



**HAL**  
open science

# Exploration des réseaux épileptiques par imagerie ultrasonore et électrophysiologie

Lim-Anna Sieu

► **To cite this version:**

Lim-Anna Sieu. Exploration des réseaux épileptiques par imagerie ultrasonore et électrophysiologie. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066384 . tel-01826871

**HAL Id: tel-01826871**

**<https://theses.hal.science/tel-01826871>**

Submitted on 30 Jun 2018

**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.

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Cerveau - Cognition - Comportement

*Neuroscience Paris Seine / Equipe Réseau Cortical et Couplage Neurovasculaire*

## **Exploration des réseaux épileptiques par imagerie ultrasonore et électrophysiologie**

Par Lim-Anna Sieu

Thèse de doctorat de Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement le 28 Juin 2016

Devant un jury composé de :

Mme. le Docteur Valérie Crépel (rapporteur)

M. le Docteur Hiram Gurden (rapporteur)

Mme. le Docteur Nathalie Leresche

Mme. le Docteur Nadège Roche-Labarbe

M. le Docteur Ivan Cohen



# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Valérie Crépel, M. Hirac Gurden, Mme Nathalie Leresche et Mme Nadège Roche-Labarbe de l'intérêt qu'ils ont témoigné pour mon travail et d'avoir accepté de faire partie de mon Jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Ivan Cohen de m'avoir encadré tout au long de cette thèse. Je le remercie de m'avoir soutenu dans mon parcours, d'avoir été présent, en particulier dans les moments difficiles, de m'avoir tant appris et surtout de m'avoir accordé toute sa confiance.

Je remercie également Michel Baulac pour m'avoir soutenu et offert la possibilité de réaliser cette thèse.

Merci à Bertrand Lambolez d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de m'avoir apporté tant de bons conseils.

Mes remerciements tout particuliers à Mickaël Tanter et à toute son équipe pour m'avoir donné accès à l'imagerie ultrasonore et d'avoir toujours été présents au cours de mes expériences pour tous les aspects techniques et pour toute l'originalité d'un regard de physicien sur les neurosciences. Merci à Jean-Luc Gennisson, Thomas Deffieux, Mathieu Pernot, Charlie Demené, Elodie Tiran, Bruno Osmanski et tous les autres.

Un grand merci à mon complice Antoine Bergel. Nous avons partagé tant de trucs et astuces pour mettre au point cette nouvelle technique et pour réaliser nos expériences au quotidien!

Merci à tous les membres de l'équipe "Réseau cortical et couplage neurovasculaire" pour leur accueil au laboratoire et les discussions scientifiques stimulantes. A Agnès Bonnot pour ses conseils d'écriture et la relecture de cette thèse et toutes nos discussions scientifiques et générales, à Bruno Cauli pour tous ses bons conseils, à la famille Tricoire : Régine et Ludo pour leur convivialité, à Juliette Piquet pour sa bonne humeur en toutes circonstances, à Xavier Toussay pour les conversations et les séances d'escalades qu'on a partagées, et enfin à Sandrine Picaud pour les échanges aussi bien méthodologiques que personnels.

Un merci également à toutes les personnes du NPS qui participent à faire vivre le laboratoire.

Lors de mes expériences in vitro au tout début de ma thèse, j'ai interagi avec Desdemona Fricker, Emmanuel Eugène et Jean Simonnet que je remercie vivement pour leur accueil chaleureux et pour ce qu'ils m'ont transmis sur les techniques de patch-clamp et de microscopie. Merci aussi à Mérie Nassar dont j'ai fait la connaissance un peu plus tard.

Je tiens à remercier également Clément Léna et Jean-Christophe Poncer qui ont accepté de faire partie de mon comité de thèse et d'avoir été francs dans leurs critiques.

Pour finir, mais non des moindres, je remercie tout particulièrement Edouard Yeramian pour ses conseils bienveillants et Marie-Pierre Poloujadoff pour son expertise qu'elle m'a communiquée en matière d'expérimentation animale.

# Sommaire

---

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Epilepsie : une activité neuronale anormale.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1. L'épilepsie : une maladie d'hyperactivité neuronale .....</b>	<b>6</b>
La contribution de l'électroencéphalogramme (EEG) .....	6
Les classifications des crises épileptiques et des épilepsies .....	9
<i>Les crises épileptiques .....</i>	9
<i>L'étiologie des épilepsies .....</i>	10
<i>Les formes d'épilepsies .....</i>	10
Tissu épileptique : dynamiques aberrantes des réseaux neuronaux.....	13
<i>Rythmes physiologiques : contribution des cellules GABAergiques .....</i>	14
<i>Une réorganisation du réseau : cas de l'épilepsie du lobe temporal (ELT).....</i>	15
<b>1.1.2. L'épilepsie Absence typique : crises généralisées .....</b>	<b>19</b>
Le siège des décharges de pointe-ondes.....	20
L'origine des crises d'absence : thalamus ou cortex ?.....	22
<i>Thalamus : un générateur d'oscillation rythmique.....</i>	22
<i>Cortex : un foyer hyperexcitable .....</i>	25
<b>1.2. Epilepsie : l'implication vasculaire et métabolique.....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.1. Le couplage neuro-vasculaire.....</b>	<b>28</b>
Un lien étroit anatomique : l'unité neurovasculaire.....	30
Un lien étroit fonctionnel : l'hyperémie fonctionnelle.....	32
Le signal hémodynamique.....	33
<b>1.2.2. Les techniques basées sur l'hyperémie fonctionnelle .....</b>	<b>34</b>
Techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale.....	35
<i>La Tomographie à Emission Mono Photonique (TEMP - Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT).....</i>	35
<i>La Tomographie à émission de positron (TEP ou PET) .....</i>	36
<i>L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf).....</i>	37
Techniques mesurant les réponses hémodynamiques en temps réel .....	39
<i>La spectroscopie proche infrarouge fonctionnelle (SPIRf - functional Near-InfraRed Spectroscopy, NIRS) .....</i>	39
<i>Le signal optique intrinsèque (Intrinsic Optical Signal, IOS) .....</i>	41
<i>Le Laser Doppler de flux.....</i>	42
<i>L'imagerie bi-photonique .....</i>	43

<b>1.2.3. Mécanisme vasculaire : cause ou conséquence de l'épilepsie absence ? .....</b>	<b>45</b>
Réponses vasculaires et métaboliques : indicateur de l'activité neuronale.....	45
<i>Cartographie des aires cérébrales associées aux crises d'absences.....</i>	<i>45</i>
<i>L'interprétation du BOLD.....</i>	<i>49</i>
<i>Recherche de l'initiation des crises à partir des réponses vasculaires et métaboliques .....</i>	<i>51</i>
Réponses vasculaires et métaboliques : prédiction dans la survenue des crises épileptiques.....	53
<i>Réponses hémodynamiques au cours des crises d'absence.....</i>	<i>53</i>
<i>Réponses hémodynamiques au cours des crises focales .....</i>	<i>55</i>
L'implication du système vasculaire dans l'épileptogenèse.....	58
<i>Perméabilité vasculaire : déclenchement d'une cascade d'événements menant à l'épileptogenèse.....</i>	<i>58</i>
<i>Les astrocytes : un acteur potentiel dans l'émergence des crises d'absence.....</i>	<i>60</i>
<b>1.3. L'imagerie ultrasonore fonctionnelle (fUS) pour étudier les épilepsies .....</b>	<b>61</b>
<b>1.3.1. Besoin expérimental pour l'étude des crises d'absence .....</b>	<b>61</b>
<b>1.3.2. Que mesure le fUS ? .....</b>	<b>63</b>
Principe du Doppler ultrarapide.....	64
Les caractéristiques de l'imagerie fUS.....	67
<b>1.3.3. Imagerie fUS appliquée aux épilepsies.....</b>	<b>70</b>
Le potentiel de l'imagerie fUS.....	70
Observer l'activité spontanée des réseaux épileptiques par fUS-EEG .....	72
<b>2. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>74</b>
<b>2.1. Lignée de rats GAERS .....</b>	<b>75</b>
<b>2.2. Mise au point de l'étude EEG-mfUS chez le rat mobile .....</b>	<b>76</b>
<b>2.2.1. Préparation de l'animal.....</b>	<b>76</b>
<b>2.2.2. Support et sonde ultrasonore .....</b>	<b>77</b>
Caractéristiques de la sonde ultrasonore miniature.....	77
Support pour la sonde.....	78
<b>2.2.3. Imagerie fUS et EEG.....</b>	<b>78</b>
L'acquisition des séquences ultrasonores.....	78
Acquisition EEG .....	79
<b>2.2.4. Analyse et traitement statistique des données .....</b>	<b>80</b>
<b>3. RESULTATS .....</b>	<b>81</b>
<b>3.1. Article : "EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats" .....</b>	<b>82</b>
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>102</b>

<b>4.1. La méthode mfUS-EEG .....</b>	<b>103</b>
4.1.1. Progrès pour les études fonctionnelles .....	103
4.1.2. Les limites actuelles .....	104
Les limites techniques .....	104
<i>L'imagerie d'un plan.....</i>	<i>104</i>
<i>Les pauses dans l'acquisition du signal fUS.....</i>	<i>107</i>
Analyser le fUS-EEG sur un fond d'activité variable chez l'animal mobile .....	108
<b>4.2. Apport pour la compréhension des crises d'absence .....</b>	<b>109</b>
4.2.1. Les cartes de corrélations.....	109
4.2.2. Asymétrie corticale.....	110
4.2.3. Liens entre changement de débit sanguin, signature EEG et activité neuronale. ....	111
<b>4.3. Perspectives.....</b>	<b>112</b>
4.3.1. Initiation des crises d'absence .....	112
Cortex somatosensoriel primaire ou secondaire.....	112
Cortex ou thalamus .....	112
4.3.2. Prédiction des crises .....	113
4.3.3. Animal mobile vs animal sous sédation .....	113
<b>4.4. Conclusion.....</b>	<b>114</b>
<b>5. ANNEXE I .....</b>	<b>115</b>
5.1. Article : "Disrupted coupling between interneurons and neuronal populations after kainate lesion" .....	116
<b>6. ANNEXE II.....</b>	<b>146</b>
6.1. Article : "Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast ultrasound data highly increases Doppler and fUltrasound sensitivity" .....	147
6.2. Article : "Multiplane wave imaging increases signal-to-noise ratio in ultrafast ultrasound imaging" .....	165
6.3. Article : "4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography" .....	184
<b>7. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>197</b>

# Lexique

---

**Activité paroxystique** : graphoélément se détachant nettement du rythme de fond, dont l'intensité est au maximum.

**Coefficient d'absorption** : capacité du milieu à absorber des photons.

**Diffraction** : comportement de la lumière ou du son lorsqu'ils rencontrent un objet de dimension plus petite ou comparable à sa longueur d'onde. La diffraction est le résultat de l'interférence des ondes diffusées.

**Diffusion** : phénomène par lequel un faisceau lumineux ou sonore est dévié aléatoirement à la rencontre d'un objet ou d'une interface entre deux milieux.

**Etiologie** : étude des causes et facteurs d'une pathologie.

**Graphoélément** : élément de l'EEG constituant une activité.

**Idiopathique** : un symptôme ou une maladie présentant une origine inconnue, se développant indépendamment de toute autre pathologie.

## **Interictale/Intercritique**

**Activité ou décharge interictale** : décharge épileptiforme isolée durant la période interictale.

**Phase interictale** : intervalle entre deux épisodes de crises épileptiques.

**Rétrodiffusion** : phénomène par lequel un faisceau lumineux ou sonore est retourné dans la direction d'où elle a été émise.

**Tomographie** : reconstruction du volume d'un objet à partir d'une série de mesures effectuées par tranche depuis l'extérieur de cet objet.

**Sémiologie** : étude des symptômes et des signes cliniques traduisant le trouble d'une fonction.

**Symptôme** : signe clinique qui représente une manifestation d'une maladie.

**Syndrome** : ensemble de signes cliniques et de symptômes qu'un patient est susceptible de présenter lors de certaines maladies.

# 1. Introduction

# 1.1. Epilepsie : une activité neuronale anormale

## 1.1.1. L'épilepsie : une maladie d'hyperactivité neuronale

L'épilepsie était une maladie plus communément connue pour la survenue de crises épileptiques sous forme d'attaques brusques, reflétées par de manifestations comportementales ; les convulsions, de violentes contractions musculaires anormales et désordonnées, faisant parties d'un des symptômes cliniques les plus impressionnants. Le terme *épilepsie* provient d'ailleurs du latin *epilēpsia* qui dérive lui-même du verbe grec « *ἐπιλαμβάνειν* » (*epilambanein*) signifiant "saisir", "prendre par surprise".

Si l'épilepsie a été longtemps décrite comme une maladie résultant d'un dérèglement cérébral, c'est surtout grâce à l'introduction de l'électroencéphalogramme (EEG) que nous pouvons affirmer aujourd'hui que l'épilepsie est bien une pathologie neurologique. L'EEG est un outil qui a mis en évidence pour la première fois l'activité électrique cérébrale chez l'animal (Caton, 1857) et chez l'homme (Berger, 1929). Cette technique a permis d'importantes avancées, non seulement dans la compréhension de l'électrogenèse cérébrale physiologique (électrophysiologie cérébrale), mais également dans le diagnostic de l'épilepsie et la classification des différents syndromes qui lui sont rattachés.

### La contribution de l'électroencéphalogramme (EEG)

Hans Berger réalise le premier enregistrement EEG de surface chez l'homme en plaçant des électrodes sur le scalp (Berger, 1929). Il décrit diverses activités oscillatoires et montre leurs corrélations avec différents états de vigilance. Les activités oscillatoires ou rythmiques sont issues de la synchronisation des réseaux neuronaux, localement ou sur des territoires cérébraux plus ou moins étendus. L'activité EEG physiologique est ainsi constituée d'ondes de périodes relativement constantes permettant de définir des bandes de fréquence ou rythmes EEG : *delta* (0,5 - 2 Hz) ; *thêta* (3 - 7 Hz) ; *alpha* (8 - 12 Hz) ; *bêta* (14 - 30 Hz) et *gamma* (30 - 100 Hz).

Très rapidement, l'enregistrement EEG devient une méthode couramment utilisée par les neurophysiologistes pour identifier et étudier les états de vigilance (éveil, sommeil lent, sommeil paradoxal) (Klimesch, 1999 ; Steriade, 2003) (Figure 1) et les activités cérébrales associées à des processus mentaux (attention ou exécution d'une tâche). Le caractère non invasif de l'enregistrement EEG de surface en fait l'outil de diagnostic privilégié des neurologues pour évaluer de multiples pathologies cérébrales, notamment les épilepsies.

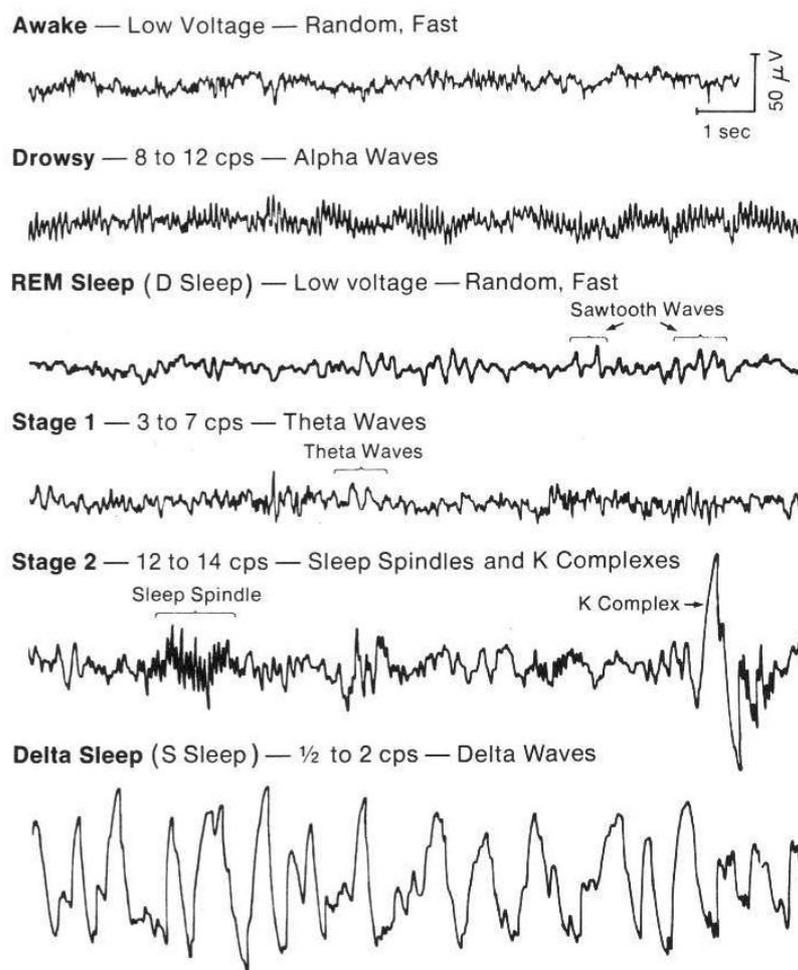
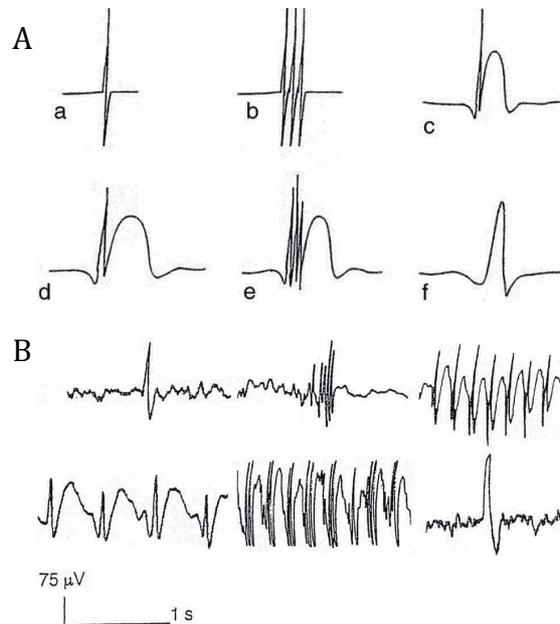


Figure 1. Exemples de traces EEG présentant différents états de vigilance distingués par des activités rythmiques spécifiques. D'après *Shepherd, 1988*.

L'exploration EEG des patients souffrant de troubles épileptiques montre l'apparition d'anomalies électroencéphalographiques sous forme de rythmes néoformés avec des pointes de grande amplitude se détachant nettement du rythme de fond, durant les crises épileptiques. Ces activités paroxystiques se distinguent en plusieurs types d'anomalies EEG élémentaires selon la morphologie des ondes cérébrales (Thomas et Arzimanoglou, 2000 ; Gelisse et al, 2009) (Figure 2) : (1) *la pointe*, onde mono- ou biphasique de très brève durée (10 à 70 ms) et de grande amplitude, (2) *la pointe lente* ou *onde aiguë* (*sharp wave*), onde de durée comprise entre 70 et 200 ms, (3) *la pointe-onde*, correspondant à un complexe constitué par la succession immédiate d'une pointe et d'une onde lente. Lorsque la fréquence du complexe pointe-onde est inférieure à 2,5 Hz, il prend le nom de pointes-onde lente et lorsque la fréquence est supérieure à 3 Hz, habituellement à 4 Hz, le complexe prend le nom de pointes-ondes rapides, (4) *les polypointes*, succession de deux ou plusieurs pointes, et (5) *les polypointes-ondes*, succession de pointes suivie immédiatement d'une onde. Une décharge est la répétition consécutive d'une anomalie élémentaire. Ainsi, une décharge de pointe-onde est caractérisée par la succession de complexes pointes-ondes. Ces activités épileptiformes, associées à des graphoéléments de grandes amplitudes, ont été rapidement interprétées comme la manifestation d'une activité neuronale anormalement synchronisée dans de vastes territoires cérébraux (Penfield et al, 1954) plus ou moins étendus. De grandes fluctuations EEG isolées, appelées activités interictales,

peuvent également être enregistrées en dehors des crises symptomatiques (Niedermeyer, 2005 ; Stériade, 2003).



**Figure 2. Activités paroxystiques élémentaires. (A) Représentation schématisée. a : pointe. b : polypointe. c : pointe-onde à 3 Hz. d : pointe-onde lente à 2 Hz. e : polypointe-onde. f : pointe lente. (B) Exemples d'enregistrements présentant les différentes activités paroxystiques élémentaires. D'après Thomas et Arzimanoglou, 2000.**

La variété des activités épileptiformes est conjointe aux différentes formes d'épilepsies. La maladie de l'épilepsie a la particularité de regrouper plusieurs formes qui diffèrent tant par leurs étiologies que par leurs sémiologies, mais avec comme caractère commun : la survenue de crises épileptiques récurrentes. Celles-ci sont caractérisées par des décharges anormales, excessives et hypersynchrones de populations plus ou moins étendues de neurones du cortex cérébral, capables d'engendrer des interruptions brusques du fonctionnement normal du cerveau. Les crises épileptiques peuvent se refléter par des manifestations cliniques paroxystiques motrices, sensitives, sensorielles ou psychiques, accompagnées ou non d'une perte de connaissance.

L'existence d'une telle diversité a nécessité une classification claire permettant de faciliter le diagnostic en pratique clinique. L'introduction de l'EEG comme outil de diagnostic a permis d'importantes avancées dans la classification des crises épileptiques, en permettant une description conjointe de leurs caractéristiques électrophysiologiques et cliniques.

Aujourd'hui, les terminologies et classifications reposent sur les avancées réalisées dans les domaines des neurosciences fondamentales et cliniques, et sont définies par l'*International League Against Epilepsy* (ILAE) ou *Ligue Internationale contre l'Epilepsie* (LIcE) (Tableau 1 & 2) pour permettre l'amélioration des diagnostics d'épilepsies ainsi que de leurs traitements. Les classifications décrites ci-dessous sont basées sur le rapport révisé de la commission de la classification de ILAE de 2010 (Berg et al, 2010).

## Les classifications des crises épileptiques et des épilepsies

L'épilepsie est définie comme:

« un trouble cérébral caractérisé par une prédisposition durable à générer des crises épileptiques et par les conséquences neurobiologiques, cognitives, psychologiques et sociales de cette affection. La définition de l'épilepsie requiert la survenue d'au moins une crise épileptique » (Fisher et al, 2005).

Une crise d'épilepsie est, quant à elle, définie conceptuellement par :

« la survenue transitoire de signes cliniques et/ou symptômes en réponse à une activité neuronale excessive ou synchrone anormale du cerveau » (Fisher et al, 2005; Engel et Chair, 2006; Berg et al, 2010).

Les différentes formes d'épilepsie peuvent être classées en fonction : (1) des modalités d'initiation des crises d'épilepsies, (2) des causes sous-jacentes (l'étiologie), et (3) des différents syndromes épileptiques et épilepsies établis (Berg et al, 2010 ; Berg et Scheffer, 2011).

### *Les crises épileptiques*

Les crises épileptiques se répartissent en deux grandes classes : les crises généralisées et les crises focales (Berg et al, 2010 ; Berg et Scheffer, 2011).

Les *crises généralisées* sont conceptualisées comme débutant d'un site d'initiation et impliquant rapidement des réseaux distribués de manière bilatérale. Les réseaux bilatéraux peuvent inclure les structures corticales et sous corticales, mais n'incluent pas nécessairement le cortex dans son intégralité. Bien que le point d'origine des crises individuelles puisse sembler localisé, le site d'initiation ainsi que la topographie des régions atteintes ne sont pas toujours identiques d'une crise à l'autre. Les crises généralisées peuvent être asymétriques.

Les *crises focales* débutent au sein de réseaux limités à un hémisphère. Elles peuvent être discrètement localisées ou impliquer un secteur plus large. Les crises focales peuvent débuter dans des structures sous corticales. Pour chaque type de crise, le point de départ est identique d'une crise à l'autre, avec un mode de propagation préférentiel qui peut impliquer l'hémisphère ipsilatéral et/ou controlatéral. Les crises focales peuvent être décrites selon leur sémiologie. Les réseaux neuronaux à l'origine de la crise ou ceux responsables de sa propagation peuvent être reflétés par des signes cliniques, permettant souvent l'identification des régions cérébrales impliquées.

Certaines crises restent inclassables, soit par absence de renseignements cliniques suffisants (certaines crises convulsives nocturnes), soit en raison d'une sémiologie déroutante (certaines crises néonatales) (Tableau 1).

## *L'étiologie des épilepsies*

Les causes sous-jacentes de l'épilepsie reposent sur trois axes : (1) *génétique*, l'épilepsie est la conséquence directe d'une anomalie génétique connue ou présumée dont les crises sont la manifestation principale, (2) une condition ou maladie *structurelle-métabolique*, pour laquelle il a été démontré une augmentation substantielle du risque de développer une épilepsie, incluant les lésions acquises telles que les accidents vasculaires cérébraux, les traumatismes et les infections, et (3) « *cause inconnue* », la cause sous-jacente reste encore non identifiée ([Tableau 1](#)).

## *Les formes d'épilepsies*

Les différentes formes d'épilepsies peuvent être organisées selon quatre groupes ([Tableau 2](#)).

Un premier groupe inclut les épilepsies pouvant être distinguées selon leur type de *syndrome électroclinique*. Un syndrome représente un ensemble de caractéristiques cliniques, de signes et de symptômes qui définissent ensemble une entité clinique distincte et reconnaissable. Il s'agit d'entités distinctes, identifiables sur les bases d'un âge typique de début des crises, de caractéristiques EEG spécifiques, de types de crises, et souvent d'autres caractéristiques qui, considérées dans leur ensemble, permettent un diagnostic spécifique (par exemple : l'épilepsie absence de l'enfant, CAE). Les syndromes électrocliniques actuellement reconnus sont présentés dans le [Tableau 2](#) selon l'âge typique de début, mais il ne s'agit là que d'un exemple d'organisation. Selon cette organisation, les syndromes électrocliniques sont souvent en relation avec des causes génétiques où l'âge d'apparition ou de disparition des symptômes est lié au développement.

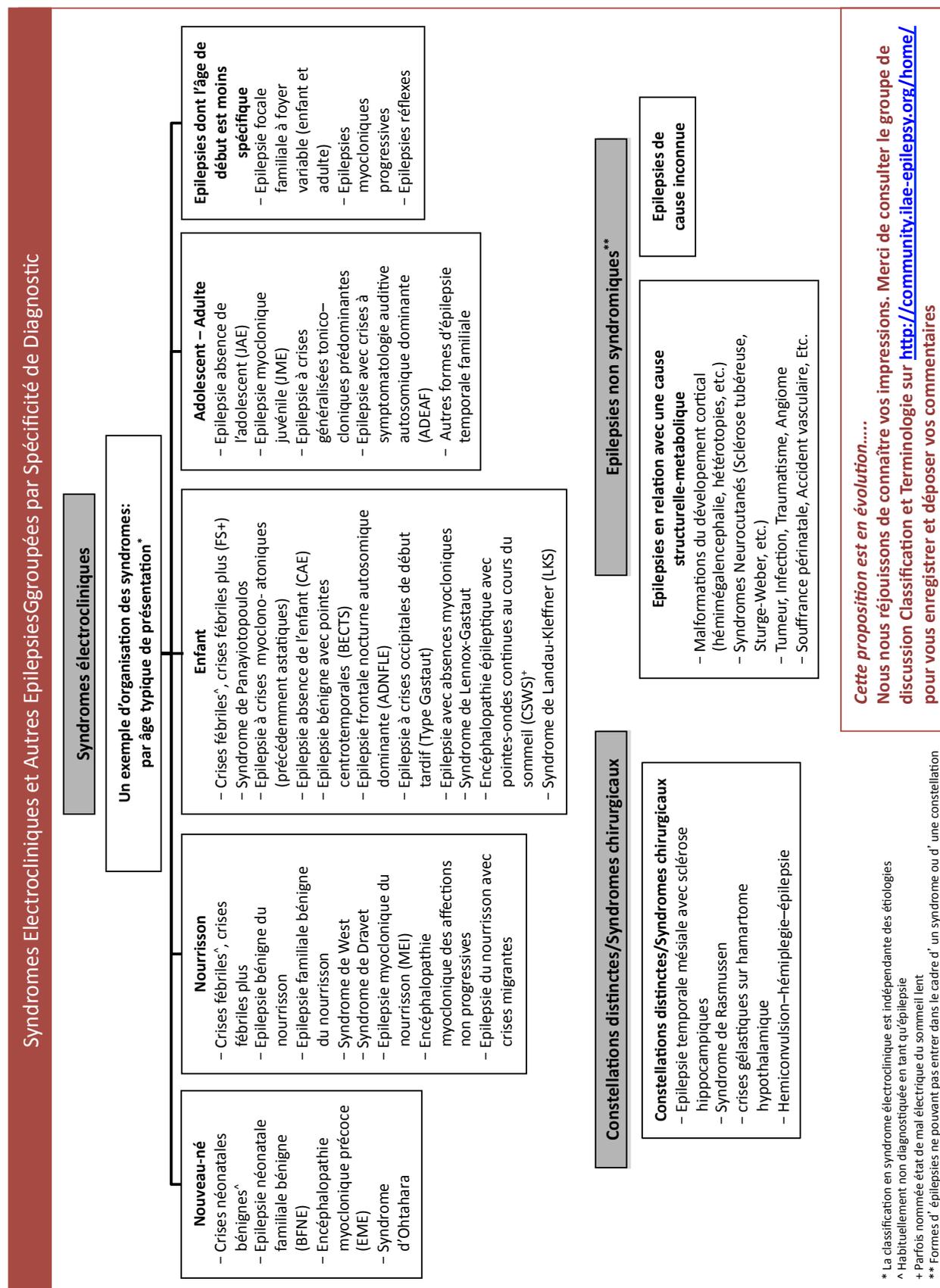
De nombreuses entités qui ne correspondent pas à ce genre de syndromes électrocliniques sont classées dans une autre catégorie, appelé constellations. Les *constellations* représentent des formes d'épilepsies pour lesquelles un diagnostic précis peut avoir des implications thérapeutiques sur le plan médical et/ou chirurgical. L'âge de début des crises n'est pas un élément central mais ces formes d'épilepsies sont suffisamment reconnaissables pour constituer des entités diagnostiques relativement spécifiques (par exemple : l'épilepsie du lobe temporel mésiale avec sclérose hippocampique, MTLE with HS).

Les épilepsies *structurelles-métaboliques* regroupent les épilepsies secondaires qui font suite à une lésion ou condition spécifique, structurelle ou métabolique (par exemples : tumeur, infection, traumatisme, malformation), mais ne correspondent pas, au vu des connaissances actuelles, à une présentation électroclinique spécifique.

Le quatrième groupe comprend les formes d'épilepsies de *cause inconnue*.



Tableau 2. Syndromes électrocliniques et autres épilepsies groupées par spécificité de diagnostic. Exemple d'organisation des syndromes par âge typique de présentation. D'après la Proposition de l'ILAE pour une révision de la Terminologie et de l'Organisation des Crises et des Epilepsies (2010).



Ce travail de classification améliore considérablement les diagnostics et prises en charge des patients en les dirigeant vers des traitements adéquats. Néanmoins, malgré des éléments d'indices fournis par les investigations cliniques et les EEG, ils ne renseignent pas sur les mécanismes responsables de la survenue des crises d'épilepsie (*ictogénèse*) ou sur le processus du passage d'un « cerveau sain » à un « cerveau épileptique » (*épileptogénèse*). La détermination des processus physiopathologiques responsables des épilepsies nécessite la caractérisation fine des activités cellulaires et subcellulaires associées aux décharges épileptiques. Même si l'idéal serait d'étudier directement ces mécanismes chez l'homme, de telles investigations restent à ce jour difficilement réalisables chez les patients à cause des contraintes éthiques associées aux techniques invasives. Seul le cas d'enregistrements électrophysiologiques *in vitro* après exérèse des foyers épileptiques chez les malades atteints d'épilepsie focale (exemple Cohen et al, 2002) est envisageable. De ce fait, les études des mécanismes physiopathologiques des épilepsies reposent principalement sur l'utilisation des modèles animaux validés *in vivo* et *in vitro*, qui constituent une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes cellulaires aussi bien physiologiques que pathologiques.

### **Tissu épileptique : dynamiques aberrantes des réseaux neuronaux**

Pour comprendre les rythmes physiologiques, de nombreuses études fondamentales ont été réalisées sur la formation hippocampique. Faisant partie du système limbique, elle présente une architecture simple. L'hippocampe est une aire corticale impliquée dans les processus mnésiques. La formation hippocampique comprend l'hippocampe, composé des régions de la corne d'Ammon (CA1, CA2 et CA3) et du gyrus denté, le complexe subiculaire et le cortex entorhinal (Figure 3). L'hippocampe est principalement composé de deux types de neurones, les cellules principales excitatrices et les interneurons. Alors que les cellules principales libèrent du glutamate comme neurotransmetteur et projettent vers différentes aires cérébrales, les interneurons sont des neurones synthétisant de l'acide gamma-amino butyrique (GABA), un neurotransmetteur inhibiteur chez l'adulte, et dont les projections restent locales. Contrairement aux neurones principaux excitateurs, exclusivement localisés en une seule couche au niveau des régions CA1, CA2 et CA3 (cellules pyramidales) et du gyrus denté (cellules en grain), les interneurons sont distribués dans toutes les couches de CA1 à CA3 et du gyrus denté (DG).

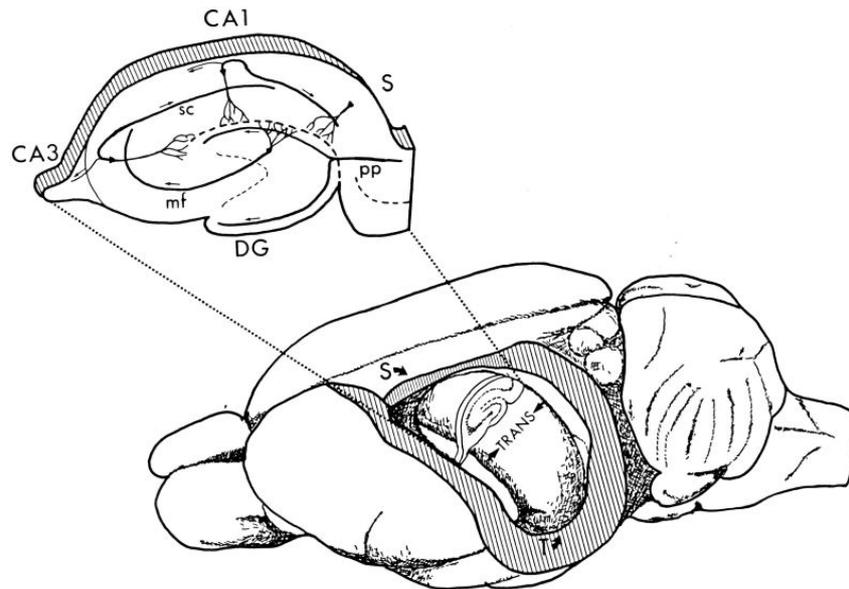


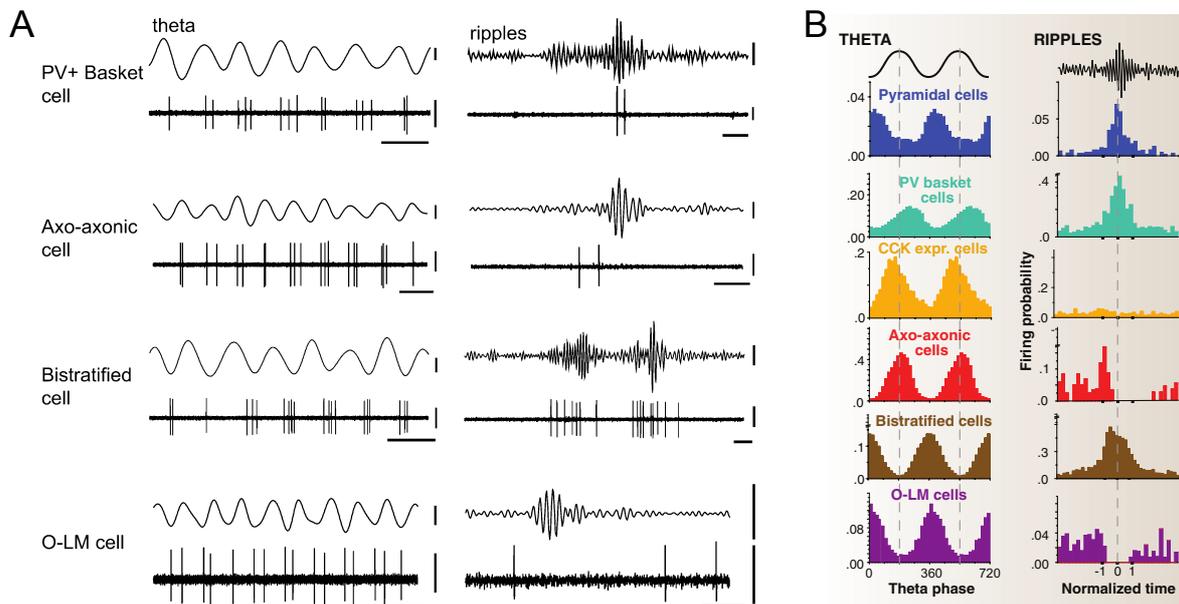
Figure 3. Schéma d'un cerveau de rat montrant la position de l'hippocampe. Une coupe transversale (TRANS) de l'hippocampe montre les régions du gyrus denté (DG), de la corne d'Ammon (CA3, CA1) et du subiculum (S) ainsi que le circuit neuronal tri-synaptique qui le compose (pp : fibre perforante, mf : fibres moussues, sc : collatéraux de Schaffer). D'après Amaral et Witter, 1989.

### *Rythmes physiologiques : contribution des cellules GABAergiques*

De multiples patrons d'activités de réseaux peuvent être enregistrés dans l'hippocampe, apparaissant de manière spontanée ou par induction pharmacologique, qui incluent des oscillations *thêta* (4 - 8 Hz), observées durant l'exploration et le sommeil REM (*rapid-eye-movement*) (O'Keef et Nadel, 1978 ; Ylinen et al, 1995 ; Csicsvari et al, 1999 ; Buzsáki, 2002), des *ripples associés aux sharp-waves* (120 - 200 Hz) qui surviennent durant le sommeil lent, l'éveil immobile et les comportements de consommation (Ylinen et al, 1995 ; Csicsvari et al, 1999) ou des oscillations *gamma* (30 - 80 Hz), corrélées aux fonctions cognitives comme la mémoire de travail, la catégorisation conceptuelle ou l'attention (Engel et al, 2001). Ces oscillations peuvent être enregistrées dans l'hippocampe grâce à des électrodes intracrâniennes *in vivo* ou extracellulaires *in vitro* sur des tranches d'hippocampe cérébral contenant des connexions synaptiques intactes.

Les mécanismes à l'origine des rythmes ont depuis longtemps fait objet de nombreuses études. Aujourd'hui, nous savons que ces rythmes physiologiques reposent sur une dynamique de coopération et de coordination temporelle des décharges d'interneurones sur les cellules pyramidales pour former des circuits complexes (Traub et Bibbig, 2000 ; Buzsáki, 2001 ; Klausberger et al, 2003 ; Klausberger et al, 2005 ; Somogyi et Klausberger, 2005 ; Tukker et al, 2007 ; Klausberger et Somogyi, 2008) (Figure 4). Bien que peu de différences aient été notées entre les cellules pyramidales, la diversité des rythmes qu'elles expriment est supportée par la riche diversité des interneurones GABAergiques (Kawaguchi et Kubota, 1997 ; Gupta et al, 2000 ; Somogyi et Klausberger, 2005 ; Petilla Interneuron Nomenclature Group *et al*, 2008 ; Kullmann, 2011). Ces interneurones contrôlent le niveau d'activité moyen et peuvent aussi réguler temporellement l'activité des cellules pyramidales (Cohen et Miles, 2000) de façon différente selon les domaines subcellulaires qu'ils innervent, selon leurs patrons de

décharge et selon leurs profils d'expression moléculaire (Buzsáki, 2001 ; Klausberger et Somogyi, 2008 ; Battaglia et al, 2013 ; DeFelipe et al, 2013).



**Figure 4. Patrons de décharges de plusieurs types d'interneurons GABAergiques durant différentes oscillations du réseau hippocampique *in vivo*.** (A) Exemple de décharges de potentiels d'action (filtrés à 0.8-5kHz) d'interneurons enregistrés durant les oscillations thêta (3-6 Hz) et les épisodes de ripples (filtré à 90-140 Hz). Echelles : spikes, 0.5 mV ; thêta, 0.2 mV, 0.3 s ; ripples, 0.1 mV, 50 ms. D'après Somogyi et Klausberger, 2005. (B) Histogrammes des probabilités de décharges des cellules pyramidales et interneurons durant les oscillations thêta, et ripples. D'après Klausberger et Somogyi, 2008.

On comprend alors que les interneurons GABAergiques ont, en plus du rôle d'inhibiteur de l'excitabilité neuronale, un rôle de modulateur de rythmes, et l'hypothèse d'un dysfonctionnement GABAergique provoquant un déséquilibre entre excitation et inhibition durant les crises épileptiques, devient alors pertinente. Toutefois, l'hypothèse d'une simple "augmentation de l'excitation" ou "diminution de l'inhibition GABAergique" créant un réseau hyperactif n'est pas entièrement adéquate. Devant un système diversifié de la neurotransmission, l'explication d'un défaut GABAergique dans l'épilepsie par la seule diminution de son influence est insuffisant (Cossart et al, 2005a). En effet, une réorganisation du réseau vers un état hyperexcitable par des modifications synergiques entre le système GABAergique et glutamatergique a été démontrée principalement sur des tranches de tissu cérébral épileptique humain et de modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal.

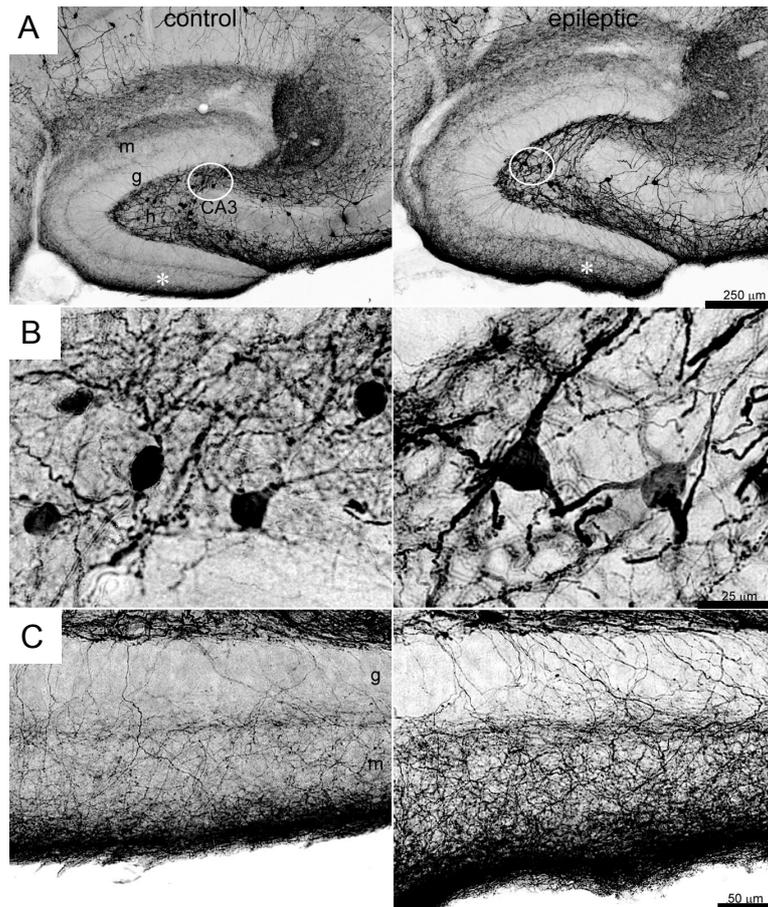
### *Une réorganisation du réseau : cas de l'épilepsie du lobe temporal (ELT)*

L'ELT est une épilepsie de crise focale qui a la particularité d'avoir son foyer épileptique dans l'hippocampe, avec ou sans sclérose hippocampique. L'ELT est très étudiée pour comprendre l'épilepsie pour 4 raisons principales : (1) elle est la forme la plus fréquente et la plus sévère d'épilepsie chez l'adulte, et les patients sont souvent réfractaires aux traitements, (2) la résection du tissu épileptique à laquelle on a alors recours, permet l'accès à l'étude des mécanismes cellulaires directement sur le tissu épileptique humain, (3) le foyer épileptique se situe dans l'hippocampe, une

structure déjà bien étudiée, et (4) les modèles animaux d'ELT sont nombreux et relativement simples à obtenir. Différentes méthodes de lésion hippocampique peuvent transformer un tissu sain en un tissu épileptique, par exemple par injection intra-hippocampique de kaïnate (Maglóczy et Freund, 1993 ; Boullier et al, 1999 ; Le Duigou et al, 2005 ; Le Duigou et al, 2008). On peut noter également la présence d'activités interictales, décharges paroxystiques isolées, observées en dehors des crises épileptiques dans des zones aux alentours du foyer. Ces décharges interictales sont les marqueurs apparents d'un réarrangement des réseaux neuronaux dans l'ELT et inversement leur présence a certainement un impact sur les réseaux fonctionnels. Comprendre de quelle manière surviennent ces décharges interictales et leur rôle dans les crises d'épilepsie est une première ébauche dans la compréhension de l'épileptogenèse et de l'ictogenèse.

Les études sur les tranches de tissu cérébral épileptique humain et de modèles d'animaux d'ELT ont permis de mettre en évidence un remodelage des réseaux neuronaux, incluant des modifications au sein des neurones excitateurs et inhibiteurs.

On peut tout d'abord évoquer les modifications morphologiques. Dans l'hippocampe, des pertes de cellules pyramidales sont retrouvées dans les régions CA1 et CA3, alors que le gyrus denté présente un bourgeonnement des fibres moussues (axones de cellules en grain) et de la neurogenèse (Tauck & Nadler, 1985 ; Cronin & Dudek, 1988 ; Goodman & Sloviter, 1992 ; Isokawa et al, 1993 ; Wenzel et al, 2000). Des interneurons GABAergiques peuvent également subir des pertes neuronales mais de manière spécifique, en particulier des neurones de type somatostatine (Sloviter, 1991 ; Buckmaster & Dudek, 1997 ; Buckmaster & Jongen-Rêlo, 1999 ; Cossart et al, 2001 ; Halabisky et al, 2010 ; Marx et al, 2013), et présenter des réorganisations synaptiques, notamment d'excroissances axonales (Buckmaster & Jongen-Rêlo, 1999 ; Wittner et al, 2001 ; Dinocourt et al, 2003 ; Bausch, 2005 ; Zhang et al, 2009 ; Maglóczy, 2010 ; Halabisky et al, 2010 ; Zhang et al, 2012) (Figure 5). Ces changements participent probablement à une forme de compensation des pertes neuronales permettant un rééquilibrage entre excitation et inhibition, mais sans vraiment réussir à l'atteindre, et aboutissent à des modifications de propriétés des décharges des neurones (Zhang et Buckmaster, 2009 ; Karunakaran et al, 2012), notamment à travers des altérations d'ordre moléculaire (McNamara, 1994 ; Cossart et al, 2005a ; Wu et Song, 2014).



**Figure 5.** Comparaison des interneurons marqués à la GFP sur des tranches de souris contrôle (à gauche) et épileptique (à droite). (A) Photos montrant des interneurons marqués à la GFP au niveau du gyrus denté. (B) Agrandissement de la région encerclé en (A) montrant les corps cellulaires des interneurons. (C) Agrandissement de la région marqué par un astérisque en (A) montrant les axones des interneurons. D'après *Zhang et al, 2009*.

Un autre aspect des modifications neuronales peut être adjoint au déséquilibre entre excitation et inhibition. De façon surprenante, des travaux réalisés sur du tissu humain ont révélé une modification de la neurotransmission GABAergique classique inhibitrice en neurotransmission GABAergique excitatrice sur certains neurones pyramidaux pendant les décharges interictales (Cohen et al, 2002 ; [Figure 6](#)). Le GABA dépolarisant est un mécanisme rencontré durant le processus de maturation neuronale chez les rats néonataux (Ben-Ari et al, 1989 ; Fukuda et al, 1998 ; Ben-Ari, 2002 ; Khazipov et al, 2014) et sur des neurones nouvellement formés dans le cerveau adulte (Ge et al, 2005). La présence de décharges interictales pourrait alors signifier une dé-différenciation vers un état immature et/ou être le fruit d'un renouvellement tissulaire pour contrer la nécrose neuronale. Dans tous les cas, ces décharges seraient la conséquence d'un réseau de neurones hyperexcités par le GABA et pourraient participer d'une certaine manière à l'ictogénèse, notamment au vu de leur apparition précoce par rapport à la survenue de crises récurrentes (Staley et al, 2011).

Les études sur l'ELT montrent ainsi des modifications au sein du réseau neuronal à plusieurs niveaux qui pourraient mener à une formation de nouveaux circuits excitateurs contribuant à l'altération du rythme physiologique. Néanmoins, la compréhension exacte des mécanismes liant les acteurs du réseau, ainsi que les différentes étapes de la mise en place de cette réorganisation, restent à élucider.

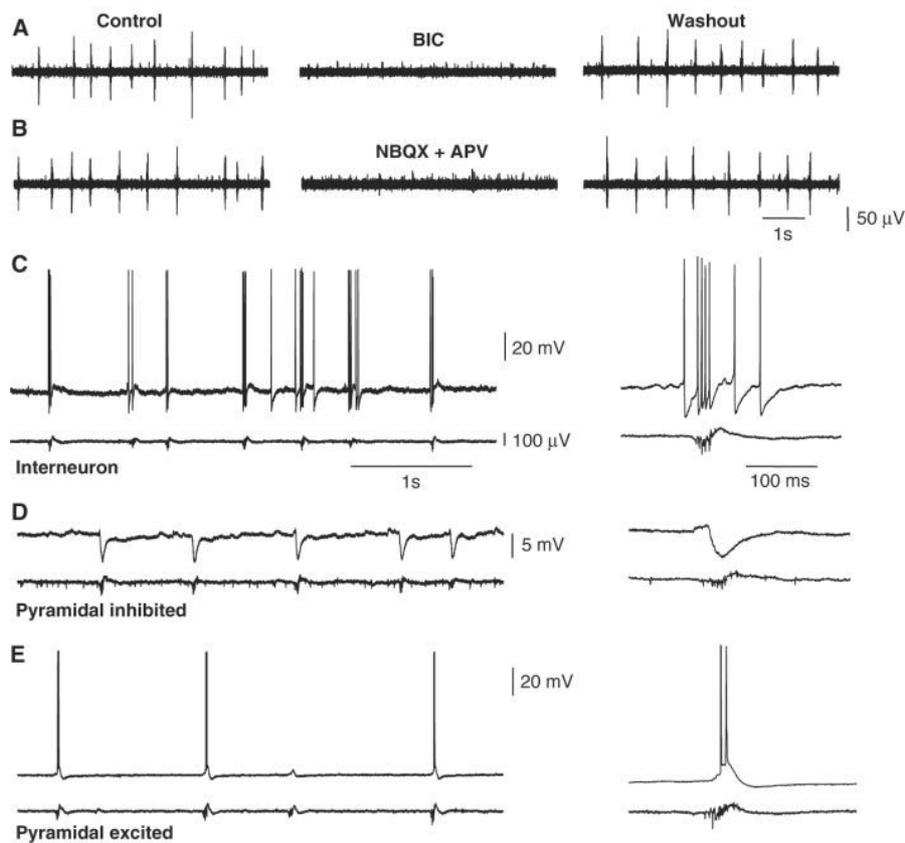


Figure 6. Les cellules pyramidales excitatrices et les interneurons inhibiteurs contribuent aux décharges interictales spontanées, observées dans le subiculum du tissu humain. Ces décharges interictales sont bloquées par des antagonistes aux récepteurs du glutamate (NBQX et APV) (A) et par l'antagoniste du récepteur GABA<sub>A</sub> (Bicuculline, BIC) (B). (C - E) Différentes réponses des neurones enregistrés en intracellulaire (tracé du haut) associées aux décharges interictales enregistrées en extracellulaire (tracé du bas). D'après *Cohen et al, 2002*.

La vue d'ensemble de ces travaux montre que l'épilepsie se manifeste parallèlement à l'existence d'altérations fonctionnelles profondes du réseau neuronal qui doit toucher, d'une manière ou d'une autre, les mécanismes cellulaires et moléculaires du système GABAergique et/ou glutamatergique. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des crises épileptiques requiert, par conséquent, la localisation exacte de l'origine du dysfonctionnement. Or, toutes les épilepsies ne présentent pas de foyer évident. C'est d'ailleurs le cas des crises d'épilepsie généralisées, comme les épilepsies absences, qui concernent de larges territoires cérébraux et ne présentent aucune modification apparente anatomique et structurelle. Les stratégies d'études et les moyens déployés ont donc été différents pour comprendre les mécanismes neuronaux se cachant derrière les crises d'absences. A la différence de l'ELT où la principale question est de savoir "comment" sont générées les crises, les investigations pour des épilepsies absences doivent répondre simultanément aux questions "où" et "comment".

### 1.1.2.L'épilepsie Absence typique : crises généralisées

Les *absences typiques*, précédemment connues sous le terme de « *Petit Mal* », sont des crises généralisées non convulsives, rencontrées dans sept syndromes d'épilepsies généralisées non lésionnelles (précédemment connues sous le nom d'épilepsies généralisées idiopathiques) : l'épilepsie absence de l'enfant, l'épilepsie absence de l'adolescent, l'épilepsie myoclonique juvénile, l'épilepsie avec absences myocloniques, l'épilepsie à crises myoclonono-toniques, l'épilepsie à crises généralisées tonico-cloniques et le syndrome de Dravet (ILAE.org). Les crises d'absences sont caractérisées par un changement comportemental brusque correspondant à une cessation d'activité, due à une perte de conscience, qui peut être accompagnée d'automatismes périodiques, comme des mouvements des yeux, de la paupière ou des membres. Malgré l'existence de points communs, chacun des syndromes présente ses propres caractéristiques (ILAE.org) ; ainsi je ne m'intéresserai ici qu'à l'épilepsie absence de l'enfant, dont les crises sont exclusivement des absences typiques.

Dans le cas de l'épilepsie absence de l'enfant, les crises d'absences interviennent typiquement plusieurs fois par jours. Au cours des crises, le patient s'immobilise, les yeux dans le vague, interrompant son activité comportementale pendant une période comprise entre 5 et 45 secondes. La crise terminée, le sujet reprend son activité, ne gardant aucun souvenir de l'épisode critique. Certains facteurs favorisent la survenue de ce type de crise, tels que la baisse de vigilance, les émotions ou une alcalose respiratoire provoquée par hyperventilation (Hughes, 2009). Les crises surviennent généralement durant l'éveil calme, l'inattention et pendant la transition éveil-sommeil (sommolence) (Danober et al, 1998 ; Depaulis et al, 2016). Sur des enregistrements EEG effectués chez des patients présentant des absences, les crises sont synchronisées et bilatérales. Elles sont caractérisées par l'apparition et l'arrêt brusque de décharges de type pointe-onde (DPO ou *Spike and Wave Discharges*, SWD) avec une fréquence régulière de 3 Hz (Figure 7). En revanche, d'un point de vue structurel, aucune anomalie du cerveau n'a été identifiée, tout comme aucun trouble neurologique ou neuropsychologique n'a été observé chez ces patients. La cause de ces crises d'absence paraît tendre plutôt vers un défaut génétique (Danober et al, 1998 ; Jones et al, 2011). Des équipes qui se sont penchées sur la question n'ont toutefois pas réussi à mettre en évidence de défauts génétiques exclusivement liés à l'épilepsie absence de l'enfant (Crunelli et Leresche, 2002 ; Hughes, 2009). Plusieurs gènes mutés sont cependant susceptibles d'être en lien avec cette épilepsie : le gène de la sous-unité  $\gamma 2$  des récepteurs GABA<sub>A</sub> (*GABRG2*), le gène de la sous-unité  $\alpha 1$  des récepteurs GABA<sub>A</sub> (*GABRA1*), le gène 2 du canal chlore (*CLCN2*), le gène du canal calcium voltage-dépendant de type T de la sous-unité  $\alpha 1H$  (*CACNA1H*) et le gène *KCNK9* codant pour le canal TASK3 (*Twik-like-acid-sensitive K+*) sensible au pH extracellulaire. Toutefois, ces mutations ne semblent pas être suffisant pour générer le phénotype des crises d'absences (Crunelli et Leresche, 2002 ; Holter et al, 2005 ; Powell et al, 2009 ; Hughes, 2009 ; Lu et Wang, 2013).

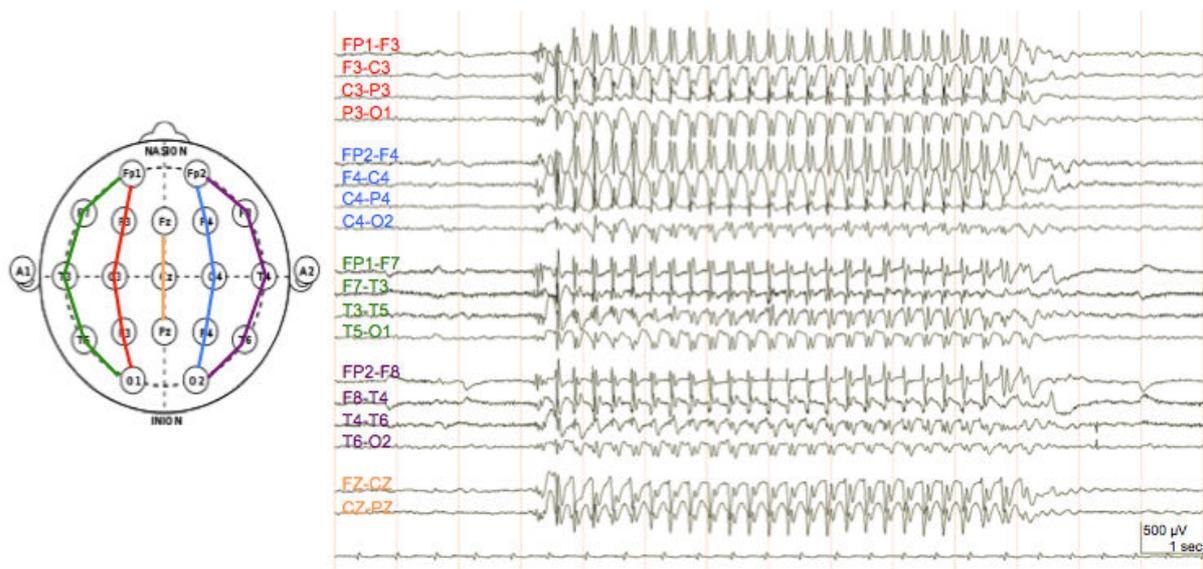
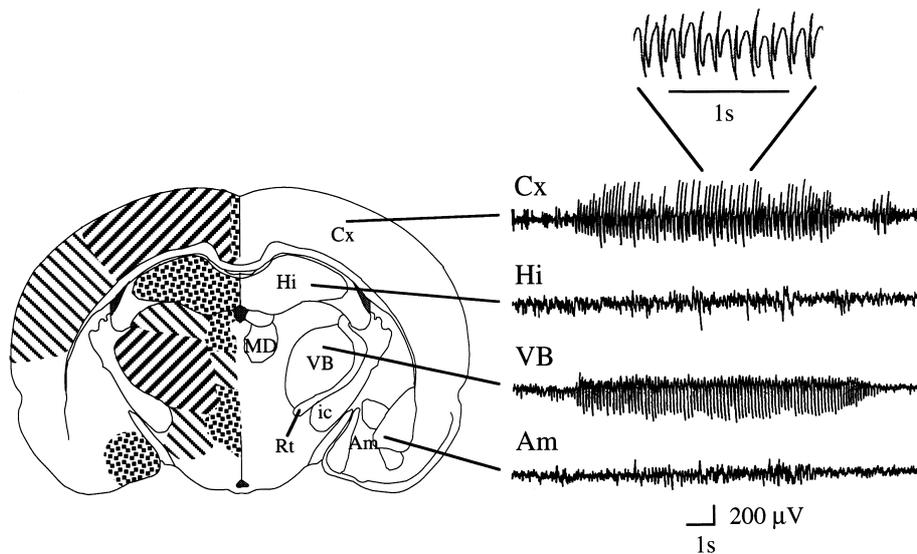


Figure 7. Exemple d'enregistrement EEG d'une crise absence typique chez l'enfant montrant des décharges de pointe-ondes à une fréquence de 3 Hz sur l'ensemble des régions corticales. Adapté de <https://www.epilepsydiagnosis.org/syndrome/cae-eeeg.html>.

Parce qu'il n'existe pas de causes anatomiques et structurelles évidentes, et que la synchronisation des décharges de pointe-ondes est bilatérale et rapide, les mécanismes générateurs et la région d'origine ont été grandement débattus. Néanmoins, comme je le traiterai dans le paragraphe suivant, le consensus général voudrait que le siège de ces décharges paroxystiques soit situé au niveau du circuit thalamocortical, circuit indispensable à la genèse des décharges de pointe-ondes.

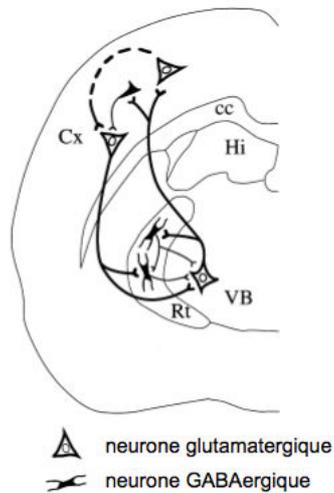
## Le siège des décharges de pointe-ondes

L'implication du thalamus a été démontrée pour la première fois en 1953, chez une patiente de 5 ans, où des décharges de pointe-ondes ont pu être enregistrées simultanément dans les EEG corticaux et thalamiques lors de la crise d'absence (Williams, 1953). L'existence d'un désordre fonctionnel entre le cortex cérébral et le thalamus, lors des décharges de pointe-ondes a été confirmée par des études sur divers modèles animaux, notamment sur des modèles génétiques des épilepsies absences validés chez le rat : WAG/Rij (*Wistar Albino Glaxo rat from Rijswijk*) (Coenen & van Luijtelaar, 2003) et GAERS (*Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg*) (Marescaux et al, 1992 ; Danober et al, 1998), présentés plus en détail dans la section Matériels et Méthodes 2.1. En revanche, ni l'hippocampe, ni les structures limbiques (septum, amygdale, cortex cingulaire et piriforme) ne présentent de décharges de pointes-ondes pendant les crises d'absence (Danober et al, 1998) (Figure 8).



