumuler les données de microbulles (gauche). Un deuxième jeu de cartes 2D ULM dynamiques représentatif du motif de stimulation (appelées "Données ULM temporelles sommées sur les motifs") est ensuite créé en concaténant les données de microbulles de fenêtres équivalentes vis-à-vis du motif de stimulation. Un recalage spatial est aussi appliqué entre ces deux étapes.

Typiquement, et dans un premier temps, une fenêtre glissante de 5 secondes avec un pas de 1 seconde entre chaque image est utilisé. Cette durée d'accumulation de 5 secondes est très courte par rapport aux temps d'accumulation traditionnellement utilisés en ULM pour reconstruire une image, ce qui conduit à des signaux qui peuvent être parcimonieux (on utilisera dans la suite le terme de sparse, emprunté de l'anglais), notamment dans les plus petits vaisseaux comme les artérioles de premier ou second ordres détectées en ULM. Les figures 2.21A et 2.22A montrent des exemples de signaux dans de tels vaisseaux, pour une expérience de stimulation des vibrisses. Le signal temporel du pixel β situé dans un vaisseau pial montre un nombre de bulles qui varie entre 0 et 10 pour chaque fenêtre de 5 secondes, et qui semble augmenter pendant les périodes de stimulation. Dans des plus petits vaisseaux où le flux est trop faible pour avoir une probabilité de détection d'une bulle supérieure à 1 en 5 secondes, le signal est sparse. C'est le cas pour le pixel γ situé dans une artériole pénétrante. C'est encore plus marqué pour les pixels δ et ϵ situés dans des branches d'ordre 1 d'une artériole pénétrante. On

peut cependant noter que les bulles dans ces pixels sont principalement détectés pendant des périodes de stimulation des vibrisses. La localisation des pixels est indiquée en figure 2.23.

À cette échelle microscopique, les problématiques de mouvement sont importantes et doivent être corrigées (elles seront de nouveau abordées dans ce chapitre en section 2.7.2). Ainsi, un recalage spatial permet de corriger la dérive due à des mouvements lents sur le temps d'acquisition total, qui dépasse les vingt minutes. Les signaux correspondant aux pixels β , δ , γ et ϵ après ce recalage sont montrés en figures 2.21B et 2.22B. Cette correction de mouvement peut aussi répartir une détection de bulle unique sur plusieurs pixels, ce qui conduit à des signaux temporels plus lisses.

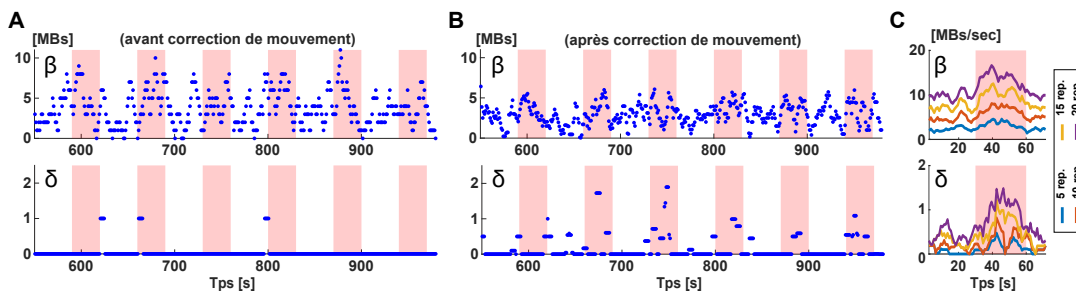


FIGURE 2.21 – (A) Profils temporels en nombre de MBs (données ULM temporelles brutes) pour un pixel dans un gros vaisseau de la pie-mère (pixel β , localisation en figure 2.23) et un pixel dans un petit vaisseau (pixel δ , 1^{er} embranchement depuis l'artériole pénétrante). (B) Profils temporels en nombre de MBs pour les mêmes pixels après recalage spatial. (C) Profils temporels en flux de microbulles pour les mêmes pixels après sommation sur les motifs de stimulation (données ULM temporelles sommées sur les motifs). Les profils sont donnés pour différents nombres de répétitions.

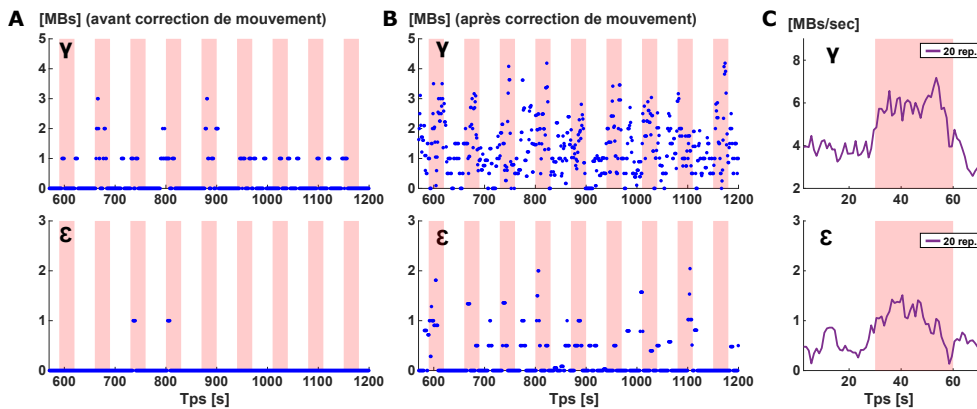


FIGURE 2.22 – Même analyse qu'en figure 2.21 pour le pixel γ dans une artériole pénétrante et le pixel ϵ , 1^{er} embranchement depuis l'artériole pénétrante. Le panel (C) est montré pour N=20 répétitions.

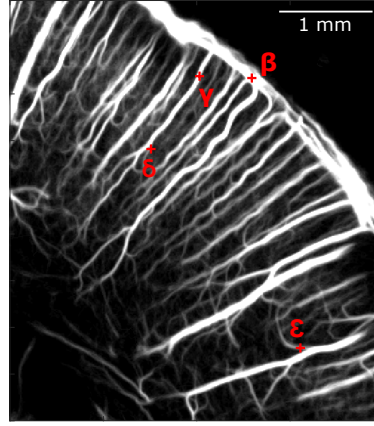


FIGURE 2.23 – Localisation des pixels β , δ , γ et ϵ sur une carte de vascularisation (carte ULM en nombre de MBs par pixel).

Pour obtenir des data non sparse et augmenter la sensibilité des signaux, l'idée est de tirer partie de la répétition du motif de stimulation pour combiner des points équivalents vis-à-vis de la stimulation dans chaque motif et créer un deuxième jeu de cartes dynamiques représentatives du motif de stimulation.

En pratique, à partir du premier jeu de données $M^r(x,z,t)$, on crée un deuxième jeu de données $M^s(x,z,t)$ (figure 2.20 droite) de dimension $(N_x * N_z * N_t^s)$ où $N_t^s = \frac{\Delta t_{motif}}{\Delta t_p}$, telle que, La matrice en nombre de bulles est donnée par :

$$MB^s(x, z, t) = \sum_{i=0}^{N_{motif}-1} MB^r(x, z, t + i * \Delta t_{motif}) \quad , \quad t < \Delta t_{motif} \quad (2.3)$$

et la matrice des vitesses $V^s(x,z,t)$ correspond à la vitesse moyenne de toutes les bulles passant par le pixel (x,z) pendant $[t+(i-1)*\Delta t_{motif} - \Delta t_f/2 : t+(i-1)*\Delta t_{motif} + \Delta t_f/2]$.

On peut aussi obtenir une matrice temporelle correspondant aux flux de microbulles en divisant par la largeur de la fenêtre :

$$MB^F(x, z, t) = \frac{1}{\Delta t_f} \sum_{i=0}^{N_{motif}-1} MB^r(x, z, t + i * \Delta t_{motif}) \quad , \quad t < \Delta t_{motif} \quad (2.4)$$

Pour parler de ce deuxième groupe de matrice $M^s(N_x, N_z, N_t^s)$ on fera référence aux données ULM temporelles sommées sur le motif.

La figure 2.21C représente les signaux temporels MB^F et V^s pour les pixels β , et δ pour un nombre de motifs croissant. Au fur et à mesure que le nombre de motifs augmente, la sensibilité augmente et le caractère parcimonieux diminue. Pour le pixel δ à 20 répétitions, le flux atteint ainsi 1.4 MB/s pendant la stimulation des vibrisses contre 0.4 MB/s en moyenne sur la ligne de base. Plus le pixel est dans un vaisseau avec un flux plus faible, et donc avec une probabilité de détection de microbulles faible, plus le nombre de répétitions nécessaire pour obtenir un signal non sparse est élevé. Les signaux équivalents pour les pixels γ et ϵ pour 20 répétitions

sont montrés en figure 2.22C.

Les précédentes figures ont montré les réponses sur des exemples dans des pixels uniques. On peut aussi s'intéresser au comportement moyen sur un ensemble de pixel. La figure 2.24 montre des signaux temporels moyennés sur trois catégories de pixels : les pixels appartenant à des vaisseaux de la pie-mère, les pixels appartenant à des vaisseaux pénétrants (artérioles ou veinules) et des pixels appartenant aux plus petits vaisseaux détectés en ULM, que l'on nomme vaisseaux intra-parenchymaux, et qui correspondent aux ordres 1 et 2 de branchement après l'artériole. On peut observer pour les trois catégories une augmentation du nombre de bulles pour chaque épisode de stimulation.

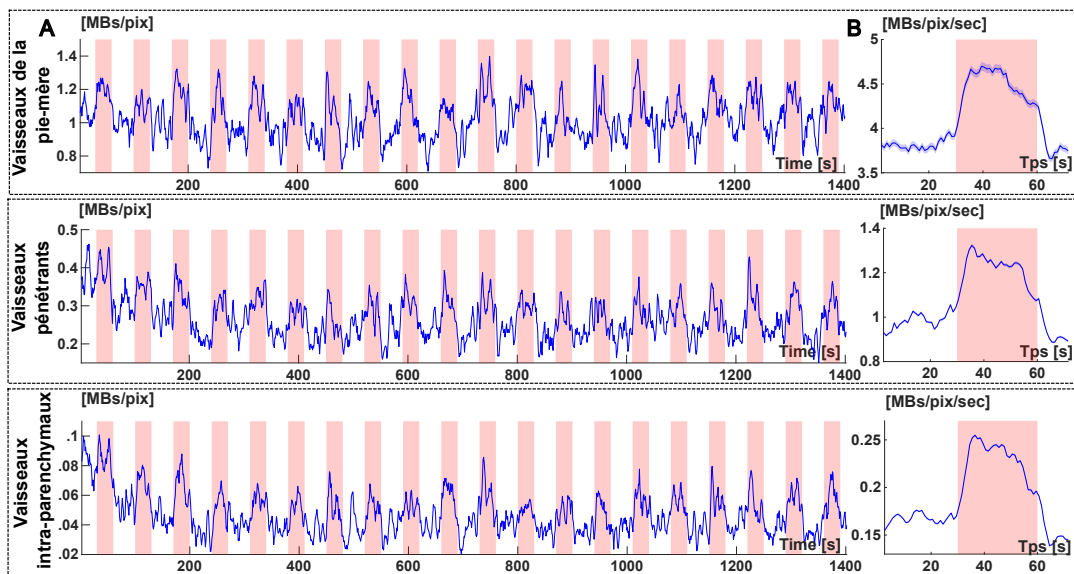


FIGURE 2.24 – (A) Profils temporels en nombre de MBs (données ULM temporelles brutes après correction de mouvement) moyennés spatialement sur des pixels de trois compartiments vasculaires différents : vaisseaux de la pie-mère, vaisseaux pénétrants et vaisseaux intra-parenchymaux (branches d'ordre 1 et supérieurs). (B) Profils temporels en flux de MBs correspondant aux données de (A) après sommation sur les motifs (données ULM temporelles sommées sur les motifs) pour N=20 stimulations.

2.6 Développement de l'imagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation Ultrasonore : imager sur le cerveau entier une hyperhémie fonctionnelle à une précision micrométrique

2.6.1 Cartes d'activation par analyse par corrélation

Maintenant que des données dynamiques en ULM ont pu être obtenues, l'objectif est d'imager la variation de ces signaux au cours du motif de stimulation. En particulier, on cherche à savoir s'il y a une modification dans le flux de bulles ou dans leur vitesse dans les zones associées à la stimulation des vibrisses, à savoir le S1BF et le VPM, pendant la stimulation. Une technique couramment utilisée en imagerie fonctionnelle (MACÉ et al., 2011) consiste à regarder la corrélation des signaux temporels avec le motif de stimulation, ce qui renseigne sur la ressemblance du signal temporel de chaque pixel avec le motif de stimulation.

En pratique, on calcule le coefficient de corrélation de Pearson entre le motif de stimulation $A(t)$ (créneau composé de 0 pour les périodes de repos et de 1 pour les périodes de stimulation) et la matrice $M^s(t)$ (correspondant à $MB^F(t)$ ou $V^s(t)$) :

$$c(x, z) = \frac{\sum_{k=1}^{N_i^s} \{(M^s(x, z, t_k) - \overline{M^s(x, z)}) \cdot (A(t_k) - \overline{A})\}}{\sqrt{\sum_{k=1}^{N_i^s} (M^s(x, z, t_k) - \overline{M^s(x, z)})^2} \cdot \sqrt{\sum_{k=1}^{N_i^s} (A(t_k) - \overline{A})^2}} \quad (2.5)$$

avec : \overline{X} : moyenne temporelle de X

L'image obtenue en figure 2.25 donne la carte de l'hyperhémie fonctionnelle à une résolution de $6.5 \mu\text{m}$ à l'échelle du cerveau entier, dans le cas d'une stimulation des vibrisses avec une injection continue de microbulles. L'activation dans le cortex somato-sensoriel en tonneau (S1BF) et dans le thalamus (VPM) est ainsi détectée.

Concrètement, cela signifie que le flux de microbulles augmente dans les régions du S1BF et du VPM avec la stimulation des vibrisses, et que les bulles vont plus vite dans ces vaisseaux pendant les périodes de stimulation.

Les résultats obtenus en utilisant la même analyse par corrélation mais sur les données d'imagerie fUS sans injection de microbulles confirment que l'activation a bien été identifiée dans les bonnes zones. La figure 2.26 compare ainsi les cartes obtenues en fUS et en fULM et permet d'apprécier le gain en résolution spatiale (gain d'un facteur 16).

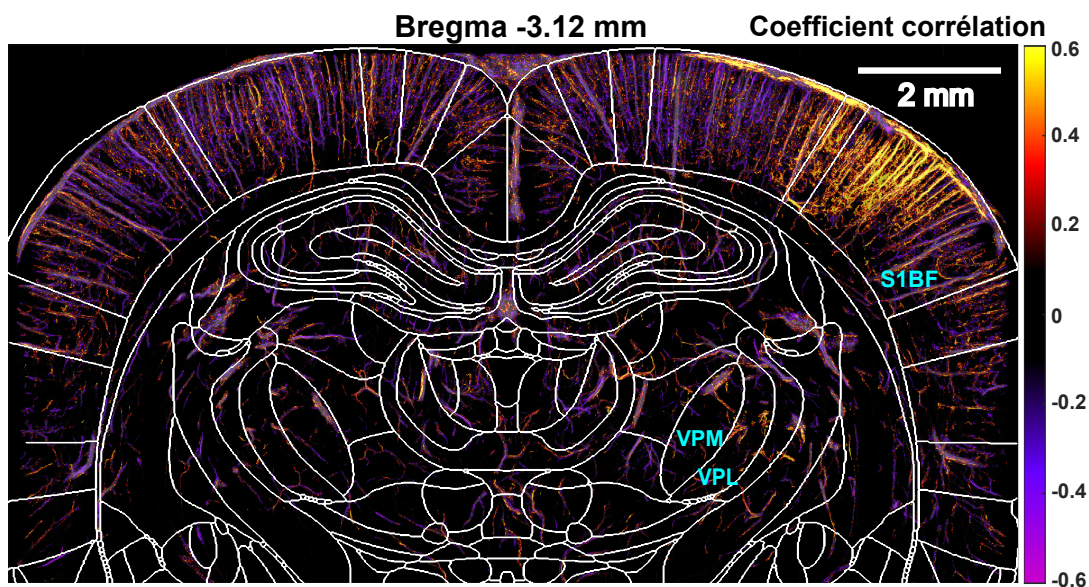


FIGURE 2.25 – Carte d’activation fonctionnelle obtenue par calcul du coefficient de corrélation de Pearson entre le motif de stimulation et le signal de flux de MBs. Superposition du plan à Bregma = -3.12 mm de l’atlas de rat (PAXINOS et WATSON, 2006) . S1BF : Cortex primaire sensoriel, cortex en tonneau. VPM/VPL : Noyau thalamique ventro-postero-medial/latéral.

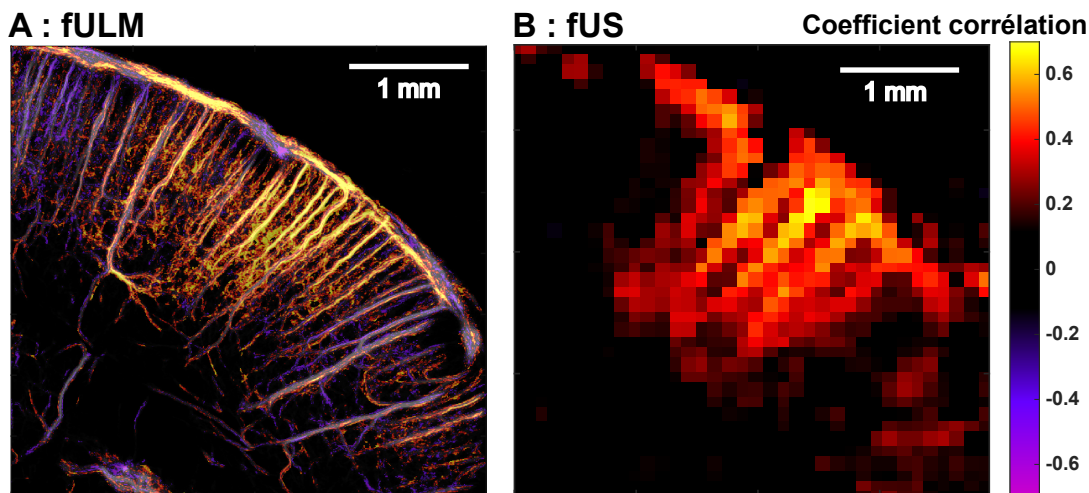


FIGURE 2.26 – Zoom sur le S1BF d’une carte d’activation fonctionnelle obtenue par fULM à gauche et par fUS à droite chez le même animal pour une expérience de stimulation des vibrisses. Cartes d’activation obtenues par analyse par corrélation.

2.6.2 Cartes d'activation par analyse par Décomposition en Valeurs Singulières

Si l'analyse par corrélation peut être une première méthode pour valider la possibilité de transformer l'ULM en une modalité d'imagerie fonctionnelle, elle ne donne pas de quantifications des variations en flux ou en vitesse pendant une hyperhémie fonctionnelle. Une autre méthode d'analyse des données fULM dynamiques a donc été développée. Elle repose sur l'utilisation d'une décomposition en valeurs singulières. On montre dans cette partie que cette analyse permet d'obtenir une imagerie quantitative de neuroimagerie fonctionnelle à une résolution de 6.5 μm sur le cerveau entier. L'intérêt de cette méthode est aussi sa robustesse vis-à-vis des données ULM qui peuvent être sparses ou présenter des variations liées à l'injection plutôt qu'à la stimulation. On verra ainsi qu'elle permet l'étude d'hyperhémies fonctionnelles dans des cas complexes comme l'utilisation de bolus pour l'injection ou la détection de motifs uniques de stimulation sans moyenner sur plusieurs essais.

2.6.2.1 Principe de la méthode

Le principe est d'appliquer une décomposition en valeurs singulières (SVD) aux données dynamiques ULM représentatives du motif $M^s(N_x, N_z, N_t)$ (que ce soit $MB^F(x,z,t)$ ou $V^s(x,z,t)$), préalablement réarrangées en une matrice spatio-temporelle 2D de Casaroti ($N_x * N_z, N_t$).

Cette SVD permet la décomposition suivante, basée sur la covariance :

$$M^s(x, z, t) = \sum_{i=1}^{N_t^s} \lambda_i U_i(x, z) V_i(t) \quad (2.6)$$

avec : λ_i les valeurs singulières, $U_i(N_x * N_z, N_x * N_z)$ les vecteurs singuliers spatiaux et $V_i(N_t^s, N_t^s)$ les vecteurs singuliers temporels. Les vecteurs U_i et V_i correspondent aux vecteurs propres respectifs des matrices de covariance $M^s M^{s*}$ et $M^{s*} M^s$, * désignant la transposée conjuguée.

En réarrangeant les vecteurs singuliers spatiaux sous forme d'images $I_i(N_x, N_z)$, on peut écrire :

$$M^s(x, z, t) = \sum_{i=1}^{N_t^s} \lambda_i I_i(x, z) V_i(t) \quad (2.7)$$

Ainsi la matrice temporelle initiale peut être vue comme une somme d'images (correspondant à chaque I_i , ou chaque U_i), chacune indépendamment modulée par le signal temporel respectif V_i . Chaque pixel de l'image I_i (correspondant à U_i) se comporte en suivant les fluctuations temporelles données par V_i . λ_i représente le poids du mode dans le signal total. Les modes sont rangés par λ_i décroissants.

L'application de la SVD aux matrices temporelles MB^F et V^s permet d'isoler les fluctuations dues à l'activation, i.e. l'hyperhémie fonctionnelle, dans un mode singulier particulier, et ainsi

de les séparer des fluctuations causées pas d'autres phénomènes, qu'ils soient physiologiques ou liés à l'injection de microbulles et à sa nature probabiliste.

Le produit scalaire p_i calculé entre tous les vecteurs singuliers temporels et le motif de stimulation permet de déterminer dans quel mode l'hyperhémie fonctionnelle a été isolée, en choisissant le mode pour lequel la valeur de ce produit scalaire est la plus élevée.

$$p_i = \frac{A(t) - \bar{A}}{\sqrt{\sum_{k=1}^{N_t^s} (A(t_k) - \bar{A})^2}} * V_i(t) \quad (2.8)$$

Un des avantages majeurs de cette analyse est qu'elle permet d'obtenir des cartes quantitatives qui nous renseignent sur l'augmentation du nombre de microbulles par pixel si la SVD est appliquée à la matrice MB^F , ou sur l'augmentation de vitesse si elle est appliquée à la matrice V^s . En effet de telle cartes quantitatives peuvent être obtenues grâce aux formules suivantes :

$$\Delta MB(x, z) = \lambda_i U_{i=i_{stim}}(x, z) \left\{ \sum_{t_j \in stim} V_{i=i_{stim}}(t_j) - \sum_{t_j \in baseline} V_{i=i_{stim}}(t_j) \right\} \quad (2.9)$$

$$\Delta V(x, z) = \lambda_i U_{i=i_{stim}}(x, z) \left\{ \overline{V_{i=i_{stim}}(t_j)}_{t_j \in stim} - \overline{V_{i=i_{stim}}(t_j)}_{t_j \in baseline} \right\} \quad (2.10)$$

Les cartes de ligne de base sont obtenues en calculant :

$$MB_{baseline}(x, z) = \sum_{i=1}^{i < i_{stim}} \lambda_i U_i(x, z) \sum_{t_j \in baseline} V_i(t_j) \quad (2.11)$$

$$MB_{baseline}(x, z) = \overline{\lambda_i U_i(x, z) V_i(t_j)}_{t_j \in baseline, i < i_{stim}} \quad (2.12)$$

2.6.2.2 Résultats

Prenons un exemple en appliquant cette analyse par SVD aux données utilisées pour l'analyse en corrélation exposée en section 2.6.1 (obtenue en utilisant une injection continue de microbulles et une stimulation des vibrisses). Les résultats sont présentés en figure 2.27. La SVD donne pour ce jeu de données la ligne de base dans le mode 1, alors que l'hyperhémie fonctionnelle est donnée par le mode 2. On vérifie en effet que le deuxième vecteur singulier temporel suit le motif de stimulation.

La carte d'activation exposée en figure 2.27 montre qu'il a ainsi été développé, grâce à un protocole expérimental dédié, une méthode de traitement des données permettant de créer des données ULM dynamiques et une méthode d'analyse dédiée utilisant la SVD, une modalité d'imagerie fonctionnelle permettant d'obtenir des cartes quantitatives de l'hyperhémie sur

l'ensemble d'un cerveau de rongeur et avec une résolution de 6.5 μm .

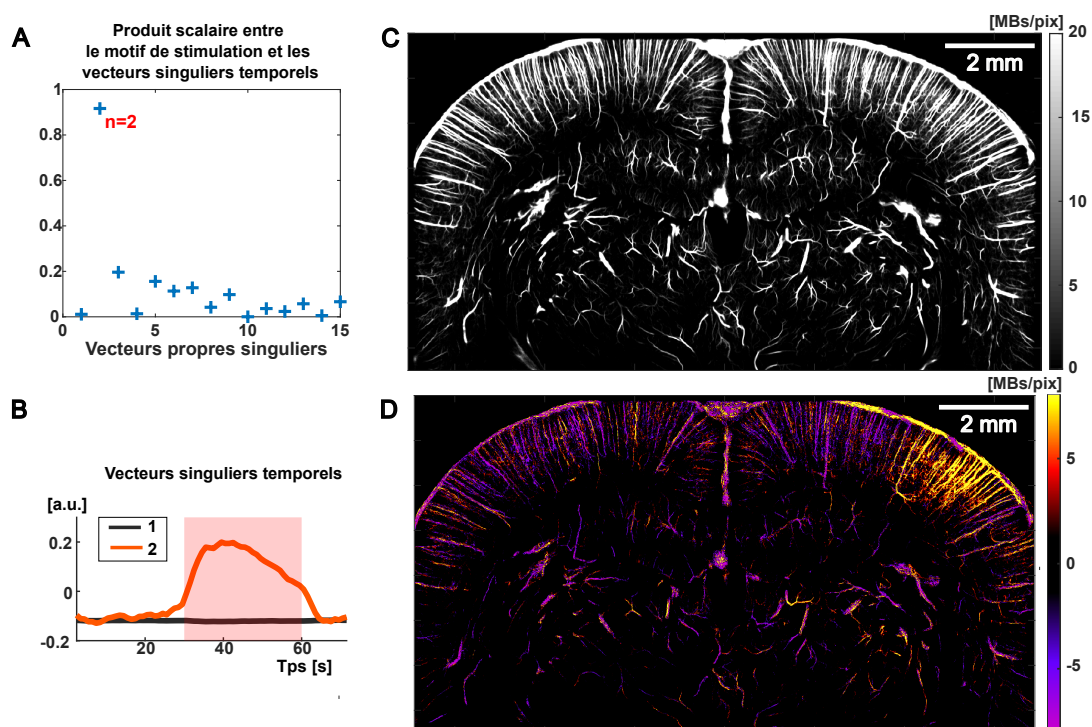


FIGURE 2.27 – Cartes d'activation fonctionnelle par analyse SVD. La SVD est appliquée sur le signal de flux de MBs (données ULM temporelles sommées sur les motifs de stimulation) pendant une expérience de stimulation des vibrisses. (A) Produit scalaire entre le motif de stimulation et les 15 premiers vecteurs temporels : sélection automatique du mode singulier contenant l'activité cérébrale associée à la stimulation (N=2). (B) Vecteurs singuliers temporels correspondant à la ligne de base (N=1) et à la stimulation (N=2). (C-D) Vecteurs singuliers spatiaux correspondant à la ligne de base (C, N=1) et à la stimulation (D, N=2).

Étude de l'influence du nombre de répétitions

Il est intéressant d'étudier la capacité de la SVD à réaliser une détection fine des signaux associés au stimulus, dans l'espace et dans le temps, en fonction du nombre de répétition du motif de stimulation. Les figures 2.28 et 2.29 nous montrent que si pour moins de 5 stimuli, le traitement par SVD n'est pas capable de détecter une activation, il permet cependant de converger vers une solution spatio-temporelle stable après 10 répétitions.

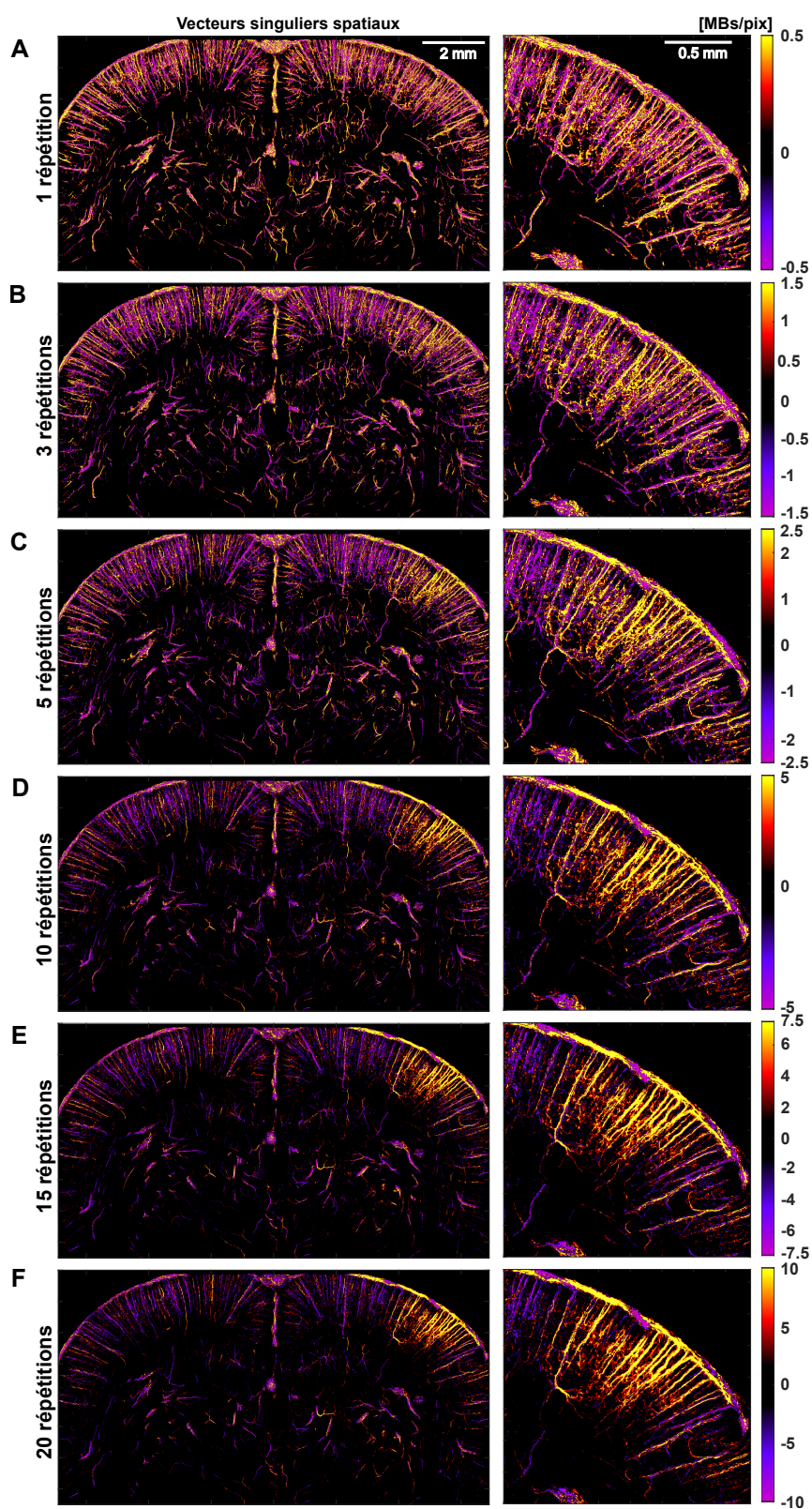


FIGURE 2.28 – fULM par analyse SVD pour un nombre croissant de répétitions du motif de stimulation. Les différents panels (A-F) montrent les vecteurs singuliers spatiaux associés à la stimulation de $N = 1$ (A) à $N = 20$ (F) répétitions. On choisit le vecteur spatial associé à la stimulation comme celui dont le produit scalaire avec le motif de stimulation est le plus élevé. Gauche : cerveau entier, droite : zoom sur le S1BF.

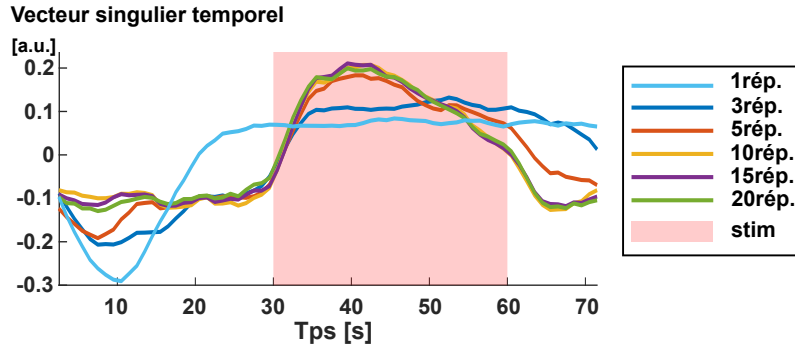


FIGURE 2.29 – fULM par analyse SVD pour un nombre croissant de répétitions du motif de stimulation. Vecteurs singuliers temporels associés à la stimulation de N=1(A) à N=20(F) répétitions. Vecteurs singuliers temporels correspondant aux vecteurs singuliers spatiaux montrés en 2.28.

Capacité à détecter les motifs uniques de stimulation

Pour des activations suffisamment fortes, la SVD peut même être appliquée aux données ULM dynamiques brutes sans sommation sur tous les motifs. La SVD parvient encore une fois à isoler l'hyperhémie fonctionnelle dans un mode.

Si l'on reprend les résultats montrés en figure 2.24 (section 2.5.2), on observe que même dans les plus petits vaisseaux l'activation est détectable pour chaque motif de stimulation. La SVD est aidée par le grand nombre d'échantillons spatio-temporels. Même si le flux est trop faible dans un pixel pour détecter l'augmentation à chaque pas temporel concerné, la SVD lui attribue tout de même le motif de stimulation grâce à la covariance forte qu'il montre avec d'autres pixels. La variance des données peut être expliquée par un sous-espace de vecteurs singuliers de dimension inférieure au rang de la matrice de départ. On note d'ailleurs la décroissance très rapide des valeurs singulières (figure 2.31).

Reprenons donc les données correspondant à la même expérience que celles utilisées jusqu'à maintenant mais appliquons la SVD sur la matrice MB^r et non pas la matrice MB^F . L'analyse par SVD parvient encore à isoler l'activité cérébrale liée à la stimulation, cette fois-ci dans le mode 4. La SVD parvient ainsi à donner une information locale même dans des pixels contenant un nombre extrêmement faible de détections. La carte d'activation obtenue est cohérente vis-à-vis de celle obtenue pour les données sommées sur les motifs, mais cette analyse permet d'extraire des informations supplémentaires puisque chaque stimulation peut conduire à des réponses légèrement différentes. La carte montrée en figure 2.30B (droite) a été obtenue suivant la formule :

$$\Delta MB_{ST}(x, z) = \lambda_i U_{i=i_{stim}}(x, z) \sum_{k=1}^{N_{stim}} \left\{ \sum_j^{t_j \in stim_k} V_{i=i_{stim}}(t_j) - \sum_j^{t_j \in baseline_k} V_{i=i_{stim}}(t_j) \right\} \quad (2.13)$$

Il s'agit de la réponse sur toutes les stimulations mais on pourrait aussi décider d'extraire la réponse de l'un ou l'autre des motifs de l'expérience.

Si l'on s'intéresse aux modes précédents le mode 4, ils décrivent une fois encore l'injection.

Ainsi, on peut reconnaître la petite décroissance du nombre de bulles injectées en début d'expérience (figure 2.17), qui a été isolée dans un mode séparé et ne perturbe donc plus le mode associé à la stimulation.

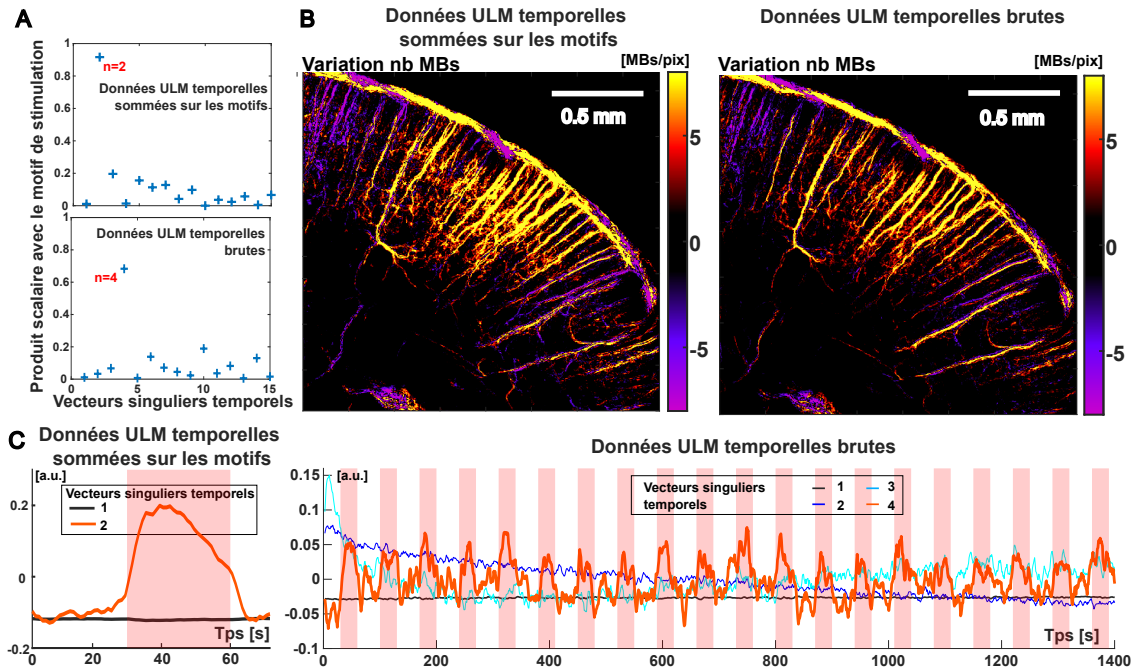


FIGURE 2.30 – Comparaison de l'application de la SVD aux données sommées sur les motifs et aux données brutes. (A) Produit scalaire entre le motif de stimulation et les 15 premiers vecteurs temporels. Sélection automatique du mode singulier contenant l'activité cérébrale associée à la stimulation : $N=2$ pour les données sommées sur les motifs et $N=4$ pour les données temporelles brutes. (B) Vecteurs singuliers spatiaux associés à la stimulation, zoom sur le S1BF : U_2 pour les données sommées sur les motifs et U_4 pour les données temporelles brutes. (C) Vecteurs singuliers temporels associés à la stimulation : V_2 pour les données sommées sur les motifs et V_4 pour les données temporelles brutes.

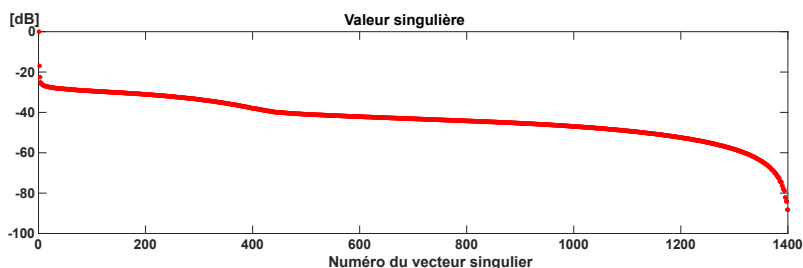


FIGURE 2.31 – Valeurs singulières de la SVD appliquée aux données ULM temporelles brutes (sans sommation sur les motifs). Elles sont exprimées en dB par rapport à la valeur de la première valeur singulière (la plus élevée).

Conditions expérimentales plus exigeantes : cas des injections de MBs par bolus

Le protocole décrit jusqu'à présent prévoyait une injection continue de microbulles, pour

essayer de limiter le plus possible les variations de concentration en microbulles qui pourraient masquer les augmentations pouvant être attribuées à des stimulations sensorielles. Cependant il n'est pas toujours aisé de maintenir une perfusion stable de microbulles, et beaucoup utilisent des injections de microbulles par bolus pour obtenir des images en ULM.

Ici, on décide de répéter la même expérience, sur le même rat et dans le même plan d'imagerie avec le même protocole de stimulation, en utilisant soit une injection continue soit une injection par bolus (figure 2.32). Cette expérience montre la robustesse de l'analyse par SVD qui permet de discriminer les variations en nombre de microbulles dues au bolus de celles dues aux stimulations en isolant la ligne de base, le motif d'injection et le signal d'activation dans des modes différents : le premier, le deuxième et le troisième en l'occurrence. L'analyse par SVD appliquée à l'expérience en injection continue isole la ligne de base et le signal d'activation dans le mode 1 et le mode 2 respectivement. De plus, les deux cartes donnent des valeurs d'activation similaires, sachant qu'il s'agit de deux expériences pratiquées sur le même rat mais l'une après l'autre donc la réponse physiologique a pu aussi varier entre les deux expériences.

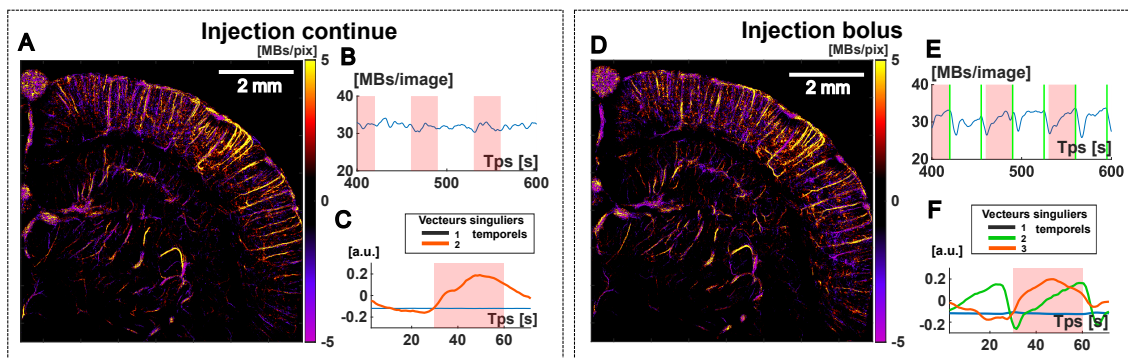


FIGURE 2.32 – fULM par analyse SVD pour une injection continue (B) versus une injection par bolus (E). Le même protocole de stimulation est appliqué chez le même rat dans le même plan d'imagerie. (A&D) Vecteurs singuliers spatiaux correspondant à la stimulation. (C&F) Vecteurs singuliers temporels correspondant à la ligne de base, l'injection et la stimulation.

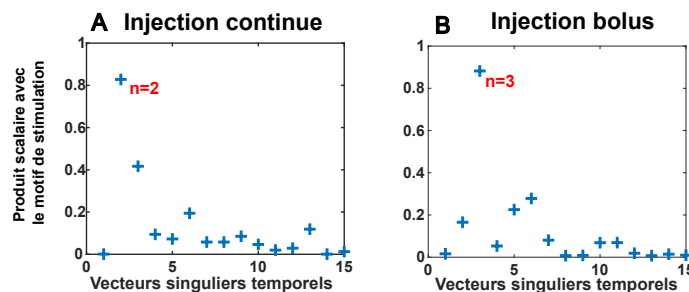


FIGURE 2.33 – Produit scalaire entre le motif de stimulation et les 15 premiers vecteurs temporels. sélection automatique du mode singulier contenant l'activité cérébrale associée à la stimulation : $N = 2$ pour l'injection continue et $N = 3$ pour l'injection par bolus.

La robustesse de l'analyse SVD, notamment face au bruit apporté par l'injection des

microbulles, sera de nouveau illustrée dans ce chapitre (section 2.7.1) quand nous discuterons de la résolution temporelle du fULM.

2.6.3 Comparaison des deux méthodes d'analyse

L'analyse par corrélation est une méthode d'analyse qui est quantitative vis-à-vis de la ressemblance des profils temporels avec les motifs d'activation mais qui ne donne pas d'information quantitative sur les variations des paramètres d'intérêt, comme le flux de microbulles ou leur vitesse, ce que permet a contrario l'analyse par SVD.

L'analyse par corrélation est sensible au bruit d'injection, que ce soit dans le cas de variations fortes, comme par exemple pour une injection de microbulles par bolus, ou dans le cas des fluctuations au cours d'une injection continue si la fenêtre temporelle d'analyse est assez faible. L'analyse par SVD, par sa capacité à isoler le bruit d'injection dans des modes séparés, apparaît comme plus robuste pour traiter les données fULM, avec la nature probabiliste de l'injection. Nous y reviendrons d'ailleurs dans le paragraphe suivant (section 2.7.1) en montrant que l'analyse par SVD permet d'avoir une réponse robuste même si l'on réduit la fenêtre temporelle utilisée pour accumuler les données, et donc d'atteindre une meilleure résolution temporelle.

Dans certains cas, l'analyse par SVD peut être complètement non supervisée, comme dans le cas présentée en 2.6.2.2 où elle est appliquée directement aux données dynamiques ULM brutes sans sommation sur les motifs et donc sans aucun a priori sur le motif de stimulation.

Une limitation de l'analyse par SVD est cependant qu'elle extrait l'activation dans un mode séparé, et donc attribue à tous les pixels le même comportement temporel dicté par le vecteur singulier temporel correspondant. Dans le cas où la fenêtre temporelle est assez large, il apparaît comme normal que tous les pixels se comportent avec le même profil temporel. Cependant si l'on veut raffiner l'analyse temporelle, les dynamiques notamment au début de la stimulation et pour le retour à la ligne de base varient potentiellement d'un vaisseau à un autre. Le profil général va être extrait dans le mode associé à l'activation, mais les modulations de ce signal pour chaque pixel risquent d'être réparties dans les modes suivants, et il peut être compliqué de les reconnaître.

2.7 Caractérisation de la technique d'imagerie

2.7.1 Résolution temporelle

Pour expliquer la méthode, le choix a été fait de présenter tous les résultats précédents avec chaque image ULM de la matrice temporelle créée sur un temps d'accumulation de 100 secondes. Il s'agit en effet d'une durée d'accumulation typiquement utilisée dans la littérature et qui permet d'obtenir une bonne sensibilité même pour des vaisseaux entre 5 et 10 μm (HINGOT, ERRICO, TANTER et al., 2017). On choisit donc la largeur de la fenêtre glissante telle que cette largeur multipliée par le nombre de stimulations donne environ 100 secondes. Pour un nombre de motifs de stimulation $N = 20$, cela implique d'utiliser une largeur de fenêtre de 5 secondes.

La dimension de la fenêtre glissante peut cependant être adaptée en fonction de l'analyse que l'on souhaite faire, ou du nombre de répétitions utilisées (plus ce nombre est élevé, plus la fenêtre peut être petite) pour pouvoir faire des analyses temporelles plus fines par exemple. Plus le temps d'accumulation pour créer une image est petit, plus le côté probabiliste de la répartition des bulles se fait sentir. Là encore, l'analyse par SVD montre sa robustesse face à ce bruit lié à l'injection de microbulles.

Les cartes d'activation obtenues pour trois fenêtres temporelles différentes illustrent cette possibilité (figure 2.34). Si les cartes de corrélation offrent de bons résultats pour la fenêtre de 5 s, car le bruit lié à l'injection est très lissé avec une fenêtre aussi large, les coefficients diminuent pour des fenêtres plus courtes car la ressemblance avec le motif de stimulation est dégradée par le bruit d'injection. La stabilité des cartes même avec des fenêtres beaucoup plus petites est en revanche maintenue avec l'analyse par SVD. On remarque la stabilité des valeurs quantitatives obtenues par SVD, illustré sur le pixel en vert, alors qu les valeurs de corrélation s'effondrent.

Le risque en diminuant trop la fenêtre temporelle est de perdre la sensibilité aux petits flux, mais l'analyse par SVD semble maintenir les performances pour les plus gros vaisseaux.

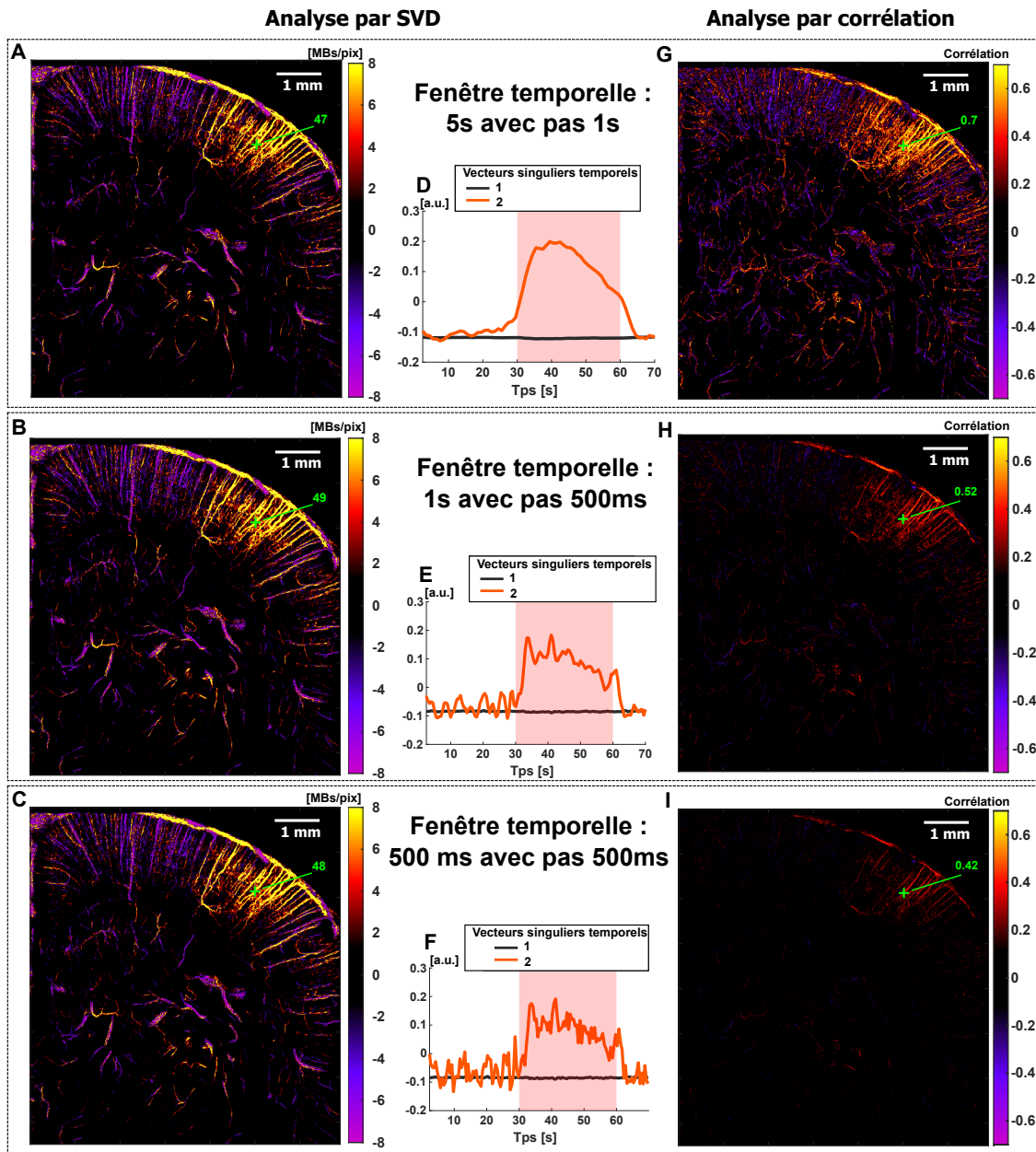


FIGURE 2.34 – Résolution temporelle, analyse par SVD versus analyse par corrélation. (A-C) SVD appliquée au signal de flux de MBs. Vecteurs singuliers spatiaux (gauche) associés à la stimulation pour différentes résolutions temporelles (i.e. dimension de fenêtre glissante) : (A) Fenêtre de 5 s avec un pas de 1 s (B) Fenêtre de 1s avec un pas de 500 ms (C) Fenêtre de 500 ms avec un pas de 500 ms. (D-F) Vecteurs singuliers temporels correspondants. (G-I) Résultats pour la même expérience en utilisant l’analyse par corrélation : coefficient de corrélation de Pearson calculé entre le motif de stimulation et le signal de flux de MBs.

2.7.2 Résolution spatiale et correction du mouvement

Les données de fULM ont été reconstruites sur une grille avec des pixels de taille $6.5 \mu\text{m}$ ($[6.875 \ 6.25]$ correspondant à $[\text{pitch}/16 \ \lambda/16]$, où pitch désigne la largeur inter-élément de la barrette échographique, et λ la longueur d'onde des ondes ultrasonores). Il s'agit ici de vérifier que la résolution spatiale de notre méthode d'imagerie atteint bien de $6.5 \mu\text{m}$. En particulier, avec de telles résolutions, les problématiques de correction de mouvement deviennent cruciales.

Les principales sources de mouvement sont la respiration et le cycle cardiaque. Ces pulsatilités cardiaque et respiratoire peuvent être estimées en utilisant des techniques de corrélations croisées, comme décrites dans KASAI et al., 1985. En bref, le déplacement axial (en z) entre deux images est estimé en multipliant le signal IQ d'un pixel dans la première image par le signal IQ conjugué du même pixel dans l'image suivante. Au moment de la systole pour le cycle cardiaque ou de l'inspiration pour le cycle respiratoire, ces déplacements atteignent un maximum.

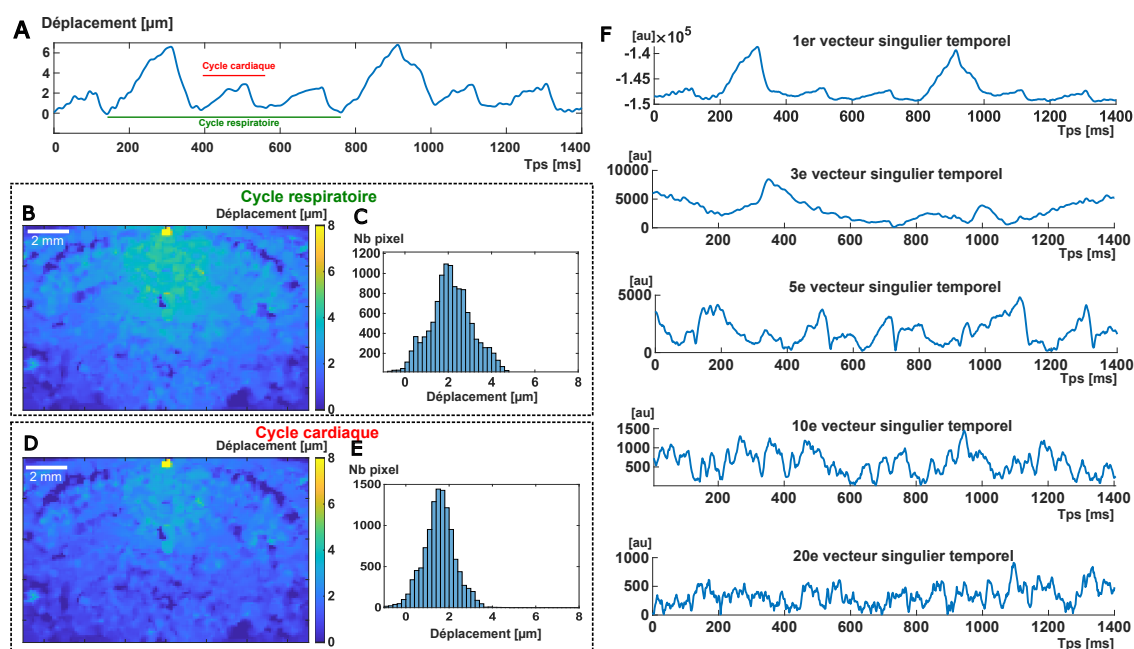


FIGURE 2.35 – Estimation du mouvement de la pulsatilité cardiaque et respiratoire. (A) Le déplacement du tissu selon l'axe z moyenné sur les pixels de l'image permet d'identifier le cycle cardiaque (environ 180 ms soit 330 bpm) et le cycle respiratoire (environ 620 ms soit 97 bpm). Ce déplacement a été évalué par autocorrélation sur les données IQ brutes. (B-E) Déplacement moyen du tissu sur un cycle respiratoire (B-C) et cardiaque (D-E) évalué en chaque pixel, représenté sous forme de carte (B&D) ou d'histogramme (C&E). (F) Vecteurs singuliers temporels ($i = 1, 3, 5, 10, 20$) multipliés respectivement par chaque valeur singulière de la décomposition par valeurs singulières appliquées aux mêmes données IQ qu'en (A).

Sur la figure 2.35A qui représente le déplacement moyen sur l'image pendant 1 400 secondes, le cycle cardiaque et le cycle respiratoire peuvent être identifiés. Le cycle respiratoire

de 620 ms (97 bpm) et le cycle cardiaque 180 ms (330 bpm). Un rat présente généralement un rythme respiratoire qui se situe entre 60 et 110 bpm et un rythme cardiaque entre 300 et 400 bpm.

La carte des déplacements et les valeurs pour chaque pixel présentées sous forme d'histogramme (figure 2.35B-E) indiquent que la pulsativité introduit un artefact de mouvement moyen de $2.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$ pour la respiration et de $1.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$ pour le cardiaque sur l'axe z. On peut se rendre compte ici que le mouvement est plus faible que la taille des pixels choisie pour la reconstruction des données fULM. Le mouvement ne peut être déterminé que selon l'axe z avec cette technique, cependant le déplacement selon x risque d'être du même ordre de grandeur, voire inférieur, puisque la craniotomie au dessus du crâne offre plus de possibilités à un mouvement selon z.

Il est aussi à noter qu'une partie de ces mouvements est corrigée pendant l'opération de filtrage SVD appliquée sur les IQs au début de l'algorithme d'ULM, pour enlever le signal du tissu. En effet si l'on regarde les premiers modes temporels de la SVD des mêmes IQs que ceux utilisés pour l'analyse par autocorrélation, on reconnaît la pulsativité tissulaire dans le mode 1 de la SVD (figure 2.35F). Or les dix premiers modes sont retirés pour filtrer le signal du tissu et garder le signal des bulles, ce qui permet une correction au moins partielle de ces artefacts de mouvement.

Pour prendre en compte des mouvements sur des échelles de temps beaucoup plus lentes que l'échelle temporelle cardiaque ou respiratoire, comme une dérive qui peut avoir lieu sur des temps d'expérimentation longs, parfois supérieurs à 20 minutes, une opération de recalage spatiale (déjà discuté en 2.5.2) est ajoutée. Il s'agit d'un recalage basé sur l'intensité, effectuée sur des cartes ULM en nombre de bulles calculées toutes les dix secondes.

Maintenant que les sources potentielles de mouvement ont été identifiées, quantifiées et au moins partiellement corrigées, il s'agit de vérifier que la résolution de $6.5 \mu\text{m}$ est atteinte pour les données fULM obtenues.

Pour cela, en suivant la méthode utilisée par ERRICO et al., 2015 et DEMENÉ et al., 2021, la résolution spatiale est évaluée en quantifiant la distribution statistique des vitesses pour une population de microbulles détectées dans un pixel unique de taille ($6.875 \times 6.25 \mu\text{m}$) et de la comparer à la distribution dans un pixel voisin d'un profil transversal de vaisseau et vérifier que les informations sont bien différentes (profil de vitesse de type Poiseuille). Contrairement à Errico et al. on n'utilise pas toute l'acquisition mais les données correspondant à un point temporel de nos matrices MB^s et V^s pour vérifier qu'on a cette résolution pour les données ULM dynamiques. Les distributions pour deux profils, un dans le cortex et un plus profondément dans le thalamus (figure 2.36) montrent qu'on peut mesurer des distributions statistiquement différentes pour deux pixels de $6.5 \mu\text{m}$ voisins.

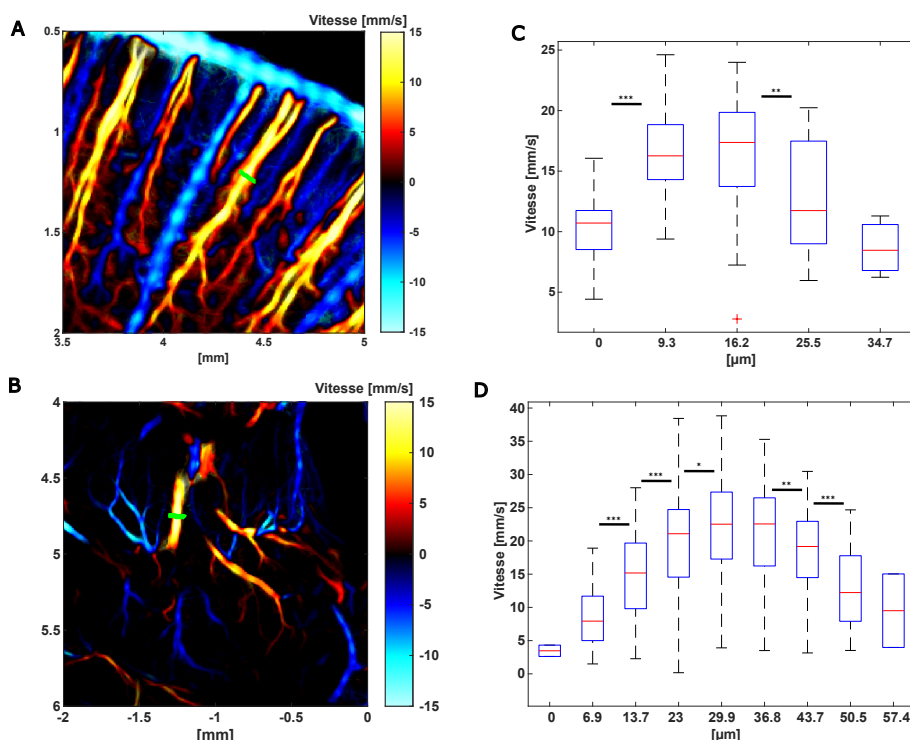


FIGURE 2.36 – Quantification de la résolution spatiale. (A-B) Profils transversaux de deux vaisseaux (dans le cortex (A) et dans le thalamus (B)) choisis pour la quantification, tracés sur une carte en vitesse signée (selon l'axe z) de la vascularisation. (C-D) Profils de vitesse pour les profils montrés en (A-B) respectivement. Les vitesses des MBs pour chaque point temporel des données ULM temporelles sommées sur les motifs sont rassemblées en groupe correspondant à chaque pixel de 6.5 µm (représenté par chaque boîte). La marque centrale des boîtes représente la médiane et les extrémités le 25^e et 75^e centiles. Les valeurs p d'un t-test entre chaque pixel voisin sont indiquées par : *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Le nombre d'échantillons pour chaque groupe de la gauche vers la droite est : (C) : 11, 27, 26, 17, 3 et (D) : 2, 47, 96, 179, 223, 194, 135, 50, 2.

2.7.3 Sensibilité

Comme montré en figure 2.37, la sensibilité de l'ULM aux petits flux est élevée même en profondeur, avec la détection de flux allant jusqu'au mm/s. Ces vitesses correspondent à des vaisseaux de l'ordre de la dizaine de microns (PIECHNIK, CHIARELLI et JEZZARD, 2008). Ces petits flux correspondent en particulier aux bifurcations d'ordre 1 et 2, comme on le verra en section 3.13.2.

Estimer la sensibilité de données ULM consiste à déterminer la taille de vaisseau minimale (ou plutôt le flux minimal) qui est entièrement représentée sur une carte ULM. Cette sensibilité dépend du temps d'acquisition. Estimer la sensibilité de données fULM consiste à déterminer si une variation pendant une stimulation est détectable. Pour un temps d'acquisition fixé, cette sensibilité dépend de la localisation du pixel.

En effet, comme expliqué en section 2.5.2, selon les pixels, le signal sera sparse ou non et permettra donc un échantillonnage correct ou non de la réponse vasculaire. Si le pixel est dans un vaisseau suffisamment gros (artériole pénétrante) de diamètre compris entre 30 et 60 μm , plusieurs microbulles peuvent être détectées chaque seconde, ce qui conduit à un SNR élevé. Un tel SNR permet par exemple de réaliser des mesures sur chaque essai unique (exemple du pixel β en figure 2.21). Si le pixel se situe dans un pré-capillaire, l'accumulation sur plusieurs motifs est nécessaire mais permet finalement d'arriver à une augmentation du nombre de bulles qui dépasse de plusieurs facteurs la déviation standard sur la ligne de base. Par exemple, le rapport augmentation du nombre de bulle / déviation standard atteint 5.2 pour le pixel δ et 4.1 pour le pixel γ . Le SNR est donc compliqué à estimer puisqu'il dépend de la localisation du pixel.

Parallèlement, pour obtenir de très bons SNR, il est possible de moyennner les réponses sur plusieurs pixels voisins, le nombre de pixels étant très élevé à ces résolutions micrométriques. On moyenne sur plusieurs pixels, mais en exploitant la résolution micrométrique du fULM pour associer des pixels avec une interprétation physiologique. C'est ce qui a pu être fait par exemple en figure 2.24 pour laquelle les pixels ont été séparés en trois catégories de vaisseaux (vaisseaux de la pie-mère, pénétrants et intra-parenchymaux). Cela sera de nouveau exploité en section 3.13.1 du chapitre 3 pour l'analyse par compartiments vasculaires.

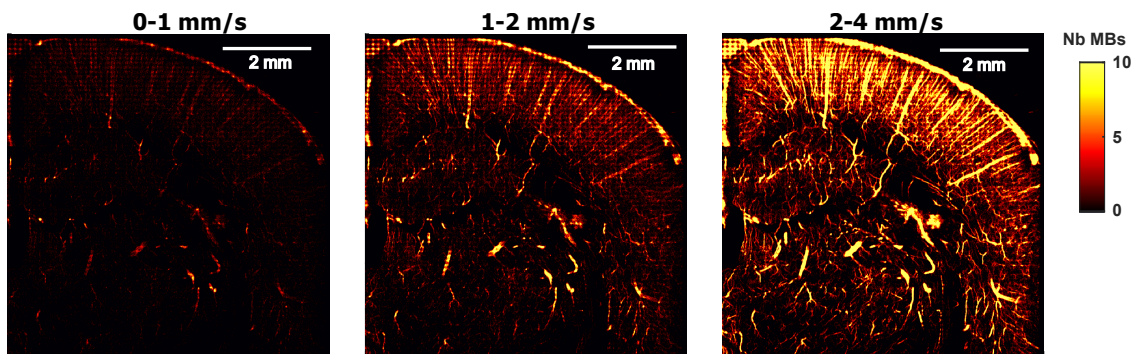


FIGURE 2.37 – Carte en nombre de bulles pour des bulles appartenant à trois intervalles de vitesse différentes.

2.8 Limites et pistes d'améliorations

2.8.1 Correction de mouvement

Des corrections plus fines des artefacts de mouvements pourraient être mises en place. En effet, lorsque l'on descend à des résolutions aussi fines que celles offertes par l'ULM, ces problématiques ne sont plus négligeables.

Une première piste serait de corriger les artefacts de mouvements dus à la pulsativité (comme introduit en 2.7.2) en utilisant les estimations de mouvement obtenus par les méthodes de corrélations croisées pour corriger la position des microbulles avant la SVD, comme cela a été montré par HINGOT, ERRICO, TANTER et al., 2017.

Pour pouvoir étudier des dilatations de vaisseaux, une correction rigide des mouvements à des échelles temporelles plus lentes a été choisie. Or on peut observer de façon plus ou moins marquée selon les expériences une dilatation du cerveau au cours l'acquisition. Elle peut s'expliquer par la craniotomie qui laisse la possibilité au cerveau de se dilater et par l'injection de fluide avec les microbulles (même si une partie est évacuée assez rapidement par les urines). C'est un processus progressif qui a lieu tout au long de l'acquisition, et le fait de sommer les données sur les motifs fait qu'il n'y a pas de dérive au cours du temps, cependant la résolution spatiale des images finales pourrait être améliorée si ce mouvement non rigide était corrigé. Cela doit être fait en portant attention à ne pas corriger au passage des modifications physiologiquement intéressantes des vaisseaux (comme une dilatation pendant une activité cérébrale).

2.8.2 Améliorer la sensibilité

Pour gagner en sensibilité, notamment aux petits flux, l'enjeu est d'augmenter le nombre de détections de MBs par point temporel dans les données ULM dynamiques. Cela peut être fait en augmentant le nombre de répétitions ou la largeur de la fenêtre glissante. Mais avant cela, maximiser le nombre de MBs que l'algorithme d'ULM parvient à détecter correctement par image ultrarapide pourrait faire grimper les performances de la technique.

2.8.2.1 Évaluer les performances de l'algorithme d'ULM pour gagner en sensibilité

En effet, des paramètres très stricts ont été appliqués dans la sélection des microbulles par l'algorithme d'ULM pour arriver aux résultats montrés jusqu'à présents : cela permet d'éliminer beaucoup de bruit mais beaucoup de microbulles réelles ont aussi été écartées.

Pour pouvoir travailler de façon efficace sur l'optimisation de l'algorithme d'ULM, Gatien Clément, en stage au laboratoire, a travaillé sur une méthode permettant d'évaluer les performances de l'algorithme. Le principe est de créer un jeu de données réaliste des conditions d'imagerie in vivo avec une distribution de microbulles que l'on connaît (i.e. dont on connaît la localisation et la vitesse) pour pouvoir ensuite appliquer à ce jeu de données l'algorithme

d'ULM et confronter les positions et les vitesses obtenues à celles données en entrée. Gatien a travaillé pour de l'ULM sur des données de cerveau de rat avec craniotomie mais le processus serait identique pour d'autres applications. Il s'agit de créer un jeu de données semi synthétique, à partir d'une image BMode d'un cerveau de rat (sans bulles) et de cartes ULM correspondantes (obtenues avec injections de microbulles chez le même rat, dans le même plan exactement et avec la même sonde; les deux acquisitions étant réalisées à la suite l'une de l'autre). Les différentes étapes pour y parvenir sont les suivantes :

Générer les positions de bulles : l'objectif est de créer une population de microbulles qui suivent des déplacements réalistes. Pour cela, on utilise le champ de microbulles obtenu par ULM (carte de champ de vitesse et de nombre de bulles par pixel). Des positions de microbulles sont générées pour une première image selon une distribution dans le plan qui suit les proportions données par la carte en nombre de bulles (initialisation). On génère ensuite une deuxième image en appliquant aux microbulles de la première image un déplacement qui suit le champ de vitesse pour la cadence d'imagerie fixée. À chaque image, de nouvelles bulles sont aussi introduites (nombre constant pour imiter une injection continue) et on attribue à chaque bulle une durée de vie (en nombre d'images) qui suit une loi inverse Gaussienne réaliste (moyenne 50 et paramètre de forme 100).

Générer des données ultrasonores pour les microbulles : à partir des positions de bulles, il s'agit de créer des données RF qui correspondent aux échos créés par une telle population de microbulles. Pour cela, le logiciel de simulation Field II (J.A. JENSEN et SVENDSEN, 1992 et Jørgen JENSEN, 1996) permet de calculer le signal reçu par chaque élément piézoélectrique après l'émission des ondes ultrasonores et leur rétrodiffusion par la population de microbulles, considérées comme des diffuseurs ponctuels. Ce logiciel repose sur la théorie des systèmes linéaires et calcule le signal résultant comme la convolution de la réponse impulsionnelle des transducteurs avec le signal émis. Les paramètres de la sonde (taille des éléments, réponse impulsionnelle...) ainsi que les paramètres de séquences (angles d'émission des ondes planes...) lui sont spécifiés en entrée. Ces données RF sont ensuite beamformées.

Ajouter des données de tissu. Pour avoir des données ultrasonores de tissu réalistes des données in vivo, notamment du speckle, les données ultrasonores de microbulles obtenues par simulation sont mélangées à des données de tissu expérimentales obtenues chez le même rat, dans le même plan et avec la même sonde (mais sans injection de microbulles) que les données ULM utilisées pour générer les positions de microbulles.

Appliquer l'algorithme d'ULM aux données semi-synthétiques obtenues. En sortie de l'algorithme, les positions et vitesses mesurées peuvent être comparées aux positions de bulles générées lors de la première étape. Cette comparaison nécessite une étape d'attribution de chaque point détecté par l'algorithme à un des points simulés. Cette attribution est réalisée en minimisant la somme des distances pour une image entre chaque point détecté et chaque point simulé. Une fonction de coût permet aussi de fixer un seuil en distance à partir duquel il vaut mieux ne pas attribuer une détection.

Les performances de l'algorithme ont été évaluées par cette méthode pour 60 secondes

d'acquisition et une centaine de microbulles par image. Seulement 50% des microbulles sont détectées et gardées à la fin de l'algorithme d'ULM. Il y a 3% de faux positifs par rapport aux données simulées et 8% par rapport à celles parmi les données simulées qui ont effectivement été détectées par l'algorithme.

Le nombre de microbulles qui sont présentes mais n'ont pas été détectées ou gardées en fin d'algorithme ULM est énorme : une marge de progression très importante existe. Il est possible avec cette méthode de pousser l'analyse et d'étudier quelles microbulles ne sont pas détectées et si elles ont des caractéristiques similaires (position dans le plan d'imagerie, localisation dans quel type de vaisseaux...) et à quelle étape de l'algorithme ULM elles sont rejetées. Il est aussi possible de modifier artificiellement les conditions expérimentales, d'injection par exemple en faisant varier la concentration de microbulles et générant plus ou moins de positions de bulles. La proportion de MBs détectées chute ainsi de 70% à 18% quand on passe de 10 MBs simulées par image à 400 MBs par image. Cependant comme il y a aussi plus de bulles au départ, le nombre de MBs détectées est tout de même plus grand pour les fortes concentrations. La précision de localisation décroît pour des concentrations élevées car dans les régions avec trop de bulles, la PSF est déformée par la présence d'autre microbulles dans le voisinage.

Ainsi cet outil permet de mieux comprendre les performances de l'algorithme d'ULM et pourrait être utilisé pour optimiser cet algorithme et améliorer sa sensibilité.

2.8.2.2 Parvenir à localiser les bulles non isolées pour gagner en sensibilité

Pour augmenter le nombre de détections par seconde, une autre possibilité est de parvenir à détecter et localiser correctement des MBs même dans des zones où elles ne sont pas parfaitement isolées. Cela pourrait permettre d'augmenter la concentration en MBs injectées et ainsi d'augmenter le nombre de bulles détectées dans les petits vaisseaux. Cette concentration est volontairement faible car le principe de l'ULM repose sur la localisation de MBs isolées. Avec des concentrations plus élevées, on arriverait à imager les petits flux beaucoup plus rapidement, mais dans les gros vaisseaux, la localisation et le tracking deviendraient compliqués car les bulles seraient trop proches. Plusieurs groupes ont travaillé sur des méthodologies pour faire de l'ULM avec des concentrations de bulles plus élevées, pour pouvoir réduire le temps d'acquisition en ULM. Une de ces méthodes a été proposée par HUANG et al., 2020. Le principe est, à partir d'un jeu de données qui contient beaucoup de MBs, de créer plusieurs jeux de données contenant chacun une sous-population de MBs et d'appliquer l'algorithme d'ULM sur chacune de ces populations, avant de concaténer les résultats (figure 2.38). La séparation en sous-population est faite par gamme de vitesse et par direction de déplacement des bulles, par analyse de Fourier.

La méthode décrite a été implémentée par Adrien Zammour, en stage au laboratoire. Les résultats obtenus, illustrés en figure 2.39, permettent en effet d'augmenter le nombre de détections dans les vaisseaux où la concentration est très élevée et où la localisation et le tracking sont donc très compliqués.

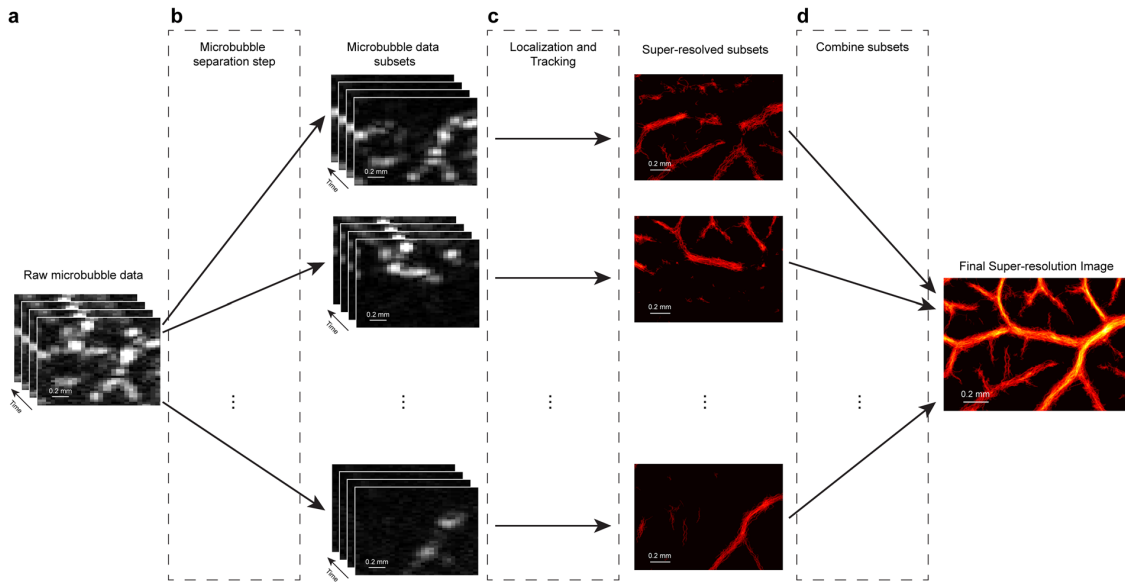


FIGURE 2.38 – Principe de l’algorithme d’ULM avec séparation des MBs. (a) Données spatio-temporelles de bulles après réjection du tissu. (b) Une transformée de Fourier 3D permet de séparer la population initiale de MBs en différentes sous-populations de MBs en fonction de leur vitesse et direction, chacune présentant ainsi une concentration de MBs plus faible. (c) Chaque sous-population est traitée par l’algorithme de localisation et de tracking de façon indépendante. (d) L’image de super-résolution finale est obtenue en combinant les signaux de toutes les sous-populations. D’après HUANG et al., 2020.

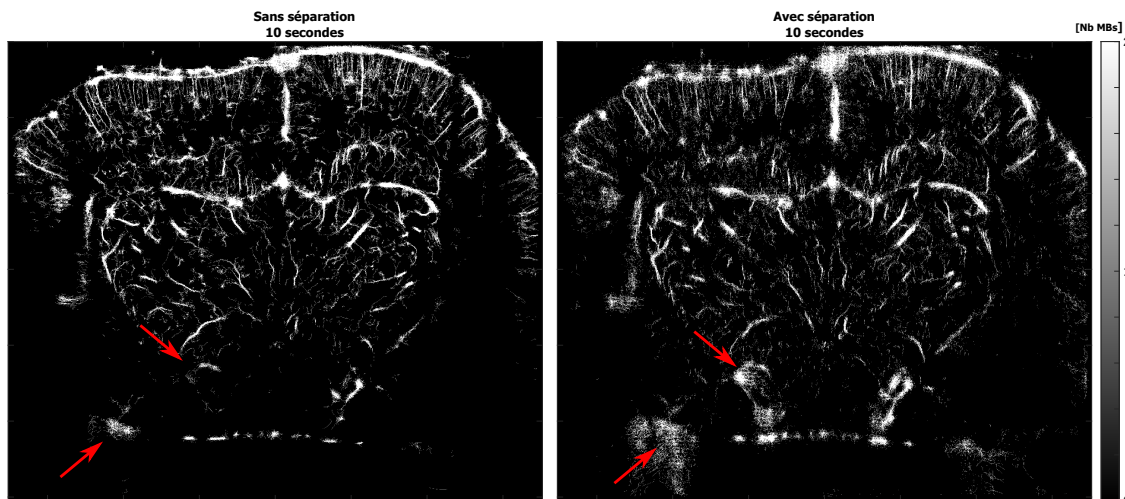


FIGURE 2.39 – Résultats de l’algorithme d’ULM pour 10 secondes d’acquisition, obtenu avec l’algorithme original (gauche) ou l’algorithme avec séparation par la méthode décrite par HUANG et al., 2020 (droite). Les flèches rouges vers des gros vaisseaux ou des structures très vascularisées où le nombre de MBs est très élevé.

2.8.3 Investiguer d'autres méthodes d'analyse

Si on a proposé ici la décomposition en valeurs singulières comme méthode de traitement des données fULM, d'autres méthodes pourraient être explorées, par exemple l'analyse par composantes indépendantes (HERAULT et ANS, 1984), ou des méthodes adaptées à d'autres types de données sparses en neuroimagerie comme les pointes neurales en électrophysiologie (PALM, AERTSEN et GERSTEIN, 1988).

2.8.4 Extension à la 3D

Le fULM a ici été développé en 2D, mais des preuves de concept à la fois de l'imagerie fonctionnelle par fUS (RABUT et al., 2019) en 3D et de l'ULM en 3D (HEILES, 2019) laissent suggérer la possibilité de son extension en 3D. Cela nécessitera de pouvoir acquérir des volumes 3D avec les mêmes capacité en terme de cadence d'imagerie et d'imagerie en continue.

2.9 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, une preuve de concept d'imagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation Ultrasonore, que l'on appellera fULM, a été établie.

La principale difficulté vient des longs temps d'acquisition nécessaires en ULM pour avoir une bonne sensibilité aux petits flux. Pour résoudre ce compromis, on a introduit une méthodologie basée sur la répétition de stimuli pendant l'imagerie ULM. Cette méthodologie permet d'augmenter le nombre de détection de microbulles par seconde.

Un protocole expérimental dédié a été mis au point, ainsi qu'une méthode d'analyse des données. Cette méthode permet de créer des données ULM dynamiques. L'utilisation de la décomposition en valeurs singulières (SVD) appliquée à ces données ULM spatio-temporelles permet d'extraire de manière robuste le signal d'hyperhémie fonctionnelle et d'obtenir des cartes d'activations fonctionnelles quantitatives, sur le cerveau entier et avec une résolution spatiale micrométrique.

Enfin des pistes d'améliorations, en particulier pour augmenter la sensibilité de la technique, qui apparaît comme critique, ont été abordées.

Maintenant que la preuve de concept a été établie, il s'agit d'appliquer cette nouvelle modalité d'imagerie fonctionnelle à l'étude de l'activité cérébrale, pour explorer les différents descripteurs de l'activité hémodynamique offerts par le fULM.

2.10 Annexe : protocole expérimental détaillé

Ce protocole a été réalisé selon les directives ARRIVE et en accord avec la directive du Conseil Européen du 22 Septembre 2010 (010/63/UE) et le comité d'éthique local en matière d'expérimentation animale (N°59, 'Paris Centre et Sud', projet 2017-23).

Animaux et hébergement : Les rats (Sprague-Dawley, pesant entre 200 et 300 grammes) sont hébergés au laboratoire une semaine avant les expérimentations et gardés à deux par cage sous conditions contrôlées (22+/-1°C, 60+/-10% d'humidité relative, cycle jour/nuit 12h/12h, nourriture et eau ad libitum. Aucun des animaux utilisés n'as reçu de traitement particulier et tous ont été choisis au hasard pour pratiquer les procédures.

Procédure chirurgicale et préparation pour l'imagerie : Sous anesthésie forte (bolus en intrapéritonéal de metomidine (Domitor, 0.4 mg/kg) et ketamine (Imalgène, 40 mg/kg), un cathéter rempli de saline est inséré dans la veine jugulaire avant de placer l'animal sur un cadre stéréotaxique pour effectuer une craniotomie entre Bregma et Lambda, permettant d'obtenir une fenêtre d'imagerie sur le S1BF ou le SC. Pendant toute la procédure chirurgicale et la session d'imagerie, la température corporelle est maintenue à 37°C. Environ 45 minutes après induction (quand la craniotomie est terminée), l'anesthésie est maintenue mais réduite en utilisant une perfusion sou-cutanée de metomidine (0.1mg/kg/h) et de ketamine (12.5 mg/kg/h) à l'aide d'un pousse-seringue. Les fréquences cardiaques et respiratoires sont monitorées en continue pour assurer la stabilité de l'anesthésie (Labchart, AD Instruments). Pendant la chirurgie, la dure-mère est gardée intacte et 2 millilitres de saline sont déposées sur le cerveau, avant de recouvrir la fenêtre avec du gel échographique (Dexco Medical, France). La sonde ultrasonore, placée sur une système motorisé 3 axes, est positionnée sur la fenêtre.

Protocole de stimulation : Les stimulations sensorielles utilisées sont la stimulation des vibrisses de la face à l'aide d'une stimulateur mécanique qui permet de broser les vibrisses à une fréquence de 10Hz, et des stimulation visuelles avec des flash lumineux par une LED à 3Hz. Les stimulations sont déclenchées par les séquences d'imagerie grâce à un microcontrôleur (Arduino Uno) qui contrôle un servomoteur pour assurer la synchronisation de l'imagerie et des stimulations et ainsi la précision et la reproductibilité des stimulations. Le paradigme de stimulation typiquement utilisé est le suivant : 30 secondes de ligne de base, 30 secondes de stimulation, 10 secondes de retour à la ligne de base. Le nombre de répétition du stimulus est typiquement de 5 pour les expériences de fUS et de 20 pour les expériences de fULM.

Protocole d'injection : Pour les expériences suivies par imagerie ULM, les microbulles (Sonovue, Braco, Italy, reconstruite dans 5 mL de saline) sont injectées de façon continue à 3.5 mL/h grâce à un pousse-seringue (KD Scientific, USA). Un aimant est introduit dans la seringue pour pouvoir mélanger la solution de microbulles pendant toute l'acquisition. Cette injection permet d'avoir un nombre stable de bulles dans la circulation pendant tout le protocole d'acquisition (environ 20 minutes). Dans l'expérience avec injection par bolus, des bolus de 35 µL de Sonovue sont injectées toutes les 35 secondes.

Imagerie ultrasonore : La sonde utilisée est une sonde linéaire (128 éléments, 15.625 MHz, espace inter-éléments de 110 μ m, focale en élévation à 8mm) connectée à un échographe ultrarapide (Verasonics; 128 voies, fréquence d'échantillonnage de 62.5MHz) guidé par le logiciel d'acquisition Neuroscan (Iconeus, Paris, France, et Accélérateur de la Recherche Technologique en Ultrasons Biomédicaux de l'INSERM, Paris, France).

Séquence ultrasonore et traitement des données pour l'imagerie fUS : Des blocs de 200 images à une cadence d'imagerie de 500 Hz sont construits avec un beamforming par somme et délai. Chaque image est une image « compound » obtenue à partir de 11 ondes planes émises à une PRF de 5 500 Hz et avec des angles de -10 à 10° par pas de 2°. Le pulse correspond à deux périodes de sinusoïde avec un voltage de 25 V (indice mécanique de 0.44). Un filtre SVD est ensuite appliqué par bloc de 200 images (à cadence d'imagerie de 500 Hz) pour retirer le signal du tissu et garder uniquement le signal sanguin (on retire les 60 premiers modes propres). Le Doppler puissance est ensuite calculé pour chaque voxel en intégrant sur les 200 points temporels. Les blocs sont acquis de manière continue (pas de pause entre blocs).