**Figure 8.** Localisation des décharges de pointes-ondes enregistrées avec des électrodes profondes bipolaires chez le rat GAERS. *Hémisphère gauche* : cartographie schématique des décharges pointes-ondes sur une section coronale du cerveau de rat. Zones hachurées gauche : grande amplitude des pointes-ondes ; Zones hachurées droite : petites amplitudes des pointes-ondes ; Pointillés : absence de pointe-ondes ; Zones blanches : absence de données enregistrées. *Hémisphère droit* : enregistrements EEG simultanées du cortex, de l'hippocampe dorsal, du thalamus ventrobasal et de l'amygdale. Am : amygdale ; Cx : cortex ; Hi : hippocampe ; ic : capsule interne ; MD : noyau thalamique médiodorsal ; Rt : noyau thalamique réticulé ; VB : noyau thalamique ventral postérieur (ventro-basal). D'après Danober et al, 1998.

Le thalamus est un important centre de relais de l'information sensorielle. Toutes les voies sensorielles passe par cette structure avant de se projeter sur le cortex, notamment le noyau ventral postérieur thalamique qui projette vers le cortex somatosensoriel et moteur. La boucle thalamocorticale, formée par les connexions entre le cortex, les noyaux de relai thalamique et le noyau réticulaire, joue un rôle essentiel dans la survenue des crises d'absences, notamment dans le développement des décharges de pointe-ondes (Avanzini et al, 1992 ; Vergnes et Marescaux, 1992 ; Snead, 1995 ; Steriade and Contreras, 1995, 1998 ; McCormick and Contreras, 2001 ; Danober et al, 1998). Les neurones corticothalamiques, localisés dans les couches profondes du cortex (couches V et VI), sont de type glutamatergique et excitent les neurones thalamocorticaux, localisés dans les noyaux de relai thalamiques. Ceux-ci, également glutamatergiques, excitent en retour les neurones corticaux. En parallèle, les terminaisons axonales des neurones corticothalamiques de la couche VI, ainsi que celles des neurones thalamocorticaux contactent également les neurones GABAergiques du noyau réticulaire du thalamus (nRT), lesquels inhibent en retour les neurones thalamocorticaux (Jones, 2002) (Figure 9). Cette boucle thalamocorticale, ainsi constituée, confère une interdépendance des activités thalamiques et corticales. Cette interdépendance est cruciale pour les crises d'absence puisque ni le cortex, ni le thalamus (spécifiquement les noyaux de relai et réticulaire) seuls ne peuvent soutenir les décharges de pointe-ondes (Vergnes et Marescaux, 1992 ; Danober et al, 1998), rendant par la même occasion complexe la mise en évidence d'un site d'initiation des crises d'absence.



**Figure 9.** Représentation schématique du circuit thalamocortical chez le rat. Les neurones corticaux (Cx) glutamatergiques projettent vers le noyau ventral postérieur du thalamus (VB) où sont situés les neurones de relai thalamiques excitateurs qui en retour projettent vers le cortex. En parallèle, les neurones corticothalamiques et thalamocorticaux contactent les neurones du noyau réticulaire du thalamus (Rt), lesquels inhibent les neurones thalamocorticaux. D'après *Danober et al, 1998*.

Où et comment sont générées ces crises ? Il est difficilement concevable que l'initiation d'une crise d'épilepsie généralisée résulte d'une synchronisation, spontanée et immédiate, de la quasi-totalité des neurones de l'ensemble du cortex et du thalamus. Il a donc été supposé l'existence de territoires épileptogènes restreints à l'origine des crises généralisées. Plusieurs hypothèses d'initiations des crises d'absences ont été émises, avec comme acteurs principaux : le thalamus et le cortex (voir review Meeren et al, 2005 ; Polack et Charpier, 2010 ; Avoli, 2012).

### **L'origine des crises d'absence : thalamus ou cortex ?**

De nombreuses recherches cliniques et expérimentales ont été réalisées dans le but de comprendre les mécanismes fondamentaux se cachant derrière les crises d'absences, dont l'historique est bien synthétisé par Meeren et al (2005) et Avoli (2012). Je ne passerai pas en revue toutes les découvertes qui ont mené aux diverses théories sur la genèse des crises d'absences jusqu'à aujourd'hui, mais j'évoquerai brièvement les points clés qui ont soutenu le débat d'un rôle majeur du thalamus et du cortex.

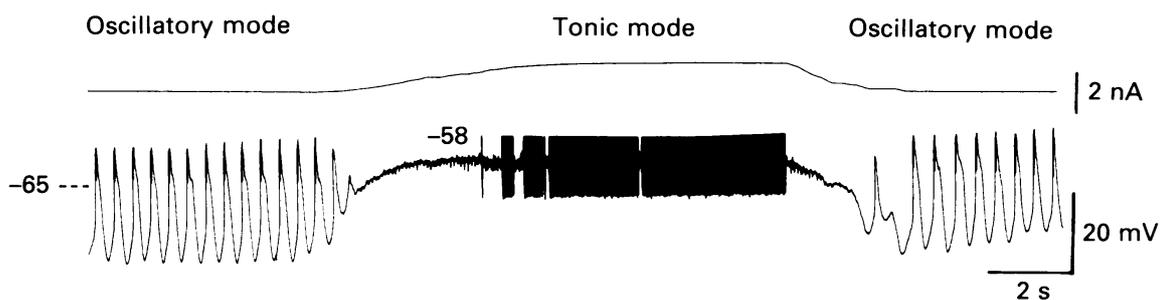
#### *Thalamus : un générateur d'oscillation rythmique*

Il a été initialement proposé que les crises d'absence aient une origine sous-corticale car aucun élément ne permettait de révéler une origine corticale (Jasper et Kershman, 1941). L'hypothèse a été confortée par la découverte des noyaux thalamiques intralaminaires présentant une projection diffuse non-spécifique dans le cortex (Morison et Dempsey, 1941). Les stimuli électriques à une fréquence de 3Hz dans les noyaux thalamiques de la ligne médiane et intralaminaire ont montré un arrêt

comportemental associé à une survenue de pointes-ondes bilatérales et synchrones à une fréquence de 3 Hz chez le chat et le singe (Jasper et Droogleever Fortuyn, 1947). Toutefois, les décharges n'apparaissent que lorsque l'anesthésie est progressivement allégée, et particulièrement lorsque l'animal est sensible aux stimuli sensoriels (Pollen et al, 1963 ; Avoli, 2012), suggérant une implication de l'état de vigilance dans la genèse des pointes-ondes.

Par la suite, des expériences sur le modèle de chat épileptique par injection de pénicilline (Prince et Farrell, 1969) ont montré que les décharges de pointes-ondes se développent graduellement à partir des fuseaux de sommeil (*spindles*), suggérant que les décharges et les spindles se partagent le même circuit thalamocortical (Gloor et al, 1990 ; Avoli, 2012). Cette hypothèse est soutenue par d'autres travaux sur le même modèle : (1) des micro-injections locales et transitoires de KCl dans le thalamus suppriment à la fois les décharges de pointes-ondes et les spindles, et (2) la réduction de l'excitabilité corticale par des *spreading depression* transforment les décharges pointes-onde en spindles dans le cerveau intact du chat (Avoli, 2012).

A partir de ces observations, la boucle thalamocorticale est devenue la cible des investigations. Par ailleurs, des études électrophysiologiques fondamentales *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les neurones du noyau de relais thalamiques possèdent deux modes de genèse de potentiels d'action qui varient selon l'état de l'animal : (1) les décharges de potentiels d'action uniques durant l'attention et l'éveil, et (2) les décharges en bouffées rythmiques durant les périodes d'inattention et de sommeil (Steriade et Deschênes, 1984 ; Steriades et Llinás, 1988 ; Llinás et Steriade, 2006). Ces deux modes sont possibles grâce à des propriétés électriques intrinsèques des neurones de relais thalamiques (McCormick et Pape, 1990a et 1990b ; [figure 10](#)), leur permettant de générer des dynamiques fonctionnelles spécifiques et de réguler les différents états de vigilance. Dès lors, les neurones thalamiques ne sont plus considérés comme de simples relais mais des arbitres fondamentaux des états globaux du cerveau (Llinás et Steriade, 2006).



**Figure 10. Mode oscillatoire et mode tonique générés par des neurones de relais thalamique. La dépolarisation de la cellule à -58 mV stoppe l'activité rythmique et modifie le patron de décharge du neurone en mode tonique ou single-spikes de manière réversible. D'après McCormick et Pape, 1990.**

Des études sur des modèles de rat, présentant des décharges de pointes-ondes spontanées, viennent appuyer le rôle du thalamus dans la génération des crises d'absence. Chez le rat Fischer 344 présentant des décharges de pointes-ondes spontanées, appelées *spindles de haut-voltage* par les auteurs, l'ablation corticale n'abolit pas les spindles de haut-voltage contrairement aux lésions

thalamiques, plus particulièrement au niveau du noyau thalamique réticulé (Buzsáki et al, 1988 ; Meeren et al, 2005). De plus, quelques cycles précoces de spindles de haut-voltage, enregistrés à partir de potentiels de champs locaux (*local field potential*, LFP), apparaissent dans le thalamus avant le cortex, et les populations rythmiques de neurones déchargeant dans le thalamus se construisent graduellement avant que les décharges deviennent visibles à l'EEG (Buzsáki, 1991) (figure 11). Ces résultats suggèrent que les décharges épileptiques sur l'EEG proviendraient d'une oscillation rythmique anormale du réseau thalamique, qui imposerait son rythme au cortex. Cette hypothèse est supportée par des études sur les modèles WAG/Rij et GAERS. Chez les GAERS, le noyau thalamique réticulé joue un rôle de pacemaker dans le réseau intrathalamique et la lésion du noyau supprime les décharges de pointe-ondes (Avanzini et al, 1992). Chez les deux modèles, il a été montré que les décharges neuronales des noyaux du relais thalamocortical précèdent les décharges des neurones néocorticaux de quelques millisecondes pendant la composante pointes des décharges de pointes-ondes observées sur l'EEG (Inoue et al, 1993 ; Seidenbecher et al, 1998). Cela suggère que les cellules de relais thalamocortical mènent les neurones corticaux, soutenant l'hypothèse du thalamus agissant comme un générateur des décharges corticales.

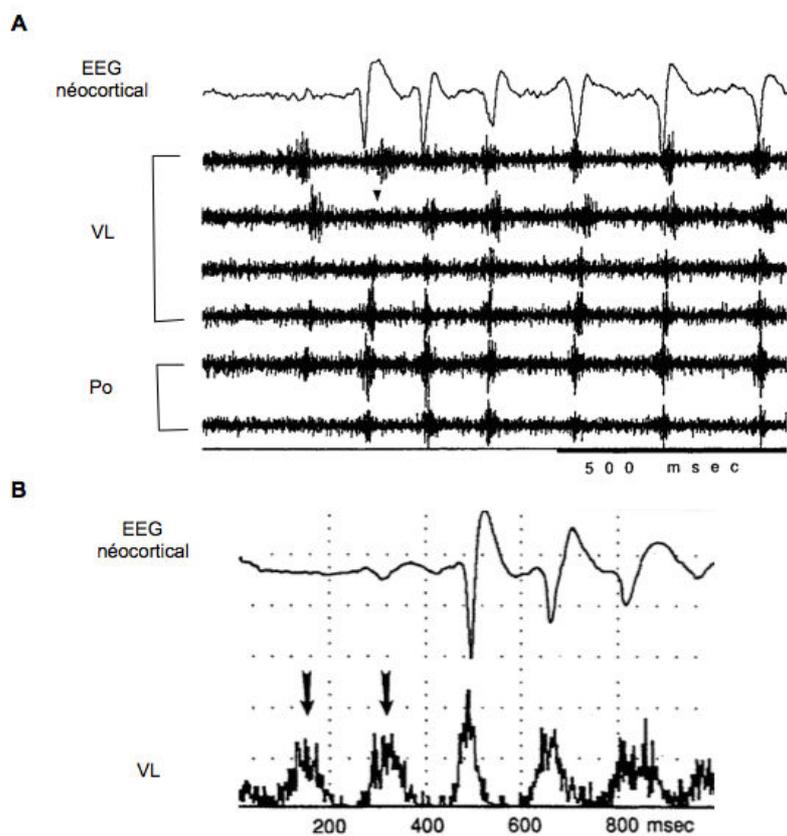


Figure 11. L'apparition rythmique de décharges de population de neurones thalamiques précède la survenue de spindles de haut-voltage (SHV) enregistrés en EEG cortical. (A) Exemple de tracés obtenus au début d'un épisode de SHV. Echelle verticale : 1 mV (EEG) et 400  $\mu$ V (l'activité unitaire). (B) Moyenne des décharges unitaires déclenchées par le pic de la composante pointe du SHV sur plusieurs débuts d'épisode de SHV. Po : noyau postérieur du thalamus, VL : noyau ventrolatéral du thalamus. D'après Buzsáki, 1991.

## *Cortex : un foyer hyperexcitable*

Bien qu'une origine thalamique dans la genèse de décharges pointes-ondes a reçu beaucoup de soutien expérimental, de nombreuses observations cliniques démontrent un rôle crucial du néocortex. Des études sur des patients ont soulevé des doutes sur une origine thalamique, notamment lorsque l'injection de pentylentétrazol, une substance convulsive, dans l'artère carotide alimentant le cortex génère des activités pointes-ondes généralisées alors qu'une injection dans l'artère vertébrale, qui alimente le diencephale et le tronc cérébral, ne produit rien (Bennett, 1953). Ces études ont été confirmées sur d'autres patients et sur des chats (Gloor, 1968 ; Gloor, 1969). D'autres arguments ont suivi, comme l'observation de décharges survenant dans le cortex à travers des enregistrements profonds chez des patients, aux voisinages d'une lésion dans le lobe frontale, suggérant que les décharges pointes-ondes seraient secondaires aux décharges focales corticales qui se propageraient de manière corticocorticales (Bancaud, 1969). De même, la capacité d'évoquer des crises après stimulation par des électrodes implantées dans une zone du cortex où se trouve l'origine focale de crises généralisées (Meeren et al, 2005), ainsi que la possibilité de générer des décharges pointes-ondes bilatérales sur une large zone corticale lorsque celle-ci se trouve isolée des structures sous-corticales, après application bilatérale de substance convulsive sur le cortex chez le chat ou le singe (Avoli, 2012) vont à l'encontre de l'argument, avancé par Penfield et Jasper, qui soutient que les lésions ou les stimulations électriques corticales ne peuvent évoquer des attaques de petit ou grand mal (Meeren et al, 2005).

Cette notion d'anomalie corticale a été soutenue par Gloor et al (Gloor, 1969 ; Gloor et al, 1990) qui montrent sur la base du modèle de chat pénicilline que : (1) l'application de la pénicilline de manière diffuse sur le cortex provoque des décharges de pointes-ondes alors que l'injection de pénicilline dans le thalamus ne produit rien, (2) l'ablation chirurgicale du néocortex freine la survenue des activités de pointes-ondes dans le thalamus, et (3) les connexions intracorticales et callosales sont fondamentales pour la propagation et la genèse des activités pointes-ondes. Ils avancent que le facteur essentiel responsable des décharges de pointes-ondes est une augmentation diffuse de l'excitabilité du cortex. L'hyperactivité du cortex serait un prérequis pour la genèse des décharges de pointes-ondes alors que l'activité du réseau thalamique représenterait un mécanisme essentiel pour la rythmicité des décharges. La présence du thalamus et du cortex est alors cruciale pour le développement des décharges de pointes-ondes, alors que la synchronisation bilatérale dépend du corps calleux (Meeren et al, 2005 ; Danober et al, 1998 ; Avoli, 2012). D'autres études sur les modèles de chats sont venues appuyer le rôle du néocortex (Steriade et Contreras, 1998 ; Steriade et Amzica, 2003). Toutefois, un reproche envers ces modèles est que l'induction de crises par augmentation pharmacologique de l'excitabilité corticale donne par essence une importance accrue au cortex dans ce processus.

L'introduction des deux modèles de rats génétiques d'épilepsie absences, WAG/Rij et GAERS, vient cependant confirmer le rôle initiateur du néocortex. Les enregistrements simultanés de potentiels de champs sur de multiples sites corticaux et thalamiques ont montré, à travers une méthode d'analyse d'association non-linéaire entre les signaux, l'existence d'un foyer cortical constant localisé dans la région du cortex somatosensoriel périoral, avec un délai de quelques millisecondes entre les décharges de pointes-ondes enregistrées dans cette région et celles enregistrées à partir d'autres territoires thalamiques et corticaux, chez le modèle WAG/Rij (Meeren et al, 2002) (Figure 12). Dans les premières 500 ms, le foyer cortical mènerait le thalamus, puis durant la crise, les régions corticales et

thalamiques interagiraient de manière bidirectionnelle. Ces résultats, qui ont donné naissance à la théorie du foyer cortical, sont réaffirmés chez le modèle GAERS avec l'existence d'une hyperactivité des neurones dans les couches profondes du cortex somatosensoriel primaire facial, non retrouvée dans le cortex moteur (Polack et al, 2007), et qui reviendrait à une activité normale après injection parentérale d'éthoxusimide, traitement de première intention des absences humaines (Polack et Charpier, 2009).

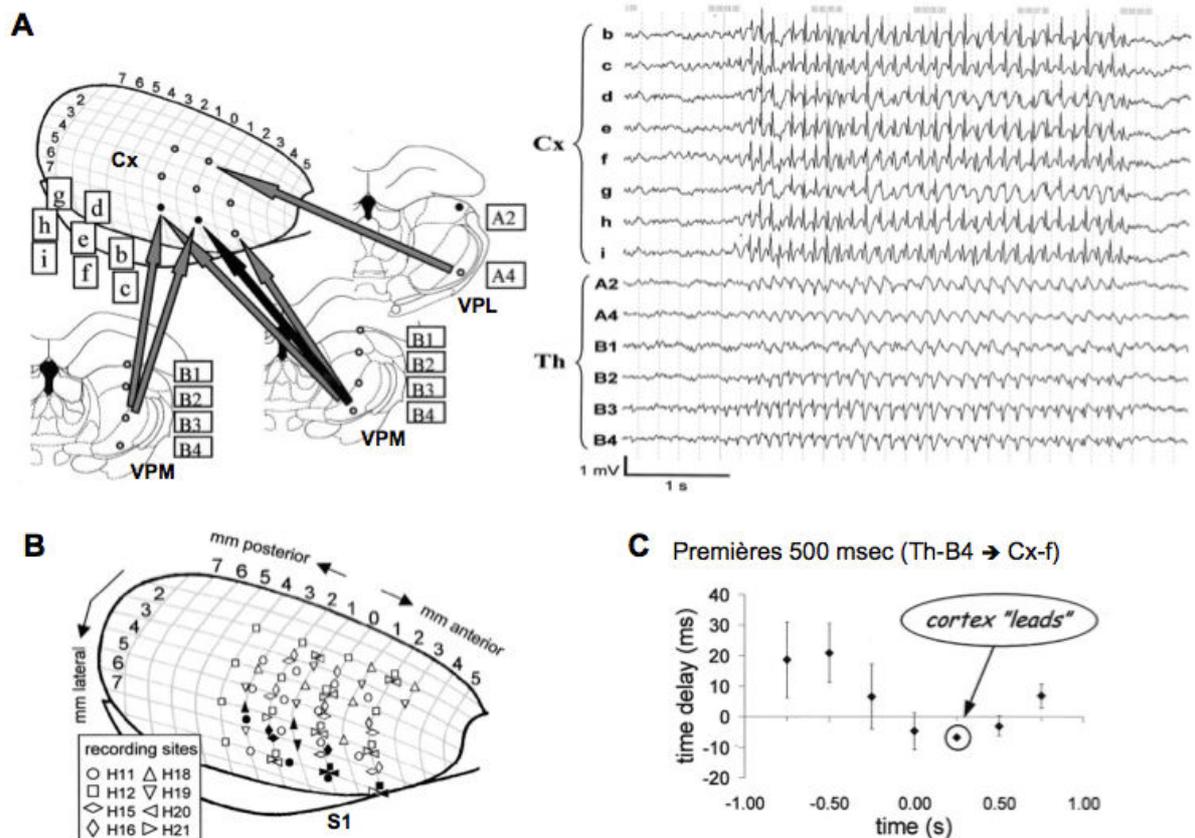


Figure 12. Existence d'un foyer cortical qui mène le thalamus dans les premières 500 ms des décharges de pointes-ondes. (A) Exemple de tracés EEG typique enregistrés au cours d'une crise dans le cortex et le thalamus. (B) Topographie du foyer cortical observé sur 8 rats. Les positions des électrodes sont indiquées par la position des symboles, chaque symbole représente un rat. Les symboles noirs représentent les sites qui mènent les crises. (C) Graphe montrant les variations de délais de l'interdépendance entre le thalamus (VPM) et le cortex (f) (foyer) représenté par la flèche noire en (A) au début des crises chez un rat. Dans les premières 500 ms, dans la configuration du thalamus menant le cortex, le délai est négatif signifiant que c'est le cortex qui mène le thalamus. Cx : cortex, S1 : cortex somatosensoriel primaire, Th : thalamus, VPL : noyau ventro-postérieur latéral du thalamus, VPM : noyau ventro-postérieur médian du thalamus. Adapté de Meeren et al, 2002.

La théorie d'un foyer cortical, avancée par Meeren et al. (2002), est celle qui attire le plus d'attention aujourd'hui. Le cortex est à la fois initiateur, hyperexcitable et un générateur de rythme, et le thalamus est vu plutôt comme un résonateur pertinent pour le maintien des décharges de pointes-ondes (Meeren et al, 2002). Il est tout de même important de souligner que tous ces résultats reposent sur des études électrophysiologiques, c'est-à-dire utilisant des techniques d'enregistrements à résolution et échantillonnage spatiaux limités. Si on reprend les résultats décrits plus haut, on se rend compte que l'emplacement des électrodes d'enregistrement est crucial pour évaluer le site d'initiation

d'une crise d'absence ou pour connaître la contribution des régions impliquées, et que l'exploration d'une "nouvelle" zone peut remettre en question la théorie actuelle. L'équipe de Meeren, par exemple, a dû pratiquement "couvrir" le cortex d'électrodes pour découvrir l'existence d'un foyer cortical. Par ailleurs, en s'intéressant aux cortex somatosensoriel secondaire et insulaire chez le modèle GAERS, l'équipe de Pinault a montré que l'initiation des décharges de pointes-ondes débiterait dans le cortex somatosensoriel secondaire et insulaire plutôt que dans le cortex somatosensoriel primaire (Zheng et al, 2012). De la même manière, d'autres études électrophysiologiques ont montré l'implication du striatum dans la modulation des crises d'absence (Danober et al, 1998 ; Deransart et al, 1998 ; Deransart et al, 2000 ; Slaght et al, 2004) alors que la majorité des études se concentrent sur le système cortico-thalamo-cortical. Aujourd'hui encore, un nouveau site d'initiation potentiel a été révélé. Le noyau postérieur du thalamus semble être une région essentielle à l'initiation des décharges de pointes-ondes (Luttjohann et van Luijtelaar, 2015).

Cela montre que malgré l'excellente résolution temporelle des techniques d'électrophysiologie, la nécessité d'avoir des outils permettant d'observer à travers l'ensemble du cerveau en profondeur est indispensable pour étudier les crises d'absences. Les progrès techniques ont permis de répondre de mieux en mieux à cette nécessité. En se basant sur le lien étroit entre les activités neuronales et vasculaires, les outils d'imagerie représentent, à ce jour, le meilleur moyen complémentaire pour remédier au manque d'échantillonnage spatial. Si l'utilisation de mesures métaboliques reste une mesure indirecte des activités neuronales, ces mesures ont en revanche l'avantage d'apporter de nouvelles informations complémentaires jusqu'alors inaccessibles à travers des études électrophysiologiques. De nombreuses études utilisant des outils basés sur les activités métaboliques ont pu ainsi montrer un rôle du système vasculaire et métabolique dans l'émergence des épilepsies, et notamment dans les crises d'absence.

## 1.2. Epilepsie : l'implication vasculaire et métabolique

Les neurones ont des besoins métaboliques pour fonctionner. Ces besoins sont apportés par le système vasculaire à travers un signal hémodynamique émis par ces cellules. Ce signal provoque la dilatation des artérioles et des capillaires dans une région précise du cerveau concomitante avec la constriction des vaisseaux sanguins dans les zones périphériques. Ce phénomène fondamental des fonctions cérébrales est appelé *hyperémie fonctionnelle*, et fut découvert en 1880 par Angelo Mosso (Mosso, 1880), puis, confirmé par Roy et Sherrington en 1890 (Roy et Sherrington, 1890). Ces événements sont spatialement restreints et se produisent en quelques secondes suite à une activation neuronale intense. Cela correspond bien à l'idée selon laquelle un réseau de neurones ne peut être soumis à une activité intense que si celui-ci reçoit l'apport énergétique nécessaire à son fonctionnement. Un défaut, même minime dans l'apport en substrat énergétique ou en oxygène, peut entraîner des dégâts considérables, voire même la mort des cellules cérébrales (Drake et Iadecola, 2006). Les activités neuronales requièrent donc un débit sanguin minimal et contrôlé pour assurer leur maintien, intégré au moyen d'un couplage neurovasculaire.

En parallèle, il existe un phénomène de régulation en réponse aux variations de pression, appelé *autorégulation cérébrovasculaire*, dans lesquels les vaisseaux cérébraux sont capables de modifier activement leur diamètre en réponse à une variation de pression de perfusion. Ce phénomène est un mécanisme physiologique de protection, permettant de maintenir un débit sanguin cérébral constant. Dans ce chapitre, je ne m'attarderai pas sur ce sujet et me focaliserai sur le contrôle du débit sanguin cérébral par les activités neuronales locales qui est la base de la neuroimagerie. Par ailleurs, des études n'ont montré aucun changement de pression artérielle au début, pendant et à la fin des crises d'absence (Nehlig et al, 1996 ; Nersesyan et al, 2004b).

### 1.2.1. Le couplage neuro-vasculaire

Le système vasculaire repose sur un réseau d'artères, de capillaires et de veines. Trois troncs artériels sont responsables de la vascularisation cérébrale. Le sang arrive au cerveau par deux paires de vaisseaux, les *artères carotides internes* (droite et gauche) et *l'artère basilaire*, formée par la fusion des deux *artères vertébrales* (droite et gauche). Ces artères émergent du cou, pénètrent dans la boîte crânienne, se rejoignent en établissant des connexions et forment le *polygone de Willis*. A la sortie du polygone de Willis, trois paires d'artères majeures drainent le sang : *l'artère cérébrale antérieure*, *l'artère cérébrale moyenne* et *l'artère cérébrale postérieure*. Ces différentes artères desservent des régions spécifiques et définissent donc de nombreux territoires artériels cérébraux (Figure 13). Ces artères progressent dans le parenchyme cérébral en se ramifiant pour former de plus petites artères, *artérioles* et *capillaires*. Les capillaires s'unissent ensuite pour former des *veinules*, puis des *veines* qui forment au fur et à mesure des systèmes veineux plus importants. Il existe un réseau superficiel et un réseau profond, se rejoignant au niveau des *sinus*, présents dans le dédoublement de la dure-mère, qui assurent le drainage du sang (Scremin, 2004, 2015).

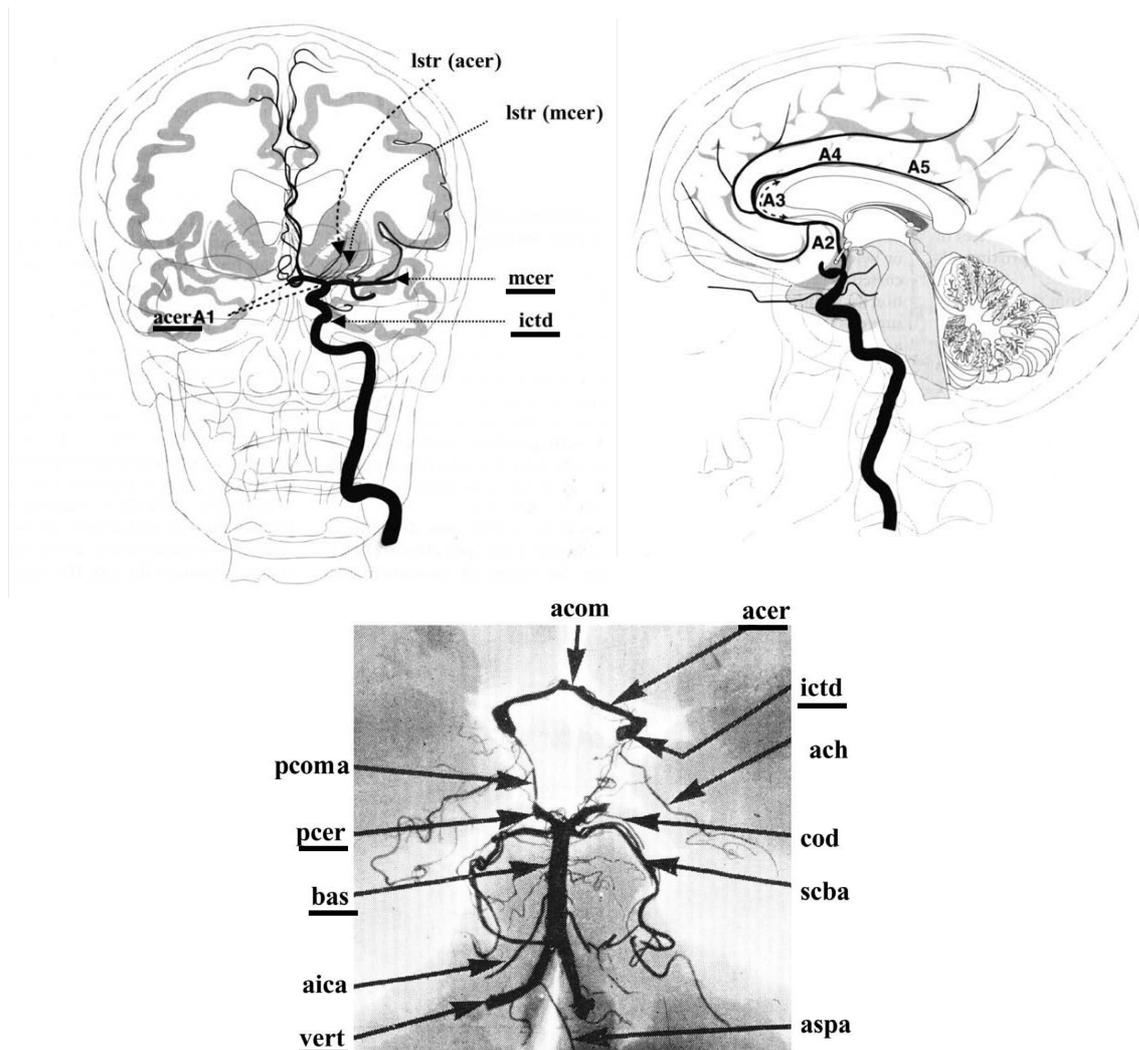


Figure 13. Illustration anatomique des projections artérielles cérébrales observées en coronal (en haut à gauche) et sagittal (en haut à droite), et du polygone de Willis (en bas) chez l'homme. acer : artère cérébrale antérieure, bas : artère basilaire, ictd : artère carotide interne, mcer: artère cérébrale moyenne, pcer : artère cérébrale postérieure, vert : artère vertébrale. Adaptée de *Scremin, 2004*.

Le système vasculaire joue un rôle vital dans l'activité du cerveau en procurant continuellement de l'oxygène et des substrats métaboliques, dont en particulier le glucose, aux cellules cérébrales à travers les artères et permet le rejet par le retour veineux des métabolites produits par ces cellules. La bonne régulation du débit sanguin cérébral (*Cerebral Blood flow*, CBF) assure l'équilibre du fonctionnement cérébral. L'ajustement du débit sanguin fonctionne par rétro-contrôle (*feed-back*), qui améliore le taux de délivrance des substrats énergétiques pour sous-tendre les fonctions. Ainsi la variation de fonction neuronale induit le changement de CBF qui provoque une adaptation de l'approvisionnement énergétique permettant la fonction neuronale (Attwell et al, 2010 ; Kleinfeld et al, 2011). La régulation du CBF relative aux besoins du cerveau repose donc sur un lien étroit entre l'activité neuronale et le flux sanguin. Ce lien passe par une relation neuro-glio-vasculaire, appelée unité neurovasculaire (Drake et Iadecola, 2006).

## Un lien étroit anatomique : l'unité neurovasculaire

A ce jour, la majorité des études de couplage neurovasculaire reposent sur du tissu cortical, bien qu'on puisse trouver des études réalisées sur des tranches d'hippocampe ou au niveau de la rétine. Les descriptions ci-dessous sont donc basées sur ces études.

Trois partenaires cellulaires : neurones, astrocytes et vaisseaux sanguins forment une entité fonctionnelle avec d'étroits couplages anatomiques et fonctionnels. Les constituants cellulaires de l'unité neurovasculaire varient selon le type, la taille et la localisation des vaisseaux sanguins (Drake et Iadecola, 2006 ; Iadecola et Nedergaard, 2007) (Figure 14).

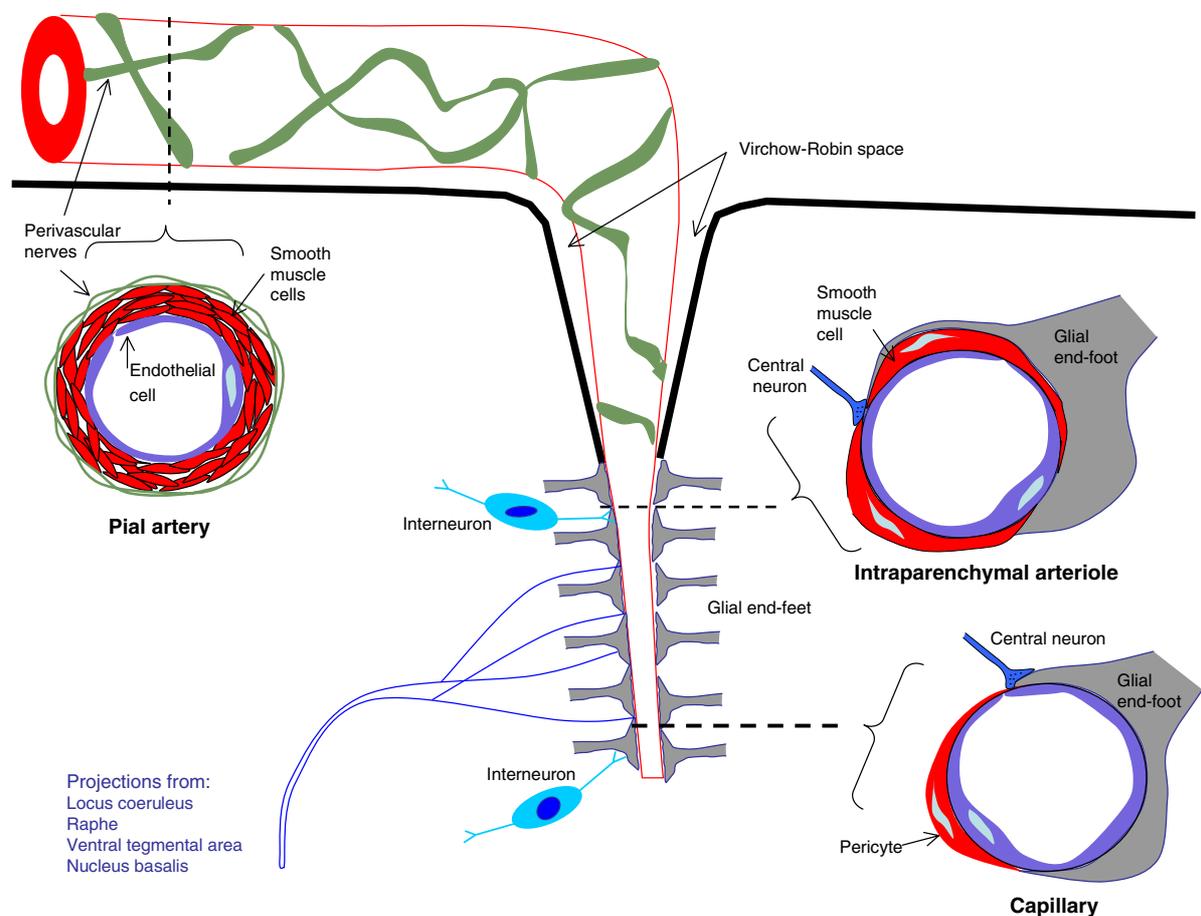


Figure 14. Schéma de l'unité neurovasculaire. L'unité regroupe le couplage fonctionnel entre les neurones, cellules gliales, cellules musculaires lisses et cellules endothéliales. Les composants cellulaires varient selon le type, la taille et la localisation des vaisseaux sanguins. Les coupes transversales (tirets) montrent les artères piales, les artérioles du parenchyme cérébral et les capillaires. L'innervation des artères piales est fournie par les nerfs périphériques alors que les artérioles et les capillaires sont innervés par des neurones centraux (interneurones locaux et neurones de projection) et les pieds astrocytaires y sont étroitement apposés. D'après Drake et Iadecola (2006).

A la surface du cerveau, de larges artères cérébrales, appelées *artères piales*, progressent dans le parenchyme cérébral pour former de plus petites artères et des artérioles pénétrantes. Les artères piales sont composées de trois tuniques : (1) une couche de *cellules endothéliales* ou *endothélium* cérébral, spécialisées dans la formation de la barrière hémato encéphalique par leur manque de

fenestration et par la présence de jonctions serrées entre les cellules, et sont connectées par des jonctions gap permettant la transmission de réponses intracellulaires entre les cellules adjacentes, (2) une tunique composée principalement de *cellules musculaires lisses* qui possèdent des propriétés contractiles, et (3) une couche externe de *cellules leptoméningées*, entourant étroitement toutes les structures (artères, veines, nerfs) qui pénètrent dans le système nerveux central ou en sortent. Les artères piales possèdent en outre une membrane élastique sur laquelle reposent les cellules endothéliales. Les artères piales présentent une grande densité d'innervation par les nerfs périvasculaires, provenant des ganglions autonomes et sensoriels situés dans le système nerveux périphérique. Les axones constitutifs de ces nerfs libèrent des neurotransmetteurs et neuropeptides qui peuvent soit contracter, soit dilater les artères et artérioles (Drake et Iadecola, 2006).

Les artères piales progressent dans le parenchyme cortical au niveau de l'espace de Virchow-Robin, invagination de la pie-mère, pour former les artérioles pénétrantes. Ces artérioles sont constituées d'une couche de cellules endothéliales et d'une seule couche de cellules musculaires lisses. Les artérioles sont en contact avec des pieds astrocytaires et des prolongements neuronaux.

En pénétrant plus en profondeur, les vaisseaux deviennent de petites artérioles et des capillaires, avec un réseau très dense et un calibre de l'ordre de 8 à 10  $\mu\text{m}$ . Leur paroi très mince est formée de cellules endothéliales fixées sur la membrane basale dans laquelle sont disposés les péricytes, cellules apparentées aux cellules musculaires lisses possédant aussi des propriétés contractiles. Dans certains cas, une seule cellule endothéliale constitue l'entière circonférence de la paroi, assurant ainsi les échanges de substances (gaz, nutriment, hormones) et de déchets entre le sang et les cellules du parenchyme. A ce niveau, la membrane basale vasculaire, et dans une moindre mesure, les cellules musculaires lisses et péricytes, contactent directement les prolongements neuronaux et pieds astrocytaires. Par l'intermédiaire de leurs prolongements, les neurones et astrocytes viennent jusqu'à entourer la quasi-totalité de la paroi vasculaire (Kacem et al, 1998). Les prolongements neuronaux peuvent provenir des interneurones (Vaucher et al, 2000 ; Cauli et al, 2004) ou des neurones localisées dans les régions sous-corticales, projetant dans le néocortex. Les régions sous-corticales connues pour contribuer à l'innervation périvasculaire corticale incluent le cerveau antérieur basal, les noyaux du raphé, l'aire tegmentale ventrale et le locus coeruleus (Drake et Iadecola, 2006 ; Iadecola et Nedergaard, 2007). Il est intéressant de noter qu'au niveau du thalamus, il existe un contact direct entre les terminaisons axonales corticothalamiques et la membrane basale des vaisseaux sanguins, bien que la nature fonctionnelle de ce couplage neurovasculaire reste à élucider (Feig et Guillery, 2000).

La régulation du CBF repose sur la capacité des cellules musculaires lisses et des péricytes à contracter ou dilater les vaisseaux pour pouvoir maintenir l'homéostasie cellulaire. L'implication des artérioles et des capillaires intracérébraux dans la régulation locale des flux microvasculaires est établie (Kleinfeld et al, 1998 ; Stefanovic et al, 2007 ; Shih et al, 2009 ; Attwell et al, 2010 ; Drew et al, 2011). Les contacts directs qu'ils entretiennent avec les neurones et les astrocytes montrent l'importance de cette unité neurovasculaire dans la régulation du CBF. Dans le cas des artères piales, la large taille des vaisseaux innervés et la nature diffuse de l'innervation périvasculaire par les nerfs autonomes périphériques rendent improbable que cette innervation puisse jouer un rôle dans les changements de flux sanguin initiés par l'activité cérébrale. Il est toutefois probable que ces innervations modulent la variation du CBF qui survient pendant l'hypertension, ou après l'interruption

transitoire de CBF durant un AVC (ou encore durant les crises épileptiques) (Iadecola, 1998 ; Drake et Iadecola, 2006). Contrairement aux artères et artérioles, les veines et veinules ont, quant à elles, peu de cellules contractiles, et assurent principalement un rôle de drainage. La dilatation des veinules reste possible mais de manière faible comparée aux artérioles et ne s'opère qu'à la suite de la dilatation des artérioles et capillaires induite après une longue période de stimulation (30 s) (Drew et al, 2011), laissant aux veinules peu de chance de réguler le débit sanguin.

### **Un lien étroit fonctionnel : l'hyperémie fonctionnelle**

Des contacts entre des neurones et les vaisseaux intracérébraux correspondent bien à un mécanisme d'interaction directe entre les deux parties. En revanche, il est intéressant de noter que les pieds astrocytaires occupent une portion majoritaire de la surface vasculaire contrairement aux prolongements neuronaux. Or, les astrocytes ont une implication importante dans l'apport énergétique aux neurones, notamment grâce à leur capacité de faire des réserves de glycogène et de produire du lactate par la glycogénolyse et la glycolyse (Magistretti et al, 1993 ; Buxton, 2009 ; Barros et Deitmer, 2010). Outre une communication bidirectionnelle entre neurones et astrocytes pour le maintien du métabolisme glutamatergique et GABAergique lors des activités neuronales, impliquant un rôle essentiel des astrocytes dans la neurotransmission (Perea et Araque, 2002 ; Haydon et Carmignoto, 2006 ; Theodosis et al, 2008 ; Christophe M Michel, 2009 ; Buxton, 2009 ; Ortinski et al, 2010 ; Takata et al, 2011), il a été démontré que les astrocytes jouent également le rôle d'intermédiaire entre l'activité neuronale et la régulation de CBF par une corrélation entre l'élévation de calcium intracellulaire des pieds astrocytaires et le changement de tonus vasculaire (Zonta et al, 2002 ; Winship et al, 2007 ; McCaslin et al, 2010). Le changement du tonus vasculaire repose également sur l'activité des interneurons qui, selon leur nature, sont capables de dilater ou de contracter les vaisseaux sanguins (Cauli et al, 2004 ; Kleinfeld et al, 2011). De même, il a été démontré que les cellules pyramidales locales exprimant la cyclooxygénase 2 (COX-2), qui contactent les vaisseaux à travers de fines couches de pieds astrocytaires dans le cortex somatosensoriel (Wang et al, 2004), contribuent majoritairement à la dilation des vaisseaux sanguins en réponse aux stimulations des vibrisses (Lecrux et al, 2011 ; Lacroix et al, 2015), corroborant ainsi l'existence d'un lien fonctionnel local entre activité neuronale et tonus vasculaire (Figure 15).

Le mécanisme du couplage neuro-glio-vasculaire met en jeu la transmission d'agents vasoactifs libérés par les neurones et les astrocytes, mais également par les cellules endothéliales, agissant sur les cellules musculaires lisses (ou péricytes) des vaisseaux pour les dilater ou les contracter. Les transmetteurs vasoactifs incluent les ions potassium ( $K^+$ ), l'acétylcholine, le monoxyde d'azote (*Nitric Oxyde*, NO), le GABA, les catécholamines et les neuropeptides. D'autres neurotransmetteurs, comme le glutamate, n'ont pas de propriétés vasoactives directes, mais stimulent la synthèse et la libération de puissants vasodilateurs comme le NO, les métabolites des époxygénases P450 et des cyclooxygénase (COX) tant au niveau neuronal qu'astrocytaire (Moro et al, 1995 ; Nguyen et al, 2000 ; Jakovcevic et Harder, 2007 ; Blanco et al, 2008 ; Gordon et al, 2008 ; Buxton, 2009 ; Koehler et al, 2009 ; Attwell et al, 2010 ; Carmignoto et Gómez-Gonzalo, 2010 ; Cauli et Hamel, 2010 ; Petzold et Murphy, 2011).

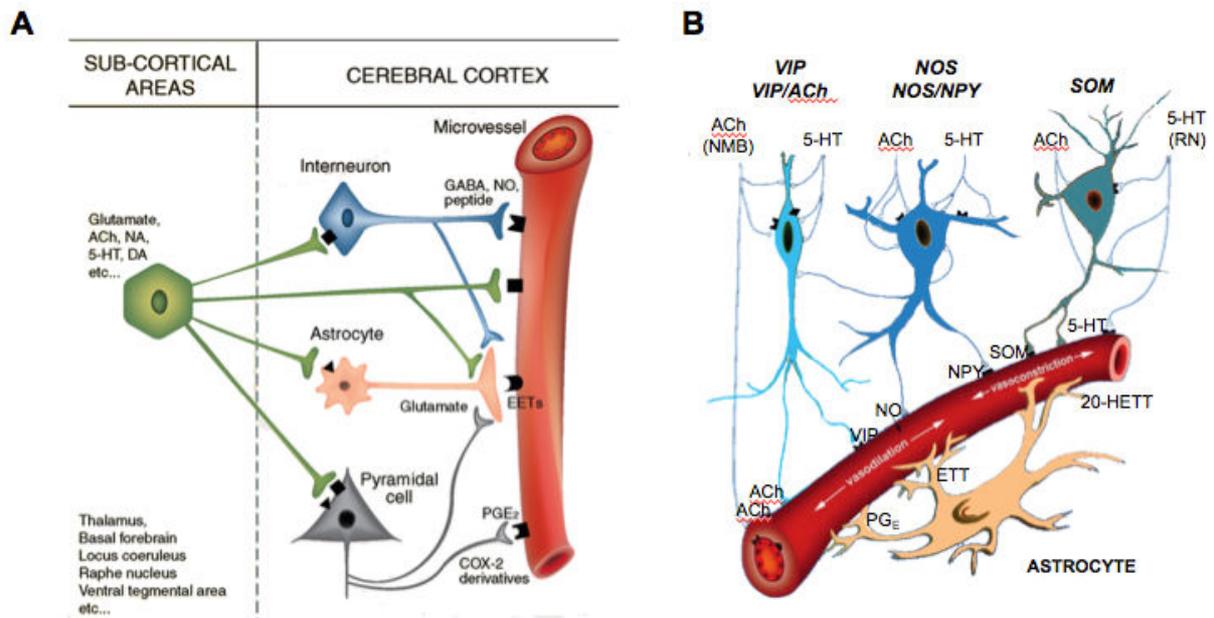
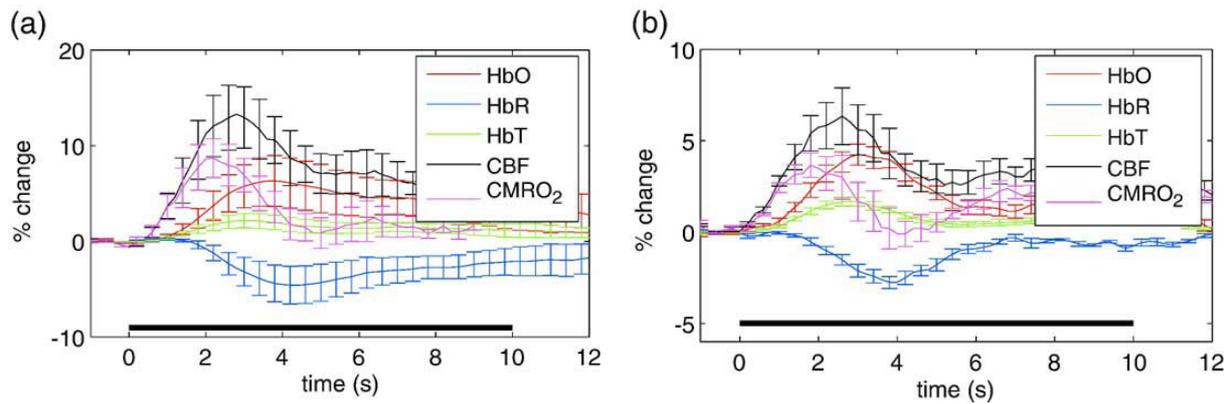


Figure 15. Schéma récapitulatif de la modulation de la microvascularisation par l'action des différents neurones et astrocytes. (A) Le tonus vasculaire peut être modulé par des interneurons ou des cellules pyramidales locaux directement ou par le biais d'astrocytes, et par des neurones en provenance des régions sous-corticales. Adaptée de *Cauli et Hamel, 2010*. (B) Divers types d'interneurones provoquent différentes réponses vasculaire (vasodilatation ou vasoconstriction) selon les agents vasoactifs mis en jeu. Adaptée de *Kleinfeld et al, 2011*.

## Le signal hémodynamique

Plusieurs paramètres physiques mesurables varient significativement avec l'activation neuronale, dont le taux d'oxygénation du sang, le diamètre des vaisseaux, qui contrôle le volume sanguin, et le débit sanguin, qui dépend de la géométrie du réseau vasculaire et de la pression artérielle. Ces paramètres sont collectivement appelés *réponse hémodynamique*. La réponse hémodynamique est un phénomène bien localisé mais lent par rapport à l'activation neuronale. Des études *in vivo* menées chez l'animal ont ainsi montré que le pic de la réponse est atteint seulement dans les secondes qui suivent la stimulation de la zone, alors que la réponse neuronale est de l'ordre de la milliseconde (Malonek et al, 1997 ; Sheth et al, 2004 ; Dunn et al, 2005 ; Hillman et al, 2007 ; Stefanovic et al, 2007) (Figure 16). Cette réponse lente est due à la dynamique de la dilatation des vaisseaux. Malgré ce désavantage, l'imagerie de la dynamique du sang dans le cerveau permet de localiser indirectement les zones cérébrales activées. Ce sont ces signaux hémodynamiques résultant du couplage neurovasculaire qui sont aujourd'hui exploités au travers de multiples techniques d'imagerie cérébrale.



**Figure 16.** Moyenne des variations de réponses pour chaque paramètre hémodynamique mesuré au cours d'une stimulation de 10 s de la patte (a) et des vibrisses (b) chez le rat. HbO : taux d'hémoglobine oxygénée, HbR : taux d'hémoglobine désoxygénée, HbT : taux d'hémoglobine total (soit volume sanguin), CBF : débit sanguin, CMRO<sub>2</sub> : consommation d'O<sub>2</sub> dans le sang. D'après *Dunn et al, 2005*.

Bien que les mécanismes qui sous-tendent l'hyperémie fonctionnelle restent encore à éclaircir, la compréhension du couplage neurovasculaire aujourd'hui est telle qu'on peut affirmer que les activités neuronales sont capables de contrôler les activités vasculaires de manière locale à travers des signaux émis directement, ou par le biais des astrocytes, sur la microvascularisation. La prise en compte de cette interaction implique en terme expérimental que les techniques d'imagerie basées sur le métabolisme et la perfusion sanguine (débit sanguin, volume sanguin, taux d'O<sub>2</sub> dans le sang, taux de consommation d'O<sub>2</sub> (CMRO<sub>2</sub>) par unité de temps et de volume de tissu) sont capables de refléter l'activité neuronale. D'autre part, cette interdépendance entre les activités neuronale et vasculaire sous-entend qu'une altération au niveau vasculaire puisse avoir un impact sur l'activité neuronale, et inversement. Cela signifie que la prise en compte du rôle des événements vasculaires dans les processus physiologiques et pathologiques neuronaux devient incontournable.

### 1.2.2. Les techniques basées sur l'hyperémie fonctionnelle

Une série d'outils a vu le jour pour mesurer les réponses hémodynamiques et ils ont largement contribué à la compréhension que nous avons aujourd'hui du couplage neurovasculaire. Chacune des techniques, dont je décrirai succinctement les principes par la suite, mesure des propriétés physiques distinctes et chacune présente des atouts appropriés selon les questions abordées. Pour l'étude des signaux hémodynamiques mesurés sur l'ensemble du cerveau chez l'homme et l'animal *in vivo*, on peut citer l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), la Tomographie à Emission Mono Photonique (*Single-Photon Emission Computed Tomography*, SPECT) et la Tomographie à émission de positron (TEP ou PET) qui sont des techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrales non invasives. Ces techniques ont l'avantage d'identifier les aires cérébrales impliquées au cours d'événements spécifiques (comme des tâches psychomotrices ou des crises d'épilepsie) à travers une cartographie du cerveau. Les autres techniques, comme la spectroscopie proche infra-rouge (*functional Near-InfraRed Spectroscopy*, NIRS), le signal optique intrinsèque (*Intrinsic Optical Signal*, IOS), le laser Doppler ou l'imagerie bi-photonique (ou 2-photon), ont un champ d'observation plus restreint mais possèdent des résolutions plus fines. L'un des avantages de ces techniques est la possibilité de suivre les variations de

réponse hémodynamique au cours d'un événement du réseau neuronal en temps réel. En revanche, à cause de leur aspect invasive (à l'exception du NIRS), ces techniques sont communément utilisées sur des modèles animaux *in vivo* ou *in vitro*.

## Techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale

### *La Tomographie à Emission Mono Photonique (TEMP - Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT)*

La tomographie par émission mono photonique (SPECT) est une technique d'imagerie utilisée en médecine nucléaire qui peut permettre d'obtenir des informations sur le débit sanguin cérébral sur tout le volume du cerveau. Le principe repose sur la détection d'un produit de contraste radioactif, injecté au patient, dont la fixation augmente dans les zones cérébrales où l'activité est la plus intense et diminue dans les régions moins fonctionnelles. Le traceur radioactif émet des rayons gamma ionisants. Ces photons gamma sont détectés grâce à une caméra à scintillateur, développée pour la première fois par Anger dans les années 1950 (Anger, 1952 ; Peterson et Furenlid, 2011). Le rayonnement gamma est ainsi transformé en rayonnement lumineux en traversant un cristal scintillateur, qui est ensuite converti en signal électrique par des photomultiplicateurs. La présence d'un collimateur permet de filtrer le rayonnement incident suivant sa direction afin de sélectionner les photons perpendiculaires à l'organe ou la fonction ciblée, augmentant ainsi la résolution spatiale des détecteurs. En revanche, ce procédé induit la perte d'une grande quantité de photons et explique la mauvaise qualité relative de l'image (Figure 17). La caméra gamma effectue une rotation autour du patient pour reconstruire une image 3D à partir d'une série de projections suivant différents angles, d'où le terme tomographie.

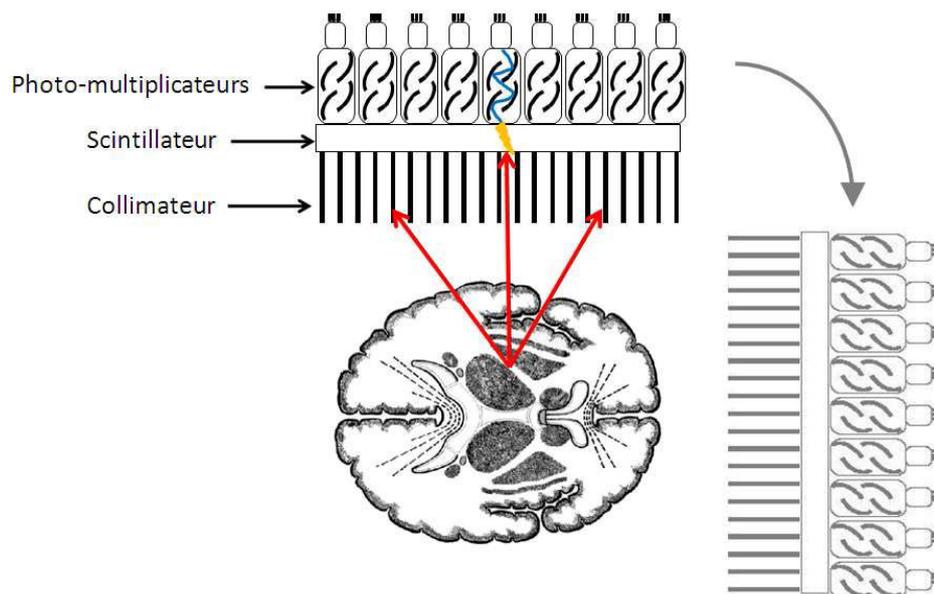


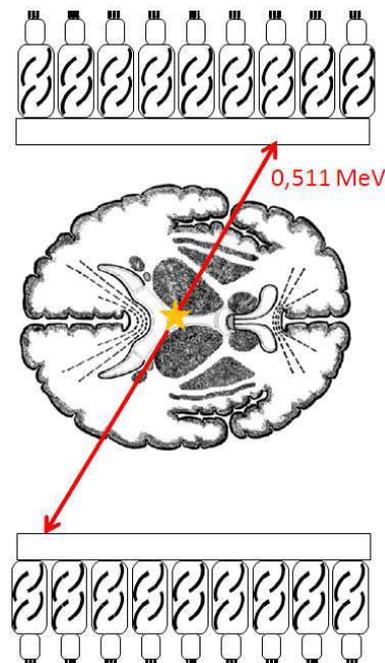
Figure 17. Principe de la tomographie par émission mono-photonique.

Cette technique d'imagerie fonctionnelle est limitée par une faible résolution spatiale (3 - 6 mm) et temporelle (plusieurs minutes). De plus, si la détection est non invasive, elle nécessite l'injection de composés radioactifs délétères à hautes doses.

### *La Tomographie à émission de positron (TEP ou PET)*

La tomographie à émission de positron (TEP) est une technique assez proche du SPECT dans le sens où il s'agit également d'une tomographie d'émission utilisant un traceur radioactif. Le principe, ici, repose sur l'injection d'une molécule d'intérêt dans laquelle est introduite un traceur radionucléide émetteur de positrons ou positons (électron avec une charge positive). Une fois le positon émis, dont le parcours ne dépasse pas quelques millimètres, celui-ci s'annihile avec un électron pour donner deux photons gamma s'éloignant en directions opposées (Figure 18). La détection en coïncidence de deux rayons gamma, avec une énergie proche de 511keV, sur deux détecteurs, permet d'identifier une droite sur laquelle a eu lieu la réaction d'annihilation. Ainsi, par reconstruction, il est possible de localiser les zones qui émettent des positons avec une résolution spatiale de l'ordre de 2,5 à 5 mm qui est meilleure que celle du SPECT, mais qui reste assez faible. Cette technique est également limitée par la résolution temporelle qui est de l'ordre de une à plusieurs minutes.

Deux stratégies sont possibles pour suivre l'activation cérébrale via le couplage neurovasculaire par la TEP. L'une consiste à suivre les variations locales en demande métabolique de glucose dans le cerveau en attachant un radionucléide fluor-18 ( $^{18}\text{F}$ ) à un analogue du glucose (Phelps, 1981 ; Kornblum et al, 2000). La deuxième consiste à suivre les variations locales de flux sanguin en attachant le radionucléide oxygène-15 ( $^{15}\text{O}$ ) à une molécule d'eau (Fox et al, 1986).



**Figure 18.** Principe de la tomographie par émission de positons.

Une TEP miniature a été récemment développée permettant à un rat d'être pleinement conscient et mobile lors de son utilisation. Appelé RatCAP (*Rat Conscious Animal PET*), cet outil permet de s'affranchir des effets liés à l'anesthésie et aux stressés liés à la contention et au protocole expérimental (Schulz et al, 2011).

### *L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf)*

L'IRM fonctionnelle permet d'étudier le fonctionnement du cerveau en observant les modifications locales d'oxygénation sanguine ou de volume sanguin cérébrale associées à un événement ou à la réalisation d'une tâche spécifique. Depuis sa création, il y a environ 25 ans, cette technique a révolutionné notre compréhension du cerveau.

La technique la plus courante utilise l'effet BOLD (*Blood Oxygenation Level Dependent*) (Ogawa et al, 1990) qui, contrairement aux TEP et SPECT, n'utilise aucun agent de contraste. Le principe du BOLD repose sur les propriétés magnétiques de l'hémoglobine. Celle-ci peut être rencontrée sous deux formes : l'hémoglobine oxygénée (oxyhémoglobine, HbO<sub>2</sub>) et l'hémoglobine désoxygénée ou réduite (désoxyhémoglobine, HbR). L'oxyhémoglobine a des propriétés diamagnétiques comme la plupart des tissus biologiques alors que la désoxyhémoglobine est paramagnétique, modifiant la susceptibilité magnétique locale. L'IRM permet de mesurer ce contraste (Ogawa et al, 1990). Plus la concentration en HbR est importante, plus le signal BOLD est faible. Le contraste mesuré permet ainsi d'observer indirectement les variations hémodynamiques engendrées par l'activité neuronale à travers le principe du couplage neurovasculaire. Lors de l'activation d'une population neuronale, la consommation locale en oxygène augmente provoquant l'augmentation en HbR. Toutefois, le besoin en oxygène de ces neurones étant plus important, une augmentation locale du débit sanguin par la vasodilatation entraîne une augmentation d'oxygène, faisant diminuer la concentration en HbR dans la région activée. Ce dernier effet prédomine : l'activation neuronale a pour conséquence une augmentation du signal BOLD de quelques pourcents (Buxton, 2009) (Figure 19). La variation de signal BOLD induite par une stimulation ponctuelle peut être modélisée par la fonction de réponse hémodynamique (FRH ou HRF en anglais) (Buxton et al, 1998) (Figure 20). Cette fonction est l'équivalent de la réponse impulsionnelle d'un filtre linéaire et caractérise les processus hémodynamiques mis en jeu. En détectant ces variations positives et négatives du signal BOLD en chaque point, il est possible de dresser une carte d'activation et de désactivation du cerveau.