Séquence ultrasonore et traitement des données pour l'imagerie ULM : Des blocs de 400 images à une cadence d'imagerie de 1 000 Hz sont construits avec un beamforming par somme et délai. Chaque image est une image « compound » obtenue à partir de 5 ondes planes émises à une PRF de 5 000 Hz et avec des angles de -5/-2/0/2/5°. Le pulse correspond à deux périodes de sinusoïde avec un voltage de 5 V (indice mécanique de 0.09). Un filtre SVD est ensuite appliqué par bloc de 400 images (à cadence d'imagerie de 1 000 Hz) pour retirer le signal du tissu et garder uniquement le signal des microbulles (on retire les 10 premiers modes propres). Les images sont ensuite interpolées spatialement à (pitch/6 λ /6). Un masque binaire est ensuite créé pour ne garder que les bulles grâce à un filtre dédié, optimisé pour augmenter le contraste des structures vasculaires (implémentation 3D disponible sur Mathworks, ©Dirk-Jan Kroon 2009 and ©Tim Jerman, 2017). (vesselness, implémentation 3D disponible sur Mathworks, ©Dirk-Jan Kroon 2009, and ©Tim Jerman, 2017). Les bulles sont ensuite détectées comme étant les maxima locaux les plus intenses dont la corrélation à une PSF type (réponse par le système ultrasonore d'une microbulle isolée) dépasse 0.7. La localisation sous-pixel est ensuite faite en utilisant un ajustement polynomial (sur un voisinage de 5x5 pixels). Les coordonnées calculées par cet ajustement sont arrondies à la taille de pixel choisie : 6.875x6.25 microns = taille du pixel initial/16. Les bulles sont ensuite traquées par un algorithme classique de suivi de particules (simple tracker.m disponible sur Mathworks ©Jean-Yves Tinevez, une implémentation de "munkres algorithm" de ©Yi Cao 2009, avec une vitesse maximale des particules de 100 mm/s). Les positions successives d'une trace, correspondant au parcours d'une microbulle, entre chaque image sont utilisées pour calculer les composantes du vecteur vitesse (selon l'axe de la sonde x et l'axe de la profondeur z). Une interpolation spatiale linéaire pour chaque trace permet de compter une détection pour chaque pixel qui se trouve sur le parcours de chaque bulle. Finalement, la carte ULM représentant le nombre de bulles est construite en comptant toutes les bulles détectées par pixel sur tout le temps d'acquisition, et la carte ULM représentant la vitesse est calculée en prenant la moyenne des vitesses de ces bulles par pixel.

Références

- BOURQUIN, Chloé et al. (2021). « In vivo pulsatility measurement of cerebral microcirculation in rodents using Dynamic Ultrasound Localization Microscopy ». In : *IEEE Transactions on Medical Imaging*. Conference Name : IEEE Transactions on Medical Imaging, p. 1-1. ISSN : 1558-254X. DOI : 10.1109/TMI.2021.3123912.
- CORMIER, Philippe et al. (2021). « Dynamic Myocardial Ultrasound Localization Angiography ». In : *IEEE Transactions on Medical Imaging*. Conference Name : IEEE Transactions on Medical Imaging, p. 1-1. ISSN : 1558-254X. DOI : 10.1109/TMI.2021.3086115.
- DEMENÉ, Charlie et al. (mars 2021). « Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients ». In : *Nature Biomedical Engineering* 5.3. Bandiera_abtest : a Cg_type : Nature Research Journals Number : 3 Primary_atype : Research Publisher : Nature Publishing Group Subject_term : Biomedical engineering;Ultrasound Subject_term_id : biomedical-engineering;ultrasound, p. 219-228. ISSN : 2157-846X. DOI : 10.1038/s41551-021-00697-x. URL : <https://www.nature.com/articles/s41551-021-00697-x> (visité le 18/11/2021).
- ERRICO, Claudia et al. (nov. 2015). « Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging ». In : *Nature* 527.7579. Number : 7579 Publisher : Nature Publishing Group, p. 499-502. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature16066. URL : <https://www.nature.com/articles/nature16066> (visité le 03/03/2021).
- HEILES, Baptiste (20 déc. 2019). « 3D Ultrasound Localization Microscopy ». Thèse de doct. PSL Research University. URL : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02478291> (visité le 17/12/2021).
- HERAULT, Jeanny et Bernard ANS (31 juill. 1984). « Neuronal network with modifiable synapses : decoding of composite sensory messages under unsupervised and permanent learning ». In : *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* 299, p. 525-528.
- HINGOT, Vincent, Claudia ERRICO, Baptiste HEILES et al. (déc. 2019). « Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localization Microscopy ». In : *Scientific Reports* 9.1. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-018-38349-x. URL : <http://www.nature.com/articles/s41598-018-38349-x> (visité le 04/09/2019).
- HINGOT, Vincent, Claudia ERRICO, Mickael TANTER et al. (1^{er} mai 2017). « Subwavelength motion-correction for ultrafast ultrasound localization microscopy ». In : *Ultrasonics* 77, p. 17-21. ISSN : 0041-624X. DOI : 10.1016/j.ultras.2017.01.008. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041624X16302451> (visité le 22/11/2021).
- HUANG, Chengwu et al. (déc. 2020). « Short Acquisition Time Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging via Microbubble Separation ». In : *Scientific Reports* 10.1, p. 6007. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-020-62898-9. URL : <http://www.nature.com/articles/s41598-020-62898-9> (visité le 08/12/2021).

- HUBERMAN, Andrew D. et Christopher M. NIELL (sept. 2011). « What can mice tell us about how vision works? » In : *Trends in Neurosciences* 34.9, p. 464-473. ISSN : 01662236. DOI : 10.1016/j.tins.2011.07.002. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223611001068> (visité le 30/12/2021).
- JENSEN, J.A. et N.B. SVENDSEN (mars 1992). « Calculation of pressure fields from arbitrarily shaped, apodized, and excited ultrasound transducers ». In : *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 39.2. Conference Name : IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, p. 262-267. ISSN : 1525-8955. DOI : 10.1109/58.139123.
- JENSEN, Jørgen (1^{er} jan. 1996). « FIELD : A program for simulating ultrasound systems ». In : *Medical and Biological Engineering and Computing* 34, p. 351-352.
- KASAI, C. et al. (mai 1985). « Real-Time Two-Dimensional Blood Flow Imaging Using an Auto-correlation Technique ». In : *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics* 32.3. Conference Name : IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics, p. 458-464. ISSN : 2162-1403. DOI : 10.1109/T-SU.1985.31615.
- MACÉ, Emilie et al. (août 2011). « Functional ultrasound imaging of the brain ». In : *Nature Methods* 8.8, p. 662-664. ISSN : 1548-7105. DOI : 10.1038/nmeth.1641. URL : <http://www.nature.com/articles/nmeth.1641> (visité le 29/08/2019).
- PALM, G., A. M. H. J. AERTSEN et G. L. GERSTEIN (juin 1988). « On the significance of correlations among neuronal spike trains ». In : *Biological Cybernetics* 59.1, p. 1-11. ISSN : 0340-1200, 1432-0770. DOI : 10.1007/BF00336885. URL : <http://link.springer.com/10.1007/BF00336885> (visité le 21/02/2022).
- PAXINOS, George et Charles WATSON (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates : hard cover edition*. Elsevier.
- PIECHNIK, Stefan K., Peter A. CHIARELLI et Peter JEZZARD (jan. 2008). « Modelling vascular reactivity to investigate the basis of the relationship between cerebral blood volume and flow under CO2 manipulation ». In : *NeuroImage* 39.1, p. 107-118. ISSN : 10538119. DOI : 10.1016/j.neuroimage.2007.08.022. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811907007616> (visité le 18/11/2021).
- RABUT, Claire et al. (oct. 2019). « 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents ». In : *Nature methods* 16.10, p. 994-997. ISSN : 1548-7091. DOI : 10.1038/s41592-019-0572-y. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6774790/> (visité le 29/07/2021).
- STAIGER, Jochen F. et Carl C. H. PETERSEN (1^{er} jan. 2021). « Neuronal Circuits in Barrel Cortex for Whisker Sensory Perception ». In : *Physiological Reviews* 101.1. Publisher : American Physiological Society, p. 353-415. ISSN : 0031-9333. DOI : 10.1152/physrev.00019.2019. URL : <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00019.2019> (visité le 30/12/2021).



Chapitre 3 - Étude et quantification de l'hyperhémie fonctionnelle par fULM

3.11 Introduction

3.11.1 Complexité de la régulation vasculaire cérébrale

Un enjeu crucial de l'imagerie biomédicale est d'apporter, en plus d'une image anatomique, une information quantitative sur le fonctionnement des organes *in vivo*. Ce fonctionnement des organes doit être étudié à différentes échelles, de l'échelle cellulaire où les maladies trouvent généralement leurs origines, à l'échelle plus large des organes où les symptômes s'expriment dans un second temps. Dans le cerveau, le système cérébrovasculaire a évolué en un réseau multi-échelle unique pour assurer un apport en oxygène et en nutriments finement régulé, avec une modulation spatiale et temporelle permanente du flux sanguin. Ce couplage neurovasculaire, rapidement décrit dans le premier chapitre, est un mécanisme fondamental du fonctionnement cérébral et toute altération de cette interaction neurone/vaisseau conduit à des dysfonctionnements cérébraux. Nous revenons ici plus en détail sur cette régulation finement orchestrée du flux cérébral par le système cérébrovasculaire.

Le cerveau, en tant qu'organe le plus complexe et ayant l'activité métabolique la plus importante de tout le corps, est équipé d'un système vasculaire très sophistiqué qui pénètre intimement en contact avec les différents constituants cellulaires pour les approvisionner en énergie et en nutriments, évacuer les protéines et métabolites non désirés et maintenir une homéostasie du cerveau (SCHAEFFER et IADECOLA, 2021). Le concept d'unité neurovasculaire introduit en 2001 (www.ninds.nih.gov/About-NINDS/Strategic-Plans-Evaluations/Strategic-Plans/Stroke-Progress-Review-Group) permet de décrire cette association développementale, structurelle et fonctionnelle forte entre les cellules cérébrales et la microvascularisation. Parallèlement à ces régulations locales au niveau de la microvascularisation, des facteurs systémiques à plus large échelle, impliquant des segments vasculaires plus en amont ou en aval, influencent profondément la fonction neurovasculaire. Le contrôle permanent de la fonction cérébrovasculaire dépend de l'équilibre délicat de mécanismes de régulations systémiques et de mécanismes intrinsèques plus régionaux.

Hétérogénéité des associations neurovasculaires

Les grosses artères cérébrales sont couvertes de plusieurs couches de cellules musculaires lisses (SMC), des cellules contractiles en forme d'anneau séparées de l'endothélium des vaisseaux par une épaisse membrane élastique. Bien que n'étant pas en contact direct avec des cellules cérébrales, les vaisseaux de la pie-mère sont richement innervés par des fibres nerveuses exprimant une grande quantité de neurotransmetteurs et de neuropeptides. Les artères pénétrantes sont entourées d'une couche plus fines de SMCs, elles sont entourées d'un espace péri-vasculaire dans lequel les nerfs péri-vasculaires sont plus rares et la lamina élastique moins épaisse. Au fur et à mesure que les artères se ramifient et deviennent plus fines, la couche de SMCs diminue jusqu'à devenir une couche unique pour les artérioles, voire discontinue. L'es-

pace péri-vasculaire et les nerfs péri-vasculaires disparaissent et les artérioles sont encastrées dans des pieds astrocytaires. Les artérioles se transforment ensuite en artérioles pré-capillaires, et les SMCs sont progressivement remplacées par des péricytes nichés dans la membrane basale endothéliale et recouvrant approximativement 30% de la surface des capillaires. Du côté veineux, les SMCs réapparaissent entourées par des membranes basales endothéliales ainsi que l'espace péri-vasculaire. Les veines ont cependant moins de SMCs que les artérioles et elles sont plus allongées et moins contractiles.

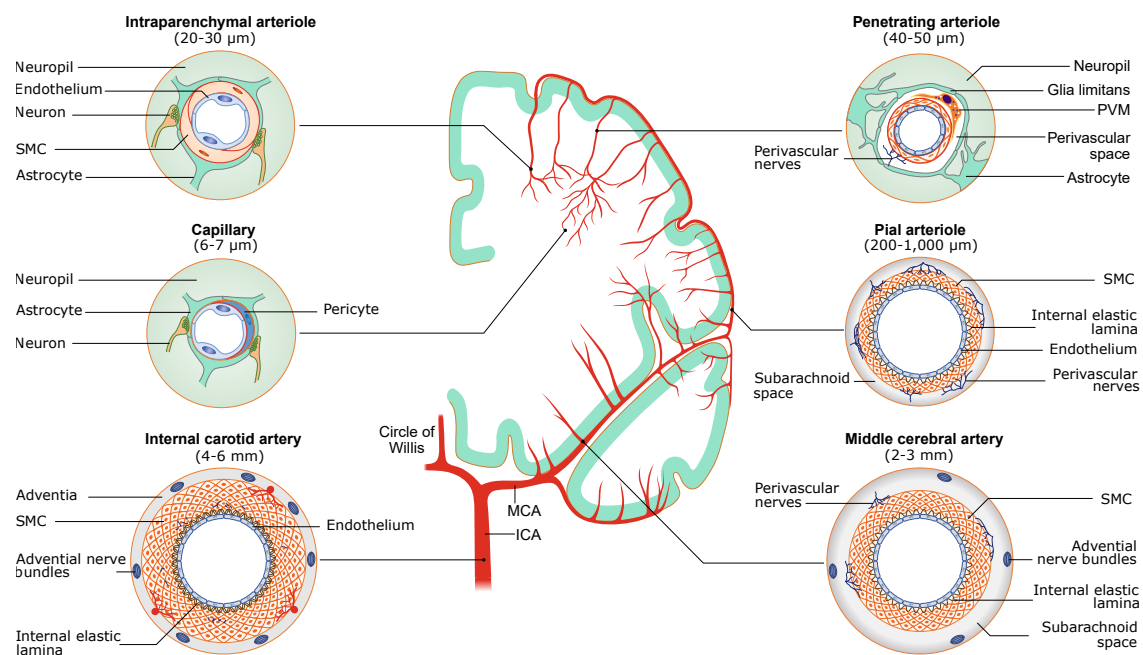


FIGURE 3.40 – Hétérogénéité des artères cérébrales et diversité des cellules vasculaires et péri-vasculaires. D'après SCHAEFFER et IADECOLA, 2021

Facteurs systémiques

Des facteurs extrinsèques au cerveau exercent des effets importants : l'arbre cérébrovasculaire est impliqué à toutes les échelles avec des spécificités propres selon les segments. Ces facteurs systémiques qui influencent le flux sanguin cérébral peuvent être la posture, le glucose circulant, les hormones, l'hématocrite, la viscosité du sang. En particulier, on peut citer la pression artérielle (AP) et la concentration en différents gaz sanguins.

La pression artérielle est la force principale qui permet de propulser le sang dans les vaisseaux cérébraux. Une perfusion cérébrale adéquate résulte d'une pression artérielle suffisante. Quand elle diminue de plus de 30-40%, le flux sanguin cérébral (CBF) chute, la fonction cérébrale cesse et une perte de conscience s'ensuit dans les secondes qui suivent. À cause de la sensibilité du CBF à la pression artérielle (AP), les vaisseaux du cerveau sont équipés d'un système tampon leur permettant de stabiliser le CBF pendant les variations d'AP, on parle d'autorégulation cérébrale. Celle-ci est effective sur une gamme de AP (-20 à +20 Hgmm par rapport à la ligne de base) et avec une latence de quelques secondes. L'autorégulation cérébrale

dépend des propriétés intrinsèques des SMCs à induire une vasoconstriction quand la pression intra-vasculaire augmente et une vasodilatation quand la pression diminue, pour faciliter le flux. On parle de la réponse myogénique. Ces ajustements vasculaires concernent les artères et artérioles extra-crânielles, intra-crânielles et intra-cérébrales.

Une élévation de la pression artérielle partielle en CO₂ (pCO₂, hypercapnie) ou une réduction de la pression artérielle partielle en O₂ (pO₂, hypoxie) induit une augmentation globale du CBF. L'hypoxie et l'hypercapnie induisent des dilatations de tous les segments de la circulation cérébrale et sont souvent accompagnées d'une augmentation de l'AP qui amplifie l'impact sur le CBF.

Facteurs intrinsèques et couplage neurovasculaire

Contrairement aux facteurs systémiques, les signaux intrinsèques qui régulent le CBF proviennent d'un site actif dans le cerveau et se propagent de façon rétrograde à travers l'arbre cérébrovasculaire. Les changements vasculaires résultants peuvent être hautement localisés ou plus diffus. Un des mécanismes principaux est le couplage neurovasculaire (NVC) et l'augmentation de CBF induit par l'activation d'une voie de signalisation neuronale. La relation intime entre les fonctions vasculaire et neuronale est une des propriétés la plus distinctive de la circulation cérébrale et sous-tend beaucoup des signaux d'imagerie fonctionnelle. Le NVC résulte d'une séquence hautement coordonnée d'événements multicellulaires : une réponse locale impliquant les micro-vaisseaux près du site actif et une réponse plus large transmise en amont aux artères plus larges.

La réponse locale est aujourd'hui décrite comme étant le résultat du relargage de plusieurs médiateurs vaso-actifs (ions, neuro-transmetteurs...). Ces médiateurs pourraient cibler spécifiquement certains segments (comme par exemple le NO spécifiquement les artérioles intra-cérébrales, HOILAND et al., 2020, MISHRA et al., 2016). Les différentes contributions des différents mécanismes en jeu ne sont toujours pas bien décrites. Le rôle des artérioles pré-capillaires et des capillaires (figure 3.41A) suscite un intérêt croissant, car ces derniers représentent un site potentiellement majeur de la régulation de la résistance vasculaire et du CBF, voire les pilotes initiaux du NVC (HALL et al., 2014). Plusieurs investigations ont montré que les branches de premier ordre (premières ramifications depuis l'artère pénétrante) sont les premiers segments à se relâcher pendant le NVC et que la dilatation et l'augmentation du flux dans les segments en aval sont plus tardifs et considérés comme passifs (HILL et al., 2015, FERNANDEZ-KLETT et al., 2010). RUNGTA et al., 2018 ont aussi démontré que les artérioles pénétrantes et les capillaires de premier ordre forment l'unité fonctionnelle principale : ils se dilatent en premier et le plus fortement (figure 3.42). On retrouve sur ce segment (figure 3.41B) des cellules musculaires lisses et des péricytes spécifiques ("mesh pericytes") qui jouent un rôle clé dans le couplage neurovasculaire (ATTWELL et al., 2016, BERTHIAUME et al., 2018, HALL et al., 2014). GRUBB et al., 2020 ont récemment décrit un mécanisme de contrôle du CBF par un sphincter situé à la transition entre l'artériole pénétrante et le capillaire d'ordre 1 (figure 3.41D). Ces sphincters sont capables de générer la plus grande variation dans la résistance au flux cérébrovasculaire; ils permettent de contrôler le flux dans les capillaires tout en protégeant le tissu cérébral de variations de pression

trop importantes (ZAMBACH et al., 2021).

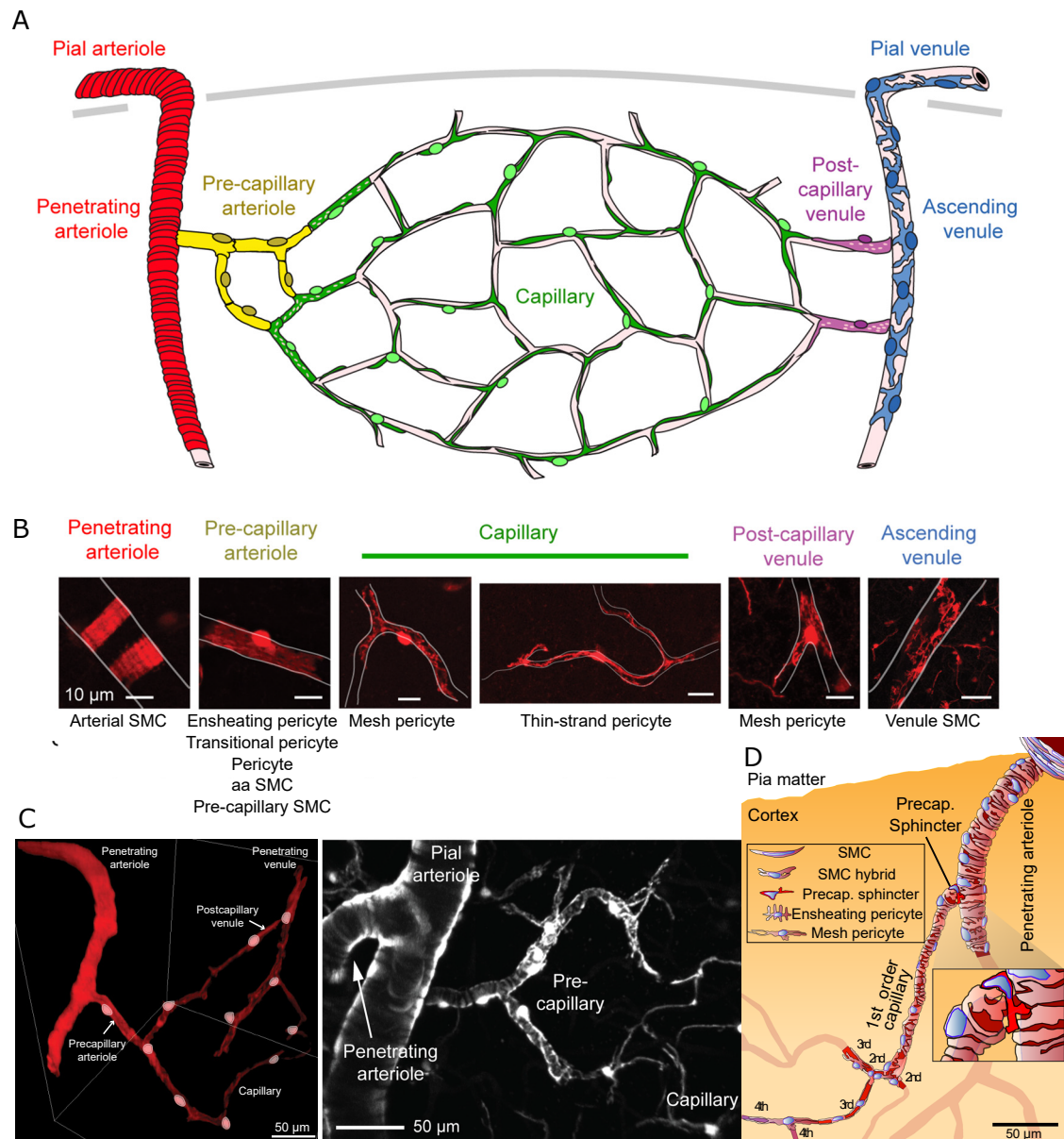


FIGURE 3.41 – (A) Schéma représentant les cellules murales de sept zones microvasculaires allant des artérioles de la pie-mère aux veinules de la pie-mère du cortex cérébral, d'après BERTHIAUME et al., 2018. (B) Images de microscopie représentatives de la morphologie des cellules murales des 5 zones sous la surface corticale présentées en (A). Toutes les barres d'échelle sont de 10 μ m, sauf celle de la veinule ascendante qui est de 50 μ m. D'après BERTHIAUME et al., 2018. (C) Image de microscopie biphotonique in vivo révélant la distribution de péricytes (gauche : HARTMANN et al., 2015; droite : BERTHIAUME et al., 2018). (D) Schéma d'une artériole pénétrante avec un sphincter précapillaire à l'embranchement proximal, d'après GRUBB et al., 2020.

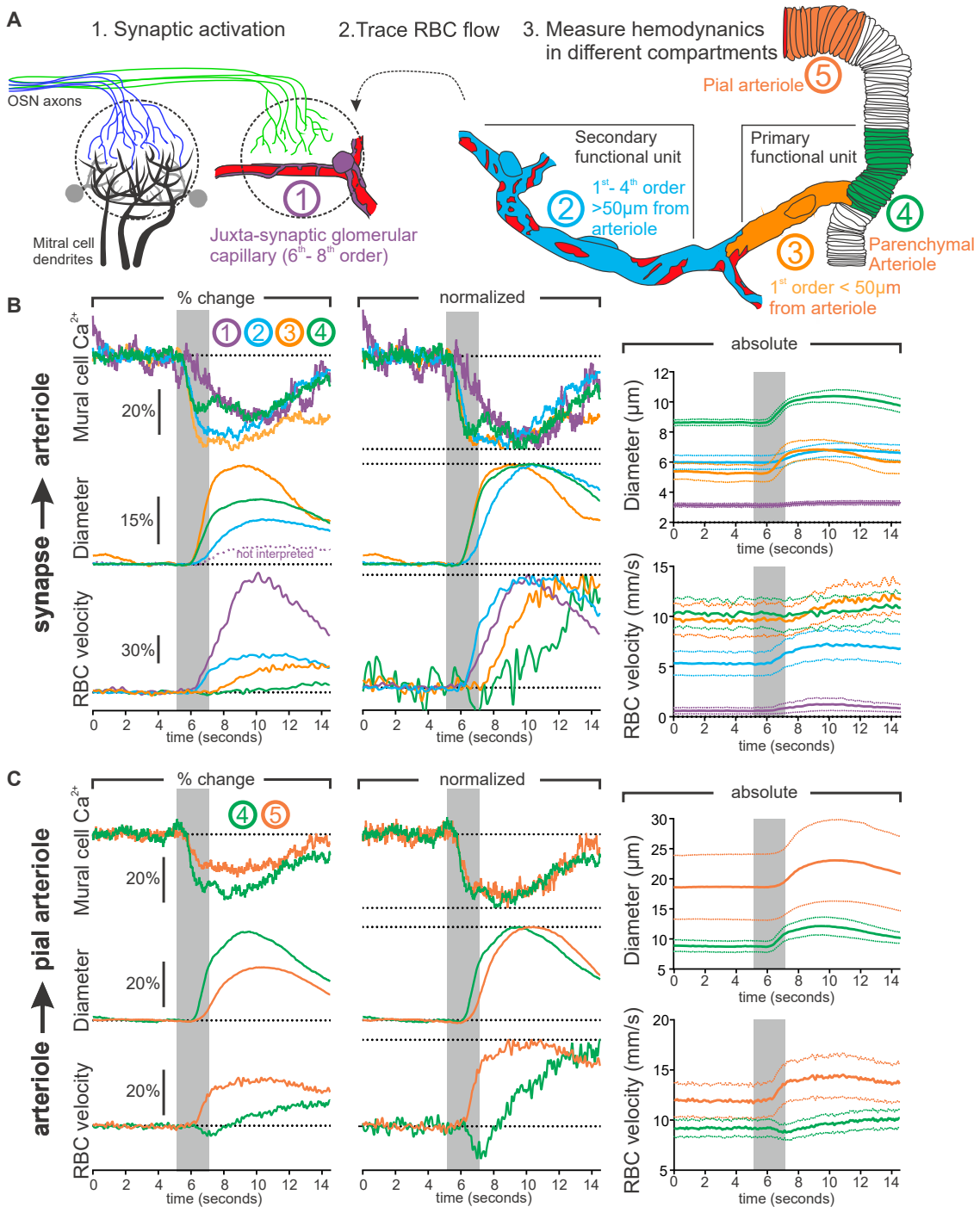


FIGURE 3.42 – Hyperhémie fonctionnelle de la synapse à la pie-mère, d’après RUNGTA et al., 2018. Mesure du Ca²⁺, de la vitesse des RBCs et du diamètre des vaisseaux dans différents compartiments vasculaires en amont de l’activation synaptique. (A) Schéma du design expérimental (B) Mesures dans les vaisseaux de la synapse à l’artériole pénétrante. (C) Mesure de l’artériole pénétrante à l’artériole de la pie-mère.

La réponse à distance, la vasodilatation des vaisseaux en amont, est aujourd’hui supposée être induite par une propagation rétrograde de la vasodilatation et des ajustements locaux

de l'autorégulation à des changements de pressions intra-vasculaires induits par la dilatation en aval. Dans des réseaux vasculaires interconnectés, une coordination de la vasodilatation en amont et en aval est nécessaire pour augmenter le flux de manière effective sans priver les territoires voisins de leur perfusion sanguine nécessaire. La réponse vasculaire locale doit donc être coordonnée à la réponse vasculaire à distance. Pendant le NVC, les cellules endothéliales détectent et transmettent les signaux neurovasculaires en amont aux SMCs, les effecteurs responsables de la vasodilatation, ce qui augmente le CBF (B. R. CHEN et al., 2022). Un des mécanismes proposés est le suivant : les ions K⁺ relargués pendant l'activité neuronale induisent une hyperpolarisation endothéliale (LONGDEN et al., 2017), qui se propage de façon rétrograde aux cellules endothéliales adjacentes, probablement via des jonctions communicantes (ZECHARIAH et al., 2020). Au niveau des artérioles, l'hyperpolarisation se transmet de l'endothélium à des SMCs par un couplage électrique via les jonctions myoendothéliales, résultant in fine à une vasodilatation et une augmentation du CBF.

Implications pour l'imagerie fonctionnelle

Cette complexité spatio-temporelle de la régulation du CBF ne doit pas être oubliée pendant l'interprétation de données d'imagerie fonctionnelle qui exploitent le NVC. Notamment si la résolution spatiale ou temporelle de la modalité n'est pas assez fine pour capturer tous ces phénomènes. Elle invite à utiliser des modalités ayant les résolutions spatio-temporelles les plus fines possible.

Les variables systémiques peuvent compliquer l'évaluation des signaux utilisés en imagerie fonctionnelle. Par exemple, la pulsativité aortique et les fluctuations dues à la respiration peuvent avoir une influence sur le signal BOLD utilisé en IRM ou le signal fUS, et causer des oscillations à faibles fréquences. Or les oscillations faibles fréquences du signal BOLD sont utilisées pour étudier la connectivité fonctionnelle en fMRI ou en fUS. La prise en compte de ces variables systémiques est ainsi primordiale dans les études de neuroimagerie fonctionnelle ; cela souligne l'intérêt d'avoir une vue d'ensemble sur l'activité du cerveau.

3.11.2 L'imagerie fonctionnelle par Microscopie de Localisation Ultrasonore dans le paysages des autres modalités de neuroimagerie fonctionnelle

Au regard de ce qui a été décrit, il apparaît comme primordial pour une modalité de neuroimagerie fonctionnelle de combiner un large champ de vue, pour suivre les variations systémiques au niveau du cerveau entier, tout en ayant la résolution spatiale suffisante, micrométrique, qui permette d'étudier les modulations spatiales fines de la régulation du flux sanguin.

La plupart des modalités de neuroimagerie, comme le fMRI, le PET, la photoacoustique, le fNIRS ou le fUS exploitent le couplage neurovasculaire pour mesurer des changements locaux dans le flux sanguin ou l'oxygénation durant une activité neuronale. Mais toutes ces modalités, qui permettent d'imager l'ensemble du cerveau, n'atteignent pas des résolutions

micrométriques et sont plutôt limitées à la centaine de microns en imagerie préclinique ou au millimètre en imagerie clinique. À ces échelles mésoscopiques, un grand nombre de vaisseaux, qui plus est appartenant potentiellement à des compartiments vasculaires différents (artérioles, artérioles pré-capillaires, capillaires, veinules) participent au signal d'un voxel. Ces différents vaisseaux pouvant avoir des réponses très différentes, l'interprétation de ce signal mésoscopique est difficile.

Les modalités optiques en revanche permettent d'étudier avec une précision spatio-temporelle exceptionnellement fine ces différentes réponses et ont apporté beaucoup d'information sur le fonctionnement du couplage neurovasculaire au niveau local. Mais à cause du régime de diffusion multiple de la lumière dans les tissus, l'étendue du champ de vue est limitée et ces modalités ne permettent pas de rendre compte de l'information plus large échelle de l'architecture globale du système vasculaire et de son interaction avec les fluctuations locales dues à une activation. Les activations dans des zones subcorticales sont aussi très peu étudiées.

Ainsi le manque de technique d'imagerie qui permette un suivi quantitatif large champ avec une résolution microscopique explique en partie le nombre d'inconnues persistant autour de ce mécanisme aussi fondamental pour le fonctionnement du cerveau qu'est la régulation du flux sanguin.

3.11.3 Objectifs du chapitre

Maintenant que la preuve de concept d'une nouvelle modalité d'imagerie fonctionnelle large champ pouvant atteindre des résolutions micrométriques a été établie en chapitre 2, l'objectif de ce chapitre est d'étudier les possibilités de quantification de l'activité cérébrale par le fULM et ces apports par rapport aux autres modalités d'imagerie. On s'attachera ici à valider ses performances en matière de quantification sur des stimuli connus pour comparer les réponses obtenues par le fULM à des réponses connues établies par d'autres modalités d'imagerie. On montrera ainsi différentes analyses qu'il est possible de mener grâce aux données recueillies par le fULM. On discutera aussi des possibilités que peut représenter l'imagerie fULM pour la quantification de phénomènes encore mal décrits.

3.12 Reproductibilité et validation

Si la méthode a été illustrée dans le chapitre précédent sur un exemple, la même expérience de fULM a été faite sur plusieurs animaux pour s'assurer de la reproductibilité de la technique. Quatre rats ont été utilisés dans des expériences de stimulation des vibrisses et ont permis de mesurer la réponse obtenue par fULM dans les zones activées (S1BF et VPM). Cela a permis aussi de faire une analyse statistique sur les variations de flux et de vitesse de microbulles dans les artérioles et les veinules, à comparer aux valeurs communément obtenues dans la littérature par d'autres techniques d'imagerie fonctionnelle. Trois rats ont aussi été utilisés dans des expériences de stimulation visuelle pour mesurer la réponse obtenue par fULM dans le colliculus supérieur (SC).

3.12.1 Réponse fULM moyenne dans la zone activée

On utilise l'imagerie fUS (sans injection de microbulles) pour choisir la zone activée pour laquelle on souhaite extraire la réponse fULM. Les données Doppler de puissance sont analysées par une approche dite du Modèle Linéaire Global (GLM) pour obtenir des cartes de Z-score. Le principe est de décomposer le signal grâce à un ensemble de régresseurs (ici on utilise simplement le motif de stimulation) pondérés et un terme d'erreur puis de résoudre cette décomposition aux moindres carrés pour trouver la valeur des pondérations. On applique ensuite un t-test (hypothèse nulle : variations du signal indépendantes de la stimulation, i.e. pondération du régresseur de la stimulation égale à 0).

La figure 3.43A-B montre de telles cartes. Les zones activées correspondant au S1BF, VPM et SC sont choisies comme étant les pixels significatifs avec une valeur p (t-test) inférieure à 0.05 après correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples. La zone contrôle pour les stimulations de vibrisses est choisie par symétrie par rapport au S1BF activé dans le cortex contralatéral et celle pour les stimulations visuelles dans la partie caudale du cortex rétrosplénial.

Une fois que les zones activées ont été déterminées pour chacun des rats, les réponses fULM sont obtenues en sommant les valeurs de MB^F sur les deux dimensions spatiales des régions d'intérêt ou en moyennant les valeurs de V^S sur ces deux dimensions. Les signaux obtenus sont ensuite normalisés par la ligne de base pour obtenir des variations relatives.

La figure 3.43 montre ces réponses pour les 4 rats (moyenne \pm SEM). Le flux de microbulles augmente ainsi de $+17\pm 5\%$ dans le S1BF et de $+11\pm 3\%$ dans le VPM. La vitesse des bulles augmente quant à elle de $4.7\pm 2.1\%$ dans le S1BF et de $3.7\pm 4.9\%$ dans le VPM. Les réponses sont aussi données pour des stimulations visuelles (on y reviendra plus largement en 3.13.4). Le flux de bulles augmente de $+20\pm 8\%$ et la vitesse des bulles de $+4.4\pm 1.9\%$ dans le colliculus supérieur. Les réponses obtenues par le signal fUS sont données pour comparaison (figure 3.43E&H), on peut remarquer que la forme des réponses en MB^F sont similaires à celles obtenues en fUS, par exemple le pic initial en début de stimulation suivi par un plateau plus bas pour la stimulation visuelle, forme que l'on ne retrouve pas dans le profil temporel en vitesse.

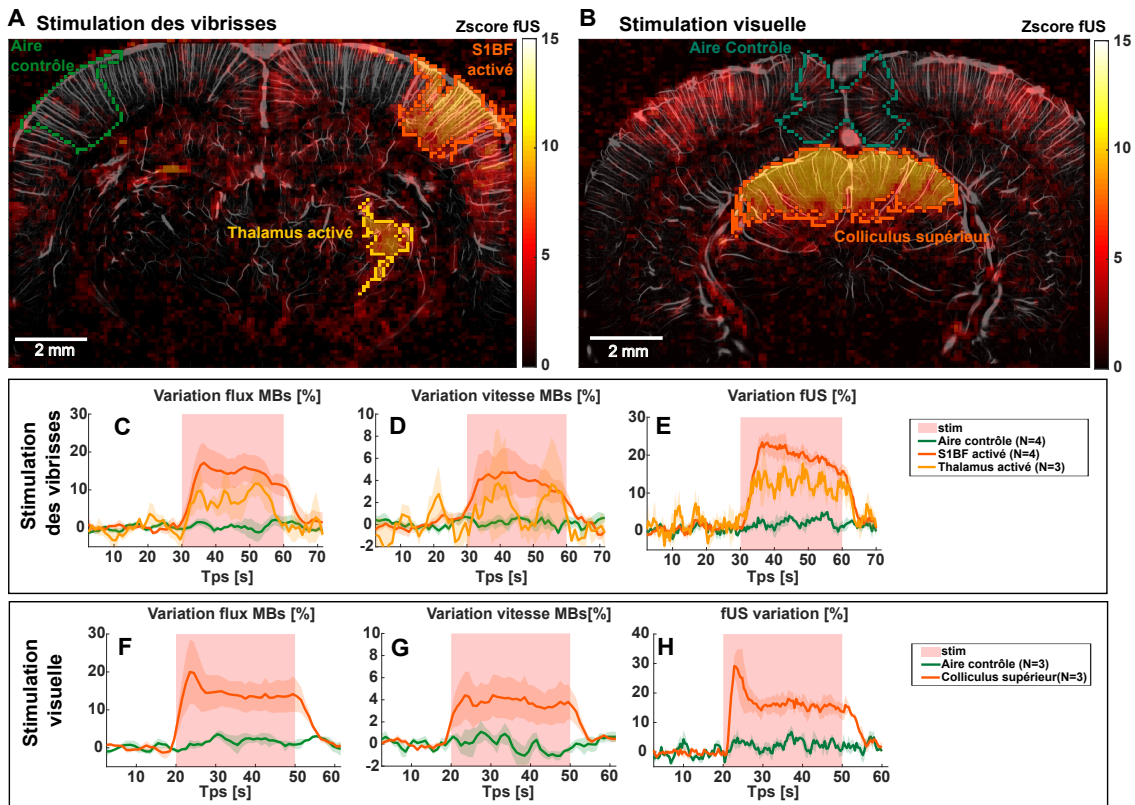


FIGURE 3.43 – Réponses temporelles inter-animales en nombre de MBs et en vitesse pendant l’hyperhémie fonctionnelle. (A-B) Imagerie fUS : exemples sur deux rats (A : stimulation des vibrisses, B : stimulation visuelle) des zones choisies pour extraire les réponses fonctionnelles. Une carte d’activation fUS (Z-score) est superposée à une carte de la vascularisation par ULM (nombre de MBs). Les zones activées sont choisies pour un seuil $p < 0.05$ après correction de Bonferroni. (C-D) Imagerie fULM : Variations du flux de MBs et de la vitesse des MBs dans le S1BF (N=4) et dans le VPM (N=3) pendant une expérience de stimulation des vibrisses. (F-G) Imagerie fULM : variations du flux de MBs et de la vitesse des MBs dans le SC (N=3) pendant une expérience de stimulation visuelle. (E&H) Variations du signal Doppler de puissance pour les expériences d’imagerie fUS correspondantes. Tous les profils temporels sont montrés en moyenne \pm SEM.

3.12.2 Analyse statistique sur le comportement des artéριοles et des veinules pendant une hyperhémie fonctionnelle

Pour se comparer aux valeurs obtenues dans la littérature, des quantifications des variations du flux et de la vitesse dans les artéριοles et les veinules pendant la stimulation de vibrisses ont été effectuées sur les quatre rats.

Pour chaque animal, l’acquisition est séparée en deux : les périodes de repos (0 : 30[70]s pour le motif de stimulation typique) et les périodes de stimulation (30 : 60[70]s). Puis on construit les cartes de nombre de bulles et de vitesse pour ces deux jeux de données. Pour chaque vaisseau, on définit un profil transversal, normal à la direction du flux (défini par $\tan^{-1}(\frac{V_x}{V_z})$ au centre du vaisseau, i.e. là où le nombre de microbulles est maximal) à la profondeur désirée.

Les profils en nombre de bulles et en vitesse sont ensuite extraits des cartes $MB_{rest}(x,z)$ ou $MB_{stim}(x,z)$ et $V_{rest}(x,z)$ ou $V_{stim}(x,z)$ suivant ce profil en moyennant sur une épaisseur de 50 μm . Les métriques suivantes sont extraites : nombre de microbulles maximum (i.e. nombre de microbulles au centre du vaisseau), vitesse au centre du vaisseau et diamètre (défini comme la largeur du vaisseau au seuil fixé par la mi-hauteur du profil au repos).

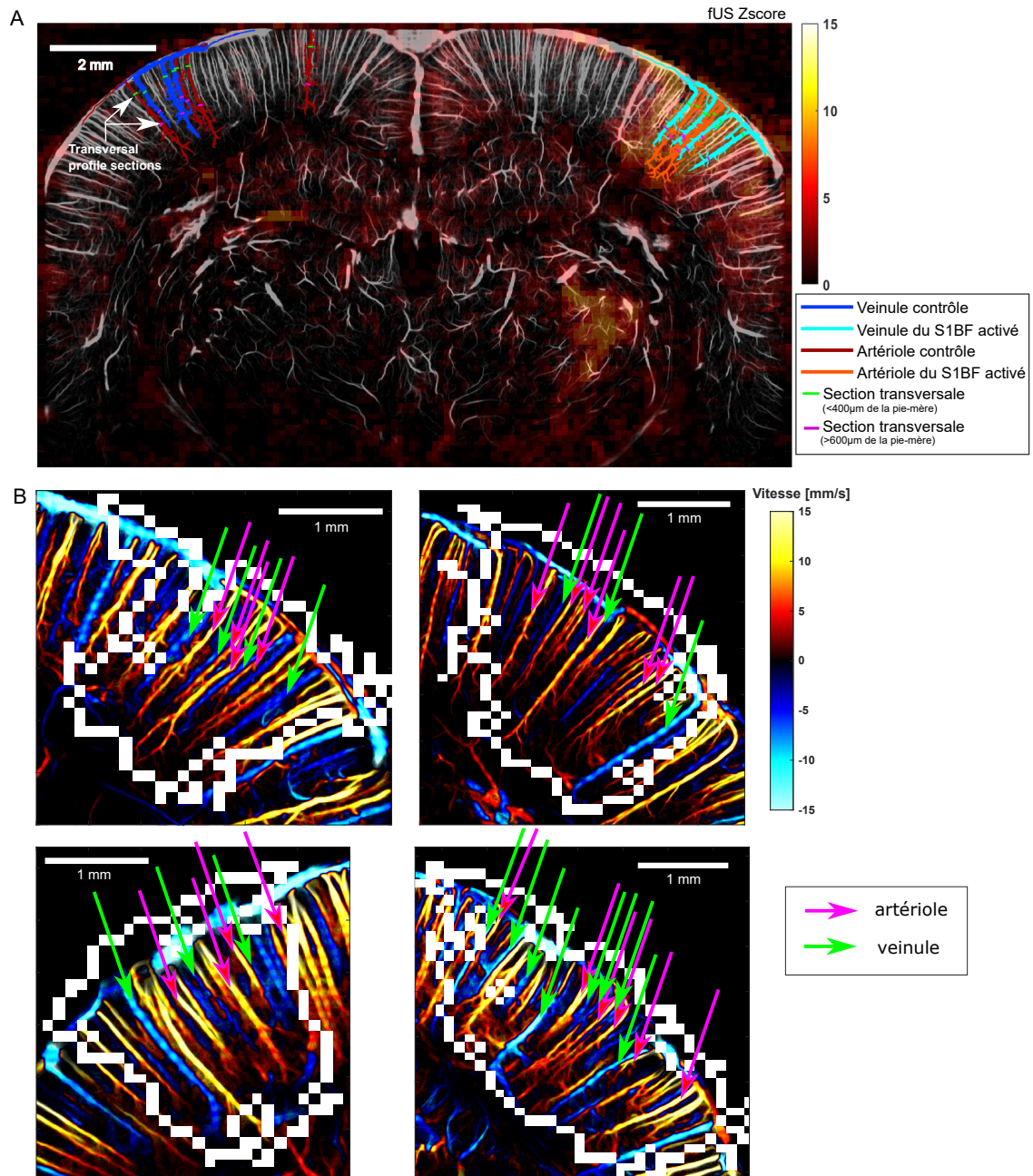


FIGURE 3.44 – (A) Illustration sur un rat de la sélection des vaisseaux du S1BF activé et des vaisseaux contrôles pour une stimulation des vibrisses. Les profils sont mesurés à deux profondeurs : $<400\mu\text{m}$ et $>600\mu\text{m}$ de la pie-mère. (B) Vaisseaux sélectionnés dans les S1BF activés (délimités en blanc) des quatre rats utilisés pour l'analyse statistique.

Pour la sélection des vaisseaux en vue de l'analyse statistique, on définit quatre catégories de vaisseaux : artérioles pénétrantes contrôles, veinules ascendantes contrôles, artérioles pénétrantes du S1BF activé, veinules ascendantes du S1BF activé. La zone correspondant au S1BF activé correspond à celle définie en section 3.12.1 par l'analyse GLM de la réponse fUS. Les vaisseaux des zones activées sont choisis aléatoirement dans ces zones, les vaisseaux contrôles sont choisis aléatoirement dans le cortex contra-latéral au S1BF activé. Un total de 20 artérioles contrôles et 20 artérioles du S1BF activé ont été choisies aléatoirement parmi les quatre rats (sur un total de 65 artérioles potentielles) et 18 veinules contrôles et du S1BF activé (sur 38 veinules potentielles). Pour chaque animal, au moins 3 vaisseaux sont sélectionnés par catégorie de vaisseaux et on extrait autant de vaisseaux contrôle que de vaisseaux du S1BF pour les veinules et pour les artérioles. La figure 3.44 montre un exemple de sélection de vaisseaux.

Les profils sont calculés pour chacun de ces vaisseaux à deux profondeurs : moins de 400 μm de la pie-mère et plus de 600 μm de la pie-mère (nous reviendrons sur cette deuxième profondeur dans la suite du chapitre).

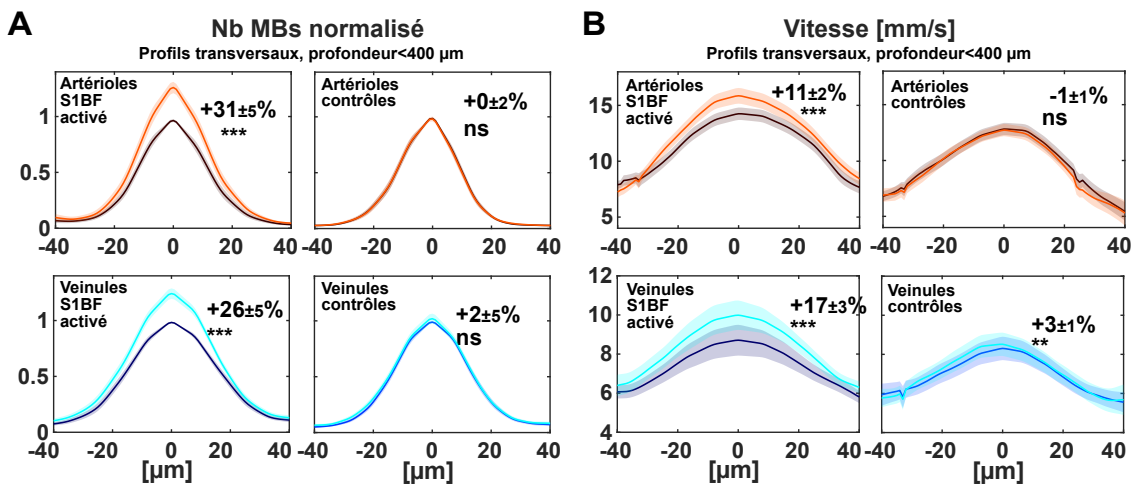


FIGURE 3.45 – Profils moyens (moyenne \pm SEM) en nombre de MBs (A) et vitesse (B) sur les sections transversales de N=20 artérioles et N=18 veinules à une profondeur < 400 μm de la pie-mère. Les valeurs indiquées correspondent aux variations relatives pendant la stimulation par rapport au repos, ainsi que les valeurs p (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) d'un test des rangs signés de Wilcoxon sur cette variation.

Les profils obtenus sont représentés en figure 3.45. Les artérioles étudiées ont un diamètre moyen autour de 25 μm et une vitesse moyenne de 14 mm/s au repos et les veinules un diamètre moyen autour de 30 μm et une vitesse autour de 8 mm/s au repos, pour les profils à moins de 400 μm de la pie-mère. On mesure pour les profils artériolaires des augmentations pendant l'hyperhémie fonctionnelle de 31±5% en nombre de bulles, 11±2% en vitesse et 19±3% en diamètre (moyenne \pm SEM). De même on mesure pour les veinules des augmentations de 26±5% en nombre de bulles, 17±3% en vitesse et 12±2% en diamètre.

La significativité de ces résultats a été vérifiée avec un test non paramétrique, certaines des variables ne suivant pas une distribution normale pour certaines des métriques (normalité testée

par test d'Anderson-Darling). Les résultats d'un test des rangs signés de Wilcoxon (hypothèse nulle : distribution avec médiane à 0) appliqué à la variation relative en stimulation par rapport au repos pour chacune de métriques (nombre de microbulles, vitesse, diamètre) sont donnés en figure 3.46 par leur valeur p.

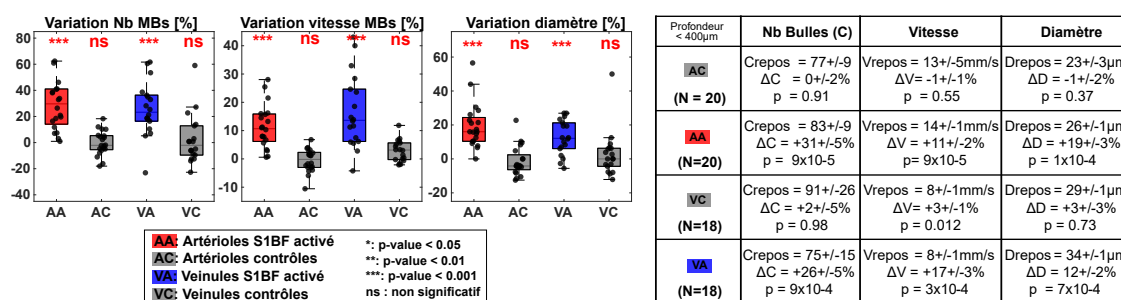


FIGURE 3.46 – Résultats des analyses statistiques. Gauche : Boîtes à moustache représentant les variations en nombre de MBs, en vitesse et en diamètre pour les profils transversaux des N=20 artérioles et N=18 veinules à une profondeur inférieure à 400 µm de la pie-mère. La marque centrale indique la médiane, et les bords les 25^e et 75^e centiles. Les moustaches délimitent les points extrêmes. Les valeurs individuelles sont superposées (points noirs) sur chaque boîte. Les résultats du test de Wilcoxon sont donnés au dessus de chaque boîte. Droite : Tableau résumant la valeur au repos, la variation relative pendant la stimulation par rapport au repos (moyenne ± SEM), et la valeur p du test des rangs signés de Wilcoxon pour le nombre de MBs, la vitesse et le diamètre et ce pour chaque catégorie de vaisseaux.

Ces résultats sont cohérents avec des résultats obtenus en microscopie biphotonique dans le cortex (artérioles de diamètres autour de 18 µm et vitesse autour de 9 mm/s au repos, augmentation de la vitesse de 17% et du diamètre de 12%) (GRUBB et al., 2020) ou dans le bulbe olfactif (artérioles de diamètre autour de 20 µm et de vitesse autour de 13 mm/s au repos, augmentation du diamètre de 20% et de la vitesse de 15%) (RUNGTA et al., 2018). On a aussi pu quantifier de grosses variations en terme de flux de bulles, de vitesse et de diamètres pour les veinules pendant l'hyperhémie fonctionnelle, ce qui est cohérent avec des études en IRM fonctionnelle et en microscopie biphotonique qui font état de larges augmentations du flux veineux pour des stimulations longues (J. J. CHEN et PIKE, 2010, DREW, SHIH et KLEINFELD, s. d.).

3.13 Outils d'analyse en fULM

On a ainsi pu valider que les valeurs quantitatives obtenues par le fULM sont en accord avec les mesures effectuées par d'autres modalités d'imagerie comme l'IRM fonctionnelle ou la microscopie biphotonique, et que les expériences de fULM ont pu fonctionner sur plusieurs animaux. Il s'agit maintenant de raffiner ces analyses pour illustrer les possibilités permises par l'analyse des données fULM.

3.13.1 Raffiner la réponse en tirant parti de la résolution spatiale : étude par compartiments vasculaires

La réponse à la stimulation montrée en 3.12.1 est une réponse moyenne sur toute la zone d'activation. Elle moyenne les réponses de vaisseaux différents et de compartiments vasculaires différents, dont la réponse peut pourtant différer. Cette réponse pourrait être très largement raffinée en s'appuyant sur la résolution microscopique apportée par l'ULM. En effet, cette résolution permet de résoudre les vaisseaux individuellement et donc de distinguer leur réponse. Ceci n'est pas possible en imagerie fUS ou en fMRI où un pixel mesure entre 100 μm et 1 mm et donc ne permet pas de résoudre les vaisseaux individuellement.

Pour cela le S1BF activé (défini comme en section 3.12.1) est segmenté en quatre compartiments : vaisseaux de la pie-mère, artérioles pénétrantes, veinules et vaisseaux intra-parenchymaux (les plus petits vaisseaux détectés en ULM, qui correspondent aux ordres 1 et 2 de branchement à partir de l'artériole). Une première segmentation de tous les vaisseaux est obtenue en appliquant un filtre dédié sur la carte du nombre de bulles total sur toute l'acquisition, filtre optimisé pour augmenter le contraste des structures vasculaires (implémentation 2D disponible sur Mathworks, ©Dirk-Jan Kroon 2009 and ©Tim Jerman, 2017). Les vaisseaux de la pie-mère sont sélectionnés manuellement dans cette segmentation comme étant les vaisseaux à la surface du cortex. Les artérioles sont distinguées des veinules grâce à la direction du flux ($V_z > 0$ pour les artérioles et $V_z < 0$ pour les veinules). Les pixels restants, correspondants aux branches d'ordre 1 et inférieur, sont regroupés dans la catégorie vaisseaux intra-parenchymaux.

Pour chacune de ces quatre catégories, des histogrammes dynamiques et les réponses temporelles au cours du motif de stimulation sont obtenus. Les histogrammes dynamiques sont créés en concaténant les histogrammes de vitesse de bulles pour chaque point temporel (largeur de regroupement de 1 mm/s). Ces résultats ont été obtenus sur 40 stimulations, les réponses temporelles sont données en moyenne \pm SEM pour 4 réponses temporelles calculées chacune sur 10 stimulations. Ils sont présentés en figure 3.47 et montrent que les réponses sont en effet différentes pour les quatre compartiments : en particulier, la variation relative apparaît ainsi comme étant la plus importante pour les vaisseaux intra-parenchymaux ($+49 \pm 9\%$ contre $+36 \pm 4\%$ pour les veinules, $+32 \pm 7\%$ pour les artérioles pénétrantes et $+26 \pm 3\%$ pour les vaisseaux de la pie-mère). Les réponses apparaissent différentes entre flux et vitesse à la fois dans la forme de la réponse (par exemple, plutôt un plateau pour la vitesse artériolaire alors que la vitesse pour

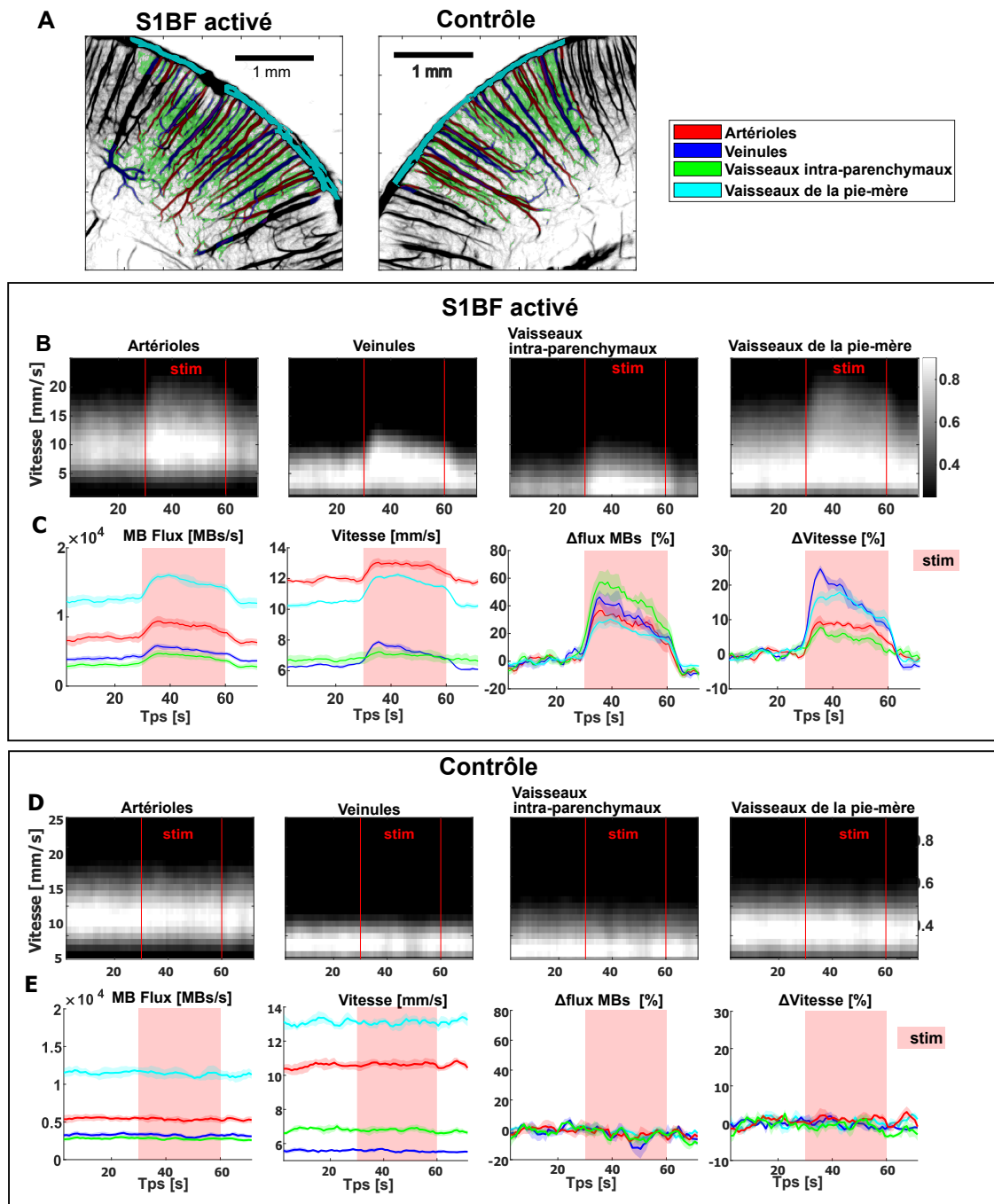


FIGURE 3.47 – Analyse par compartiment vasculaire. (A) Le S1BF activé est segmenté en quatre compartiments vasculaires : vaisseaux de la pie-mère, artérioles pénétrantes, veinules et vaisseaux intra-parenchymaux. De même pour la zone contrôle choisie de façon symétrique au S1BF activé dans le cortex contra-latéral. (B) Histogrammes dynamiques montrant la distribution de vitesses des MBs pour chaque compartiment défini en (A) et comment elle est modifiée pendant la stimulation (N=40 stimuli). (C) Flux moyen de MBs et vitesse moyenne (\pm SEM) pour N=4 décours temporels chacun obtenu sur 10 stimulations. Profils exprimés en valeur absolue (deux panels de gauche) ou en variation relative par rapport à la ligne de base (deux panels de droite). (D-E) Analyse analogue à l'analyse présentée en (B-C) pour la zone contrôle.

les veines montre plutôt une décroissance continue à mesure que le stimulus persiste) et en amplitude (les augmentations relatives ne sont pas maximales pour les mêmes compartiments entre flux de microbulles et vitesse des microbulles). L'étude de la zone contrôle confirme qu'on ne voit pas d'activation dans le cortex contra-latéral (cortex ipsi-latéral par rapport aux vibrisses stimulées).

Chaque microbulle jouant le rôle d'un capteur hémodynamique, l'estimation de paramètres quantitatifs moyens, comme le flux de microbulles ou leur vitesse, est faite sur un très grand nombre de ces capteurs ce qui donne une très bonne précision et une petite erreur standard. En effet sur 4 expériences de stimulation, l'erreur standard inter-essai pour le flux de microbulles est de 6.3% pour les artérioles, 5% pour les veinules, 3% pour les vaisseaux de la pie-mère et 8.5% pour les vaisseaux intra parenchymaux. Pour la vitesse, elle est de 0.8% pour les artérioles, 1.4% pour les veinules, 1.9% pour les vaisseaux de la pie-mère et 1.4% pour les vaisseaux intra-parenchymaux.

Comme cela a déjà été évoqué dans l'introduction de ce chapitre, des travaux récents ont démontré que le flux sanguin cérébral est principalement contrôlé par les cellules musculaires lisses impliquées dans des artérioles de plus de 10 μm (donc typiquement des vaisseaux que l'on peut détecter en ULM et qui correspondent aux compartiments vaisseaux intra-parenchymaux) et les "mesh" péricytes situées au niveau du premier embranchement à partir de l'artériole pénétrante. Ainsi le fULM apporte un point de vue complémentaire à ces travaux en confirmant que l'augmentation relative de flux est plus importante dans les vaisseaux intra-parenchymaux (artériole pré-capillaire d'ordre 1 et inférieur) que dans les artérioles pénétrantes.

On peut noter ici que la segmentation a été faite sur des critères morphométriques sur les vaisseaux et l'hémodynamique et non pas sur des marqueurs cellulaires qui permettent traditionnellement de faire la distinction entre artérioles, artérioles pré-capillaires et capillaires. Cependant cette description est souvent utilisée dans la communauté, par exemple en optique comme chez (ZAMBACH et al., 2021, HALL et al., 2014).

Ce résultat peut être retrouvé en utilisant l'analyse par SVD quantitative présentée en chapitre 2. On montre en figure 3.48 un zoom dans la zone activée de l'augmentation du nombre de bulles pendant la stimulation. On peut la comparer à une image de l'augmentation relative en nombre de microbulles par rapport aux périodes de repos, qui montre bien que l'augmentation relative est bien plus élevée dans les vaisseaux intra-parenchymaux que dans les artérioles pénétrantes. Cette augmentation relative est calculée selon la formule :

$$\Delta MB_{rel}(x, z) = \frac{\lambda_i U_{i=i_{stim}}(x, z) \{ \sum_{t_j \in stim} V_{i=i_{stim}}(t_j) - \sum_{t_j \in baseline} V_{i=i_{stim}}(t_j) \}}{\sum_{i=1}^{i_{stim}} \lambda_i U_i(x, z) \sum_{t_j \in baseline} V_i(t_j)} \quad (3.14)$$

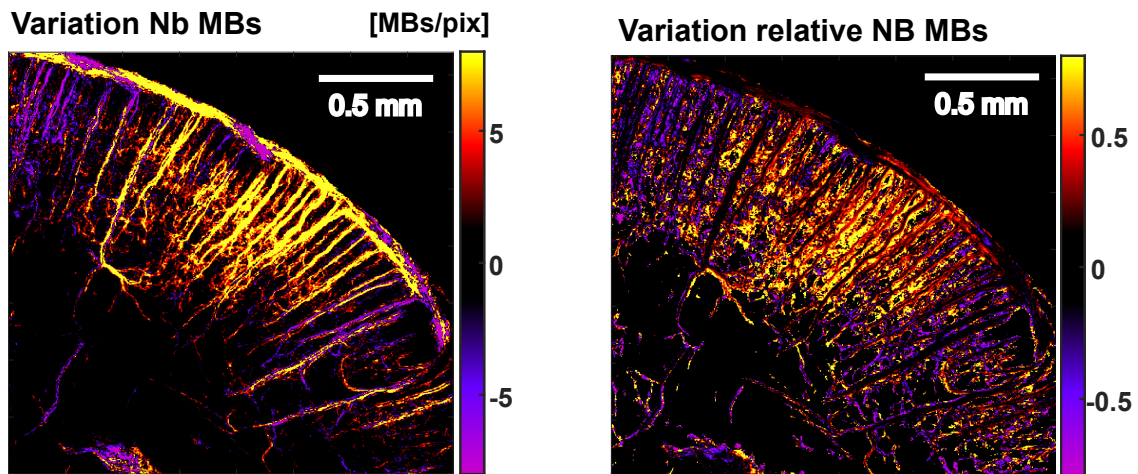


FIGURE 3.48 – Cartes d’activation fonctionnelle obtenues par analyse SVD sur le signal de flux de MBs. Quantification de la variation absolue du nombre de MBs pendant la stimulation (gauche) ou relative par rapport au repos (droite).

3.13.2 Raffiner la réponse en tirant parti de la résolution spatiale : étude par arbres vasculaires

Avec l’analyse précédente par compartiment vasculaire, on a séparé les différents compartiments vasculaires mais on a mélangé les réponses provenant de différents arbres vasculaires. Par arbre vasculaire, on entend la continuité d’un vaisseau qui trouve son origine dans la pie-mère pour pénétrer dans le cortex puis se ramifier en vaisseaux de plus en plus petits jusqu’aux capillaires. Il peut cependant être intéressant d’étudier le comportement d’un arbre vasculaire, par exemple d’une artériole pénétrante et de tous les vaisseaux qui en découlent indépendamment.

En effet, DUVERNOY, DELON et VANNON, 1981, qui ont proposé la classification la plus partagée des artères pénétrantes, notamment basée sur la profondeur corticale des vaisseaux et des bifurcations, ont postulé que les différents groupes d’artères étaient responsables de l’irrigation de différentes couches neuronales. GUIBERT, FONTA et PLOURABOUÉ, 2010 ont apporté certains arguments en faveur de cette hypothèse, en montrant que la profondeur de la région irriguée par un vaisseau corrélait fortement avec la profondeur du vaisseau. Il a aussi été montré que les bifurcations irriguant le lit capillaire étaient les plus nombreuses au niveau de la couche corticale 4 (SCHMID et al., 2017, BLINDER et al., 2013). Étudier de façon différenciée le comportement de différentes artérioles, par exemple en fonction de leur profondeur de pénétration, serait donc intéressant.

De plus, la réponse des différents vaisseaux peut varier en fonction de leur distance par rapport à la zone d’activation. Les variations relatives les plus importantes se situent près de la zone activée, puis diminuent au fur et à mesure. Des variations positives (dilatations) ont été détectées jusqu’à 3 mm de la zone activée mais à plus de 2 mm ce sont surtout des variations négatives (constrictions) qui ont pu être mesurées (DEVOR, TIAN et al., 2007, DEVOR, HILLMAN

et al., 2008). Selon HALL et al., 2014, 50% des artères pénétrantes suivies répondent à l'activation, mais la question de leur répartition par rapport à la zone activée n'est pas toujours claire.

Dans le cas de stimulation des vibrisses, en fonction de l'activation plus forte d'une vibrisse ou de l'autre, des tonneaux différents peuvent être plus ou moins activés et donc des vaisseaux différents plus ou moins sollicités. D'autant que la régulation du flux dépend aussi de la longueur du stimulus. BERWICK et al., 2008 ont montré que si la réponse vasculaire était large pour des stimuli courts, au fur et à mesure que la stimulation persiste la zone irriguée se limite progressivement à une zone restreinte autour du tonneau associée à la vibrisse stimulée.

On s'attache donc dans ce paragraphe à présenter des analyses rendues possible par les données FULM pour étudier le comportement d'un arbre vasculaire.

Dans un premier temps, on peut caractériser les variations des différentes métriques (nombre de bulles, vitesse et diamètre) le long d'une artériole pénétrante ou d'une veinule particulière dont on souhaite étudier le comportement (figure 3.49).

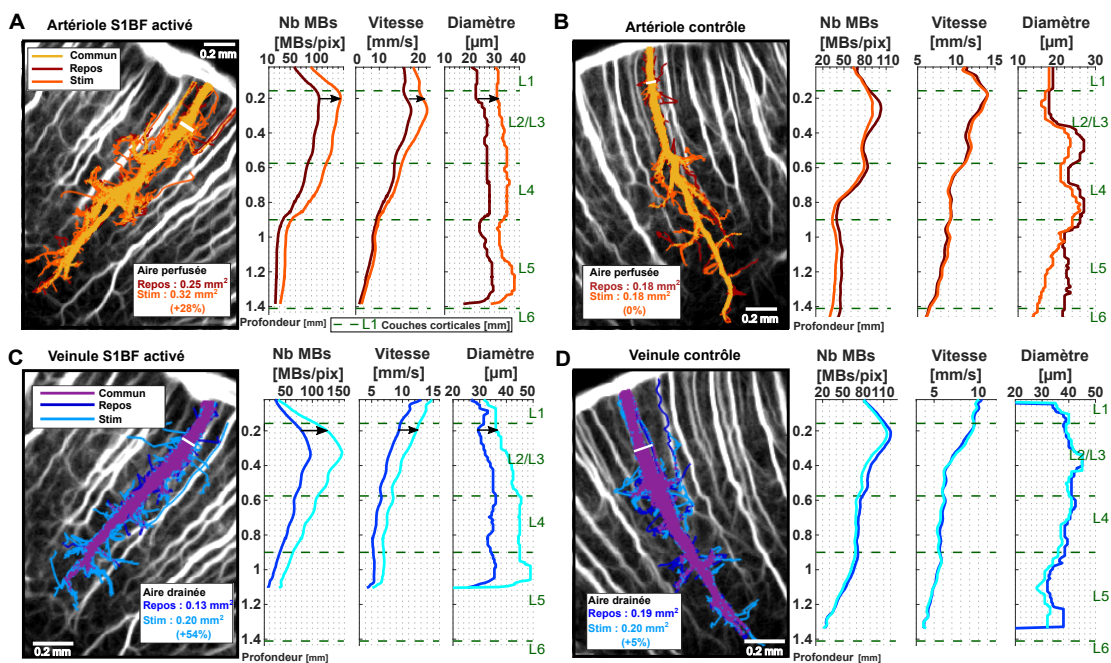


FIGURE 3.49 – Quantifications le long des vaisseaux en nombre de MBs, vitesse et diamètre pendant le repos et pendant la stimulation pour des artérioles (A-B) et des veinules (C-D) du S1BF activé (A,C) et contrôles (B,D). L'identification de chaque trajectoire de MBs permet de choisir spécifiquement les MBs qui sont entrées par une section des artérioles ou ont été évacuées par une section des veinules. Ces trajectoires sont superposées en couleurs différenciées, selon si elles correspondent à des périodes de repos ou de stimulation, sur une carte de la vascularisation. À titre d'indication, les profondeurs typiques des couches neuronales sont indiquées (L1, L2...) selon les valeurs données par (MEYER et al., 2013).

Pour cela la ligne centrale du vaisseau d'intérêt est isolée et pour chaque pixel (corres-

pendant à chaque profondeur), le profil transversal et ses métriques associées (nombre de bulle, vitesse et diamètre) est extrait (de la même manière qu'en 3.12.2). Ainsi, la variation de ces métriques pendant la stimulation peut être étudiée tout au long du vaisseau (par exemple +38%, +24% et +37% pour l'artériole et +60%, +30% et +22% pour la veinule à 200 μm sous la pie-mère) pour les vaisseaux du S1BF activé, alors qu'aucune variation n'est observée sur les vaisseaux contrôles.

Pour compléter cette analyse, on peut s'intéresser à tout l'arbre vasculaire dont est à l'origine une artériole ou qui est drainée par une veinule en particulier. L'ULM permet en effet de traquer des bulles sur des trajectoires longues. Cette représentation Lagrangienne des flux de microbulles permet de démêler l'étendue spatiale des vaisseaux en aval ou en amont d'une entrée artériolaire ou d'une sortie veineuse. Cette approche peut faire penser à ce que l'on peut faire pour les neurones en IRM de diffusion, pour laquelle on peut reconstruire les faisceaux de matière blanche en s'intéressant à la direction de diffusion des molécules d'eau, ou aux techniques de marquage neuronal qui permettent de tracer les projections neuronales afférentes et efférentes des tissus nerveux.

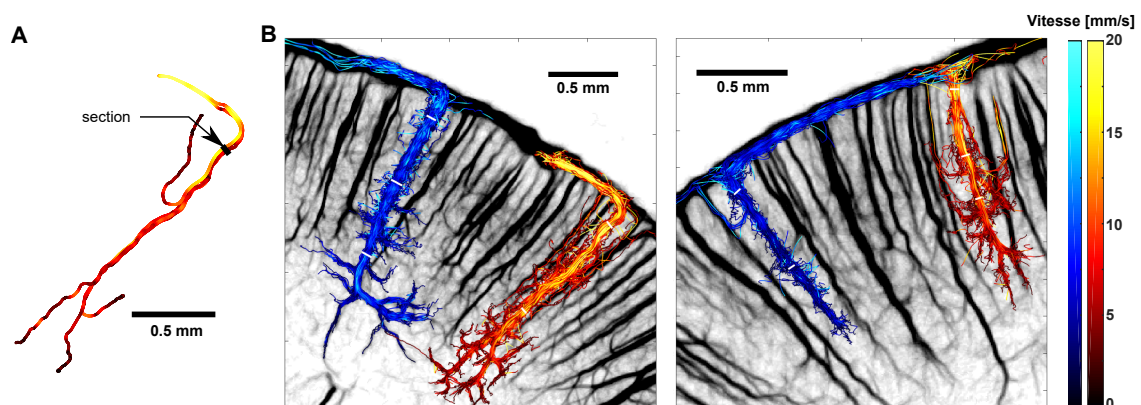


FIGURE 3.50 – Description lagrangienne des vaisseaux sanguins. (A) Un segment est placé sur une profil transversal d'un vaisseau. Toutes les trajectoires de microbulles qui traversent ce segment sont isolées. Exemple avec 4 trajectoires traversant le segment noir. (B) Exemples d'une artériole et d'une veinule pénétrant profondément dans le cortex. Les trajectoires sélectionnées sont celles traversant les segments blancs. (C) Même analyse qu'en (B) pour une artériole et une veinule plus courtes.

On illustre cette possibilité en figures 3.50, 3.51 et 3.52. Une entrée (ou une sortie) est choisie en plaçant un segment sur une artériole (ou une veinule) près de la pie-mère. Chaque bulle qui est passée pendant l'acquisition par ce segment est sélectionnée. On peut voir par ailleurs sur ces figures et sur la figure 3.51 la capacité de l'ULM à détecter les premiers ordres de ramification à partir de l'artériole (ordres 1 et 2 de bifurcations des artérioles pré-capillaires à partir des artérioles pénétrantes). On reconnaît aussi des caractéristiques morphologiques de vaisseaux bien décrites dans DUVERNOY, DELON et VANNSON, 1981. Par exemple, les bifurcations

pour les veinules sont perpendiculaires à l'axe de pénétration alors qu'elles sont plutôt à 45° pour les artérioles.

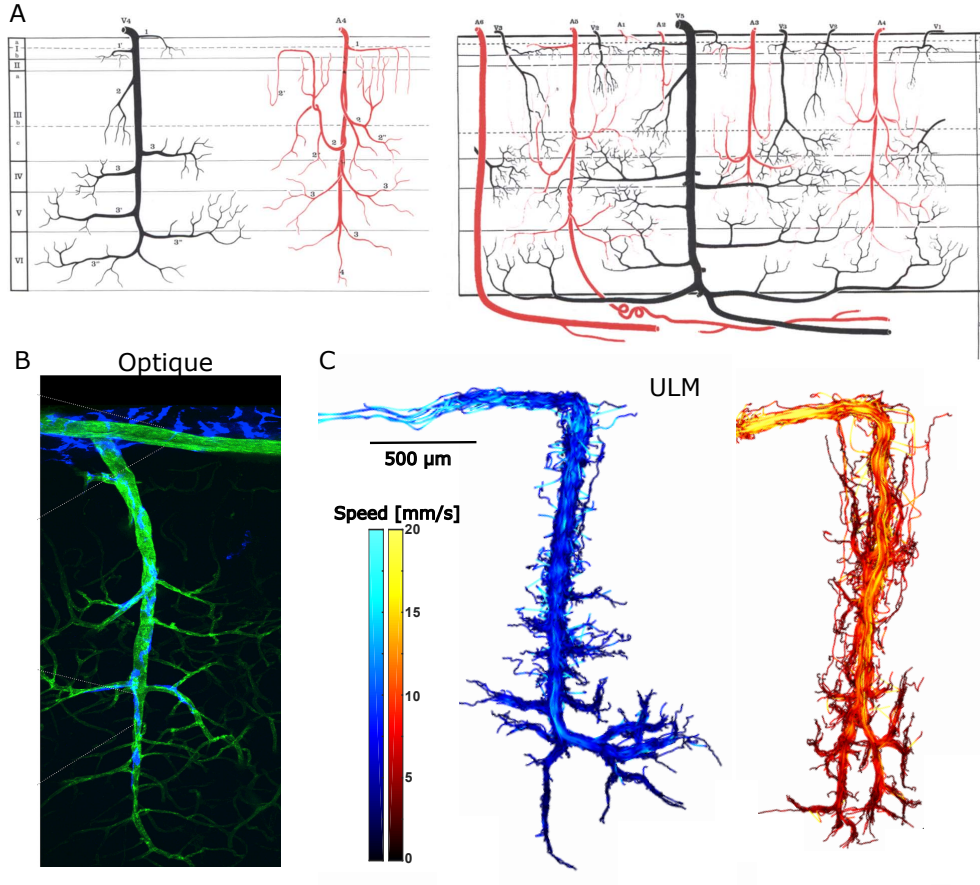


FIGURE 3.51 – (A) Gauche : Représentation schématique d'une artériole et d'une veinule intra-corticale typique. Droite : Représentation schématique de la classification des artérioles et veinules intra-corticales en fonction de leur profondeur de pénétration et de leurs ramifications. D'après DUVERNOY, DELON et VANNSON, 1981 (B) Image de microscopie d'une artériole pénétrante, d'après IADECOLA, 2017. (C) Trajectoires de MBs d'une veinule (gauche) et d'une artériole (droite) par ULM

Les modifications de cet arbre vasculaire entre les périodes de repos et de stimulation peuvent être étudiées, en séparant les bulles passées pendant les périodes de repos de celles passées pendant la stimulation. En arrondissant les positions de tous ces bulles à la taille du pixel ULM (6.5 μm) on peut calculer un indice de perfusion (pour les artérioles) ou de drainage (pour les veinules) en calculant l'aire occupée par toutes ces bulles. Ainsi, l'indice de perfusion pour l'artériole du S1BF activé illustrée en figure 3.49 a augmenté de 28% et l'aire drainée par la veinule de 54% alors que les aires pour les deux vaisseaux contrôles sont restées stables (+0% et +5%).

Cette approche lagrangienne présente l'avantage de s'affranchir du côté probabiliste des données ULM. En effet, arrivée à une bifurcation, une bulle peut passer dans une ou l'autre des

branches (en suivant une probabilité donnée par le ratio des flux), et avoir une approche par pixel peut être compliquée. L'approche par pixel est particulièrement justifiée pour des pixels où le flux est suffisant (cas des pixels de la ligne centrale de vaisseaux pénétrants), mais si l'on pense être à la limite de sensibilité pour les pixels des petits flux, l'approche lagrangienne permet en quelque sorte de s'affranchir du chemin choisi par la bulle et du côté probabiliste des données ULM.

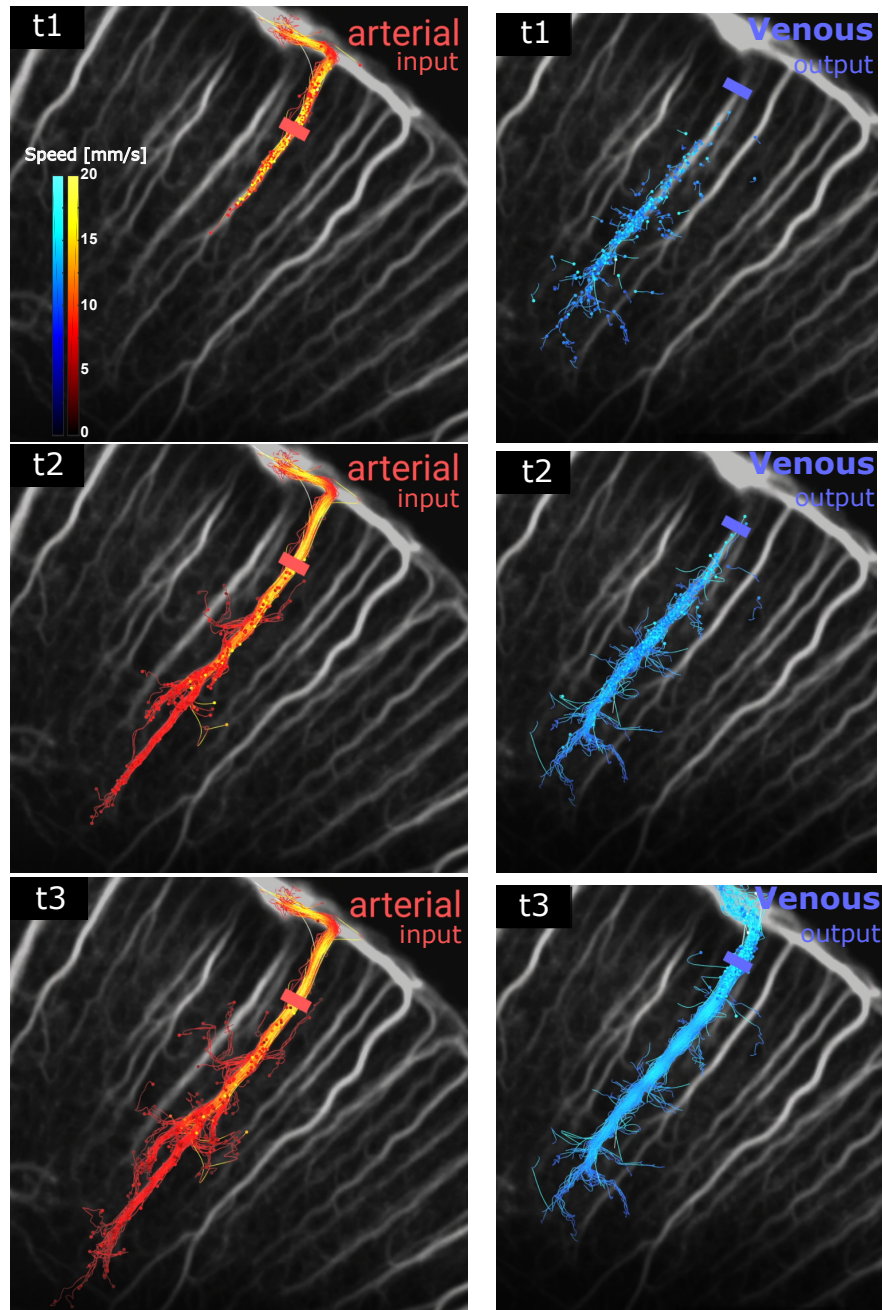


FIGURE 3.52 – Description lagrangienne des vaisseaux sanguins. Un segment est placé sur un profil transversal d'un vaisseau (gauche : artériole; droite : veinule). On peut alors suivre dans le temps les trajectoires de toutes les microbulles traversant ce segment.

L'analyse statistique présentée en figure 3.53 sur les métriques de nombres de bulles, vitesse des bulles et diamètre a été complétée avec l'analyse de cette nouvelle métrique. L'indice de perfusion des artérioles du S1BF activé a augmenté de $+21\pm 4\%$ (valeur p de 0.0002) et celui de drainage des veinules du S1BF activé de $+16\pm 5\%$ (valeur p de 0.002), alors qu'il ne varie pas dans les contrôles ($-1\pm 2\%$ pour les artérioles et $+2\pm 2\%$ pour les veinules).

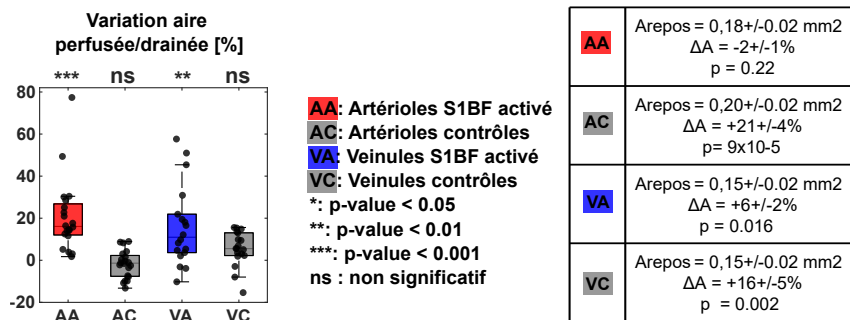


FIGURE 3.53 – Résultats de l'analyse statistique sur les aires perfusées (artérioles) et drainées (veinules). Gauche : Boîtes à moustache représentant les variations des aires pour N=20 artérioles et N=18 veinules. La marque centrale indique la médiane, et les bords les 25^e et 75^e centiles. Les moustaches délimitent les points extrêmes. Les valeurs individuelles sont superposées (points noirs) sur chaque boîte. Les résultats du test de Wilcoxon sont donnés au-dessus de chaque boîte. Droite : Tableau résumant la valeur au repos, la variation relative pendant la stimulation par rapport au repos (moyenne \pm SEM), et la valeur p du test des rangs signés de Wilcoxon.

3.13.3 Étude de la variation en profondeur

Sur l'artériole du S1BF activé montrée en exemple en figure 3.49, il apparaît que l'augmentation en flux de bulles est maintenue sur toute la profondeur alors que l'augmentation en vitesse ne concerne que les premières centaines de microns en-dessous de la pie-mère. En profondeur, l'augmentation du diamètre reste revanche élevée.

L'analyse statistique présentée en 3.12.2 a alors été effectuée sur des profils plus profonds dans le cortex (à plus de 600 μm de la pie-mère) pour étudier ce comportement (figure 3.54). Pour les artérioles, l'augmentation en nombre de bulles est encore de $+27\pm 6\%$ mais l'augmentation en vitesse seulement de $+4\pm 1\%$ alors qu'une augmentation du diamètre de $22\pm 4\%$ est observée. Pour les veinules, l'augmentation est assez stable ($+22\pm 8\%$ en nombres de bulles, $+16\pm 3\%$ en vitesse et $+13\pm 4\%$ en diamètre). La différence de variations sur les vitesses dans les artérioles entre les deux profondeurs est significative (p-value de 0.002, test de rangs signés de Wilcoxon, hypothèse nulle : différence entre les deux variables vient d'une distribution de médiane nulle).

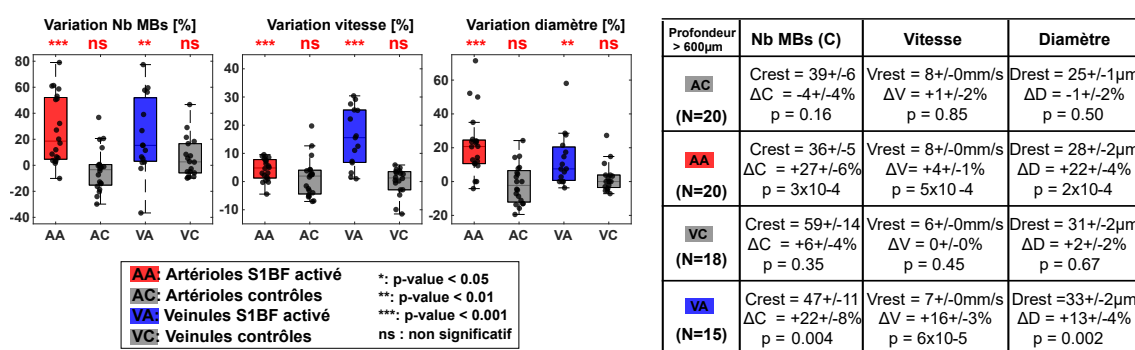


FIGURE 3.54 – Analyse statistique à une deuxième profondeur. Gauche : Boîtes à moustache représentant les variations en nombre de MBs, en vitesse et en diamètre pour les profils transversaux des N=20 artérioles et N=18 veinules à une profondeur supérieure à 600 µm de la pie-mère. La marque centrale indique la médiane, et les bords les 25^e et 75^e centiles. Les moustaches délimitent les points extrêmes. Les valeurs individuelles sont superposées (points noirs) sur chaque boîte. Les résultats du test de Wilcoxon sont donnés au dessus de chaque boîte. Droite : Tableau résumant la valeur au repos, la variation relative pendant la stimulation par rapport au repos (moyenne ± erreur standard), et la p-value du test des rangs signés de Wilcoxon.