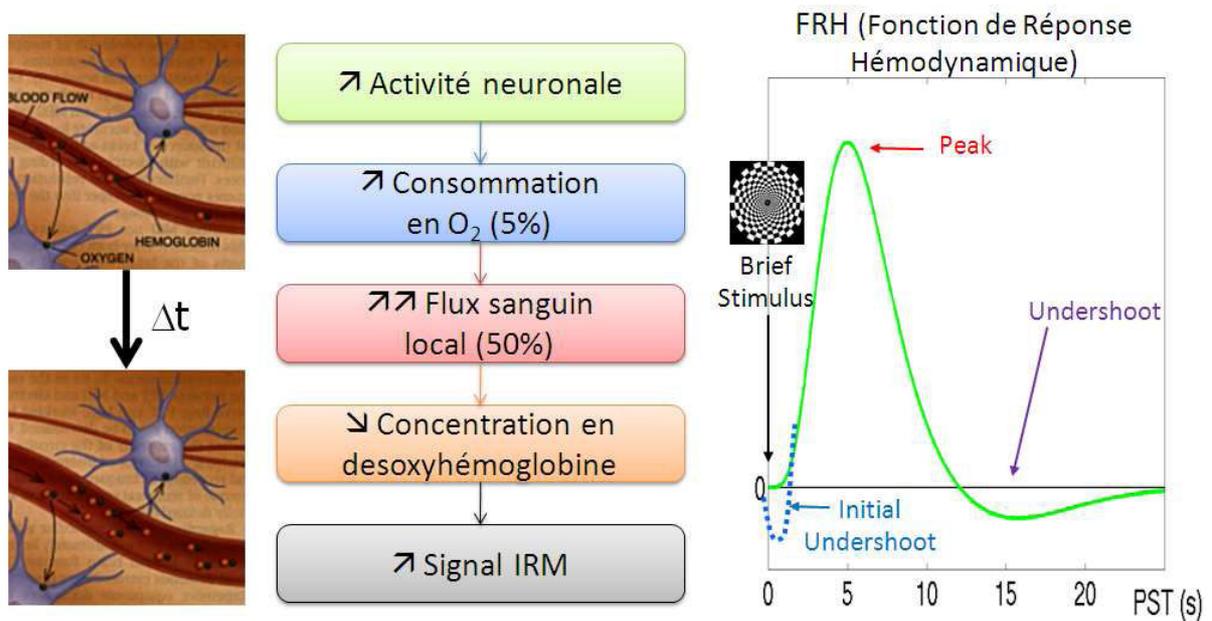


Figure 19. Effet BOLD. A gauche : Augmentation du débit sanguin cérébral local par vasodilatation, d'après Raichle, 1994. Au centre : Processus à l'origine du signal BOLD. A droite : Fonction de réponse hémodynamique.

L'IRMf permet également de mesurer les changements de volume sanguin cérébral (CBV), offrant l'avantage de s'affranchir des mesures indirectes d'oxygénation du sang. Cette méthode permet de présenter une localisation plus précise des activités, car le signal BOLD provient principalement des veines et veinules, avec une résolution temporelle un peu meilleure (Silva et al, 2007). Toutefois, elle nécessite l'injection systémique d'agent de contraste paramagnétique pour mesurer exclusivement le volume sanguin et non plus la réponse BOLD (excéder la réponse BOLD et sensibiliser le volume sanguin) (Mandeville, 2012).

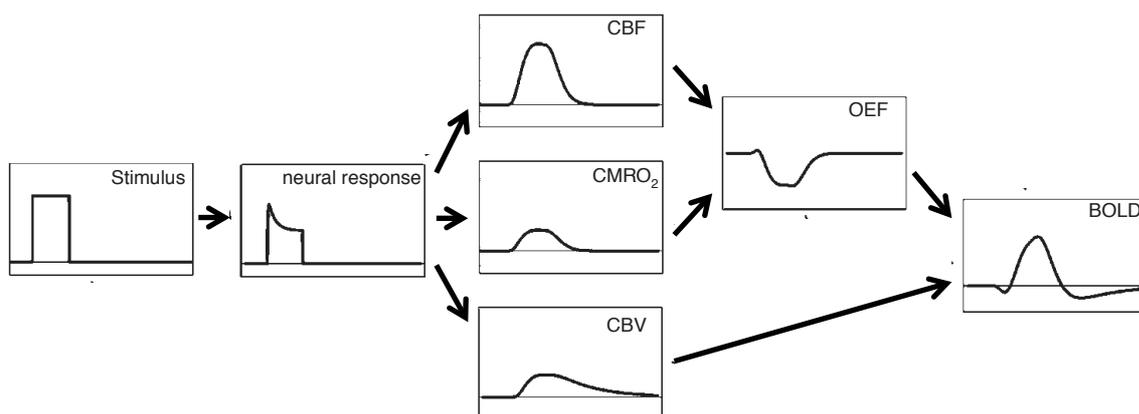


Figure 20. L'enchaînement des événements menant au signal BOLD (ou fonction de la réponse hémodynamique). Un stimulus déclenche l'activité neuronale, qui en retour déclenche l'activité métabolique sous forme d'une large augmentation du débit sanguin (CBF), une petite augmentation du taux métabolique d' $O_2$  (CMRO<sub>2</sub>), et une augmentation modérée du volume sanguin. Les changements combinés du CBF, CMRO<sub>2</sub> et CBV créent le changement du signal BOLD. Cette cascade de réactions explique pourquoi la réponse BOLD est déformée de façon complexe par rapport au stimulus. Un aspect clé de cette chaîne d'événements est que le CBF et le CMRO<sub>2</sub> sont plutôt entraînés en parallèle qu'en série et potentiellement par différents aspects de l'activité neuronale. OEF : la fraction d'extraction d' $O_2$  correspond à la consommation d' $O_2$ . D'après Buxton, 2009.

Dans l'ensemble, l'IRMf possède une très bonne résolution spatiale, de l'ordre du millimètre (voire inférieure au millimètre, dépendant de l'intensité du champ magnétique en passant de 1,5 Tesla à 7 ou 8 Tesla), et une bonne résolution temporelle, de l'ordre de la seconde, qui est suffisante pour suivre les variations hémodynamiques. D'autre part, malgré une interférence des forts champs magnétiques avec les faibles signaux électriques générés par le cerveau, il est possible d'acquérir simultanément l'IRMf et l'EEG au moyen d'équipement spécialement développé, permettant de bénéficier à la fois de la bonne résolution spatiale de l'IRMf et de la bonne résolution temporelle de l'EEG. En revanche, l'IRMf présente une faible sensibilité (rapport signal sur bruit), intrinsèquement lié à la taille du voxel observé, ce qui rend indispensable de moyenniser temporellement les signaux en répétant le stimulus pour détecter de manière significative les variations du signal BOLD ou CBV.

### **Techniques mesurant les réponses hémodynamiques en temps réel**

Les techniques, décrites ci-dessous, permettent généralement d'étudier le couplage neurovasculaire, des périodes de latences hémodynamiques ou de vasomotion durant diverses conditions physiologiques (stimulation sensorielle par exemple) ou pathologiques (crise d'épilepsie par exemple) sur des réseaux fonctionnels cérébraux d'extension spatiale limitée. Ces approches sous-entendent de connaître au préalable les réseaux neuronaux d'intérêt. Ces outils sont parfaitement compatibles avec les enregistrements électrophysiologiques. En revanche, ils sont limités aux cortex dans les études *in vivo*.

#### *La spectroscopie proche infrarouge fonctionnelle (SPIRF - functional Near-InfraRed Spectroscopy, NIRS)*

La spectroscopie proche infrarouge a été appliquée pour la première fois chez le chat et chez l'homme en 1977 (Jöbsis, 1977). Contrairement aux techniques citées ci-dessus, le NIRS n'est pas une technique de type imagerie, dans le sens où elle ne génère pas une image, mais elle permet de mesurer en temps réel les réponses hémodynamiques. Comme le signal BOLD de l'IRMf, le NIRS permet d'enregistrer une mesure indirecte de l'activité cérébrale à travers les variations du taux d'oxygénation du sang, mais utilise pour cela une méthode optique. Le principe du NIRS repose sur la capacité d'absorption de lumière monochromatique dans les longueurs d'ondes proche de l'infrarouge (650 à 890 nm) par certains chromophores présents dans le tissu cérébral, dont l'oxyhémoglobine et la désoxyhémoglobine. Ces deux formes d'hémoglobines présentent des spectres d'absorption différents dans le proche infrarouge (Figure 21) facilitant leur distinction selon le choix de la longueur d'onde émise (typiquement 770 et 850 nm ou 690 et 830 nm). Contrairement au signal BOLD qui reflète exclusivement la densité de HbR, la mesure conjointe des changements de concentration d'HbR et HbO<sub>2</sub> peut donner accès à la valeur du volume sanguin régional cérébral à partir de la somme d'HbR et HbO<sub>2</sub>, qui correspond à la concentration totale en hémoglobines (HbT), procurant des données physiologiquement pertinentes sur les corrélats métaboliques des activités cérébrales.

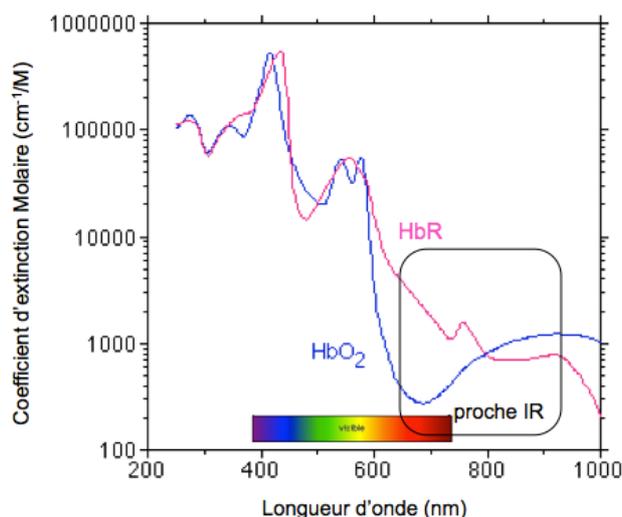


Figure 21. Spectre d'absorption de l'hémoglobine oxygénée (HbO<sub>2</sub>) et désoxygénée (HbR) en fonction de la longueur d'onde. Le carré noir indique le spectre proche de l'infrarouge (IR) utilisé pour le NIRS. Adapté de *Prahl, 1999*.

Le dispositif est composé d'une source d'émission de lumière proche infrarouge placée à la surface du crâne (alternant deux ondes monochromatiques) et d'un détecteur plus ou moins éloigné. La lumière proche infrarouge qui est capable de pénétrer sur une profondeur de quelques centimètres va être partiellement dispersée par les constituants du tissu et absorbée par les HbR et HbO<sub>2</sub>. La distance entre la source et le détecteur conditionne la profondeur de pénétration de la lumière échantillonnée. Plus le détecteur est éloigné de la source, plus la lumière recueillie aura traversé une grande distance dans le cortex, sondant ainsi des couches corticales plus profondes mais au détriment de la sensibilité et de la résolution spatiale (Figure 22). La profondeur est estimée approximativement à un tiers de la distance émetteur-détecteur (Patterson et al, 1995). Le changement de concentration en HbR et HbO<sub>2</sub> est mesuré par la différence entre les intensités de lumières émises et reçues (due à l'absorption et à la dispersion des photons). L'intensité de la lumière recueillie par les capteurs est directement proportionnelle au taux d'oxygénation du sang et permet ainsi de mesurer la réponse hémodynamique. Cette technique offre l'avantage d'avoir une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde, même si elle dépend toujours de la latence hémodynamique. En revanche, sa résolution spatiale est faible. Le NIRS peut être utilisé aussi bien chez l'animal que chez l'homme et elle est en outre facilement compatible avec l'EEG.

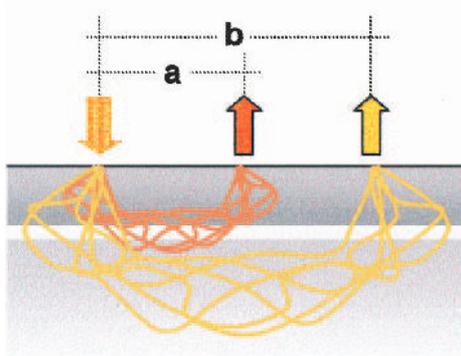


Figure 22. Schéma de la trajectoire de la lumière proche infrarouge à différentes distances de séparation émetteur-détecteur. Une distance émetteur-détecteur plus éloignée (b) permet d'échantillonner plus profondément qu'une distance émetteur-détecteur plus proche (a) mais au détriment du rapport signal sur bruit et de la résolution spatiale. D'après *Obrig et Villringer, 2003*.

## Le signal optique intrinsèque (Intrinsic Optical Signal, IOS)

L'imagerie des signaux optiques intrinsèques (IOS) a été développée dans les années 1980. Comme le NIRS, elle est basée sur les différences d'absorbance optique de l'hémoglobine selon l'état d'oxygénation, mais cette fois-ci, dans le spectre visible (Dunn et al, 2003) (figure 23).

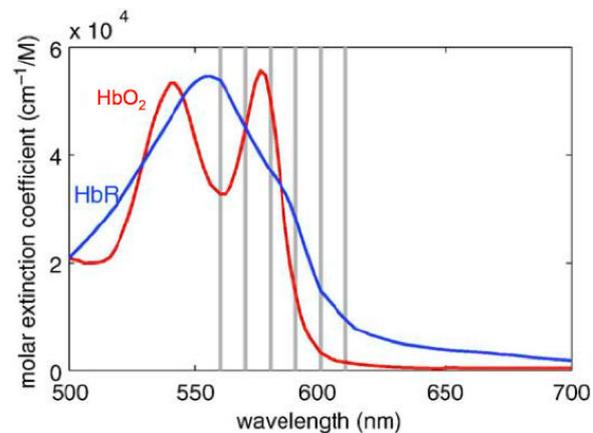


Figure 23. Spectre d'absorption de l'hémoglobine dans le visible selon son état d'oxygénation. D'après *Dunn et al, 2005*.

La mesure consiste à observer la surface du cerveau illuminée par une source de lumière blanche. La lumière réfléchie par les tissus est filtrée aux longueurs d'ondes d'intérêt et capturée par une caméra CCD, en formant des images (Figure 24). En comparant la réflectance des tissus mesurée à des longueurs d'ondes spécifiques, l'IOS permet de mesurer la concentration en HbR, la concentration en HbO<sub>2</sub> et la concentration totale en hémoglobine (HbT), elle-même liée au volume sanguin.

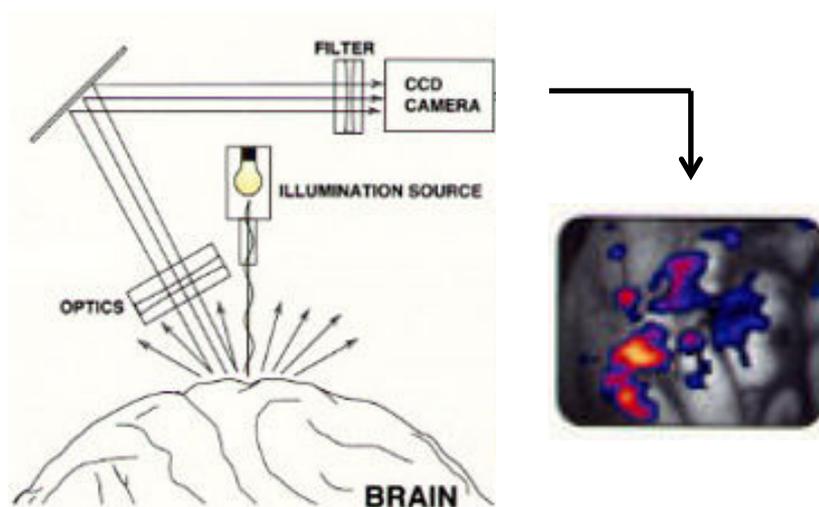


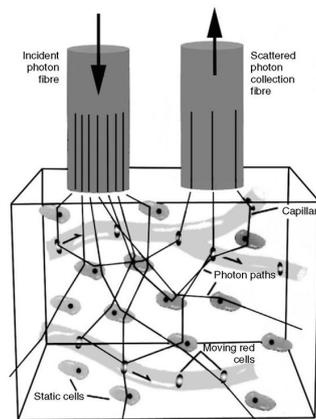
Figure 24. Principe de l'imagerie du signal optique intrinsèque (IOS). D'après *Pouratian et al, 2002*.

Contrairement au NIRS, où les photons diffractent à travers le tissu, en IOS les photons sont ici utilisés en régime balistique, ce qui permet de localiser leur provenance, et ainsi de former des images. Il n'est donc pas possible d'observer plus profondément que la profondeur à partir de laquelle la diffraction devient significative. L'IOS donne donc accès uniquement à l'imagerie de tissus

cérébraux de surface et impose d'enlever ou d'amincir le crâne pour laisser passer les photons. En revanche, cette technique optique allie de très bonnes résolutions spatiale (10  $\mu\text{m}$ ) et temporelle (10 ms) à une bonne sensibilité. Facilement compatible avec l'EEG, elle est généralement utilisée sur des animaux mais a aussi son utilité chez des patients en conditions peropératoires (Pouratian et al, 2002 ; Zhao et al, 2007 ; Ma et al, 2009).

### *Le Laser Doppler de flux*

Le laser Doppler de flux est une technique mesurant le CBF de la microcirculation en temps réel, avec typiquement une épaisseur du tissu échantillonné de 1 mm. Le principe de la technique repose sur la mesure de la vitesse des particules sanguines en utilisant l'effet Doppler à partir d'une source laser monochromatique, dont les longueurs d'ondes utilisées sont généralement de 633 nm (rouge) ou 780 nm (proche infrarouge). Une fibre optique, placée au dessus du cerveau, émet un faisceau laser monochromatique de faible puissance qui va illuminer le tissu. La lumière se retrouve dispersée par les structures du tissu statique et les globules rouges en mouvement (Figure 25). La plupart de la lumière est diffractée par le tissu immobile mais une petite partie de la lumière est diffractée par les globules rouges en mouvement. La lumière diffractée est analysée afin d'isoler ce signal. Il est possible de calculer la perfusion car l'amplitude et la distribution des fréquences de la lumière modifiée par l'effet Doppler sont directement liées au nombre et à la vitesse des cellules sanguines en mouvement, mais restent insensibles à leur sens de déplacement. Une procédure de calibration est indispensable pour estimer le flux sanguin.



**Figure 25. Principe du laser Doppler.**

Tout comme l'IOS, le laser Doppler nécessite un volet crânien (dû à l'épaisseur d'échantillonnage). En revanche, cette technique a une très bonne résolution temporelle, de quelques millisecondes, mais reste une technique très locale (1  $\text{mm}^3$ ) bien qu'elle ne soit pas aussi limitée que l'IOS en profondeur.

## L'imagerie bi-photonique

L'imagerie bi-photonique est une microscopie à fluorescence pouvant mesurer la dynamique des événements fonctionnels cellulaires et subcellulaires, comme les fluctuations calciques (neuronales et astrocytaires), ou la dynamique anatomique, comme la vasomotion des vaisseaux sanguins (dilatation et contraction). Le signal de fluorescence collecté en microscopie bi-photon et rendant compte de l'activité étudiée, provient de fluorophores appelés aussi "*sondes fluorescentes*" qui sont soit endogènes dans le cas d'utilisation d'animaux transgéniques, soit injectés directement dans la zone étudiée. De la même façon, en injectant un traceur fluorescent dans la circulation cérébrale (par exemple le FITC-Dextran), cet outil peut servir à mesurer les flux sanguins (Kleinfeld et al, 1998 ; Chaigneau et al, 2003 ; Nishimura et al, 2007 ; Shih et al, 2012).

Le principe d'un microscope bi-photonique est de ne générer de la fluorescence qu'au point de focalisation du faisceau d'excitation (Figure 26A). Contrairement à la microscopie confocale qui excite la molécule fluorescente par absorption d'un photon (par exemple à une longueur d'onde de 450 nm), le bi-photon repose sur l'excitation simultanée par deux photons, ayant chacun la moitié de l'énergie requise, correspondant au double de la longueur d'onde (par exemple 2 x 800 nm) (Figure 26B). Parce l'absorption par les molécules fluorescentes est proportionnelle à l'intensité au carré, la résolution de la tâche focale est inférieure avec une excitation à deux photons. En revanche, parce qu'il y a moins de diffusion tissulaire à une longueur d'onde dans le spectre proche-infrarouge que dans le spectre visible, cela permet l'acquisition d'images à de plus grandes profondeurs. De plus, comme la fluorescence varie comme le carré de la densité d'énergie du faisceau, l'émission parasite de fluorescence hors du point focal est réduite (Figure 26C). La pénétration dans les tissus (après craniotomie ou amincissement du crâne) peut alors atteindre jusqu'à plus de 600-800 microns, ce qui est meilleur que pour l'imagerie optique intrinsèque, bien que toujours insuffisant pour imager au-delà de la partie superficielle du cortex pour les études *in vivo*. Compatible avec l'EEG, cette technique présente une excellente résolution spatiale pouvant descendre jusqu'à moins de 1  $\mu\text{m}$ , réalisant ainsi de très belles images 3D de la microvascularisation.

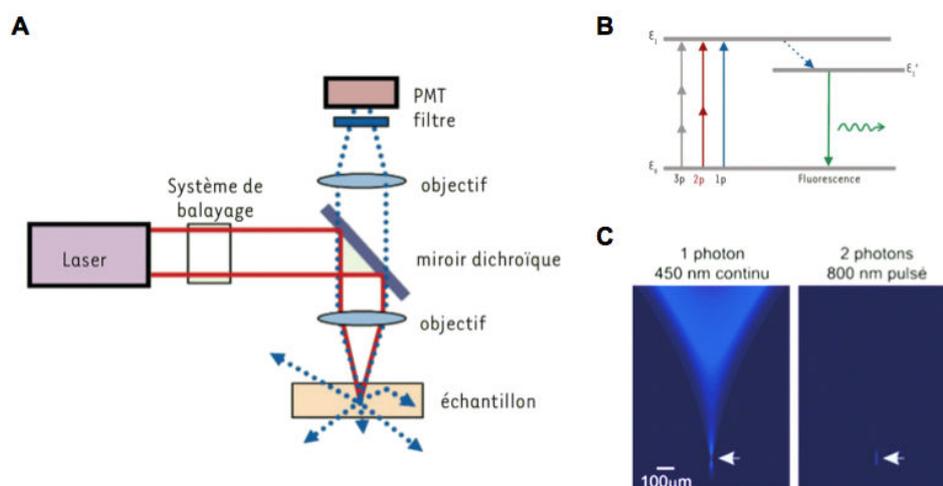


Figure 26. Principe de l'imagerie bi-photonique. (A) Schéma expérimental du montage typique d'un microscope bi-photonique. (B) Schéma des niveaux d'énergie d'une molécule fluorescente. La flèche bleu représente l'absorption d'un photon (1p), les flèches rouges représentent l'absorption à 2 photons (2p) et les grises représentent l'absorption à 3 photons (3p). La flèche pointillée représente le passage vers un niveau d'énergie intermédiaire avant l'émission spontanée d'un photon de fluorescence (flèche verte). (C) Comparaison du profil de l'intensité lumineuse obtenu à partir de l'émission de 1 photon et de 2 photons. D'après Dufour et al, 2006.

Comme le champ observé doit être scanné point par point par le laser, cela implique un compromis entre la vitesse d'échantillonnage et le volume exploré. Les flux sanguins sont observés vaisseau par vaisseau, où on peut distinguer le passage des hématies, avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde. L'excellente résolution spatio-temporelle permet de suivre la réactivité des vaisseaux sanguins (dilatation et constriction) suite aux stimulations neuronales *in vivo* ou *in vitro*. L'imagerie bi-photon est particulièrement adaptée pour comprendre le couplage neurovasculaire car elle permet de suivre simultanément les activités cellulaires et vasculaires fonctionnelles. En revanche, elle nécessite de réaliser un volet crânien et son application *in vivo* est compliquée en raison de la pulsativité du cerveau, rendant pour l'instant impossible son application en pratique clinique. Toutefois, l'application sur petit animal éveillé, tête fixée, est en pleine expansion.

L'ensemble de ces outils, dont les caractéristiques sont résumées dans le [Tableau 3](#), ont été largement utilisés en recherche, notamment pour étudier les épilepsies afin d'identifier les réseaux neuronaux impliqués au cours de l'ictogénèse et d'en déterminer les mécanismes de couplage neurovasculaire. Dans le cas des crises d'absences, les études ont surtout cherché à identifier "le foyer épileptique", par l'imagerie cérébrale pour pouvoir déterminer les facteurs déclencheurs de l'excitabilité des régions impliquées durant l'ictogénèse. De manière intéressante, et en parallèle avec des études sur les crises focales, les corrélats vasculaires et métaboliques liés aux crises d'absence ont montré des phénomènes surprenants, menant au questionnement d'un lien causal ou consécutif entre la modulation vasculaire et la survenue des crises épileptiques.

**Tableau 3. Tableau récapitulatif des caractéristiques des outils mesurant la perfusion et/ou l'oxymétrie**

	2-photon	IOS	Laser Doppler	NIRS	IRMf	TEP	SPECT
Paramètres mesurés	CBF Courants calciques	Oxygénation CBV	Oxygénation CBV	Oxygénation CBV	BOLD CBV	CBF Métabolisme du glucose	CBF
Profondeur	<1 mm	surface	1 mm	mm	tout le volume	tout le volume	tout le volume
Résolution spatiale	10 $\mu$ m	10 $\mu$ m	1 mm	mm - cm	$\leq$ mm	2,5 - 5 mm	3 - 6 mm
Résolution temporelle	ms	10 ms	ms	ms	s	min	min
Sensibilité	bonne	bonne	bonne	bonne	mauvais	bonne	bonne
Compatibilité électrophysiologie	bonne	bonne	bonne	bonne	moyen	bonne	bonne

BOLD : *Blood Oxygenation Level Dependent*, CBF : flux sanguin, CBV : volume sanguin

### **1.2.3. Mécanisme vasculaire : cause ou conséquence de l'épilepsie absence ?**

L'épilepsie est clairement une pathologie neuronale. Une crise épileptique est définie par la présence de décharges hypersynchrones détectées par EEG. Cependant, malgré leur excellente résolution temporelle, l'échantillonnage spatial parcellaire des outils électrophysiologiques est une véritable limite dans l'exploration des réseaux neuronaux impliqués. En outre, les mesures se concentrent sur une aire ou une population restreinte de neurones, ne permettant pas d'appréhender l'ensemble du cerveau. A ce titre, les techniques d'imagerie cérébrale sont de bons outils complémentaires pour étudier les crises épileptiques, avec comme approche de corréler les changements de réponses vasculaires et métaboliques aux activités neuronales. Elles permettent de cartographier et de définir plus précisément la localisation et l'étendue des structures cérébrales impliquées au cours des crises, validant ou révélant des régions cérébrales susceptibles d'être omises par les études électrophysiologiques.

#### **Réponses vasculaires et métaboliques : indicateur de l'activité neuronale**

Hypothétiquement, les fortes décharges neuronales associées aux épilepsies devraient provoquer des variations hémodynamiques. C'est typiquement ce qui est observé au cours des crises de types focales où le foyer ictal (et les régions adjacentes) sont accompagnés d'une augmentation métabolique et de débit sanguin locale (Kurian et al, 2006 ; Zhao et al, 2007, 2009 ; Ma et al, 2009, 2013). Ainsi les régions cérébrales présentant une augmentation de signal hémodynamique au cours des crises d'absences pourraient indiquer les réseaux neuronaux susceptibles d'être des foyers épileptiques.

#### *Cartographie des aires cérébrales associées aux crises d'absences*

La SPECT, qui mesure des variations de CBF, et la TEP, qui décèle des perturbations locales du métabolisme cérébral, sont très souvent utilisées dans les évaluations pré-chirurgicales sur des patients atteints d'épilepsie focale réfractaire mais peu utilisées chez les patients atteints d'épilepsie absence (Kurian et al, 2006). Parce que la TEP et la SPECT ont une résolution temporelle de plusieurs minutes et que les crises d'absences durent typiquement 5 à 45 s, l'image générée par ces deux techniques inclut généralement des phases ictales et interictales (hors crises). De ce fait, je ne présenterai que les études par EEG-IRMf.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, l'épilepsie absence est une pathologie neuronale caractérisée par des crises généralisées. Les études électrophysiologiques avaient révélé l'importance du cortex et du thalamus dans la survenue des décharges de pointes-ondes généralisées. L'utilisation de l'EEG-IRMf a permis de montrer des changements du signal BOLD ou de la perfusion sanguine

(CBV), appelés "*activation*" lors d'une augmentation de réponse et "*désactivation*" lors d'une diminution. Ces « activations » et « désactivations » sont associées aux crises d'absence dans certaines régions cérébrales aussi bien chez les patients que sur les modèles animaux.

Chez les patients, la plupart des études d'EEG-IRMf ont permis de mettre en évidence une activation du thalamus et une désactivation prédominante très étendue de la majeure partie du cortex, particulièrement des lobes pariétal et frontal, bien qu'une activation variable dans certaines zones corticales sans préférence régionale a pu être observée chez certains patients (Archer et al, 2003 ; Aghakhani et al, 2004 ; Labate et al, 2005 ; Gotman et al, 2005 ; Laufs et al, 2006 ; Moeller et al, 2008 ; Berman et al, 2010 ; Masterton et al, 2013) (Figure 27). Une réponse au niveau des ganglions de la base a également été observée, en concordance avec l'implication du striatum dans les crises d'absence dans les études électrophysiologiques (Danober et al, 1998 ; Deransart et al, 1998 ; Deransart et al, 2000 ; Slaght et al, 2004). En revanche, alors que des études observent plutôt une désactivation au niveau des ganglions de la base (Moeller et al, 2008 ; Berman et al, 2010), une autre étude montre une activation du striatum (Masterton et al, 2013). Une activation variable au niveau du cervelet a également été observée chez certains patients, bien que son implication dans les crises d'absence ne soit pas claire (Norden et Blumenfeld, 2002). Les variabilités de réponses, activation ou désactivation observées, surtout au niveau du cortex, entre les patients restent encore à éclaircir. Bien que la majorité des études a été réalisée sur des patients présentant plusieurs formes d'épilepsie absence typique et dont la majorité suivait déjà un traitement pouvant expliquer des variabilités de réponses au niveau cortical, une étude regroupant seulement des patients atteints d'épilepsie absence de l'enfance et n'ayant encore reçu aucune médication montre également des résultats similaires (Moeller et al, 2008), suggérant l'existence d'une variabilité inter-individuelle.

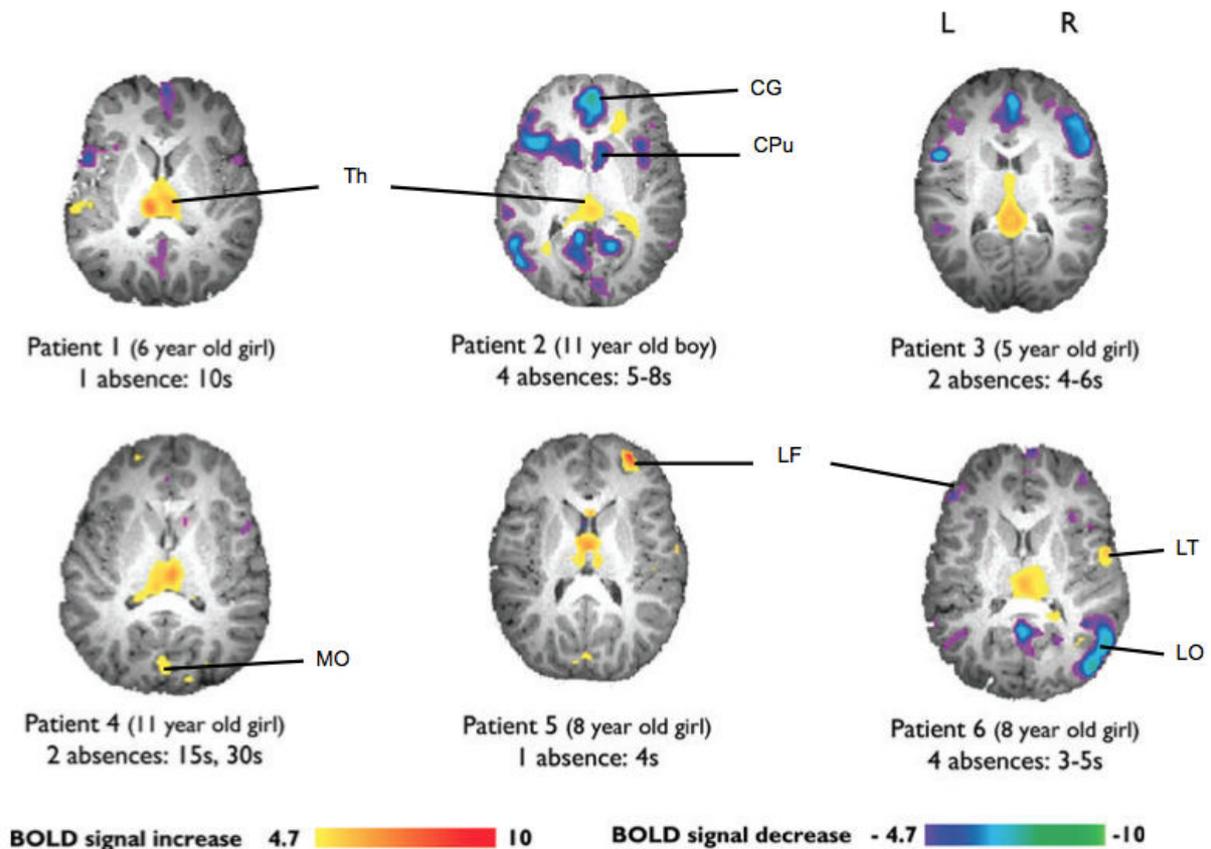


Figure 27. Cartographie d'IRMf de 6 patients atteints de CAE montrant des signaux BOLD positifs (jaune-rouge) et négatifs (violet-bleu) associés aux décharges de pointes-ondes généralisées. L : gauche, R : droit ; CPu : Caudate Putamen (striatum), CG : cortex cingulaire, LO : cortex occipital latéral, LF : cortex frontal latéral, LT : cortex temporal latéral, MO : cortex occipital médial, Th : thalamus. D'après *Moeller et al, 2008*.

Sur les modèles de rats, une augmentation métabolique (BOLD) au niveau du thalamus et du cortex somatosensoriel primaire a été révélée chez le Sprague-Dawley éveillé et restreint lors de crises généralisées induites après injection intra-péritonéale de  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) (Tenney et al, 2003), ainsi que chez le modèle de rat WAG/Rij éveillé et restreint (Tenney et al, 2004) ou sédaté sous fentanyl-halopéridol, un neuroleptanalgésique (Nersesyan et al, 2004 ; Mishra et al, 2011) (Figure 28). Ces résultats corroborent les études électrophysiologiques montrant l'implication du thalamus et du cortex somatosensoriel primaire, région correspondant au foyer cortical (Meeren et al, 2002). Chez le rat WAG/Rij sédaté, les décharges de pointes-ondes observées au niveau du striatum sont accompagnées d'une désactivation (Mishra et al, 2011), en accord avec des études d'EEG-IRMf réalisées chez les patients (Moeller et al, 2008 ; Berman et al, 2010). Pour tous ces animaux, les activations étaient généralement symétriques et bilatérales. En revanche, une variation concernant la désactivation a été observée notamment au niveau du cortex. A la fois une activation et une désactivation corticale ont été montrées chez le modèle de rat éveillé injecté au GBL (Tenney et al, 2003). Chez le WAG/Rij sous fentanyl-halopéridol, des désactivations ont pu être observées mais pas de manière régulières ou aussi éminentes que les activations (Nersesyan et al, 2004), alors qu'aucune région désactivée n'a été significativement constatée chez le WAG/Rij éveillé et restreint (Tenney et al, 2004).

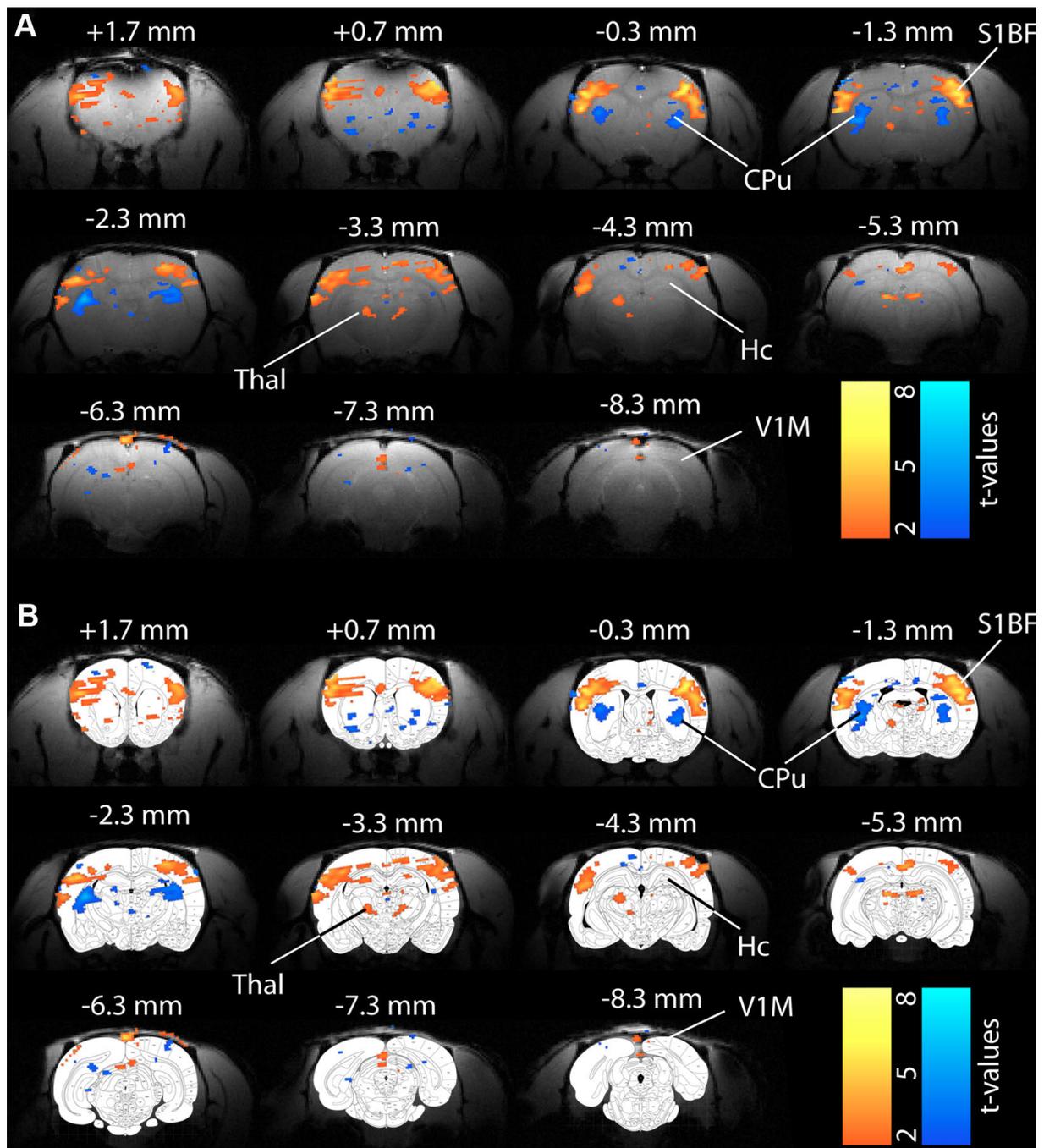


Figure 28. Cartographie montrant les variations des signaux BOLD associés aux décharges de pointes-ondes généralisées chez un rat WAG/Rij sans (A) et avec la superposition de l'Atlas (Paxinos et Watson, 1998) (B). CPU : Caudate Putamen, Hc : hippocampe, S1BF : cortex somatosensoriel primaire à tonneaux, Thal : thalamus, V1M : cortex visuel primaire. D'après *Mishra et al, 2011*.

Dans l'ensemble, les cartographies des aires cérébrales corrélées aux crises d'absence sont en accord avec les études électrophysiologiques, minimisant l'hypothèse d'une autre structure impliquée dans le maintien d'une crise d'absence à l'exception du cervelet, dont l'implication reste encore mal connue (Gotman et al, 2005 ; Norden et Blumenfeld, 2002 ; David et al, 2008). En revanche, la correspondance du signal BOLD entre les patients (majoritairement une désactivation avec parfois une activation corticale) et les modèles de rat (principalement une activation corticale) n'est pas établie, et soulève la question de la signification d'une augmentation ou diminution du signal BOLD.

## L'interprétation du BOLD

L'interprétation des signaux de l'IRMf requiert la connaissance de la relation entre les changements des réponses BOLD et de l'activité neuronale. Les réponses du débit sanguin sont fortement corrélées au potentiel de champ local qui reflète principalement les potentiels synaptiques des neurones (Attwell et al, 2010 ; Vanzetta et al, 2010). Il a été démontré que l'augmentation du signal BOLD est bien corrélée à l'augmentation des activités synaptiques évoquées, et donc de l'activité neuronale (Logothetis et al, 2001), et que l'amplitude des signaux BOLD dépend fortement à la fois des cellules pyramidales et des interneurons recrutés par le réseau, en raison des différentes molécules vasoactives qu'ils contiennent (Enager et al, 2009). En revanche, comme le signal BOLD dépend à la fois de l'oxygénation du sang et du flux sanguin qui présentent des évolutions temporelles différentes et parfois découplées, l'interprétation du signal BOLD positif comme une activité neuronale accrue, et négatif comme une diminution de l'activité, est à utiliser avec précaution (Blumenfeld, 2007 ; Vanzetta et Slovin, 2010 ; [Figure 29](#)).

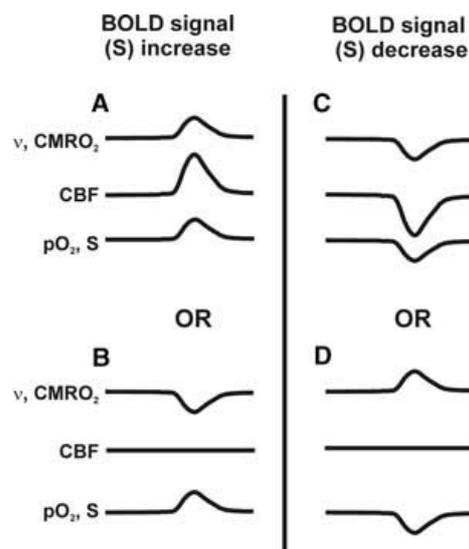


Figure 29. Exemple de représentation schématique de changements possibles de l'activation neuronale ( $v$ ), de la consommation d' $O_2$  ( $CMRO_2$ ), du débit sanguin ( $CBF$ ), et de l'oxygénation du tissu ( $pO_2$ ) menant à une augmentation ou une diminution du signal BOLD ( $S$ ). D'après Blumenfeld, 2007.

Par exemple, une augmentation du signal BOLD peut se produire de deux façons différentes : (1) une augmentation de l'activité neuronale et de  $CMRO_2$  accompagnée par une augmentation suffisante du CBF qui apporte de l'oxygène en excès de la demande métabolique, ce qui conduit à une augmentation de  $pO_2$  et du signal BOLD (Logothetis et al, 2001) ([Figure 29A](#)); (2) une décroissance de l'activité neuronale et de  $CMRO_2$ , sans changement de CBF de sorte qu'à nouveau l'apport d'oxygène excède la demande métabolique et donc augmente  $pO_2$  et le signal BOLD ([Figure 29B](#)). De façon symétrique, le signal BOLD peut augmenter avec peu ou pas de changement de l'activité neuronale si le CBF décroît anormalement (Martin et al, 2006).

De la même manière, la diminution du signal BOLD peut refléter soit une diminution soit une augmentation (soit même aucun changement) de l'activité neuronale, suivant la direction et l'amplitude de variation de CBF. Dans les conditions normales, on considère que les baisses de signal BOLD reflètent une baisse de l'activité neuronale accompagnée d'une baisse de CBF qui fait diminuer l'apport d'oxygène, la  $pO_2$  et le signal BOLD (Shmuel et al, 2002, 2006 ; Stefanovic et al, 2004 ; Devor et al, 2007a) (Figure 29C). Cependant, il a été récemment montré que pendant une intense activité associée à des crises épileptiques, il est aussi possible d'observer un signal BOLD qui décroît alors que l'activité neuronale et  $CMRO_2$  augmentent, pourvu que CBF ne change pas ou n'augmente pas suffisamment pour répondre aux demandes métaboliques, ce qui conduit à une baisse de  $pO_2$  (Schridde et al, 2008) (Figure 29D). De façon semblable, le signal BOLD peut décroître avec peu ou pas de changement d'activité neuronale si CBF est réduit de façon anormale, par exemple par un détournement vasculaire (Harel et al, 2002 ; Shmuel et al, 2002 ; Devor et al, 2005) ou un vasospasme (Shih et al, 2009 ; Mishra et al, 2011).

Toutefois, les crises d'épilepsie sont par définition des hypersynchronisations neuronales. Dans le cas des crises d'absence généralisées, même si des régions, notamment corticales, ne présentent pas de décharges de pointes-ondes, les régions qui montrent un signal BOLD positif devraient théoriquement correspondre aux régions les plus actives. En ce qui concerne le BOLD négatif, comme observé au niveau des régions corticales chez les patients, cela peut correspondre soit à une baisse de l'activité neuronale par rapport à l'activité neuronale basale ; soit à de l'activité neuronale, qui selon le recrutement des cellules pyramidales et interneurons provoquerait une vasoconstriction ou une faible vasodilatation masquée par la forte consommation en  $O_2$  ; soit à un effet de détournement du flux sanguin par les zones fortement vasodilatées au détriment de leur périphérie, dans une région non touchée par des décharges de pointes-ondes et n'ayant pas ou peu d'activité neuronale. Le signal BOLD positif semble donc avoir une interprétation plus fiable pour prédire les réseaux neuronaux impliqués dans l'épilepsie absence.

Dans le cas des études EEG-IRMf mesurant, non plus le BOLD mais les changements de CBV, on s'affranchit de l'ambiguïté entre les effets métaboliques et les effets vasculaires. Ainsi, les régions hyper-perfusées correspondent aux régions activées par les neurones, et les régions hypo-perfusées peuvent correspondre soit à une baisse d'activité neuronale, soit à une vasoconstriction accompagnée d'activité neuronale, soit à un vascular-steal sans ou avec peu d'activité neuronale. En mesurant les changements de CBV à travers l'EEG-IRMf chez le modèle de rat GAERS sédaté sous fentanyl-halopéridol, l'équipe de Depaulis a montré une activation dans les régions du cortex somatosensoriel primaire à tonneaux et du thalamus, en accord avec les études électrophysiologiques. Une activation a également été observée dans le cortex rétrospinal, dans la *substantia nigra* (substance noire) *pars reticulata*, au niveau du pons, dans le cervelet et dans le bulbe rachidien (medulla oblongata). Une désactivation a été observée dans les régions du cortex somatosensoriel primaire des pattes, du cortex somatosensoriel sensoriel, du cortex visuel, du cortex moteur et du striatum (David et al, 2008) (Figure 30). Les études électrophysiologiques ont montré des décharges de pointes-ondes dans les régions du striatum, du cortex somatosensoriel et moteur, signifiant plutôt une hypo-perfusion due à une baisse d'activité neuronale par rapport à une activité basale ou à une vasoconstriction. L'hyper-perfusion du thalamus et du cortex somatosensoriel primaire à tonneaux et

l'hypo-perfusion du striatum ont également été observées chez le modèle rat WAG/Rij (Mishra et al, 2011), confirmant les observations des signaux BOLD sur les modèles d'animaux.

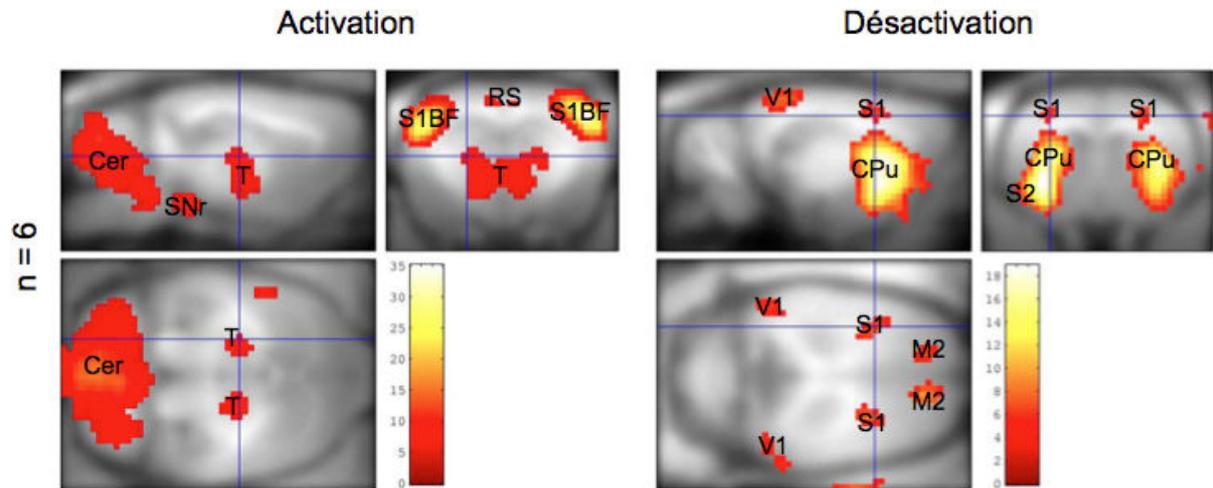


Figure 30. Cartographie montrant les changements de CBV associés aux décharges de pointes-ondes moyennés sur 6 rats GAERS. Cer : cervelet, CPU : striatum, M2 : cortex moteur secondaire, RS : cortex rétrospécial, S1 : cortex somatosensoriel primaire, S1BF : cortex somatosensoriel primaire à tonneaux, SNr : substantia nigra pars reticulata, T : thalamus, V1 : cortex visuel. D'après David et al, 2008.

La différence des signaux BOLD (activation et désactivation) corticale observée entre les patients et les modèles animaux reste cependant encore non élucidée.

### *Recherche de l'initiation des crises à partir des réponses vasculaires et métaboliques*

Bien que l'IRMf ne puisse pas suivre le déroulement temporel d'un événement en temps réel à cause de son manque de sensibilité, cela n'a pas empêché des équipes de vouloir déterminer, à partir de cette technique, l'origine de l'initiation des crises d'absence à travers des analyses du signal plus poussées.

Les études électrophysiologiques sur les rats WAG/Rij ont montré une initiation des crises d'absence dans la région périorale du cortex somatosensoriel, menant les autres régions du cortex et le complexe ventrobasal du thalamus dans les premières 500 ms (Meeren et al, 2002). Afin d'identifier la/les régions qui mènent les crises d'absence à travers l'EEG-IRMf, l'équipe de Depaulis (David et al, 2008) a estimé la connectivité fonctionnelle de plusieurs régions d'intérêts en utilisant la causalité de Granger sur les données d'IRMf de haute résolution spatiale sur le modèle de rats GAERS. En se focalisant sur 3 régions identifiées, le cortex somatosensoriel primaire (S1BF), le thalamus et le striatum, basées sur de forts changements de CBV associés aux décharges de pointes-ondes, ils montrent à travers une méthode de déconvolution hémodynamique que la région S1BF mène le striatum et le thalamus, ce qui est en accord avec les études électrophysiologiques et la théorie du foyer cortical.

De la même manière, les activations corticales spécifiquement observées chez les patients apparaissent plus précocement que l'activation thalamique (Moeller et al, 2010). Ce résultat est confirmé par une autre étude réalisée par l'équipe de Blumenfeld (Bai et al, 2010) qui montre également une activation corticale précoce comparée à l'activation thalamique. En revanche, contrairement aux précédentes études par EEG-IRMf, les auteurs n'ont pas employé le modèle de fonction de réponse hémodynamique (HRF) standard, qui possède plusieurs a priori sur les données. A la place, ils créent une carte montrant le changement de pourcentage moyenné sur le signal d'IRMf sur une base voxel par voxel à travers le cerveau à différents temps des décharges de pointes-ondes. Ils montrent ainsi, par cette analyse du signal, des activations corticales liées aux crises, sous forme de clusters locaux majoritairement localisés dans le cortex frontal orbital/médial et le cortex pariétal médial/latéral, qui apparaissent au moins 5 s avant le début des décharges de pointes-ondes (Bai et al, 2010) (Figure 31).

Cette étude, révélant l'existence d'un précurseur des activités de décharges de pointes-ondes à partir d'enregistrement d'IRMf, confirme une autre étude qui montre des changements de réponses BOLD observés 6 s avant le début des crises, chez des enfants ayant des décharges de pointes-ondes généralisées (Moeller et al, 2008b). Ces résultats supportent l'idée que les décharges de pointes-ondes ne sont pas soudaines et imprévisibles, mais également que le système métabolique et vasculaire pourrait être impliqué dans l'initiation et même utilisé pour la prédiction des crises épileptiques. Cela soutient l'importance de pouvoir étudier les réponses hémodynamiques au cours des crises d'absence.

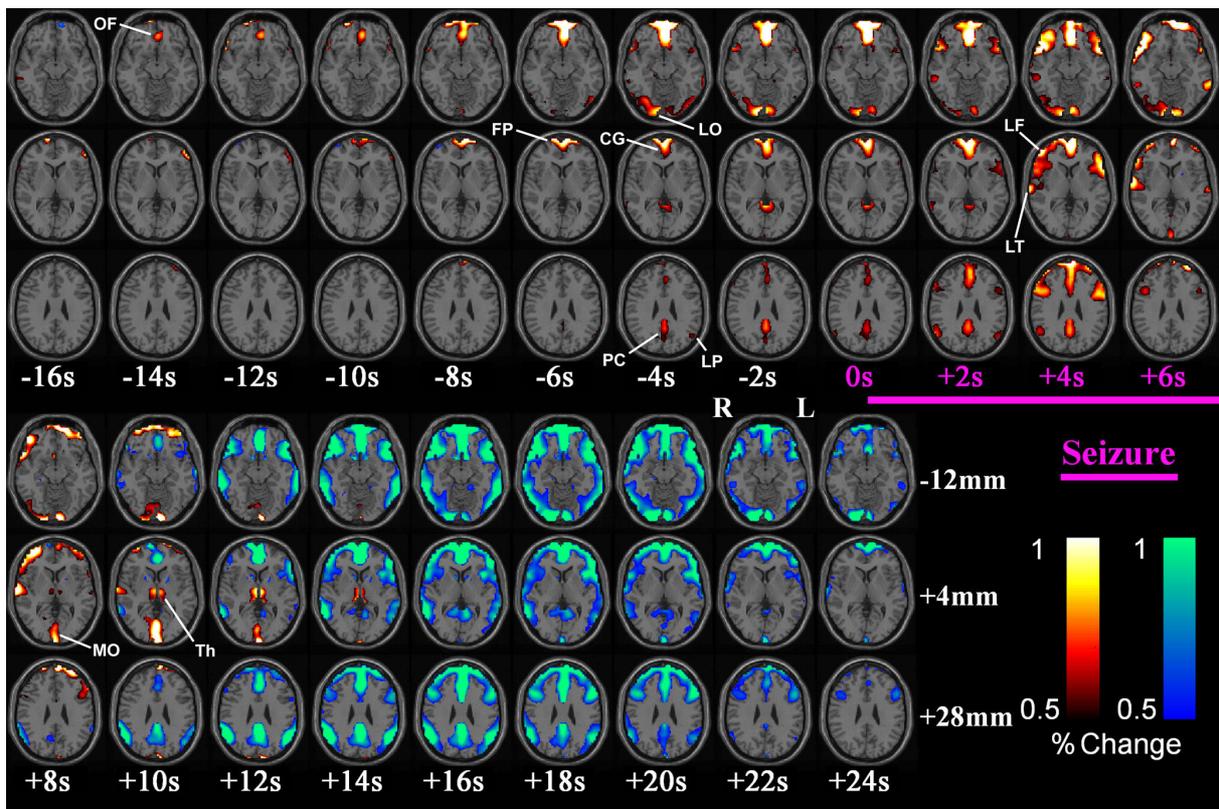


Figure 31. Cartographies montrant les pourcentages de changements BOLD associés aux décharges de pointes-ondes au cours de temps, observées sur une analyse groupée de 8 patients atteints d'épilepsie absence de l'enfance. OF : frontal orbital médial, FP : frontal polaire, CG : cingulaire, LP : pariétal latéral, PC : précuneus, LO : occipital latéral, LF : frontal latéral, LT : temporal latéral, MO : occipital médial, Th : thalamus. D'après Bai et al, 2010.

## **Réponses vasculaires et métaboliques : prédiction dans la survenue des crises épileptiques**

La révélation par l'IRMf d'une anticipation des réponses BOLD à l'apparition des crises d'absence (Moeller et al, 2008b ; Bai et al, 2010) apporte la notion de phase pré-ictale, qui avait déjà été démontrée chez des patients atteints d'épilepsie de type focal à partir d'enregistrements EEG intracrânien et de surface (Le Van Quyen et al, 2000, 2001 ; Navarro et al, 2002). Des études, qui se concentrent sur les réponses hémodynamiques au cours des crises épileptiques dans le but de mieux comprendre le couplage neurovasculaire au cours des décharges épileptiformes et que je présente ci-dessous, soutiennent l'existence d'une phase pré-ictale métabolique et vasculaire.

### *Réponses hémodynamiques au cours des crises d'absence*

En utilisant la technique du laser Doppler, qui mesure les variations de CBF dans une épaisseur de tissu d'environ 1 mm, l'équipe de Marescaux montre une baisse du CBF cortical chez le rat GAERS (Nehlig et al, 1996), alors que l'équipe de Blumenfeld montre une augmentation de CBF chez le rat WAG/Rij (Nersesyan et al, 2004b) au cours des décharges de pointes-ondes (Figure 32). Ces deux résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la localisation de la mesure, comme le montre les cartographies à l'IRM sur les modèles de rat. L'équipe de Blumenfeld s'est focalisée sur la région du cortex somatosensoriel primaire, où se situe le foyer cortical (Meeren et al, 2002) et dont les mesures à l'IRMf montrent une activation chez le modèle de rat WAG/Rij (Nersesyan et al, 2004a ; Tenney et al, 2004). De son côté, l'équipe de Marescaux, considérant probablement les crises comme complètement généralisées, ne précise pas la région corticale enregistrée. Les résultats d'IRMf suggèrent qu'ils ont pu enregistrer des régions pouvant être activées et désactivées chez le modèle de rat GAERS (David et al, 2008).

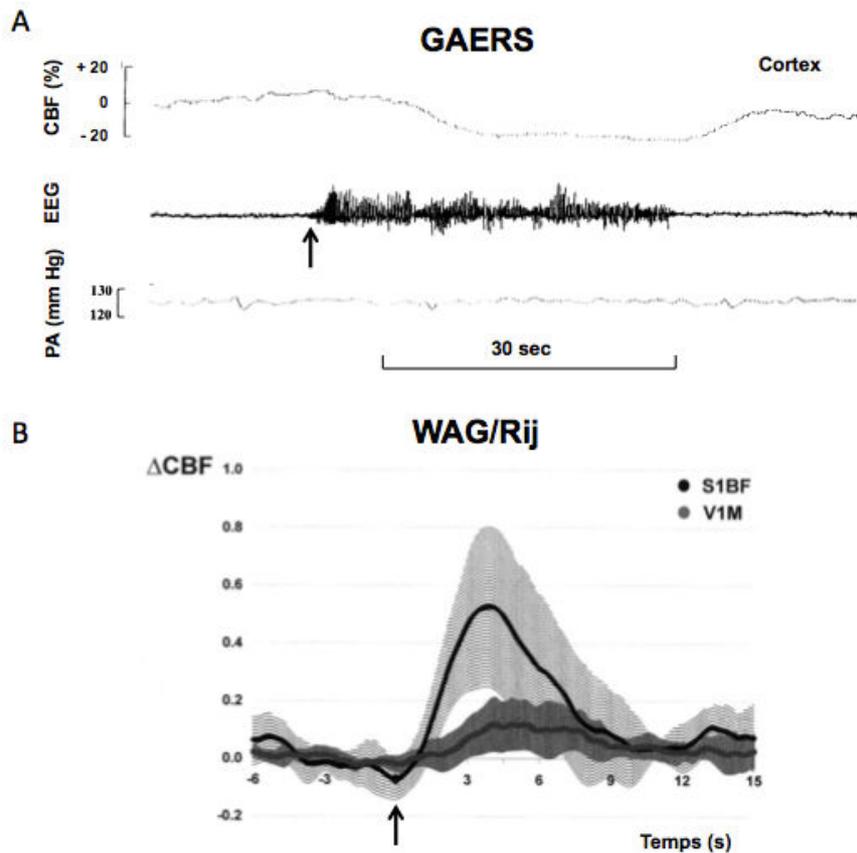


Figure 32. (A) Variations de débit sanguin cérébrale (CBF) mesurées dans le cortex au cours d'une crise d'absence chez le modèle de rat GAERS, d'après *Nehlig et al, 1996*. (B) Variations de débit sanguin moyennées sur plusieurs crises d'absence d'une durée moyenne de  $5.12 \pm 1.63$  s chez le modèle de rat WAG/Rij (moyenne  $\pm$  SD), d'après *Nersesyan et al, 2004b*. Flèche : début des crises. S1BF : cortex somatosensoriel primaire à tonneaux ; V1M : cortex visuel primaire ; PA : pression artérielle.

Ces études ne semblent pas révéler de changements de réponses hémodynamiques dans les secondes précédant les crises. En revanche, en utilisant la technique de l'EEG-NIRS, qui mesure les concentrations d'hémoglobine oxygénée [HbO<sub>2</sub>], désoxygénée [HHb] et totale [HbT], une étude a montré une augmentation de [HHb], accompagnée d'une baisse de [HbO<sub>2</sub>] et [HbT] (soit une vasoconstriction), dans les 15 s précédant le début des décharges de pointes-ondes suivie d'une baisse de [HHb] et d'une augmentation de [HbO<sub>2</sub>] et [HbT] (soit une vasodilatation) au commencement de la crise, chez le modèle de rat GAERS (Roche-Labarbe et al, 2010) (Figure 33). Contrairement aux études réalisées par Doppler laser, la distance entre l'émetteur et le détecteur était de 5 mm avec une profondeur de mesure du NIRS d'environ 1.7 mm à travers le cerveau, leur permettant de visualiser principalement les cortex moteur, somatosensoriel et visuel, suggérant une spécificité due aux régions corticales mesurées. Les résultats obtenus avec l'EEG-NIRS confirment la présence d'une phase pré-ictale observée en utilisant la même technique chez les enfants (Roche-Labarbe et al, 2008). En parallèle, une diminution de la respiration a été observée chez le rat GAERS, environ 7 s avant la crise jusqu'à atteindre un pic 2 s après le commencement de la crise (Roche-Labarbe et al, 2010). Aucun changement de pression artérielle n'a été observé (Nehlig et al, 1996 ; Nersesyan et al, 2004).