Ce résultat peut se retrouver en regardant les cartes d'activation en nombre de bulles et en vitesse obtenues pas l'analyse SVD (Fig. 3.55). Si l'augmentation en flux semble concerner toute la longueur des artérioles, l'augmentation de la vitesse des bulles n'apparaît que dans la partie supérieure du cortex.

À ces deux cartes, on peut ajouter une carte de dilatation/constriction (figure 3.56), obtenue en soustrayant une segmentation de la vascularisation sur la carte en nombre de bulles pendant la stimulation MB_{stim} à celle au repos MB_{rest} . La dilatation des vaisseaux y est visible, notamment en profondeur, ce qui est cohérent avec une augmentation du flux en profondeur malgré une faible augmentation de vitesse.

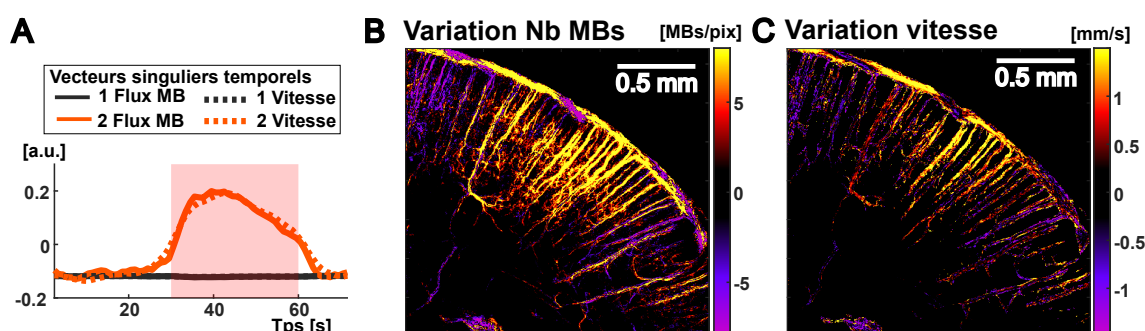


FIGURE 3.55 – Cartes d'activation fonctionnelle obtenues par analyse SVD sur le signal de flux de MBs ou le signal de vitesse moyenne des MBs. (A) Vecteurs singuliers temporels correspondant à la ligne de base et à la stimulation. (B) Vecteur singulier spatial correspondant à la stimulation (N=2) pour la SVD appliquée au signal de flux des MBs. (C) Vecteur singulier spatial correspondant à la stimulation (N=2) pour la SVD appliquée au signal de vitesse moyenne des MBs.

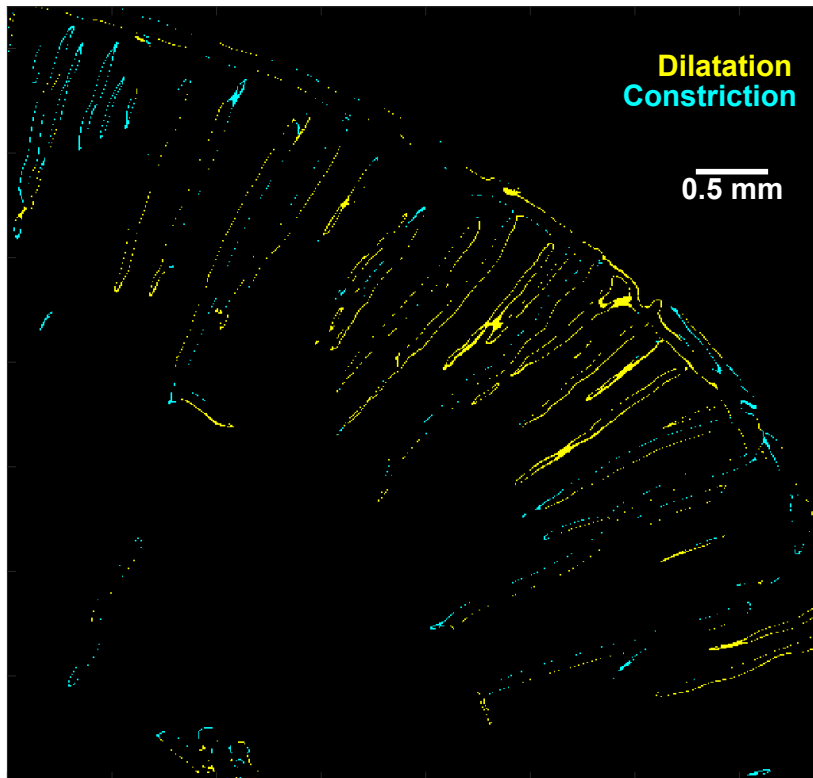


FIGURE 3.56 – Carte de dilatation/constriction des vaisseaux pendant une expérience de stimulation des vibrisses.

Étude couche corticale

Comme décrit rapidement en introduction (section 1.1.1), la distribution neuronale varie dans le cortex, composé de 6 couches corticales, et avec elle varie la demande métabolique. Les projections neuronales arrivent par exemple dans la couche 4 du cortex somatosensoriel et du cortex visuel pour les stimulations des vibrisses et visuelles respectivement. Il serait intéressant pour une modalité de neuroimagerie fonctionnelle de pouvoir observer des différences de réponses entre les différentes couches corticales. Certaines études en microscopie biphotonique (GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ et al., 2016) et en fMRI de haute résolution (GOENSE, MERKLE et LOGOTHETIS, 2012, HUBER et al., 2015, T. KIM et S.-G. KIM, 2010) ont montré que les réponses hémodynamiques variaient en fonction de la profondeur.

Dans cette étude en fULM, la réponse à l'activation a été quantifiée par profondeur corticale en moyennant la réponse de la carte quantitative en nombre de bulle sur les pixels de la même profondeur corticale (en ne prenant que les pixels appartenant à la zone activée, comme définie en section 3.12.1). Les résultats sont données en figure 3.57. Le pic initial sur la variation absolue du nombre de bulle correspond aux vaisseaux de la pie-mère et donc à la profondeur 0. Cet exemple nous montre que la variation relative en nombre de bulles se situe autour d'une profondeur de 700 μm qui correspond en effet à une profondeur typique de la couche corticale 4. Ainsi, cet exemple semble confirmer une hyperhémie plus importante dans la couche corticale 4 du cortex somato-sensoriel suite à une stimulation des vibrisses.

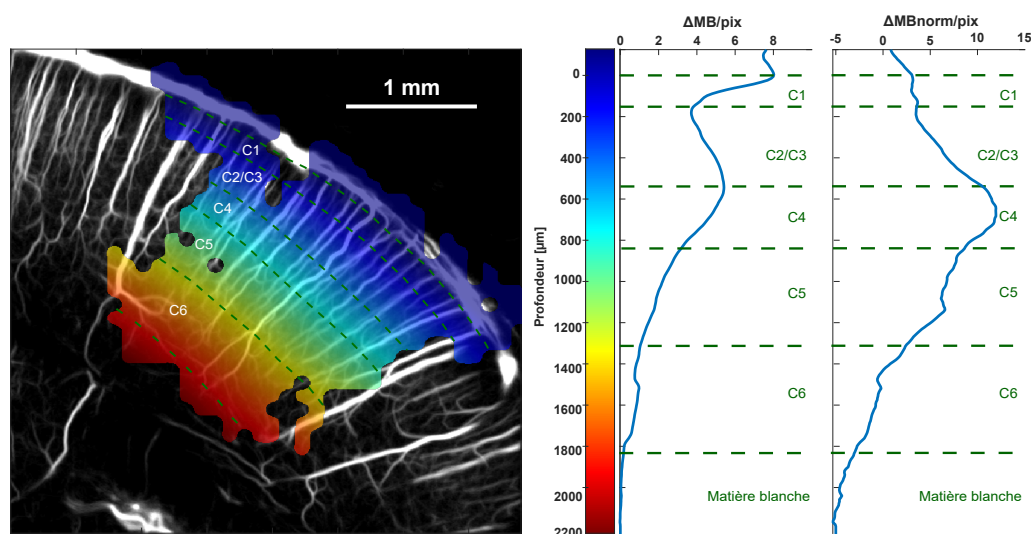


FIGURE 3.57 – Variation moyenne en fonction de la profondeur corticale du nombre de MBs par pixel. Cette variation est donnée en valeur absolue et valeur relative par rapport au repos. La profondeur correspondante est représentée en couleur superposée à une carte de la vascularisation. À titre d'indication, les profondeurs typiques des couches corticales sont indiquées (C1, C2...) selon les valeurs données par (MEYER et al., 2013).

3.13.4 Imagerie large champ et en profondeur

La majorité des résultats évoqués jusqu'à présent sont des réponses à une stimulation des vibrisses, et les réponses étudiées l'ont été dans le cortex. Ce stimulus bien connu et largement étudié a été choisi pour pouvoir confronter nos résultats à ceux de la littérature et aux résultats fournis par des méthodes optiques en particulier.

Mais il est à noter que l'intérêt majeur du fULM et la possibilité d'imager tout le cerveau du rongeur. L'intérêt est double. Premièrement, il permet d'étudier des stimuli qui activent des zones en profondeur dans le cerveau, notamment sous corticales. Deuxièmement, cela permet d'étudier la réponse dans tout le cerveau simultanément. Par exemple dans le cas où plusieurs zones sont activées (par exemple cortex et thalamus pour des stimulations de vibrisses) ou pour étudier les interactions entre régulation systémique et couplage neurovasculaire dans la zone activée. Cela permet par exemple de monitorer des variations hémodynamiques globales au niveau du cerveau et des changements systémiques simultanément à l'étude de l'hyperhémie fonctionnelle dans la zone activée.

Pour illustrer cette possibilité de quantification en profondeur, on montre ici les réponses obtenues dans des vaisseaux du thalamus (figure 3.58) pour la même expérience que les résultats montrés en 3.13.2 pour des vaisseaux du cortex. On peut aussi montrer les résultats obtenus dans le colliculus supérieur pour une stimulation visuelle (figure 3.59).

La réponse moyenne dans le SC sur N=3 animaux a aussi été quantifiée et a déjà été abordée en 3.12.1.

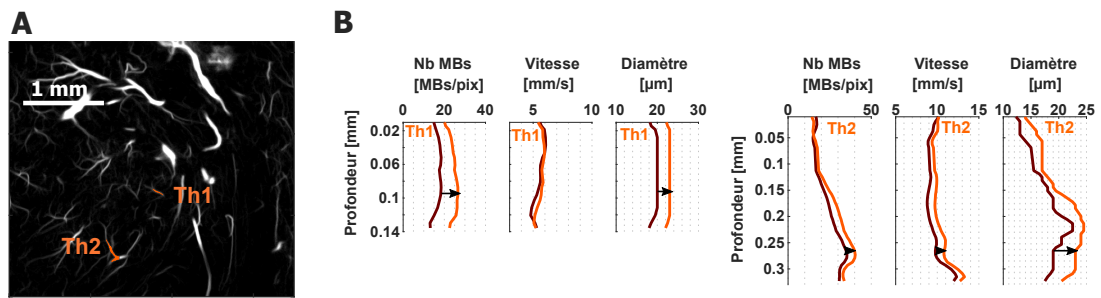


FIGURE 3.58 – Imagerie fonctionnelle dans des zones sous corticales pendant une stimulation de vibrisses (A) Sélection de deux vaisseaux sanguins (orange) dans le thalamus activé. (B) Quantifications des profils en nombre de bulles, en vitesse et en diamètre pour les vaisseaux sélectionnés, au repos et pendant la stimulation.

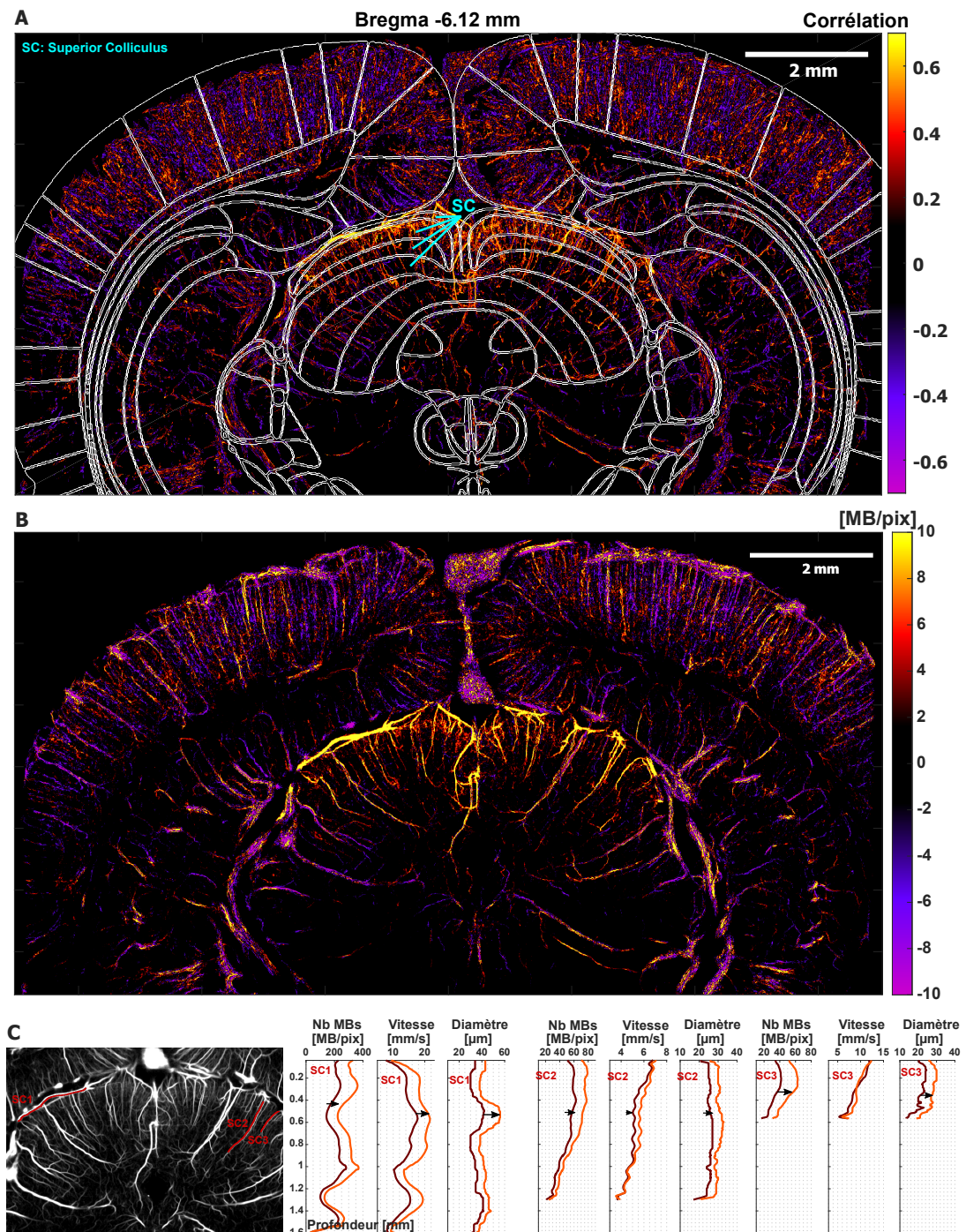


FIGURE 3.59 – Imagerie fonctionnelle large champ et dans des zones sous corticales pendant une stimulation visuelle. (A) Carte d'activation fonctionnelle obtenue par analyse par corrélation sur le signal de flux de MBs, superposée au plan coronal à Bregma = -6.12mm de l'atlas de Paxinos et Watson (PAXINOS et WATSON, 2006). (B) Carte d'activation fonctionnelle quantitative obtenue par analyse SVD sur le signal de flux de MBs (même signal qu'en (A)). (C) Gauche : Sélection de trois vaisseaux sanguins (rouge) dans le SC activé. Droite : Quantifications des profils en nombre de bulles, en vitesse et en diamètre pour les vaisseaux sélectionnés, au repos et pendant la stimulation.

3.14 Limites actuelles et pistes d'amélioration

Le fULM tel qu'il a été développé jusqu'à maintenant a aussi des limitations.

Tout d'abord, comme expliqué déjà au chapitre 2, sa sensibilité peut apparaître comme trop faible pour l'étude de certains phénomènes, notamment dans les plus petits vaisseaux. Des pistes ont cependant été explorées au chapitre 2 pour augmenter cette sensibilité. La possibilité d'un élargissement de la méthode à la 3D a aussi été abordée en chapitre 2.

D'autres limites sont plutôt liées aux conditions expérimentales que nécessite pour l'instant le fULM, des conditions qui sont non physiologiques. Tout d'abord, à cause de la craniotomie et de la pose d'un cathéter dans la veine jugulaire avec injection de microbulles, le rat est sous anesthésie. La possibilité de faire du fULM en transcranien a été explorée et des premiers résultats seront montrés en section 3.15.1.2, même si la qualité des images n'est aujourd'hui pas encore satisfaisante. Une autre possibilité serait de poser une prothèse transparente aux ultrasons après la craniotomie qui permet de faire de l'imagerie ultrasonore sans la barrière du crâne chez l'animal éveillé, comme dans BERGEL et al., 2018. En ce qui concerne le cathéter, des essais d'injection continue par la queue sont prometteurs, afin d'être moins invasif. Il nous semble ainsi que le fULM sera possible chez des animaux éveillés dans des conditions tête fixée (comme par exemple avec le setup commercialisé par Neurotar, déjà utilisé en des études en fUS (FERRIER et al., 2020, BERTOLO et al., 2021)). Il est à noter que la majorité des études en fMRI et en fUS sont aussi effectuées chez l'animal anesthésié.

De plus, une quantité relativement importante de fluide est injectée pendant les expérimentations (3.5 mL/h pendant environ 20 minutes). Même si une grande partie est évacuée par les urines, une influence est possible sur certains paramètres physiologies comme l'hématocrite, la pression artérielle et la pression partielle en différents gaz, paramètres cruciaux pour l'hémodynamique cérébrale. Une possibilité serait d'utiliser des concentrations en microbulles plus élevée dans la solution injectée. Un suivi de ces paramètres physiologiques (en plus du rythme cardiaque et respiratoire) pourrait aussi être mis en place. Si des effets majeurs de l'hémodynamique cérébrale avait lieu, notre technique serait par ailleurs potentiellement capable de les suivre, puisque toute la vascularisation sanguine cérébrale est imagée.

Une autre question d'importance, qui n'est pas spécifique au fULM mais à l'ULM en général, est de savoir si les microbulles sont des capteurs fidèles de l'hémodynamique. En effet, les globules rouges et les microbulles ont des propriétés en terme de mécanique des fluides qui peuvent différer, en plus d'être présents dans des concentrations largement différentes. En particulier, les RBCs ont une viscosité et une densité différente du plasma et ne prennent pas forcément les mêmes chemins préférentiels que les plasma ("plasma skimming") aux bifurcations. Ainsi, les microbulles suivent-elles aussi les mêmes chemins que les RBCs?

Comparé aux modalités optiques, le fULM n'a accès qu'à des informations vasculaires et hémodynamiques. Ainsi la discrimination entre les différents segments vasculaires ne se base que sur des descripteurs morphométriques et ne peut pas s'appuyer sur des marqueurs cellulaires (SMCs, péricytes...). Cette description est cependant largement utilisée dans la littérature (HALL et al., 2014, ZAMBACH et al., 2021).

Si les bifurcations d'ordre 1 et 2 sont détectées, la limite de détection dans l'arbre vasculaire n'est pas claire et les capillaires d'ordres supérieurs sont sûrement sous détectés. Cependant, comme expliqué en introduction de ce chapitre, la première branche semble un des sites majeurs de la régulation (HALL et al., 2014, ATTWELL et al., 2016, BERTHIAUME et al., 2018), et les variations dans les plus petits vaisseaux seraient attribuées à des modifications passives.

De même, le fULM ne donne pas accès à l'oxygénation du sang, qui est aussi un paramètre d'intérêt concernant l'activité vasculaire (contrairement à la photoacoustique, à plusieurs méthodes optiques ou au fMRI).

3.15 Perspectives

3.15.1 Vers l'imagerie fonctionnelle clinique transcrânienne ?

3.15.1.1 Introduction : difficulté du fUS transcrânien clinique.

Le Doppler ultrasonore transcrânien est utilisé en clinique avec des sondes basse fréquence (1-3 MHz). Il permet entre autre en routine de faire un diagnostic de mort cérébrale, mais aussi d'estimer le flux sanguin en un point, généralement dans les grosses artères principales comme l'artère cérébrale moyenne. Quelques études ont aussi été réalisées pour étudier des réponses à des stimuli; par exemple, une augmentation de la vitesse dans les artères cérébrales postérieures artères en réponse à un stimulus visuel (AASLID, 1987) ou des études sur la latéralisation du cerveau en comparant la vitesse maximale du flux au repos et pendant des tâches dans l'hémisphère gauche et dans l'hémisphère droit au niveau de l'artère cérébrale moyenne (DEPPE et al., 2000). Cependant, il ne s'agit que d'une mesure en un point et dans les grosses artères du cerveau et ce Doppler fonctionnel transcranien n'a pas les capacités d'une vraie modalité de neuroimagerie fonctionnelle.

Si les preuves de concept et les études utilisant l'imagerie fonctionnelle ultrasonore se sont multipliées en imagerie préclinique, sa translation en clinique reste réservée à certaines applications très ciblées, à cause de la barrière du crâne qui atténue une grande partie de l'énergie ultrasonore (atténuation de 1.5 Np/cm à 1 MHz). Elle a montré tout son intérêt chez le nouveau-né (DEMENÉ, PERNOT et al., 2014, BARANGER et al., 2021) ou en per-opératoire (IMBAULT et al., 2017).

En revanche, très récemment DEMENÉ, ROBIN et al., 2021 ont fait la preuve de la possibilité de faire de la microscopie par ultrasons (ULM) en clinique à travers le crâne par la fenêtre temporale, avec la capacité de distinguer la systole de la diastole ou de mettre en lumière des vortex dans des anévrismes. L'utilisation des microbulles, beaucoup plus échogènes permet d'augmenter la sensibilité et ainsi d'être capable d'imager des flux cérébraux en transcrânien. L'utilisation de l'ULM apparaît donc comme un moyen prometteur pour pouvoir réaliser de la neuroimagerie fonctionnelle par ultrasons en clinique.

3.15.1.2 Preuve de concept fULM transcrânien préclinique

La première étape est de réaliser une preuve de concept de fULM en transcrânien chez l'animal. Tous les résultats montrés jusqu'à présent ont été réalisés sur des rats avec craniotomie. Des premiers essais ont été réalisés sur des rats sans craniotomie. Pour cela, seulement la peau est retirée, puis la solution saline et le gel échographique sont déposés directement sur le crâne. Le principal problème auquel nous avons été confrontés en imagerie transcrânienne est la présence de « stripe artifact », bien décrit dans la littérature (VIGNON et al., 2010) qui conduisent à la formation de zone d'ombre dans lesquelles il est difficile de récupérer du signal. Cela peut être expliqué par des aberrations du front d'onde ultrasonore dues à la courbure de sillons

présents sur la surface interne du crâne au niveau des gros vaisseaux de la pie-mère (qui se comportent comme des lentilles déformant le front d'onde). Chez le rat, on observe souvent une zone d'ombre au centre, sous le sinus veineux (zone d'ombre qui chevauche souvent le colliculus supérieur) et deux zones latérales (qui impactent la visualisation du S1BF).

Des résultats ont tout de même pu être obtenus (figure 3.60), même si les images sont de bien moins bonne qualité qu'en imagerie avec craniotomie et l'analyse par SVD parvient à isoler un mode pour l'hyperhémie fonctionnelle (mode 2). Les stripes artifact impactent malheureusement la grande partie des zones fonctionnelles d'intérêt (S1BF et SC) mais sur les bords des régions qui ont pu être imagées, une quantification apparaît tout de même comme possible.

Enfin, les données ont été traitées de la même manière que pour l'imagerie avec craniotomie, or des techniques de correction d'aberrations existent et pourraient être appliquées pour gagner du signal dans les zones d'ombre (DEMENÉ, ROBIN et al., 2021).

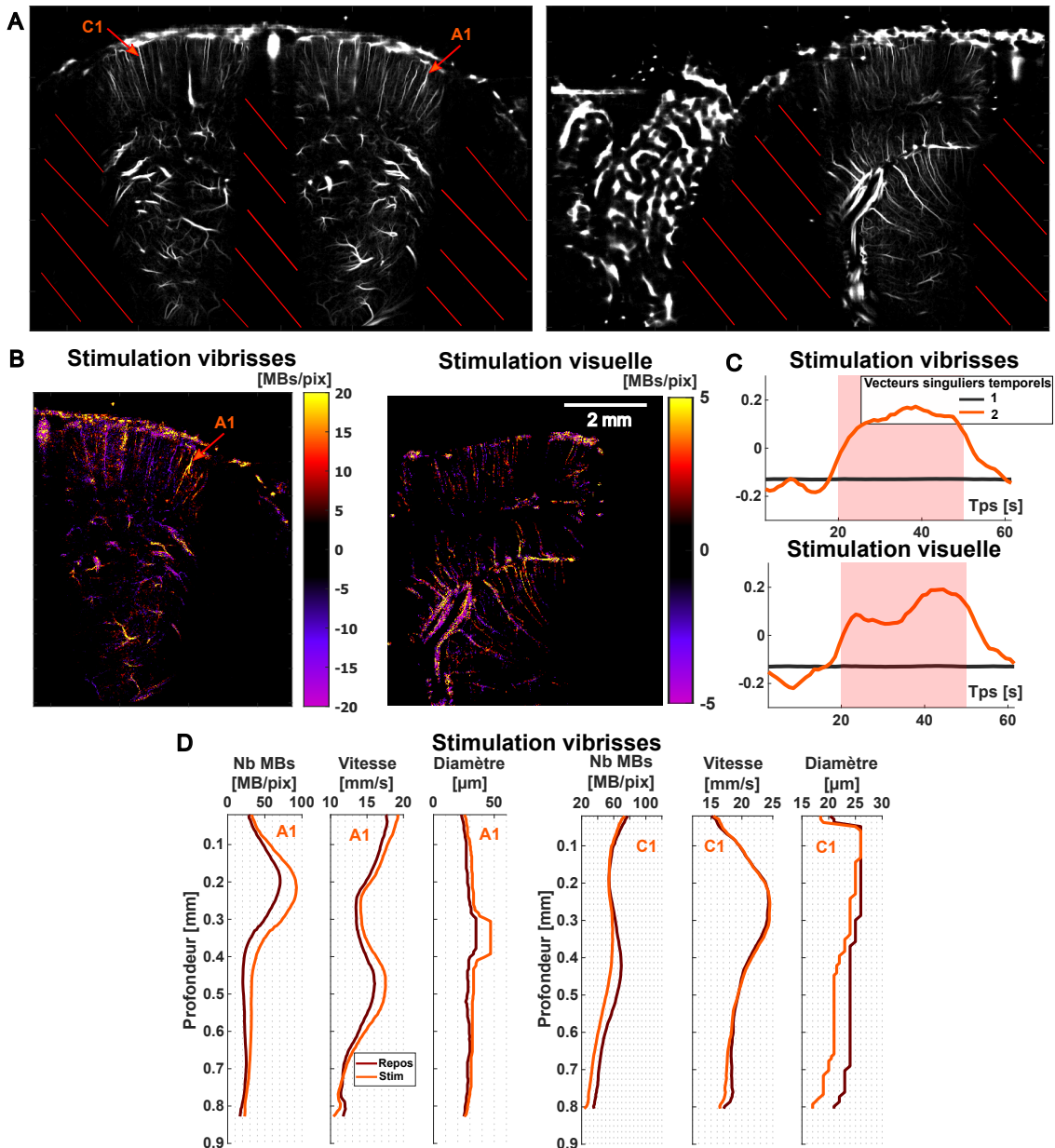


FIGURE 3.60 – (A) Plans d’imagerie transcrânienne (pour une stimulation des vibrisses à gauche et une stimulation visuelle à droite) sur lesquelles les cônes d’ombre créés par le stripe artifact sont signalés par des traits rouges. (B) Cartes d’activation fonctionnelle obtenues par analyse SVD sur le signal de flux de MBs. (C) Vecteurs singuliers temporels associés à la stimulation. (D) Quantifications le long des vaisseaux en nombre de MBs, vitesse et diamètre pendant le repos et pendant la stimulation pour les vaisseaux A1 et C1 montrés en (A) et (B).

3.15.1.3 Un protocole expérimental dédié pour le fULM transcrânien clinique

La translation de l'imagerie préclinique vers l'imagerie clinique nécessite la modification du dispositif expérimental. Des premiers outils pour aller vers un dispositif permettant d'établir une preuve de concept d'imagerie fonctionnelle ultrasonore transcrânienne en clinique ont été développés. L'objectif de cette partie est de décrire ces premières pistes, et de présenter les problématiques qui risquent de se poser pour pouvoir aller jusqu'à la preuve de concept clinique. Ces outils ont été développés avec Victor Blanvillain, en stage au laboratoire.

Prototype de dispositif expérimental

Pour faire de l'imagerie ultrasonore transcrânienne, plusieurs fenêtres sur le cerveau sont possibles, mais la plus courante est la fenêtre trans-temporale. Même à travers cette fenêtre, le crâne humain reste beaucoup plus épais que celui du rat (et il existe une très grande variabilité intra patients) et obtenir une image anatomique (BMode) qui permette de se placer dans le plan d'intérêt n'est pas aisé. Quelques repères existent, comme le tronc cérébral qui dessine une forme de papillon hypoéchoïque sur le BMode ou les principales artères en imagerie Doppler, notamment la MCA. Mais ils ne sont pas toujours facilement observables et ne permettent pas de se placer dans un plan d'imagerie précis. L'idée est donc d'utiliser des données IRM pour se placer. Pour le patient d'intérêt, deux séquences d'IRM sont effectuées, une imagerie anatomique (contraste T1) et une imagerie de la vascularisation (séquence Time of flight, TOF). Sur l'IRM anatomique, la zone d'intérêt (qui sera activé pendant la stimulation) est repérée et le plan d'imagerie est choisi.

La mise en place d'un système de neuro-navigation permet ensuite de superposer les images ultrasonores acquises en temps réel sur les images IRM. Pour cela, une référence avec de marqueurs réfléchissants est fixée sur le patient de façon solidaire à la boîte crânienne. Une autre référence est fixée à la sonde ultrasonore de façon solidaire. Une caméra permet de repérer les marqueurs et ainsi les déplacements respectifs des deux références dans l'espace. Une étape de recalage avec des repères anatomiques (coins de yeux, oreilles, commissures des lèvres...) permet de calibrer le système, et de placer le champ de vue de la sonde dans le référentiel du patient (et de son IRM).

Ainsi, en bougeant la sonde, par exemple au niveau de la tempe du patient, il est possible d'avoir la coupe de l'IRM anatomique qui correspond au champ de vue de la sonde. On peut aussi superposer la coupe IRM et l'image ultrasonore obtenue. La séquence TOF permet alors de vérifier le bon alignement des deux modalités d'imagerie en vérifiant que les grosses artères, visibles en Doppler ultrasonore sont bien superposées.

Une partie du travail a consisté à développer un prototype qui permette :

- de fixer la référence de façon solidaire au crâne.
- de placer la sonde sur la fenêtre trans-temporale, de pouvoir l'orienter librement dans un premier temps pour choisir le plan d'imagerie puis de pouvoir être fixée une fois le plan choisi pour limiter les artefacts de mouvement.

- d'insérer la neuronavigation dans le dispositif expérimental

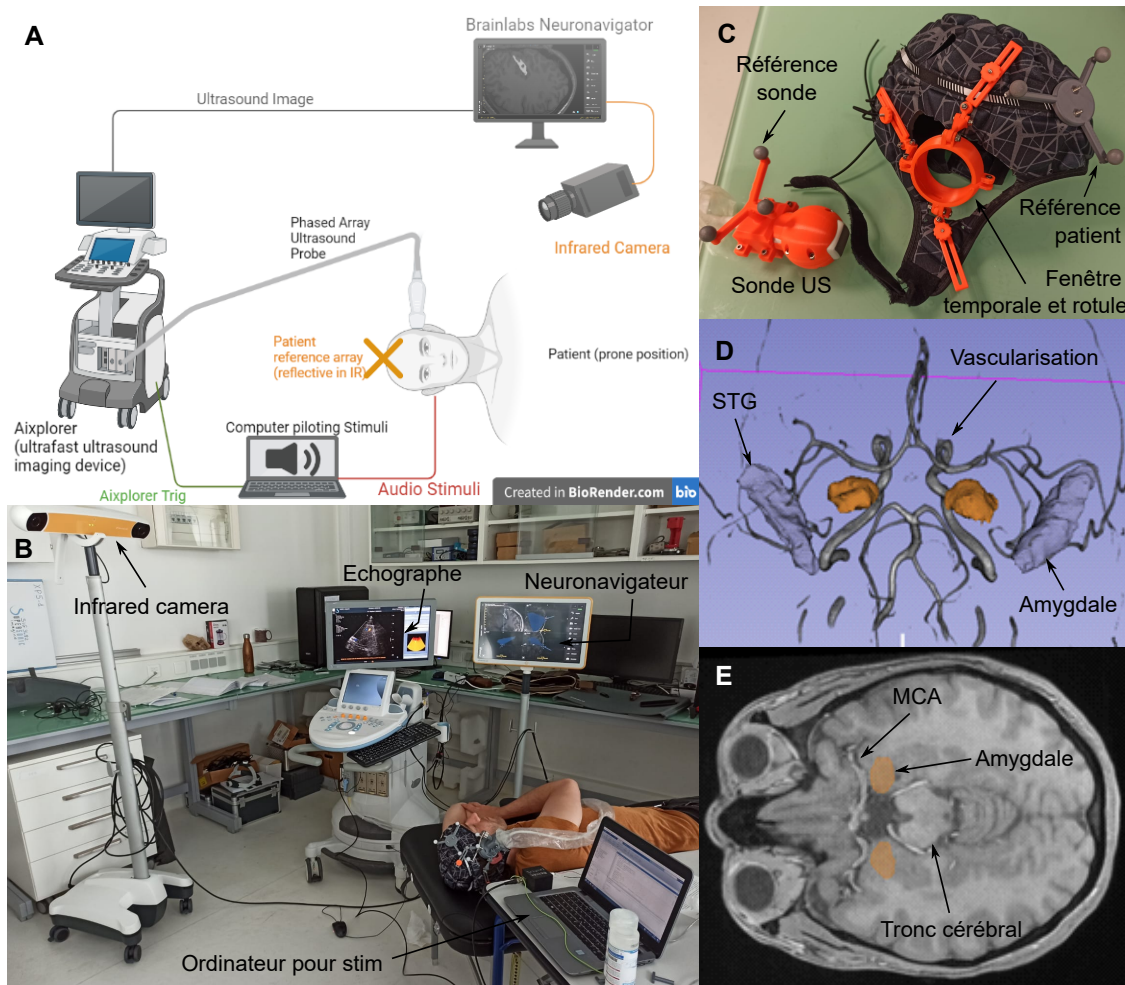


FIGURE 3.61 – (A) Schéma du dispositif expérimental. (B) Photographie du dispositif expérimental. (C) Photographie de la sonde ultrasonore et du casque porte-sonde. Une référence (avec boules réfléchissantes pour la caméra infrarouge) est fixée sur la sonde ultrasonore qui peut s'insérer dans une rotule au niveau de la fenêtre temporale dans le casque, sur lequel est fixée une référence. (D) Segmentation de la vascularisation (sur laquelle on peut voir le polygone de Willis), des gyrus supérieurs temporaux et des amygdales sur les données IRM. (E) Coupe IRM dans un plan coupant les amygdales; Le T1 et le TOF ont été fusionnés pour pouvoir se placer grâce à l'anatomie et à la vascularisation.

Stimulation

Le choix de la stimulation est aussi un paramètre à considérer avec attention. En effet, les stimulations des vibrisses par exemple ne peuvent évidemment pas être utilisées, et il faut choisir une zone activée dans le champ de vue d'une imagerie transcrânienne trans-temporale. Le cortex auditif peut être une solution envisagée. Le cortex auditif primaire se situe dans le gyrus de Heschl, dans le lobe temporal. Les IRM ont été segmentées à l'aide du logiciel Freesurfer (© FreeSurfer, 2013), largement utilisé dans la communauté IRM. La segmentation du gyrus de Heschl et l'utilisation du neuronavigateur ont permis de confirmer que cette zone pouvait être

visible sur les plans d'imagerie par la fenêtre trans-temporale. L'idée serait alors de stimuler le cortex avec un bruit blanc en répétant plusieurs fois le motif de stimulation.

L'amygdale pourrait être une autre structure d'intérêt car elle se situe largement dans la fenêtre trans-temporale, dans un plan d'imagerie classiquement utilisé en imagerie ultrasonore transcrânienne (avec des repères facilement identifiables sur imagerie BMode et Doppler (tronc cérébral et MCA)). En IRM, des études ont montré qu'il était possible de stimuler l'amygdale, impliquée dans le traitement des émotions fortes, en utilisant des stimuli auditifs émotionnellement connotés, comme le bruit d'une fraise de dentiste (YU et al., 2015).

Séquences d'imagerie

Pour faire des premiers essais sans injection de microbulles, des séquences ultrasonores ont été calibrées pour faire de l'imagerie Doppler ultrarapide. Si les valeurs des indices mécaniques (liées notamment à la pression ultrasonore maximale) ne sont pas limitantes du point de vue des normes, les paramètres thermiques eux, liés à la chauffe de la sonde et à l'absorption thermique par le crâne le sont. Ce point risque d'être un des points cruciaux pour la mise en place d'une modalité d'imagerie fonctionnelle ultrasonore transcrânienne clinique.

Un autre enjeu concerne le flux de données pour l'acquisition et l'enregistrement, dans la mesure où un enregistrement continu de données ultrasonores serait optimal pour pouvoir faire de l'imagerie fonctionnelle. Cet enjeu était moins présent en imagerie préclinique dans la mesure où le champ de vue était beaucoup plus petit et donc les données pour une image beaucoup moins lourdes.

À la fois pour des problèmes de normes thermiques et de sauvegarde des données, des séquences avec une acquisition non continue ont été choisies pour le moment. Cela ajoute une difficulté car il faut alors bien choisir comment le signal sanguin va être échantillonné par la séquence ultrasonore en regard du motif de stimulation choisi.

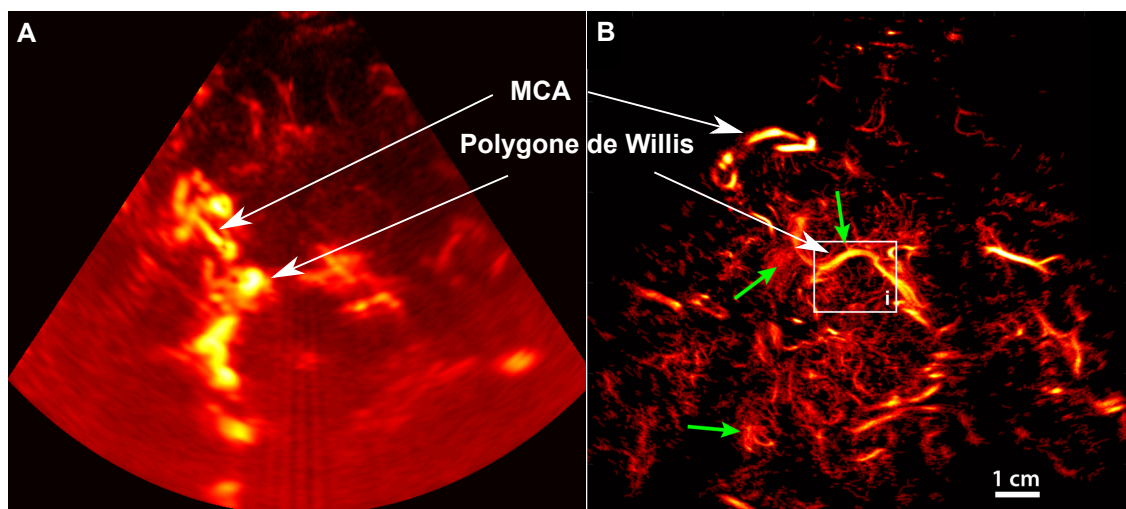


FIGURE 3.62 – (A) Imagerie Doppler ultrarapide clinique transcrânienne trans-temporale. (B) Imagerie ULM clinique transcrânienne trans-temporale, d'après DEMENÉ, ROBIN et al., 2021

Des séquences pour l'imagerie transcrânienne avec injection de microbulles en ULM ont été calibrées dans le cadre de DEMENÉ, ROBIN et al., 2021. et ces séquences pourront sûrement être reprises, la difficulté étant encore une fois la longueur des échantillons et le temps entre chaque échantillon acceptable pour pouvoir faire de l'imagerie fonctionnelle et donc échantillonner correctement la réponse hémodynamique, tout en respectant les normes et en maîtrisant le flux de données.

La thèse de Victor Blanvillain aura pour objet de continuer ce projet et d'aboutir à une preuve de concept de neuroimagerie fonctionnelle clinique en transrânien.

3.15.2 Vers d'autres applications que la stimulation fonctionnelle? Cas de la dépression corticale envahissante

L'application considérée jusqu'à présent (qu'elle soit chez le rongeur ou chez l'humain, avec craniotomie ou en transcranien) consiste en l'étude d'une hyperhémie fonctionnelle en réponse à un stimulus répété. Il serait cependant très intéressant de pouvoir élargir le fULM à l'étude de phénomènes non répété et/ou à des activités spontanées. On peut penser par exemple à l'étude de la connectivité fonctionnelle ou à celle des migraines ou des dépressions corticales envahissantes.

La nature non répétitive de ces phénomènes rend l'application du fULM plus compliqué, car c'est cette répétition qui permettrait de résoudre le compromis entre temps d'acquisition et sensibilité aux petits flux. Des premiers résultats sur un rat présentant des phénomènes de dépression corticale envahissante montrent que le fULM pourrait malgré tout être étendu à de tels phénomènes.

Une dépression corticale envahissante correspond à des ondes de dépolarisation des neurones qui se propagent lentement dans le cortex à des vitesses comprises entre 1.5 et 9.5 mm/min. Cette onde se manifeste au niveau du flux sanguin par une augmentation du volume sanguin suivie par une diminution, prolongée dans le temps (vasodilatation suivie d'une vasoconstriction prolongée, BRENNAN et al., 2007). Mais la relation entre le phénomène parenchymal et vasculaire reste mal comprise. Ces dépressions sont associées à diverses pathologies cliniques, comme la migraine ou des ischémies cérébrales.

Chez un rat, avec craniotomie et soumis à des flash lumineux à 3Hz, des phénomènes de dépressions corticales ont pu être capturés pendant une expérience d'imagerie ULM. Des cartes ULM sont obtenues en accumulant sur des durées de $\Delta t_f = 10$ secondes, la résolution spatiale est de 25 microns.

Soit $MB(x,z,t_i)$ les cartes en nombre de bulles obtenues pour $t_i \in [i*\Delta t_f : (i+1)*\Delta t_f]$. On note MB_{base} la valeur moyenne de MB obtenue sur la ligne base, et t_0 le début de la dépression

corticale. Les cartes $MB_{var}(x,r,t_i)$ montrées en figure 3.63A sont calculées suivant :

$$MB_{var}(x,r,t_i) = \frac{MB(x,r,t_i) - MB(x,r,t_0)}{MB_{base}}, \quad t_i > t_0 \quad (3.15)$$

On peut y voir l'augmentation du flux sanguin (nuances de rouge) suivie d'une diminution qui se maintient (nuances de bleu) se propageant du centre de l'hémi-cortex vers la périphérie à gauche et vers le sinus veineux médian à droite (figure 3.63(A)). La résolution spatiale est de 25 microns.