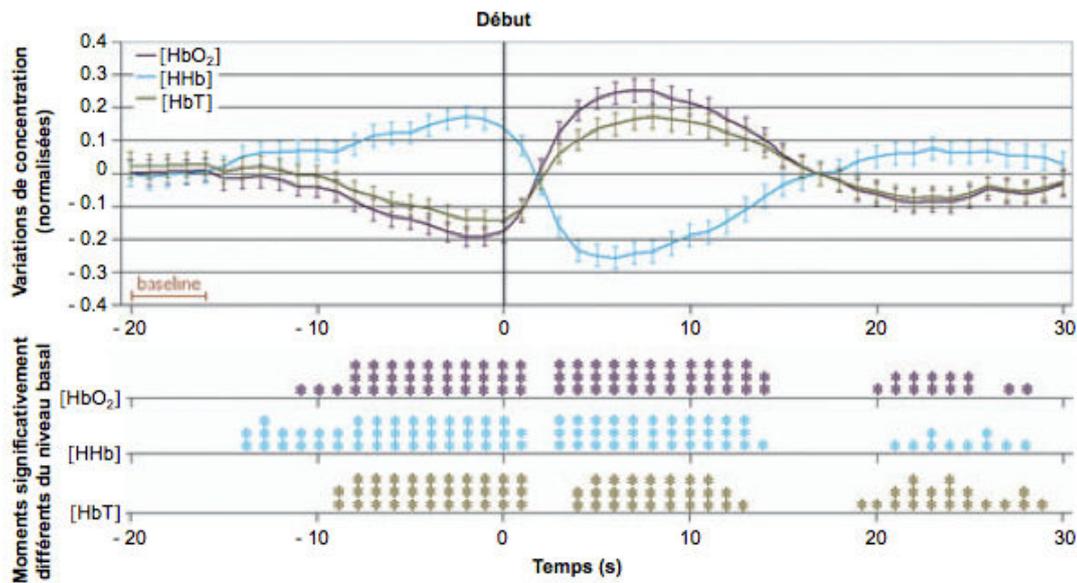


Figure 33. Variation des concentrations d'hémoglobines oxygénées [HbO<sub>2</sub>], désoxygénées [HHb] et totales [HbT] au début des crises moyennées sur plusieurs animaux (en haut). Le graphe du dessous montre la significativité des variations moyennées à différents temps. D'après Roche-Labarbe et al, 2010.

Enfin, ces résultats révélant une phase pré-ictale métabolique et vasculaire corroborent une étude réalisée sur le modèle de rat épileptique induit par la pénicilline. En utilisant la technique d'IOS, l'équipe de Toga (Chen et al, 2000) a montré que la survenue d'une crise généralisée, après une injection corticale ipsilatérale de pénicilline, est souvent précédée d'un changement de signal IOS au niveau du cortex controlatéral (Figure 34).

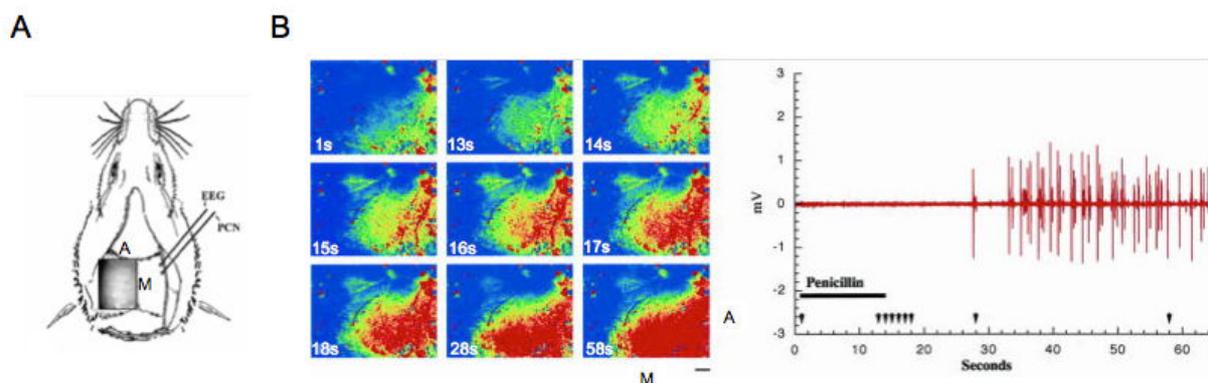


Figure 34. Le changement de signal IOS précède les décharges EEG généralisées après injection corticale de pénicilline. (A) Schéma expérimental. (B) Variation de l'intensité du signal IOS observée à différents temps après induction de pénicilline (à gauche) par rapport au tracé EEG (à droite). L'intensité du signal optique est affichée dans les couleurs chaudes. A : antérieur, M : milieu, PCN : pénicilline. Echelle : 1 mm. D'après Chen et al, 2000.

### Réponses hémodynamiques au cours des crises focales

Il est remarquable que l'anticipation des réponses métaboliques et vasculaires a été démontrée dans plusieurs études sur les épilepsies de crises focales. Ce phénomène, qui peut être observé juste

avant les décharges interictales (Hawco et al, 2007 ; Jacobs et al, 2009 ; Osharina et al, 2010) et juste avant les décharges ictales (Zhao et al, 2007 ; Zhao et al, 2011 ; Slone et al, 2012), a été observé chez des patients et sur des modèles animaux par le biais de différentes techniques mesurant la perfusion sanguine ou l'oxymétrie. L'équipe de Schwartz (Zhao et al, 2011) a ainsi montré que, chez le modèle de rat ayant des crises focales induites par une injection focale corticale de 4-AP, les événements ictaux sont précédés, dans les 5 secondes avant le commencement d'une crise, d'une vasoconstriction des vaisseaux sanguins autour du foyer ictal, avec une vasoconstriction maximale à environ 2 mm de distance du foyer (Figure 35). Dans le foyer, la vasodilatation survient seulement environ 0,5 seconde après le commencement de la crise. Cette étude montre qu'il existe un événement précoce autour du centre de la décharge ictale. A l'inverse, pendant les processus corticaux physiologiques, c'est après une brève période de vasodilatation que la vasoconstriction survient autour de la région stimulée (*surround*) (Devor et al, 2007). Cela suggère que dans ce modèle de crise focale, la vasoconstriction pré-ictale ferait shunter l'oxygénation du sang vers le foyer, ce qui faciliterait ou causerait directement le commencement d'une crise épileptique (Zhao et al, 2011). Ces résultats montrent l'importance des régions adjacentes au foyer ictal, et la distance spécifique pour visualiser la vasoconstriction peut expliquer pourquoi les mesures effectuées avec le NIRS révèlent une phase pré-ictale contrairement au laser Doppler. Ce genre de phénomène reste à vérifier pour les crises d'absence. Est-il possible de localiser précisément la vasoconstriction précoce observée avec le NIRS ? Ce type d'observation nécessite de pouvoir suivre les réponses hémodynamiques sur un large champ d'observation avec une bonne résolution spatiale pour pouvoir aborder et localiser au mieux les régions d'intérêt.

Nous avons vu que de multiples travaux soutiennent l'existence d'une phase pré-ictale corticale d'origine métabolique et vasculaire dans plusieurs types d'épilepsie et pointent l'importance d'étudier à la fois l'activité neuronale et l'activité vasculaire et métabolique dans la compréhension de la survenue des crises épileptiques. Il est également important de rappeler que les techniques mesurant les réponses hémodynamiques se concentrent principalement sur les régions corticales car ces techniques ont une faible pénétration en profondeur, ce qui empêche l'accessibilité au thalamus dans les études *in vivo* chez les patients ou sur les modèles animaux. La question de savoir comment varient les réponses hémodynamiques au cours d'une crise d'absence dans le thalamus et si les changements de réponses hémodynamiques débutent dans cette région ou dans le cortex sont encore sans réponses.

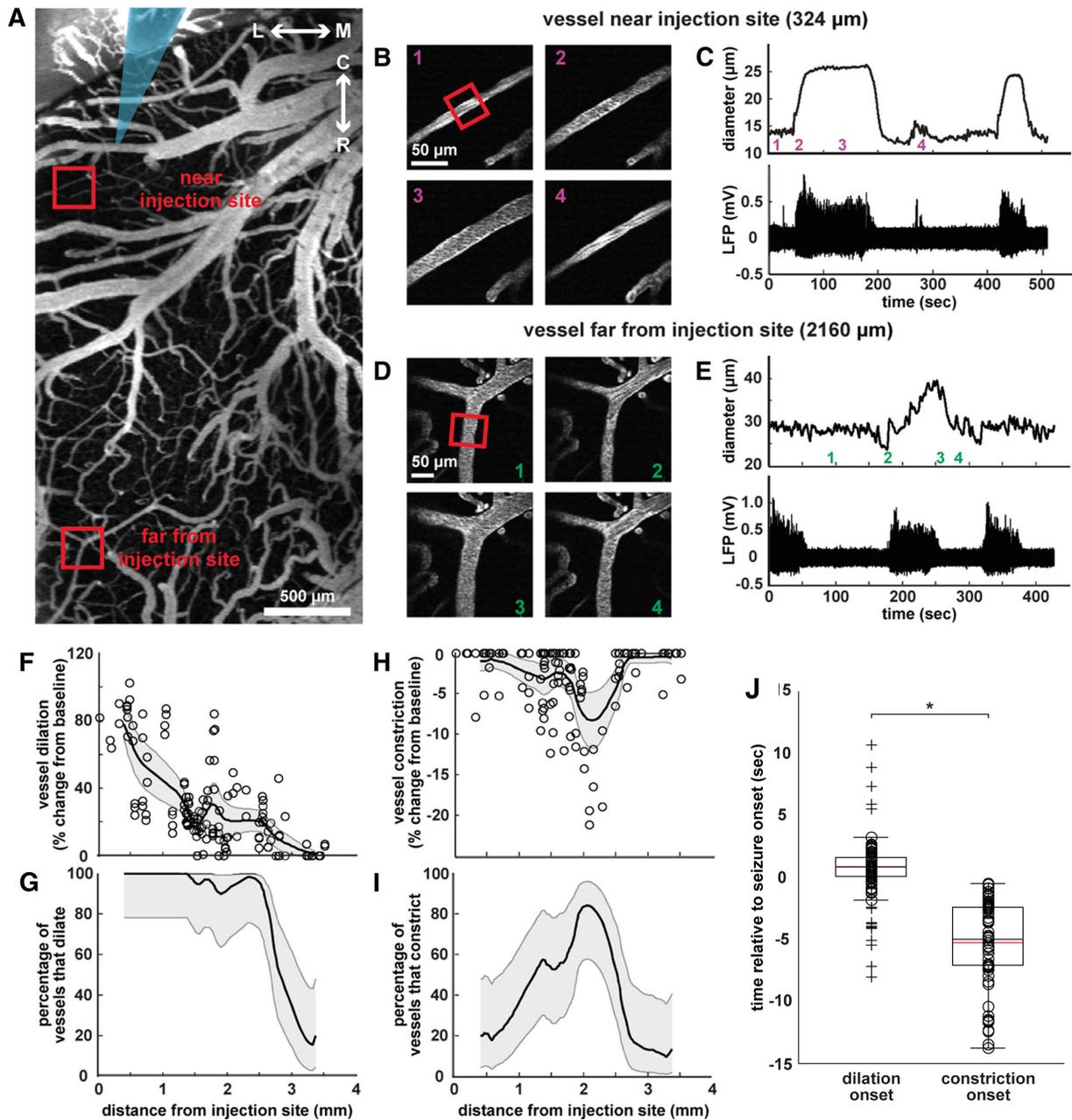


Figure 35. Les crises focales induites par une injection corticale locale de 4-AP provoquent des variations vasculaires spatialement dépendantes. (A) Image au bi-photon montrant les structures vasculaires à la surface du cerveau (pointe bleu : emplacement de l'électrode ; carrés rouges : régions proche et éloigné du site d'injection agrandis en (B) et (E)). L ↔ M : axe latéral - médial ; C ↔ R : axe caudal - rostral. (B) Exemple de la vasodilatation d'une artériole proche du site d'injection concomitante aux crises. (C) Graphe montrant les variations de diamètre du vaisseau (en haut) correspondant au carré rouge en (B), au cours des événements ictales et non ictales (en bas). Les chiffres correspondent aux différents instants présentés en (B). (D) Exemple d'une vasoconstriction transitoire d'une artériole éloignée de plus de 2 mm du site d'injection au commencement d'une crise. (E) Graphe montrant les variations de diamètre du vaisseau (en haut) correspondant au carré rouge en (D), au cours des événements ictales et non ictales (en bas). Les chiffres correspondent aux différents instants présentés en (D). (F et H) Pourcentage de la dilatation des vaisseaux (F) et de la constriction des vaisseaux (H) par rapport au niveau basal en fonction de la distance du site d'injection. (G et I) Pourcentage de vaisseaux qui se dilatent (G) et qui se contractent (I) en fonction de la distance du site d'injection. A noter que plus les vaisseaux sont proches du site d'injection, plus ils se dilatent. Les vaisseaux localisés aux alentours de 2 mm du site d'injection sont les vaisseaux susceptibles de vasoconstricter. (J) Graphe montrant que les artérioles aux alentours du foyer vasoconstricteur environ 5 s avant le début des crises alors que la dilatation des vaisseaux dans le foyer survient 0.5 s après. D'après *Zhao et al, 2011*.

Les travaux présentés jusque ici ont abordé les questions concernant la genèse des crises épileptiques. Toutefois, il est important de noter que l'implication précoce du système vasculaire ne semble pas se restreindre uniquement à l'ictogénèse. Les études sur l'épileptogénèse menées sur les modèles d'épilepsie de crises focales ont montré que le système vasculaire aurait également une part importante dans la mise en place de l'épilepsie. Ces études, que je considère utile de mentionner, sont d'un grand intérêt car elles permettent de révéler des acteurs susceptibles d'être des promoteurs de l'émergence des crises épileptiques, qui pourraient tout aussi bien intervenir dans l'épilepsie absence.

## **L'implication du système vasculaire dans l'épileptogénèse**

Sur la base du couplage neuro-vasculaire, un dysfonctionnement vasculaire peut avoir une implication dans la genèse de l'épilepsie. Certaines malformations artério-veineuses cérébrales, présentant un lien anormal entre artères et veines, sont par exemple associées à l'émergence d'épilepsies (Turjman et al, 1995). La contribution vasculaire dans l'épileptogénèse a été abondamment étudiée à travers des modèles d'épilepsie de crises focales induites par lésions cérébrales, notamment dans le but, à travers la compréhension des mécanismes, de déterminer l'existence d'acteurs potentiels afin de trouver de nouveaux traitements.

### *Perméabilité vasculaire : déclenchement d'une cascade d'événements menant à l'épileptogénèse*

Dans le cas des épilepsies associées à des lésions cérébrales, comme l'épilepsie du lobe temporal (ELT), une perméabilité de la barrière hémato encéphalique (BHE - *Blood-Brain Barrier*, BBB) a pu être observée chez les patients et sur des modèles animaux (Friedman et al, 2009 ; Noebels et al., 2012 ; Janigro, 2012). Cette rupture de la BBB qui survient rapidement après l'induction d'un Status Epilepticus (SE), serait positivement corrélée à la fréquence des crises chez les rats présentant des crises épileptiques chroniques, suggérant que la rupture de la BBB contribue à la progression de la maladie (van Vliet et al, 2007). Cette ouverture de la BBB est accompagnée d'une angiogenèse, avec la densité vasculaire qui ne dépendrait pas des pertes neuronales (Ndode-Ekane et al, 2010) mais qui serait également corrélée positivement à la fréquence des crises épileptiques (Rigau et al, 2007). Il a été notamment démontré que l'induction d'une perméabilité de la BBB était suffisante pour induire un foyer épileptique dans le cortex somatosensoriel, avec une apparition retardée d'activités épileptiformes hypersynchrones (Seiffert et al, 2004).

La BBB a une fonction importante dans le maintien de l'homéostasie du cerveau en protégeant le tissu cérébral des substances circulant dans les vaisseaux sanguins, potentiellement toxiques, et en ne laissant passer que des molécules indispensables aux besoins du cerveau. Or, cette rupture de la BBB libère (1) des ions, comme le potassium, (2) des protéines, comme l'albumine sérique, (3) des neurotransmetteurs (adénosine, glutamate, et ATP) et (4) des produits métaboliques (adénosine, glucose, H<sup>+</sup>, CO<sub>2</sub>), qui peuvent contribuer au remodelage du tissu cérébral environnant en le rendant épileptique (Janigro, 2012). En l'occurrence, la libération des protéines issues des sérums, comme les

albumines sériques (ou sérum albumine) (Seiffert et al, 2004 ; Raab et al, 2012), dans le tissu cérébral, agit sur les astrocytes en provoquant des oscillations du calcium cytosolique, en augmentant la synthèse d'ADN (Nadal et al, 1995 ; Vega-Zelaya et al, 2014) et en engendrant une diminution du tamponnage potassique extracellulaire via une altération des propriétés des canaux potassiques (Ivens et al, 2007), contribuant ainsi à l'épileptogenèse (Friedman et al, 2009 ; Noebels et al., 2012).

La prolifération et l'altération morphologique des astrocytes, comprenant une augmentation de la régulation de la GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) et l'hypertrophie des corps cellulaires et des pieds astrocytaires appelée *gliose réactive*, sont des marqueurs pathologiques de nombreux patients atteints d'ELT (Das et al, 2012). Cette transformation astrocytaire interviendrait quelques heures seulement après le SE (Friedman et al, 2009). On dénote également la présence de chevauchements des pieds astrocytaires avec perte de domaines chez le modèle ELT de souris après mise en place de l'épilepsie (Oberheim et al, 2008). Ces astrocytes activés, ainsi que l'activation de la microglie, sont les sources majeures des molécules inflammatoires qui contribuent à l'épileptogenèse, en particulier l'interleukine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  (Vezzani et al, 2013). De même, la libération des leucocytes dans le parenchyme (Zattoni et al, 2011) ou l'adhésion anormale des leucocytes aux cellules endothéliales vasculaires (Fabene et al, 2008) observées après le SE, s'accompagnent d'activation des réponses inflammatoires (Marchi et Lerner-Natoli, 2013 ; Zattoni et al, 2011 ; Janigro, 2012).

Par ailleurs, le gonflement des astrocytes provoque un rétrécissement de l'espace extracellulaire, reflété par une diminution de la fraction volumique et une augmentation de la tortuosité (Sherpa et al, 2014), menant ainsi à l'accumulation de molécules (ions, neurotransmetteurs, nutriments) dans l'espace extracellulaire (Sykova et Nicholson, 2008). L'augmentation de concentration extracellulaire de diverses molécules, telles que le potassium extracellulaire (McBain et al, 1990) connu pour engendrer des activités épileptiformes (McNamara, 1994), pourrait également contribuer à l'émergence d'activités épileptiques (Janigro, 2012).

D'autre part, une privation d'énergie provoque la modification du gradient ionique membranaire des neurones, déclenchant leur dépolarisation. Les neurones se mettent alors à décharger massivement avant d'entrer éventuellement dans une période réfractaire.

Ces résultats montrent que des altérations vasculaires peuvent mener vers une épileptogenèse à travers une cascade d'événements, et suggère un rôle des astrocytes dans la mise en place de l'épilepsie. Si les astrocytes tiennent une place particulière dans le maintien des réseaux et dans la régulation des flux sanguins en étant un intermédiaire essentiel entre les neurones et la microcirculation, ils interagissent également directement avec les neurones, en modulant leur excitabilité et la transmission synaptique (Parri et al, 2001 ; Perea et Araque, 2002 ; Haydon et Carmignoto, 2006 ; Theodosis et al, 2008 ; Christoph M Michel, 2009 ; Buxton, 2009 ; Ortinski et al, 2010 ; Takata et al, 2011). Une étude *in vitro*, sur des tranches de cerveau, a ainsi montré que l'activation des astrocytes, reflétée par l'élévation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, ne se produisait pas durant les décharges interictales mais seulement lors des décharges ictales (Gómez-Gonzalo et al, 2010), confirmant une autre étude montrant que l'activation des astrocytes n'est pas corrélée aux activités épileptiformes isolées (Tashiro et al, 2002). Une boucle d'excitation réciproque entre les neurones et les astrocytes contribuerait à l'initiation des crises focales (Gómez-Gonzalo et al, 2010) et provoquerait, par le biais des astrocytes, une réponse des artéριοles cérébrales (Gómez-Gonzalo et al, 2011). Ces

résultats suggèrent que les astrocytes pourraient être impliqués dans la synchronisation de larges populations de neurones et contribuer à l'émergence des crises épileptiques.

### *Les astrocytes : un acteur potentiel dans l'émergence des crises d'absence*

La compréhension de l'épileptogenèse est primordiale à l'identification des acteurs essentiels à la mise en place de la pathologie pour permettre de meilleurs traitements. Alors que dans le cas des épilepsies absence il n'y a pas de perméabilité évidente au niveau vasculaire, les études sur l'ELT mettent néanmoins en lumière une contribution des astrocytes.

Chez les rats WAG/Rij, une étude sur le néocortex a ainsi montré que, malgré aucune anomalie structurelle apparente du cerveau, il existe une baisse de la densité des cellules gliales, accompagnée d'une faible interaction glie-neurone, limitée aux couches profondes du cortex cingulaire et somatosensoriel (Sitnikova et al, 2011), région où se situe le foyer cortical (Meeren et al, 2002 ; Polack et al, 2007). Chez les rats GAERS, la présence d'astrocytes réactifs, mise en évidence par une augmentation d'expression de GFAP, est accompagnée d'une altération du catabolisme du glutamate dans le cortex et le thalamus chez les rats adultes et chez les jeunes, bien avant la mise en place des crises d'absence (Dutuit et al, 2000), suggérant que les modifications astrocytaires ne seraient pas une conséquence adaptative de la survenue des crises d'absence. En revanche, l'induction locale des IL-1 $\beta$ , cytokines pro-inflammatoires, par l'activation des astrocytes seraient quant à elle corrélée aux décharges de pointes-ondes et ne serait observée que dans le cortex somatosensoriel et pas dans les autres régions du cortex adjacent ou dans les régions extra-corticales (Akin et al, 2011), suggérant que la production locale de cette molécule inflammatoire par les astrocytes est associée à l'ictogenèse et soutient par ailleurs la théorie du foyer cortical. D'autre part, l'IL-1 aurait des effets sur le débit sanguin cérébral (hypo-perfusion/vasoconstriction) (Murray et al, 2015).

D'autres études, sur le métabolisme des astrocytes impliqué dans les interactions glie-neurone après la mise en place des décharges de pointes-ondes, ont révélé une augmentation du métabolisme glutamatergique cortical (Melo et al, 2006, 2007) ainsi qu'une réduction de la recapture du glutamate (Touret et al, 2007), suggérant un changement de la neurotransmission glutamatergique au niveau du cortex qui pourrait contribuer à l'hyperexcitabilité corticale. Au niveau thalamique, un dysfonctionnement d'un transporteur du GABA (GAT-1) dans les astrocytes a été montré (Pirttimaki et al, 2012), suggérant un changement de propriétés des signaux astrocytes-neurones et GABAergiques thalamiques.

Ces résultats montrent que des altérations astrocytaires existent dans l'épilepsie absence et impactent à la fois l'activité neuronale et les modifications vasculaires. Ils font ainsi partie des cibles potentielles pour comprendre les mécanismes générant l'épilepsie (Crunelli et Carmignoto, 2013).

## 1.3. L'imagerie ultrasonore fonctionnelle (fUS) pour étudier les épilepsies

Les épilepsies impliquent aussi bien des crises soudaines qu'une évolution lente de la pathologie. Elle mettent en jeu des mécanismes moléculaires et cellulaires mais sont distribuées à travers différentes aires cérébrales. Pour les décrypter, il est important d'observer le cerveau sur des larges gammes d'échelles anatomique et temporelle. L'utilisation de l'imagerie fonctionnelle cérébrale comme l'EEG-IRMf permet de localiser la distribution des réseaux neuronaux associés aux crises d'absence mais cette technique est aussi capable, à travers des analyses plus poussées, d'estimer la dynamique spatio-temporelle des décharges de pointes-ondes. Une faiblesse de cette approche expérimentale reste le manque de sensibilité qui nécessite de faire une moyenne de nombreuses crises d'absence, voire de plusieurs sujets, alors qu'on sait que les crises épileptiques ont des chemins variables même pour un seul individu. Outre le masquage de la variabilité, il est impossible d'utiliser cette imagerie pour suivre le décours temporel des crises. La technique EEG-NIRS est plus performante pour aborder ces questions. Les mesures locales des taux d'hémoglobine oxygénée, désoxygénée et total ont une très bonne résolution temporelle et sont assez sensibles pour détecter des variations au cours d'une seule crise. Sa faiblesse est la pauvre résolution spatiale et la limitation au cortex comme champ d'étude, alors que les structures sous-corticales (thalamique et striatum) sont cruciales dans la genèse des décharges de pointe-ondes. Les techniques, de laser Doppler, IOS ou microscopie bi-photonique, ont de meilleures résolutions spatiales mais présentent le même problème de volume d'échantillonnage qui limite la mesure au néocortex. Elles sont donc peu applicables aux épilepsies absences. Ainsi, la majorité des études utilisant ces outils concernent les épilepsies néocorticales. Elles ont permis d'imager les foyers épileptiques, montrant finement les mécanismes de couplage neurovasculaire, sur des expériences animales ou en pratique clinique dans le cas de l'IOS. L'étude des crises d'absence nécessite de nouvelles techniques pour appréhender avec acuité les mécanismes de réseaux neuronaux et métaboliques associés aux décharges de pointes-ondes.

### 1.3.1. Besoin expérimental pour l'étude des crises d'absence

Pour étudier les crises d'absence, une bonne technique d'imagerie fonctionnelle cérébrale doit idéalement réunir les caractéristiques suivantes :

- (1) **mesurer l'activité hémodynamique directement ou indirectement liée à l'activation neuronale** : l'occurrence d'une phase pré-ictale de nature métabolique et vasculaire est à prendre en compte pour comprendre les mécanismes déclencheurs des crises d'absence.
- (2) **être compatible avec des enregistrements électrophysiologiques** : les crises d'absence sont caractérisées par des décharges de pointes-ondes. Même si elles sont accompagnées par des manifestations comportementales (absence/freezing), la présence de décharges pointes-ondes, observable à partir d'enregistrements électrophysiologiques (EEG, LFP), reste le critère le plus sûr

pour distinguer les périodes de crises des périodes hors crises. L'étude de couplage neurovasculaire doit comporter simultanément une mesure électrophysiologique.

(3) **avoir un large champ d'observation et une bonne résolution spatiale** : puisque les crises d'absence touchent un ensemble de structures cérébrales, il est important de pouvoir étudier simultanément tout le volume du cerveau (chez l'homme : 1400 cm<sup>3</sup>, chez le rat : 600 mm<sup>3</sup>), avec une bonne résolution spatiale pour identifier les régions activées par les crises d'absence le plus finement, en distinguant les différents noyaux thalamiques impliqués. La résolution spatiale idéale serait de 10 μm (taille typique d'un neurone).

(4) **avoir une bonne sensibilité et une bonne résolution temporelle** : une bonne sensibilité permet d'extraire les signaux par rapport à un bruit basal (lié à la qualité de l'appareil de mesure ou d'origine physiologique). Une bonne résolution temporelle permet d'échantillonner au mieux les variations de réponses en fonction de l'activation neuronale afin de suivre l'évolution des activités hémodynamiques au cours d'une crise, qui peut se révéler différente d'une autre malgré un patron commun (Figure 36). On souhaite déceler les fluctuations de réponses hémodynamiques corrélées aux décharges de pointes-ondes qui peuvent survenir juste avant, au début, pendant, à la fin et juste après une crise d'absence et, par la même occasion, déterminer le site d'initiation d'une crise à travers les différences de délai d'apparition.

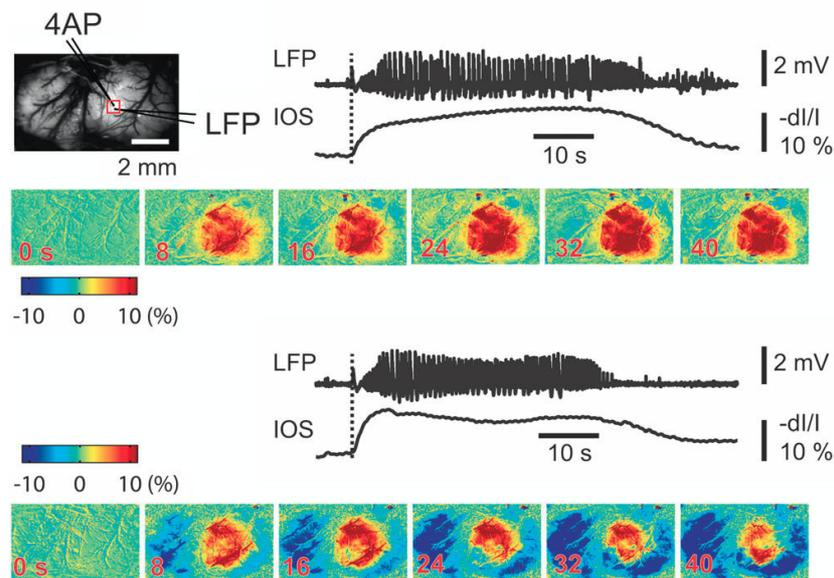


Figure 36. Exemple de réponses hémodynamiques observées durant deux crises épileptiques induites après une injection corticale locale de 4AP. D'après *Ma et al, 2013*.

(5) **travailler sur des animaux/patients éveillés et mobiles** : chez l'animal, une anesthésie et/ou une ventilation artificielle est généralement nécessaire pour faire de l'imagerie. Les crises épileptiques survenant sous anesthésie ou sédation peuvent présenter une activité cérébrale différente de celle observée en condition de crises naturelles. En effet, les anesthésies ont des effets sur la connectivité fonctionnelle (Liu et al, 2013) et sur le couplage neurovasculaire qui peuvent modifier les réponses hémodynamiques (Franceschini et al, 2010). A titre d'exemple, une étude a montré très peu de signaux

BOLD positifs associés à des décharges de pointes-ondes induites par injection intra-péritonéale de  $\gamma$ -butyrolactone (GLB), chez un rat anesthésié à 2 % d'isoflurane comparé à un rat éveillé (Tenney et al, 2003) (Figure 37). Or, l'isoflurane réduit partiellement l'excitation neuronale et le métabolisme cérébral et augmente le CBV à partir d'une dose de 1,6 % (Franceschini et al, 2010). Cela suggère que les effets liés à l'isoflurane auraient masqué la réponse BOLD provoquée par les décharges de pointes-ondes.

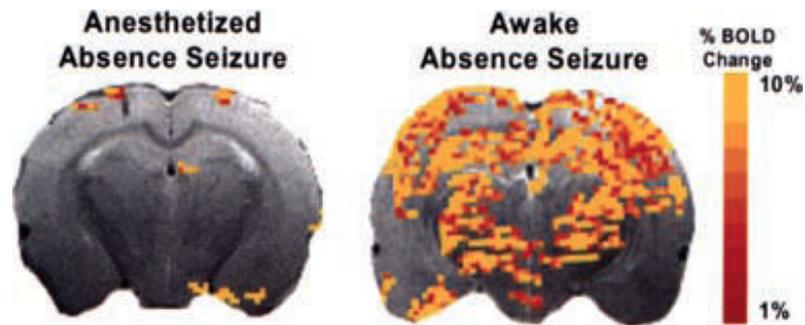


Figure 37. Comparaison des signaux BOLD positifs associés aux décharges de pointes-ondes induites par injection de GLB chez le rat anesthésié à l'isoflurane et chez le rat éveillé. D'après Tenney et al, 2003.

Chez les modèles WAG/Rij et GAERS, l'association fentanyl-halopéridol est communément utilisée pour leur effet anesthésiant sans suppression de la survenue des décharges de pointes-ondes. Des études ont montré une diminution dose-dépendante du CBF et du  $CMRO_2$  chez le rat sous fentanyl (Carlsson et al, 1982), et des effets complexes (diminution ou augmentation) du CBF local en fonction des régions cérébrales chez l'homme sous halopéridol (Handley et al, 2013), pouvant donc avoir des répercussions sur les réponses hémodynamiques. Par ailleurs, malgré le caractère non convulsif des crises d'absences, une restriction des mouvements imposée par les techniques d'imagerie peut représenter un environnement stressant pour les patients qui peut jouer sur l'apparition des crises, mais surtout pour les animaux, qui doivent en outre réussir un entraînement préalable.

Aujourd'hui, aucun outil ne réunit tous ces critères. Cependant, une nouvelle technique d'imagerie a récemment fait son apparition et s'en rapproche fortement. Cette technique prometteuse, appelé imagerie ultrasonore fonctionnelle (*functional Ultrasound imaging - fUS*), a en effet démontré sa capacité à suivre les variations de perfusion sanguine sur toute la profondeur d'un cerveau de rat au cours d'événements transitoires, comme lors d'une crise d'épilepsie (Macé et al, 2011).

### 1.3.2. Que mesure le fUS ?

L'imagerie ultrasonore fonctionnelle est une technique d'imagerie très récemment développée (Macé et al, 2011). C'est une technique améliorée de l'imagerie Doppler ultrasonore conventionnelle.

De la même manière que le laser Doppler, le principe de l'imagerie ultrasonore repose sur la détection des globules rouges en mouvement. Les ultrasons sont des ondes mécaniques de

compression de fréquence plus élevée que le son audible, soit au dessus de 20 kHz. Pour les applications médicales, la gamme utilisée varie entre 100 kHz - 40 MHz. Dans la partie basse de cette gamme de fréquences, des images peuvent être créées à partir des échos produites par la rétrodiffusion des tissus. Aux plus hautes fréquences, il se produit une absorption des ondes par les tissus, correspondant d'une part à une mauvaise propagation des ondes, et d'autre part à une conversion de l'énergie acoustique en chaleur potentiellement destructrice des cellules. L'imagerie ultrasonore consiste à sonder la région d'intérêt à l'aide d'une onde ultrasonore envoyée par un transducteur et à enregistrer les échos renvoyés par les inhomogénéités du milieu de propagation. Lorsqu'une onde ultrasonore rencontre des éléments en mouvement, l'onde est rétrodiffusée sous forme d'échos avec un décalage de fréquence. L'enveloppe du signal rétrodiffusé est extraite et mesurée en chaque point du transducteur. L'analyse des signaux forme des images reflétant les différentes propriétés du tissu. L'imagerie des cellules sanguines en mouvement par ultrasons, appelée imagerie Doppler, permet d'extraire des paramètres comme la vitesse ou le volume sanguin.

Très peu de travaux en neurosciences ont utilisé la technique Doppler ultrasonore conventionnelle due à son manque de sensibilité qui limite son utilisation à l'imagerie de quelques artères cérébrales. En effet, l'imagerie Doppler ultrasonore permet d'examiner les débits au dessus de 10 cm/s dans les larges vaisseaux, mais présente une difficulté à détecter un débit plus lent, comme une vitesse de moins de 1 mm/s, retrouvée dans les capillaires chez les rats. Puisque le signal ultrasonore rétrodiffusé par la faible quantité des globules rouges est plus faible que les échos émis par l'entourage tissulaire, le décalage Doppler dû aux mouvements lents des globules rouges est masqué par le mouvement du tissu (Christopher et al, 1996 ; Goertz et al, 2000 ; Fang et al, 2007). Le développement de l'imagerie fUS surmonte ce problème et permet de mesurer des changements hémodynamiques fonctionnels de la microvascularisation en profondeur chez le rat (Macé et al, 2011). Pour cela, le fUS repose sur une nouvelle séquence Doppler ultrasonore : le Doppler ultrarapide.

## **Principe du Doppler ultrarapide**

Contrairement à la séquence Doppler conventionnelle qui consiste à scanner le cerveau colonne par colonne en émettant une série d'ondes focalisées en différentes régions du champ d'observation pour reconstituer une image (Figure 38 (a - d)), la séquence Doppler ultrarapide se base sur une approche différente : l'émission répétée d'ondes planes (Macé et al, 2011, 2014 ; Figure 38 (e - h)).

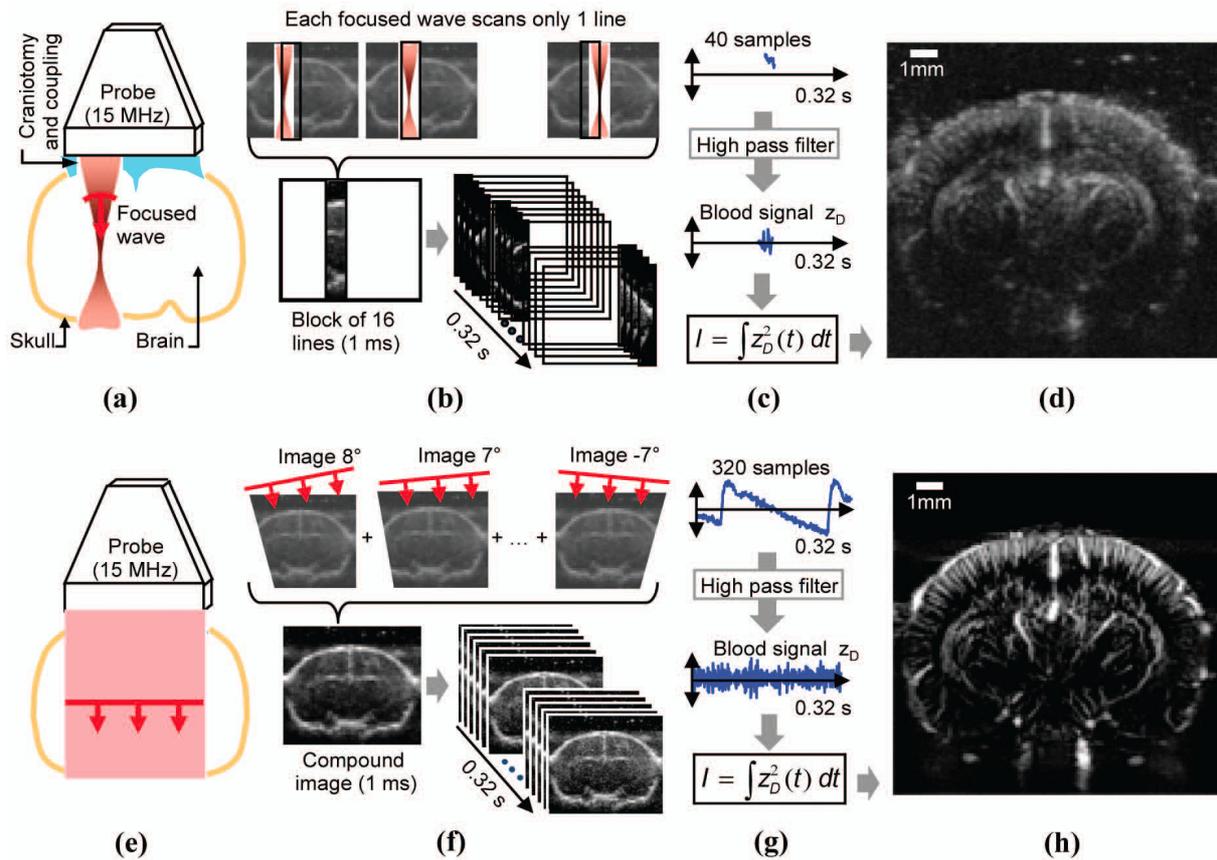
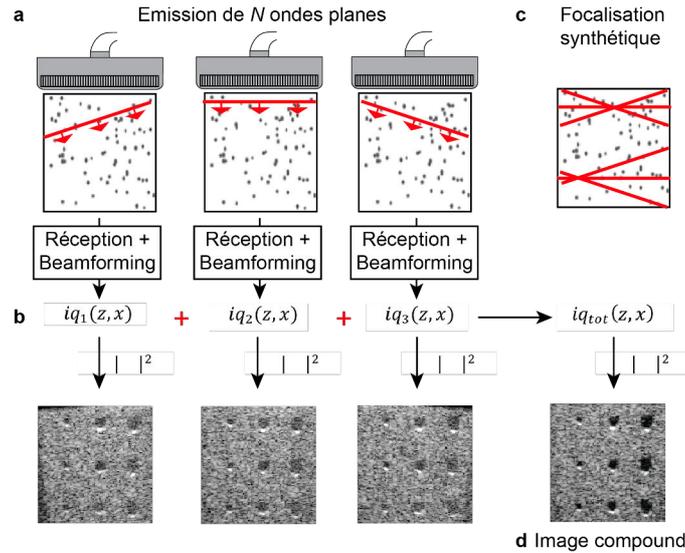


Figure 38. Comparaison du Doppler conventionnel et du Doppler ultrarapide. D'après Macé et al, 2014.

L'émission d'une onde plane depuis toute la longueur de la barrette de la sonde génère des ondes rétrodiffusées venant de tous les points de l'image. Ces échos sont enregistrés et une image entière est reconstruite à partir d'une seule émission. L'avantage de cette stratégie est la rapidité à produire une image complète, mais au détriment de la qualité d'image car la focalisation de l'émission est perdue. Pour gagner en qualité, l'utilisation de la méthode de l'image compound est appliquée. Cela consiste à combiner une série d'images, en variant la direction du plan d'onde grâce à un décalage ajustable entre transducteurs voisins. Cette méthode revient à créer une focalisation synthétique virtuelle. Chaque image compound fournit un échantillon du signal pour chaque pixel avec une résolution équivalente à celle d'un point focal (Figure 39). La durée de l'acquisition d'une image compound est équivalente à celle d'une colonne en tir focalisé, offrant ainsi un gain temporel dans la construction d'une image complète. Puisqu'il n'est plus nécessaire de diviser le champ d'observation en colonnes, de nombreuses images compound peuvent être acquises dans un temps équivalent, permettant d'augmenter considérablement la sensibilité. En pratique, une séquence de 200 - 400 ms améliore fortement la sensibilité tout en restant assez courte pour suivre les variations hémodynamiques qui sont de l'ordre de la seconde.



**Figure 39.** Principe de l'image compound. (a)  $N$  ondes planes sont émises avec un angle différent. (b) Chaque onde plane génère une image ultrarapide de mauvaise qualité. (c) En sommant les signaux, on obtient une focalisation synthétique des ondes en chaque point et une image compound (d) de meilleure qualité.

La séquence Doppler ultrarapide traite les signaux reçus par les transducteurs de façon spécifique. La première étape consiste à former un film rapide du signal acoustique en chaque pixel (*beamforming*) (Figure 38 (c) et (g)). Les séries temporelles de chaque pixel sont ensuite traitées de façon indépendante les unes des autres. Un filtre passe-haut est appliqué pour supprimer l'effet du mouvement du tissu et isoler un signal sanguin superposé de bruit. A partir de ce signal deux approches sont possibles (Figure 40). (1) Soit on mesure l'énergie du signal (l'intégrale du signal au carré). Normalisée par la durée du film cela donne la puissance du signal, qui correspond à la quantité d'agitation de particules échogènes dans le voxel. Ce "Doppler de puissance" reflète donc la quantité de globules rouges, soit le CBV. (2) Soit on calcule le spectre du signal, par exemple au moyen d'un algorithme de transformée de Fourier rapide (FFT), économique en calcul. Le profil de fréquences correspond à la distribution des vitesses des particules dans le voxel, suivant la formule de Doppler. Le pic du spectre correspond à la vitesse majoritaire des particules. Ce "Doppler de couleur" reflète le CBF. En pratique le Doppler de couleur est plus sensible au bruit, puisque la position du pic de fréquence est variable lorsqu'il y a peu de particules en mouvement (Macé et al, 2014). Par conséquent, on utilise le Doppler de puissance pour reconstruire en fUS des images incluant des aires de fort et bas débits. La puissance Doppler ne donne pas d'information directe sur la vitesse du sang mais en considérant en première approximation que la concentration des globules rouges est homogène, la puissance du Doppler est proportionnelle au volume sanguin dans le voxel.

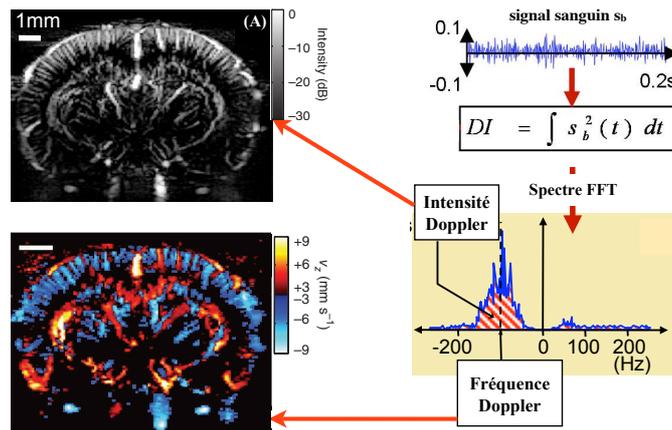


Figure 40. Extraction de deux types de signaux sanguins : l'intensité Doppler correspondant à la quantité de sang et la fréquence Doppler correspondant à la vitesse du sang axiale. Adapté de *Macé et al, 2011*.

Cette méthode permet de surpasser la qualité de l'imagerie ultrasonore conventionnelle en terme de contraste, de résolutions et surtout de sensibilité. La séquence Doppler ultrarapide est environ 15 fois plus sensible que la séquence Doppler conventionnelle pour les tissus proches de la sonde et jusqu'à 30 fois en profondeur (Figure 41), permettant ainsi d'étudier les régions profondes du cerveau. La cadence atteinte de la séquence Doppler ultrarapide est de 10 000 tirs d'onde ultrasonore par seconde pour former une image toutes les 200-400ms, contre typiquement moins de 1 image par seconde, de qualité inférieure, avec la séquence Doppler conventionnelle.

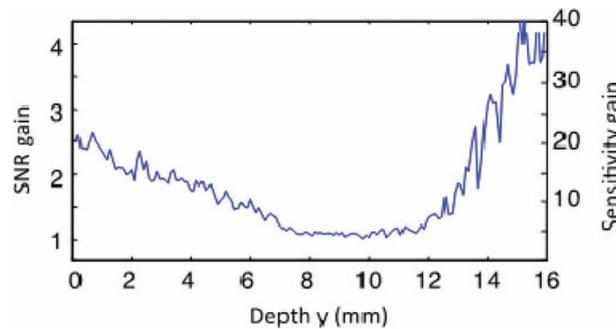


Figure 41. Gain en sensibilité de l'image avec la séquence Doppler ultrarapide en fonction de la profondeur par rapport à la séquence Doppler conventionnelle. D'après *Macé et al, 2014*.

## Les caractéristiques de l'imagerie fUS

Le choix d'une sonde à 15 MHz de fréquence sonore a été conditionnée par la capacité à détecter la microvascularisation en profondeur avec la meilleure résolution spatiale. En utilisant une sonde à 15 MHz, l'imagerie ultrasonore présente une résolution spatiale de 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  dans le plan d'imagerie, avec une épaisseur de 200  $\mu\text{m}$  et une profondeur de pénétration de 2 cm, permettant d'étudier l'étendue dorso-ventrale d'un cerveau de rat adulte (*Macé et al, 2011, 2014*). Les transducteurs sont focalisés, ce qui change légèrement l'épaisseur du plan d'imagerie suivant la profondeur. La distance focale est fixée à 8mm, correspondant environ au centre de l'image (Figure 42).

Un facteur limitant actuel est lié à la puissance de calcul nécessaire pour générer les images. Alors que les ondes ultrasonores sont émises et reçues pendant 200 à 400 ms, le transfert des données brutes et la reconstruction de l'image requiert environ 2,5 s, limitant temporellement l'intervalle d'acquisition entre deux images Doppler ultrarapide à environ 3 s. Cette durée de transfert n'implique en aucun cas les propriétés physiques d'acquisitions des images mais de la capacité à traiter les données. Cela signifie qu'avec le progrès croissant de l'informatique, il deviendra possible de suivre l'imagerie en temps réel avec une excellente résolution temporelle. En utilisant des tirs ultrasonores en continu, il devient même possible d'utiliser des fenêtres glissantes pour extraire au mieux les informations temporelles portées par le signal.

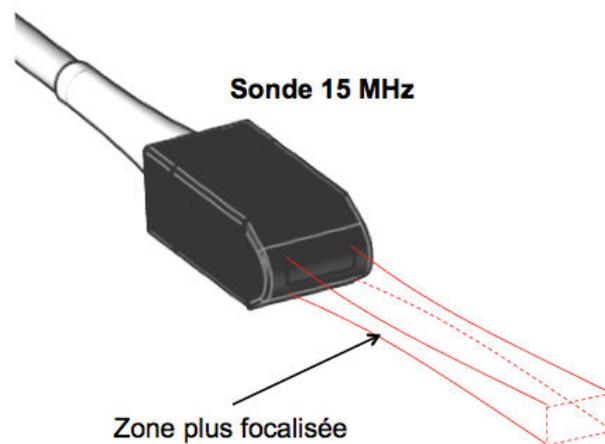


Figure 42. Schéma d'un tir d'onde plane présentant une zone plus focalisée aux alentours de 8 mm de profondeur.

Une approche théorique et sa validation expérimentale ont permis de cerner la grandeur quantifiée par l'imagerie fUS. Ainsi on estime détecter le sang s'écoulant à une vitesse axiale comprise entre 4 mm/s (limité par le filtrage, Figure 43) et 25 mm/s (limité par l'échantillonnage) (Macé et al, 2014). Dans le cerveau de rat, la vitesse du sang varie de moins de 1 mm/s (en moyenne 0,5 mm/s) dans les capillaires à plusieurs cm/s dans les artères (Kleinfeld et al, 1998 ; Chaigneau et al, 2003). Au niveau des artérioles, suivant leur diamètre (10 - 50  $\mu\text{m}$ ), la vitesse sanguine moyenne est de 10 mm/s et peut atteindre 25 mm/s (Shih et al, 2009, 2012 ; Nishimura et al, 2007). Les veinules sont en moyenne plus larges que les artérioles (10 à 100  $\mu\text{m}$ ) et la vitesse peut descendre jusqu'à 0,6 mm/s pour les petites veinules (Nguyen et al, 2011). Les volumes quantifiés par l'imagerie fUS correspondent donc principalement à des artérioles, grosses veinules et dans une moindre mesure aux plus larges vaisseaux. En effet, bien que les artères et veines aient des flux trop rapides pour être détectés, ces vaisseaux sont assez larges pour que la composante perpendiculaire à l'axe du vaisseau du mouvement des particules soit dans la gamme détectable. Plus la direction du flux s'approche de l'axe d'insonification, plus la fréquence Doppler augmente. Malgré une absence de détection des capillaires, la détection des artérioles est importante car la régulation du volume sanguin en réponse à l'activation neuronale locale se passe majoritairement au niveau des artérioles (Shih et al, 2009 ; Drew et al, 2011 ; Hill et al, 2015).

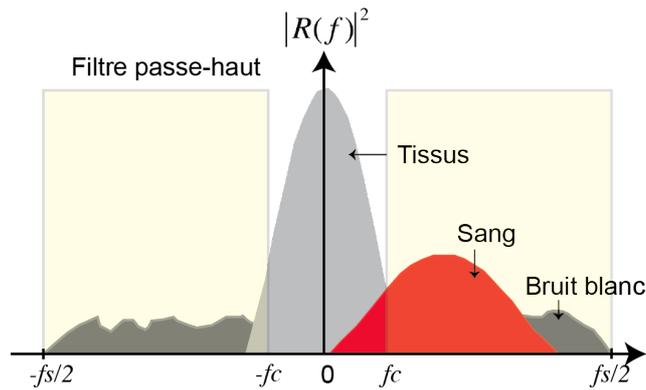


Figure 43. Effet du filtrage et du bruit sur le spectre Doppler. Les mouvements des tissus induisent un bruit basse fréquence éliminé par un filtre passe-haut.

Comparée à l'IRM, l'imagerie fUS présente le gros avantage de ne pas générer de champ magnétique pouvant interférer avec la détection des activités électriques des neurones. Elle est naturellement compatible avec des enregistrements électrophysiologiques. En revanche, une limitation est que l'os du crâne diffracte et absorbe ces ultrasons à cause de sa structure poreuse. L'imagerie fUS nécessite donc de s'affranchir de la barrière osseuse. La technique est invasive et implique des études aiguës chez l'animal. Un amincissement de l'os est possible avec toutefois une diminution de la qualité des images dans la largeur et la profondeur de champs d'observation. Chez l'homme, il est possible d'utiliser l'imagerie fUS en peropératoire ou chez le nouveau-né au niveau des fontanelles, espaces membraneux séparant les os du crânes qui ne sont pas encore soudés.

L'imagerie fUS présente ainsi des caractéristiques (tableau 4) qui combinent résolution spatiotemporelle et champ d'observation au même titre que l'IRMf (Figure 44) mais avec une sensibilité accrue.

Tableau 4. Caractéristiques de l'imagerie fUS

	fUS
Paramètres mesurés	CBV (et CBF)
Champ d'observation	plan de 2 cm de profondeur
Résolution spatiale	100 x 100 x 200 $\mu\text{m}$
Résolution temporelle	200-400 ms (+2,5 s)
Sensibilité	bonne
Compatibilité électrophysiologie	bonne

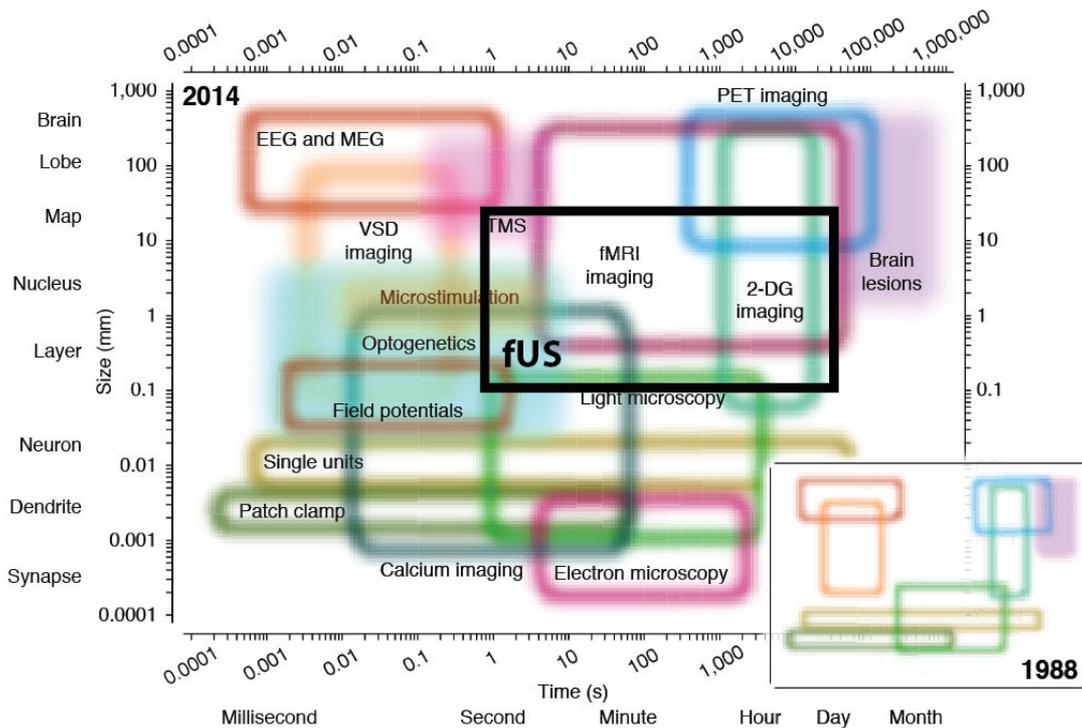


Figure 44. Comparaison du fUS (encadré noir) et des méthodes rencontrées en neurosciences en fonction des résolutions spatiotemporelles et champs d'observation. Adaptée de *Sejnowski et al, 2014*.

### 1.3.3. Imagerie fUS appliquée aux épilepsies

#### Le potentiel de l'imagerie fUS

Chez le rat anesthésié et trépané, l'imagerie fUS a prouvé sa capacité à cartographier l'activation cérébrale lors de stimuli sensoriels avec une bonne résolution spatiotemporelle et une très bonne sensibilité (Macé et al 2011 ; Osmanski et al, 2014). Ceci a été démontré durant des stimulations de vibrisses, où la sensibilité est assez bonne pour détecter l'activation d'une seule vibrisse (Macé et al, 2011 ; [Figure 45A](#)), et au cours de stimulations odorantes, où il est possible de distinguer des activations spécifiques dans le bulbe olfactif par différentes odeurs (Osmanski et al, 2014 ; [Figure 45B](#)).

Cependant, la force de la technique réside dans la capacité à mesurer le volume sanguin en temps réel au cours d'un seul événement transitoire, comme il a été démontré sur des crises épileptiques induites par injection focale de 4-AP chez le rat anesthésié et trépané (Macé et al, 2011). Dans cette expérience, la mesure de variation de volume sanguin a été réalisée toutes les 3s simultanément avec un enregistrement EEG, permettant de distinguer les états de crises et hors crises. La région où est localisée le site d'injection montre une augmentation du volume sanguin au cours des crises, en concordance avec des études utilisant d'autres méthodes d'observation (Zhao et al, 2009, 2011 ; Ma et al, 2013). Par contre, là où l'imagerie fUS présente un sérieux avantage, c'est la

possibilité de suivre en profondeur les changements de volume sanguin au cours d'une crise épileptique, observable sous forme de propagation. L'augmentation de volume sanguin au lieu du site d'injection est suivie d'une propagation au niveau du cortex adjacent, du thalamus et du cortex controlatéral. La variabilité des patrons de propagation de cette activité épileptiforme étaient visible au cours de deux crises consécutives chez un même animal (Figure 46), suscitant un intérêt de développer le fUS pour étudier les crises épileptiques spontanées.

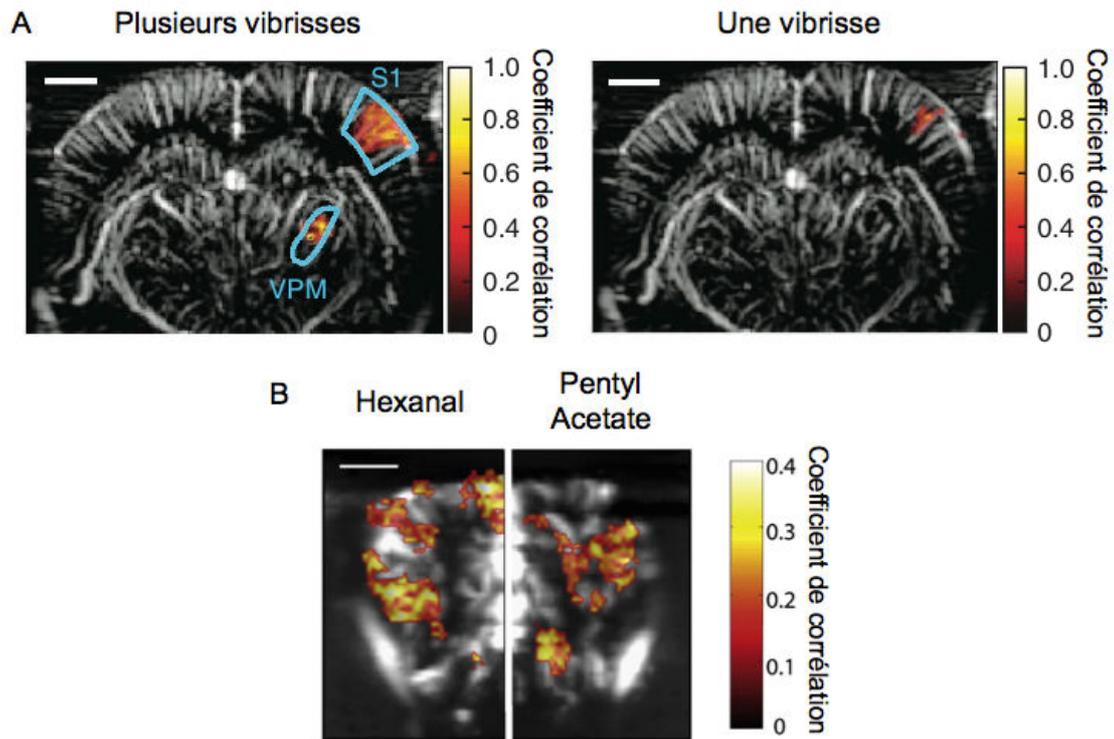


Figure 45. Carte de corrélation montrant l'activation des régions cérébrales lors de stimuli sensoriel. (A) Cartographie montrant l'activation des régions au cours de stimulations d'un groupe de vibrisses et d'une seule vibrisse. S1 : cortex somatosensoriel primaire, VPM : noyau ventro-postéro-médian du thalamus. Barre d'échelle : 2 mm. D'après *Macé et al, 2011*. (B) Cartographies montrant l'activation de régions spécifiques du bulbe olfactif pour deux odeurs différentes (Hexanal et Pentyl Acétate). Barre d'échelle : 1 mm. D'après *Osmanski et al, 2014*.

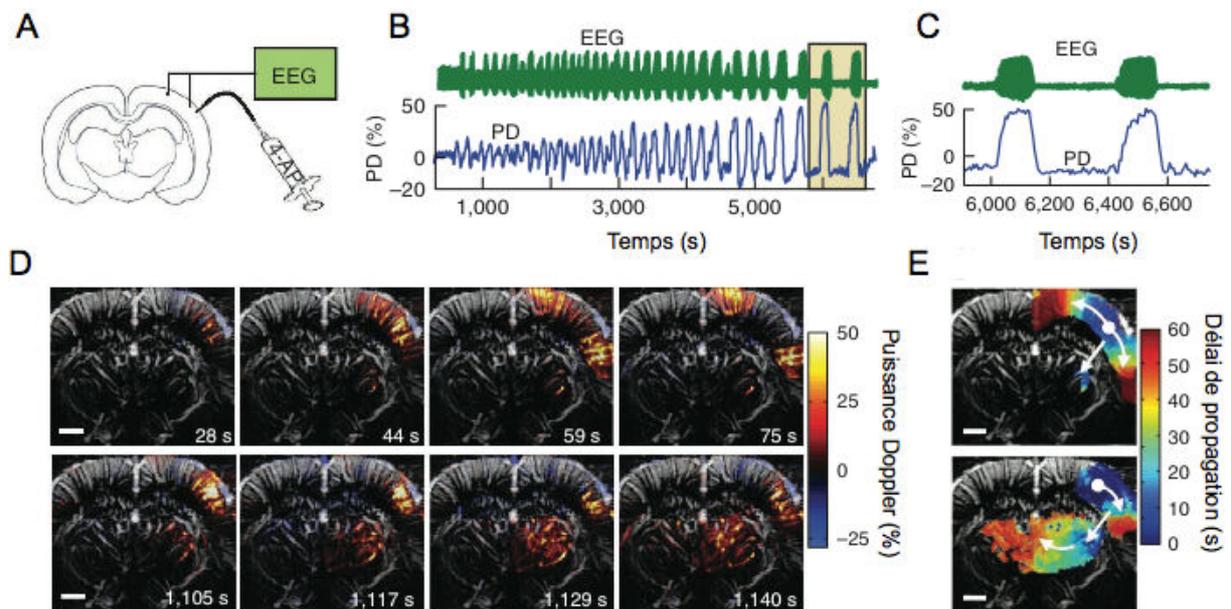


Figure 46. Activités épileptiques observées à partir de l'imagerie fUS-EEG. (A) Schéma montrant le lieu d'injection, l'emplacement des électrodes et le plan imagé. (B) Tracés montrant les activités EEG et la variation de puissance Doppler (PD), soit le volume sanguin, correspondant au lieu du site d'injection au cours du temps. (C) Agrandissement de l'encadrée du (B) montrant une hyperperfusion au cours des crises. (D) Deux propagations de crises différentes à partir du point d'injection. Suivi de l'hyperperfusion au cours de deux crises épileptique, haut : propagation corticale, bas : propagation thalamique. (E) Carte de délai de propagation de l'hyperperfusion correspondant à la propagation corticale (haut) et à la propagation thalamique (bas). Barre d'échelle : 2mm. D'après *Macé et al, 2011*.