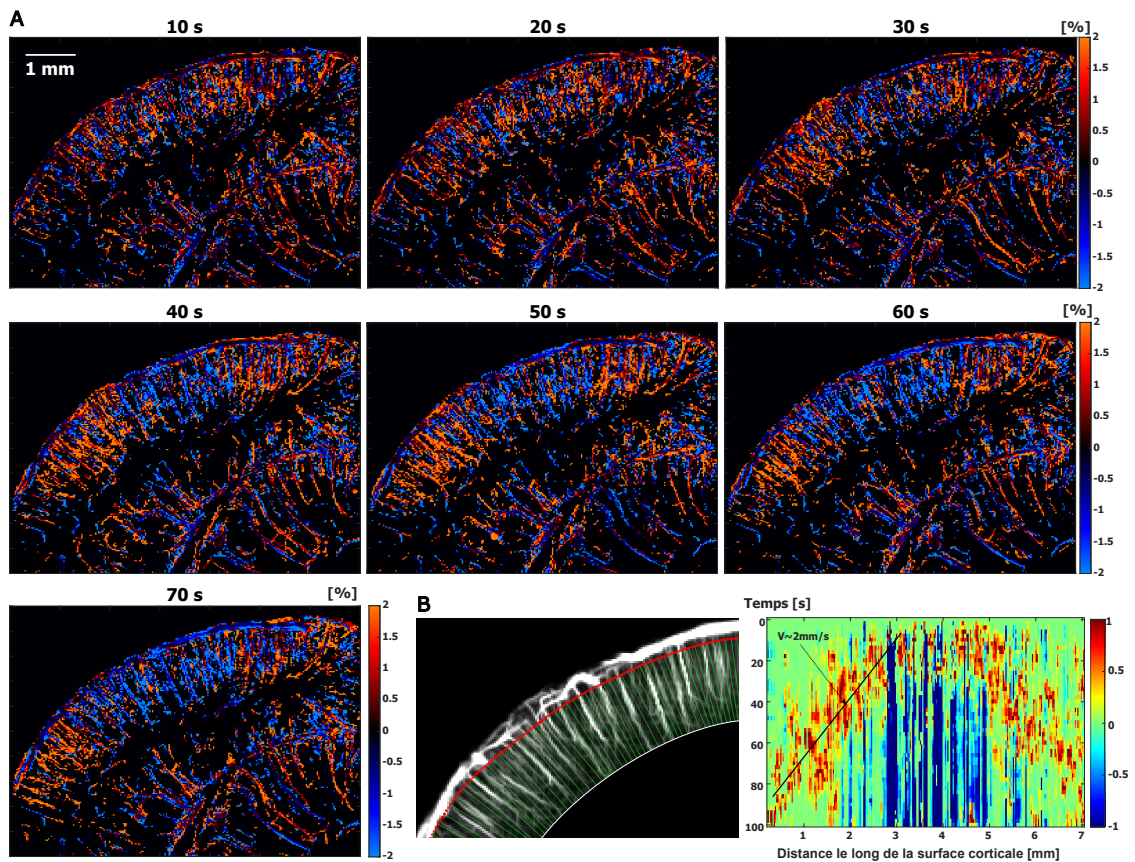


FIGURE 3.63 – Étude d'une dépression corticale envahissante par fULM. (A) Variation du flux de MBs par rapport à la ligne de base. (B) Diagramme espace-temps montrant la propagation de la dépression corticale. La réponse temporelle de chaque colonne corticale (représentée par les lignes vertes) forme une colonne du diagramme espace temps.

En (B), on étudie la variation temporelle pour des colonnes corticales de taille égale à notre résolution, de 25 microns. Pour cela, la ligne directrice de la surface piale est isolée (ligne rouge) puis les normales à cette ligne sont calculées (vertes, par soucis de visibilité, elles ne sont pas toutes représentées). On représente pour chacune de ces colonnes (correspondant à chaque ligne verte de l'image à gauche et à l'axe des abscisses sur le diagramme espace-temps à droite) l'évolution temporelle de la moyenne ajustée (en retirant 50% des valeurs extrêmes)

de MB_{var} le long de la colonne. On peut suivre la propagation de l'onde sur ce diagramme espace-temps, avec la propagation de l'augmentation du flux sanguin visible sur les traînées rouges. La diminution prolongée du flux post dépression est visible en bleu. En calculant la pente de la traînée rouge, on trouve une vitesse de propagation de l'onde d'environ 2 mm/min.

Ainsi cet exemple montre que le fULM pourrait être étendu à l'étude de certains phénomènes, même sans répétition. Les conditions sont toutefois particulièrement adaptées dans le cas des dépressions corticales envahissantes car leur faible vitesse de propagation autorise une résolution temporelle limitée (les cartes ULM peuvent être calculées en utilisant des fenêtres temporelles d'accumulation larges, comme ici de 10 secondes) et les amplitudes des variations du volume sanguin sont très importantes ce qui rend la question de la sensibilité moins critique. Il est à noter que pour des phénomènes propagatifs comme ces dépressions, l'analyse par décomposition en valeurs singulières n'est pas adaptée.

3.16 Conclusion du chapitre

Ainsi, le fULM a été appliqué dans ce chapitre à l'étude de deux stimulations : stimulation des vibrisses et stimulation visuelle.

Ces stimulations, largement utilisée dans la communauté, ont permis de montrer la capacité du fULM à extraire des réponses hémodynamiques globales dans les zones activées. Une première étude statistique a aussi permis de vérifier que les ordres de grandeur d'augmentation de vitesse et de dilatation des vaisseaux pendant une hyperhémie fonctionnelle sont cohérents avec ce qui a été mesuré par d'autres modalités d'imagerie fonctionnelles, comme le fMRI ou l'imagerie biphotonique. Ces réponses peuvent être extraites simultanément pour n'importe quelle zone du cerveau, en particulier en profondeur.

Le fULM a aussi le potentiel de différencier des réponses spécifiques pour les différents compartiments vasculaires, les différents arbres vasculaires ou les différentes couches corticales. Sa capacité à suivre le chemin parcouru par les bulles des gros vaisseaux jusqu'aux pré-capillaires apporte aussi un autre regard. C'est cette richesse des données fULM et cette versatilité des analyses possibles que l'on a essayé de mettre en avant.

Ces analyses ont confirmé certaines observations faites ces dernières années sur le couplage neurovasculaire. Cependant, il faudrait faire des études plus complètes (avec un nombre d'animaux plus élevé notamment) pour répondre à certains des débats qui entourent encore ce couplage. Ce chapitre a eu pour objet de proposer des techniques d'analyses des données fULM mais elles devront ensuite être prises en main par des biologistes pour faire ces études plus complètes et potentiellement répondre à ces questions.

Une perspective excitante pourrait aussi venir de l'émergence d'agents de contraste qui remplaceraient les microbulles et permettraient de faire de l'imagerie moléculaire : il s'agit de vésicules de gaz modifiables génétiquement pour cibler différents types de cellules (BOURDEAU et al., 2018).

Comme toute modalité d'imagerie, cette modalité a aussi ses inconvénients (sensibilité à améliorer, pas de marqueurs cellulaires, influence de l'injection...), et la réponse à certaines des questions sur le couplage neurovasculaire viendra peut-être aussi de la combinaison du fULM à d'autres techniques.

Les deux chapitres qui s'achèvent ici ont ainsi montré la mise au point d'une nouvelle modalité de neuroimagerie fonctionnelle. Comme pour toute modalité d'imagerie, si l'interprétation se fait sur des paramètres physiologiques (la vitesse du sang, le taux d'oxygénation...), la mesure réelle est toute autre. En IRM c'est bien un changement de champ magnétique qui est mesuré, en optique il s'agit souvent d'une modification de l'absorption... Bien comprendre le signal physique mesuré et ce qui peut le modifier est donc impératif pour pouvoir mieux quantifier et interpréter des résultats.

Le chapitre qui suit propose donc de prendre un pas de côté et de revenir au signal qui

est mesuré en ULM. On étudiera en particulier un paramètre, l'intensité rétrodiffusée par les microbulles, qui pourrait permettre de raffiner notre compréhension du signal ULM et de le comparer au signal mesuré en Doppler de puissance.

Références


- AASLID, R. (août 1987). « Visually evoked dynamic blood flow response of the human cerebral circulation ». In : *Stroke* 18.4, p. 771-775. ISSN : 0039-2499. DOI : 10.1161/01.str.18.4.771.
- ATTWELL, David et al. (1^{er} fév. 2016). « What is a pericyte? » In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 36.2. Publisher : SAGE Publications Ltd STM, p. 451-455. ISSN : 0271-678X. DOI : 10.1177/0271678X15610340. URL : <https://doi.org/10.1177/0271678X15610340> (visité le 21/11/2021).
- BARANGER, Jerome et al. (déc. 2021). « Bedside functional monitoring of the dynamic brain connectivity in human neonates ». In : *Nature Communications* 12.1, p. 1080. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/s41467-021-21387-x. URL : <http://www.nature.com/articles/s41467-021-21387-x> (visité le 21/07/2021).
- BERGEL, Antoine et al. (18 déc. 2018). « Local hippocampal fast gamma rhythms precede brain-wide hyperemic patterns during spontaneous rodent REM sleep ». In : *Nature Communications* 9.1, p. 5364. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/s41467-018-07752-3. URL : <https://www.nature.com/articles/s41467-018-07752-3> (visité le 08/07/2019).
- BERTHIAUME, Andrée-Anne et al. (2018). « Pericyte Structural Remodeling in Cerebrovascular Health and Homeostasis ». In : *Frontiers in Aging Neuroscience* 10, p. 210. ISSN : 1663-4365. DOI : 10.3389/fnagi.2018.00210. URL : <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2018.00210> (visité le 21/11/2021).
- BERTOLO, Adrien et al. (24 fév. 2021). « Whole-Brain 3D Activation and Functional Connectivity Mapping in Mice using Transcranial Functional Ultrasound Imaging ». In : *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 168, e62267. ISSN : 1940-087X. DOI : 10.3791/62267. URL : <https://www.jove.com/v/62267/whole-brain-3d-activation-functional-connectivity-mapping-mice-using> (visité le 21/11/2021).
- BERWICK, J. et al. (fév. 2008). « Fine Detail of Neurovascular Coupling Revealed by Spatiotemporal Analysis of the Hemodynamic Response to Single Whisker Stimulation in Rat Barrel Cortex ». In : *Journal of Neurophysiology* 99.2, p. 787-798. ISSN : 0022-3077, 1522-1598. DOI : 10.1152/jn.00658.2007. URL : <http://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00658.2007> (visité le 05/07/2019).
- BLINDER, Pablo et al. (juill. 2013). « The cortical angiome : an interconnected vascular network with noncolumnar patterns of blood flow ». In : *Nature Neuroscience* 16.7. Bandiera_abtest : a Cg_type : Nature Research Journals Number : 7 Primary_atype : Research Publisher : Nature Publishing Group Subject_term : Neuro-vascular interactions Subject_term_id : neuro-vascular-interactions, p. 889-897. ISSN : 1546-1726. DOI : 10.1038/nn.3426. URL : <https://www.nature.com/articles/nn.3426> (visité le 18/12/2021).
- BOURDEAU, Raymond W. et al. (jan. 2018). « Acoustic reporter genes for noninvasive imaging of microorganisms in mammalian hosts ». In : *Nature* 553.7686, p. 86-90. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature25021. URL : <http://www.nature.com/articles/nature25021> (visité le 21/02/2022).

- BRENNAN, Kevin C. et al. (juin 2007). « Distinct Vascular Conduction With Cortical Spreading Depression ». In : *Journal of Neurophysiology* 97.6, p. 4143-4151. ISSN : 0022-3077, 1522-1598. DOI : 10.1152/jn.00028.2007. URL : <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00028.2007> (visité le 01/02/2022).
- CHEN, Brenda R. et al. (2022). « A Critical Role for the Vascular Endothelium in Functional Neurovascular Coupling in the Brain ». In : *Journal of the American Heart Association* 3.3 (). Publisher : American Heart Association, e000787. DOI : 10.1161/JAHA.114.000787. URL : <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/JAHA.114.000787> (visité le 04/03/2022).
- CHEN, J. Jean et G. Bruce PIKE (1^{er} nov. 2010). « MRI measurement of the BOLD-specific flow-volume relationship during hypercapnia and hypocapnia in humans ». In : *NeuroImage* 53.2, p. 383-391. ISSN : 1095-9572. DOI : 10.1016/j.neuroimage.2010.07.003.
- DEMENÉ, Charlie, Mathieu PERNOT et al. (juin 2014). « Ultrafast Doppler reveals the mapping of cerebral vascular resistivity in neonates ». In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 34.6, p. 1009-1017. ISSN : 0271-678X. DOI : 10.1038/jcbfm.2014.49. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4050246/> (visité le 08/07/2019).
- DEMENÉ, Charlie, Justine ROBIN et al. (mars 2021). « Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients ». In : *Nature Biomedical Engineering* 5.3. Bandiera_abtest : a Cg_type : Nature Research Journals Number : 3 Primary_atype : Research Publisher : Nature Publishing Group Subject_term : Biomedical engineering;Ultrasound Subject_term_id : biomedical-engineering;ultrasound, p. 219-228. ISSN : 2157-846X. DOI : 10.1038/s41551-021-00697-x. URL : <https://www.nature.com/articles/s41551-021-00697-x> (visité le 18/11/2021).
- DEPPE, Michael et al. (1^{er} fév. 2000). « Assessment of Hemispheric Language Lateralization : A Comparison between fMRI and fTCD ». In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 20.2. Publisher : SAGE Publications Ltd STM, p. 263-268. ISSN : 0271-678X. DOI : 10.1097/00004647-200002000-00006. URL : <https://doi.org/10.1097/00004647-200002000-00006> (visité le 27/12/2021).
- DEVOR, A., E. M. C. HILLMAN et al. (31 déc. 2008). « Stimulus-Induced Changes in Blood Flow and 2-Deoxyglucose Uptake Dissociate in Ipsilateral Somatosensory Cortex ». In : *Journal of Neuroscience* 28.53, p. 14347-14357. ISSN : 0270-6474, 1529-2401. DOI : 10.1523/JNEUROSCI.4307-08.2008. URL : <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.4307-08.2008> (visité le 18/12/2021).
- DEVOR, A., P. TIAN et al. (18 avr. 2007). « Suppressed Neuronal Activity and Concurrent Arteriolar Vasoconstriction May Explain Negative Blood Oxygenation Level-Dependent Signal ». In : *Journal of Neuroscience* 27.16, p. 4452-4459. ISSN : 0270-6474, 1529-2401. DOI : 10.1523/JNEUROSCI.0134-07.2007. URL : <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.0134-07.2007> (visité le 18/12/2021).
- DREW, Patrick J, Andy Y SHIH et David KLEINFELD (s. d.). « Fluctuating and sensory-induced vasodynamics in rodent cortex extend arteriole capacity ». In : (), p. 6.

- DUVERNOY, H. M., S. DELON et J. L. VANNSON (1^{er} nov. 1981). « Cortical blood vessels of the human brain ». In : *Brain Research Bulletin* 7.5, p. 519-579. ISSN : 0361-9230. DOI : 10.1016/0361-9230(81)90007-1. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923081900071> (visité le 29/07/2021).
- FERNANDEZ-KLETT, F. et al. (21 déc. 2010). « Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.51, p. 22290-22295. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1011321108. URL : <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1011321108> (visité le 21/07/2021).
- FERRIER, Jeremy et al. (30 juin 2020). « Functional imaging evidence for task-induced deactivation and disconnection of a major default mode network hub in the mouse brain ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117.26, p. 15270-15280. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1920475117. URL : <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1920475117> (visité le 21/11/2021).
- GOENSE, Jozien, Hellmut MERKLE et Nikos K. LOGOTHETIS (8 nov. 2012). « High-Resolution fMRI Reveals Laminar Differences in Neurovascular Coupling between Positive and Negative BOLD Responses ». In : *Neuron* 76.3, p. 629-639. ISSN : 0896-6273. DOI : 10.1016/j.neuron.2012.09.019. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627312008549> (visité le 18/12/2021).
- GRUBB, Søren et al. (déc. 2020). « Precapillary sphincters maintain perfusion in the cerebral cortex ». In : *Nature Communications* 11.1, p. 395. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/s41467-020-14330-z. URL : <http://www.nature.com/articles/s41467-020-14330-z> (visité le 08/06/2021).
- GUIBERT, Romain, Caroline FONTA et Franck PLOURABOUÉ (1^{er} nov. 2010). « Cerebral Blood Flow Modeling in Primate Cortex ». In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30.11. Publisher : SAGE Publications Ltd STM, p. 1860-1873. ISSN : 0271-678X. DOI : 10.1038/jcbfm.2010.105. URL : <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.105> (visité le 18/12/2021).
- GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, Eugenio et al. (déc. 2016). « Effect of electrical forepaw stimulation on capillary transit-time heterogeneity (CTH) ». In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 36.12, p. 2072-2086. ISSN : 0271-678X. DOI : 10.1177/0271678X16631560. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5363666/> (visité le 09/06/2021).
- HALL, Catherine N. et al. (avr. 2014). « Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease ». In : *Nature* 508.7494, p. 55-60. ISSN : 0028-0836, 1476-4687. DOI : 10.1038/nature13165. URL : <http://www.nature.com/articles/nature13165> (visité le 27/07/2020).
- HARTMANN, David A. et al. (oct. 2015). « Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice ». In : *Neurophotonics* 2.4, p. 041402. ISSN : 2329-423X. DOI : 10.1117/1.NPh.2.4.041402.
- HILL, Robert A. et al. (juill. 2015). « Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes ». In : *Neuron* 87.1, p. 95-110. ISSN : 08966273. DOI : 10.1016/j.neuron.2015.06.001. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627315005140> (visité le 27/07/2020).

- HOILAND, Ryan L. et al. (nov. 2020). « Nitric oxide is fundamental to neurovascular coupling in humans ». In : *The Journal of Physiology* 598.21, p. 4927-4939. ISSN : 1469-7793. DOI : 10.1113/JP280162.
- HUBER, Laurentius et al. (15 fév. 2015). « Cortical lamina-dependent blood volume changes in human brain at 7T ». In : *NeuroImage* 107, p. 23-33. ISSN : 1053-8119. DOI : 10.1016/j.neuroimage.2014.11.046. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811914009768> (visité le 18/12/2021).
- IADECOLA, Costantino (sept. 2017). « The Neurovascular Unit Coming of Age : A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease ». In : *Neuron* 96.1, p. 17-42. ISSN : 08966273. DOI : 10.1016/j.neuron.2017.07.030. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627317306529> (visité le 27/07/2020).
- IMBAULT, Marion et al. (déc. 2017). « Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity ». In : *Scientific Reports* 7.1, p. 7304. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-017-06474-8. URL : <http://www.nature.com/articles/s41598-017-06474-8> (visité le 08/12/2021).
- KIM, Tae et Seong-Gi KIM (15 jan. 2010). « Cortical layer-dependent arterial blood volume changes : Improved spatial specificity relative to BOLD fMRI ». In : *NeuroImage* 49.2, p. 1340-1349. ISSN : 1053-8119. DOI : 10.1016/j.neuroimage.2009.09.061. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105381190901060X> (visité le 18/12/2021).
- LONGDEN, Thomas A. et al. (mai 2017). « Capillary K⁺-sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow ». In : *Nature Neuroscience* 20.5. Number : 5 Publisher : Nature Publishing Group, p. 717-726. ISSN : 1546-1726. DOI : 10.1038/nn.4533. URL : <https://www.nature.com/articles/nn.4533> (visité le 04/03/2022).
- MEYER, H. S. et al. (19 nov. 2013). « Cellular organization of cortical barrel columns is whisker-specific ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.47, p. 19113-19118. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1312691110. URL : <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1312691110> (visité le 18/12/2021).
- MISHRA, Anusha et al. (déc. 2016). « Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles ». In : *Nature Neuroscience* 19.12. Number : 12 Publisher : Nature Publishing Group, p. 1619-1627. ISSN : 1546-1726. DOI : 10.1038/nn.4428. URL : <https://www.nature.com/articles/nn.4428> (visité le 04/03/2022).
- PAXINOS, George et Charles WATSON (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates : hard cover edition*. Elsevier.
- RUNGTA, Ravi L. et al. (juill. 2018). « Vascular Compartmentalization of Functional Hyperemia from the Synapse to the Pia ». In : *Neuron* 99.2, 362-375.e4. ISSN : 08966273. DOI : 10.1016/j.neuron.2018.06.012. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662731830480X> (visité le 08/07/2019).
- SCHAEFFER, Samantha et Costantino IADECOLA (sept. 2021). « Revisiting the neurovascular unit ». In : *Nature Neuroscience* 24.9. Bandiera_abtest : a Cg_type : Nature Research Journals Number : 9 Primary_atype : Reviews Publisher : Nature Publishing Group Subject_term : Blood-brain barrier;Neuro-vascular interactions Subject_term_id : blood-brain-barrier;neuro-

- vascular-interactions, p. 1198-1209. ISSN : 1546-1726. DOI : 10.1038/s41593-021-00904-7. URL : <https://www.nature.com/articles/s41593-021-00904-7> (visité le 18/11/2021).
- SCHMID, Franca et al. (14 fév. 2017). « Depth-dependent flow and pressure characteristics in cortical microvascular networks ». In : *PLOS Computational Biology* 13.2. Sous la dir. de Jeffrey J. SAUCERMAN, e1005392. ISSN : 1553-7358. DOI : 10.1371/journal.pcbi.1005392. URL : <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1005392> (visité le 27/07/2020).
- VIGNON, Francois et al. (déc. 2010). « The stripe artifact in transcranial ultrasound imaging ». In : *Journal of Ultrasound in Medicine : Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine* 29.12, p. 1779-1786. ISSN : 1550-9613. DOI : 10.7863/jum.2010.29.12.1779.
- YU, Jen-Fang et al. (2015). « Human amygdala activation by the sound produced during dental treatment : A fMRI study ». In : *Noise & Health* 17.78, p. 337-342. ISSN : 1463-1741. DOI : 10.4103/1463-1741.165063. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4900504/> (visité le 15/05/2019).
- ZAMBACH, Stefan Andreas et al. (29 juin 2021). « Precapillary sphincters and pericytes at first-order capillaries as key regulators for brain capillary perfusion ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.26, e2023749118. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.2023749118. URL : <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.2023749118> (visité le 21/11/2021).
- ZECHARIAH, Anil et al. (mars 2020). « Intercellular Conduction Optimizes Arterial Network Function and Conserves Blood Flow Homeostasis During Cerebrovascular Challenges ». In : *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40.3, p. 733-750. ISSN : 1524-4636. DOI : 10.1161/ATVBAHA.119.313391.



Chapitre 4 : Imagerie de rétrodiffusion en Microscopie de Localisation Ultra- sonore

4.17 Introduction

L'ULM quantifie à une échelle micrométrique des paramètres hémodynamiques (le flux et la vitesse dans les vaisseaux) par la localisation super-résolue de microbulles de gaz. Dans ce chapitre, on se propose de montrer que l'ULM permet d'accéder à un autre type d'imagerie : l'imagerie de l'amplitude de rétrodiffusion.

Comme décrit au chapitre 1 (section 1.2.4), en ULM les microbulles ont une taille bien inférieure à la longueur d'onde ultrasonore utilisée, elles se comportent vis-à-vis des ultrasons comme des diffuseurs de Rayleigh, des sources ponctuelles. L'image d'une microbulle par le système d'imagerie est une fonction bien connue, la réponse impulsionnelle spatiale (PSF, Point Spread Function). L'intensité rétrodiffusée par de tels diffuseurs est une fonction de l'intensité incidente, ie l'intensité ultrasonore reçue par la MB, et d'un coefficient de rétrodiffusion qui dépend de propriétés intrinsèques de la particule (volume et différence d'impédance acoustique avec le milieu environnant) et de la fréquence ultrasonore.

$$P_r(\phi) = P_i \sigma_b(\phi) \quad (4.16)$$

avec :

$P_r(\phi)$: puissance rétrodiffusée dans la direction ϕ

P_i : puissance incidente reçue par la particule

$$\sigma_b(\phi) = \frac{V_{MB}^2 \pi^2}{\lambda^4} \left[\frac{(k_{MB} - k_p)}{k_p} \frac{(\rho_{MB} - \rho_p)}{\rho_p} \cos\phi \right]^2 \quad (4.17)$$

avec :

λ : longueur d'onde ultrasonore V_{MB} : volume de la particule,

$V_{MB} = \frac{4}{3} \pi r_{MB}^3$ avec r_{MB} le rayon de la particule

k_{MB}, k_p : compressibilité de la particule (ici une MB) et du milieu (plasma) respectivement.

ρ_{MB}, ρ_p : densité massique de la particule (ici en MB) et du milieu (plasma) respectivement.

ϕ : angle entre la direction rétrodiffusée par rapport à la direction du faisceau incident.

En ULM, on utilise traditionnellement la forme des images de MBs, que l'on ajuste sur une forme de PSF type pour en trouver le centroïde. La position de ce dernier correspond à la position super-résolue de la microbulle. Cette localisation des positions permet ensuite via leur suivi au cours du temps de remonter à la vitesse et aux flux dans les vaisseaux.

Dans ce traitement, c'est la forme de la réponse de la bulle qui est exploitée, et non pas la valeur absolue de l'intensité rétrodiffusée. On se propose dans ce chapitre de s'intéresser à ce paramètre non exploité pour le moment : la mesure de l'intensité rétrodiffusée (schéma 4.64).

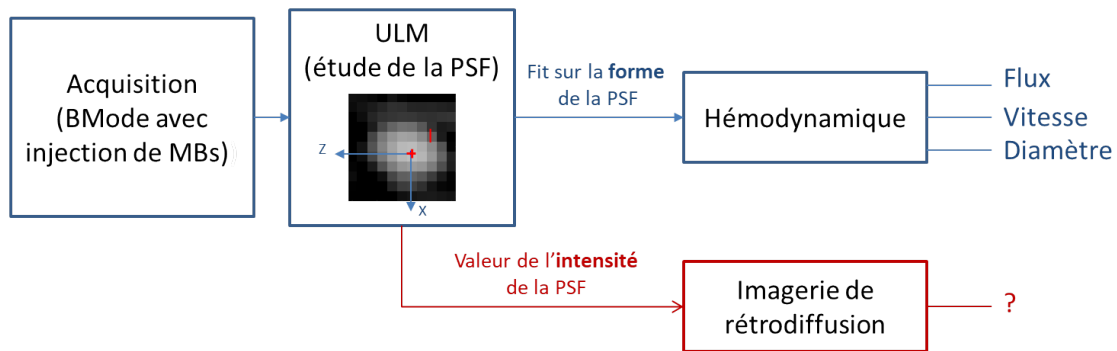


FIGURE 4.64 – Schéma de principe de l'ULM multi-paramétrique.

Méthode

Cette étude sera réalisée in vivo chez le rat dans le cadre de l'imagerie de la vascularisation cérébrale. Le dispositif expérimental (animaux et sonde utilisés), les séquences d'imagerie et le traitement pour obtenir des données ULM sont les mêmes que ceux décrits au chapitre 2 (détails en annexe 2.10). Pour chaque bulles détectée, en plus de la mesure de la position super-résolue par l'algorithme d'ULM, on mesure la valeur de l'intensité du pixel sur le BMode pour cette position.

Les méthodes de traitement de données spécifiques à l'imagerie de rétrodiffusion seront décrits au fur et à mesure du chapitre.

On donne ici quelques précisions sur la solution de microbulles utilisée. Il s'agit de SonoVue (SonoVueTM, Bracco SpA, Milan, Italy), solution composée de microbulles d'hexafluorure de soufre (SF₆) encapsulé dans une monocouche de phospholipides. Elles sont en suspension dans une solution saline (NaCl à 0.9%). Le diamètre moyen d'une bulle est de 2,5 µm, et plus de 90% des bulles sont inférieures à 8 µm (SCHNEIDER, 1999).

Imagerie multi-paramétrique en ULM : flux et amplitude de rétrodiffusion

Les cartes ULM 2D représentent traditionnellement pour chaque pixel le nombre de bulles l'ayant parcouru au cours de l'acquisition. On s'intéresse ici à l'intensité rétrodiffusée par les microbulles. On calcule alors pour chaque pixel la valeur moyenne de l'amplitude (mesurée comme la valeur du pixel sur le BMode) de toutes les bulles détectées dans ce pixel.

Cette nouvelle représentation est illustrée en figure 4.65. Elle offre un contraste tout à fait différent de celui des cartes en nombre de microbulles, contraste qui permet notamment de bien distinguer les plus petits vaisseaux. On a ainsi une imagerie multi-paramétrique en ULM : nombre de diffuseurs ou amplitude de rétrodiffusion. Une impression de 3D apparaît dans cette représentation. Cela fera l'objet de la partie qui suit.

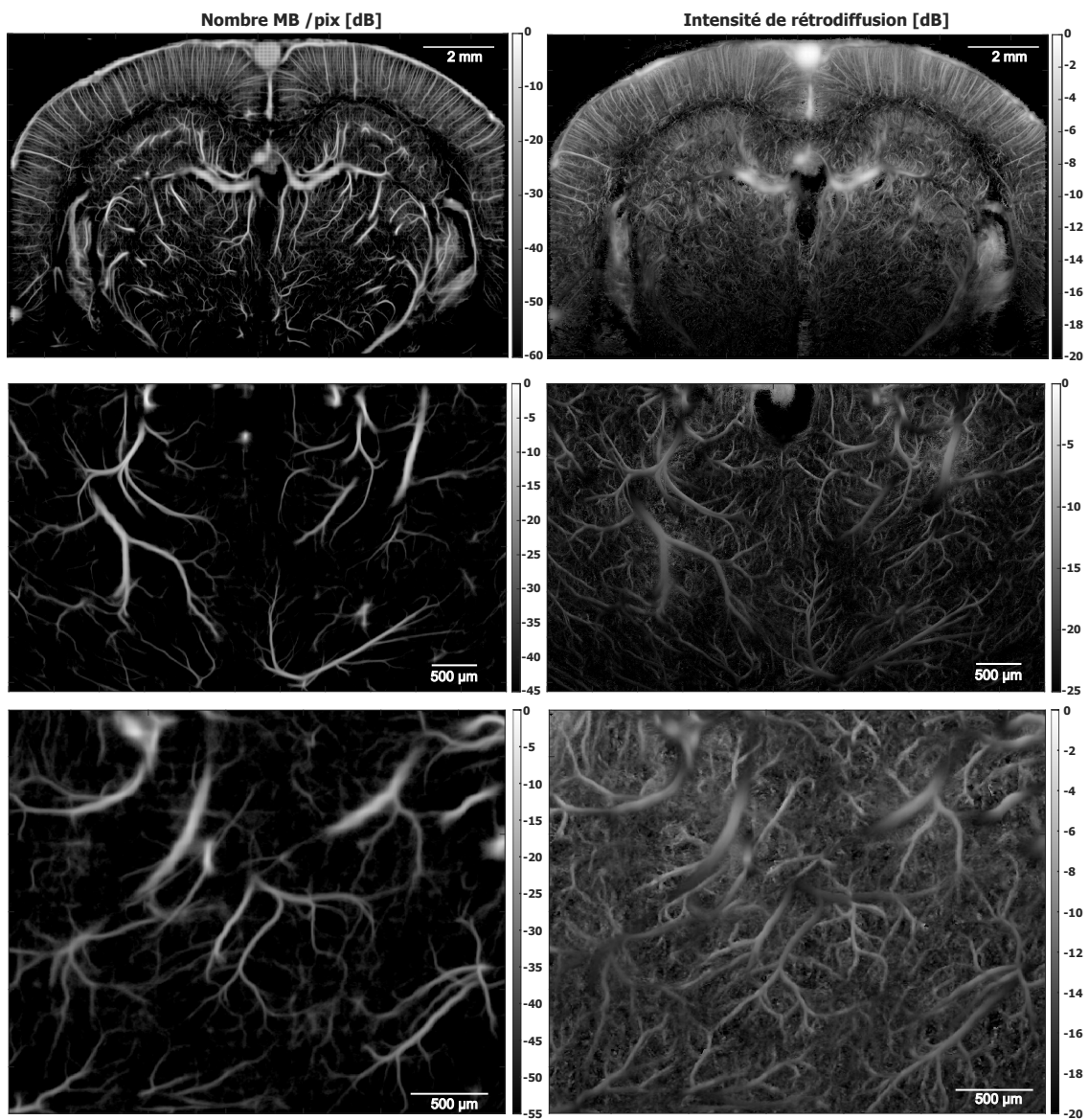


FIGURE 4.65 – Gauche : cartes ULM d'une coupe coronale de cerveau de rat entier (haut) et de deux zones situées dans le thalamus (milieu et bas) en nombre de MBs par pixel : représentation classiquement utilisée dans la littérature ULM. Droite : cartes ULM représentant pour chaque pixel l'amplitude moyenne de toutes les bulles ayant parcouru le dit pixel. Ces cartes ont été créées à partir des mêmes jeux de données que pour les cartes montrées à gauche.

4.18 Amplitude de rétrodiffusion et 3D

On cherche dans cette partie à expliquer l'impression de 3D qui émane des représentations ULM en amplitude de rétrodiffusion. L'objectif est de montrer que ce nouveau paramètre en ULM permet effectivement de localiser les vaisseaux dans l'espace 3D.

4.18.1 Variations de l'intensité ultrasonore dans l'espace 3D

Comme expliqué en introduction de ce chapitre, l'intensité rétrodiffusée par les MBs est une fonction de l'intensité incidente, ie l'intensité ultrasonore reçue par les MBs, et d'un coefficient de rétrodiffusion qui dépend de propriétés intrinsèques de la particule (volume et différence d'impédance acoustique avec le milieu environnant) et de la fréquence ultrasonore. On fait ici l'hypothèse d'une distribution monodisperse de MBs (toutes les MBs ont la même taille) et de même composition. La fréquence de travail est fixée à 15 MHz. L'intensité rétrodiffusée par les MBs ne dépend alors plus que de l'intensité ultrasonore reçue.

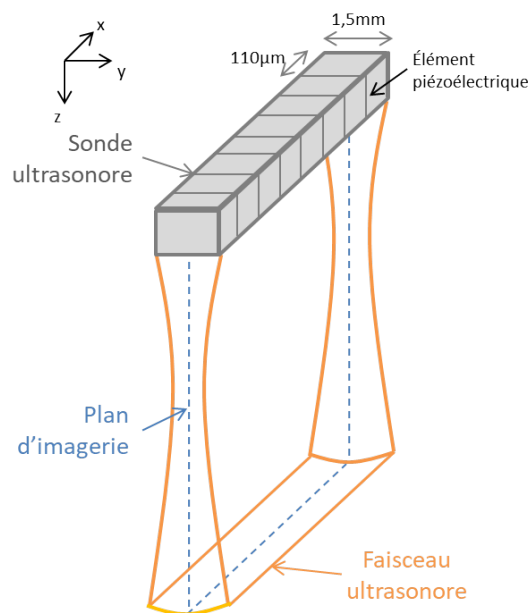


FIGURE 4.66 – Schéma de la sonde utilisée et du faisceau ultrasonore.

Or cette intensité ultrasonore varie dans l'espace 3D. On s'intéresse ici à ces variations en étudiant le faisceau ultrasonore créé par notre sonde, une sonde linéaire constituée d'une barrette de 128 éléments piézoélectriques alignés selon l'axe X (figure 4.66). La figure 4.67 représente le champ ultrasonore obtenu par simulation sous Field II (J.A. JENSEN et SVENDSEN, 1992, Jørgen JENSEN, 1996). Les caractéristiques de la sonde et les principaux paramètres utilisés pour la simulation sont donnés en figure 4.68.

Suivant l'axe Z, l'intensité acoustique est atténuée selon une décroissance exponentielle. Selon la direction orthogonale au plan d'imagerie (axe Y, appelé direction de l'élévation), le

faisceau a une certaine épaisseur qui varie en fonction de la profondeur. Il existe en effet une focalisation selon Y réalisée par une lentille acoustique présente sur la sonde. Les réponses en intensité selon Y sont données pour plusieurs profondeurs en figure 4.67D.

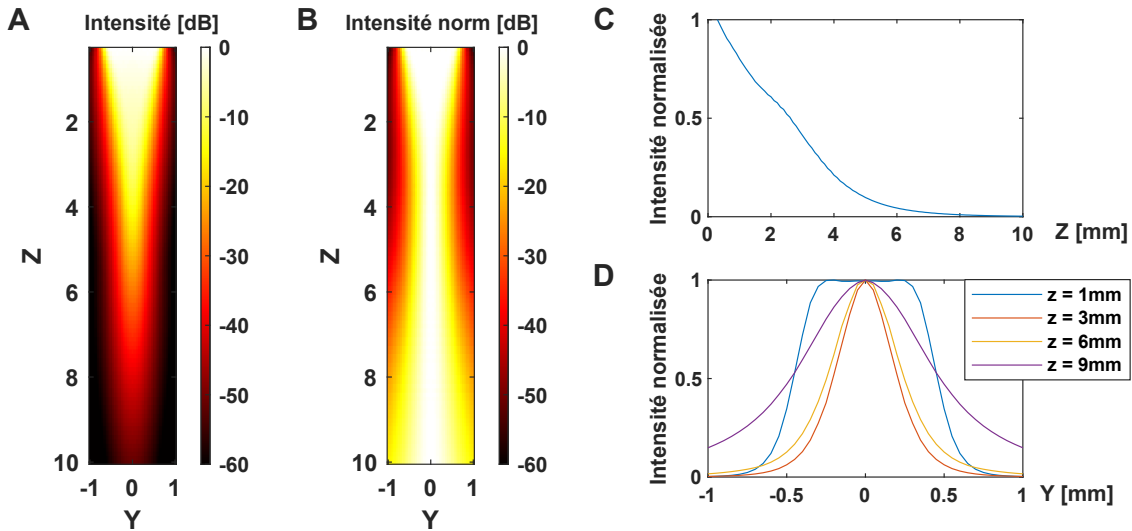


FIGURE 4.67 – Simulation Field II de la sonde linéaire à 15 MHz utilisée dans ce chapitre. (A) Champ de l’intensité ultrasonore dans un plan ZY en X=0. (B) Champ obtenu en (A) normalisé par le maximum pour chaque profondeur. (C) Décroissance de l’intensité ultrasonore avec la profondeur : $I=f(z)$ en $x=0$ et $y=0$. (D) Variations de l’intensité acoustique suivant l’axe Y pour 4 profondeurs selon Z (et à $x=0$) ; l’intensité a été normalisée par la valeur maximale à chaque profondeur. Les paramètres de simulation sont détaillés en figure 4.68

Sonde		Paramètre de simulation	
Fréquence :	15,625 MHz	Vitesse du son :	1540 mm/s
Nb éléments piézoélectriques (selon X) :	128 éléments	Atténuation :	6,8Np/m (15MHz)
Dimension éléments piézoélectriques :			
X	108 μ m	Fréquence échantillonnage :	300 MHz
Y	1,5 mm	Excitation :	2 arches de sinusoïdes
Espace inter-éléments (selon X) :	2 μ m		
Focus en élévation :	8 mm		

FIGURE 4.68 – Paramètres de simulation utilisés pour obtenir le champ d’intensité ultrasonore montré en figure 4.67

4.18.2 Amplitude rétrodiffusée par les MBs et information 3D : principe et illustrations

Principe

L’énergie reçue par les microbulles puis rétrodiffusée par celles-ci varie donc en fonction de leur position dans l’espace 3D. À une position (x,z) donnée de l’image ULM 2D, cette énergie

dépend de la position selon Y du vaisseau qu'elle parcourt. Elle est maximale si la MB est centrée sur le faisceau et décroît de part et d'autre (figure 4.67D). Exploiter la variation de l'énergie rétrodiffusée selon l'axe Y à une profondeur donnée pourrait permettre d'avoir une information sur la position dans la dimension hors plan. Comme illustré sur le schéma de principe en figure 4.69, pour une même position (x,z), des valeurs d'amplitude différentes pour une MB isolée indiquent une position en Y différente.

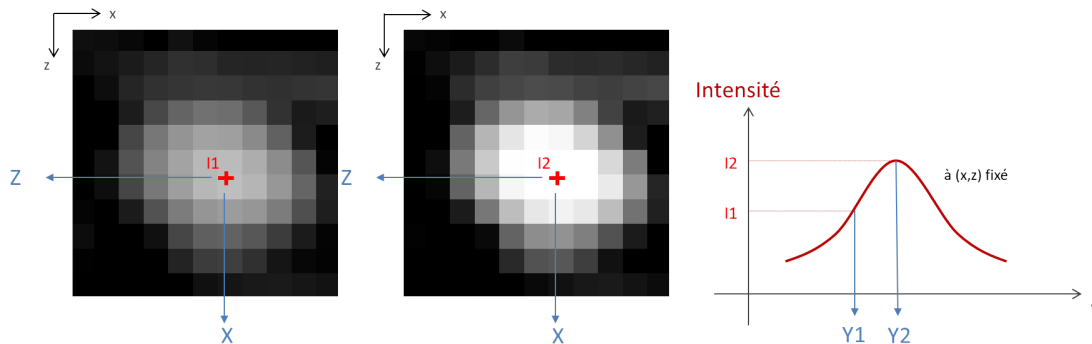


FIGURE 4.69 – Gauche : PSF de deux bulles situées à la même position (x,z) mais ayant des intensités différentes. Droite : D'après la réponse en élévation de l'intensité rétrodiffusée par une MB pour une position (x,z) donnée, des intensités rétrodiffusées différentes correspondent à des positions selon Y différentes.

Illustration in vivo

Illustrons sur trois exemples dans des données in vivo cette idée selon laquelle l'amplitude de rétrodiffusion porte une information sur la localisation selon Y :

- le cas d'un vaisseau traversant le plan d'imagerie
- le cas de vaisseaux parallèles au plan d'imagerie mais situés à des position en Y différentes
- le cas de vaisseaux superposés en ULM 2D.

On considère en figure 4.70, le cas d'un vaisseau traversant le faisceau ultrasonore, modélisé sur le schéma B. Les microbulles qui parcourent ce vaisseau vont arriver par un bord du faisceau où l'intensité ultrasonore est minimale et où l'énergie rétrodiffusée sera donc minimale. Cette énergie va ensuite croître jusqu'à ce que la bulle atteigne le centre du faisceau là où l'amplitude mesurée sur le BMode sera maximale, puis décroître à mesure que la bulle s'en éloigne. On peut voir sur l'image ULM en amplitude de rétrodiffusion en (A) de tels vaisseaux, situés dans le thalamus. L'amplitude est minimale sur les bords du faisceau ultrasonore (flèches vertes) et maximale quand le vaisseau est centré sur le faisceau (flèches cyan). Si l'on isole une microbulle parcourant ce vaisseau, par exemple celle suivant la trajectoire dessinée en rouge sur l'image, la variation de l'amplitude de cette bulle mesurée sur les images BMode au cours du temps présente bien le comportement décrit en B.