## Observer l'activité spontanée des réseaux épileptiques par fUS-EEG

L'imagerie fUS couplée à l'EEG intracrânien possède des qualités pour aborder l'épilepsie absence chez le rat. La possibilité de suivre les variations de perfusion à travers le cerveau en profondeur au cours du temps permet d'aborder les questions de l'initiation et la propagation des crises d'absence, ainsi que de révéler, voire caractériser, l'existence d'une phase pré-ictale. L'objectif minimal de cette thèse était d'utiliser cette technique sur un modèle de rat génétiquement épileptique, présentant des crises d'absences spontanées, trépané et sous neuroleptanalgie.

Cependant, il nous est apparu assez tôt qu'on pourrait essayer de développer le fUS sur un animal mobile, en utilisant une sonde miniaturisée. En fixant la sonde, petite et légère, fermement sur la tête de l'animal, nous pourrions alors travailler sur le rat éveillé et mobile et ainsi tirer partie de la survenue des crises spontanées (répondant au critère cité ci-dessus). Cela nécessitait de surmonter un problème majeur qui est la craniotomie. Contrairement à un rat anesthésié où il est possible de laisser l'animal trépané le temps d'une expérience, cette approche est inconcevable pour un animal libre de ces mouvements. Nous avons exploré très tôt l'amincissement de l'os, mais un os aminci est fragile, peu stable dans le temps, à moins de se limiter à une fenêtre de petites dimensions. En outre, un os même aminci dégrade la qualité des images, comparativement à un volet crânien. Il fallait trouver un moyen de fermer le volet par une prothèse invisible aux ultrasons, étanche, tout en évitant la formation de bulles gazeuses fortement diffractantes. Parallèlement, un tel procédé offrirait l'avantage de faire des expériences chroniques sur un même animal. Cette approche représentait le risque d'un

investissement important pour développer un volet chronique pour s'apercevoir que l'imagerie pouvait être massivement parasitée par le mouvement de l'animal mobile. Cependant, le choix de l'étude des crises non convulsives limite ce risque, au moins dans une première période de mise au point.

Un second problème, auquel j'ai été confrontée, est la limite que représente l'imagerie d'un seul plan. En effet, la généralisation des décharges de pointes ondes requiert l'observation de l'ensemble du cerveau, ou du moins en priorité des structures comme le cortex somatosensoriel primaire, le thalamus et le striatum. Il fallait donc trouver une méthode pour déplacer la sonde au dessus de la tête de l'animal afin d'imager plan par plan l'ensemble du cerveau. Cela sous-entendait également de réaliser une fenêtre crânienne assez large pour avoir accès aux structures cérébrales associées aux décharges de pointe-ondes.

Malgré les difficultés que cela a représenté, c'est cette approche dans laquelle je me suis lancée dès le début de ma thèse. J'ai ainsi contribué au développement de l'imagerie fUS sur le rat mobile (*mobile functional UltraSound* - mfUS) pour aborder les questions liées aux crises d'absence dans les meilleures conditions.

## 2. Matériels et méthodes

## 2.1. Lignée de rats GAERS

Le choix de l'animal a été conditionné par la question posée. Tout d'abord, j'ai décidé de travailler chez le rat car la taille de l'animal était adaptée à la taille de la sonde ultrasonore et également parce qu'il existe des lignées de rats présentant des absences spontanées en abondance. J'ai choisi de travailler avec la lignée de rats GAERS (*Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg*) où la pénétrance est totale. Elle est issue de plusieurs générations de rats Wistar originellement sélectionnés pour la présence de décharges de pointes-ondes spontanées bilatérales et synchrones sur l'ensemble du cortex (Marescaux et al, 1992 ; Danober et al, 1998 ; Depaulis et al, 2015). Ce modèle génétique reproduit les symptômes de l'épilepsie de la petite enfance, appelée « petit mal ». Les symptômes, ou plus précisément les crises d'absence générées de façon spontanées, observés chez les rats GAERS sont, quasiment en tout point, similaires aux crises observées chez l'enfant. Citons des similitudes dans le patron EEG, les structures impliquées connues, la dépendance de survenue des décharges de pointes-ondes à l'état de vigilance, ainsi que le profil thérapeutique. Seules deux différences majeures sont relevées : (1) la fréquence des cycles de décharges de pointes-ondes, qui est plus élevée chez les GAERS (~ 7-11 Hz) que chez les enfants (~ 3 Hz), et (2) l'âge d'apparition des crises, qui chez les GAERS commencent vers P30 et continuent au cours de leur vie adulte, alors que chez les enfants, les crises apparaissent dès l'enfance mais disparaissent généralement à la puberté ou se transforment sous forme d'épilepsie plus sérieuse (Marescaux et al, 1992 ; Danober et al, 1998). Néanmoins, ces différences ne remettent pas en cause les mécanismes à l'origine de l'épilepsie, ce qui fait des rats GAERS un bon modèle. Comparé au rat WAG/Rij qui est une autre lignée de rats ayant des crises d'absence, le rat GAERS présente un nombre, une durée totale et une durée moyenne des décharges de pointes-ondes significativement plus élevés (Akman et al, 2010), ce qui représente un avantage pour mon étude. En effet, la durée d'une crise se situe entre 0.5 et 75 s chez les GAERS (Marescaux et al, 1992 ; Danober et al, 1998 ; Akman et al, 2010) contre une durée aux alentours de 5 s (Sarkisova et Luijtelaar, 2011) à 10 s (Akman et al, 2010) chez les WAG/Rij. Or, l'imagerie fUS génère des images typiquement toutes les 3 s, ce qui ne correspondrait qu'à la génération d'une image pour des crises de 5 s. De plus, les rats WAG/Rij ont la particularité d'avoir deux types de décharges de pointes-ondes : *type I* et *type II* (Midzianovskaia et al, 2001 ; Sitnikova et van Luijtelaar, 2007). Les décharges de pointes-ondes de type I sont généralisées et s'étendent sur tout le cortex, similaire à celles observées chez le patient, alors que les décharges de pointes-ondes de type II, retrouvées dans 60 % des rats WAG/Rij adultes, sont localisées dans les zones occipitales. Pour la clarté d'une première étude, la lignée GAERS m'a parue plus appropriée car elle ne présente que des décharges de pointes-ondes généralisées.

## 2.2. Mise au point de l'étude EEG-mfUS chez le rat mobile

### 2.2.1. Préparation de l'animal

Des rats GAERS âgés entre 2 et 4 mois ont été utilisés pour cette étude. La procédure chirurgicale que j'ai mise au point consistait à réaliser une craniotomie, suivie d'une implantation d'électrodes pour enfin finir par un scellement à l'aide d'une prothèse assez rigide pour protéger le cerveau en laissant passer les ultrasons. Une première induction anesthésique était réalisée avec l'inhalation de 2 % d'isoflurane, puis l'animal était maintenu anesthésié durant la chirurgie par un mélange kétamine/xylazine (80/10 mg/kg) injecté en intra-musculaire. La température de l'animal était maintenue à 36.5°C à l'aide d'un tapis chauffant (Bioseb, France). Une incision sagittale de la peau était réalisée de la partie antérieure jusqu'à la partie postérieure de la tête pour exposer le crâne. L'os pariétal et frontal était découpé à l'aide d'une fraiseuse et retiré soigneusement en préservant la dure-mère pour prévenir des dommages cérébraux. Le volet crânien exposait le cerveau du bulbe olfactif au cervelet, soit de +6 à -8 mm à partir du Bregma, avec une largeur maximale de 14 mm (Figure 47A). Des électrodes EEG intracrâniennes étaient ensuite implantées dans le cerveau. Les électrodes étaient fabriquées avec du fil de tungstène de 50 µm d'épaisseur, soudés à des connecteurs miniatures. La différence avec le design standard, sans imagerie fUS, est la présence de deux coudes à angle droit formés avant l'insertion dans le cerveau. Cette forme permet d'ancrer les électrodes sur l'os postérieur du crâne. Quatre électrodes bipolaires étaient implantées dans le cortex somatosensoriel primaire : S1BF = AP -3, L +/-5, DV -1.75 et S1Lp = AP +1, L +/-6, DV -2, en mm à partir du Bregma. Des électrodes bipolaires étaient parfois implantées dans le thalamus : VPM = AP -3.8, L +/-2.6, DV -6 et Po = AP -3.6, L +2.6, DV -5 mm, et dans le striatum : CPu = AP +0.36, L +3.5, DV -4 mm. Une électrode était implantée dans le cervelet comme référence. Une vis épидurale placée au dessus du bulbe olfactif et une autre vis sur le côté latéral du cervelet étaient utilisées comme masses. Le tout était recouvert par une prothèse. Une feuille de polyméthylpentène (PMP) transparente de 125 µm d'épaisseur (Goodfellow) était scellée avec de la résine acrylique (GC Unifast TRAD) et l'espace résiduel entre le cerveau et le matériau était rempli de solution saline (NaCl 0.9 %). Le PMP est un bio-polymère standard utilisé pour les implants. Ce matériau a une même impédance acoustique proche de l'eau, évitant une distorsion de la propagation des ondes ultrasonores aux interfaces gel-prothèse et prothèse-saline. Le choix d'utiliser une prothèse comme approche a été conditionné par un champ de vision plus large du cerveau à l'imagerie comparé à l'approche de l'os aminci (Osmanski et al, 2014b) et la possibilité de prolonger les conditions d'imagerie pendant 1 à 2 mois. Trois écrous étaient scellés dans la résine pour permettre la fixation de la sonde (Figure 47B). La procédure chirurgicale nécessitait typiquement 4-6h.

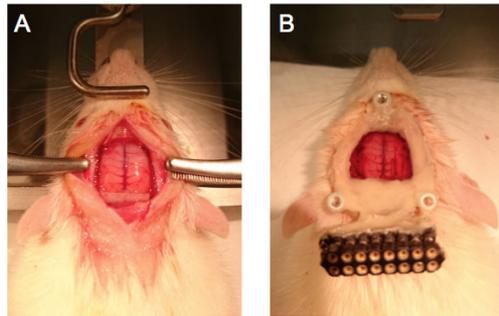


Figure 47. Procédure chirurgicale. (A) Exemple d'un volet crânien typique. (B) Exemple d'un rat après la chirurgie.

Après une semaine de récupération, les animaux étaient utilisés pour les sessions d'acquisitions. Avant de procéder à une session d'enregistrement, le rat était anesthésié pendant 20-25min avec 2 % d'isoflurane afin d'attacher la sonde sur la tête de l'animal. Du gel acoustique était appliqué sur la prothèse et la sonde était ensuite insérée dans son support, préalablement attaché à la tête du rat avec des vis par le biais des écrous scellés. La sonde était positionnée sur le plan coronal ou tournée en diagonal pour visualiser simultanément le cortex antérieur et postérieur, le thalamus et le striatum. Le gel pouvait rester en place au delà de 8 h d'enregistrement. Les rats étaient ensuite placés dans une cage standard d'hébergement sans leur couvercle durant toute la session d'enregistrement (Figure 48).

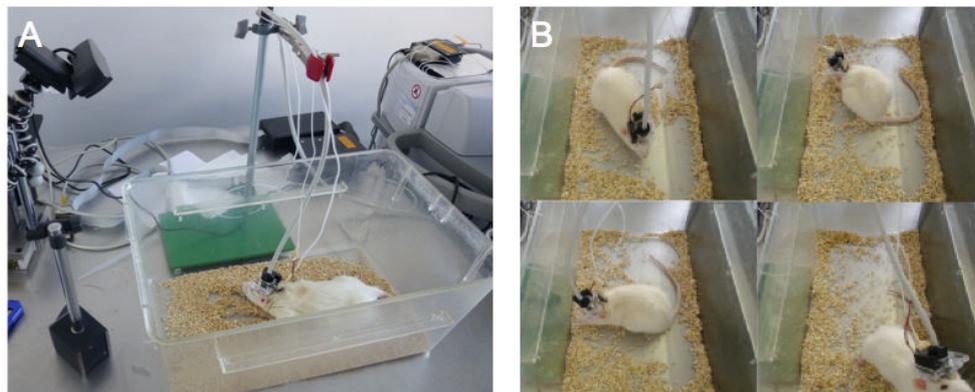


Figure 48. Session d'enregistrement. (A) Environnement du rat au cours d'un enregistrement. (B) Exemples de la mobilité du rat

## 2.2.2. Support et sonde ultrasonore

### Caractéristiques de la sonde ultrasonore miniature

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler avec trois générations de sondes pour petit animal de dimensions de plus en plus réduites. Toutes ces améliorations n'affectaient pas la sensibilité des transducteurs mais ont permis la réalisation des expériences sur les animaux mobiles. Les principaux résultats ont été obtenus à partir de la dernière génération de sondes, c'est-à-dire la sonde

ultrasonore miniature (Vermon). Comparées aux précédentes études (Macé et al, 2011 ; Osmanski et al, 2014b), les dimensions de cette sonde (en cm) ont été réduites de 15 (hauteur), 6 (largeur), 2.5 (épaisseur) à 2.5 x 1.85 x 1.85. Le poids (en g) était réduit de 250 à 12. Le câble était plus flexible en réduisant son diamètre de 11.5 mm à 6.9 mm. Cette sonde ultrasonore était composée d'une rangée linéaire de 128 transducteurs émettant une fréquence centrale de 15 MHz (pitch spatial de 0.11 mm ; élément transducteur : 2.000 x 0.110 mm<sup>2</sup> ; bande passante : 46 % à - 6 dB, correspondant à 11 - 18 MHz), permettant une résolution spatiale typique de 0.110 x 0.110 mm<sup>2</sup> dans le plan d'imagerie. Elle avait une lentille acoustique avec une distance focale de 8 mm et une largeur focale de 400 µm, correspondant à l'épaisseur du plan imagé. La partie active était intégrée dans une résine moulée de 18.5 mm de diamètre et 25 mm de longueur. Un câble de 150 cm de longueur et un poids de la sonde de 12 g assurait un confort et une liberté de mouvement pour l'animal.

### **Support pour la sonde**

Plusieurs générations de supports ont vu le jour en raison des différentes sondes utilisées. Ces différentes platines présentaient néanmoins des caractéristiques similaires. La platine soutenant la sonde était composée de deux parties usinées en Plexiglas pour son poids léger et sa rigidité. La partie fixe, comprenant deux rainures en forme de U sur les côtés droit et gauche, permettant la translation de la partie mobile, était attachée sur la tête de l'animal à l'aide de trois vis. La partie mobile présentant deux bords coulissant était ajustée à la base pour limiter la friction sans laisser de jeu mécanique. La sonde était encastrée à travers une ouverture centrale dans la partie mobile. Un Servo moteur linéaire (VS-19, Roboshop) était fixé dans la partie mobile. Le moteur était contrôlé par un système électronique créé sur mesure, connecté au scanner ultrasonore par un port USB. La platine pesait 18 g et mesurait en tout 41 mm de largeur, 34 mm de longueur et 16 mm de hauteur.

Le moteur du support était contrôlé par pas de 125 µm. La précision du moteur était meilleure qu'un pas. Pour mon étude, les plans imagés étaient espacés de 500 µm. Le temps de parcours d'une plage de 15 mm était d'environ de 2 s. Il n'était pas nécessaire d'avoir une vitesse plus rapide. Lorsque l'on souhaitait comparer les réponses hémodynamiques des structures anatomiques distinctes, il était plus judicieux de pivoter la sonde pour imager un plan incluant les structures d'intérêt. La limite expérimentale pour l'imagerie ne se situait pas dans la dérive du mouvement ou l'instabilité, mais plutôt dans la fuite éventuelle de solution saline de la prothèse crânienne, générant des bulles de gaz qui dégradait les images. Cela se passait typiquement de quelques semaines à deux mois après la chirurgie.

## **2.2.3. Imagerie fUS et EEG**

### **L'acquisition des séquences ultrasonores**

Les images vasculaires étaient obtenues via la technique d'imagerie Doppler compound ultrarapide (Macé et al, 2011). La sonde était pilotée par un scanner ultrasonore ultrarapide basé sur un

système GPU programmable (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) doté d'une mémoire RAM de 24 Gb. En "mode continu", 200 images étaient acquises par des tirs ultrasonores à une cadence de 1kHz pendant 200ms, répétées toutes les 3s. Chacune des images était ainsi constituée de la combinaison de 5 tirs ultrasonores successifs avec des ondes planes d'inclinaisons différentes, par une sommation cohérente des images complexes beamformées obtenues à partir d'un set d'ondes planes successives de différents angles (Bercoff et al, 2011). Compte tenu du compromis entre la cadence de tirs, la résolution et la vitesse d'imagerie, une onde plane compound utilisant cinq angles espacés de 5 degrés (de  $-10^\circ$  à  $+10^\circ$ ) a été choisie, résultant en une répétition de la fréquence du pulse (*pulse repetition frequency*, PRF) des transmissions de l'onde plane de 8 kHz. Afin de discriminer les signaux sanguins des mouvements du tissu, la série d'images compound ultrarapides était traitée par un filtre temporel passe-haut de Butterworth du 4ème ordre avec une fréquence de coupure à 50 Hz. L'énergie était calculée en chaque pixel en prenant le carré du module de l'image complexe. Quelques images étaient supprimées avant d'être incorporées dans l'enregistrement lorsque des échos parasites étaient présents, ceux-ci principalement causés lorsque l'animal cognait la sonde contre la paroi de sa cage ou lorsque l'animal grinçait des dents.

Les spécifications techniques du scanner utilisé incluait un bus express PCI 16x de 6 GB/s, un processeur Xeon de 12 core à 3-GHz, un GPU NVidia Quadro K5000 avec un bus à 173 GB/s, fournissant 2.1 teraflops. Une limitation du fUS était due au temps de transfert et de traitement de la grande quantité de données requise pour former ("beamformer") les images fUS. La limitation du mode continue était la rapidité de traitement pour transformer une série d'acquisition d'ondes planes en images compound et de générer ensuite une image fUS.

## **Acquisition EEG**

Les signaux des électrodes intracrâniennes étaient captés par un préampli 16 canaux présentant une entrée de haute impédance, un filtre DC-cut à 1Hz, un gain de 1000, et étaient numérisés à 20 kHz (Xcell, Dipsi, Cancale, France), en même temps qu'un signal de synchronisation issu de la machine ultrasonore lors de l'acquisition des images. Un logiciel développé au laboratoire en langage G (Labview, National Instruments, Austin, TX, USA) permettait d'acquérir les signaux enregistrés par les électrodes et par les acquisitions d'images ultrasonores simultanément avec la vidéo de l'enregistrement obtenue à travers une caméra.

Un amplificateur standard avec une large bande passante était utilisé, permettant d'enregistrer à la fois des potentiels de champs locaux (LFP, 0.1 - 200 Hz) et des activités multi-unitaires (MUA, 200 - 2 000 Hz). La résolution spatiale des LFP reste controversée, avec une estimation allant de 250  $\mu\text{m}$  à plus d'un millimètre de rayon. Le rayon de détection des MUA est estimé aux alentours de 70 - 200  $\mu\text{m}$ .

## 2.2.4. Analyse et traitement statistique des données

Les données ultrasonores et vidéo-EEG étaient collectées pour le traitement hors ligne, via un logiciel développé sur mesure au laboratoire implémenté avec Labview. Cet outil permettait la lecture et les analyses. Les signaux étaient synchronisés à travers plusieurs modalités (le signal électrique de synchronisation provenant du scanner pendant les tirs ultrasonores et un enregistrement du temps de chaque tir).

Les images ultrasonores étaient normalisées en fonction de la valeur moyenne sur l'ensemble des périodes hors crises, donnant donc le changement relatif de l'écho vasculaire en pourcentage de la ligne de base. Pour repérer les structures et régions cérébrales sur les images mfUS générées, l'atlas Paxinos-Watson (Paxinos et Watson, 2007) (plan coronal) ou Waxholm (Papp et al, 2014 ; Kjonigsen et al, 2015) (plan en diagonal) était superposé en utilisant le cortex comme principal point de repère. La correction de Bonferroni était appliquée dans les tests statistiques sur les images pour prendre en considération les multiples tests sur un large nombre de pixels.

Les crises d'absence étaient détectées lorsque les électrodes présentaient au moins 3 s de décharges de pointes-ondes à une fréquence au dessus de 5 Hz, alors qu'un intervalle sans pointes-ondes de 3 s permettait de discriminer les crises successives. Les crises étaient définies seulement par les signaux EEG et étaient toujours bilatérales.

Le calcul du coefficient de corrélation R de Pearson entre l'EEG et l'intensité du pixel du mfUS était basé sur la fonction du statut de crise (1 : pendant une crise, 0 : dans un intervalle sans crise). Le test de Student était utilisé pour les tests statistiques sur le coefficient R de Pearson. Toutes les statistiques sont montrées sous forme de moyenne +/- écart type (SD).

## 3. Résultats

## 3.1. Article : "EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats"

Le développement de l'imagerie fUS a permis d'introduire une nouvelle modalité pour suivre l'hémodynamique cérébrale et la connectivité fonctionnelle chez le rongeur trépané et anesthésié avec une haute résolution spatiotemporelle et une excellente sensibilité. Malgré son potentiel, l'imagerie fUS présente deux limites. (1) L'immobilisation et l'anesthésie de l'animal. Idéalement, les études d'activités cérébrales *in vivo* devraient être réalisées dans des conditions naturelles, lorsque le sujet est éveillé et mobile. En effet, l'étude de la dynamique des réseaux fonctionnels au cours des crises épileptiques spontanées est un enjeu crucial à la compréhension des mécanismes liés à la pathologie. Elle permet de s'affranchir des effets liés à la sédation qui peuvent influencer sur le réseau cérébral fonctionnel et des contraintes liées à l'immobilisation. (2) L'imagerie d'un plan. L'accès à l'ensemble des structures cérébrales est une nécessité pour l'étude des réseaux fonctionnels. En outre, les crises épileptiques peuvent s'étendre sur de larges territoires cérébraux.

Dans cet article, nous présentons en détail le développement de la technique fUS combiné à l'EEG sur le rat éveillé et mobile (*mobile fUS*, mfUS). Cela repose sur plusieurs avancées : une procédure chirurgicale que j'ai mise au point, comprenant un large volet crânien, une implantation d'électrodes intracrâniennes et une prothèse crânienne perméable aux ultrasons permettant l'accès à une large portion du cerveau ; une sonde miniaturisée et légère offrant une liberté de mouvement au rat ; un support de la sonde motorisé afin de fixer la sonde fermement sur la tête de l'animal et d'imager plusieurs plans coronaux du cerveau sur un axe antéro-postérieur ; et un logiciel pour la synchronisation des acquisitions mfUS, EEG et vidéo, et pour la lecture et l'analyse des signaux multimodaux.

Le potentiel de l'imagerie mfUS-EEG est démontrée à travers deux applications : (1) l'exploration des changements hémodynamiques durant les crises d'absence spontanées sur plusieurs plans du cerveau, étude que j'ai réalisée, et (2) l'étude des variations hémodynamiques durant les rythmes thêta observés pendant la navigation spatiale.

Les travaux que j'ai effectués sur les rats GAERS, qui présentent des décharges de pointes-ondes bilatérales spontanées à l'EEG au cours des crises d'absence, ont montré des patrons de corrélation hémodynamique distincts à travers les structures du cerveau. Des hyper-perfusions dans le cortex somatosensoriel et le thalamus étaient concomitantes avec une hypo-perfusion dans le striatum et dans certaines régions du cortex. Aucune variation dans l'hippocampe n'a été observée. Bien que des études d'IRMf ont montré des activations bilatérales, une latéralisation de la perfusion dans le cortex somatosensoriel a pu être observée sur la moitié des animaux. En se penchant sur les variations de perfusion, l'hyper-perfusion corticale était bilatérale ou unilatérale au cours des différentes crises successives malgré des décharges de pointes-ondes bilatérales. Les régions corticales et thalamiques révèlent des oscillations synchrones dans le patron de perfusion au cours des crises.

L'application sur les rats Sprague Dawley pendant la marche a montré une hyper-perfusion dans le cortex somatosensoriel, l'hippocampe et le thalamus dorsal, et une hypo-perfusion dans le thalamus ventral.

Ces résultats montrent que l'imagerie mfUS-EEG est adaptée aussi bien pour des études fonctionnelles pathologiques que comportementales chez l'animal.

# EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats

Lim-Anna Sieu<sup>1,2</sup>, Antoine Bergel<sup>1,3</sup>, Elodie Tiran<sup>4</sup>, Thomas Deffieux<sup>4</sup>, Mathieu Pernot<sup>4</sup>, Jean-Luc Gennisson<sup>4</sup>, Mickaël Tanter<sup>4</sup> & Ivan Cohen<sup>1</sup>

**We developed an integrated experimental framework that extends the brain exploration capabilities of functional ultrasound imaging to awake and mobile rats. In addition to acquiring hemodynamic data, this method further allows parallel access to electroencephalography (EEG) recordings of neuronal activity. We illustrate this approach with two proofs of concept: a behavioral study on theta rhythm activation in a maze running task and a disease-related study on spontaneous epileptic seizures.**

*In vivo* brain activity recordings can help unravel the mechanisms underlying complex behaviors and pathologies. Ideally, both neuronal activity and metabolic events are captured in the most natural conditions, when the subject is awake and freely moving. An increasing awareness exists that major issues of neurophysiology need to be addressed with such global approaches. For example, the basic mechanisms involved in functional network dynamics and pathologies including epilepsy can be deciphered only if the electrographic and metabolic components are sensed concomitantly<sup>1,2</sup>. However, the multiple feedback loops between electrographic and metabolic signals have mainly been tackled separately because of a lack of appropriate methods for accessing them together, thereby prompting the development of multimodal strategies.

In practice there is a compromise between the size of imaging field, time resolution, sensitivity, separability of processing and metabolism, and physical constraint on the animal. Electrophysiology and, as was more recently shown, optical techniques<sup>3,4</sup> can record neuronal activity in the mobile animal, yet sampling is limited by electrode size and light diffraction. In contrast, functional magnetic resonance imaging (fMRI) records brain-wide metabolism, with trade-offs in sensitivity and resolution and at the cost of subject immobilization or animal sedation<sup>1</sup>. Functional ultrasound imaging based on ultrafast Doppler processing (fUS) offers a way to monitor

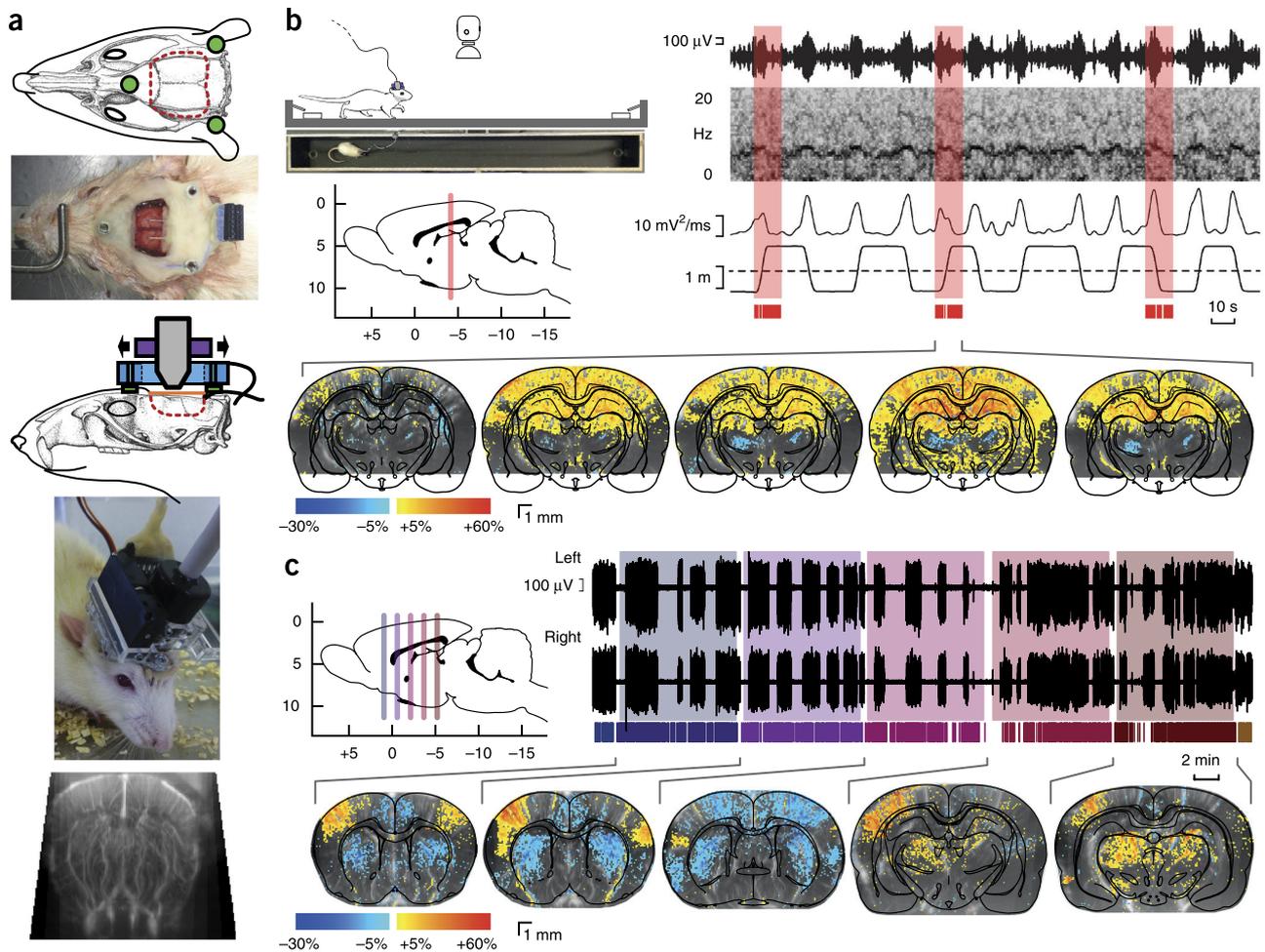
brain hemodynamics<sup>5,6</sup> and functional connectivity<sup>7</sup> in rodents with high spatiotemporal resolution and unique sensitivity. However, the limited transparency of the skull to ultrasound waves necessitates the removal of the bone and application of the ultrasound probe directly above the tissue, bathed in ultrasound-conductive saline, in an immobile, anesthetized animal.

To unfold the potential of fUS, we extend the technique to awake and mobile rats (mobile fUS, mfUS). Furthermore, we combine recording of cerebral hemodynamics at high spatiotemporal resolution and sensitivity with simultaneous monitoring of neuronal activity through EEG. Our integrated experimental setup relies on a set of technological advances: an ultrasound-permeable skull prosthesis; a lightweight ultrasound probe; a motorized head-mounted probe holder; an electrode implantation procedure; and a software environment for synchronized acquisition, playback and analysis of these multimodal signals.

We present the details of this experimental framework below (Fig. 1) and then demonstrate two applications (Fig. 2). We first searched for the functional correlate of theta rhythm, involved in brain area communication during spatial navigation tasks<sup>8</sup>. Second, we explored the neuronal and metabolic manifestations of spontaneous generalized, nonconvulsive, absence epilepsy seizures, as their initiation and generalization across brain areas remain debated questions<sup>9–11</sup>.

To prepare rats for mfUS, we developed a new surgical procedure (Supplementary Figs. 1 and 2) that allows for chronic recording sessions (Fig. 1a). Craniotomy of the parietal and frontal skull bones (15 mm anteroposterior (AP) × 14 mm medio-lateral (ML)) exposed the dura mater. For EEG purposes, we implanted intracranial stereotaxic electrodes, either hippocampal (Supplementary Fig. 3) or cortical, and anchored them at the edges of the window, with their connector fixed to the back of the head. Finally, a polymer prosthesis was sealed in place of the removed skull. Polymethylpentene film of 125- $\mu\text{m}$  thickness offered the best image quality compared to polyvinyl chloride, polyoxymethylene, Udel polysulfone and polycarbonate, for available thickness in the range of 75–250  $\mu\text{m}$ , and provided good mechanical resistance and low permeability. Thus, we could access the cortex and deep structures with a larger and deeper field of view and improved sensitivity over those provided by earlier cranial thinning procedures<sup>7</sup>. Three nuts used as attachment points for the probe holder were sealed above the nasal bone and lateral to the interparietal bone, and the animal was allowed to recover. For ultrasound recordings, we used a miniature ultrasound probe (18-mm radius, 25-mm height) mounted on a lightweight head-anchored adjustable holder (18 g; Supplementary Figs. 4 and 5).

<sup>1</sup>Institut de Biologie Paris-Seine, INSERM U1130, CNRS UMR 8246, University Pierre et Marie Curie UMCRI18, Paris, France. <sup>2</sup>Institut des Neurosciences Translationnelles de Paris, Paris, France. <sup>3</sup>Ecole Doctorale Frontières du Vivant (FdV), Programme Bettencourt, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. <sup>4</sup>Institut Langevin, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris ParisTech, Paris Sciences et Lettres Research University, CNRS UMR 7587, INSERM U979, Paris, France. Correspondence should be addressed to I.C. (ivan.cohen@upmc.fr).



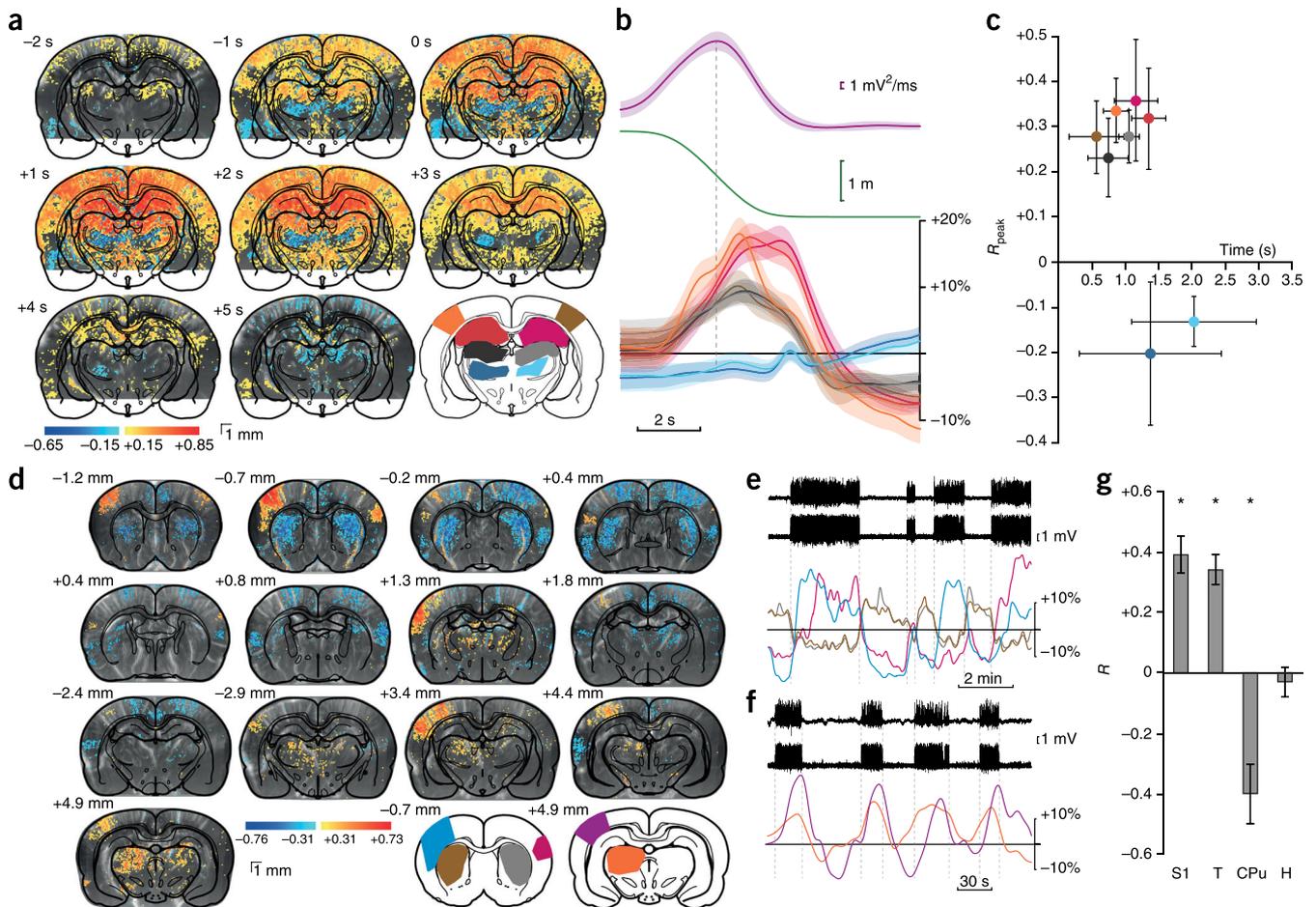
**Figure 1** | Awake mobile EEG-FUS procedure and acquisition protocols. **(a)** Surgical procedure and probe setup. Schematic representation of window boundary (red dotted line), prosthetic skull (orange), attachment nuts (green), probe holder (blue), motor (purple) and probe (gray); surgery outcome with added hippocampal stereotaxic electrode and EEG connector; animal equipped with motorized translation stage; and raw mfUS view through the prosthesis. **(b)** Burst-mode acquisition for maze experiments. Left, schematic of the maze, water reward sites and overhead camera. An atlas side view, with the coronal imaging plane (red) is shown below. Right, EEG-behavior recording chart, with, from top to bottom, hippocampal local field potential, short-term Fourier transform spectrum and power in the theta band. The lower trace shows position along the maze; bottom red bars indicate timing of FUS images. Mid-maze crossing is indicated by the dotted line. The red shading represents the 12-s frames of FUS acquisition. Bottom, coronal ultrasound images acquired at high speed are averaged ( $n = 25$  runs) for an example of five consecutive times around the reference. Color-coded overlay on vascular background shows pixel intensity change relative to baseline rest. Ventral areas were not acquired to increase burst duration. **(c)** Continuous-mode acquisition for seizure recording. Spontaneous generalized absence seizures are recorded from bilateral EEG. The fUS image trigger mark is shown below the EEG signal. Coronal planes (bottom) were acquired successively for 10 min each. Each color corresponds to a coronal plane. Color-coded overlay on vascular background shows pixel intensity change relative to baseline outside seizure. In **b, c** the changes in pixel intensity relative to baseline are shown where  $P < 10^{-2}$  (Student's  $t$ -test with Bonferroni correction). Brain outlines are from the Paxinos-Watson atlas<sup>19</sup>, Academic Press.

The device was fixed to the head while the animal was under short isoflurane anesthesia, with contact gel applied between the probe and prosthetic skull. The holder was motorized (**Supplementary Fig. 6**) to explore consecutive planes, without direct interaction between the experimenter and the animal, and could be locked for maximum stability.

We first recorded from rats walking along a linear maze to address how brain-wide networks activate during periods of hippocampal theta rhythm, which is a major mechanism proposed for intracerebral cross-area processing in episodic memory and spatial navigation tasks<sup>8</sup>. Healthy Sprague Dawley rats ( $n = 8$ ) ran on a 2.25-m-long, 0.2-m-wide linear track to obtain a water reward. A single ultrasound imaging plane included the dorsal hippocampus, cortex with somatosensory areas, and thalamus. In order

to temporally resolve hemodynamics as the animal crossed the maze, we used a 'burst-mode' ultrasound sequence (**Fig. 1b** and **Supplementary Fig. 7**), acquiring fUS compound frames at 500 Hz for 12 s. Acquisition was triggered when the animal turned around, and it was followed by a 40-s lapse to collect the data. For EEG recordings, we used hippocampal electrodes during this set of experiments. As expected, hippocampal theta was consistently associated with locomotion. Distance traveled over time was shorter (56–64%) than in control untethered, surgery-free rats ( $P < 10^{-6}$ ; **Supplementary Fig. 8a,b** and **Supplementary Tables 1** and **2**). Yet, maximum speed was only slightly slower for the initial 15 min, with a nonsignificant ( $P = 0.6$ ) difference of 1% thereafter.

In this experiment, single-pixel variations in the fUS images, relative to average baseline when the animal was at rest, ranged



**Figure 2** | Comparison of EEG and hemodynamic signatures of natural events. (a–c) Maze experiment cross-correlation between local field potential theta-band power and ultrasound signal for each pixel at varying time lag (–2 to +5 s) over  $n = 20$  midline crossings acquired in 1 h. (b) Region variation of hemodynamic signal, relative to rest, is obtained by spatial averaging of pixels indicated on atlas layout (solid lines and envelopes, mean  $\pm$  s.d.). Purple, theta power; green, trajectory; other colors correspond to colored regions in a. The vertical dotted line shows the reference midline-crossing time. (c) Value and delay of peak Pearson's correlation coefficient ( $n = 6$  animals, mean  $\pm$  s.d.). (d–g) Epilepsy experiment cross-correlogram between mfUS image and seizure, at zero time lag, for successive coronal planes. (e, f) mfUS signals in the areas color-marked on atlas layouts (a) were averaged and displayed together with the EEG recordings. (g) Perfusion averaged over significant areas ( $n = 6$  animals, mean  $\pm$  s.d., Student's *t*-test, \*  $P < 0.001$ ). In a, d the cross-correlation Pearson's *R* coefficient is color coded according to the scales below. Significant pixels are shown for  $P < 10^{-2}$  (Student's *t*-test with Bonferroni correction). S1, somatosensory cortex; T, thalamus; CPu, caudate putamen; H, hippocampus.

from –30% to +60% (Fig. 1b), whereas brain area averages reached –10% to +20% (Fig. 2b). As expected, theta-band intrahippocampal EEG power peaked at top animal speed, which was coincident with crossing the middle of the maze, with a mid-height theta peak width of  $3.2 \pm 0.3$  s ( $\pm$ s.d.,  $n = 8$ ). In order to quantify functional activation during the task, we computed the maps of Pearson's correlation coefficient between power in the theta band and pixel intensity, for varying time lags (Fig. 2a). Averaging pixels across anatomical areas revealed hyperperfusion in the somatosensory cortex, dorsal thalamus and hippocampus, and hypoperfusion in the ventral thalamus. These correlations were consistent with fUS signal time course (Fig. 2b). Hyperemia peaked at 0.7–1.5 s following the peak of hippocampal theta, which is consistent with signaling cascades that adapt blood flow to cognitive demand during the task<sup>12</sup>. The occasional asymmetry that we observed between the left and right cortical hemispheres may correlate with functional dominance<sup>13</sup>. Overall (Fig. 2c), our data reveal a pattern of combined hippocampal and wide-spread cortical activation in a short time window together with

coordinated thalamic suppression during the navigation task. This pattern is consistent with observations in alert and still animals, in the context of a conditioning protocol<sup>14</sup>. In these instances, thalamic activity is suppressed during hippocampal-cortical interaction involved in episodic memory operations. In the present locomotion task, the dorsal thalamus was activated while the ventral thalamus was suppressed simultaneously.

In a second experiment, we scanned through the brain of an epileptic rat to address the heterogeneous alterations in neuro-metabolic coupling during hypersynchronous seizure activity<sup>2</sup>. We recorded spontaneous generalized absence seizures from bilateral cortical bipolar electrodes in genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS,  $n = 12$ ). We quantified both the relative time spent seizing and seizure duration, and we found no significant ( $P = 0.3$  and  $P = 0.98$ , respectively) difference between EEG only and EEG-mfUS conditions (Supplementary Fig. 8c,d and Supplementary Table 3). For this experiment, we used 'continuous-mode' ultrasound acquisition (Fig. 1c and Supplementary Fig. 7), alternating between 200 ms to acquire

one compound mfUS image and 2.8 s of processing. Multiple imaging planes were scanned for 10–15 min each.

In this experiment, we also found individual pixel changes ranging from –30% to +60%, relative to seizure-free baseline (Fig. 1c), whereas averaging over seizure-associated areas revealed changes from –10% to +20% (Fig. 2e,f). We found distinct patterns of correlation across structures along the AP axis. Hyperperfusion in the somatosensory cortex and thalamus was concomitant with hypoperfusion in the caudate putamen and no variation in the hippocampus. Although absence seizures are generalized throughout neocortex, vascular alterations showed spatial compartments, and lateralization in the frontal primary sensory cortex perfusion was observed in half of the animals (6/12 rats). Furthermore, the sensitivity of mfUS enabled the observation that consecutive seizures with a similar bilateral cortical EEG profile could display a distinct bilateral or unilateral perfusion course (Fig. 2e). Comparing the dynamics of cortical and thalamic areas coupled to seizure (Fig. 2f) revealed synchronous oscillations in the perfusion pattern. Thus, the responses we observed across anatomical structures (Fig. 2g) are compatible with EEG-fMRI experiments that found inverted electrographic-hemodynamic coupling between the cortex and caudate putamen<sup>15</sup> and with time-resolved EEG–near-infrared spectroscopy experiments indicating blood flow fluctuations around seizures initiation<sup>16</sup>. Having superior temporal and spatial resolution among these techniques, mfUS further points to cortical decoupling between electrographic activity and perfusion, with both static and transient components, in naturally occurring seizures.

We have developed a methodology that captures the hemodynamic state of the brain over its whole depth along with its electrographic activity in awake, mobile rats over repeated and prolonged periods of time. Despite the small size and weight of the probe, holder and cable, the system limits the distance and environment that the animal can explore, similarly to multi-channel microdrive tetrode systems. Another limitation is a potential contribution of a locomotion effect to brain perfusion, for instance due to higher heart rate during running. Absence seizures correspond to animal freezing and still showed strong variations in hemodynamics. Furthermore, such a locomotion effect is expected to be uniform across brain areas, but we found both increases and decreases in perfusion, even in the running task. Thus, we exclude a locomotion effect in the tasks presented here, although it may become apparent during intensive locomotion activity.

We demonstrated how this methodology applies to both cognitive and pathological questions. Thus, substantial progress was achieved in observing the interplay between metabolism and neuronal electrical activity that governs global brain equilibrium. Whereas current plane-by-plane imaging could be adapted to address questions such as hippocampal–prefrontal cortex interaction<sup>17,18</sup> by rotating the probe from the current coronal orientation, synchronous volumic acquisition will become possible with future matrix-type probes. As it develops,

mfUS imaging will become applicable to a wide range of protocols including complex behavioral tasks in healthy animals and neurovascular pathologies.

## METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

*Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.*

## ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge E. Yeramian and A. Bonnot for critical discussions and help with the manuscript. The research leading to these results has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013)/ERC grant agreement no. 339244-FUSIMAGINE. This work was also partly supported by the Agence Nationale de la Recherche under the program “Future Investments” with the reference Laboratory of Excellence ANR-10-LABX-24 LABEX WIFI within the French Program “Investments for the Future” under reference ANR-10-IDEX-0001-02 PSL, the program “Investissements d’avenir” ANR-10-IAIHU-06 and a PhD fellowship from the University Paris Diderot FdV Bettencourt PhD program.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.-A.S. designed the surgical procedure and prosthetic skull and performed and analyzed epilepsy experiments; A.B. designed the intrahippocampal recording procedure and performed and analyzed navigation experiments; E.T. and T.D. developed the burst-mode ultrasound recording sequence; M.P. and J.-L.G. developed the continuous-mode ultrasound recording sequence; J.-L.G. and M.T. designed and supervised the ultrasound scanner and probe; I.C. designed and supervised the experiments, designed the probe holder, and programmed acquisition and analysis software; I.C., L.-A.S. and A.B. wrote the paper.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Logothetis, N.K. *Nature* **453**, 869–878 (2008).
2. Sada, N., Lee, S., Katsu, T., Otsuki, T. & Inoue, T. *Science* **347**, 1362–1367 (2015).
3. Kerr, J.N. & Nimmerjahn, A. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 45–53 (2012).
4. Packer, A.M., Russell, L.E., Dalgleish, H.W. & Häusser, M. *Nat. Methods* **12**, 140–146 (2015).
5. Macé, E. *et al. Nat. Methods* **8**, 662–664 (2011).
6. Macé, E. *et al. IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **60**, 492–506 (2013).
7. Osmanski, B.F., Pezet, S., Ricobaraza, A., Lenkei, Z. & Tanter, M. *Nat. Commun.* **5**, 5023 (2014).
8. Buzsáki, G. & Moser, E.I. *Nat. Neurosci.* **16**, 130–138 (2013).
9. David, O. *et al. PLoS Biol.* **6**, 2683–2697 (2008).
10. Zheng, T.W. *et al. Epilepsia* **53**, 1948–1958 (2012).
11. Jacobs, J. *et al. Neuroimage* **45**, 1220–1231 (2009).
12. Koehler, R.C., Roman, R.J. & Harder, D.R. *Trends Neurosci.* **32**, 160–169 (2009).
13. LaMendola, N.P. & Bever, T.G. *Science* **278**, 483–486 (1997).
14. Logothetis, N.K. *et al. Nature* **491**, 547–553 (2012).
15. Mishra, A.M. *et al. J. Neurosci.* **31**, 15053–15064 (2011).
16. Roche-Labarbe, N. *et al. Epilepsia* **51**, 1374–1384 (2010).
17. O'Neill, P.K., Gordon, J.A. & Sigurdsson, T. *J. Neurosci.* **33**, 14211–14224 (2013).
18. Brincat, S.L. & Miller, E.K. *Nat. Neurosci.* **18**, 576–581 (2015).
19. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 6th edn. (Academic Press, 2007).

## ONLINE METHODS

**Animal preparation.** All animals received humane care in compliance with the European Communities Council Directive of 2010 (2010/63/EU), and the study was approved by the institutional and regional committees for animal care. Male Sprague Dawley rats 10–12 weeks old and male GAERS rats (genetic absence epilepsy rats from Strasbourg) 8–16 weeks old underwent surgical craniotomy and implant of ultrasound-clear prosthesis. Anesthesia was induced with 2% isoflurane and maintained by ketamine/xylazine (80/10 mg per kg body weight), while body temperature was maintained at 36.5 °C with a heating blanket (Bioseb). A sagittal skin incision was performed across the posterior part of the head to expose the skull. Parietal and frontal flaps were excised by drilling and gently moving the bone away from the dura mater. The opening exposed the brain between the olfactory bulb and the cerebellum, from bregma +6 to bregma –8 mm, with a maximal width of 14 mm. Electrodes were implanted stereotaxically and anchored on the edge of the flap. A plastic sheet of polymethylpentene (PMP) was sealed in place with acrylic resin (GC Unifast TRAD), and residual space was filled with saline. We chose a prosthesis approach that offers a larger field of view and prolonged imaging conditions over 1–2 months compared to the thinned-bone approach<sup>7</sup>. Particular care was taken not to tear the dura in order to prevent cerebral damage. The surgical procedure, including electrode implantation, typically took 4–6 h. Animals recovered quickly, and after a conservative 1-week resting period, they were used for data acquisition.

In order to attach the ultrasound probe and connect the EEG electrodes before a recording session, rats underwent short anesthesia for 20–25 min with 2% isoflurane. Acoustic gel was applied on the skull prosthesis, and then the probe was inserted into the holder. The gel did not dry out even for extended recordings of up to 6–8 h. Animals were allowed to recover for 30 min before the recording session started.

**Electrodes.** The electrodes we used are based on regular polytrodes made of bundles of insulated tungsten wires, either multisite (for hippocampal theta) or bipolar (for epilepsy). The difference from standard design is the right-angle elbow that is formed before insertion in the brain (**Supplementary Fig. 2**). This shape allows us to anchor the electrodes on the skull anterior or posterior to the flap. Electrodes were implanted with stereotaxic-positioning micromotion and anchored one after the other; then the plastic film was applied to seal the skull. Two epidural screws placed above the cerebellum were used as reference and ground.

The intrahippocampal handmade theta electrode bundles are composed of 25- $\mu$ m insulated tungsten wire, soldered to miniature connectors (**Supplementary Fig. 3**). Four to six conductive ends were spaced by 1 mm and glued to form 3-mm-long, 50- $\mu$ m-thick bundles. The bundles were lowered in dorsal hippocampi at stereotaxic coordinates AP = –4, ML =  $\pm$ 2.5, DV = –1.5 to –4.5, in mm relative to bregma. Hippocampal theta rhythm was confirmed by phase inversion across recording sites in successive hippocampal layers, time-frequency decomposition, and coincidence with periods of exploration and navigation.

Cortical electrodes for absence epilepsy recordings comprised four bipolar electrodes implanted in the primary somatosensory cortex: S1BF = AP –3, L  $\pm$  5, DV –1.75 and S1Lp = AP +1, L  $\pm$  6, DV –2, in mm relative to bregma.

**Skull prosthesis.** The prosthetic skull was composed of PMP (Goodfellow), a standard biopolymer used for implants. This material has tissue-like acoustic impedance, which allows undistorted propagation of ultrasound waves at the acoustic gel–prosthesis and prosthesis–saline interfaces. The prosthesis was cut out of a film of 125- $\mu$ m thickness and sealed to the skull with resin.

**Animal behavior.** Animals for the maze experiment were trained before surgery. They were placed under a controlled water-restriction protocol (weight between 85% and 90% of the normal weight) and trained to run back and forth in a long rectangular maze for water reinforcement. The maze (225 cm  $\times$  20 cm) had 5-cm-high lateral walls and was placed 50 cm above ground. Drops of water were delivered through two small tubes coming out from the two end walls of the maze (**Fig. 1b**). Each time the animal crossed the maze, a single drop of water was delivered in alternate water tubes by opening an electronically controlled pair of solenoid valves. Daily training lasted 30 min. Rats took about two sessions to reach a score of 60 maze travels and perform reliably, crossing the mid-maze at fast speed, but training was reinforced for at least two more days. Daily recording sessions lasted 20–30 min, depending on animal motivation. Because the acquisition in burst mode required 40 s for image reconstruction from ultrasound echoes, we could not capture every run. The number of runs acquired ranged from one-fourth to one-half of all the runs, depending on animal performance and the timing of its spontaneous runs within the session. The data analyzed here were recorded in 12 sessions performed across 8 d. Epileptic animals were recorded in a regular housing cage with the cover removed.

**Miniature ultrasound probe.** The Ultrasonic probe (Vermon) is a linear array made of 128 transducers working at a 15-MHz central frequency (spatial pitch, 0.11 mm; transducer element, 2.000  $\times$  0.110 mm<sup>2</sup>; bandwidth, 46% at –6 dB, corresponding to 11–18 MHz). Image resolution is 0.110  $\times$  0.110 mm<sup>2</sup>. This probe has an acoustic lens with an elevation focal distance of 8 mm and an elevation focal width of 400  $\mu$ m, corresponding to the thickness of the imaging plane. The active part is embedded in 18.5-mm-diameter and 25-mm-length molded resin. A 150-cm cable length and 12-g probe weight ensure a good freedom and comfort to move for the animal. Compared to in previous work<sup>5,7</sup>, the probe was miniaturized (**Supplementary Fig. 1**). Dimensions (in cm) were reduced from 15 (height), 6 (width), 2.5 (thickness) to 2.5  $\times$  1.85  $\times$  1.85. The weight (in g) was reduced from 250 to 12. The cable was made more flexible by reducing its diameter from 11.5 mm to 6.9 mm. All these improvements did not affect sensitivity of the transducer array and were required to perform such experiments on moving animals.

Penetration of the ultrasound waves across 15 mm of rat brain allowed us to image the rat brain at all depths (as shown in **Fig. 1a**, bottom image). More generally, depth of penetration decreases with higher frequencies (smaller wavelength), while resolution simultaneously increases. Thus, there is a trade-off between resolution and depth of penetration, and 15 MHz is optimal for rat brain.

Although we designed the probe, it was manufactured by specialist company Vermon. Interested labs are welcome to contact us to share our customized probe design considerations.



**Probe holder.** The holder was made of two parts machined in Plexiglas for light weight and stiffness. First, a base plate with U-shaped side grooves, allowing translation of the mobile part, was attached to the head of the animal with three screws. Second, the mobile part presenting two sliding side edges was fitted into the base part. The probe was attached through a central opening in the mobile part. A linear servo motor (VS-19, Robotshop) was fixed to the mobile part and anchored on the base plate. It was controlled by custom-made electronics connected to the ultrasound scanner through USB port. Holder weight was 18 g, and overall size was 41-mm width, 34-mm length, 16-mm height. Digital information to reproduce the parts is provided as **Supplementary Data**.

The motor of the probe holder was controlled in steps of 125  $\mu\text{m}$ . Motor accuracy was better than one step. The time to travel the range of 15 mm was about 2 s. There is no need for faster motion of the motor. Rather, when hemodynamics of distinct anatomical structures have to be compared, a better strategy is to rotate the probe to image a plane encompassing those structures. The current experimental limit for imaging lies not in drifts or instability of the electromechanical system but rather in the eventual leak in the prosthetic skull, generating gas bubbles that degrade imaging. This happens several weeks and up to 2 months after surgery.

**Ultrasound imaging.** Vascular images were obtained via the ultrafast compound Doppler imaging technique<sup>5,20</sup>. The probe was driven by a fully programmable GPU-based ultrafast ultrasound scanner (Aixplorer, Supersonic Imagine) relying on 24-GB RAM memory. In burst mode we used an acquisition sequence of 6,000 frames at a rate of 500 Hz for a total acquisition time of 12 s. A manual trigger was given when the animal finished drinking water and turned around in position for the next run. In the continuous mode, we acquired 200 ultrasound images at 1-kHz frame rate for 200 ms, repeating every 3 s. In both burst mode and continuous modes, each frame is a compound plane-wave frame, that is, a coherent summation of beamformed complex in phase/quadrature images obtained from the insonification of the medium with a set of successive plane waves with specific tilting angles<sup>21</sup>. This compound plane-wave imaging technique enabled us to recreate a posteriori a good quality of focalization in the whole field of view with very few ultrasound emissions. Given the trade-off between frame rate, resolution and imaging speed, a plane-wave compounding using five 5°-apart angles of insonification (from  $-10^\circ$  to  $+10^\circ$ ) was chosen. As a result, the pulse repetition frequency (PRF) of plane wave transmissions was equal to 8 kHz. In order to discriminate blood signals from tissue clutter, we high-pass-filtered the ultrafast compound Doppler frame stack using a fourth-order Butterworth filter (cutoff frequency, 50 Hz) along the temporal dimension, giving a high frequency in phase/quadrature frame stack whose energy in each pixel we then computed to build the ultrafast power Doppler fUS image. Some frames were discarded before being incorporated in a recording when they showed artifact echoes, which are caused by the animal bumping the probe against a hard surface such as cage or maze wall.

The signal measured by fUS and its sensitivity are presented in earlier theoretical and experimental work<sup>6</sup>. Briefly, fUS measures moving echogenic particles, that is, red blood cells, and thus corresponds to cerebral blood volume (CBV). Importantly, this

proportionality is valid only if backscattering properties do not vary versus time. This assumption is valid while red blood cells backscattering properties such as hematocrit and shear rate remain time invariant, which is most likely.

**Ultrasound sequences.** Technical specifications of the scanner used here include 16 $\times$ , 6 GB/s PCI express bus, 12 core 3-GHz Xeon processor, NVidia Quadro K5000 GPU with a bus at 173 GB/s, providing 2.1 teraflops. One current limitation of fUS is due to the transfer and processing time of the large amount of data required to form ('beamform') fUS images. Yet, this limitation does not stem from physical principles but rather from contingent hardware. Although increasing computing power and optimized software provide perspective for continuous monitoring at high speed (200 ms per image), the current technology allows continuous recording with a temporal resolution close to the time constant of neurovascular coupling (1–2 s) and further allows 'burst' capture for quick behavioral events such as running a maze (**Supplementary Fig. 7**). The limitation for the continuous mode is the processing speed to transform a series of plane-wave acquisitions into compound images and then generate a fUS image. The limitation for the burst mode is the memory available to buffer plane wave images to later generate a movie of fUS images. Detailed codes and software for fUS acquisition are described in ref. 5. Additional Matlab code for the Doppler processing is included in **Supplementary Software 1**.

**Ultrasound stability and reproducibility.** Stability during a recording session and across sessions is estimated from our recordings. Variation during a recording is exemplified in **Figure 2b**, with narrow s.d. around average traces. This indicates good stability during a recording session. Reproducibility across recordings is quantified in **Figure 2c,g**, which summarize measures across all animals. It shows a good reproducibility.

We cannot completely exclude a contribution of a locomotion effect—for instance, due to higher heart rate during running. However, the maze task is not limited to running, as it involves navigation processing. Animals showed a learning curve when they were trained for the task. Furthermore, a locomotion effect would likely be uniform across the brain, whereas we found both increases and decreases in blood perfusion. Thus, such a potential effect is not strong enough to mask differential changes and dynamics across areas. Our animals did not engage in intensive motor activity, at least not above the requisite for most cognitive and pathology experiments. GAERS rats' seizures correspond to freezing behavior, and yet again they exhibited increases and decreases of similar amplitude compared to moving animals. This further supports that the technique can sense changes in perfusion unrelated to a locomotion effect.

**EEG acquisition.** Intracranial electrode signals were fed through a high input impedance, DC-cut at 1 Hz, gain of 1,000, 16-channel amplifier and digitized at 20 kHz (Xcell, Dipsi), together with a synchronization signal from the ultrasound scanner. Custom-made software based on Labview (National Instruments) simultaneously acquired video from a camera pointed at the recording stage.

Contrary to fMRI, which generates a strong magnetic field, there is no such cause for artifact with ultrasound. A regular amplifier

was used, and no additional electronic circuit for artifact suppression was necessary. A large-bandwidth amplifier was used, which can record both local field potentials (LFPs, 0.1–200 Hz) and multi-unit activity (MUA, 200–2,000 Hz), although we did not need this later feature in the work presented here. The spatial resolution of LFPs remains controversial depending on recording location and parameters, with estimates ranging from 250  $\mu\text{m}$  to several millimeters in radius. MUA radius of detection is around 70–200  $\mu\text{m}$ .

**Analysis algorithms.** In order to analyze series of track-crossing trials, we aligned them by setting each trial reference time when the rat crossed the middle of the maze. Animal position was detected by applying a threshold on the image pixel intensity that distinguished the bright animal on dark background. Cumulative distance and maximum crossing speed were computed using the trajectory smoothed with a time constant of 0.5 s.

Ultrasound images were normalized according to the average value over all the nonrunning or nonseizing time, thus giving the relative change in vascular echo in percent of baseline. Paxinos-Watson atlas<sup>19</sup> images were superimposed using the cortex as the main landmark. Statistical significance on images used Bonferroni correction to account for the multiple testing over the large number of pixels.

EEG signal was filtered with a 6- to 9-Hz pass-band for hippocampal theta. The power of theta was computed as the square of the EEG signal integrated over a sliding window with characteristic width of 0.5 s.