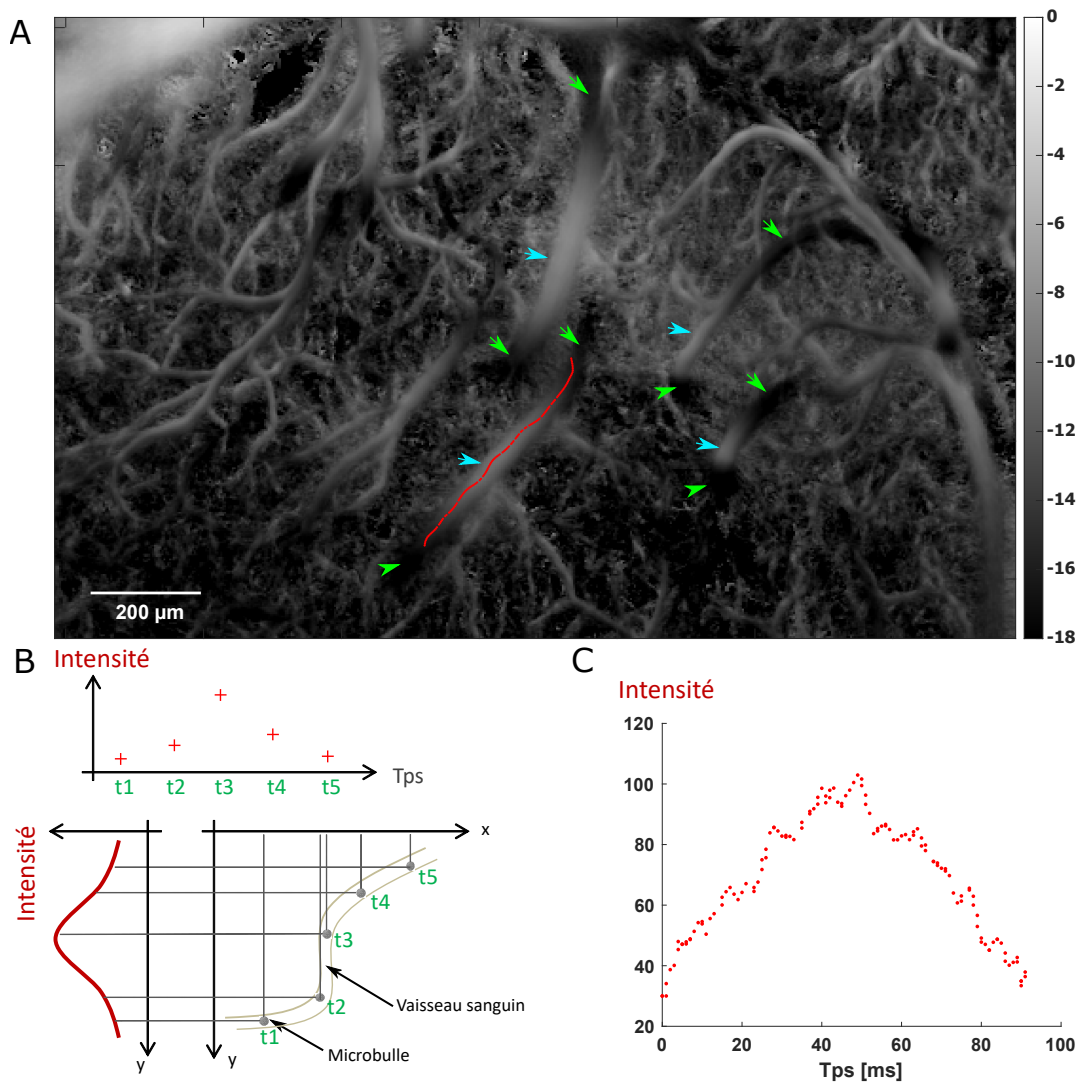


FIGURE 4.70 – (A) Carte ULM en amplitude de rétrodiffusion dans le thalamus sur lequel des vaisseaux traversant le faisceau ultrasonore dans la direction hors plan sont visibles. (B) Schéma de principe de la variation d’intensité rétrodiffusée par une microbulle parcourant un vaisseau traversant le faisceau ultrasonore. (C) Évolution au cours du temps de l’intensité d’une bulle parcourant un vaisseau traversant le faisceau ultrasonore selon le tracé rouge en (A). Cette situation correspond à la situation explicitée par le schéma en (B).

On considère en figure 4.71 le cas de vaisseaux qui sont parallèles au plan d’imagerie (ils ne le traversent pas), mais qui se situent à des positions différentes selon Y. Cette situation correspond typiquement à des vaisseaux du cortex pour une imagerie dans un plan coronal ou sagittal. Pour rappel le faisceau mesure de 800 μm à 1 mm d’épaisseur à cette profondeur. Certains vaisseaux vont alors être centrés sur le faisceau, là où le champ d’intensité ultrasonore est maximal : l’amplitude rétrodiffusée par les bulles qui les parcourent sera plus élevée que celles de bulles parcourant des vaisseaux situés sur le bord du faisceau ultrasonore, là où le champ d’intensité ultrasonore est plus faible. Si l’on s’intéresse aux histogrammes des amplitudes de rétrodiffusion mesurées pour les 3 vaisseaux du cortex (figure 4.71C, pointés par les flèches en

B), on distingue trois distributions différentes, qui indiquent que le vaisseau A est situé plus au centre du faisceau que le vaisseau B, lui-même plus centré que le vaisseau C. Sur la carte ULM en amplitude de rétrodiffusion (B), les vaisseaux situés sur le bord du faisceau apparaissent en noir et ceux centrés apparaissent en blanc, avec les nuances de gris pour les vaisseaux intermédiaires.

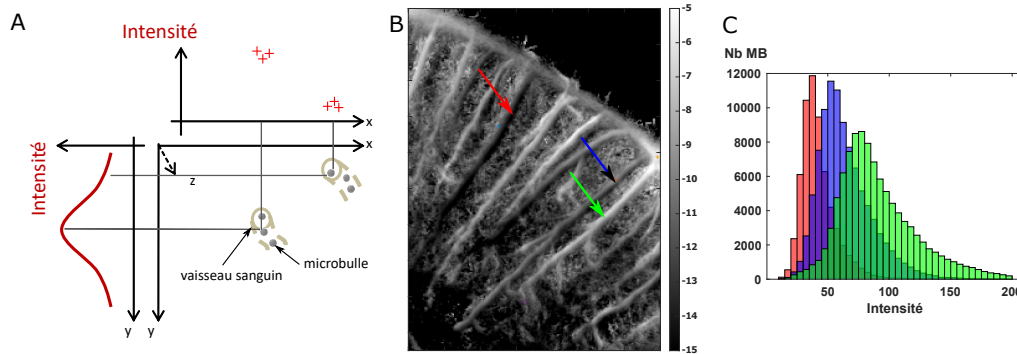


FIGURE 4.71 – (A) Schéma de principe de l'amplitude rétrodiffusée par des MBs parcourant des vaisseaux parallèles au plan d'imagerie mais répartis selon Y. (B) Carte ULM en amplitude de rétrodiffusion dans le cortex. (C) Histogramme des valeurs d'amplitude de rétrodiffusion des MBs ayant parcourus les trois vaisseaux fléchés sur l'image (B).

Un autre cas intéressant est le cas de vaisseaux qui se superposent dans les images ULM 2D. On comprend bien que ces vaisseaux ne peuvent pas être exactement localisés au même endroit, ils sont en fait situés à deux positions différentes selon l'axe Y. Une telle situation est illustrée en figure 4.72, où une artériole et une veinule sont superposées sur l'image ULM 2D. Toutes les trajectoires traversant le segment vert sur l'image sont isolées (B), et la distribution des amplitudes rétrodiffusées par les microbulles de ces trajectoires montrées en (D). Sur cet histogramme, deux distributions semblent apparaître. Les trajectoires peuvent être séparées en deux jeux de données en fonction de la direction de déplacement des bulles selon l'axe Z : vers le haut pour l'artériole et vers le bas pour la veinule (C). Si l'on représente les histogrammes pour ces deux groupes (E), deux distributions apparaissent, révélant que la veinule est située plus au bord du faisceau que l'artériole. Une situation analogue est montrée en figure 4.72(A'-E'), observée chez le même rat (et sur le même plan d'imagerie) dans le cortex contra-latéral à la situation décrite en (A-E). Cette fois-ci, la veinule est plus au centre du faisceau que l'artériole.

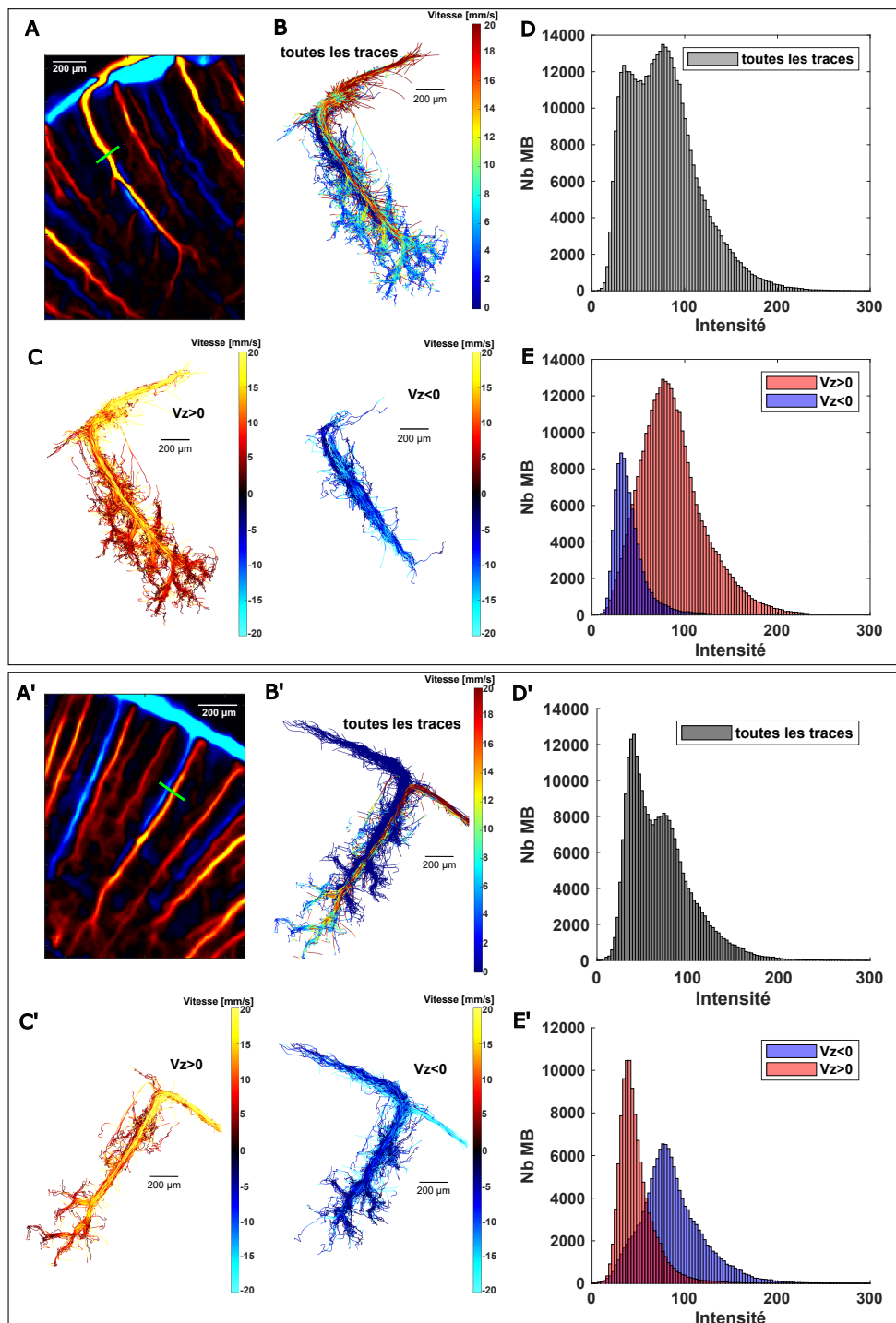


FIGURE 4.72 – (A) Carte ULM en nombre de MBs : artérioles ($V_z > 0$) en nuances de rouge et veinules ($V_z < 0$) en nuances de bleu. Au niveau de la marque verte, on devine que deux vaisseaux, une artériole et une veinule sont superposées sur l'image 2D. (B) Toutes les trajectoires des MBs ayant traversé la section verte sur l'image en (A). (C) Séparation des traces montrées en (B) selon que leur vitesse moyenne selon z est positive (artériole) ou négative (veinule). (D) Histogramme des valeurs d'amplitude rétrodiffusée par les MBs correspondant aux traces en (B). (E) Histogramme des valeurs d'amplitude rétrodiffusée par les MBs correspondant aux traces en C-gauche ($V_z > 0$) en rouge et en C-droite ($V_z < 0$) en bleu. (A'-D') Même analyse qu'en (A-D) pour un autre exemple de superposition d'une artériole et d'une veinule sur l'image ULM 2D.

4.18.3 Localisation 3D et mesure de vitesse absolue par imagerie de l'amplitude de rétrodiffusion

On a illustré dans les paragraphes précédents l'idée selon laquelle l'amplitude de rétrodiffusion pouvait donner une information sur la position des vaisseaux dans la dimension hors plan. L'objectif de cette partie est d'étudier la possibilité de localiser effectivement les vaisseaux dans cette dimension, ie de leur attribuer une coordonnée selon Y, et ce avec une forme de super-résolution.

Cela permettra de pallier aux biais qui existent en ULM 2D. Tout d'abord, même si la taille d'un pixel dans le plan d'imagerie en ULM est de l'ordre de 5-10 μm , ce qui permet de résoudre les vaisseaux individuellement, il est très difficile d'estimer la densité des vaisseaux dans une zone où la distance entre deux vaisseaux. En effet, si deux vaisseaux peuvent apparaître à 50 μm de distance sur l'image 2D, ils peuvent en réalité être éloignés de plusieurs centaines de microns dans la dimension de l'élévation. Deuxièmement, les cartes de vitesses fournies ne prennent en compte que les composantes V_x et V_z de la vitesse. Dans le cas de vaisseaux parallèles au plan d'imagerie, comme dans le cortex pour des images coronales ou sagittales, cela ne pose pas trop de problème dans la mesure où la composante V_y de la vitesse est très faible. Mais dans le cas de vaisseaux qui traverseraient le plan d'imagerie, l'estimation de la vitesse peut être largement sous-estimée.

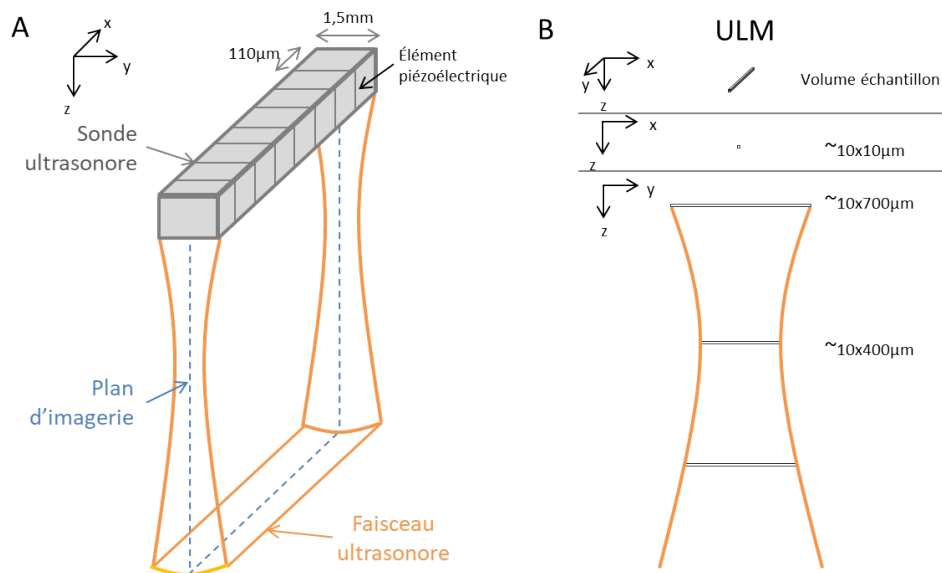


FIGURE 4.73 – Gauche : Schéma de la sonde utilisée et du faisceau ultrasonore. Droite : Schéma à proportion gardée de la taille des volumes échantillons dans le cas de l'imagerie par ULM pour la sonde utilisée.

Pour faire sentir l'importance que ce biais peut avoir, on représente en figure 4.73 le volume qui participe au signal de chaque pixel en ULM 2D, en conservant les proportions. Ce volume présente une anisotropie très marquée ($10 \times 10 \times 400 \mu\text{m}$ au niveau de la focale pour la sonde

considérée à 15 MHz, voire $10 \times 10 \times 800 \mu\text{m}$ dans le premier millimètre sous la sonde).

4.18.3.1 Preuve de concept expérimentale in vivo

Méthode et principe

Pour étudier cette idée, une étude a été réalisée en imageant plusieurs plans parallèles éloignés d'une distance d selon la direction Y orthogonale aux plans d'imagerie.

On présente ici des résultats pour une étude à 5 plans coronaux avec une distance inter-plan d de $100 \mu\text{m}$ selon Y. La même séquence ultrasonore que précédemment est utilisée pour l'imagerie ULM, mais la sonde est fixée sur un moteur qui permet de la déplacer suivant les différents plans. Chaque plan est imagé 400 ms avant de revenir au premier plan. On répète ce déplacement pour obtenir 525 blocs d'images de 400ms pour chaque plan, ce qui correspond à un temps d'accumulation des données ULM pour chaque plan de 3 min et 30 s. Les images ULM sont réalisées avec une résolution dans le plan XZ de $6,5 \mu\text{m}$.

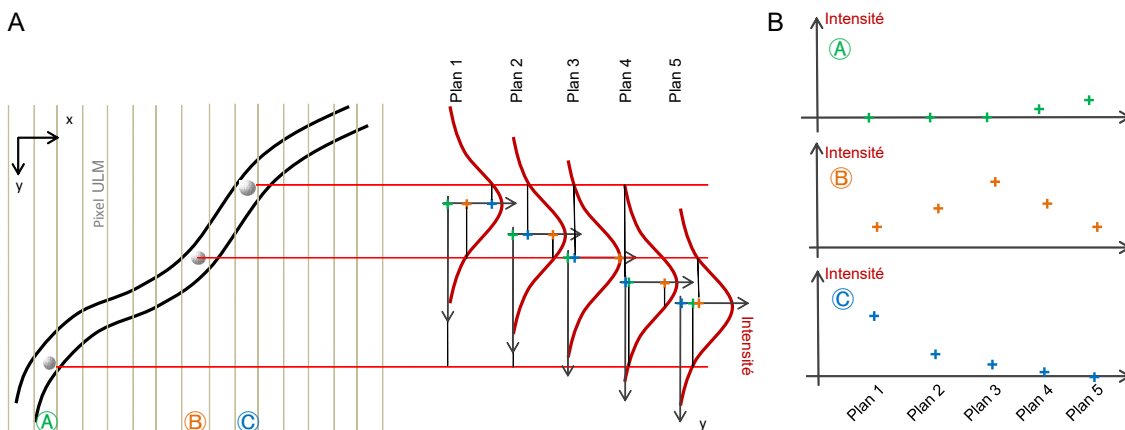


FIGURE 4.74 – Multiplan et variations de l'amplitude rétrodiffusée. (A) 5 images ULM sont réalisées selon des plans d'imagerie parallèles selon la direction hors plan (Y). Pour chaque plan, selon la position du vaisseau selon Y, les MBs à une position (x,z) donnée ne reçoivent pas le même intensité ultrasonore. Des exemples sont donnés pour trois positions de bulle. (B) Intensité mesurée sur les 5 images BMode associées aux 5 plans d'imagerie pour les 3 bulles exemples.

Considérons la situation illustrée en figure 4.74. Les bulles parcourant chaque pixel sont situées à des positions selon Y correspondant à la position y du vaisseau en (x,z) . Sur tous les plans d'imagerie parallèles, alors que la position du vaisseau dans le plan XZ ne varie pas, la position en Y relativement à l'élévation du faisceau ultrasonore, et donc l'amplitude rétrodiffusée, va varier selon les plans. L'amplitude mesurée sur chacune des images associées à chacun des plans pour une position (x,z) ne sera donc pas la même. Prenons l'exemple de la bulle située dans le pixel B : elle est centrée par rapport à la largeur du faisceau ultrasonore pour le plan d'imagerie numéro 3. Sur les cinq images obtenues, l'intensité du pixel associée à la position

(x_B, z_B) sera donc maximale pour l'image du plan 3 et va décroître en allant vers le plan 1 d'un côté et vers le plan 5 de l'autre. Les bulles des pixels A et C illustrent deux autres situations.

Dans un premier temps, les 5 valeurs d'amplitude telles qu'illustrées en figure 4.74 sont obtenues pour chaque pixel ULM grâce aux acquisitions sur les 5 plans. À partir de ces réponses, un ajustement (on emploiera dans la suite le terme anglais de fit) avec la réponse type en élévation (telle qu'elle a été montrée en figure 4.67D) est réalisé pour trouver la position du maximum selon Y et donc la position en Y du vaisseau correspondant au pixel. On utilise pour ce fit une gaussienne :

$$f(y) = a * \exp\left(-\frac{(y-y_0)^2}{b}\right) \quad (4.18)$$

a : amplitude y_0 : centroïde c : facteur sur la largeur de la gaussienne

Ce fit nous donne la coordonnée y_0 du vaisseau. Cela correspond à l'analogie de ce qui est classiquement fait en ULM pour lequel on fit les images de bulles sur la réponse type dans le plan XZ (PSF 2D) pour trouver la position du maximum de la PSF dans XZ avec une résolution sub-pixel.

On utilise ici 5 plans car on a estimé que 5 points seraient suffisants pour estimer correctement les fit et connaître les positions en Y pour les vaisseaux centrés sur les 5 plans. Si on voulait étendre le volume sur lequel est faite cette étude, il suffirait d'augmenter le nombre de plans.

Résultats : localisation 3D

La figure 4.75 représente les cartes ULM obtenues pour 5 plans en nombre de bulles (représentation classique de l'ULM) et en intensité de rétrodiffusion. Les plans étant espacés de 100 microns, ce qui est inférieur à la largeur du faisceau, les mêmes vaisseaux sont visibles sur plusieurs plans consécutifs. La zone étudiée est située dans le thalamus d'un cerveau de rat, les vaisseaux visibles sont des vaisseaux qui sont inclinés par rapport au plan coronal et traversent le plan d'imagerie.

Les pixels bleu, vert et rouge illustrent les situations décrites dans le schéma figure 4.74. Le pixel bleu appartient à un vaisseau qui est plutôt centré sur le plan 4 (pour lequel l'intensité de ce pixel est maximale) ; le pixel vert correspond à un vaisseau qui à cette position est situé entre le plan 3 et le plan 4 ; le pixel rouge est situé proche du plan 5 et même au-delà. Les valeurs d'intensité pour ces 3 pixels et pour les 5 plans sont donnés en B. Le nombre de bulles détectées est aussi donné pour information entre parenthèse : la variabilité vient du fait que toutes les images n'ont pas été obtenues avec exactement le même nombre de bulles. L'information en intensité est quant à elle normalisée par le nombre de bulles car elle correspond à l'intensité moyenne des bulles passées dans ce vaisseau. Pour chaque pixel, à partir des intensités obtenues pour les cinq plans, on réalise un fit avec la réponse type en élévation. Le résultat pour les 3 pixels exemples est montré par les courbes magenta. La position du maximum de ce fit permet d'obtenir la position en Y du pixel correspondant.

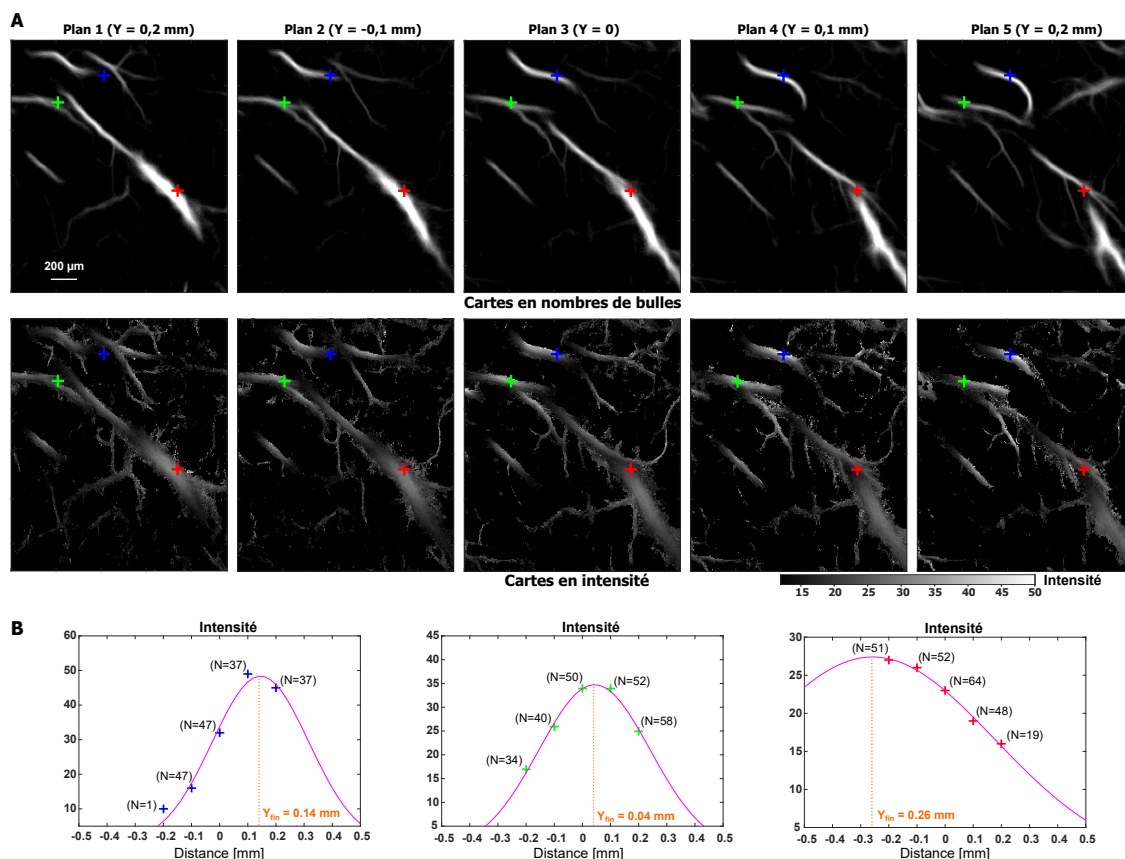


FIGURE 4.75 – (A) Carte en nombre de MBs (haut) et en amplitude de rétrodiffusion (bas) pour 5 plans coronaux (XZ) d'un cerveau de rat (thalamus). Les 5 plans sont situés tous les 100 µm selon l'axe Y. (B) Amplitude de rétrodiffusion des pixels correspondant aux croix bleue, verte et rouge en (A) pour chacun des 5 plans. (N =) : nombre de MBs sur lequel cette amplitude a été calculée. À partir des 5 points en amplitude de rétrodiffusion, un fit est réalisé (courbe magenta) dont on extrait la position du maximum. Celle-ci donne la localisation du vaisseau en Y pour la position en XZ du pixel correspondant.

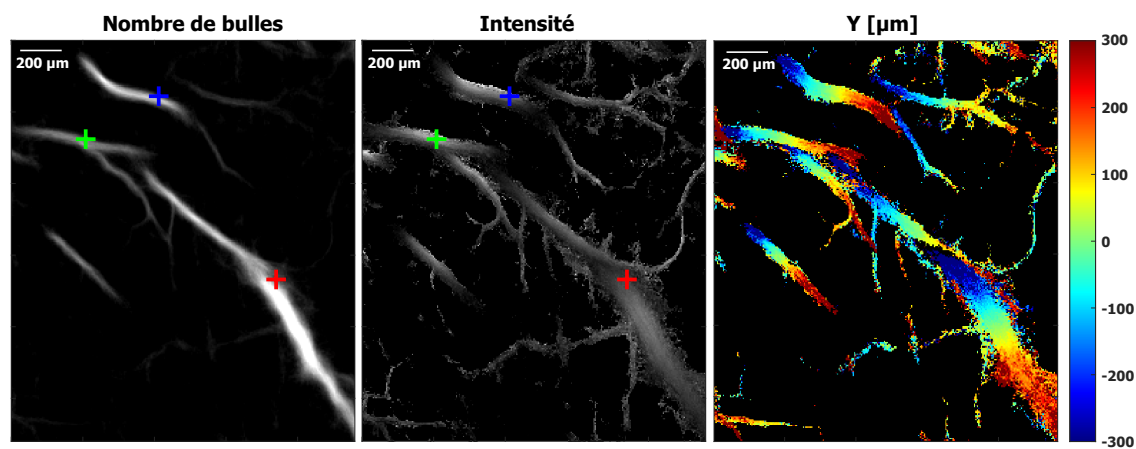


FIGURE 4.76 – Carte du plan numéro 3 en nombre de MBs (gauche), en amplitude de rétrodiffusion (centre) et la localisation selon Y des vaisseaux (droite).

La figure 4.76 montre le résultat de cette analyse effectuée sur tous les pixels de l'image étudiée. On peut y voir la position des vaisseaux selon l'axe Y : les vaisseaux montrés ici sont des vaisseaux qui traversent le plan d'imagerie. Cela permet d'obtenir une localisation 3D comme montré sur les cartes dans les 3 plans de l'espace en figure 4.77 ou sur le rendu 3D de la figure 4.78.

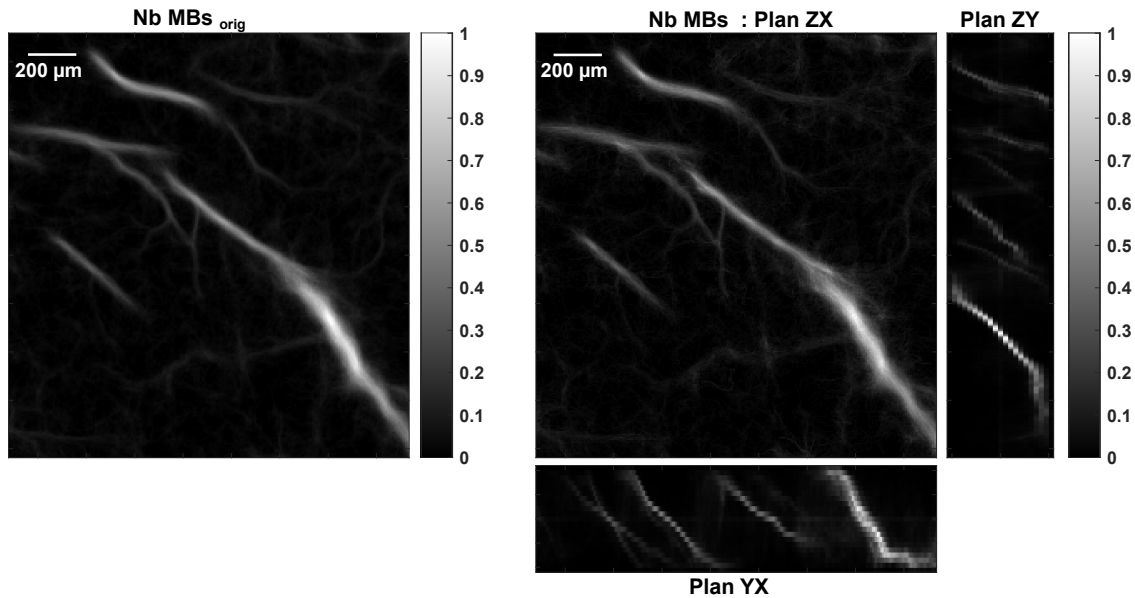


FIGURE 4.77 – Gauche : Carte du nombre de MBs dans le plan XZ obtenue par l'algorithme d'ULM initial. Droite : Carte du nombre de MBs dans les plans XZ, XY et YZ après localisation selon Y.

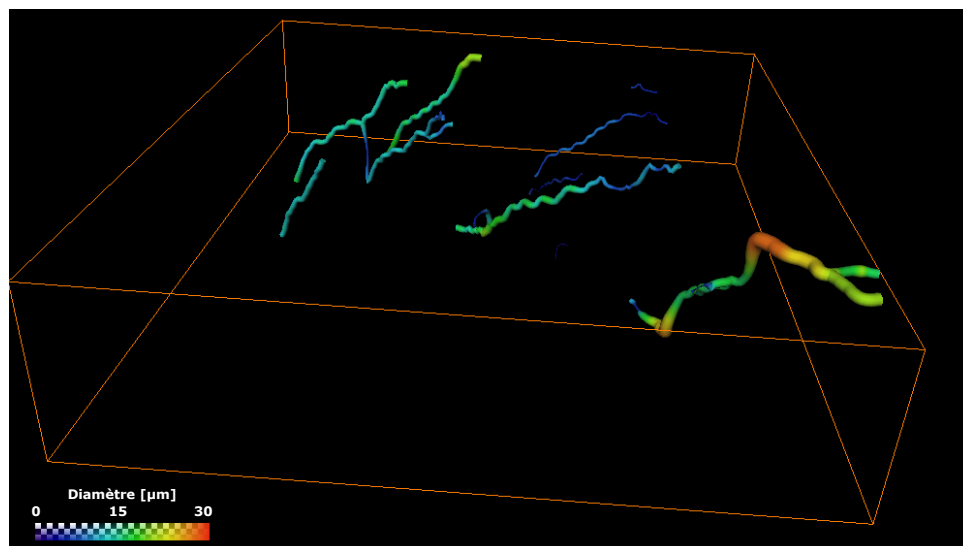


FIGURE 4.78 – Rendu 3D du volume localisé grâce à l'imagerie de rétrodiffusion en ULM. L'échelle de couleur représente les variations de diamètre des vaisseaux.

Résultats : quantification de la résolution de la localisation selon Y

On cherche ici à estimer la résolution selon Y obtenue par cette méthode de localisation. Pour cela on utilise les valeurs des intervalles confiance sur le paramètre y_0 données lors du fit. La figure 4.79B montre une carte qui pour chaque pixel donne la largeur de cet intervalle de confiance à 75%. On remarque que la localisation présente la meilleure précision pour les vaisseaux qui sont centrés au niveau du plan 3. En effet pour ces positions, le fit repose sur des valeurs situées de part et d'autre du maximum et est plus précis. Inversement, le fit est évidemment moins précis pour les vaisseaux qui sont situés à des positions Y extérieures aux deux plans extrêmes ($Y < -200 \mu\text{m}$ et $Y > 200 \mu\text{m}$). Si l'on souhaite avoir des localisations pour un volume plus large, il faudrait réaliser plus de plans.

La résolution est estimée sur les pixels localisés entre -20 et $20 \mu\text{m}$, la médiane de la largeur de l'intervalle de confiance est de $36 \mu\text{m}$.

On rappelle que la largeur du faisceau (à la profondeur considérée) est de $400\text{-}500 \mu\text{m}$, alors qu'on obtient ici une résolution de $40 \mu\text{m}$. Comme pour la super-résolution dans le plan XZ utilisée classiquement en ULM, on exploite ici le fait que le diffuseur soit isolé pour le localiser avec une précision supérieure à la limite de résolution dû à la diffraction qui prévaut dans le cas de diffuseurs multiples. Le fait que le diffuseur soit isolé est clé ici pour relier la valeur de l'intensité à la position en Y, car dans le cas de diffuseurs multiples l'aléa spatial au sein de la cellule de résolution détruit aussi l'information d'amplitude de la rétrodiffusion.

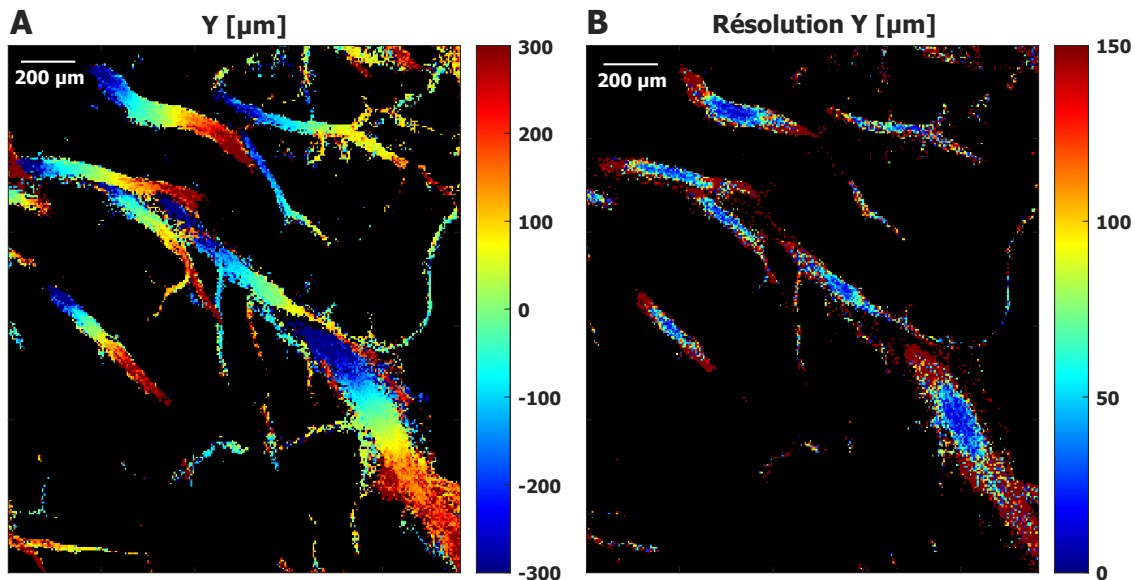


FIGURE 4.79 – (A) Carte de localisation selon Y. (B) Carte de la largeur de l'intervalle de confiance à 75% sur la localisation en Y pour chaque pixel.

Résultats : correction de la vitesse absolue

Une fois que la position des vaisseaux a été déterminée selon Y, il est possible de corriger les vitesses calculées dans la version originale de l'algorithme ULM 2D en prenant en compte la composante V_y de la vitesse (figure 4.80).

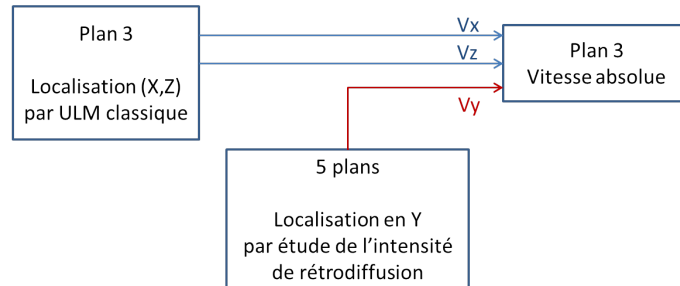


FIGURE 4.80 – Schéma de principe de la correction de vitesse par étude de l'intensité de rétrodiffusion

Pour illustrer cette correction, on sélectionne les pixels pour lesquels la localisation en Y est suffisamment précise (en particulier les pixels localisés dans l'intervalle $-200 < Y < 200 \mu\text{m}$ seront étudiés). Le même raisonnement peut s'appliquer en utilisant plus de plans si l'on souhaite corriger un volume plus grand. Les résultats sont montrés en figure 4.84, 4.81, 4.82 et 4.83. On peut vérifier que les composantes V_x et V_z de la vitesse restent inchangées, alors que la vitesse totale augmente largement à cause de la composante V_y non nulle. Dans ce cas où les vaisseaux traversent le plan d'imagerie XZ, la vitesse était en effet très largement sous-estimée.

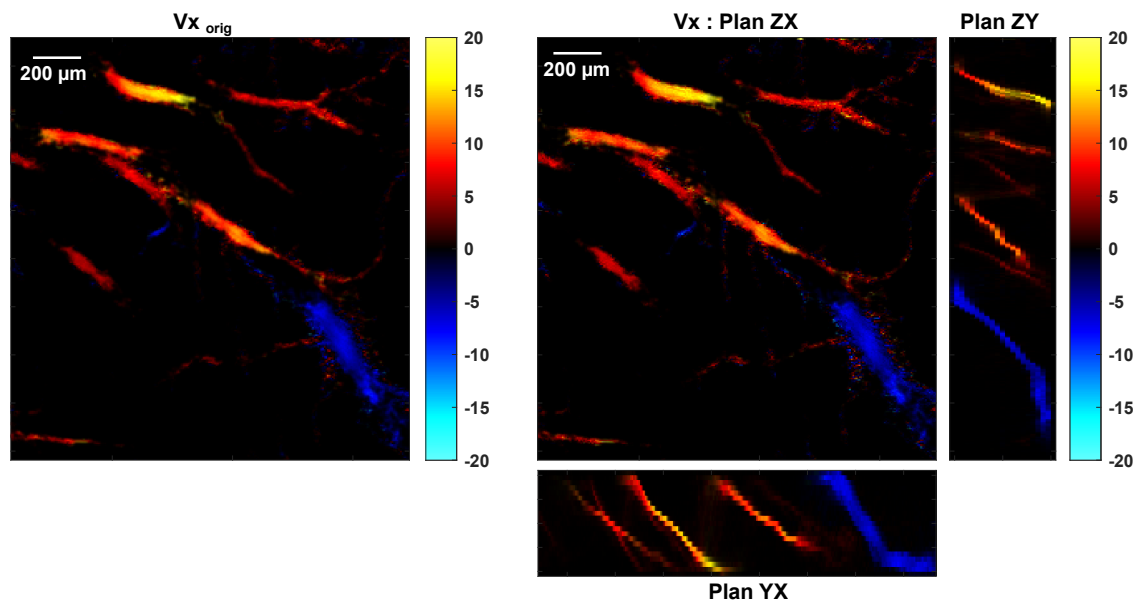


FIGURE 4.81 – Gauche : Carte de vitesse selon X dans le plan XZ obtenue par l'algorithme d'ULM initial. Droite : Carte de vitesse selon X dans le plan XZ après correction de la vitesse par prise en compte de la position en Y des MBs. Cartes de vitesse selon X dans les plans XY et YZ.

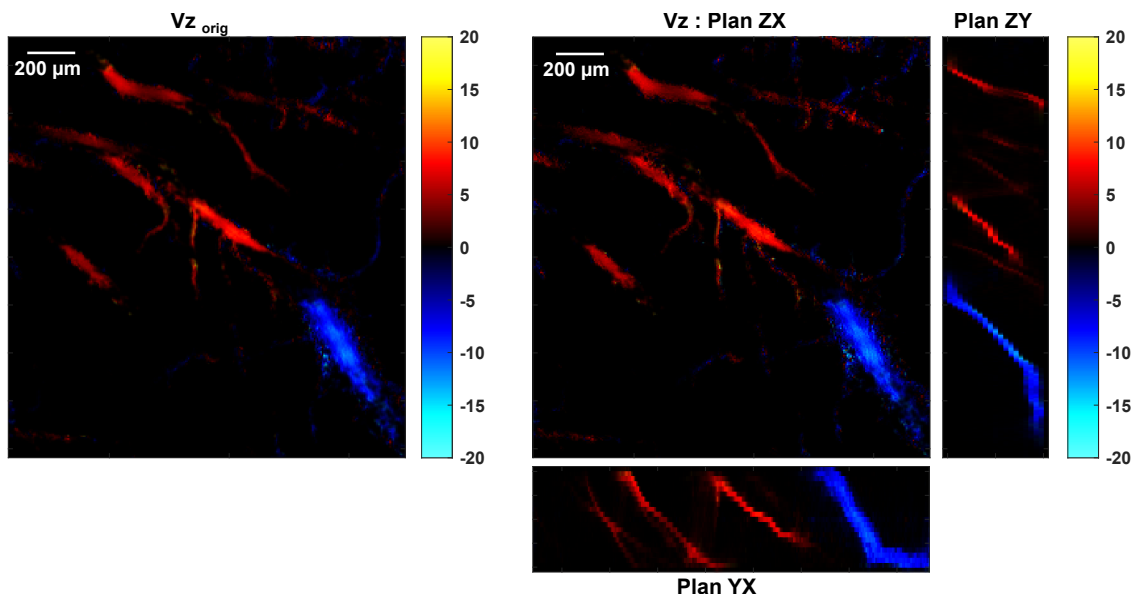


FIGURE 4.82 – Gauche : Carte de vitesse selon Z dans le plan XZ obtenue par l’algorithme d’ULM initial. Droite : Carte de vitesse selon Z dans le plan XZ après correction de la vitesse par prise en compte de la position en Y des MBs. Cartes de vitesse selon Z dans les plans XY et YZ.

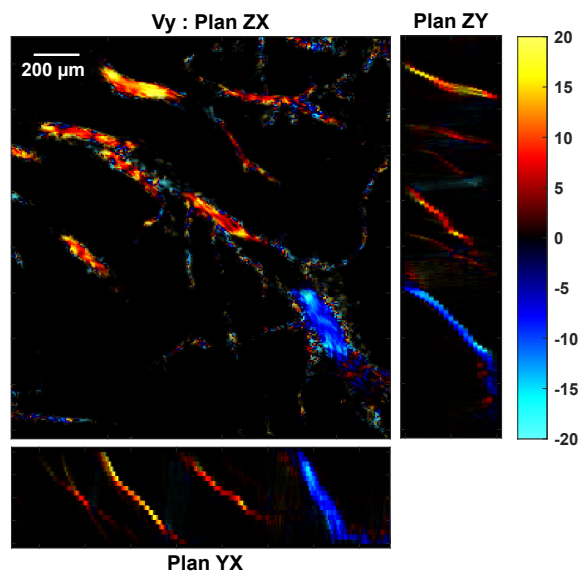


FIGURE 4.83 – Cartes de vitesse selon Y dans les plan XZ, XY et YZ après localisation des MBs selon Y.