Epileptic seizures were detected when EEG electrodes presented at least 3 s of spike wave at a rate above 5 Hz, whereas a spike-wave interval of 3 s discriminated consecutive seizures. Seizures were defined using the EEG signal alone and were always bilateral. Because we used bipolar recording that ensured locality of the EEG signal close to each recording bipolar electrode, and as it is well accepted, the electrographic signs of these seizures are bilateral. In **Figure 2d** we show in color code the Pearson's correlation coefficient between EEG-defined seizures and pixel intensity. This is how we determined the vascular correlate of seizures, which often appears to be asymmetric, contrary to the EEG.

Computation of Pearson's  $R$  correlation coefficient between EEG signal and mfUS pixel intensity was based on the theta power

curve for the maze experiment. For the epilepsy experiment, pixel intensity was correlated to the seizure status function (1 inside seizure, 0 outside). Statistical testing was performed on Pearson's  $R$  coefficient using Student's  $t$ -distribution.

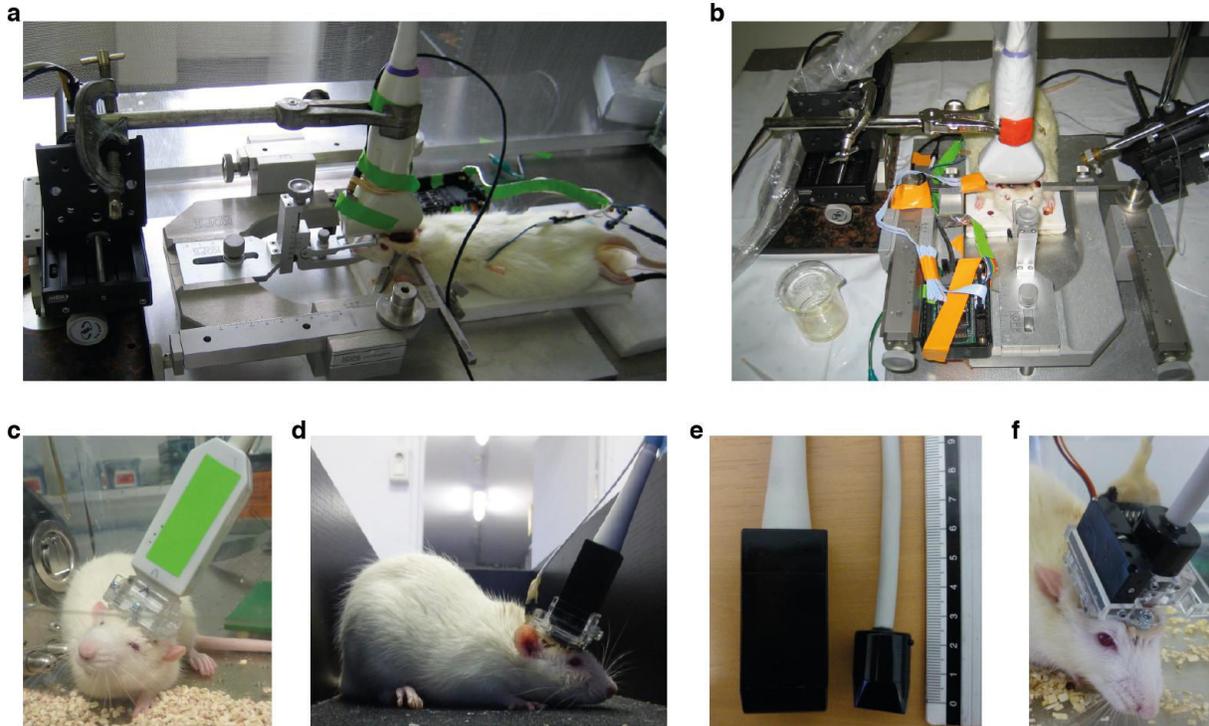
**Statistics.** We chose sample sizes that gave consistent estimates of distance traveled over time, maximum speed and seizure pattern. The number of animals (above 15), maze crossings (above 100), seizure recording sessions (18 and 65) and seizures (above 800) are sufficiently large to test these distributions with small s.d./mean. The effect of the recording procedure is very significant, although our point is that it is of small amplitude. In **Figure 2** we stopped counting recordings when we realized that the distributions also had small coefficients of variation. The other figures did not require statistical testing.

For control experiments in **Supplementary Figure 8**, all our available data were pooled, as the numbers are routinely generated by our analysis software. For **Figure 2c,g** we stopped counting when we realized that the measures converged quickly, so that including more recordings did not change the results. This is a general preestablished criteria.

Experiments did not require randomization. Because quantification was performed by automated computer analysis, there was no need for blinding to group allocation. All statistics are given as mean  $\pm$  s.d.

**Code availability.** Data were collected from ultrasound and video-EEG devices for off-line processing. We implemented the analysis software with Labview, and we provide sample data and code archive as a **Supplementary Software 2**. Moreover, example Matlab code for all post-processing steps presented in the paper are included as well in **Supplementary Software 1**. Probe motor controller microcode is provided in the **Supplementary Note**. We suggest that interested labs contact us for further information about the algorithms.

- Montaldo, G., Tanter, M., Bercoff, J., Benech, N. & Fink, M. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **56**, 489–506 (2009).
- Bercoff, J. et al. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **58**, 134–147 (2011).



## Supplementary Figure 1

### Comparison of static and awake mobile fUS

The mfUS method is based on incremental improvements over functional ultrasound imaging on anesthetized rats.

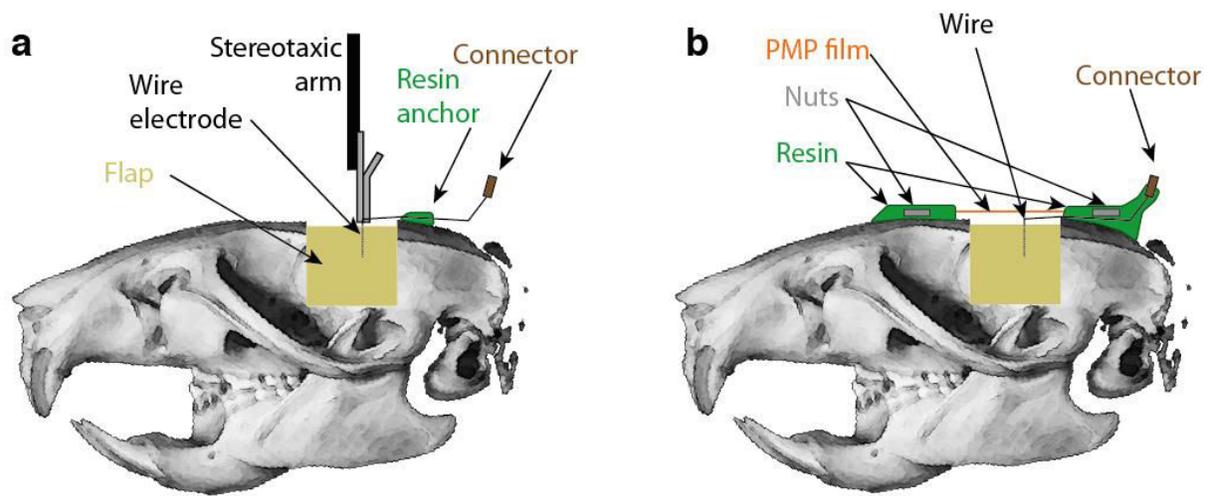
**(a, b)** show side and front views of static fUS on anesthetized rat with open or thinned-bone craniotomy<sup>5,7</sup>. The rat is sedated and fixed in a stereotaxic frame.

**(c)** the PMP prosthesis surgical procedure and a first downsized ultrasound probe provide images in awake condition although the animal is highly constrained by the weight of the probe.

**(d)** a second generation, smaller and lighter, probe allows the animal to move and EEG to be recorded.

**(e)** comparison of second and third generation of probe show a further gain in size and weight.

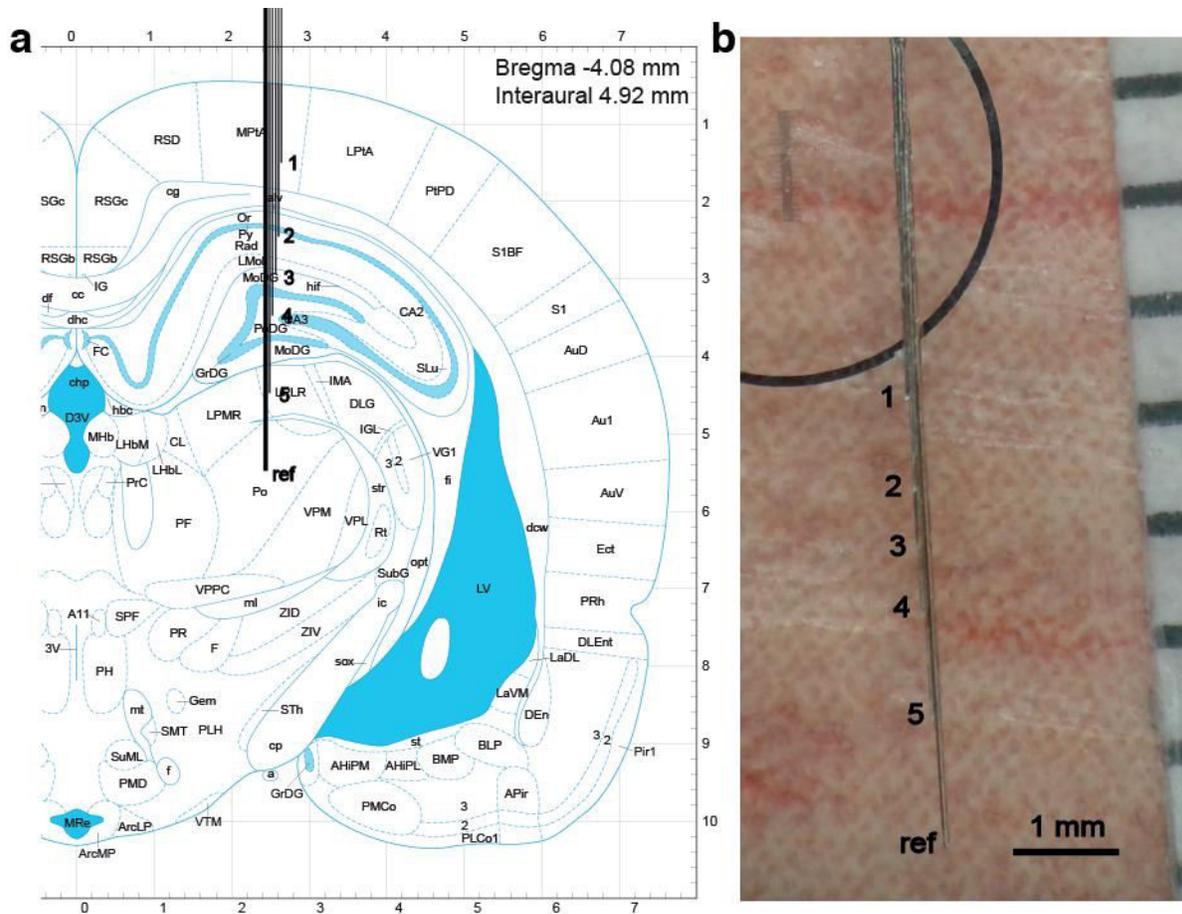
**(f)** miniature motorized design allows to scan multiple planes without directly interacting with the animal, while the mechanical constraint is minimal. All the navigation and epilepsy measures presented here were performed with this smaller design.



## Supplementary Figure 2

### Surgical procedure

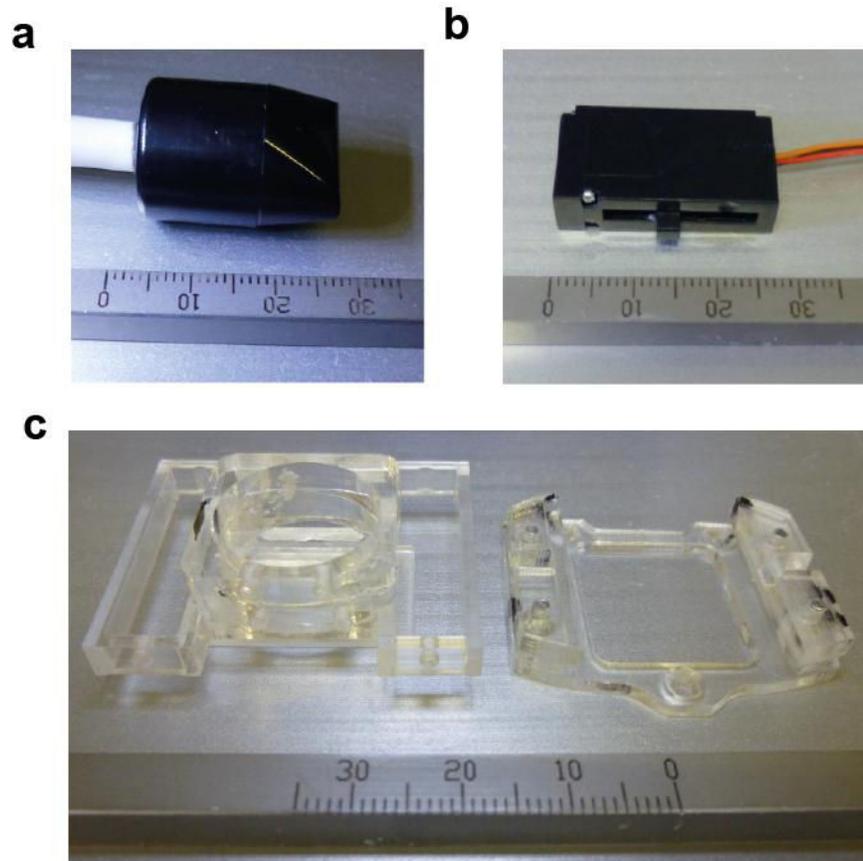
The surgical procedure to prepare the rat for simultaneous EEG and fUS recording proceeds in successive steps. First, a large bone flap is removed. Then electrodes are moved to the target position by stereotaxic micromotion, and they are anchored to the edge of the flap with a droplet of resin (**a**). For clarity, only one electrode is shown. Following sequential insertion of all the electrodes, the skull is replaced by an ultrasound clear prosthesis made of PMP. Finally, the prosthesis is sealed to the skull with resin and nuts are embedded in the resin for later attachment of the probe holder (**b**).



**Supplementary Figure 3**

### Hippocampal electrodes

Hippocampal electrodes are made from a bundle of insulated tungsten wires soldered to a miniature connector at one end. Under binocular control the 50  $\mu\text{m}$  reference electrode is juxtaposed with five 25  $\mu\text{m}$  recording electrodes. The wires tips are positioned at fixed spacing in order to reach anatomical structures encompassing the dorsal hippocampus (**a**) and they are glued with cyanoacrylate in the upper part of the bundle to avoid accidentally covering the recording tips. A millimeter scale and microscope scale slide (total length 1 mm) are used to precisely set the spacing. Atlas from Paxinos<sup>19</sup> (**b**). Differential recording from electrode tips 2-4, that show the typical theta band activation in relation with spatial navigation and phase reversal along the dorso-ventral axis are retained for analysis.

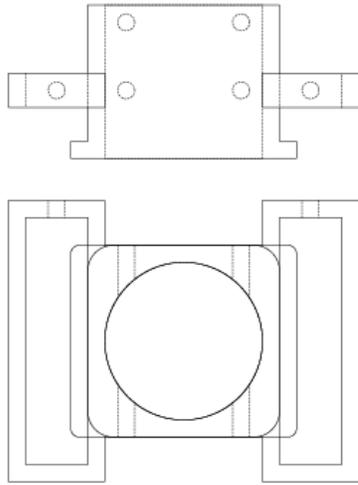


**Supplementary Figure 4**

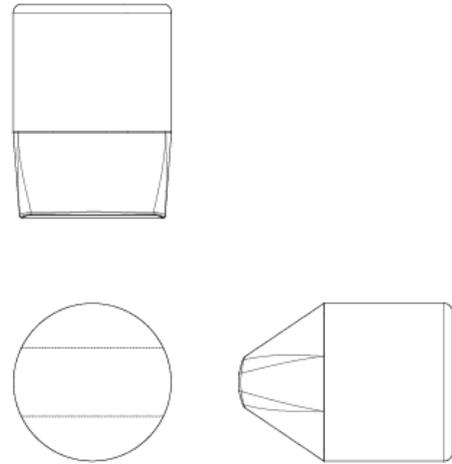
**Probe, holder and motor**

Photographs of the miniature ultrasound probe (a), micromotor (b). The probe holder (c) is composed of a plate fixed onto the head (right) and a translation stage (left).

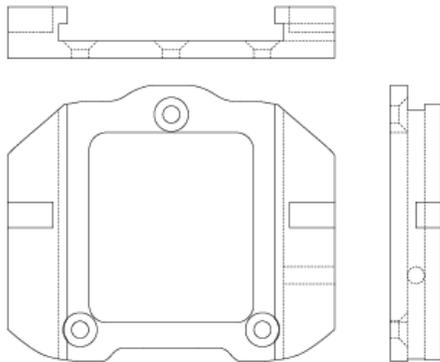
### Mobile part



### Probe



### Base plate

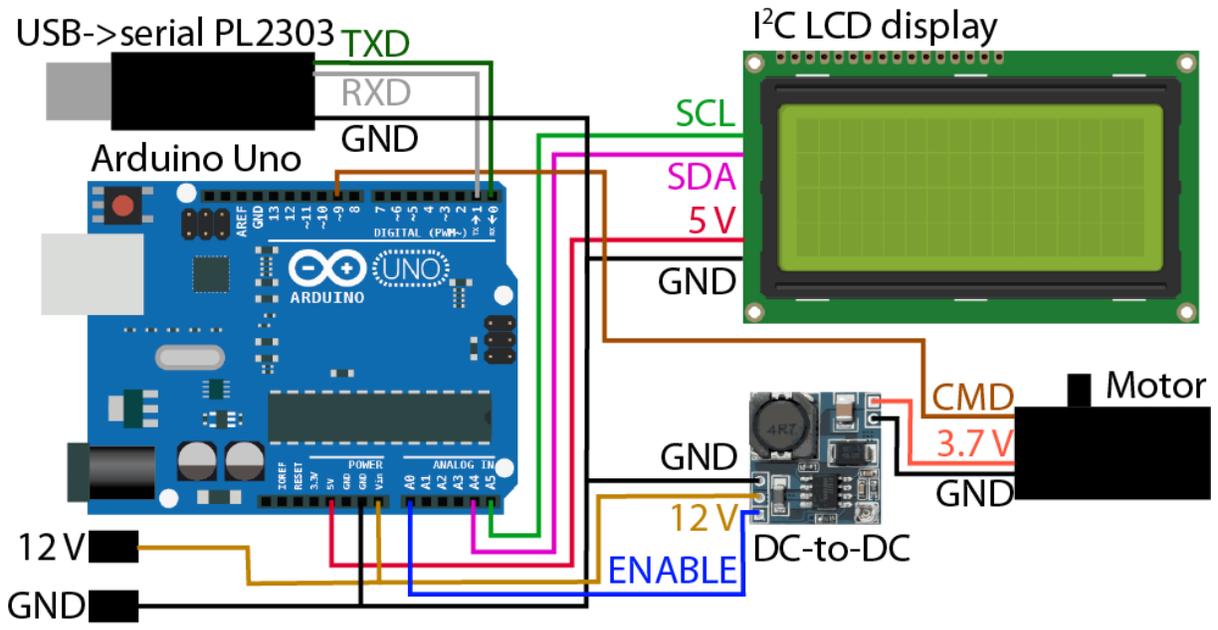


10 mm

### Supplementary Figure 5

#### CAD drawing of probe and holder parts

Front, side and top views of the base plate fixed to the head, mobile holder part and probe that fits into the mobile part. The base plate is attached to the head with M2 conical head screws. The probe and motor are secured with M2 headless screws. The sliding surface is lubricated with teflon spray. Digital information to reproduce the parts is provided as **Supplementary Material 1**.



Supplementary Figure 6

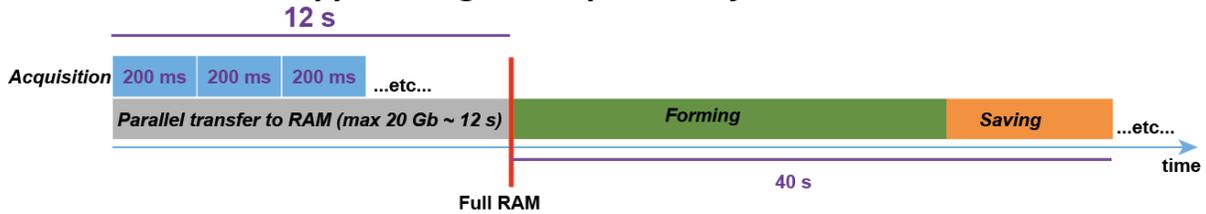
**Motor controller circuit**

The motor controller circuit is based on an Arduino Uno open-source electronic platform. Requests for mechanical translation are received from the ultrasound scanner through a USB to serial converter based on a PL2303 chip. The Arduino turns on a DC-to-DC step down converter through the "ENABLE" pin to power the servomotor with optimal 3.7V voltage. Simultaneously the position information is sent by PWM modulation to the command line. Motor power is turned off. An LCD provides status information. Arduino microcode is provided in **Supplementary Note**.

### « Continuous » mode : one 200 ms Doppler image sampled every 3 seconds



### « Burst » mode : Doppler images sampled every 200ms for 12 seconds



#### Supplementary Figure 7

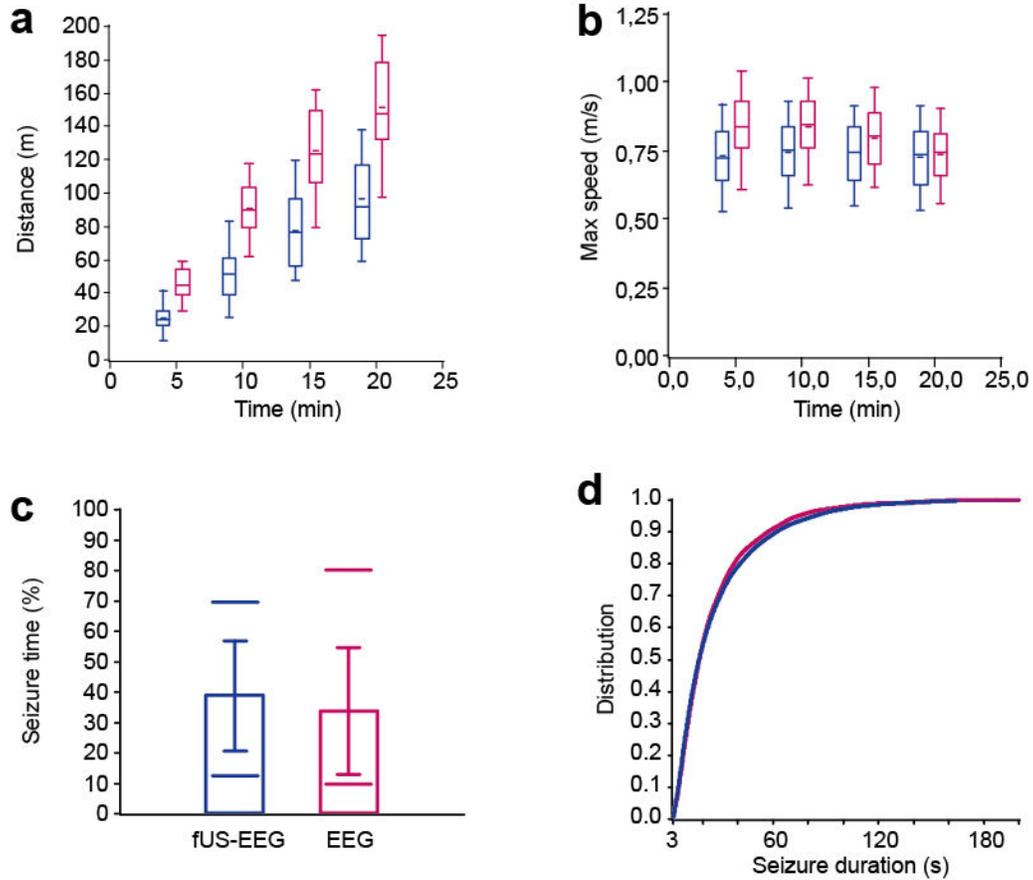
#### Comparison of "continuous" and "burst" modes

The continuous and burst modes make distinct usage of the ultrasound scanner acquisition and processing power. The main task is to transfer and process the large amount of high frequency plane wave scans into an fUltrasound images, which is saved as an array of single precision encoded pixel Power Doppler intensity corresponding to CBV. The reduction in data size is 1000 fold since 200 scans composed of repeats at 5 angles are used to generate one fUltrasound image.

The "continuous" mode has the advantage to permit acquisition of virtually unlimited duration. For this mode, the Ultrafast acquisition is set to form a single fUS image (200 ms). The transfer and processing time (here 2 seconds) limits the final rate of CBV maps.

The "burst" mode has the advantage to sustain the Ultrafast frame rate up to the filling of the RAM memories (here 12 s), allowing to capture short behavioral events such as maze crossing. CBV maps are reconstructed every 200 ms, but for this limited 12 s duration. Data is transferred in parallel with acquisition, and when buffer memory is full data is processed (40 s) to form a series of fUltrasound images. Thus duration of acquisition is limited by memory size, and interval duration is limited by processing speed.

The use of two modes is only due to technical limitations of current electronic boards of the ultrasound system. With improving bus technology and high end GPU boards it should be possible in theory today to build an Ultrafast ultrasound scanner with transfer and processing rates fast enough to work in the continuous mode during unlimited amount of time.



## Supplementary Figure 8

### Effect of recording procedure on running and seizures

(a, b) Maze experiment comparative distributions between mfUS-EEG (blue) and control untethered, surgery free, rats (red) show cumulative distance travelled in the maze is reduced by 36-44% while maximum speed is moderately reduced by 1-13%. Graphs show mean, median, center quartiles, 1 and 99 percentiles. (c, d) Genetic absence rats (GAERS, blue) show equivalent seizing time fraction and seizure duration distribution compared to EEG-only recordings (red). Graph c shows mean $\pm$  s.d., 1 and 99 percentiles.

Detailed statistics are given in the **Supplementary tables**.

## Supplementary Tables

**Table 1:** Maze travelled distance (m).

	5min	10min	15min	20min
mfUS-EEG	25.1+/-8.4 n=19	51.2+/-17.1 n=19	77.2+/-23.4 n=18	96.0+/-26.8 n=18
Untethered	44.7+/-9.2 n=21	90.8+/-17.3 n=21	125.1+/-26.1 n=21	151.3+/-31.5 n=21
p (Student)	2E-8	1E-8	7E-7	1E-6
ratio	56%	56%	62%	64%

Cumulative distance travelled over time, from the beginning of the task, for EEG-mfUS and surgery-free, untethered, control rats. The two groups performed significantly differently, with a ratio of performance around 60%. n is the number of animal, Student t-test.

**Table 2:** Maze maximum speed (m/s)

	0-5min	5-10min	10-15min	15-20min
mfUS-EEG	0.728+/-0.120 n=191	0.739+/-0.131 n=202	0.737+/-0.119 n=181	0.726+/-0.124 n=135
Untethered	0.835+/-0.132 n=430	0.834+/-0.122 n=448	0.789+/-0.121 n=326	0.732+/-0.106 n=245
p (Student)	<1E-8	<1E-8	3E-6	0.59 (NS)
ratio	87%	89%	93%	99%

Maximum speed during maze end-to-end walk for successive 5min time windows, for EEG-mfUS and surgery-free, untethered, control rats. The two groups performed slightly, yet significantly, differently for the first 15 min, with a ratio of performance in the range of 87%-93. After 15min the difference between the two groups fell to 1%, which is not significant. n is the number of maze crossing, Student t-test.

**Table 3:** Absence seizure pattern

	Recording seizure fraction (%)	Seizure duration (s)
mfUS-EEG	38.8+/-18.2 n=65	26.5+/-30.2 n=6372
EEG	33.7+/-20.1 n=18	26.4+/-34.3 n=875
p	0.31, NS (Student)	0.98, NS (Kolmogorov)

Comparison of EEG seizure patterns in epileptic rats, between craniotomized EEG-mfUS rats and controls without cranial window (EEG group). The recording seizure fraction counts the proportion of time exhibiting seizure over the whole recording session. Duration of all detected seizures is also compared. Both indicators of seizure pattern showed non significant differences between the two groups, supporting a minimal effect of the experimental procedure on seizure activity. For fraction of time in seizure, n is the number of recordings. For seizure duration, n is the number of seizures. Tests are respectively Student and Kolmogorov.

## Supplementary Note

### Holder motor controller microcode

```
// Servo motor control from serial connection
// Ivan Cohen, 2015, INSERM U1130, Paris
/*
Circuit wiring:

  Arduino Uno

  Display:
  SDA pin A4
  SCL pin A5

  USB-serial adapter:
  GND
  RX1 pin 19
  TX1 pin 18

  Servo:
  PWM->pin9

  3.7V regulator:
  ENABLE->pin A0
*/
#include <stdlib.h> // for the atol function
#include <Servo.h> // servo control
#include <Wire.h> // I2C bus for display
#include <LiquidCrystal_I2C.h> // LCD display

LiquidCrystal_I2C lcd(0x27,20,4); // init LCD for a 20 chars and 4 lines

// define variables
Servo myservo;
char cmdbuffer[8]=" ";
int bufpos=0;
int thisChar=0;
int value=0;
char displaybuffer[20];
int i,valid;
int OnOffPin=A0;
int r;

// init Arduino
void setup() {
  // Open serial communications and wait for port to open:
  Serial1.begin(9600);
  Serial.begin(9600);
  // init Servo
  myservo.attach(9,900,2100); // attaches the servo on pin 9 to the servo object
  // init display
  lcd.init();
  lcd.noBacklight();
  lcd.clear();
  lcd.backlight();
  lcd.print("Starting up...");delay(1000);
  // init servo power pin
  pinMode(OnOffPin, OUTPUT);
  analogWrite(OnOffPin, 255);
  delay(1000);
  analogWrite(OnOffPin, 0);
  // clear display
  lcd.clear();
  lcd.cursor();
  lcd.print(" Servo controller");
}

// Arduino main loop
void loop() {
  // get serial input
  for(int i=0;i<8;i++) cmdbuffer[i]=0;
  bufpos=0;
  thisChar=0;
  lcd.setCursor(0,3);
  lcd.print(" ");
}
```

```

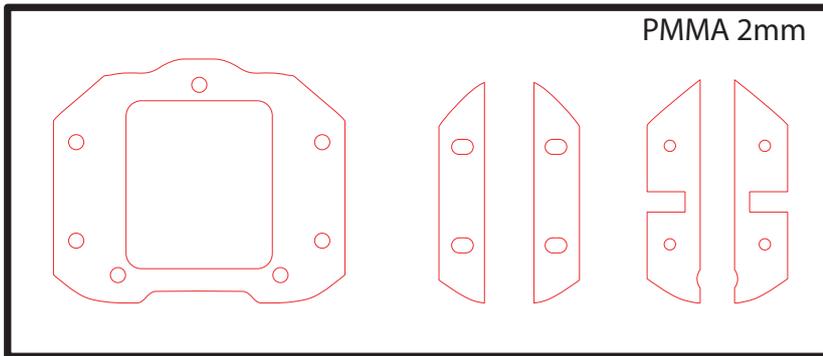
    lcd.setCursor(0,3);
    while((bufpos<4)&&(thisChar!=103))
        if (Serial1.available() > 0) {
            thisChar = Serial1.read();
            if(thisChar>0) {          cmdbuffer[bufpos]=thisChar;
                lcd.print(cmdbuffer+bufpos);
                bufpos++; Serial.println(thisChar);}
        }

// interpret command
if((bufpos>0)&&(thisChar==103)) {
    valid=1;
    for(i=0;i<(bufpos-1);i++) valid=valid&&(cmdbuffer[i]>=48)&&(cmdbuffer[i]<=57);
    } else valid=0;

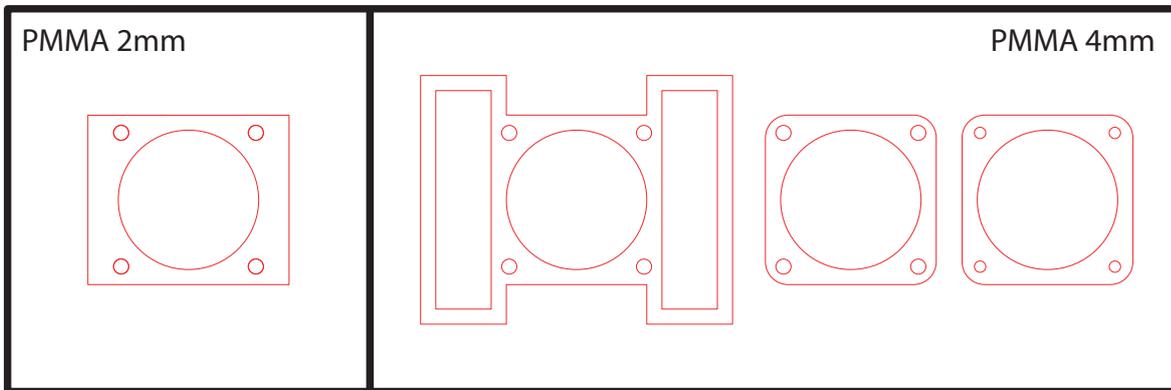
// execute valid command
if(valid) {
// convert serial input to integer
    value=atoi(cmdbuffer);
// display command value
    lcd.setCursor(0,3);
    sprintf(displaybuffer, "goto %4d", value);
    lcd.print(displaybuffer);
// turn on servo
    analogWrite(OnOffPin, 255);delay(500);
// move servo
    myservo.write(value); delay(2500);
// turn off servo
    analogWrite(OnOffPin, 0); delay(500);
// show current position
    lcd.setCursor(0,2);
    sprintf(displaybuffer, "position %4d          ", value);
    lcd.print(displaybuffer);
    while(Serial1.read() !=-1);
    }
}

```

### Base plate



### Mobile part



Laser cutting template of parts for awake/mobile functional ultrasound probe holder, from raw Poly(methyl methacrylate) plates of 2 and 4 mm.

All 8 1.5 mm holes are manually threaded before assembly.

The 2 mm holes on the leftmost upper and lower parts are bevelled to accommodate screw heads.

Assembly is performed by stacking the plates and securing them together with DIN 965 M2 screws.

## 4. Discussion

L'objectif de ma thèse était d'explorer sur le modèle des crises d'absence GAERS les variations hémodynamiques associées aux décharges de pointes-ondes spontanées. A cette fin, j'ai mis au point une nouvelle méthode d'imagerie cérébrale permettant d'étudier simultanément le changement de perfusion sanguine cérébrale en profondeur et les activités électriques chez le rat éveillé mobile. La démarche a consisté à combiner la technique d'imagerie fUS, qui permet de mesurer les variations de CBV sur toute la profondeur d'un cerveau de rat, et l'EEG intracrânien, qui distingue les différents états de l'animal à travers des patrons d'activité électrique. J'ai montré qu'il était possible d'adapter cette combinaison d'enregistrements sur un rat mobile (mfUS-EEG). Afin d'observer la majeure partie du cerveau, j'ai développé un système permettant de déplacer la sonde d'imagerie sur plusieurs plans sans approcher l'animal. En implémentant cette méthode sur le modèle de rat GAERS, il a été possible d'observer, dans certaines régions cérébrales, des variations de perfusion corrélées aux crises d'absence survenues naturellement. De plus, grâce à la sensibilité du fUS, il a été possible de suivre les décours temporels de ces variations pendant les crises.

Je vais d'abord discuter des avantages et limites de la méthode mfUS-EEG, puis j'aborderai les principaux résultats obtenus sur l'étude des crises d'absence, pour conclure sur les perspectives de mes travaux.

## 4.1. La méthode mfUS-EEG

### 4.1.1. Progrès pour les études fonctionnelles

D'un point de vue technique, l'imagerie mfUS-EEG donne accès aux structures corticales et sous-corticales avec de bonnes résolutions spatiales (100 x 100 x 400  $\mu\text{m}$ ) et temporelles (200ms), ainsi qu'une bonne sensibilité. La possibilité d'élargir le champ d'observation en scannant le cerveau sur plusieurs plans permet de reconstruire un volume cérébral au même titre que l'IRMf. Elle présente toutefois d'autres avantages par rapport à l'IRMf : (1) une meilleure sensibilité, qui permet d'étudier les changements de perfusion pendant des activités physiologiques et pathologiques, même sur des événements uniques, (2) une compatibilité facile avec les enregistrements électrophysiologiques, permettant de comparer les activations cérébrales aux marqueurs EEG établis, et (3) la possibilité d'étudier l'animal libre de ses mouvements, qui ouvre l'accès à un large éventail de patrons d'activités neuronales suivant les états de l'animal, comme par exemple le rythme  $\theta$  associé à la marche et au sommeil REM. Contrairement à l'IRMf, le fUS permet de s'affranchir du calcul de moyennes sur plusieurs événements répétés chez un animal ou un pool d'animaux qui peuvent présenter une variabilité inter-individus ou même inter-événements (Aguirre et al, 1998 ; Handwerker et al, 2004). Un autre avantage est de pouvoir définir les changements hémodynamiques qui peuvent varier pendant l'événement transitoire étudié, comme des signaux biphasiques qui peuvent s'annuler lors d'une analyse en bloc (Meltzer et al, 2008). L'accès aux structures sous-corticales pour étudier des variations hémodynamiques représente un gain en champ d'observation par rapport aux techniques comme le NIRS, l'IOS, le laser Doppler ou l'imagerie bi-photonique, dont les sensibilités sont bonnes, mais qui sont limitées à des échantillons corticaux petits ou superficiels.

### **4.1.2. Les limites actuelles**

L'imagerie mfUS-EEG est donc une technique prometteuse mais dont les capacités techniques et analytiques n'en sont qu'à leurs débuts. Sur le plan technique, l'échantillonnage est limité au niveau spatial à un seul plan et au niveau temporel à des périodes entrecoupées par le temps de reconstruction des images. Du point de vue de la physique de ce mode d'imagerie, il est théoriquement possible de produire des images en continu, en temps réel, sur l'ensemble du cerveau. Pour approcher de cette limite, la capacité de traitement des signaux ultrasonores devra être augmentée, au niveau de l'acquisition des signaux ultrasonores, de la vitesse de transfert vers l'unité de calcul, et de la puissance informatique pour la reconstruction du champ d'observation à partir des ondes réfléchies. En vue d'observer simultanément un volume plutôt qu'un plan, un travail important de développement d'une sonde matricielle devrait permettre de remplacer les sondes linéaires actuelles. En parallèle au progrès de l'acquisition du signal fUS sur des volumes croissants et des périodes continues de plus en plus longues, l'analyse de ces signaux nouveaux nécessite un développement pour interpréter des masses importantes de données. Un premier développement concerne l'identification anatomique des régions cérébrales sur les images fUS. Le deuxième est de parvenir à s'affranchir d'un état de référence, simple à définir sur un animal anesthésié mais qui perd son sens chez un animal éveillé et mobile. Enfin d'un point de vue de la physiologie, mes résultats vont dans le sens d'observations récentes indiquant qu'il n'y a pas d'équivalence systématique entre les activités EEG et métaboliques, ce qui nécessite d'explorer les mécanismes de couplage et leurs limites.

### **Les limites techniques**

#### *L'imagerie d'un plan*

Le fait qu'on puisse observer les réponses hémodynamiques dans les régions sous-corticales est un progrès par rapport aux autres techniques dont les mesures des variations hémodynamiques au cours du temps se limitent au cortex. Bien que la sonde ne permette d'imager qu'un seul plan, j'ai montré qu'il était possible de scanner plusieurs plans coronaux de manière successive le long de la quasi-totalité du cortex et des structures plus profondes incluant le thalamus et l'hippocampe. En imageant plusieurs plans successivement, on récupère ainsi des informations sur l'état global du cerveau, avec toutefois des espaces entre chaque plan.

Dans le cas de l'étude de variations hémodynamiques sur des événements uniques, j'étais limitée à un seul plan. Avec le matériel actuel, il n'est pas possible d'étudier simultanément le changement de perfusion sanguine sur un volume de cerveau au delà d'un plan. Cet aspect est pourtant essentiel lorsqu'on souhaite comparer deux régions d'intérêt qui ne font pas partie d'un même plan.

En attendant les développements techniques du fUS en préparation, il est possible de remédier partiellement à la limite d'observation à un seul plan. Dans le cas des crises d'absences, les cortex somatosensoriels primaire et secondaire, le thalamus et le striatum sont des structures impliquées dans la survenue de décharges de pointes-ondes (Danober et al, 1998 ; Deransart et al, 1998, 2000 ; Meeren

et al, 2002, 2005 ; Slaght et al, 2004 ; Polack et al, 2007, 2009 ; Polack et Charpier, 2009 ; Avoli, 2012 ; Van Raay et al, 2012 ; Zheng et al, 2012). Pour réunir ces structures sur un même plan, un changement d'orientation de la sonde est possible. De façon générale, le choix de l'orientation optimale dépend de la disposition des structures cérébrales d'intérêt.

L'imagerie fUS Doppler ultrarapide procure une image fine du réseau vasculaire, tandis que l'utilisation des ultrasons en mode d'observation anatomique B-mode est modérément performante sur un cerveau de rongeur. Aucune de ces modalités ne permet de se repérer simplement par rapport aux atlas anatomiques du cerveau. Il est possible d'identifier les plans coronaux grâce aux ventricules et aux contours du réseau vasculaire, et ainsi de les superposer à l'Atlas Paxinos, qui fournit des coupes de référence suivant cette orientation (Figure 49). Lorsque la sonde est orientée différemment, par exemple à environ 30 degrés du plan sagittal pour englober un hippocampe, l'identification des régions imagées n'est pas triviale.

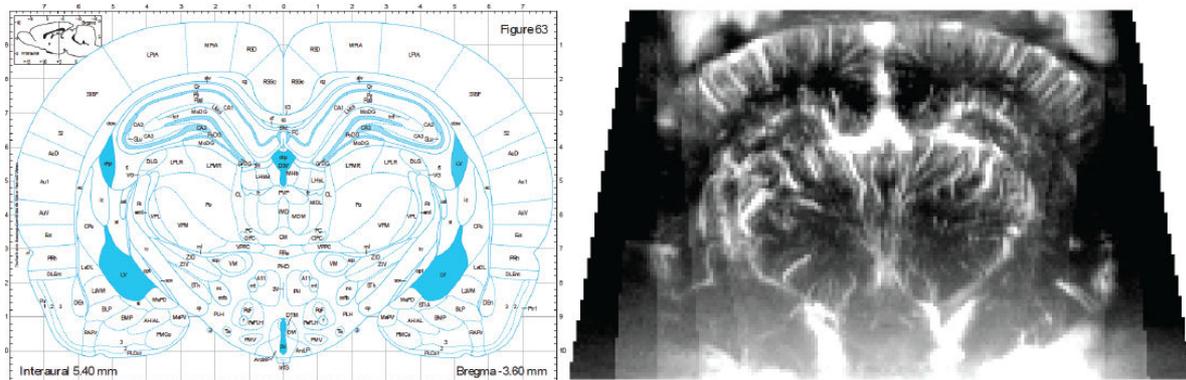


Figure 49. Comparaison d'une image fUS et de l'Atlas Paxinos

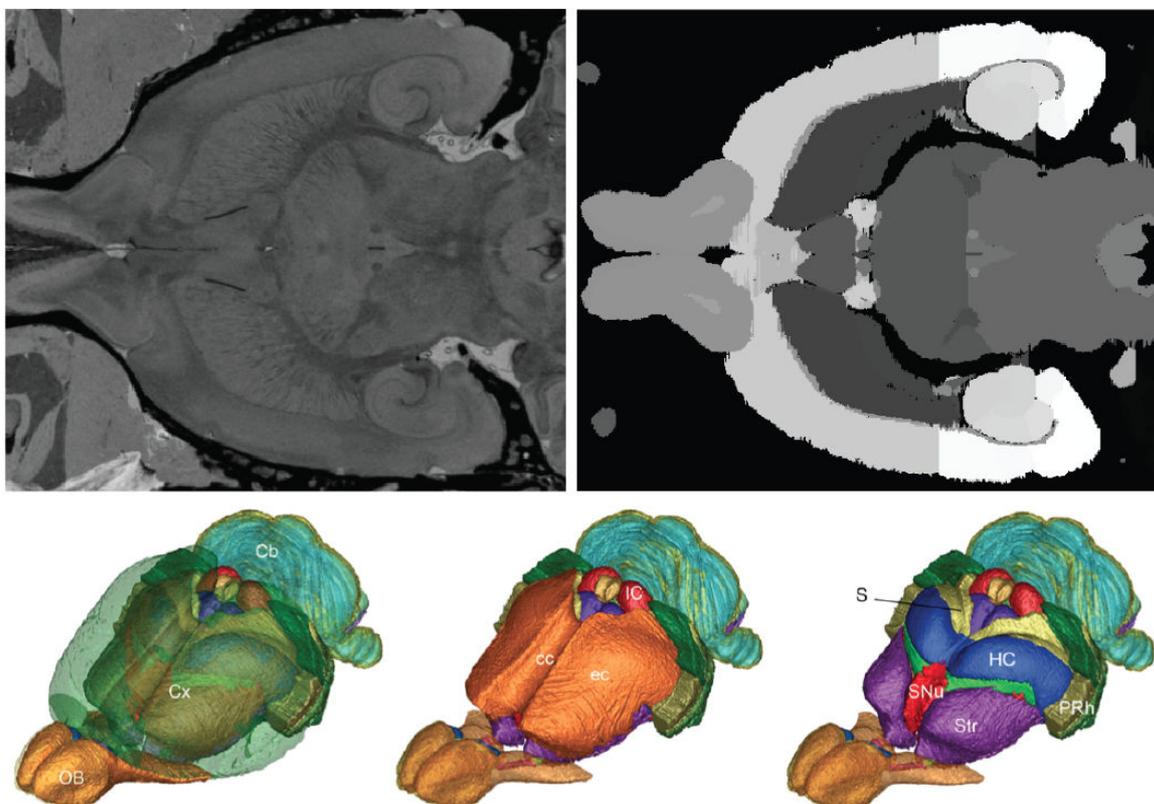


Figure 50. Présentation de l'Atlas Waxholm du rat. Imagerie 3D IRM T2\*, volume équivalent coloré par région anatomique. Reconstruction 3D des structures anatomiques.

Une piste pour un meilleur recalage anatomique des observations fUS consiste à utiliser un atlas volumétrique, aussi appelé "espace de Waxholm" (Figure 50). Ainsi, il serait possible d'utiliser des points de repère identifiables grâce au réseau vasculaire afin de déterminer l'orientation de la sonde (Figure 51). Le plan sagittal médian du cerveau, qui correspond à un axe de symétrie forme un repère évident sur les images du réseau vasculaire. Un deuxième repère anatomique et vasculaire est la surface du cortex. Pris séparément, ces repères ne permettent pas un recalage des plans observés sur l'atlas, mais l'ensemble des points de repère, pris sur plusieurs plans, définit de façon unique le recalage (Figure 52). Concernant l'étude des structures corticales, impliquées sur le modèle GAERS, l'atlas Waxholm actuel doit être complété pour inclure un découpage plus fin. Ainsi, alors que l'atlas Paxinos distingue plus de 900 régions, le Waxholm en définit moins de 100, dont seulement 4 pour les aires corticales. Il n'est pas possible de repérer les cortex somatosensoriels primaire et secondaire. Une fusion entre Paxinos et Waxholm, toujours au moyen de points de repère définis par des surfaces permettrait d'améliorer le repérage de l'imagerie fUS.

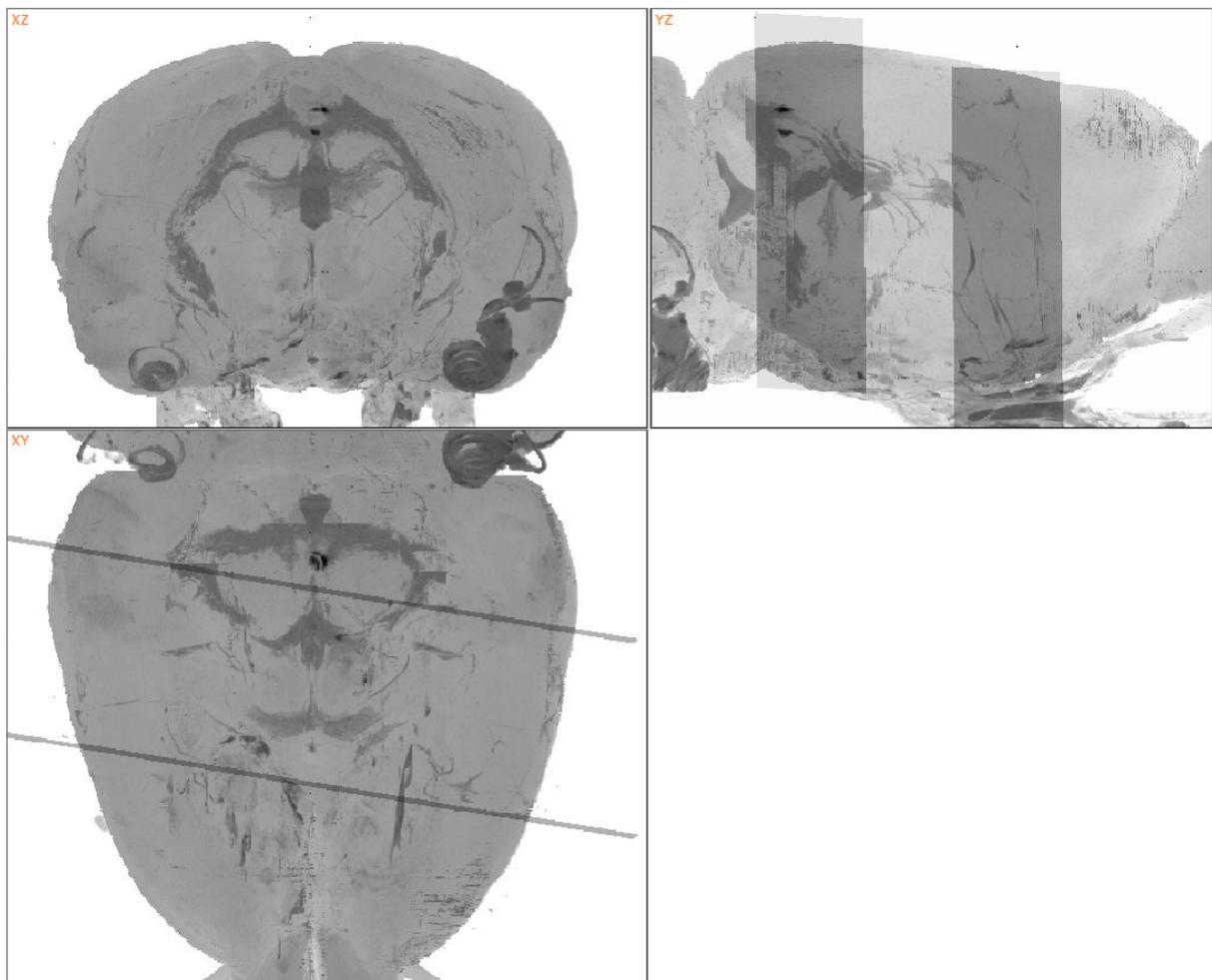


Figure 51. Exemple d'orientation arbitraire dans l'espace de Waxholm de deux plans d'imagerie.

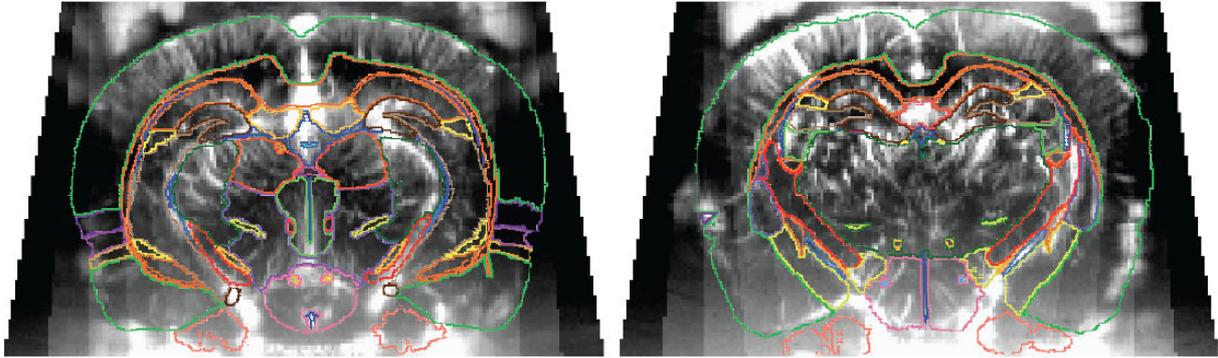


Figure 52. Deux plans fUS quasi-coronaux recalés sur l'Atlas de Waxholm. Les régions anatomiques sont indiquées par des contours colorés.

Malgré les développements sur l'orientation anatomique des enregistrements fUS, la limite à un seul plan laissera persister des inconnues sur la dynamique spatio-temporelle des réponses hémodynamiques. Par exemple, pour identifier la région initiatrice des crises, il reste impossible de garantir que le foyer épileptique se trouve dans le plan observé. Les médecins avec lesquels nous collaborons développent une sonde matricielle qui permettrait d'imager le volume d'un cerveau entier, ce qui représente un effort technologique important. Une approche intermédiaire, déjà bien avancée consiste à caler plusieurs sondes miniaturisées les unes derrière les autres, espacées de quelques centaines de microns, pour imager plusieurs plans simultanément. Une telle approche apporterait déjà un grand progrès pour étudier la dynamique des crises.

### *Les pauses dans l'acquisition du signal fUS*

Les deux modes d'acquisition que j'ai utilisés, "*Continuous*" et "*Burst*" ont été créés en fonction de la capacité de mémoire de l'ordinateur qui reconstruit les images à partir des échos ultrasonores. Ces deux modes d'acquisition permettent d'étudier soit une période longue avec une résolution temporelle modérée, soit de préserver une résolution temporelle maximale mais en contrepartie de pauses prolongées dans l'acquisition.

Le mode "*Continuous*" correspondait à 1 image toutes les 3s. Les réponses hémodynamiques ont montré un pic maximal dans les secondes qui suivent le stimulus (Dunn et al, 2005 ; David et al, 2008). L'équipe de Depaulis (David et al, 2008) a montré en IRMf que la réponse hémodynamique dans le cortex est plus lente (environ 5 s) que dans les autres structures (environ 2 s) chez les GAERS. Un échantillonnage capturant les variations hémodynamiques dans leur intégralité devient accessible avec les récentes optimisations logicielles qui produisent une image par seconde (mode "*Fast Continuous*").

Le mode "*Burst*" a l'avantage de faire des images toutes les 200 ms, avec éventuellement une résolution encore supérieure au moyen de fenêtres glissantes. En revanche, ce mode est limité à des périodes de 12s d'acquisition séparées par un délai d'environ 30 s pour générer les images et libérer la mémoire pour une nouvelle acquisition ultrasonore. Cette séquence est idéale pour mesurer de manière plus précise les réponses hémodynamiques des structures cérébrales superficielles et profondes en début de crise d'absence. Une difficulté est de déclencher l'acquisition au bon moment pour capturer un début de crise. Soit le déclenchement du Burst s'effectue manuellement dès l'apparition d'une crise,

auquel cas le début de l'initiation des crises est perdu ; soit le déclenchement se fait de manière automatique dès que la machine est prête à relancer une nouvelle séquence, et on a une chance mais faible de tomber au début d'une crise. Une approche réalisable serait de laisser l'acquisition fonctionner en permanence, avec une mémoire tampon de quelques secondes, et de n'utiliser ces mesures qui si une crise se déclenche, en profitant des mesures en mémoire tampon qui précèderaient la crise.

Ainsi, des améliorations techniques sont possibles, et ont déjà permis pendant le cours de ma thèse d'améliorer les mesures de fUS. L'objectif des prochains développements correspond au besoin des études physiologiques de suivre sans interruption les variations de débit sanguin pendant plusieurs heures, avec une résolution des phénomènes les plus rapides correspondant aux pulsations cardiaques. Un tel progrès est réalisable au moyen d'une mise à jour technique vers du matériel plus puissant. L'échauffement de la sonde pendant son fonctionnement, par transformation d'une partie de l'énergie acoustique en énergie d'agitation moléculaire, ne semble pas constituer un obstacle, mais nécessitera peut-être un refroidissement actif.

### **Analyser le fUS-EEG sur un fond d'activité variable chez l'animal mobile**

Si la méthode mfUS-EEG permet d'enregistrer les activités cérébrales des états comportementaux et pathologiques en condition naturelle chez le rat, une difficulté d'analyse provient de la définition d'un état de référence pour comparer les changements spécifiques de l'événement transitoire étudié. En pratique, j'ai normalisé l'activité de chaque voxel en la divisant par l'activité moyenne pendant tout l'enregistrement. Cependant, j'ai observé que même pendant une session d'enregistrement simple, il apparaît une grande diversité des activités de fond, telles que l'éveil actif, l'éveil passif, le sommeil lent, le sommeil REM (associé à un mouvement rapide des yeux), en plus des crises d'absence. En toute rigueur, pour relier quantitativement les observations d'un plan d'imagerie à un autre, il faudrait pouvoir enregistrer dans chacun une même variété d'états cérébraux. Ainsi, sur le modèle de rat GAERS, les crises sont survenues en majorité pendant un éveil passif ou un état de somnolence et sont souvent précédées ou suivies d'un sommeil à ondes lentes, notamment au cours de la transition éveil/sommeil. Au contraire, les crises étaient sporadiques durant l'éveil actif, le sommeil lent et le sommeil paradoxal ou REM, en accord avec la littérature (Danober et al, 1998 ; Depaulis et al, 2015). Sur un animal libre de son comportement, l'éventail des débits sanguins observés est important, même par rapport aux intenses activités associées aux crises, ce qui peut affecter la recherche de régions dont l'activité est corrélée aux crises. Les différents états comportementaux sont corrélés à différentes cartes d'activations et désactivations cérébrales (Nir et al, 2013). Par exemple, j'ai observé pendant le sommeil REM une forte activité vasculaire. Au contraire, pendant le sommeil non-REM, l'activité métabolique peut être réduite de 40 % comparé à l'éveil passif, avec une réduction de l'activation au niveau thalamique, du cortex préfrontal dorso-latéral, orbito-frontal et au niveau du cortex cingulaire chez l'homme (Maquet et al, 1997 ; Dang-Vu et al, 2010 ; Nir et al, 2013). Ainsi, il a été démontré que l'abondance de sommeil non-REM pouvait modifier les résultats des études sur l'épilepsie (Moehring et al, 2008). De même, certaines bandes de fréquences LFP seraient corrélées positivement au signal BOLD, comme c'est le cas pour les bandes gamma et bêta (Logothetis et al, 2001 ; Conner et al, 2011). Les cartes de corrélations que j'ai générées en regroupant tous les états hors

crises ne semblent pas empêcher de voir des changements importants de perfusion corrélés aux décharges de pointes-ondes des crises d'absence, probablement parce que le nombre de crises était important sur le modèle GAERS. Les plans ne comprenant aucune corrélation de variation hémodynamique correspondaient généralement aux périodes où l'animal ne faisait pas ou peu de crises d'absence. Cela correspondait typiquement à des périodes de sommeil lent/profond. Dans le cas des études par EEG-IRMf, l'état de référence est généralement peu variable pour un sujet immobile, en contention, ou sous sédation, ce qui simplifie l'analyse. L'état de référence, pris en dehors des décharges de pointes-ondes, correspond généralement au état d'éveil calme chez les sujets immobiles (Tenney et al, 2003, 2004 ; Bai et al, 2010), ou à un état de sédation sans crise pour les animaux sédatisés (Nersesyan et al, 2004). Pour aborder l'influence de l'état de référence sur les résultats obtenus (Stark et Squire, 2001), mon travail suggère d'identifier plusieurs états de référence parmi les différents niveaux de sommeils et d'éveils afin de replacer l'activité observée en chaque instant sur une échelle globale.

## 4.2. Apport pour la compréhension des crises d'absence

### 4.2.1. Les cartes de corrélations

La méthode d'observation mfUS-EEG, qui nécessitait une résection chirurgicale de la voûte crânienne sur les rats GAERS, n'a pas montré d'effet sur l'occurrence et la durée des crises épileptiques. J'ai mis en évidence à travers des cartes de corrélation une augmentation de la perfusion au niveau du cortex somatosensoriel primaire et du thalamus, accompagnée d'une hypo-perfusion au niveau du striatum. Ces résultats sont compatibles avec les études par EEG-IRMf réalisées sur les modèles de rats présentant des décharges de pointes-ondes (Tenney et al, 2003, 2004 ; Nersesyan et al, 2004 ; David et al, 2008 ; Mishra et al, 2011). Des études d'EEG-IRMf avaient montré des désactivations corticales prédominantes chez les patients, accompagnées parfois d'une activation variable dans d'autres régions corticales (Archer et al, 2003 ; Aghakhani et al, 2004 ; Labate et al, 2005 ; Gotman et al, 2005 ; Laufs et al, 2006 ; Moeller et al, 2008 ; Berman et al, 2010 ; Masterton et al, 2013). Sur les rats GAERS, l'EEG-IRMf a montré, à partir d'une moyenne sur plusieurs animaux, à la fois une activation et une désactivation corticales, avec une prédominance pour l'activation (David et al, 2008), alors que sur les modèles de rat WAG/Rij, pas ou peu de désactivations avaient été démontrées (Tenney et al, 2004 ; Nersesyan et al, 2004). Mes résultats sont compatibles avec ces observations antérieures sur le GAERS. En effet, même si j'ai constaté une variabilité entre les crises, j'ai vu également des baisses de perfusions corticales, généralement adjacentes à l'hyper-perfusion corticale. La différence observée chez les rats WAG/Rij par rapport au GAERS peut être due soit à une différence fonctionnelle entre les deux modèles, soit à la technique de mesure : signaux BOLD pour les études sur les rats WAG/Rij et CBV pour les études sur les rats GAERS. Une diminution du signal BOLD a également été observée au niveau cortical chez le modèle de rat éveillé injecté au GLB (Tenney et al, 2003), écartant l'hypothèse d'une différence due à la mesure. Mes résultats confirment

que les crises d'absence font intervenir le circuit striato-cortico-thalamique, et invitent à explorer l'inactivation du striatum.

#### 4.2.2. Asymétrie corticale

Toutes les études par EEG-IRMf sur les modèles d'épilepsie absence chez le rat ont décrit des activations essentiellement symétriques et bilatérales (Tenney et al, 2003, 2004 ; Nersesyan et al, 2004 ; David et al, 2008). Mes observations non publiées révèlent des hyper-perfusions corticales unilatérales chez 6/12 rats, à partir de cartes de corrélation sur une session d'enregistrement. Bien qu'inattendue puisque les crises d'absences sont généralisées, une asymétrie a été précédemment constatée dans des études de flux sanguin par Doppler transcrânien au niveau des artères cérébrales moyennes durant les décharges de pointes-ondes chez des patients ayant des crises d'absence (De Simone et al, 2002 ; Bek et al, 2010). De Simone et ses collaborateurs ont proposé que l'asymétrie observée puisse être expliquée soit par une asymétrie d'irrigation artérielle des structures corticales et thalamiques, soit par la présence d'un foyer unilatéral initiateur des crises généralisées. A ma connaissance aucune latéralisation n'a été décrite en IRMf, ce qui peut s'expliquer par la nécessité avec cette technique de moyenniser plusieurs crises provenant de plusieurs animaux, ainsi qu'à un possible effet de la sédation qui régularise les crises.