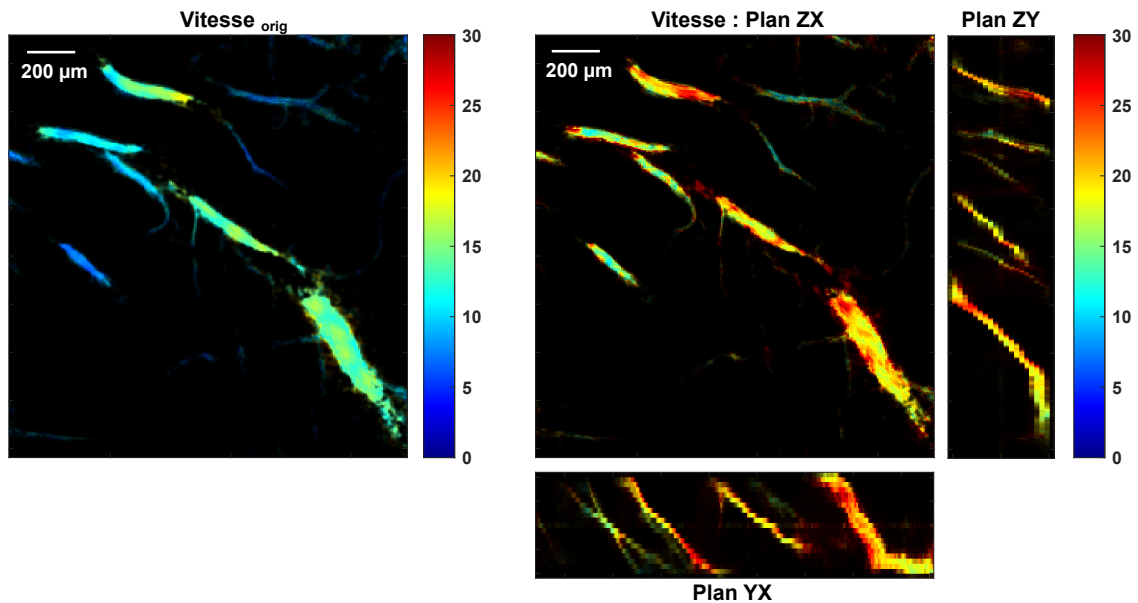


FIGURE 4.84 – Gauche : Carte de vitesse dans le plan XZ obtenue par l’algorithme d’ULM initial. Droite : Carte de vitesse dans le plan XZ après correction de la vitesse par prise en compte de la position en Y des MBs. Cartes de vitesses dans les plans XY et YZ.

4.18.3.2 Conclusion, limites et perspectives

Ainsi, la possibilité d’avoir une localisation super-résolue 3D en utilisant une sonde linéaire 2D a été montrée. Le concept utilisé pour la localisation dans la dimension hors plan d’imagerie est très similaire à celui utilisé pour la localisation dans le plan : il s’agit d’utiliser le caractère isolé d’un diffuseur pour pouvoir retrouver une information de localisation, car un diffuseur isolé a une réponse par un système d’imagerie qui est connue.

Validation in vitro

Une première preuve de concept d’un algorithme de localisation selon Y vient d’être montrée; cet algorithme doit encore être validé et optimisé. Pour cela nous proposons de réaliser une expérimentation in vitro sur des tubes avec des inclinaisons différentes par rapport au plan d’imagerie et dont les positions dans l’espace 3D sont connues.

Limites

Plusieurs hypothèses faites dans cette étude peuvent en pratique compliquer la localisation telle qu’elle a été décrite. D’autres facteurs influencent l’intensité rétrodiffusée par la microbulle, notamment sa taille (la distribution de microbulles n’est en réalité pas monodisperse) et le fait que les microbulles ne sont en pratique pas toujours isolées, notamment dans les gros vaisseaux.

Perspective : Localisation 3D et correction de vitesse par imagerie ULM 2D de rétrodiffusion dans un plan unique.

À terme, l'objectif serait de pouvoir effectuer une localisation selon l'axe Y sans avoir besoin d'imager plusieurs plans, en ayant une connaissance précise de la fonction $I = f(Y)$ pour chaque coordonnée (x,z) . On pourrait imaginer pour obtenir cette fonction effectuer une calibration à l'hydrophone, utiliser des résultats de simulation, ou même utiliser une expérience de multiplans in vivo avec la sonde et dans des conditions expérimentales précises pour trouver cette fonction, puis l'appliquer sur les expérimentations suivantes réalisées dans les mêmes conditions.

On peut cependant noter que l'approche multiplan en ULM 2D pour obtenir un volume super-résolu peut déjà présenter un intérêt par rapport à de l'ULM 3D utilisant directement une sonde matricielle. En effet ces sondes matricielles restent aujourd'hui moins sensibles et offrent une moins bonne résolution que les sondes 2D.

4.19 Signal ULM et signal Doppler de puissance

L'ULM est une modalité multi-paramétrique. Elle nous donne d'un côté, via la localisation dans le plan d'imagerie 2D, accès à des cartes de flux sanguins et de vitesse, et on verra comment obtenir des cartes de volume sanguin. De l'autre, on a vu qu'on pouvait avoir accès à la mesure de l'intensité de rétrodiffusion ultrasonore. Or ces paramètres sont les paramètres d'importance qui permettent d'expliquer le signal Doppler de puissance. Ce signal est à la base de l'imagerie fUS, modalité de neuroimagerie fonctionnelle par ultrasons. Dans ce domaine en plein développement, la compréhension du signal fUS, ie du signal Doppler de puissance enregistré par l'imageur, est d'une importance majeure. Avoir une interprétation correcte du signal Doppler de puissance est donc crucial.

L'objectif de cette partie est donc de comparer le signal Doppler de puissance mesuré à un échelle macroscopique (centaine de microns) aux informations données par l'ULM à des échelles micrométriques.

4.19.1 Signal Doppler de puissance

Le signal Doppler de puissance est une mesure de l'énergie du signal ultrasonore rétrodiffusé par les particules en mouvement. En considérant qu'il n'y a pas de mouvement des tissus, les particules en mouvement sont celles présentes dans la circulation sanguine. Le sang est composé d'un liquide, le plasma, dans lequel des érythrocytes (globules rouges, RBCs - Red Blood Cells), des leucocytes (globules blancs) et des plaquettes sont en suspension. Chez un adulte humain, les concentrations de ces différentes cellules sont environ de $5 \times 10^9 / \text{cm}^3$ pour les RBC, $7,5 \times 10^6 / \text{cm}^3$ pour les globules blancs et $3,5 \times 10^8 / \text{cm}^3$ pour les plaquettes. Un globule rouge se présente sous la forme d'un disque biconcave, élastique, de diamètre moyen de $7 \mu\text{m}$ pour une épaisseur de $2 \mu\text{m}$ (taille très inférieure à la longueur d'onde, $100 \mu\text{m}$ à 15MHz : on a bien un phénomène de diffusion de type Rayleigh). Le nombre de globules rouges est beaucoup plus élevé que celui de globules blancs et le volume d'un globule rouge est beaucoup plus grand que celui d'une plaquette : on considère généralement que l'énergie rétrodiffusée par le sang est largement due aux globules rouges (K. K. SHUNG, SIGELMANN et REID, 1976).

La plupart des modèles théoriques utilisés pour étudier la rétrodiffusion par le sang consiste à sommer les contributions des RBCs individuelles et à modéliser l'interaction entre les RBCs par un facteur de structure. Pour des concentrations faibles de diffuseurs, on peut considérer généralement que le Doppler de puissance est directement proportionnel au nombre de diffuseurs. Pour le sang et un taux d'hématocrite physiologique (35 à 45%), la densité en RBC est très élevée et les RBCs interagissent fortement. La position de chaque paire de diffuseurs n'est ni totalement décorrélée ni parfaitement corrélée dans le temps et l'espace. Les RBCs se retrouvent aussi très largement sous forme d'agrégats. La description de Rayleigh ne suffit pas et il faut prendre en compte les arrangements spatiaux et temporels pour définir l'énergie

rétrodiffusée. Ils sont souvent pris en compte sous forme d'un facteur de structure rendant compte de l'état d'agrégation. Shung, Cloutier et Lim (K. SHUNG, CLOUTIER et LIM, 1992) ont montré que le Doppler de puissance n'est alors pas directement proportionnel au nombre de RBCs mais au volume occupé par les RBCs, la densité de puissance du spectre Doppler étant donnée par :

$$P(\omega)d\omega = \sigma_b n_0 W(H) dV(v) \tag{4.19}$$

Avec :

σ_b : section efficace de rétrodiffusion n_0 : nombre moyen de RBC par unité de volume
 $W(H)$: facteur de structure dépendant de l'hématocrite H, il prend en compte l'interaction entre les particules quand l'hématocrite augmente. Pour un flux laminaire et en considérant que les RBC sont des particules sphériques, on utilise généralement $W(H) = \frac{(1-H)^4}{(1+2H)^2}$
 $dV(v)$: volume de RBC se déplaçant à une vitesse comprise dans $[v \ v+dv]$

Dans la littérature, la plupart des études en Doppler de puissance en clinique et en pré-clinique considèrent ainsi que le signal Doppler de puissance d'un pixel est proportionnel au CBV, ie au volume sanguin contenu dans le volume échantillon correspondant au pixel (RUBIN, ADLER et al., 1995).

On considère donc que le Doppler de puissance étant proportionnel au volume, il ne dépend pas de la vitesse du sang ou de l'angle du flux sanguin. Pour expliquer succinctement, une modification de ces deux paramètres aura pour effet de décaler le spectre Doppler sur l'axe des fréquences ou de changer sa forme mais l'intégrale du signal (ie le Doppler de puissance) ne sera pas modifié (figure 4.85).

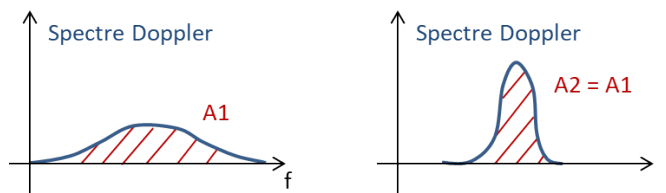


FIGURE 4.85 – Pour deux spectres Doppler différents (avec des répartitions de vitesse différentes), si l'aire sous la courbe est la même le signal Doppler de puissance sera le même.

Une nuance est à apporter par la présence du filtre de réjection du tissu qui est utilisé dans le traitement du signal avant d'obtenir de signal Doppler de Puissance, puisqu'il peut avoir pour effet de filtrer les petites vitesses de flux (MACE et al., 2013).

Le Doppler de puissance étant sensible au volume sanguin et non à sa vitesse, il permet de détecter des augmentations de flux via des vasodilatations (et non via l'augmentation de vitesse). Dans le cas d'un pixel plus grand que la taille du vaisseau, on comprend bien que le volume sanguin augmente si le vaisseau se dilate. Dans le cas d'un vaisseau qui serait plus gros

que le pixel, la dilatation n'a en théorie pas d'effet dans le plan, sauf qu'il ne faut pas oublier l'épaisseur du faisceau ultrasonore : dans cette direction, le vaisseau a sûrement un diamètre inférieure à la largeur du faisceau (400 μm au minimum avec la sonde considérée). On pourrait ainsi considérer que pour un pixel plus grand que le vaisseau, le signal variera avec la carré du rayon alors que pour un pixel plus petit que le vaisseau, il variera linéairement avec le rayon.

Problématique

Ainsi l'interprétation physique du Doppler de puissance est parfois compliquée, il est souvent assimilé au CBV mais on comprend bien qu'il existe un domaine de validité pour accepter cette interprétation car beaucoup de paramètres peuvent influencer : physiologie (via l'hématocrite, le shear rate), sensibilité aux petites vitesses et angle des vaisseaux par rapport au plan d'imagerie... Pour valider les mesures physiques obtenues en Doppler de puissance, on peut trouver dans la littérature des validations in vitro pour lesquelles ces mesures sont confrontées à des paramètres hémodynamiques connus (RUBIN, BUDE et al., 1994) mais la complexité de la rhéologie sanguine n'entre alors pas en compte.

Parallèlement, l'ULM nous donne accès à une échelle micrométrique aux paramètres d'importance qui entre en compte dans le Doppler de puissance : paramètres hémodynamiques et intensité de rétrodiffusion. On souhaite donc confronter dans cette partie le signal Doppler de puissance et le CBV mesuré par ULM. L'avantage de la comparaison qu'on se propose de faire ici est qu'on utilise exactement le même dispositif expérimental : l'objectif est de comparer les mêmes signaux vasculaires en Doppler de puissance et en ULM in vivo, chez le même animal, dans le même plan d'imagerie et avec la même sonde ultrasonore. On a donc exactement le même faisceau ultrasonore et le même substrat physiologique étudié.

4.19.1.1 Méthode : reconstruire un signal à comparer au Doppler de puissance à partir des données ULM

Pour effectuer cette comparaison, l'idée est de reconstruire un signal correspondant au Doppler de puissance à partir des données ULM.

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental (animaux et sonde utilisés), les séquences d'imagerie et le traitement pour obtenir des données ULM sont celles décrites en chapitre 2 (détails en annexe 2.10). Une première acquisition est réalisée avec une séquence ultrasonore dédiée pour de l'imagerie Doppler de puissance. Une deuxième acquisition est réalisée à la suite (même sonde sans l'avoir déplacée) avec injection de microbulles pour imager le même plan avec une séquence ultrasonore dédiée pour de l'ULM. Les cartes de nombre de bulles et de vitesse sont calculées grâce à l'algorithme d'ULM.

Reconstruction d'un CBV avec les données ULM

Dans la littérature de l'ULM, les différentes cartes et quantifications se rapportent généralement soit à ce qui est appelé une densité de bulles, soit à la vitesse des bulles. Il est important de correctement définir cette notion de densité, ce terme pouvant porter à confusion. D'autant plus que ce qu'il mesure dépend à notre sens de la façon dont l'algorithme est écrit.

Considérons des bulles qui se déplacent dans la vascularisation, on peut voir les images ultrasonores ultrarapides comme des captures d'écran qui échantillonnent les trajectoires des bulles. En règle générale, dans l'implémentation des algorithmes d'ULM, la trajectoire de la bulle est interpolée entre deux détections de la même microbulle sur deux images ultrarapides, de façon à compter une détection par pixel traversé par la trajectoire. Ainsi, même si la bulle n'a pas été réellement vue sur une des images ultrarapides pour tous les pixels traversés, l'algorithme comble les positions traversées manquantes. Comme l'explique Hingot et al. (HINGOT et al., 2019), le nombre de bulles comptées pour un pixel, qui correspond au nombre de bulles ayant traversé ce pixel, est alors proportionnel au flux de microbulles :

$$N(x, z) = MBF(x, z) * T_{acq} \quad (4.20)$$

$$N(x, z) = CBF(x, z) * C_{MBS} * T_{acq} \quad (4.21)$$

$MBF(x,z)$: flux de MBs en (x,z)

T_{acq} : la durée d'acquisition des données ULM

$CBF(x,z)$: flux sanguin en (x,z)

C_{MBS} : la concentration en MBs dans le sang

On peut en effet vérifier que si la taille du pixel double dans la direction orthogonale au flux, le nombre de bulles comptées doublera; alors que si la taille du pixel double dans la direction du flux, le nombre de bulles comptées restera identique. Si la vitesse double, le nombre de bulles comptées double également : dans le même laps de temps, deux fois plus de bulles auront traversé chaque pixel. Si l'on reprend l'expression d'un flux $Q = \int_S \vec{v} \cdot \vec{dS}$, on observe bien le même comportement : la mesure est proportionnelle à la vitesse et aux dimensions de l'espace orthogonales à la direction du flux.

La littérature ULM parlent généralement de densité pour se référer aux cartes en nombre de MBs, ce qui pourrait plutôt faire penser à une concentration ou un volume. Il faut bien penser qu'il s'agit d'un nombre de bulle pour un temps d'acquisition donné. On peut sinon normaliser par le temps d'acquisition pour avoir directement un flux de microbulles [MB/s].

Il s'agit donc dans un premier temps de mesurer une grandeur proportionnelle à un

CBV plutôt qu'un CBF en ULM, pour pouvoir se comparer au Doppler de puissance lui-même proportionnel au CBV.

Pour l'instant l'algorithme d'ULM qui calcule un nombre de MBs proportionnel au CBF se comporte comme un compteur : il compte pour chaque bulle une détection par pixel traversé. Il s'agit donc de le modifier pour prendre en compte le temps pendant lequel chaque MB est restée dans chaque pixel. En pratique, comme la distance parcourue est identique dans toute l'image (ie la taille d'un pixel), il s'agit de diviser la matrice en nombre de MBs proportionnel au flux par celle en vitesse.

$$N2(x, z) = \frac{MBF(x, z)}{V(x, z)} * T_{acq} \quad (4.22)$$

$$N2(x, z) = k * CBV(x, z) \quad (4.23)$$

Reconstruction d'une image Doppler à partir de l'ULM

Le signal Doppler de puissance correspond à l'énergie rétrodiffusée par les diffuseurs en mouvement dans la cellule de résolution. On considère souvent, sous certaines simplifications (diffuseurs qui n'interagissent pas entre eux et sont distribués de manière aléatoire, en ne prenant pas en compte les effets de la focalisation en élévation...), qu'il correspond au nombre de diffuseurs présents dans la cellule de résolution multiplié par l'énergie rétrodiffusée par un diffuseur, selon la formule (DEFFIEUX, DEMENÉ et TANTER, 2021) :

$$Dop = N v_B^2 \int_f \langle |S_D(f)|^2 \rangle df \quad (4.24)$$

avec :

N : le nombre de diffuseurs

v_B^2 la variance d'un bruit blanc

$S_D(f)$: transformée de Fourier du signal rétrodiffusé par un diffuseur

On note que dans cette formule on ne considère pas les effets de la focalisation en élévation : on considère que tous les diffuseurs participant au signal sont situés au centre du faisceau.

En appliquant un raisonnement analogue, on se propose de calculer une reconstruction du signal Doppler de puissance à partir de la carte ULM en nombre de bulles. Les cartes ULM sont obtenues à une résolution beaucoup plus fine, telles que 1 pixel Doppler correspond ici à 16 par 16 pixels ULM. On calcule alors, sur une grille correspondant à la grille des pixels de l'image Doppler de puissance, l'énergie rétrodiffusée par les microbulles, en intégrant sur la zone correspondant à chaque pixel (de taille pixel Doppler) le nombre de microbulles de chaque pixel ULM multiplié par l'énergie rétrodiffusée par les bulles de ces pixels ULM (formule 4.25).

Cette valeur nous est donnée par les cartes en intensité de rétrodiffusion. On introduit aussi dans le calcul une convolution par un kernel gaussien de largeur lambda (longueur d'onde) dans le plan XZ pour tenir compte du volume échantillon qui participe au signal d'un pixel Doppler. On appelle (X,Z) les coordonnées dans la grille Doppler de puissance et (x,z) les coordonnées dans la grille ULM. On pose donc :

$$Dop_{ULM}^I(X, Z) = \int_{pix(x,z)} (N(x, z) I^2(x, z) * kernel) dx dz \quad (4.25)$$

$N(x,z)$: la carte ULM en nombre de MBs

$I(x,z)$: la carte ULM en intensité, mesurée comme intensité du pixel sur le BMode. Elle est alors homogène à une pression. I^2 nous donne l'intensité.

* : désigne ici l'opérateur convolution

Le $N(x,z)$ utilisé est celui qui prend en compte le temps de transit des MBs dans le pixel, ie le N proportionnel au CBV.

Les hypothèses pour utiliser la formule 4.24 sont que les diffuseurs n'interagissent pas entre eux, ce qui est le cas ici puisqu'on utilise des données de MBs isolées. L'autre hypothèse est qu'on néglige les effets de focalisation en élévation, or les prend ici en compte en introduisant dans le calcul l'intensité de rétrodiffusion de MBs. Utiliser la formule 4.25 en analogie à la formule 4.24 est donc pertinent.

On étudiera aussi une reconstruction qui ne prend pas en compte l'intensité rétrodiffusée par les MBs pour comparaison, reconstruction qui suit la formule :

$$Dop_{ULM}(X, Z) = \int_{pix(x,z)} (N(x, z) * kernel) dx dz \quad (4.26)$$

4.19.1.2 Résultats : comparaison entre signal Doppler de puissance et signal CBV par ULM

Des reconstructions du signal Doppler de puissance à partir des données ULM, en prenant en compte ou non le paramètre d'intensité des microbulles sont montrées pour un plan coronal d'un cerveau de rat en figure 4.86. Qualitativement, la carte ULM CBV avec intensité ressemble effectivement à la carte de Doppler de puissance. La prise en compte du paramètre d'intensité des MBs semble améliorer la reconstruction. Cela permet de rendre compte à la fois les effets de l'atténuation en profondeur mais aussi d'une énergie rétrodiffusée différente pour les MBs (et les RBCs) circulant dans des vaisseaux plus ou moins centrés en élévation par rapport au faisceau ultrasonore. La sensibilité en profondeur est meilleur sur la reconstruction ULM car les diffuseurs utilisés sont beaucoup plus échogènes.

En figure 4.87 on étudie la relation entre Doppler de puissance et la reconstruction par ULM (avec prise en compte de l'intensité). Sur plus de 40 dB, on remarque que ces deux variables suivent une relation linéaire (coefficient de corrélation de 0.92). On rappelle que même si l'on est

bien en train de caractériser les mêmes flux, le Doppler de puissance a mesuré le signal issu de RBCs, alors que le CBV mesuré par ULM a mesuré le signal issu de MBs : ces deux informations semblent bien cohérentes.

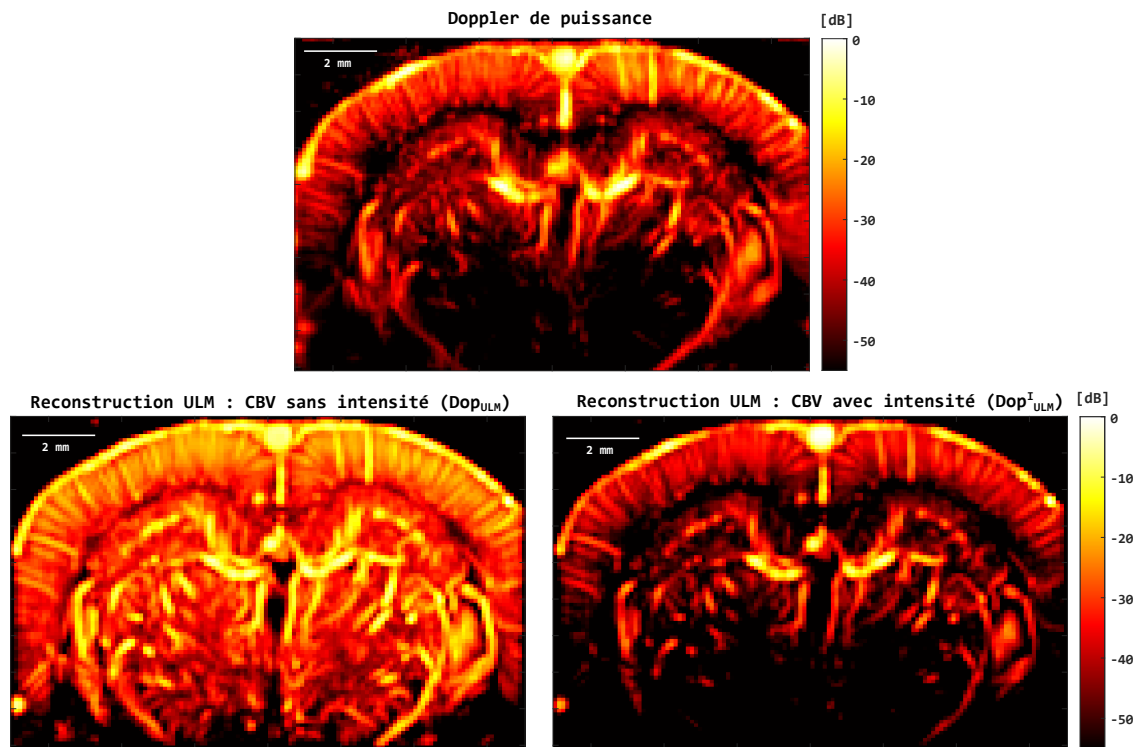


FIGURE 4.86 – Haut : Doppler de puissance. Bas : reconstruction d'un signal Doppler à partir de l'ULM selon la formule 4.26 sans prise en compte de l'intensité des MBs (centre), reconstruction d'un signal Doppler à partir de l'ULM selon la formule 4.25 avec prise en compte de l'intensité des MBs (droite).

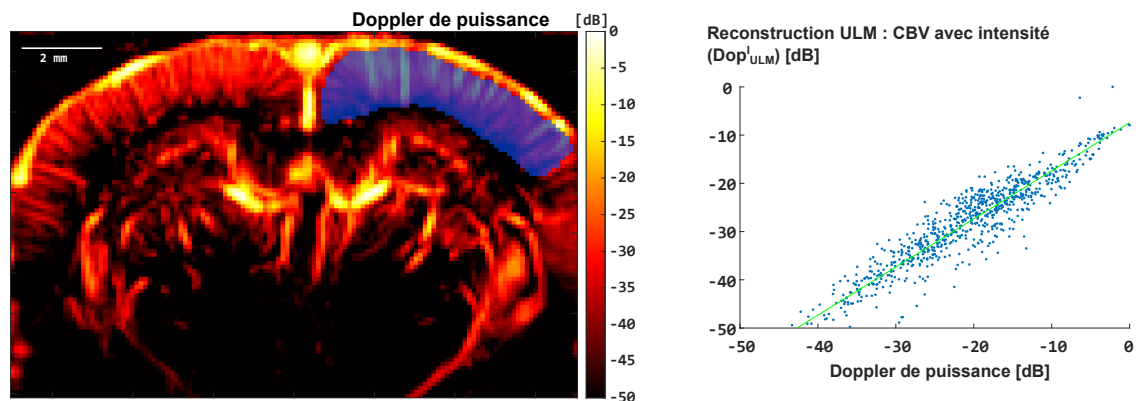


FIGURE 4.87 – Gauche : Doppler de puissance sur lequel la zone étudiée est surlignée en violet (cortex droit). Droite : scatter plot montrant la reconstruction du signal Doppler par ULM avec prise en compte de l'intensité en fonction du signal Doppler, selon la formule 4.25. Chaque point correspond à un pixel.

4.19.1.3 Conclusion et perspectives

Ainsi, il semble possible de reconstruire un signal Doppler à partir des informations hémodynamiques à l'échelle microscopique fournies par l'ULM, alors que les diffuseurs qui participent au signal de ces deux modalités ne sont même pas les mêmes. Dans cette reconstruction, l'intensité de rétrodiffusion introduite dans ce chapitre est un paramètre clé.

Cette méthode de comparaison devra être validée. Certains biais qui peuvent nuire à la comparaison devront être corrigés (sensibilité différente des deux techniques aux petites vitesses ou en profondeur...). Une métrique pour comparer judicieusement les deux signaux devra être trouvée.

Cette méthode pourrait alors permettre d'étudier le comportement du Doppler de puissance dans des conditions pour lesquelles son interprétation physiologique n'est pas facile.

Connaître la fonction de transfert entre Doppler de puissance et ULM pourrait aussi faciliter la combinaison de ces deux modalités, qui permettrait de combiner l'excellente résolution temporelle du fUS avec l'excellente résolution spatiale de l'ULM.

4.20 Conclusion du chapitre

On a pu voir dans ce chapitre comment l'étude de l'intensité rétrodiffusée par les microbulles pouvait offrir, en plus d'un contraste différent pour les cartes ULM, une information manquante dans les algorithmes d'ULM appliqués sur des données issues de sondes linéaires : la position hors plan des vaisseaux. Cela permet en particulier d'obtenir une meilleure estimation des vitesses de flux sanguins. Une validation in vitro des estimations de vitesse et un élargissement à des expériences qui ne nécessitent pas d'imager plusieurs plans restent à être réalisés.

Ce paramètre d'intensité rétrodiffusée, en complément des paramètres hémodynamiques déjà fournis par l'ULM à une échelle microscopique, nous permet aussi d'essayer de faire le lien entre le signal fourni par le Doppler de puissance et celui fourni par l'ULM. Une telle comparaison pourra aider à l'interprétation physiologique du Doppler de puissance, signal utilisé par une modalité de neuroimagerie fonctionnelle en plein développement, le fUS. Cela pourra permettre aussi éventuellement de combiner plus facilement le fUS et le fULM pour créer une modalité hybride, tirant partie de l'excellente résolution temporelle du fUS et spatiale du fULM.

Références

- DEFIEUX, Thomas, Charlie DEMENÉ et Mickael TANTER (15 oct. 2021). « Functional Ultrasound Imaging : A New Imaging Modality for Neuroscience ». In : *Neuroscience*. Brain imaging 474, p. 110-121. ISSN : 0306-4522. DOI : 10.1016/j.neuroscience.2021.03.005. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452221001214> (visité le 12/02/2022).
- HINGOT, Vincent et al. (déc. 2019). « Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localization Microscopy ». In : *Scientific Reports* 9.1. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-018-38349-x. URL : <http://www.nature.com/articles/s41598-018-38349-x> (visité le 04/09/2019).
- JENSEN, J.A. et N.B. SVENDSEN (mars 1992). « Calculation of pressure fields from arbitrarily shaped, apodized, and excited ultrasound transducers ». In : *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 39.2. Conference Name : IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, p. 262-267. ISSN : 1525-8955. DOI : 10.1109/58.139123.
- JENSEN, Jørgen (1^{er} jan. 1996). « FIELD : A program for simulating ultrasound systems ». In : *Medical and Biological Engineering and Computing* 34, p. 351-352.
- MACE, Emilie et al. (mars 2013). « Functional ultrasound imaging of the brain : theory and basic principles ». In : *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 60.3. Conference Name : IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, p. 492-506. ISSN : 1525-8955. DOI : 10.1109/TUFFC.2013.2592.
- RUBIN, J. M., R. S. ADLER et al. (oct. 1995). « Fractional moving blood volume : estimation with power Doppler US ». In : *Radiology* 197.1, p. 183-190. ISSN : 0033-8419. DOI : 10.1148/radiology.197.1.7568820.
- RUBIN, J. M., R. O. BUDE et al. (1^{er} mars 1994). « Power Doppler US : a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. » In : *Radiology*. DOI : 10.1148/radiology.190.3.8115639. URL : <https://pubs.rsna.org/doi/abs/10.1148/radiology.190.3.8115639> (visité le 29/07/2021).
- SCHNEIDER, Michel (1999). « Characteristics of SonoVue™ ». In : *Echocardiography* 16 (s1). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1540-8175.1999.tb00144.x>, p. 743-746. ISSN : 1540-8175. DOI : 10.1111/j.1540-8175.1999.tb00144.x. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1540-8175.1999.tb00144.x> (visité le 19/01/2022).
- SHUNG, K. K., R. A. SIGELMANN et J. M. REID (nov. 1976). « Scattering of ultrasound by blood ». In : *IEEE transactions on bio-medical engineering* 23.6, p. 460-467. ISSN : 0018-9294. DOI : 10.1109/tbme.1976.324604.
- SHUNG, K.K., G. CLOUTIER et C.C. LIM (mai 1992). « The effects of hematocrit, shear rate, and turbulence on ultrasonic Doppler spectrum from blood ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 39.5. Conference Name : IEEE Transactions on Biomedical Engineering, p. 462-469. ISSN : 1558-2531. DOI : 10.1109/10.135540.

Conclusion

Cette thèse a eu pour objet de développer une nouvelle modalité de neuroimagerie fonctionnelle à partir de la technique de Microscopie de Localisation Ultrasonore.

La Microscopie de Localisation Ultrasonore est fortement complémentaire aux techniques existantes de neuroimagerie puisqu'elle offre une très bonne résolution spatiale (inférieure à 10 μm) sur un large champ de vue (dizaines de millimètres en profondeur). La complexité pour la transformer en une modalité d'imagerie dynamique réside dans les longs temps d'acquisition nécessaires pour obtenir une sensibilité suffisante dans les plus petits vaisseaux sanguins.

Pour résoudre ce compromis, une méthode reposant sur la répétition de motifs de stimulation pour gagner en sensibilité, ie en nombre de microbulles détectées par unité de temps, a été développée. Cela a permis d'obtenir des films permettant de suivre l'activité vasculaire au cours d'un motif de stimulation. Des méthodes de traitements de ces cartes dynamiques ont été testées, en particulier l'analyse par décomposition en valeurs singulières. Cette méthode d'analyse a permis d'obtenir des cartes quantitatives de l'hyperhémie fonctionnelle à une résolution inférieure à 10 μm sur un cerveau entier de rat.

Une fois la méthode développée, plusieurs analyses ont été menées sur les données fULM produites pour quantifier les réponses à des stimuli fonctionnels (stimulation des vibrisses et stimulations visuelles), les confronter aux résultats obtenus par d'autres techniques, et proposer des outils d'analyses spécifiques au fULM. On peut citer par exemple la possibilité d'étudier des réponses différenciées pour différents compartiments vasculaires, pour différentes profondeurs corticales voire couches corticales, ou l'approche lagrangienne que l'on peut utiliser sur les traces de microbulles et qui permet de relier les réponses obtenues en différents points. On notera l'apport tout particulier du fULM pour l'étude de stimuli activant des zones sous corticales, privilège que les modalités optiques, les seules atteignant des résolutions micrométriques, ne possèdent pas.

On s'est aussi intéressé plus précisément au signal ULM qui sous-tend le signal fULM. En particulier, on a étudié l'intensité rétrodiffusée par les microbulles qui sont localisées dans les algorithmes d'ULM. On s'est alors attaché à montrer que ce paramètre pourrait être utilisé pour lever l'indétermination sur la position des vaisseaux dans la dimension hors plan d'imagerie

en ULM 2D et ainsi offrir des quantifications plus précises des vitesses. On s'est aussi intéressé à ce paramètre d'intensité de rétrodiffusion pour essayer de comparer les réponses obtenues par le Doppler de puissance et le signal ULM. Ces deux signaux à la base des deux modalités de neuroimagerie fonctionnelle par ultrasons : le fUS et maintenant le fULM.

Le fULM apparaît ainsi comme prometteur, mais il reste encore des améliorations à apporter pour en faire une technique qui serait utilisée en routine comme modalité de neuroimagerie fonctionnelle. Pour y parvenir, le principal enjeu est de gagner en sensibilité. Pour cela, une grande amélioration semble possible rien qu'en travaillant sur l'algorithme d'ULM, qui pour l'instant écarte beaucoup de microbulles. Des méthodes d'analyses plus poussées et plus adaptées des données fULM sont aussi à investiguer.

Gagner en sensibilité pourra permettre d'offrir de nombreuses possibilités d'application au fULM. Cela pourrait être de diminuer le nombre de répétitions nécessaires en gardant les mêmes performances en terme de résolution spatiale, résolution temporelle et sensibilité ; et ainsi de pouvoir réaliser des expérimentations moins longues. On pourrait envisager d'aller vers des études en single trial, notamment pour des vaisseaux de tailles suffisantes. Cela pourrait être d'atteindre une résolution temporelle permettant d'effectuer des analyses temporelles plus poussées que celles présentées dans cette thèse (étudier les différences temporelles en fonction des compartiments vasculaires, observer la vasodilatation rétrograde. . .). Cela permettrait aussi de s'attaquer à des applications transcrânielles et à la 3D. Enfin, cela pourrait permettre d'étendre le champ des applications à l'étude d'autres phénomènes cérébraux que la réponse à des stimulations fonctionnelles par stimuli extérieurs : étude de la connectivité cérébrale, des dépressions corticales envahissantes voire de l'épilepsie. Il faut cependant rester conscient qu'on ne descendra cependant pas à la résolution temporelle offerte par l'EEG ou les modalités optiques sans répétitions.

Un deuxième point qui paraît important est de proposer des analyses adaptées à la nature des données ULM. Souvent la littérature ULM se limite à montrer des cartes en nombre de microbulles ou en vitesse, qui ne sont qu'une représentation condensée des données ULM. Il ne faut pas oublier que toutes les trajectoires de millions de microbulles parcourant la vascularisation sont connues. Cela ouvre la voix à beaucoup d'autres analyses possibles.

Le fULM pourrait enfin être une solution au transfert des ultrasons comme modalité de neuroimagerie fonctionnelle en clinique. Cela serait d'autant plus intéressant que les ultrasons restent une technologie peu invasive, peu chère et très portable.

Acronymes

2D Deux dimensions.

3D Trois Dimensions.

ACA Artère cérébrale antérieure (Anterior Cerebral Artery).

AP Pression artérielle (Arterial Pressure).

BMode Mode Brilliance.

BOLD Blood Oxygenation Level Dependent.

CBF Flux sanguin cérébral (Cerebral Blood Flow).

CBV Volume sanguin cérébral (Cerebral Blood Volume).

CCD Charges Coupled Device.

CEUS Imagerie ultrasonore de contraste (Contrast Enhanced UltraSound imaging).

CT Computed Tomography.

ECG ÉlectroCardioGramme.

EEG ÉlectroEncéphaloGramme.

FDG Fluoro Désox yGlucose.

fMRI Imagerie de Résonance Magnétique fonctionnelle (functional Magnetic Resonance Imaging).

fNIRS Spectroscopie fonctionnelle dans le proche infrarouge (functional Near Infrared Spectroscopy).

fPA Imagerie fonctionnelle photoacoustique (functional PhotoAcoustic imaging).

fPALM fluorescence Photoactivated Localization Microscopy.

fULM Imagerie fonctionnelle par microscopie de localisation ultrasonore (functional Ultrasound Localization Microscopy).

fUS Imagerie fonctionnelle UltraSonore.

GLM Modèle linéaire généralisé (General Linear Model).

- IQ** In phase Quadrature.
- IRM** Imagerie de Résonance Magnétique.
- LED** Diode électroluminescente (Light-Emitting Diode).
- LFP** Potentiel champ local (local Field Potential).
- LGN** Corps géniculé latéral (Lateral Geniculate Nucleus).
- MB** MicroBulle.
- MCA** Artère cérébrale moyenne (Middle Cerebral Artery).
- MEG** MagnétoEncéphaloGramme.
- NVC** Couplage neuro-vasculaire (NeuroVascular Coupling).
- PCA** Artère cérébrale postérieure (Posterior Cerebral Artery).
- pCO₂** pression artérielle partielle en dioxyde de carbone.
- PET** Tomographie par Émission de Positons (Positron Emission Tomography).
- pO₂** Pression artérielle partielle en dioxygène.
- PRF** Fréquence de répétition des pulses ultrasonores (Pulse Repetition Frequency).
- PSF** Fonction d'étalement du point (Point Spread Function).
- RBC** Globule rouge (Red Blood Cell).
- RF** Radio Fréquence.
- S1BF** Cortex somatosensoriel primaire, partie cortex en tonneau.
- SC** Colliculus supérieur (Superior Colliculus).
- SMC** Cellule musculaire lisse (Smooth Muscle Cell).
- SNR** Rapport signal sur bruit (Signal to Noise Ratio).
- STED** Dépletion par émission stimulée (Stimulated Emission Depletion).
- STORM** Stochastic Optical Reconstruction Microscopy.
- SVD** Décomposition en valeurs singulières (Singular Value Decomposition).
- TOF** Time of Flight.
- ULM** Microscopie de localisation ultrasonore (Ultrasound Localization Microscopy).
- VPL** (noyau thalamique) Ventro-Postéro Latéral.
- VPM** (noyau thalamique) Ventro-Postéro Médial.
- VSDOI** Imagerie optique par colorant sensible au potentiel (Voltage Sensitive Dye Optical Imaging).

Publications et Congrès

Publications

Renaudin N, Demené C, Dizeux A, Ialy-Radio N, Pezet S, Tanter M (2022) "Functional Ultrasound Localization Microscopy reveals brain-wide neurovascular activity on a microscopic scale" *Nature Methods*. *In press*.

Goazigo AR, Beliard B, Rahal L, Claron J, Renaudin N, Rivals I, Thibault M, Nouhoum M, Deffieux T, Tanter M, Pezet S (2021) "Ultrasound localization microscopy and functional ultrasound reveal atypical features of the live trigeminal ganglion" *Communications Biology*. *In press*.

Publications en cours d'écriture

Renaudin N, Demené C, Tanter M (2022) "Microscopic imaging of ultrasonic backscattering in Ultrasound Localization Microscopy" *In writing*.

Brevet

Demené C, Deffieux T, Renaudin N, Tanter M (2022) "Method and apparatus for imaging vascular activity dynamically at a microscopic scale"

Présentation orale à une conférence internationale

17th European Molecular Imaging Meeting, Thessalonique 2022, Grèce "Functional Ultrasound Localization Microscopy reveals brain-wide neurovascular activity on a microscopic scale"

RÉSUMÉ

L'avènement de la neuroimagerie a permis d'améliorer considérablement notre connaissance du fonctionnement cérébral. Alors que la plupart des modalités permettent, en exploitant le couplage neurovasculaire, d'imager la totalité du cerveau avec des résolutions spatiales de l'ordre du millimètre, enregistrer des réponses fonctionnelles à des échelles microscopiques reste le privilège des techniques électrophysiologiques ou optiques. Mais ces dernières ne peuvent accéder qu'à la surface du cerveau ou au voisinage direct de capteurs implantés dans les tissus, sans pouvoir couvrir de larges champs de vue. Récemment, la Microscopie de Localisation Ultrasonore (ULM), par la localisation de millions de microbulles injectées dans la vascularisation sanguine, a permis de résoudre le compromis entre résolution spatiale et profondeur de pénétration en imagerie ultrasonore. Le flux cérébrovasculaire a ainsi pu être imagé à des résolutions inférieures à 10 microns sur cerveau entier. Cependant, la durée d'acquisition nécessaire pour détecter des signaux dans les plus petits vaisseaux, de l'ordre de la minute, a restreint son application à une imagerie structurale statique de la microvascularisation et empêché sa translation vers une modalité d'imagerie fonctionnelle.

Dans cette thèse, nous montrons que l'ULM peut être modifiée pour devenir une modalité d'imagerie dynamique. Elle permet alors d'étudier des hyperhémies fonctionnelles sur l'intégralité du cerveau de rat avec une résolution spatio-temporelle de (6,5 μm , 1s). En s'appuyant sur la répétition de plusieurs motifs de stimulation, cette Microscopie de Localisation Ultrasonore fonctionnelle permet de détecter les variations de flux sanguins et de vitesse jusque dans les vaisseaux intraparenchymaux des régions activées. Nous nous intéressons aussi dans cette thèse à un nouveau paramètre en ULM : l'intensité de rétrodiffusion. Nous montrons comment ce paramètre peut être utilisé pour localiser les vaisseaux dans la direction hors plan en ULM 2D, fournissant une localisation en 3D des vaisseaux sanguins et des quantifications plus précises des vitesses de flux. Nous proposons aussi d'étudier ce nouveau paramètre dans le cadre d'une comparaison des signaux Doppler de puissance et ULM, signaux utilisés par les modalités de neuroimagerie fonctionnelle par ultrasons.

MOTS CLÉS

Ultrasons biomédicaux - Neuroimagerie - Imagerie fonctionnelle - Microscopie de Localisation Ultrasonore

ABSTRACT

The advent of neuroimaging has profoundly increased our fundamental understanding of brain function. While most brain-wide functional imaging modalities exploit neurovascular coupling to map brain activity in millimetric resolutions, the recording of functional responses at microscopic scale in mammals remains the privilege of electrophysiological or optical approaches. But these are restricted to either the cortical surface or the immediate vicinity of implanted sensors. Recently, Ultrasound Localization Microscopy (ULM) solved the trade-off between spatial resolution and penetration depth by localizing millions of intravenously injected microbubbles. It achieved transcranial whole-brain imaging of cerebrovascular flow, up to micron scale. However, within microscopic vessels, the long acquisition time required to detect single microbubble signatures has so far restricted ULM application mainly to microvasculature structural imaging.

In this thesis we show that ULM can be modified to study functional hyperaemia dynamically during brain activation, reaching a (6.5 μm , 1s) spatiotemporal resolution in deep cortical and subcortical regions of the rat brain. Using repetitive activation patterns, functional ULM discriminates blood flow and velocity variations during tasks in intraparenchymal and larger vessels of activated regions. We also investigate a new parameter in ULM : the intensity backscattered by microbubbles. We show that this parameter could be used to localize vessels in the out of plane dimension in 2D ULM, thereby providing a 3D localization and a more precise quantification of flow speeds. This parameter could also help us gaining knowledge on the physiological interpretation of the signals used by ultrasound neuroimaging modalities : power Doppler and ULM.

KEYWORDS

Biomedical ultrasounds - Neuroimaging - Functional imaging - Ultrasound Localization Microscopy