Concernant la variabilité du signal hémodynamique des régions corticales présentant une hyper-perfusion durant les crises, mes résultats ont montré que l'hyper-perfusion n'était pas constante au cours d'une crise. De plus, une hyper-perfusion bilatérale observée en moyenne sur une carte de corrélation pouvait inclure dans le détail un profil de perfusion bilatéral ou unilatéral en fonction de chaque crise. Mes résultats vont à l'encontre d'une étude par EEG-IRMf sur des patients qui montre que les patrons du signal BOLD sont réguliers au sein d'un même individu (Moeller et al, 2010). En revanche, mes résultats suggèrent une variabilité de la perfusion corticale d'une crise à l'autre qui concorde avec l'étude de De Simone. Il a montré une variabilité du flux sanguin au niveau des artères moyennes cérébrales gauche et droite suivant chaque crise d'absence, avec une prédominance pour un hémisphère (De Simone et al, 2002, Table 1). Au niveau thalamique, une augmentation de la perfusion survenait systématiquement au cours des décharges de pointes-ondes, concomitant avec l'hyper-perfusion au niveau du cortex postérieur.

Mes observations avec cette technique de mfUS-EEG suggèrent une variabilité de la perfusion au niveau cortical chez le modèle GAERS et pointent vers une dichotomie anatomique entre la perfusion et les décharges de pointes-ondes durant les crises d'absence survenant naturellement. Les facteurs pouvant causer une telle asymétrie incluent une augmentation de la connectivité fonctionnelle au moment du repos (*resting functional connectivity*) qui a été démontrée chez les rats WAG/Rij (Mishra et al, 2013) et chez les patients (Fang et al, 2013). Enfin, une étude suggère que les rats WAG/Rij et GAERS pourraient avoir une réduction des axones ou de la myéline au niveau du corps calleux antérieur (Chahboune et al, 2009). Ce déficit du corps calleux, important pour la transmission inter-hémisphérique, pourrait provoquer une asymétrie des crises.

### **4.2.3. Liens entre changement de débit sanguin, signature EEG et activité neuronale.**

L'hyper-perfusion asymétrique observée même épisodiquement soulève la question sur le lien fonctionnel entre les activités électriques et vasculaires durant les crises d'absence. En effet, les décharges de pointes-ondes présentent des patrons électriques constants et généralisés symétriques durant les crises. Selon le principe du couplage neurovasculaire, une augmentation de l'activité neuronale s'accompagne d'une accélération métabolique et d'une augmentation du débit sanguin (Attwell, 2010). La régulation du tonus vasculaire repose sur la transmission de molécules vasoactives libérées par les neurones et astrocytes locaux (Attwell et al, 2010 ; Carmignoto et Gómez-Gonzalo, 2010 ; Cauli et Hamel, 2010 ; Petzold et Murphy, 2011), et dépendent donc du recrutement des différentes cellules pyramidales et interneurones par le réseau (Enager et al, 2009). Les variations de perfusion observées dans mes expériences suggèrent que les cellules recrutées lors des décharges de pointes-ondes ne sont pas les mêmes à travers les différentes régions du cortex. Les travaux de Polack et collaborateurs ont montré qu'il existe une population de neurones hyper-excités exclusivement dans les couches profondes du cortex somatosensoriel primaire facial chez le modèle GAERS (Polack et al, 2007 ; 2009), qui sont efficacement inhibés par les interneurones GABAergiques au cours des décharges de pointe-ondes (Chipaux et al, 2011). Il est plausible que le déclenchement d'une crise d'absence, facilité par une hyperexcitabilité focale des cellules pyramidales des couches profondes du cortex somatosensoriel primaire, engendre en parallèle : (1) une demande énergétique se manifestant par une dilatation locale des vaisseaux sanguins par le biais d'une excitation réciproque des astrocytes (Gómez-Gonzalo et al, 2010, 2011) ; et (2) une réponse efficace de l'inhibition sur l'ensemble du cortex, laissant peu de possibilité aux cellules pyramidales des régions adjacentes de décharger, réduisant ainsi la demande d'apport énergétique dans ces régions adjacentes. Puisqu'une partie significative du signal EEG provient des populations d'interneurones (Bazelot et al, 2010), le déclenchement systématique des cellules inhibitrices pourrait expliquer que l'EEG des crises d'absence soit constant, tandis qu'une efficacité variable à contrôler la décharge des cellules principales provoquerait une variabilité des besoins métaboliques du tissu et donc de la réponse hémodynamique.

L'hypo-perfusion observée au niveau du striatum au cours des décharges de pointes-ondes a été observée, de façon compatible avec mes observations mfUS-EEG, par EEG-IRMf sur le modèle de rats WAG/Rij (Mishra et al, 2011) ainsi que chez des patients (Moeller et al, 2008 ; Berman et al, 2010). Ces résultats vont à l'encontre de la théorie selon laquelle une activité neuronale engendre systématiquement une augmentation du débit sanguin. En effet, dans le striatum, une baisse du CBV et des signaux BOLD peut être observée durant l'activité neuronale et serait due à une vasoconstriction modulée par la stimulation des récepteurs D2 à la Dopamine (Shih et al, 2009 ; Mishra et al, 2011).

Bien que l'augmentation des réponses hémodynamiques soit généralement positivement corrélée à l'activité neuronale, plus précisément aux activités de LFP (Logothetis et al, 2001), elle ne l'est pas de façon systématique (Shih et al, 2009 ; Mishra et al, 2011). Le couplage neurovasculaire repose essentiellement sur les agents vaso-actifs libérés par les différents types de cellules cérébrales recrutées mais également sur les propriétés des différents récepteurs mis en jeu, présents au sein des différentes structures cérébrales au cours d'un événement. Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, il apparaît que malgré un patron électrique similaire généralisé au cours des crises d'absence, il existe des différences plus subtiles au niveau vasculaire, pouvant apporter des informations plus précises sur les mécanismes et sur les réseaux mis en jeu au cours des crises d'épilepsie. Une approche pour

déterminer le lien entre les tracées EEG et les réponses vasculaires serait de corrélérer les activités neuronales enregistrées localement par une électrode EEG ou éventuellement optique et les événements vasculaires voisins.

## 4.3. Perspectives

### 4.3.1. Initiation des crises d'absence

#### **Cortex somatosensoriel primaire ou secondaire**

Les études électrophysiologiques sur les modèles de rats WAG/Rij et GAERS ont mis en évidence une initiation des crises dans le cortex somatosensoriel primaire (S1) facial (Meeren et al, 2002 ; Polack et al, 2007, 2009 ; Polack et Charpier, 2009). Des travaux récents partant d'une exploration du cortex somatosensoriel secondaire (S2), ont montré que l'initiation des décharges de pointes-ondes débiterait dans cette région et le cortex insulaire plutôt que dans S1 chez les rats GAERS (Zheng et al, 2012). Ces travaux sont supportés par la réduction des crises d'absence après administration du neuropeptide Y au niveau de S2 et pas dans S1 (van Raay et al, 2012). En revanche, un doute subsiste en raison d'une fuite possible dans la région S1 faciale lors de l'injection du NPY ciblée dans S2. De plus, l'appellation "S1" par les auteurs correspond au cortex somatosensoriel des membres antérieurs et non facial (van Raay et al, 2012). Mes données préliminaires montrent la présence d'hyper-perfusions au niveau de S1 mais aussi parfois dans S2 au cours des variations hémodynamiques au début des crises. La variabilité concernant la perfusion corticale observée pour chaque crise peut expliquer cette divergence. Néanmoins, mes résultats suggèrent non pas un foyer cortical constant mais des foyers variés au sein du cortex somatosensoriel, avec toutefois une certaine prédominance pour S1. Si cela s'avère vrai, l'imagerie d'un seul plan devient alors une véritable limite pour l'identification de l'initiation des crises d'absence. En effet, quelque soit le plan imagé, il n'y aura aucune garantie que le foyer épileptique se trouve dans le plan. En revanche, puisque mes données préliminaires ne reposent que sur quelques plans analysés, l'éventualité d'observer une région constamment hyper-perfusée dans un autre plan reste possible. Un travail d'analyse sur l'ensemble des plans enregistrés reste à faire et constitue une étape essentielle dans la suite de l'analyse de mes données.

#### **Cortex ou thalamus**

L'origine des crises d'absence a fait l'objet de nombreux débats. Aujourd'hui, la théorie du foyer cortical est largement acceptée au sein de la communauté scientifique. Le cortex est à la fois initiateur, hyperexcitable et peut être un générateur de rythme alors que le thalamus est plutôt vu comme un résonateur pertinent pour le maintien des décharges de pointes-ondes (Meeren et al, 2002 ; Lutjohann et van Luijckelaar, 2015). En revanche, l'apparition d'un nouveau site thalamique essentiel à

l'initiation des décharges de pointes-ondes semble redonner une importance au thalamus (Luttjohann et van Luijtelaar, 2012). Bien que l'hyperexcitabilité corticale facilite l'initiation d'une crise, le dialogue entre le foyer épileptique cortical et le noyau postérieur thalamique est crucial à l'engagement d'une crise d'absence (Luttjohann et van Luijtelaar, 2012 ; Luttjohann et van Luijtelaar, 2015). Celui-ci est le seul noyau thalamique enregistré qui maintient un dialogue bidirectionnel avec le foyer cortical durant les 500 premières millisecondes d'une crise. Mes observations montrent que le thalamus, notamment le noyau postérieur (Po) est hyper-perfusé pendant les crises. Même si peu de doutes subsistent sur l'initiation corticale, notre technique pourrait permettre de comparer les délais des variations hémodynamiques des différents noyaux thalamiques et du foyer cortical. En revanche, suivant qu'il existe un foyer cortical ou plusieurs foyers corticaux observés grâce aux ultrasons, deux approches sont alors possibles. Dans le cas d'un foyer constant, il sera possible de pivoter la sonde en biais de manière à visualiser sur le plan à la fois le foyer épileptique et le noyau postérieur du thalamus. Dans le cas d'une variabilité du foyer épileptique, la solution sera d'utiliser plusieurs sondes miniaturisées, calées les unes derrière les autres, ce qui permettra d'avoir plusieurs plans simultanés, ou mieux encore, d'utiliser une sonde matricielle.

### **4.3.2. Prédiction des crises**

Plusieurs études ont montré que les crises d'absence étaient précédées par des phases pré-ictales métaboliques (Roche-Labarbe et al, 2010 ; Zhao et al, 2011 ; Bai et al, 2010 ; Benuzzi et al, 2012). Avec notre méthode d'imagerie mfUS-EEG, il serait possible de localiser des régions cérébrales précurseurs chez le rat. Une difficulté à surmonter est l'activité variable chez l'animal mobile. En effet, la présence de différents états de l'animal peut gêner l'observation d'un précurseur. Chez le rat WAG/Rij éveillé et mobile, il a été démontré que les décharges de pointes-ondes peuvent être précédées par différents précurseurs EEG dans les bandes de fréquences correspondant majoritairement au delta (1 - 4 Hz) et thêta (4,5 - 8 Hz), mais dont la diversité des caractéristiques EEG rendait difficile d'identifier un patron précurseur des crises commun (Sitnikova et van Luijtelaar, 2009). Une possibilité serait de regrouper chaque crise en fonction de l'état qui le précède. Ainsi, cela permettrait non seulement de faciliter l'observation d'un éventuel précurseur, mais également de déterminer si les variabilités hémodynamiques observées au cours des crises seraient influencées par l'état initial de l'animal.

### **4.3.3. Animal mobile vs animal sous sédation**

L'utilisation d'anesthésiques est connue pour avoir des effets sur le système nerveux central, notamment sur la connectivité fonctionnelle (Liu et al, 2013) et sur le couplage neurovasculaire (Franceschini et al, 2010). Chez l'animal, une anesthésie est généralement administrée au cours d'une session d'imagerie. Chez les modèles WAG/Rij et GAERS, l'association fentanyl-halopéridol est communément utilisée et peut avoir des effets sur le CBF (Carlsson et al, 1982 ; Handley et al, 2013). Bien que mes résultats soient en accord avec des études réalisées sur des animaux sous sédation, des différences comme l'asymétrie de la perfusion ou la présence d'hypo-perfusion corticale, peuvent

provenir de la différence des conditions d'études. Il serait donc intéressant de comparer les activités hémodynamiques sans et avec la sédation afin de discriminer les différences dues aux conditions d'enregistrements.

## 4.4. Conclusion

Notre compréhension actuelle des mécanismes à l'origine des crises d'épilepsie repose sur de nombreuses techniques d'investigation. Les méthodes électrophysiologiques ont montré chez l'homme et sur les modèles animaux que les crises d'absence étaient associées aux décharges de pointes-ondes généralisées. Les nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'importance du circuit thalamo-cortical dans la genèse des crises d'absence. La synchronisation rapide et bilatérale de ces décharges a suscité un vif débat sur l'origine de l'initiation, mais les investigations ont révélé l'existence d'un foyer cortical qui est aujourd'hui largement accepté.

La découverte des interactions entre métabolisme et activité électrique a permis de développer des techniques d'imagerie capables de mesurer des activités métaboliques au sein d'une région corticale ou à l'échelle du cerveau. Ces techniques ont montré des corrélats vasculaires durant les crises d'absence, mais également juste avant le départ des crises. Une augmentation de l'activité neuronale est souvent accompagnée d'une augmentation métabolique. En revanche, cette affirmation n'est pas toujours vérifiée, comme je l'ai observé au cours des crises d'absence survenues naturellement chez un modèle de rat éveillé et mobile. Mes résultats ont révélé une dichotomie entre les décharges de pointes-ondes et les changements de perfusion cérébrale. L'observation d'une hyperperfusion asymétrique observée au niveau cortical suggère une meilleure définition du foyer épileptique. En revanche, elle indique aussi que les décharges de pointes-ondes observées à l'EEG ne sont pas intrinsèquement similaires du point de vue vasculaire sur l'ensemble du cerveau.

Les recherches réalisées pour comprendre le fonctionnement dynamique des réseaux cérébraux pointent vers une implication concomitante des activités électriques et métaboliques. L'imagerie mfUS-EEG est un outil qui répond en majeure partie aux besoins expérimentaux pour étudier des réseaux cérébraux. Il allie à la fois les mesures des dynamiques neuronales et des dynamiques vasculaires sur un large champ d'observation. L'implémentation du dispositif sur un rat libre de ses mouvements ouvre un accès vers des études comportementales nécessitant la mobilité. L'imagerie mfUS-EEG s'insère donc comme un outil déjà performant, parmi les autres outils d'imagerie existants. Les prochains développements techniques, tels que l'imagerie simultanée de plusieurs plans ou le couplage aux techniques optiques grâce à la fenêtre transparente, devraient aider à aborder, avec une efficacité accrue, les questions de codage neuronal de l'information et des pathologies neuro-vasculaires.

## 5. Annexe I

## 5.1. Article : "Disrupted coupling between interneurons and neuronal populations after kainate lesion"

L'épilepsie du lobe temporal est accompagnée d'une réorganisation du réseau neuronal qui touche à la fois les structures et les propriétés des neurones. Des travaux réalisés sur du tissu humain ont révélé une modification de la neurotransmission GABAergique classique inhibitrice en neurotransmission GABAergique excitatrice sur certains neurones pyramidaux pendant les décharges interictales dans le subiculum (Cohen et al, 2002). Je me suis intéressée ici au remodelage fonctionnel à long terme des interneurones GABAergiques chez la souris, rendue épileptique par injection intra-hippocampique de kaïnate.

La lésion focale au kaïnate (KA) reproduit le syndrome des crises temporales. Les premiers travaux réalisés ont montré l'apparition durable de crises temporales récurrentes et ont permis de distinguer les effets épileptogènes locaux et les effets à distance en injectant du KA dans l'amygdale des rats (Ben-Ari et al, 1979 ; Ben-Ari et al, 1980) et dans l'hippocampe des rats et souris (Magloczky et Freund, 1993 ; Suzuki et al, 1995). Les conséquences d'une injection focale sont plutôt similaires à celles observées suite à l'administration systémique du KA (Nadler et al 1978 ; Cavalheiro et al 1982 ; Sperk et al 1983). Néanmoins, l'injection intra-hippocampique permet l'initiation d'une lésion unilatérale similaire à celle observée chez les patients, incluant une perte cellulaire au niveau local et la propagation d'une activité épileptiforme aux régions non-lésées.

L'état de mal induit chez le rongeur par l'injection intra-hippocampique de KA est associé à une immobilité ou à un comportement stéréotypé où l'animal tourne en rond . Lors de l'état de mal, l'EEG montre la présence de polypointes-ondes à 2-5 Hz, localisées au niveau de l'hippocampe et du cortex ipsilatéraux (Bouilleret et al, 1999). Après 6 - 16 heures, les pointes-ondes disparaissent et un ralentissement global de l'activité EEG est noté.

Les lésions hippocampiques sont initialement limitées au site d'injection (Bouilleret et al, 1999). Elles consistent en une mort des cellules du hile, incluant des cellules moussues, survenant dans les 2 à 24 heures. Des cellules pyramidales des régions CA1 et CA3c présentent un aspect pycnotique alors que celles de CA3a et b sont initialement préservées. Lors d'une deuxième phase débutant environ à 15 jours post-injection, d'autres modifications apparaissent. Une perte cellulaire plus marquée des régions CA1 et CA3c s'associe à une dispersion des cellules en grains. Ces modifications progressent jusqu'au 4ème mois. A ce point, les cellules pyramidales ont largement disparu de la région CA1 et dans une moindre mesure de la région CA3. Les fibres moussues ont bourgeonné, établissant de nouvelles connexions dans le gyrus denté. Les remaniements neuronaux sont accompagnés d'une importante gliose. Les cellules GFAP positives sont situées anormalement dans les colonnes des cellules granulaires et prennent une orientation radiaire. Ces modifications hippocampiques sont similaires à celles observées chez une importante fraction des patients atteints d'épilepsies du lobe méso-temporal associées à une sclérose unilatérale.

Chez le rongeur, dans les jours suivant l'injection de KA, l'EEG montre des décharges intercritiques localisées au niveau de l'hippocampe ipsilatéral, plus fréquemment observées pendant le sommeil, ainsi que des décharges critiques focales d'une durée de quelques secondes. Ces décharges

ne sont accompagnées d'aucune manifestation clinique, ou sont associées à un arrêt de l'activité en cours et parfois à des mouvements de la face.

Les crises récurrentes sont souvent focales et unilatérales, n'impliquant que l'hippocampe. D'un point de vue comportemental, elles débutent par une immobilisation, des mouvements de mastication et se poursuivent par des mouvements cloniques des pattes antérieures suivis de redressements et de courses. Simultanément, la diffusion d'une décharge épileptique dans le cortex ipsilatéral, voire controlatéral est enregistrée. Un an après l'injection de KA, les caractéristiques des anomalies comportementales et EEG, intercritiques comme critiques, sont maintenues. Des manifestations motrices durant les crises surviennent rarement. La persistance des lésions unilatérales n'est constatée dans aucun autre modèle animal de l'épilepsie temporale (Magloczky et Freund, 1993 ; Magloczky et Freund, 1995).

Mon travail visait à étudier *in vitro* la contribution des neurones GABAergiques à l'activité hippocampique spontanée. Afin de rendre un lot de souris épileptiques, une injection focale unilatérale a été réalisée dans l'hippocampe (Bouilleret et al, 1999). Après une période de 2 à 3 semaines, ces animaux développaient des crises spontanées et récurrentes et présentaient une perte cellulaire, un début de sclérose hippocampique du côté ipsilatéral, semblable au tissu épileptique humain (Le Duigou et al, 2005). Les tranches présentaient des activités épileptiformes non seulement du côté ipsilatéral, mais également controlatéral, sans perte cellulaire, reflétant une réorganisation du réseau hippocampique (Le Duigou et al, 2008).

J'ai enregistré, deux semaines après l'injection, simultanément un interneurone, au moyen de la technique de patch clamp, et l'activité des populations de cellules avoisinantes, au moyen de multi-électrodes extracellulaires placées dans CA3. Cela m'a permis de regarder comment interagissent les populations GABAergiques et glutamatergiques.

Je me suis intéressée à la région CA3 de l'hippocampe car les cellules pyramidales de cette région déchargent de manière spontanée (Cohen et al, 2000) et forment un réseau récurrent, peut-être propice à un déséquilibre entre excitation et inhibition (Lasztocki et al. 2009). Les interneurones étant minoritaires, j'ai utilisé une lignée de souris transgénique, GAD67-GFP, qui exprime la GFP sous contrôle du promoteur du GAD67, enzyme synthétisant le GABA, et présente dans les interneurones (Tamamaki et al, 2003). Je me suis focalisée sur les interneurones du stratum Pyramidale car dans cette couche se situent majoritairement les interneurones de type cellule en panier, cellule en chandelier et cellule bistratifiée, dont on attendrait un contrôle efficace de l'activité des cellules pyramidales par une innervation somatique forte, proche du point d'initiation des potentiels d'action, ou au contraire plus subtil, au niveau des dendrites éloignées.

Ce modèle de souris m'a ainsi permis de faire une comparaison de la contribution GABAergique à l'activité du réseau entre 3 groupes de tissus : contrôle, ipsilatéral et controlatéral à la lésion au KA.

Title: Disrupted coupling between interneurons and neuronal populations after  
focal kainate lesion

Running: Interneuron coupling to population activity in kainate epileptogenesis

Lim-Anna Sieu<sup>1</sup>, Emmanuel Eugène<sup>2</sup>, Agnès Bonnot<sup>1</sup>, Ivan Cohen<sup>1</sup>

1, Institut de Biologie Paris Seine, UPMC / INSERM U1130 / CNRS  
UMR8246, Paris, France.

2, Institut du Fer à Moulin, UPMC / INSERM UMRS839, Paris, France

- Key words: epilepsy, hippocampus, interneuron
- Number of words: 4007
- Corresponding author: Ivan Cohen, [ivan.cohen@upmc.fr](mailto:ivan.cohen@upmc.fr)  
Neuroscience Paris Seine - case courrier 16  
9 quai Saint Bernard  
75005 Paris, France

## **Abstract**

GABAergic interneurons are known to control activity balance in physiological conditions and to coordinate hippocampal networks during cognitive tasks. In temporal lobe epilepsy interneuron loss and consecutive network imbalance could favor pathological hypersynchronous epileptic discharges. We addressed this hypothesis in mice with epileptogenic hippocampal kainate lesion by combining in vitro intracellular recordings from GFP-expressing interneurons and nearby extracellular recordings in CA3. Slices from lesioned mice displayed, in addition to control synchronous events, larger epileptiform discharges. They had fewer interneurons of increased soma size. Interneurons had decreased resistance, increased capacitance and required higher current intensity to fire action potentials. Examination of synchronous discharges of control and larger amplitudes, revealed that interneurons adapted to fire exclusively with the largest population discharges. Yet, in periods devoid of population activity, firing in these neurons elicited extracellular post-synaptic potentials, suggesting that their output was at least partially preserved. Altogether, these observations support the idea that interneuron hypertrophy does not compensate for cell loss, but rather contributes to reduce inhibitory feedback through decreased excitability. Such cellular and network mechanisms may provide a runaway path towards epilepsy.

## Introduction

GABAergic interneurons are crucial in the regulation of principal cell networks, through inhibitory control loops in both baseline and synchronized activities (Buzsaki, 2001; Somogyi & Klausberger, 2005; Kullmann, 2011). They modulate synchronized physiological network activities like sharp-waves (Buzsaki *et al.* 1992; Traub *et al.* 2000; Maier *et al.* 2003; Racz *et al.* 2009; Ho *et al.* 2009; Ellender *et al.* 2010) that are generated through recurrent synapses of CA3 principal cells (Buzsaki, 1986), and coordinate oscillatory synchronized physiological activity by participating in different phases of network oscillations (Whittington *et al.* 1995; Traub *et al.* 1996; Klausberger *et al.* 2003; Gulyas *et al.* 2010).

In temporal lobe epilepsy (TLE) a profound neuronal reorganization affects the balance between excitatory principal cells and interneurons. In the hippocampus, principal cells are lost in area CA1-CA3, while the dentate gyrus exhibits axonal sprouting and neurogenesis (Tauck & Nadler 1985; Cronin & Dudek, 1988; Sutula *et al.* 1988; Goodman & Sloviter, 1992; Isokawa *et al.* 1993; Wenzel *et al.* 2000). Similarly, interneurons present specific patterns of cell loss, preferably for somatostatin containing neurons (Sloviter 1987; Buckmaster & Dudek 1997; Buckmaster & Jongen-Rêlo 1999; Cossart *et al.* 2001; Halabisky *et al.* 2010; Marx 2013) and widespread synaptic reorganization, including in parvalbumin containing neurons (Dinocourt *et al.* 2003; Wittner *et al.* 2001). In the rodent *in vivo* model of unilateral intra-hippocampal kainate (KA) injection, which reproduces key features of TLE (Bouilleret *et al.* 1999), the selective glutamate agonist triggers an acute wave of hyperactivity which is only slowed down by inhibitory transmission (Le Duigou *et al.* 2005). Over time, areas distant from the injection site show spontaneous interictal-like population activity, that remain present when tissue slices are kept in an *in vitro* interface chamber (Le Duigou *et al.* 2008). This activity pattern is similar to that observed in tissue resected from TLE patients in the subiculum, although in the latter case GABA acts as a contributing factor rather than a brake to activity (Cohen *et al.* 2002). Thus, TLE tissue shows complex remodelling of inhibitory circuits, which may contribute to alter the powerful patterning role they have under physiological conditions.

In this study we examined the long term functional remodelling of interneurons in the kainate mouse model of TLE. We applied kainate through a unilateral dorsal hippocampus injection that induces epileptogenesis. Mice expressing a green fluorescent protein (eGFP) under control of a glutamic acid decarboxylase (GAD67) promoter were used in order to specifically track interneurons, including all calretinin, parvalbumin and somatostatin positive

cells (Tamamaki *et al.* 2003). Recordings were performed in hippocampal slices prepared two weeks after the injection, a delay corresponding to the emergence of spontaneous seizures. We used a modified submersion-type recording chamber (Hajos et al 2009) to preserve spontaneous neuronal population discharges *in vitro* and we combined intracellular patch-clamp recording from interneurons with extracellular recordings that monitor synchrony of neuronal populations (Cohen & Miles 2006).

We found spontaneous local field potentials (LFP) both in control and KA treated mice. While amplitude distribution was similar for LFPs of small amplitude, KA treated mice had more large amplitude events, with a cutoff around 400 $\mu$ V. They had fewer interneurons, which showed a significant increase in soma size. Interneurones had decreased resistance and increased capacitance and required higher current intensity to fire action potential. Contrary to control tissue, interneurons rarely discharged with small amplitude LFP, while they were recruited by large amplitude LFP. Yet, in periods devoid of population discharges, interneuron firing could elicit extracellular post-synaptic potentials, suggesting that their output was at least partially preserved. Thus CA3 interneuron remodelling in response to epileptogenic kainate lesion corresponds to an exclusive functional tuning to pathological discharges.

## Material and methods

### *Animals*

All animals received humane care in compliance with the European Communities Council Directive of 2010 (2010/63/EU), and the study was approved by the institutional and regional committees for animal care. Experiments were performed on 25 adult (4-10 week old) mice from the GAD67-GFP (delta neo) line (Tamamaki et al, 2003). The mice expressed eGFP protein under control of the GAD67 promoter, allowing fluorescent labelling of GABAergic interneurons in live tissue.

### *Kainic acid injection*

Experiment design required a delay between kainic acid lesion and *in vitro* tissue recording (**Fig. 1a**). Mice 3-4 week old and 3-5 days after weaning, were anesthetized by isoflurane inhalation (1-1.5%) and placed in a stereotaxic frame. A droplet of 50nl of KA solution was injected in the right dorsal hippocampus (from the bregma: anteroposterior -1.8mm, mediolateral -1.8mm, dorsoventral -1.8mm) through a fine needle of outer diameter 0.1mm (Hamilton, Nevada, USA), connected to a 10 $\mu$ l syringe, mounted on an electric pusher (WPI, Sarasota, FL, USA). The KA solution contained: KA (20mM, Sigma-Alrich), NaCl (0,9%) and Ruby Red dye (M=3000, 10mg/ml, Invitrogen), so that the site of injection could be identified. As expected the lesion was observed in the dorsal tissue ipsilateral to the injection (**Fig. 1b**), and the fluorescence distribution was altered by the lesion. In control tissue, GAD67-GFP interneurons spread across all areas and layers of the hippocampus. The injection site is sclerotic, and the anatomical layers became less visible in the dorsal hippocampus, while in the ventral hippocampus the tissue was less affected.

### *Slice preparation*

Slices were prepared 2-3 weeks post injection, or at the equivalent age of 5-7 weeks in untreated animals. In both cases, mice were anesthetized by brief inhalation of halothane, then were decapitated and their brain removed. A tissue bloc containing left and right hippocampi was cut in horizontal slices of 350  $\mu$ m thickness with a vibratome (Microm HM 650V, Walldorf, Germany) in a cold solution (2-4°C) containing (mM): choline chloride (110), KCl (2,5), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,25), NaHCO<sub>3</sub>- (25), D-Glucose (7), CaCl<sub>2</sub> (0,5) and MgCl<sub>2</sub> (7). Slices were then transferred to a storage interface-type chamber (35°C), where they were placed in an artificial cerebro-spinal fluid (ACSF) solution containing (mM): NaCl (125), KCl (2,5),

NaHCO<sub>3</sub>- (26), D-Glucose (10), MgCl<sub>2</sub> (2) and CaCl<sub>2</sub> (2), while their upper surface was exposed to a humidified O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 95/5 atmosphere (Maier *et al.* 2009). Cutting and ACSF solutions were oxygenated with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 95/5 gas mixture (pH 7,4). One slice was transferred to the submerged recording chamber and immobilized with a nylon mesh. It was continually perfused with oxygenated ACSF, 10 ml/min at 32°C, the flow reaching both the lower and the upper sides of the slice (Hajos *et al.* 2009). This recording condition preserved spontaneous activity. The chamber was placed on an Axioscope 2 FS microscopy (Zeiss) platform, equipped with a 40x DIC objective. Green fluorescent GAD67 interneurons were visualized using selective filters (Ex: 485/20nm, Em: 530/25nm).

#### *Extracellular recordings*

Neuronal population activity was recorded with a 16 channel silicon extracellular electrode (NeuroNexus, Ann Arbor, Michigan), mounted on a micromanipulator. The electrode was composed of two branches spaced by 150µm, each branch comprising two tetrodes (**Fig. 1c**). Each electrode channel could detect spontaneous local field potentials, including extracellular multiunit action potentials (Cohen *et al.* 2000) and extracellular synaptic potentials (Bazelot *et al.* 2010). The silicon electrode was placed in CA3 with one tetrode in *Stratum Oriens*, two tetrodes in *Stratum Pyramidale* and one tetrode in *Stratum Radiatum*. Signals were amplified 1000 times and filtered between 1Hz and 20KHz, by a 16 channels amplifier with high input impedance (Xcell, Dipsi, Châtillon). Noise amplitude ranged from 5 to 10µV, while action potentials, observed in *Stratum Pyramidale*, ranged from 40 to 200µV.

#### *Intracellular recordings*

Interneurons were studied with the patch-clamp technique in the whole-cell configuration. Borosilicate pipettes were filled with a solution containing (mM): K-Gluconate (130), KCl 5), HEPES (10), EGTA (10), MgCl<sub>2</sub> (2), Mg-ATP (4), Tris-GTP (0,4), Na<sub>2</sub>-phosphocreatinin (10) and biocytin (0,1%). The pipette resistance ranged from 2 to 6 MΩ in ACSF. This solution generated a non-corrected liquid junction potential of -15mV. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. An Axopatch 200A amplifier (Molecular Devices) was used in current-clamp mode to establish whole-cell configuration. Data were digitalized by a 16-bit analogic-digital conversion interface with 16 channels (Digidata 1322A, Molecular Devices), and displayed with the accompanying software Axoscope.

### *Analysis*

Interneuron intrinsic properties were derived from current-clamp recording. Resting potential was obtained by averaging membrane potential for 10s when no current was injected. Membrane resistance and capacitance were measured from hyperpolarization steps of 50pA. We computed the average of 10 traces without synaptic events. An exponential curve was adjusted to obtain values for time constant, resistance and capacitance. Then, membrane potential was adjusted to -65mV and a series of current steps lasting 800ms were applied. We counted the number of elicited action potentials generated and identified the threshold values.

Extracellular signals recorded from each electrode were filtered to isolate local field potentials (LFP, 5-300Hz) characteristic of synchronous activities. They were automatically detected by an algorithm previously presented in (Cohen *et al.* 2000) that gave a proportion of false positives and false negatives that did not exceed 3%. We compared the characteristics of LFP measured stratum pyramidal, using one electrode site from each recording.

We distinguished LFP of amplitude less than 400 $\mu$ V that had similar distribution in control and KA-treated tissue and those of larger amplitude that were at least an order of magnitude more abundant in epileptic tissue. Small LFP correspond to synchronization of only a fraction of neurons, while large LFP had amplitudes correspond to massive synchronization (Cohen *et al.* 2006). The detection of LFP signals from recording sites distant by 200 $\mu$ m implied that both small and large LFP synchronous activities were taking place across spatially extended neuronal populations.

We explored the extracellular synaptic potential generated by post-synaptic currents induced by firing in the intracellularly recorded interneuron (Bazelot et al 2010). Since the potential was close to noise level, we aligned traces of intracellular action potentials that did not occur at short interval (<250ms) with population discharge (amplitude above 30 $\mu$ V).

Analysis was performed with routines implemented using Labview (National Instruments, Austin, TX, USA). For statistics we used two-tailed Student's t-test.

### *Morphology*

During intracellular recordings, the cell was filled with biocytin (0,1%) by diffusion from the pipette. After the recordings, each slice was transferred in a 4% Paraformaldehyde solution, dissolved in a 0,12M phosphate Buffer (PBS) solution, and left under continuous agitation at 4°C during 24h for fixation. Slices were then transferred to a 0,12M PBS solution, sucrose (30%) at 4°C for cryoprotection and each slice was left for at least a night under

agitation. Freezing-unfreezing (x3) on dry ice was then used to permeabilize the membranes, followed by 3 washes (PBS 0,12M at ambient temperature). Saturation and permeabilization were performed with PBS 0,12M, milk (0.2%), Triton 100X (0.3%), for 3h at ambient temperature. Slices were then incubated overnight with 1/500 Streptavidin-Cy3 (Invitrogen) and 1/1000 DAPI in PBS 0,12M, milk (0.2%), Triton 100X (0.1%) at 4°C. The Streptavidin revealed biocytin (avidin-biotin complex) whilst DAPI revealed cellular nuclei. After 3 washes with PBS 0,12M, the slices were mounted in a Prolong Gold Antifade medium (Molecular probes, Invitrogen) that preserved fluorescence. Cy3, GFP and DAPI were visualized with a fluorescent microscope equipped for structured light imaging (Optigrid system, Qioptic). Acquisition was made with 4X or 20X lens with a high-resolution camera (Qimaging Retiga EXi 1392x1042 pixels). The morphology of each cell was revealed in 3 dimensions (voxel = 2um for 4X and 0,7um for 20X) and the images were scanned and visualized using Volocity software (Improvision, Perkin Elmer).

### Cell counting

Cell counts and soma size estimation were performed on cumulative stacks of 350µm thickness. CA3 sectors were divided according to *Cornu Ammonis* layers. We pooled Lacunosum Moleculare and Radiatum as the exact border between the two was not always clearly visible, which could have biased quantification. Counts were divided by the volume examined to obtain a cellular density, in order to compensate for possible hippocampal KA-induced shrinkage (Wolf *et al.* 2002).

## Results

Networks of CA3 were studied after a delay that corresponded to the early phase of epileptogenesis, around two weeks after a focal KA lesion in the dorsal hippocampus of the right hemisphere (**Fig. 1**). We compared slices ipsi- or contralateral to the lesion and control tissue.

### Spontaneous population activity

Spontaneous neuronal activity was assessed in acute slice preparation by recording spontaneous extracellular local field potentials, in control (n=12), ipsilateral (n=13) and contralateral (n=9) animals (**Fig. 2**). Slices exhibited stable spontaneous activity for prolonged recording sessions (>1h). Both control and KA slices from ipsi- and contralateral sides exhibited LFP discharges (**Fig. 2a**). These discharges of varying amplitude were comparable to partial or extensive synchrony of neuronal populations induced pharmacologically (Cohen et al 2006).

Activity patterns were different in the three groups (Fig 2b-d). Control slices exhibited discharges of small amplitude (**Fig. 2b**). On the contrary, epileptic slices further exhibited large amplitude discharges with patterns of short sequences of discharges of increasing amplitude (**Fig. 2c-d**). We pooled the LFPs detected in our recordings to estimate the distribution of their characteristic shape and interval. Distributions were significantly different for amplitude, duration of the rising phase and interval between discharges (**Table 1**). While discharges below 400 $\mu$ V had similar distribution, the most prominent signature of epileptic tissue was an increased amount of discharges above 500-700 $\mu$ V, rising above ten-fold over control tissue for larger amplitudes (**Fig. 2e**). Thus, we distinguished small LFP below 400 $\mu$ V and the larger LFP that formed a signature of epileptogenic transformation. Changes in interval distribution was more pronounced in tissue ipsilateral to the KA injection, with a ten-fold increase for intervals above 4s (**Fig. 2f**). Duration of LFP fell sharply in control tissue at around 20ms, while both ipsi- and contralateral tissue distributed to larger values, with stronger difference on the contralateral side (**Fig. 2g**).

### Interneuron density and size

Since interneurons exert a strong control of hippocampal network activity through inhibitory feedback, we wanted to compare the population of interneurons after the epileptogenic lesion, starting with their anatomical distribution (**Fig. 3a,b**). To quantify these changes we counted the cells in stack images of our 350  $\mu$ m slices (**Fig. 3c**). Significant cell

loss was found in the ipsilateral side, in all layers except in the *Radiatum-Lacunosum moleculare* (**Table 2**). As expected, the damage was stronger in the tissue closer to the lesion site. On the contrary, soma size (**Table 3**) significantly increased in all layers on both sides, relative to control. In *Lucidum*, both density and soma size were significantly different between ipsilateral and contralateral sides. Areas of greater cell loss coincided with stronger soma enlargement, suggesting that cellular hypertrophy took place to compensate for the functional deficit of inhibition induced by cell loss and synaptic reorganization.

#### Interneuron membrane properties

We then asked if the changes in interneuron size could impact their intrinsic and firing properties. We chose cells with somas in *Stratum Pyramidale* in order to include basket cells that exert fast feedback inhibition on pyramidal cells (Miles *et al.* 1996). Intrinsic membrane properties were characterized using intracellular recordings of visually identified fluorescent cells (**Fig. 4 & 5, Table 4**).

The passive properties were estimated from the voltage response to hyperpolarizing current step. The time constant was longer in epileptic tissue than control, both contralateral ( $p < 0.03$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 6$ ) and ipsilateral ( $p < 0.01$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 9$ ) to the lesion (**Fig. 4a**). No significant difference was found between the two sides. We estimated the resistance from the maximum amplitude of the voltage step and the capacitance by dividing the time constant by the resistance. Each group of cells showed distinct combination of resistance and capacitance (**Fig. 4b**). Resistance (**Fig. 4c**) was different between control and contralateral ( $p < 0.01$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 6$ ), and between contra- and ipsilateral ( $p < 0.01$ ,  $n_1 = 6$ ,  $n_2 = 9$ ). Capacitance (**Fig. 4d**) showed the same pattern (respectively  $p < 0.01$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 6$  and  $p < 0.01$ ,  $n_1 = 6$ ,  $n_2 = 9$ ). For these two parameters we found no difference between control and ipsilateral.

The change in time constant could impact the firing property of the interneuron, thus we tested how the resting membrane potential and the firing threshold varied. Resting membrane potentials did not present significant difference between control, ipsi- or contralateral tissue. We estimated the threshold current that could elicit firing by applying series of current steps and counting the number of action potentials evoked (**Fig. 5a, b**). We found an increase in current required to elicit action potentials in contralateral tissue, where membrane time constant was the most strongly altered during epileptogenesis ( $p < 0.05$ ,  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 4$ ).

#### Contribution of interneurons to synchronous discharges

Although changes in cellular properties varied in the direction of decreased excitability in epileptic tissue, cellular contribution to population activity also depends on the numbers of cells and their connectivity. In order to address the question directly we combined intracellular recording with extracellular monitoring of population discharges (**Fig. 6**). In control tissue (n=6), LFPs were associated either with subthreshold excitatory synaptic potential (**Fig. 6a**) or with action potentials (**Fig. 6b**). In contrast, the typical behavior of interneurons in epileptic tissue was to exhibit no synaptic potential and no firing associated with LFPs of equivalent amplitude (**Fig. 6c**, n=7). However, these neurons strongly fired when LFPs of larger amplitude were generated in the tissue (n=7). These findings suggest that interneurons in KA treated mice do not lack synaptic input, yet they are functionally tuned to selectively respond to larger population discharges.

To study the tuning of interneurons to the largest population discharges, we measured across our recordings how an interneuron responded to LFP in two distinct range of amplitude, 30-300 $\mu$ V and 400-1200 $\mu$ V (**Fig. 6e**). Distributions were significantly different across groups of tissue and amplitude range (**Table 5**). In control tissue interneuron firing was time-locked to small LFPs, and was stronger but not time-locked to large LFPs. On the contrary, in epileptic tissue time-locking of interneurons was strong for large LFPs, while their firing was below that for small LFPs at intervals larger than 0.1-0.2s, with a subsequent refractory period. In order to confirm this pattern, we measured, for each amplitude of LFP, the occurrence of intracellular firing in a time window of +/-0.1s (**Fig. 6f**), and we counted the number of action potentials (**Fig. 6g**). Control and epileptic tissue showed very distinct behavior of interneurons. In control tissue interneuron firing was relatively stable over the range of amplitude, with a decay from around 1/4 chance of firing and 0.4 action potential per LFP below 300 $\mu$ V down to 1/5 and 0.2 for large LFPs. On the contrary, in epileptic tissue firing probability started below 1/10 probability with less than 0.1 action potential and increased up to one-to-one firing of around 2 action potentials per LFP above 600-700 $\mu$ V. Thus in epileptic tissue interneurons appear to be irresponsive to synchrony of sparse populations but contribute to all the largest population discharges.

#### Extracellular synaptic potential from interneurons

Recent work demonstrated that interneurons may contribute to local field potentials through post-synaptic current loops running in the resistive extracellular space (Bazelot et al, 2010), and we asked whether interneurons firing in epileptic tissue can also elicit significant post-synaptic currents (**Fig. 7**). In combined intra- and extracellular recordings, we isolated

interneuron action potentials that were not preceded or followed by a LFP above  $500\mu\text{V}$  in a time window of  $\pm 200\text{ms}$ , which was mostly associated with intracellular depolarisation through the recording pipette (**Fig. 7a**). Extracellular traces were aligned on intracellular firing and their average was estimated. For  $n=3/9$  interneurons, from ipsi- ( $n=1$ ) and contralateral ( $n=2$ ) epileptic tissue, we found a clear extracellular potential following interneuron firing. The signal was maximal in *Stratum Pyramidale*, reaching  $5\text{-}15\mu\text{V}$ , with a latency shorter than  $1\text{ms}$  after the action potential. A smaller field potential was observed from electrodes on either side of *Stratum Pyramidale*. Thus we conclude that interneurons can trigger post-synaptic current of comparable amplitude to those previously reported in control tissue. We revealed the biocytin injected through the recording pipette to estimate the distribution of dendrites and axon of these interneurons (**Fig. 7b**). All three neurons had dendrites extending in the basal and apical layers, and an axon densely innervating the *Stratum Pyramidale*, thus they likely were basket cells.

## Discussion

The kainate microlesion rodent model of temporal lobe epilepsy shows a broad range of tissue remodelling (Levesque *et al.* 2013). In this study, tissue resected two weeks after the lesion showed distinct spontaneous LFPs of amplitude above half a millivolt. Interneuron loss and cell body swelling were observed in CA3. In Stratum Pyramidale interneurons had increased capacitance and reduced resistance. The overall effect of these changes was an increase in membrane time constant and an increase in input current required to trigger action potentials in tissue contralateral to the lesion. By measuring membrane potential during LFPs we found that during epileptogenesis interneurons stop to fire with population discharge of the same amplitude as observed in control tissue. On the contrary, interneurons fire with each large amplitude discharges, that form a signature of epileptic tissue. While the response to interneuron input and their contribution to microcircuit activity are altered, their post-synaptic extracellular potential comparable to control tissue suggest that their output might be at least partially preserved.

Changes in hippocampal GABAergic interneuronal circuits are known to play a central role in TLE epileptogenesis (Fritschy *et al.* 1999, Maglóczky 2010), with most of the evidence coming from histological work in both human and animal models. In animal models, injecting kainate in awake rather than anesthetized animals could reduce tissue variability and thus give sharper images of these complex transformation over time (Rattka *et al.* 2012). Yet, this study provides a snapshot of tissue functional reaction to lesion, while epileptogenesis continues to develop over several months (Le Duigou *et al.* 2008, Shetty *et al.* 2009, Karunakaran *et al.* 2012). Enlargement of interneuron soma similar to our observation has been described in the *Dentate Gyrus* in the pilocarpine model (Halabisky *et al.* 2010). While we observed more interneuron loss and larger body size on the ipsilateral side, we found larger capacitance increase on the contralateral side, where threshold current increase was significant. These combined observation suggest that part of capacitance increase must be generated through larger dendritic compartment.

Dentate granular cell sprouting and CA1 sclerosis form the most visible anatomical markers of TLE in the kainate model, yet CA3 lesion-induced plasticity may play a central role in sustaining pathological activities. High-resolution MRI data (Hsu *et al.* 2007) has shown that the first changes are observed in CA3, corresponding to focal oedema and cell death (Bouilleret *et al.* 2000), in agreement with the observation of kainate receptors post-synaptic to mossy-fiber contacts (Pinheiro *et al.* 2012). At the functional level, the CA3 recurrent network may have a triggering role in hypersynchronous activities, especially from

CA3a hyperexcitable pyramidal cells (Cohen *et al.* 2006, Wittner & Miles 2007). Strengthened population discharges in CA3 affect both recurrent connections, and projection areas. Indeed, epileptogenic lesion triggers CA3 sprouting to widespread regions of the hippocampus and the entorhinal cortex (Siddiqui & Joseph 2005, Zhang *et al.* 2012). In vivo, these connexions will propagate pathological population discharges from the hippocampus to cortical fields.

Perisomatic inhibition of principal cells by basket cells may contribute to synchronize network activity, although different mechanisms have been proposed to explain this phenomenon. In the intra peritoneal pilocarpine model of epilepsy (Zhang *et al.* 2009; Thind *et al.* 2010) basket cells receive less excitatory synaptic drive, their pools of readily releasable vesicles are smaller, and transmission failure at basket cell-to-granule cell synapses is increased. Inhibition failure was suggested to allow runaway excitation. Another mechanism has been suggested in an acute slice model, where perisomatic inhibitory input was found to be massively involved during burst discharges, implying a simultaneous silent refractory periods among principal cells and as a consequence a synchronization of their rebound discharge (Marchionni & Maccaferri 2009). Our data reconcile the two mechanisms suggested earlier, showing reduced input-output response together with stronger time-locking of action potential to the largest spontaneous population discharges, with a subsequent refractory period. A consensus seems to emerge as this pattern of interneuron activity with interictal discharges was recently reported in the pilocarpine model in vivo (Feldt-Muldonn *et al.* 2015).

During epileptogenesis, disrupted coupling between interneurons and population activity of size comparable to that observed in control tissue may impair hippocampal rhythmogenesis (Dugladze *et al.* 2007), impacting learning and memory (Stubley-Weatherly *et al.* 1996). Furthermore, the cycle of cell loss, reactive hypertrophy and disrupted coupling provides a runaway path towards epilepsy which should be addressed in future therapeutic strategies.

### **Author contributions**

All authors contributed to the design of the experiments. Experiments were designed by LAS and IC. LAS performed electrophysiology recordings and morphology observations. IC programmed analysis software. EE produced morphological imaging. LAS, AB and IC analyzed the data and wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Richard Miles for hosting experiments and to Desdemona Fricker and Jean Simmonet for helpful discussions. We thank Dr Yuchio Yanagawa for sharing the GAD67-GFP mouse line, and Dr Marie-Catherine Tiveron for help starting the mouse colony.

## **Bibliography**

- Bazelot M, Dinocourt C, Cohen I, Miles R (2010). Unitary inhibitory field potentials in the CA3 region of rat hippocampus. *J Physiol* **588**, 2077-90.
- Bouilleret V, Loup F, Kiener T, Marescaux C, Fritschy JM (2000). Early loss of interneurons and delayed subunit-specific changes in GABA(A)-receptor expression in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* **10**, 305–324.
- Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G (1999). Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **89**, 717–729.
- Buckmaster PS, Dudek FE (1997). Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol* **385**, 385-404.
- Buckmaster PS, Jongen-Rêlo AL (1999). Highly specific neuron loss preserves lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of kainate-induced epileptic rats. *J Neurosci* **19**, 9519-29.
- Buzsáki G (1986). Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res* **398**, 242-52.
- Buzsáki G, Horváth Z, Urioste R, Hetke J, Wise K (1992). High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* **256**, 1025-7.
- Buzsáki G (2001). Hippocampal GABAergic interneurons: a physiological perspective. *Neurochem Res* **26**, 899-905.
- Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C (2012). The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* **13**, 407–420.
- Cohen I, Huberfeld G, Miles R (2006). Emergence of disinhibition-induced synchrony in the CA3 region of the guinea pig hippocampus in vitro. *J Physiol* **570**, 583–594.
- Cohen I, Miles R (2000) Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges in in vitro hippocampus. *J Physiol* **524**, 485–502.
- Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* **298**, 1418-21.
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchán-Pérez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C (2001). Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* **4**, 52–62.
- Cronin J, Dudek FE (1988). Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatment in rats. *Brain Res.* **474**, 181-4.
- Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben-Ari Y, Esclapez M (2003). Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* **459**, 407–425.
- Dugladze T, Vida I, Tort AB, Gross A, Otahal J, Heinemann U, Kopell NJ, Gloveli T (2007). Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 17530–17535.
- Ellender TJ, Nissen W, Colgin LL, Mann EO, Paulsen O (2010). Priming of hippocampal population bursts by individual perisomatic-targeting interneurons. *J Neurosci* **30**, 5979-91.
- Fritschy JM, Kiener T, Bouilleret V, Loup F (1999). GABAergic neurons and GABA A-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochemistry International* **34**, 435–445.
- Goodman JH, Sloviter RS (1992). Evidence for commissurally projecting parvalbumin-immunoreactive basket cells in the dentate gyrus of the rat. *Hippocampus* **2**, 13-21.

- Gulyás AI, Szabó GG, Ulbert I, Holderith N, Monyer H, Erdélyi F, Szabó G, Freund TF, Hájos N (2010). Parvalbumin-containing fast-spiking basket cells generate the field potential oscillations induced by cholinergic receptor activation in the hippocampus. *J Neurosci* **30**, 15134-45.
- Hájos N, Mody I (2009). Establishing a physiological environment for visualized in vitro brain slice recordings by increasing oxygen supply and modifying aCSF content. *J Neurosci Methods* **183**, 107–113.
- Halabisky B, Parada I, Buckmaster PS, Prince DA (2010). Excitatory Input Onto Hilar Somatostatin Interneurons Is Increased in a Chronic Model of Epilepsy. *J Neurophysiol* **104**, 2214–2223.
- Ho EC, Zhang L, Skinner FK (2009). Inhibition dominates in shaping spontaneous CA3 hippocampal network activities in vitro. *Hippocampus* **19**, 152-65.
- Hsu YH, Lee WT, Chang C (2007). Multiparametric MRI evaluation of kainic acid-induced neuronal activation in rat hippocampus. *Brain* **130**, 3124–3134.
- Isokawa M, Levesque MF, Babb TL, Engel J Jr (1993). Single mossy fiber axonal systems of human dentate granule cells studied in hippocampal slices from patients with temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **13**, 1511-22.
- Karunakaran S, Grasse DW, Moxon KA (2012) Changes in network dynamics during status epilepticus. *Exp Neurol*. **234**, 454-65.
- Klausberger T, Magill PJ, Márton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsáki G, Somogyi P (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* **421**, 844-8.
- Kullmann DM (2011). Interneuron networks in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol* **21**, 709-16.
- Le Duigou C, Bouilleret V, Miles R (2008). Epileptiform activities in slices of hippocampus from mice after intra-hippocampal injection of kainic acid. *J Physiol* **586**, 4891–4904.
- Le Duigou C, Wittner L, Danglot L, Miles R (2005) Effects of focal injection of kainic acid into the mouse hippocampus in vitro and ex vivo. *J Physiol* **569**, 833–847.
- Magloczky Z (2010). Sprouting in human temporal lobe epilepsy: Excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy Research* **89**, 52–59.
- Maier N, Morris G, Johenning FW, Schmitz D (2009). An Approach for Reliably Investigating Hippocampal Sharp Wave-Ripples In Vitro. *PLoS One* **4**, e6925.
- Maier N, Nimrich V, Draguhn A (2003). Cellular and network mechanisms underlying spontaneous sharp wave-ripple complexes in mouse hippocampal slices. *J Physiol* **550**, 873-87.
- Marchionni I, Maccaferri G (2009). Quantitative dynamics and spatial profile of perisomatic GABAergic input during epileptiform synchronization in the CA1 hippocampus. *J Physiol* **587**, 5691–5708.
- Marx M, Haas CA, Häussler U (2013) Differential vulnerability of interneurons in the epileptic hippocampus. *Front Cell Neurosci* **7**, 167.
- Miles, R., Toth, K., Gulyas, A. I., Hajos, N., & Freund, T. F. (1996). Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*, **16**, 815–823.
- Muldoon SF, Villette V, Tressard T, Malvache A, Reichennek S, Bartolomei F, Cossart R (2015) GABAergic inhibition shapes interictal dynamics in awake epileptic mice. *Brain*. **138**, 2875-90.
- Nakajima S, Franck JE, Bilkey D, Schwartzkroin PA (1991). Local circuit synaptic interactions between CA1 pyramidal cells and interneurons in the kainate lesioned hyperexcitable hippocampus. *Hippocampus* **1**, 67–78.

- Pinheiro PS, Lanore F, Veran J, Artinian J, Blanchet C, Crépel V, Perrais D, Mulle C (2013). Selective Block of Postsynaptic Kainate Receptors Reveals Their Function at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Cereb Cortex* **23**, 323-31.
- Rácz A, Ponomarenko AA, Fuchs EC, Monyer H (2009). Augmented hippocampal ripple oscillations in mice with reduced fast excitation onto parvalbumin-positive cells. *J Neurosci* **29**, 2563-8.
- Rattka M, Brandt C, Löscher W (2012). The intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revisited: Epileptogenesis, behavioral and cognitive alterations, pharmacological response, and hippocampal damage in epileptic rats. *Epilepsy Research* **PII: S0920-1211**, 00313-0
- Shetty AK, Hattiangady B, Rao MS (2009). Vulnerability of hippocampal GABA-ergic interneurons to kainate-induced excitotoxic injury during old age. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13**, 2408–2423.
- Siddiqui AH, Joseph SA (2005). CA3 axonal sprouting in kainate-induced chronic epilepsy. *Brain Research* **1066**, 129–146.
- Sloviter RS (1987). Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* **235**, 73-6.
- Somogyi P, Klausberger T (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* **562**, 9-26.
- Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G (1988). Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* **239**, 1147-50.
- Stubley-Weatherly LA, Harding JW, Wright JW (1996). Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Res* **716**, 29-38.
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J-I, Obata K, Kaneko T (2003). Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* **467**, 60–79.
- Tauk DL, Nadler JV (1985). Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci* **5**, 1016-22.
- Thind KK, Yamawaki R, Phanwar I, Zhang G, Wen X, Buckmaster PS (2010). Initial loss but later excess of GABAergic synapses with dentate granule cells in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* **518**, 647–667.
- Traub RD, Bibbig A, Fisahn A, LeBeau FE, Whittington MA, Buhl EH (2000). A model of gamma-frequency network oscillations induced in the rat CA3 region by carbachol in vitro. *Eur J Neurosci* **12**, 4093-106.
- Traub RD, Whittington MA, Stanford IM, Jefferys JG (1996). A mechanism for generation of long-range synchronous fast oscillations in the cortex. *Nature* **383**, 621-4.
- Wenzel HJ, Woolley CS, Robbins CA, Schwartzkroin PA (2000). Kainic acid-induced mossy fiber sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats. *Hippocampus* **10**, 244-60.
- Whittington MA, Traub RD, Jefferys JG (1995). Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* **373**, 612-5.
- Wittner L, Maglóczy Z, Borhegyi Z, Halász P, Tóth S, Eross L, Szabó Z, Freund TF (2001). Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* **108**, 587-600.
- Wittner L, Miles R (2007). Factors defining a pacemaker region for synchrony in the hippocampus. *J Physiol* **584**, 867–883.
- Wolf OT, Dyakin V, Patel A, Vadasz C, De Leon MJ, McEwen BS, Bulloch K (2002). Volumetric structural magnetic resonance imaging (MRI) of the rat hippocampus following kainic acid (KA) treatment. *Brain Research* **934**, 87–96.

- Zhang W, Huguenard JR, Buckmaster PS (2012). Increased excitatory synaptic input to granule cells from hilar and CA3 regions in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **32**, 1183-96.
- Zhang W, Yamawaki R, Wen X, Uhl J, Diaz J, Prince DA, Buckmaster PS (2009). Surviving Hilar Somatostatin Interneurons Enlarge, Sprout Axons, and Form New Synapses with Granule Cells in a Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci* **29**, 14247–14256.

## Figures

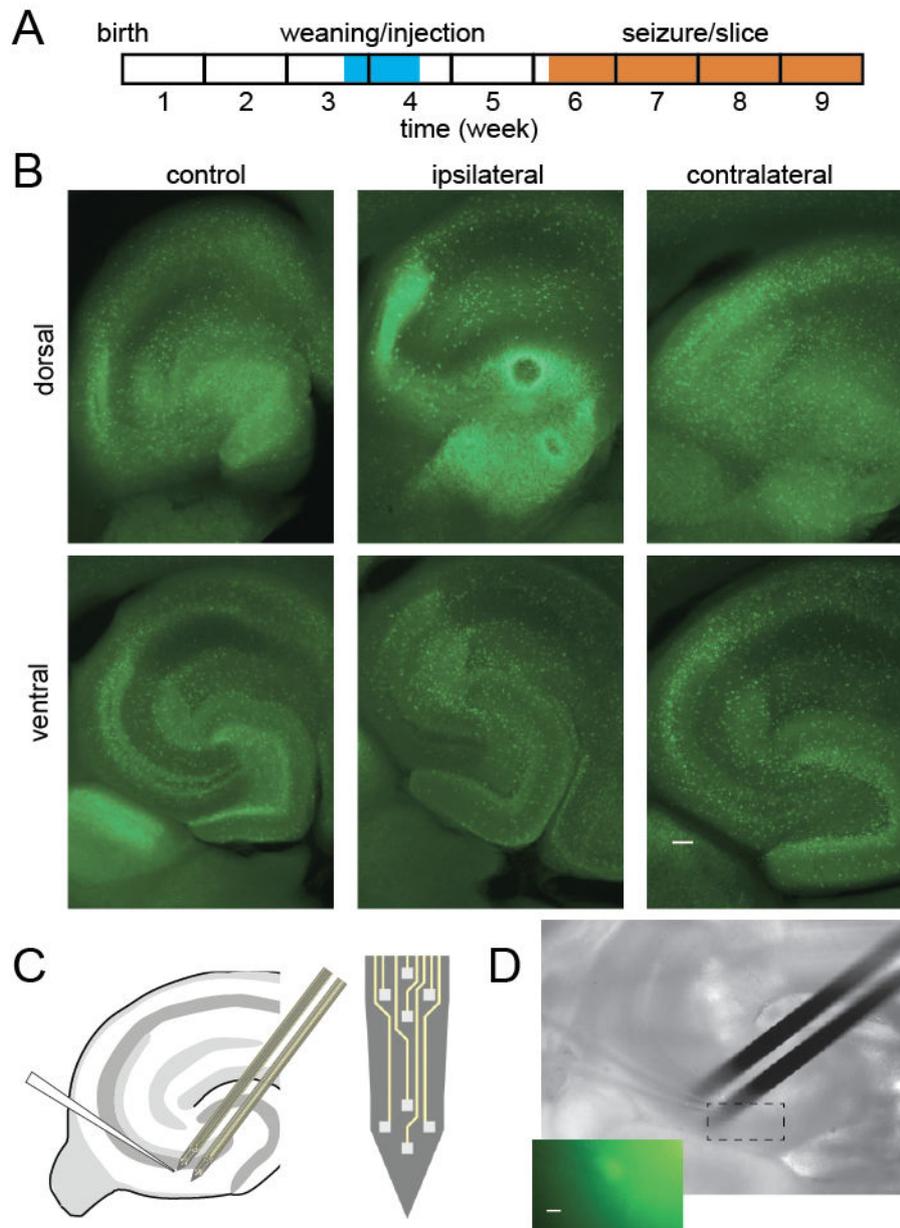


Figure 1 - Interneuron and LFP recording after epileptogenic lesion. A, Experiment timeline. B, Fluorescence ipsilateral and contralateral to focal KA lesion, 2 weeks post-injection. Overall fluorescence was most intense around the lesion, although in a diffuse pattern. Cell bodies remained visible throughout most tissue. C, D Schematic and snapshot of intracellular recording from fluorescent interneuron and nearby population local field potentials.

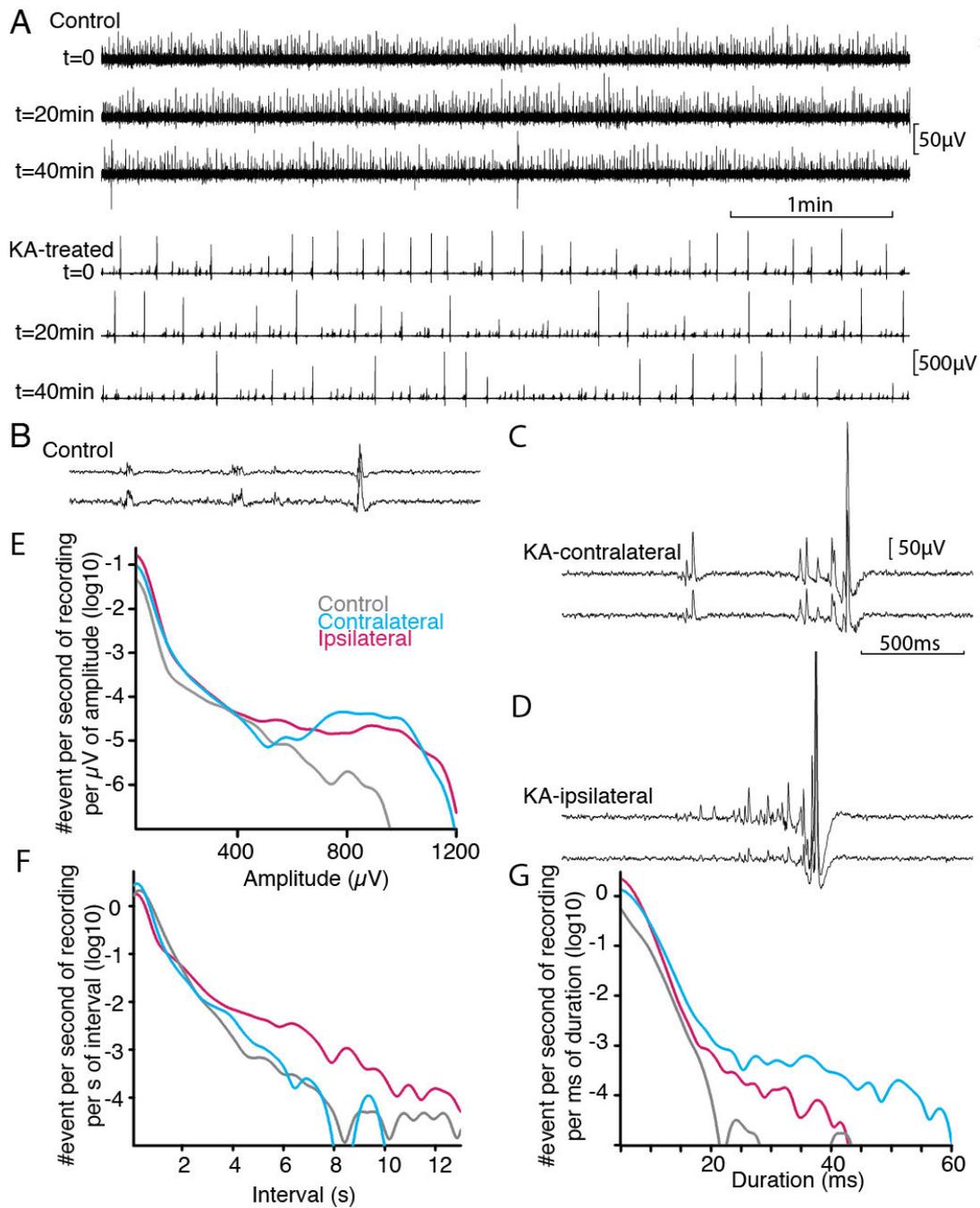


Figure 2 - Spontaneous activity in vitro. A, Stable spontaneous activity was observed in our immersed slice preparation in physiological saline, both in control and epileptic tissue. Sample extracellular traces are shown at 20 minute interval. B-D, Activity pattern differed between control (B), contralateral (C), ipsilateral side (D). Paired extracellular recording show synchronous field potentials across distance of 180 microns in *Stratum Pyramidale*. E-G, Distribution of field potential characteristics across all recordings (n= 115507 control, n=107141 contralateral, n=224497 ipsilateral). Epileptogenic tissue had more large amplitude potentials, and more potentials of longer duration. Prolonged periods of silence were more prominent ipsilateral to lesion.

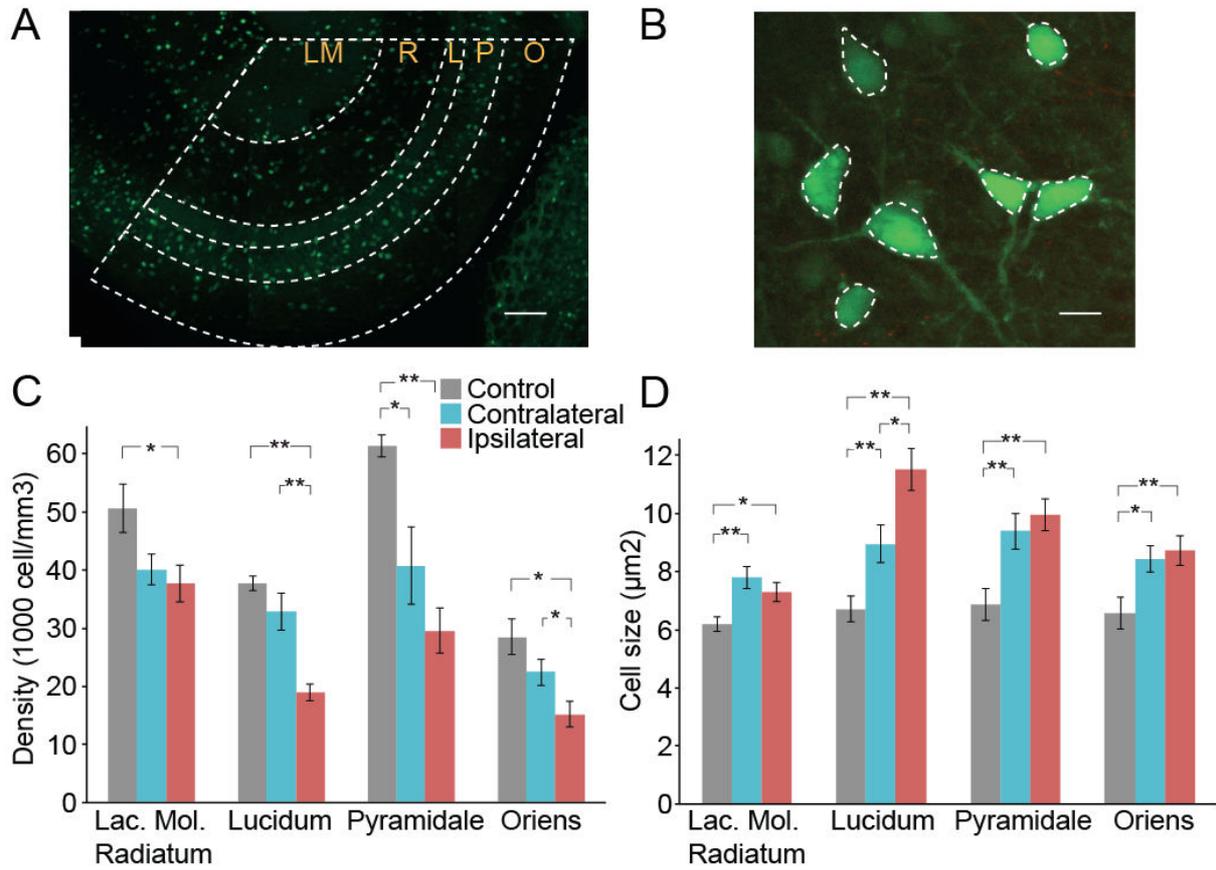


Figure 3 - Interneuron density and size. Interneuron density (A) and body size (B) were estimated in ventral CA3 using GFP fluorescence in fixed tissue. C, D, Overall cell loss was significant on the ipsilateral but not the contralateral side (Student's t-test, AVG $\pm$ -SEM, n=3 control, n=6 contralateral, n=9 ipsilateral). Cells were enlarged over all CA3 layers in epileptic mice (Student's t-test, AVG $\pm$ -SEM).

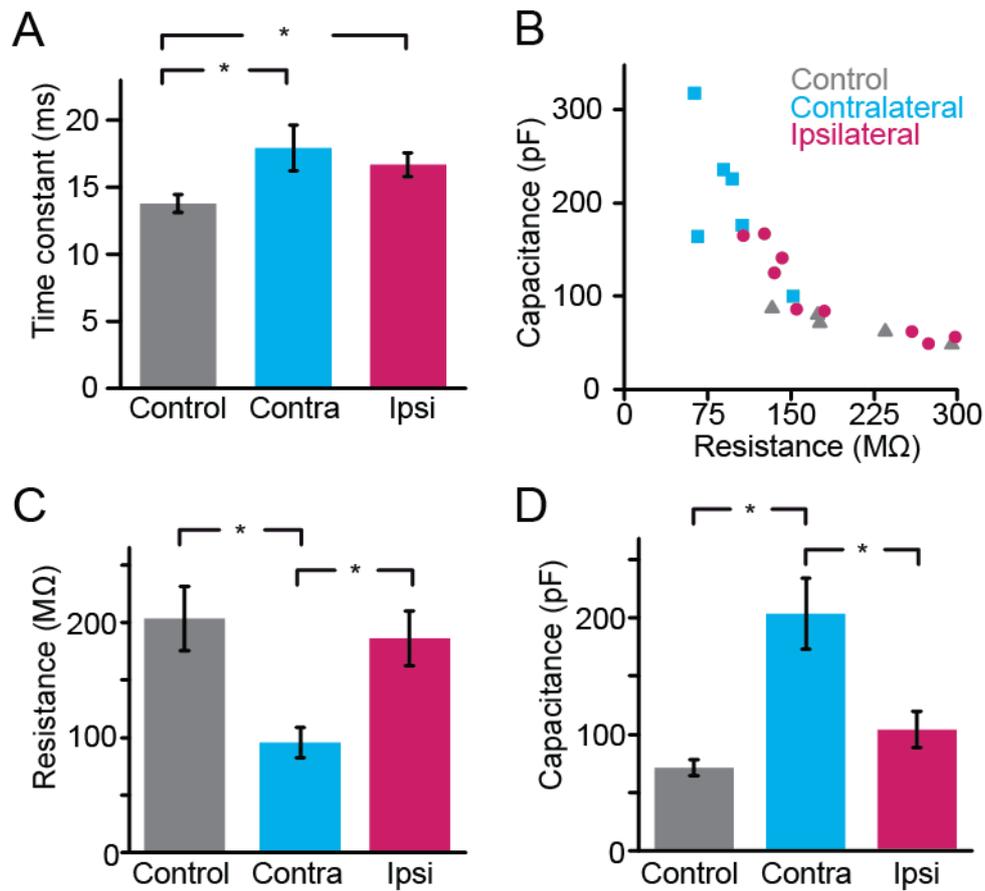


Figure 4 - Passive membrane properties of interneurons. A, resistance vs capacitance show concurrent increased capacitance and reduced resistance coherent with interneuron enlargement following kainate lesion. B-D, Membrane time constant was significantly altered (B), corresponding to changes in both resistance (C) and capacitance (D). Error bars +/- SEM (n= 5 control, n=6 contralateral, n=9 ipsilateral)

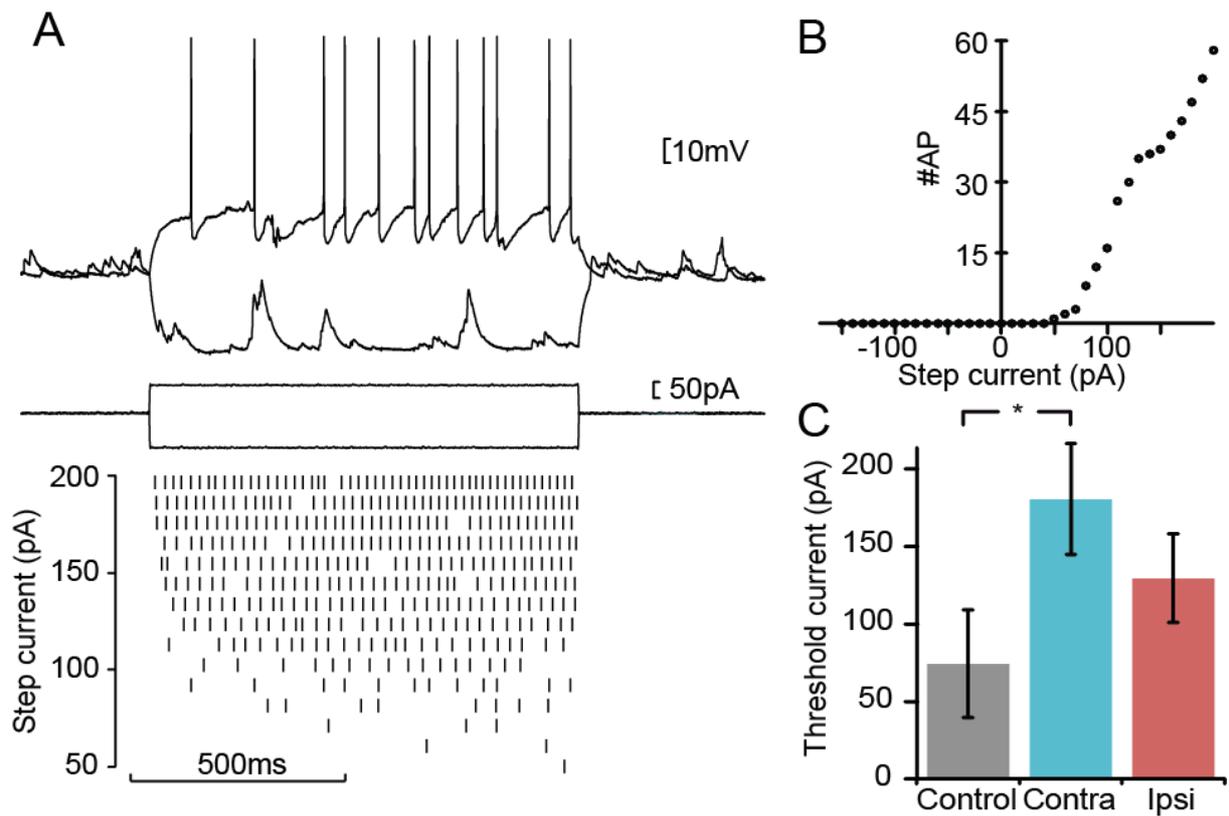


Figure 5 - Firing threshold. A, sample trace of intracellular protocol used to estimate membrane properties. Current pulses of fixed duration and varying amplitude were used. Detection of action potentials as a for each current step. B, number of action potential as a function of step size. Threshold current was taken as the minimal current that could elicit firing. C, Summary for threshold current showing significantly larger current required to elicit action potentials in contralateral cells (Student's t-test, error bars +/-SEM, n=4 control, n=4 contralateral, n=8 ipsilateral).

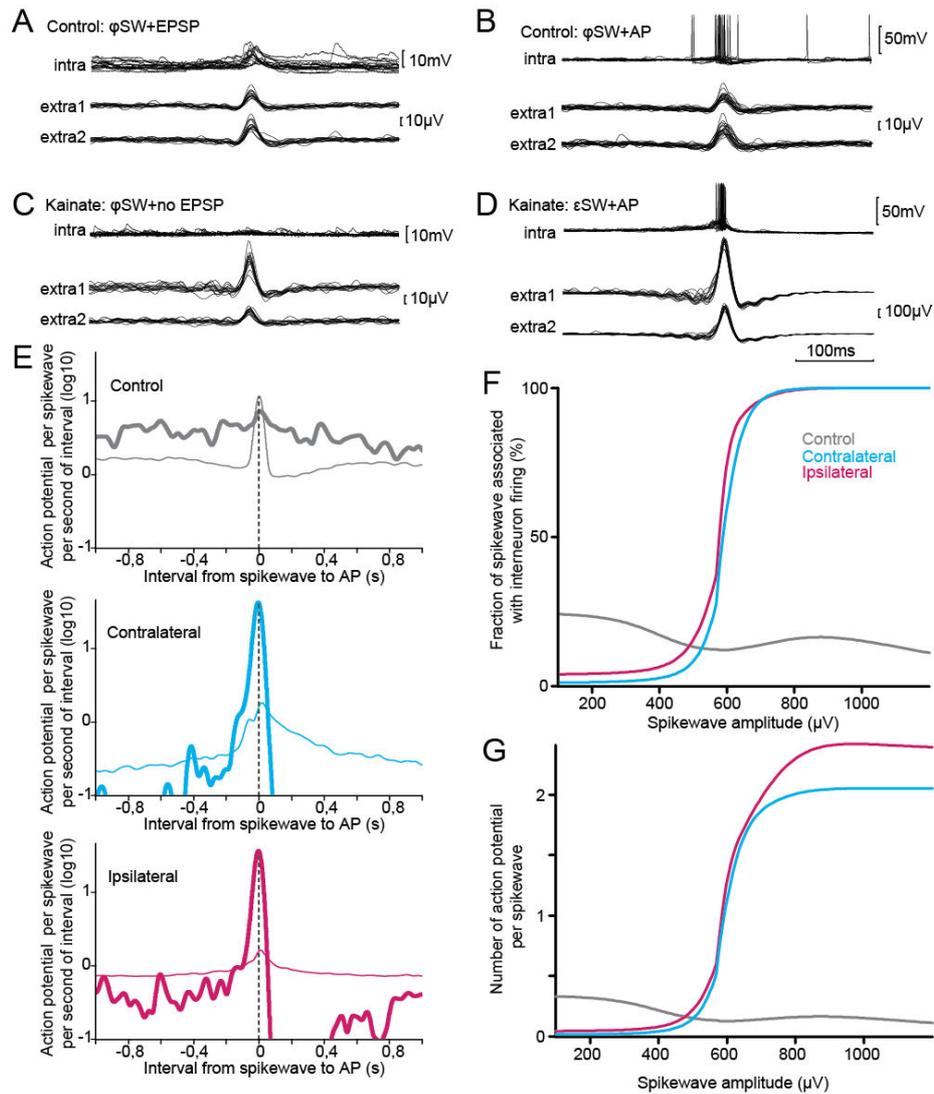


Figure 6 - Intracellular correlate of LFP. A-D, Sample traces of interneuron membrane voltage (upper trace) and population discharges detected from a pair of extracellular electrodes (lower traces). In control slice interneurons showed mixed excitatory synaptic potentials (A) and firing (B) during LFPs. B, In epileptic tissue, interneurons showed no response for LFPs of amplitude similar to those found in control tissue (C), but responded to the largest synchronous events (D). E, Interneuron firing relative to LFPs of moderate amplitude (30-300 $\mu$ V, thin line), corresponding to partial synchrony discharges and those of amplitude characteristic of epileptic tissue (400-1200 $\mu$ V, thick line). Time-locking was associated with partial synchrony in control tissue and was stronger for epileptiform discharges in KA treated tissue. F, G, Firing response and number of action potentials varied in opposite directions relative to LFP amplitude in control and epileptic tissue. Number of LFP: control n= 12198, contralateral n=14524, ipsilateral n=83386. Number of action potential: control n=4020, contralateral n=231, ipsilateral n=3572.

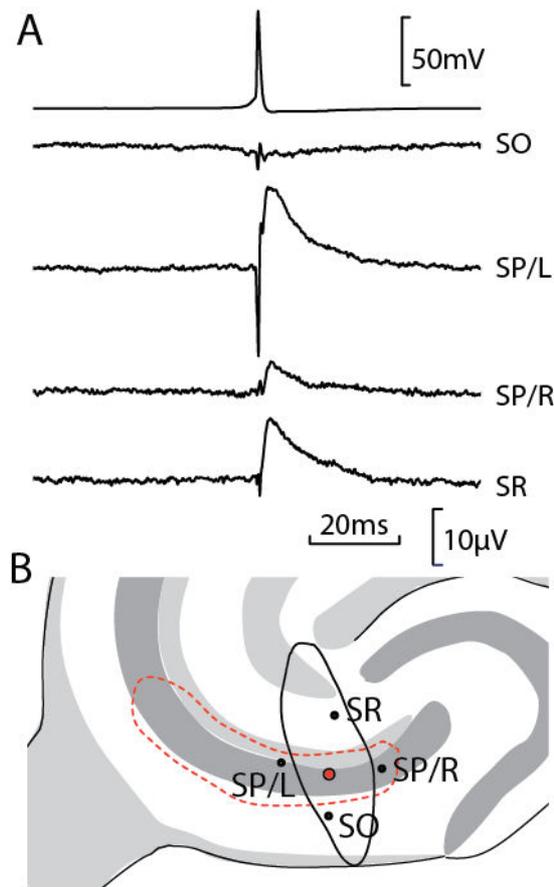


Figure 7 - Extracellular synaptic potential. Field potential generated by a single interneuron was estimated from neighboring extracellular electrodes in epileptic tissue. A, Intra- and extracellular signals were averaged over traces showing one intracellular action potential and LFP not synchronous across SP sites. The intracellular potential (upper trace) is shown together with extracellular signal from *Stratum Oriens* (SO), *Stratum Pyramidale* to the left and right of the recorded cell (SP/L, SP/R), and *Stratum Radiatum* (SR). While SP/L electrode recorded interneuron firing, the SP/L electrode captured field potential associated with extracellular currents induced by the post-synaptic potential. B, schematic of the recording geometry relative to background hippocampal anatomy. Cell soma is shown as a large dot. Extent of interneuron dendrite and axon are indicated respectively by plain and dotted lines. Positions of the extracellular electrodes are marked with four small dots. Three out of nine recordings showed such potentials, all of which were initiated by perisomatic axon.

**Table 1 - Comparison of spontaneous discharge properties**

Test	Maximum distance	p
Amplitude, Control vs Contralateral	0.021	<b>&lt;0.001</b>
Amplitude, Contralateral vs Ipsilateral	0.012	<b>&lt;0.001</b>
Amplitude, Control vs Ipsilateral	0.025	<b>&lt;0.001</b>
Duration, Control vs Contralateral	0.236	<b>&lt;0.001</b>
Duration, Contralateral vs Ipsilateral	0.113	<b>&lt;0.001</b>
Duration, Control vs Ipsilateral	0.123	<b>&lt;0.001</b>
Interval, Control vs Contralateral	0.139	<b>&lt;0.001</b>
Interval, Contralateral vs Ipsilateral	0.067	<b>&lt;0.001</b>
Interval, Control vs Ipsilateral	0.106	<b>&lt;0.001</b>

(Kolmogorov-Smirnov test, control n=73158, contralateral n=68315, ipsilateral n=145864)

**Table 2 - Comparison of interneuron density**

Test	t	p
LM+Rad., Control vs Contralateral	2.14	0.055
LM+Rad., Contralateral vs Ipsilateral	0.56	0.330
LM+Rad., Control vs Ipsilateral	2.44	<b>0.036</b>
Lucidum, Control vs Contralateral	1.40	0.142
Lucidum, Contralateral vs Ipsilateral	3.89	<b>0.004</b>
Lucidum, Control vs Ipsilateral	9.63	<b>&lt;0.001</b>
Pyramidale, Control vs Contralateral	2.98	<b>0.016</b>
Pyramidale, Contralateral vs Ipsilateral	1.45	0.136
Pyramidale, Control vs Ipsilateral	7.46	<b>&lt;0.001</b>
Oriens, Control vs Contralateral	1.59	0.110
Oriens, Contralateral vs Ipsilateral	2.27	<b>0.038</b>
Oriens, Control vs Ipsilateral	3.53	<b>0.011</b>

(Two-tailed Student's t-test. Number of slice: control n=3, contralateral n=6, ipsilateral n=9)

**Table 3 - Comparison of interneuron soma size**

Test	t	p
LM+Rad., Control vs Contralateral	3.41	<b>0.002</b>
LM+Rad., Contralateral vs Ipsilateral	0.97	0.247
LM+Rad., Control vs Ipsilateral	2.61	<b>0.015</b>
Lucidum, Control vs Contralateral	2.89	<b>0.009</b>
Lucidum, Contralateral vs Ipsilateral	2.65	<b>0.014</b>
Lucidum, Control vs Ipsilateral	5.69	<b>&lt;0.001</b>
Pyramidale, Control vs Contralateral	3.06	<b>0.005</b>
Pyramidale, Contralateral vs Ipsilateral	0.70	0.309
Pyramidale, Control vs Ipsilateral	3.99	<b>&lt;0.001</b>
Oriens, Control vs Contralateral	2.67	<b>0.014</b>
Oriens, Contralateral vs Ipsilateral	0.42	0.362
Oriens, Control vs Ipsilateral	2.88	<b>0.008</b>

(Two-tailed Student's t-test. Number of cell, for each of Control, Contralateral, Ipsilateral: LM+Rad. n=40, Lucidum n=20, Pyramidale n=20, Oriens n=20)

**Table 4 - Interneuron passive properties and firing threshold**

	<b>Control</b>	<b>Contralateral</b>	<b>Ipsilateral</b>
Resting Vm (mV)	-59±1.6 (n=29)	-61±1.4 (n=8)	-59±1.8 (n=11)
Threshold I <sub>c</sub> (pA)	74±35 (n=4)	180±35 (n=4)	129±28 (n=8)
Threshold Vm (mV)	-52±3	-49±2	-45±3
R(MO $\Omega$ m)	203±28 (n=5)	96±13 (n=6)	186±24 (n=9)
C (pF)	71±6 (n=5)	203±30 (n=6)	104±15 (n=9)
Time constant (ms)	13.8±0.7 (n=5)	17.9±1.7 (n=6)	16.7±0.9 (n=9)

Average±/-SEM (n)

**Table 5 - Interneuron firing relative to LFP**

Test	n1	n2	Max. distance	p
Contralateral Small vs Control Small	98055	23692	0,17	<b>&lt;0.001</b>
Contralateral Small vs Ipsilateral Small	130833	23692	0,13	<b>&lt;0.001</b>
Contralateral Small vs Contralateral Large	593	23692	0,55	<b>&lt;0.001</b>
Contralateral Small vs Control Large	1209	23692	0,21	<b>&lt;0.001</b>
Contralateral Small vs Ipsilateral Large	714	23692	0,46	<b>&lt;0.001</b>
Control Small vs Ipsilateral Small	130833	98055	0,10	<b>&lt;0.001</b>
Control Small vs Contralateral Large	593	98055	0,40	<b>&lt;0.001</b>
Control Small vs Control Large	1209	98055	0,08	<b>&lt;0.001</b>
Control Small vs Ipsilateral Large	714	98055	0,30	<b>&lt;0.001</b>
Ipsilateral Small vs Contralateral Large	593	130833	0,48	<b>&lt;0.001</b>
Ipsilateral Small vs Control Large	1209	130833	0,09	<b>&lt;0.001</b>
Ipsilateral Small vs Ipsilateral Large	714	130833	0,38	<b>&lt;0.001</b>
Contralateral Large vs Control Large	1209	593	0,46	<b>&lt;0.001</b>
Contralateral Large vs Ipsilateral Large	714	593	0,15	<b>&lt;0.001</b>
Control Large vs Ipsilateral Large	714	1209	0,31	<b>&lt;0.001</b>

(Kolmogorov-Smirnov test)

## 6. Annexe II

Nous avons vu que l'imagerie fUS est un très bon outil de mesure, utile pour de nombreuses applications en Neurosciences (pathologie, comportement, etc.), mais sert également dans d'autres domaines en biologie, comme en cardiologie ou en cancérologie. L'imagerie ultrasonore ultrarapide est une technique récente en plein essor. L'équipe de médecins menée par M. Tanter, avec laquelle mon équipe collabore, assure sa constante évolution à travers des avancées techniques et méthodologiques qui la rendent de plus en plus performante. Nos travaux en commun ont donné lieu à trois articles publiés, auxquels j'ai apporté ma contribution dans les phases de préparation chirurgicale des animaux et d'acquisition des images.

## 6.1. Article : "Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast ultrasound data highly increases Doppler and fUltrasound sensitivity"

Le traitement des signaux ultrasonore rétrodiffusés par l'organe observé est une étape importante pour diminuer l'effet du mouvement tissulaire et isoler le signal sanguin. Les premiers filtres pour discriminer le signal tissulaire du signal sanguin étaient basés sur l'hypothèse que le mouvement du tissu est lent ou non-existant alors que les globules rouges ont des mouvements rapides. Compte tenu des différences spectrales entre les signaux provenant du tissu (basse fréquence) et les signaux sanguins (fréquence plus haute), les filtres classiques, passe-haut, se basent uniquement sur les informations temporelles en traitant chaque pixel de façon indépendante. Nous savons que le sang peut avoir de faibles débits, au niveau des capillaires, tout comme le mouvement du tissu peut être plus ou moins rapide, par exemple le tissu cardiaque. Les échos émis par la faible quantité de globules rouges sont alors masqués par le mouvement du tissu, rendant difficile la détection des faibles débits sanguins.

Une différence existe au niveau des caractéristiques spatiales entre les signaux provenant du tissu et du sang. Le signal tissulaire possède une plus forte cohérence spatiale que le signal sanguin. En combinant les informations temporelle et spatiale lors du filtrage, on peut améliorer la distinction des signaux de type tissulaire et sanguin. Les filtres développés à travers cette approche, tel que l'approche par *Singular Value Decomposition* (SVD), se sont heurtés aux limitations des scanners Doppler conventionnels. En effet, l'utilisation des tirs focalisés, colonne par colonne, réduit l'échantillonnage temporel et spatial, ce qui rend impossible un traitement par SVD. L'imagerie fUS qui utilise un scanner Doppler ultrarapide s'affranchit de cette limite puisqu'il permet de générer des images à une cadence de plusieurs kHz sur tout le plan d'observation.

Cet article montre qu'en utilisant un filtre SVD qui prend en compte à la fois de la cohérence temporelle et spatiale, la détection des faibles débits sanguins et la suppression du mouvement tissulaire (biologique ou artéfact) sont considérablement améliorées, augmentant ainsi la sensibilité. L'utilisation du filtre SVD permet de détecter un débit pouvant descendre jusqu'à 0.5 mm/s.

# Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity

Charlie Demené, Thomas Deffieux, Mathieu Pernot, Bruno-Félix Osmanski, Valérie Biran, Jean-Luc Gennisson, Lim-Anna Sieu, Antoine Bergel, Stéphanie Franqui, Jean-Michel Correas, Ivan Cohen, Olivier Baud, Mickael Tanter

**Abstract**— Ultrafast ultrasonic imaging is a rapidly developing field based on the unfocused transmission of plane or diverging ultrasound waves. This recent approach to ultrasound imaging leads to a large increase in raw ultrasound data available per acquisition. Bigger synchronous ultrasound imaging datasets can be exploited in order to strongly improve the discrimination between tissue and blood motion in the field of Doppler imaging. Here we propose a spatiotemporal singular value decomposition clutter rejection of ultrasonic data acquired at ultrafast frame rate. The singular value decomposition (SVD) takes benefits of the different features of tissue and blood motion in terms of spatiotemporal coherence and strongly outperforms conventional clutter rejection filters based on high pass temporal filtering. Whereas classical clutter filters operate on the temporal dimension only, SVD clutter filtering provides up to a four-dimensional approach (3D in space and 1D in time). We demonstrate the performance of SVD clutter filtering with a flow phantom study that showed an increased performance compared to other classical filters (better contrast to noise ratio with tissue motion between 1 and 10mm/s and axial blood flow as low as 2.6mm/s). SVD clutter filtering revealed previously undetected blood flows such as microvascular networks or blood flows corrupted by significant tissue or probe motion artifacts. We report *in vivo* applications including small animal fUltrasound brain imaging (blood flow detection limit of 0.5mm/s) and several clinical imaging cases, such as neonate brain imaging, liver or kidney Doppler imaging.

**Index Terms**—Blood flow, Doppler imaging, ultrafast imaging, ultrasound, singular value decomposition.

Manuscript received September 30, 2014; revised March 10, 2015; accepted April 20, 2015. Copyright © 2010 IEEE. Personal use of this material is permitted. However, permission to use this material for any other purposes must be obtained from the IEEE by sending a request to [pubs-permissions@ieee.org](mailto:pubs-permissions@ieee.org).

The research leading to these results has received funding from the European Research Council under the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) / ERC grant agreement n° 339244-FUSIMAGINE. This work was also supported by LABEX WIFI (Laboratory of Excellence ANR-10-LABX-24) within the French Program 'Investments for the Future' under reference ANR-10-IDEX-0001-02PSL, by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris and by PremUP Foundation, Paris 75006 France.

C. Demené, T. Deffieux, M. Pernot, B.-F. Osmanski, J.-L. Gennisson, S. Franqui, J.-M. Correas, and M. Tanter are with the Institut Langevin, CNRS UMR 7587, INSERM U979, ESPCI ParisTech, Paris 75005, France. (e-mail: [charlie.demene@espci.fr](mailto:charlie.demene@espci.fr); [thomas.deffieux@espci.fr](mailto:thomas.deffieux@espci.fr); [mathieu.pernot@espci.fr](mailto:mathieu.pernot@espci.fr);

## I. INTRODUCTION

EXTENSIVE work has been conducted over the past 30 years in order to suppress clutter signals originating from stationary and slowly moving tissue as they introduce major artifacts in ultrasonic blood flow imaging [1]. This operation remains a major challenge for the visualization of vascular paths and the measurement of blood flow velocities because tissue echoes and blood scatterers echoes tend to share common characteristics, especially in two widespread clinical cases e.g. when blood flow velocities become low (in particular in small vessels) or when tissue motion is important. These two configurations correspond both to major applications in general ultrasound imaging. On the one hand, imaging slow blood flows and therefore microvasculature is an issue in most organs as skin, muscles, placenta, as well as in tumors for cancer diagnosis. It is also of major importance in emerging fields such as fUltrasound imaging of brain activity where the neurovascular coupling occurs locally in very small vessels. On the other hand, imaging blood flow in fast moving tissue is a major issue in applications such as cardiac or abdominal (liver, kidney,...) imaging.

The reason why clutter filters fail to solve both situations mentioned above is due to the underlying assumption on which they are built. In the early history of Color Flow Imaging (CFI), clutter filtering has always been based on the fair assumption that tissue signal and blood flow signal have completely differing spectral characteristics: tissue motion is supposed very slow or non-existent whereas red blood cells are fast moving

[bruno-felix.osmanski@espci.fr](mailto:bruno-felix.osmanski@espci.fr);  
[mickael.tanter@espci.fr](mailto:mickael.tanter@espci.fr).

[jl.gennisson@espci.fr](mailto:jl.gennisson@espci.fr);

V. Biran and O. Baud are with INSERM U1141 and Neonatal Intensive Care Unit, Paris Diderot University, Children's hospital Robert Debré, APHP, Paris 75019, France. ([valerie.biran@rdb.aphp.fr](mailto:valerie.biran@rdb.aphp.fr); [olivier.baud@rdb.aphp.fr](mailto:olivier.baud@rdb.aphp.fr)).

L.-A. Sieu, A. Bergel, and I. Cohen are with Neuroscience Paris Seine, CNRS UMR8246, INSERM U1130, UPMC UMCR18, Paris, France. ([lim-anna\\_s@hotmail.fr](mailto:lim-anna_s@hotmail.fr); [antoine.bergel@cri-paris.org](mailto:antoine.bergel@cri-paris.org); [ivan.cohen@upmc.fr](mailto:ivan.cohen@upmc.fr)).

L.-A. Sieu is also with Institute of Translational Neurosciences (IHU-A-ICM), Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

S. Franqui is with service de radiopédiatrie-Hôpital Bicêtre- Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Assistance Publique hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre 94270, France. ([stephanie.franqui@bct.aphp.fr](mailto:stephanie.franqui@bct.aphp.fr)).

J.-M. Correas is also with department of Adult Radiology, Necker University Hospital, Paris 75015, France, and with Rene Descartes Medical University, Paris 75006, France. ([jean-michel.correas@nck.aphp.fr](mailto:jean-michel.correas@nck.aphp.fr)).

scatterers, meaning that demodulated tissue signal and blood signal have non-overlapping spectra centered on the zero frequency and the Doppler frequency respectively. Based on this temporal dynamics assumption, the raw ultrasonic signal is filtered along the temporal dimension using finite impulse response (FIR) or infinite impulse response (IIR) filters[2], [3]. IIR filters present the advantage of having steeper roll-off than FIR for a given order, but they also exhibit a longer settling time because of the lack of correct outputs for the first temporal points. FIR filters present a short settling time (output is stable after only  $n$  points for an  $n$ -order FIR filter) but need a higher order to efficiently discriminate clutter from blood signal. In both cases a first limitation arises: due to real-time requirement and the use of focused ultrasonic beams to build the image, the number of temporal samples available in each spatial location is low (usually 8 to 16) and those filters are really difficult to optimize [4] for a general Doppler imaging application ranging from cardiac imaging (maximal tissue velocity) to microcirculation imaging (very low blood flow speeds). The problem of the settling time can be reduced by a proper initialization [5] in the case of IIR filters but the transient response cannot be completely canceled. On the other hand, another class of filters called standard linear regression (SLR) filters [6] do not exhibit any settling time and estimate the tissue signal by a linear regression on several temporal points of the ultrasound signal: based on the same assumption than mentioned above, it is assumed that the slow variations of the signal are exclusively due to tissue and the rapid fluctuations are exclusively due to blood flow. Finally, several techniques have been developed to adapt to each Doppler imaging situation by compensating background tissue motion: by estimating first tissue velocity and down-mixing the ultrasound temporal signal via a phase correction, the spectrum can be shifted so that the center frequency of the tissue signal match the zero frequency [7], [8]. The signal is then processed using a classical fixed cut-off filter to remove tissue echoes.

In all these methods, only the temporal information has been used because the hypothesis used to discriminate tissue signal and blood scatterers signal focused on their different spectral content. But it can also be noticed that spatial characteristics of tissue signal are different from those of blood scatterers. Along one M-mode line, tissue movement toward the transducer can be approximated by only a shift in the RF data (a phase shift for In Phase/Quadrature RF data) whereas moving red blood cells change the profile of the RF data itself. A brief explanation is that tissue is far less deformable than a red blood cell arrangement in plasma, and a small movement of tissue can be seen as a spatial shift of a speckle pattern whereas a movement of red blood cells implies a reorganization of the scatterers generating a different speckle pattern. In other words, tissue signal has a higher spatial coherence than blood signal in ultrasound imaging. Several authors suggested this hypothesis and introduced new clutter rejection methods based on this a priori: Ledoux et al [9] proposed a clutter reduction simulation study based on the Singular Value Decomposition of the correlation matrix between successive temporal samples of a M-mode line. In this approach both 1D spatial and temporal

information are used via the diagonalization of the spatiotemporal (time and depth) correlation matrix. Several strategies have emerged from this approach and an exhaustive review of these methods have been proposed by Yu and Lovstakken in 2010 [10]. Among those developments, important works such as the down-mixing approach using an eigen-based tissue motion estimation of Bjeaurum et al [8] and the real time implementation of eigen-based clutter rejection proposed by Lovstakken et al [11] have to be cited. Finally, Kruse and Ferrara [12] developed an original high frequency swept scan imaging setup whose datasets have been processed using principal component analysis to estimate blood velocity in presence of strong motion.

In all reported methods, discrimination between tissue and blood flow drastically suffer from a poor ensemble length, i.e. a poor number of ultrasound pulses per line of color. The use of focused beams imposes to adopt a line-per-line scan strategy (either electronically in the case of transducer arrays, or mechanically in the case of a single transducer) in order to cover an extensive field of view. As a consequence both the number of temporal samples (collected on a particular location before the system has to move to another location) and the number of spatial samples (acquired at different times and therefore having different characteristics) are limited. From a theoretical point of view, taking into account different spatial samples along the swept direction is even intrinsically difficult as these samples are not acquired simultaneously. Unfortunately, these characteristics of ultrasonic sequences in conventional ultrasound strongly limit the impact of singular value decomposition. SVD processing is a powerful signal processing tool but as for digital filters its full potential is obtained on large datasets.

Over the past decade, it was shown that ultrafast ultrasound imaging based on unfocused wave transmissions can acquire wide two-dimensional fields of view at very high frame rates (typically higher than 1000 frames per second). The fast growing number of emerging clinical applications of ultrafast imaging [13], [14] and exponential evolution of computation power of GPU based electronics permits to envision a soon change of paradigm in ultrasonic imaging. At the cost of a little loss in focusing capabilities, plane wave imaging enables the acquisition of a large amount of synchronous samples which, in the framework of clutter rejection filters, overcome severe limitations inherent to conventional focused transmissions.

Instead of collecting typically 16 temporal samples in a small spatial box before electronically moving to another location as in conventional Doppler imaging, ultrafast imaging uses plane waves to insonify the medium before beamforming the backscattered echoes into an image. This enables ultrafast imaging over a wide field of view at a framerate of several kHz. As ultrafast imaging relies on focusing in reception only, resolution is partially lost compared to classical ultrasound imaging schemes using focusing both in emission and reception. However, it has been demonstrated that resolution or motion estimation can be improved using a set of tilted plane or diverging waves combined after beamforming [15]–[17]. The ultrasonic modality based on coherent synthetic recombination

of unfocused wave transmissions and used to visualize blood flows was called Ultrafast Doppler imaging.

In a former study, we reported that Ultrafast Doppler imaging improved Doppler sensitivity by a factor up to 30 compared to conventional Doppler imaging [18]. This is in large extent due to the temporal ensemble length of an Ultrafast Doppler dataset compared to a conventional Doppler dataset. As Ultrafast Doppler does not need electronic sweeping of the focused beam along the transducer array, temporal samples are acquired simultaneously in every pixel of the image. This means that for a 1 second acquisition at 1 kHz of frame rate, each pixel exhibits 1000 temporal points. The settling time of temporal filters is not an issue anymore and high order IIR with steep roll-of can be used as long as the first tens of temporal points are removed from the signal. The increased sensitivity of Ultrafast Doppler is in a quite large extent due to this highly efficient clutter filtering combined with a longer ensemble length and a "virtual" [19] dynamic focusing due to coherent recombination of different sonications.

However, to date, the only *a priori* used to filter out the clutter of Ultrafast Doppler Images was based on a temporal discrimination between tissue and blood flow motion [17], [18], [20]. Again, this assumption is not true in the case of slow blood flows or fast moving tissue where both spectra overlap. In these cases, spectral filters applied to Ultrafast Doppler encounter the same difficulties than mentioned previously to discriminate between tissue and blood flow.

In this paper, we present a way of rejecting clutter signals from Ultrafast Doppler datasets using Singular Value Decomposition (SVD) or Principal Component Analysis (PCA). Both 2D spatial and temporal coherence are used to separate tissue from blood flow, showing a considerable improvement in both the detection of slow blood flows and the removal of moving tissues. Thanks to ultrafast sequences, simultaneous raw data can be reshaped under large Casorati matrix form [21]. This article focuses on the straightforward use of singular value decomposition of this Casorati matrix for blood/tissue discrimination. However, the reader should note that very significant developments were achieved in the field of matrix regression in the last five years. Most of them are devoted towards low-rank matrix regression and signal separation, i.e. the so-called Robust PCA [22]. In addition to pure mathematical developments, these techniques have been widely used in other medical imaging modalities like magnetic resonance imaging (MRI) [23] and x-ray computed tomography [24].

## II. THEORY

A theoretical framework is introduced in this section of the paper to explain the different steps of the clutter rejection algorithm and better understand its implications.

### A. The specificity of ultrasound signal

#### 1) The different components of the ultrasound signal

An Ultrafast Doppler acquisition consists in a stack of beamformed ultrasound images (or a cineloop) and can be represented under the complex valued variable  $s(x, z, t)$ , where

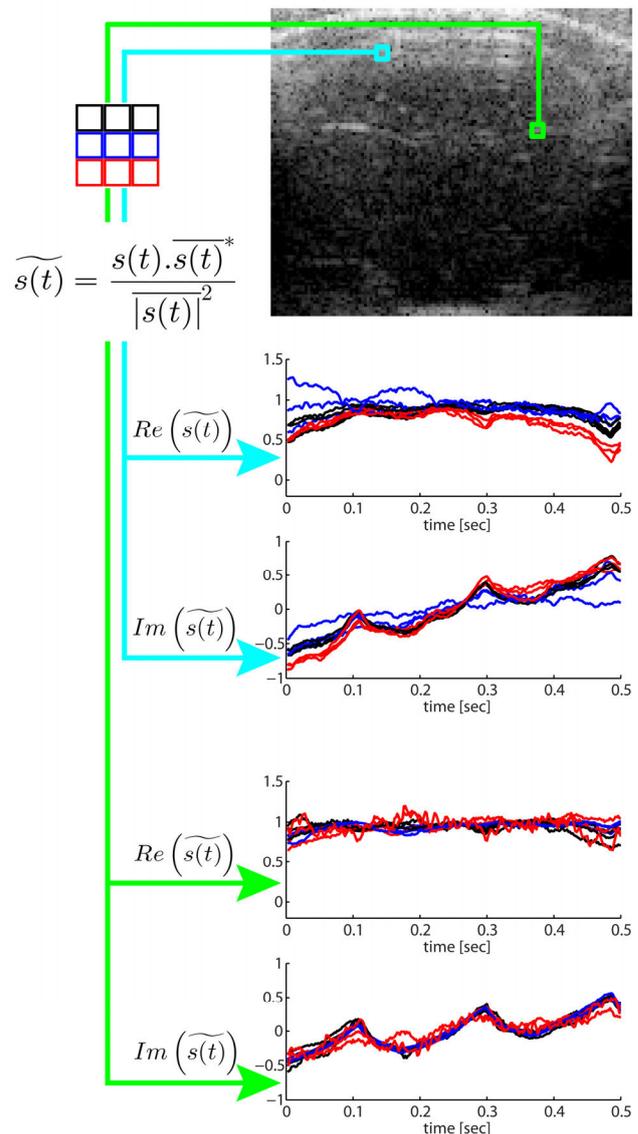


Fig. 1. Typical example of an Ultrafast Acquisition. The top image depicts  $s(x, z, t = 0)$  of an Ultrafast acquisition acquired during 0.5s at a Frame Rate of 500Hz, on the brain of a thinned skull rat (scale bar=1mm). To have an insight into the temporal dimension of this Ultrafast acquisition, two neighborhoods of nine pixels have been chosen in the image (green and cyan squares). Inside each pixel, the simplified signal  $\tilde{s}(x, z, t)$  is calculated to get rid of phase difference and amplitude difference from one pixel to another.  $\tilde{s}$  is then plotted with color respective to the position in the nine pixel neighborhood (black, blue or red). This illustrates that signal in close pixels is very similar in shape.

$x$  stands for the lateral dimension (along the transducers array),  $z$  stands for depth in the medium in front of the ultrasonic probe, and  $t$  stands for time (sampled at a frequency noted Frame Rate from there on). It is assumed that this signal can be described as the summation of three contributions (1):  $c$  the clutter signal,  $b$  the blood signal, and  $n$  the electrical/thermal noise.

$$s(x, z, t) = c(x, z, t) + b(x, z, t) + n(x, z, t) \quad (1)$$

Those three contributions have different spatial and temporal characteristics.  $n$  can be considered as a zero-mean Gaussian white noise. The classical approach consists in assuming that blood signal is a high temporal frequency signal and that tissue

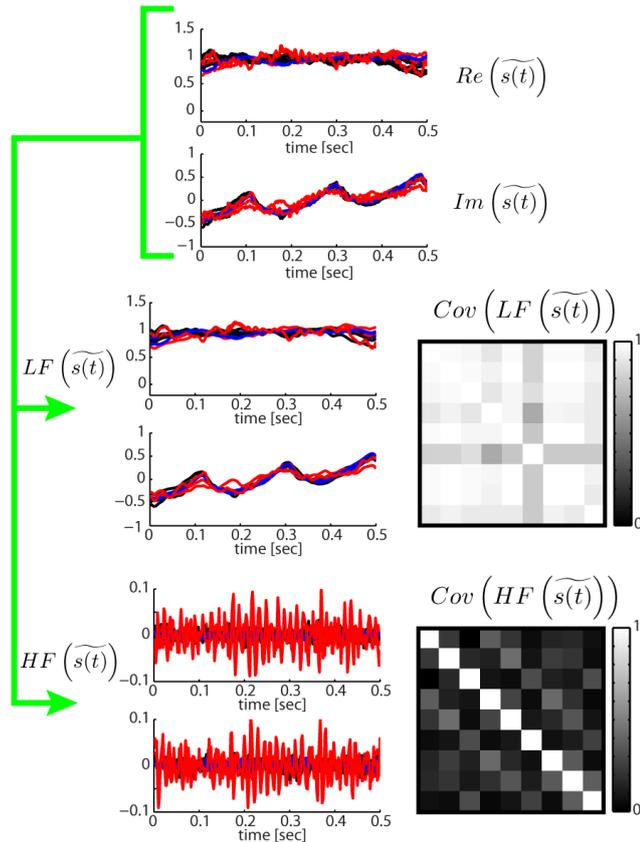


Fig. 2. The same data than in the green nine pixel neighborhood of Fig. 1 are filtered using a 50Hz cut off 4<sup>th</sup> order Butterworth filter typically used to discriminate between tissue and blood flow signals, and on the graphs it can be observed that the low frequency (LF) part of the nine pixel temporal signal are really similar in shape and seem highly correlated, whereas the blood signal (HF) seem highly decorrelated. On the right are displayed the 9x9 covariance matrix (magnitude) of the normalized zero-mean complex signals, for the low frequency and high frequency part respectively. HF Blood signal is indeed highly decorrelated compared to LF tissue signal.

signal is a low frequency signal. It must be also acknowledged that depending on the ultrasound frequency used for the acquisition, the backscattered energy of the blood signal can be 10 to 60 dB lower than energy of the tissue signal. Moreover, although spatial characteristics of blood and tissue signals are rarely investigated, they also convey different information.

## 2) Covariance matrix of neighboring pixels

This section elucidates the spatiotemporal characteristics of blood signal and tissue signal, first qualitatively by introducing a simplified signal  $\tilde{s}$  to illustrate the common statistical properties of neighboring pixels, and then quantitatively by constructing the covariance matrix of neighboring pixels.

Fig. 1 gives insight into the statistical properties of blood signal  $b$  and clutter signal  $c$  in the example of rat brain ultrasonic imaging. As stated before the temporal signal in one pixel exhibits low frequency fluctuations corresponding to tissue movement (in the imaginary part of the signal the three slow oscillations observed are due to tissue moving when the

heart beats) and high frequency fluctuations due to actual blood cells motion. In order to compare spatially close temporal signals, a simplified signal  $\tilde{s}(x, z, t) = s(x, z, t) \cdot \overline{s(x, z, t)}^* / |\overline{s(x, z, t)}|^2$  is calculated, where  $\bar{s}$  is the time average value of  $s$  and  $*$  stands for complex conjugate. This simplified illustrative representation enables to get rid of any phase shift (via the product with the complex conjugate of the time averaged signal) and of amplitude difference (via the division with the squared modulus) between two pixel signals; and consequently to compare signals only on the basis of their shape. Fig. 1 shows that in neighboring pixels, simplified signals present very similar low frequency variations (tissue motion), whereas the rapid fluctuations (blood motion) do not present the same pattern from one pixel to another. This aspect is further investigated in Fig. 2, where the nine pixel signals of the second neighborhood of Fig. 1 are separated in blood (HF) and tissue (LF) signal with a temporal filter. It is clear that tissue signal is highly correlated and the covariance matrix of those nine signals exhibits a high degree of correlation, whereas the blood signal covariance matrix is almost diagonal, meaning that blood signal is poorly spatially coherent, even at a very local scale. Fig. 1 even shows that at large spatial scales, tissue signal is still quite coherent as the simplified signals are quite similar in shape between the two neighborhoods. Thus, tissue signal could be condensed in a few temporal signal accompanied by a set of spatially arranged complex coefficients required to recover the amplitude and phase shift proper to each pixel. In other words, tissue signal realization in all pixels forms a family of vectors whose cardinality is much higher than the dimension of the tissue vector subspace. This is an essential idea to understand the efficiency of the singular-based clutter filter presented in this paper.

Contrary to tissue signal, blood signal is not assumed to have high spatial coherence. In addition, tissue signal energy is much higher (10 to 50 dB) than blood signal energy, and a separation method based on covariance estimation certainly finds the highest covariance values for the tissue signal. This discrimination based on covariance estimation can be performed using the singular value decomposition of raw data.

## B. Singular value decomposition of ultrafast ultrasonic data

Let us consider the spatiotemporal matrix form of  $s(x, z, t)$  corresponding to the raw data cineloop acquired during an ultrafast acquisition.  $s(x, z, t)$  corresponds to set of  $n_x \times n_z \times n_t$  samples where  $n_x$ ,  $n_z$  and  $n_t$  are respectively the number of spatial samples along x-direction, the number of spatial samples<sup>1</sup> along z-direction and the number of time samples. The raw data matrix is reshaped under a Casorati matrix form by transforming time series data into a 2D space-time matrix form  $\mathbf{S}$  with dimensions  $(n_x \times n_z, n_t)$  as already proposed in other imaging modalities such as MRI and CT [22]– [26].

The singular value decomposition (SVD) of this Casorati

<sup>1</sup> Note that all concepts described here are straightforwardly applicable for 4D data (3D space + 1D time). For sake of simplicity, we restrict here the examples to a 3D case (2D space image + 1D time) which is the most routine case in biomedical ultrasound.

matrix  $\mathbf{S}$  consists in finding the three matrices such as:

$$\mathbf{S} = \mathbf{U}\mathbf{\Delta}\mathbf{V}^* \quad (2)$$

Where  $\mathbf{\Delta}$  is a non-square ( $n_x \times n_z, n_t$ ) diagonal matrix,  $\mathbf{U}$  and  $\mathbf{V}$  are orthonormal matrices with respective dimensions ( $n_x \times n_z, n_x \times n_z$ ) and ( $n_t, n_t$ ) and \* stands for the conjugate transpose. Columns of  $\mathbf{U}$  and  $\mathbf{V}$  matrices correspond respectively to the spatial and temporal singular vectors of  $\mathbf{S}$ . One should also notice that  $\mathbf{U}$  and  $\mathbf{V}$  also correspond to the eigenvectors<sup>2</sup> of the respective covariance matrices  $\mathbf{S}\mathbf{S}^*$  and  $\mathbf{S}^*\mathbf{S}$ .

What is the physical meaning of the SVD of matrix  $\mathbf{S}$ ? In fact, the singular value decomposition (SVD) or principal component analysis (PCA) can be thought of as decomposing a matrix  $\mathbf{S}$  into a weighted, ordered sum of separable matrices  $\mathbf{A}_i$ . By separable, we mean that the matrix  $\mathbf{A}_i$  can be written as an outer product of two vectors  $\mathbf{A}_i = \mathbf{U}_i \otimes \mathbf{V}_i$ . Specifically, the matrix  $\mathbf{S}$  can be decomposed as:

$$\mathbf{S} = \sum_i \lambda_i \mathbf{A}_i = \sum_i \lambda_i \mathbf{U}_i \otimes \mathbf{V}_i \quad (3)$$

Thus, the SVD can be used to find the decomposition of an ultrafast ultrasonic dataset into separable space and time filters. Here  $\mathbf{U}_i$  and  $\mathbf{V}_i$  are the  $i^{\text{th}}$  columns of the corresponding SVD matrices defined in (6),  $\lambda_i$  are the ordered singular values, and each  $\mathbf{A}_i$  is a separable matrix. The number of non-zero  $\lambda_i$  is exactly the rank of the matrix. Importantly, one should keep in mind that each column  $\mathbf{V}_i$  corresponds to a temporal signal with length  $n_t$  and each column  $\mathbf{U}_i$  corresponds to a spatial signal with length  $n_x \times n_z$ . Each vector  $\mathbf{U}_i$  describes in fact a 2D spatial image  $I_i$  with dimensions ( $n_x, n_z$ ).

As one can notice, the SVD of  $\mathbf{S}$  decomposes the field into a sum of separable images  $I_i$  (characterized by a vector  $\mathbf{U}_i$ ) that are independently modulated by a temporal signal  $\mathbf{V}_i$ . In other words, all pixels of the ultrasonic spatial images  $I_i(x, z)$  characterized by the singular vector  $\mathbf{U}_i$  behave with the same time signal  $\mathbf{V}_i(t)$ .

Thus, thanks to the SVD processing, the spatiotemporal cineloop  $s(x, z, t)$  corresponding to ultrasonic raw data can be rewritten as:

$$s(x, z, t) = \sum_{i=1}^{\text{rank}(\mathbf{S})} \lambda_i I_i(x, z) \mathbf{V}_i(t) \quad (4)$$

In this decomposition, tissue displacements should be described mainly in the first singular values and singular vectors as their high spatiotemporal coherence insures that a large number of spatial pixels will exhibit the same time profile. On the contrary, blood signal should be found in lower singular values as they exhibit much lower spatiotemporal coherence. Thus, filtering the data using the SVD approach consists in calculating:

$$\mathbf{S}^f = \mathbf{S}\mathbf{V}\mathbf{I}^f\mathbf{V}^* = \mathbf{U}\mathbf{\Delta}^f\mathbf{V}^* \quad (5)$$

<sup>2</sup> Singular Value Decomposition and Principal Component Analysis are two aspects of the same problem and one decomposition can lead to the other and vice versa as  $\mathbf{S}^*\mathbf{S} = \mathbf{V}\mathbf{\Delta}^2\mathbf{U}^*\mathbf{U}\mathbf{\Delta}\mathbf{V}^* = \mathbf{V}\mathbf{\Delta}^2\mathbf{V}^*$  and  $\mathbf{S}\mathbf{S}^* = \mathbf{U}\mathbf{\Delta}^2\mathbf{V}^*\mathbf{V}\mathbf{\Delta}\mathbf{U}^* = \mathbf{U}\mathbf{\Delta}^2\mathbf{U}^*$ .

Where  $\mathbf{S}^f$  is the filtered data set and  $\mathbf{I}^f$  is a matrix filter, i.e. the diagonal identity matrix with zeros for the first diagonal elements, leading to a truncated  $\mathbf{\Delta}^f$  diagonal matrix of singular values corresponding to the removal of tissue motion.

Interestingly, the classical clutter filter approach used in ultrasound imaging corresponding to a simple high pass filter can be written under a quite similar matrix formalism:

$$\mathbf{S}^f = \mathbf{S}\mathbf{E}\mathbf{I}^f\mathbf{E}^* \quad (6)$$

Where  $\mathbf{E}$  is the Fourier transform matrix and  $\mathbf{I}^f$  is again the high pass filter, i.e. the diagonal identity matrix with zeros for the diagonal elements corresponding to low frequencies (the first and last ones with a classical FFT algorithm). In the light of this formulation both filters are temporal filters and rank-reducing for the tissue signal (the tissue is compressed on a subset of the spectrum that is then set to zero) but the SVD outperforms the Fourier decomposition according to the Eckart-Young theorem [27] as it provides a faster decrease of singular values and consequently a better tissue blood discrimination. In other words, the decomposition is better in the multidimensional SVD approach as the clutter basis vectors are calculated adaptively (through spatial averaging) and more optimally compared to the Fourier basis.

### C. Implementation of the SVD filter

Given the hypothesis of high spatiotemporal coherence for the tissue signal, the idea is to build a new spatiotemporal representation of the Ultrafast acquisition in the basis provided by the singular value decomposition. The first step is presented in Fig. 3(a) and consists in rearranging the Ultrafast Doppler acquisition into a 2D Casorati matrix  $\mathbf{S}$  where one dimension is space and the other dimension is time. Singular value decomposition could be performed on this matrix  $\mathbf{S}$  and directly give the new temporal singular vector basis  $\mathbf{U}$  and the new spatial singular vector basis  $\mathbf{V}$ .

However, in most cases the Ultrafast Doppler acquisition

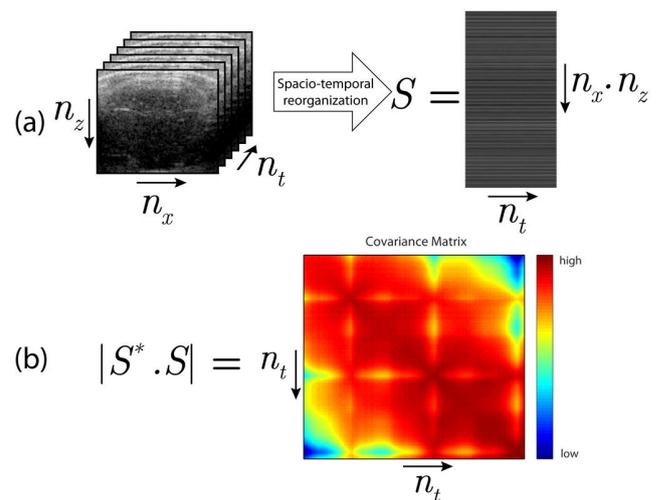


Fig. 3. (a) The Ultrafast Doppler acquisition forms a 3D stack of images with 2 spatial dimensions and one temporal dimension (same data than Fig. 1). It is reshaped in one spatiotemporal representation (Casorati matrix) where all pixels at one time point are arranged in one column. As a consequence all time points for one pixel are arranged in one row. (b) The covariance matrix is presented here in magnitude and is of dimension  $n_t \times n_t$ .

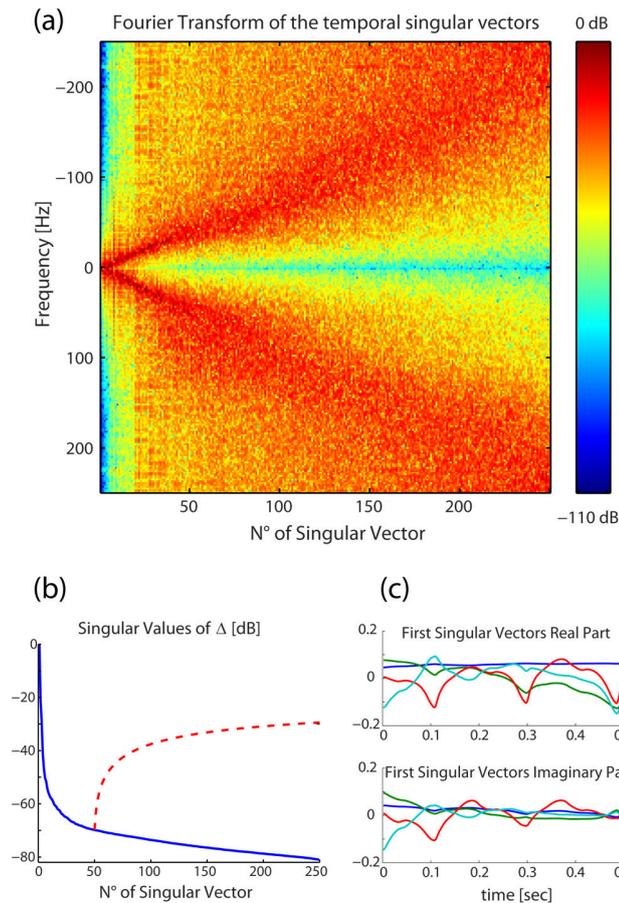


Fig. 4. (a) Spectral content estimation (via Periodogram with Tukey apodisation (0.2)) of all the right singular vectors, sorted with decreasing singular value. Low frequency temporal signal are associated with the highest singular values. As all singular vectors are normalized, energy in all spectra (all columns) is equal to one. (b) singular values of the matrix  $\Delta$  expressed in dB and cumulative sum of those singular values from  $n^\circ$  50 (dashed red). (c) The first four singular vectors (associated to the largest singular values of the covariance matrix) of the covariance matrix are plotted versus time. It can be observed that they depict slow temporal variation (the first one is almost a constant value, the third one depicts clearly the pulsatility of tissue already observed in Fig. 1) and are devoid of the fast fluctuation of blood signal.

presents many more spatial points (typically several 10 000) than temporal points (several hundreds or thousands), and it can be less demanding from a computing point of view to first form the  $n_t \times n_t$  covariance matrix (Fig. 3(b)) and diagonalize it. This gives  $n_t$  temporal eigenvectors that are the right singular vector  $V_i$  of  $\mathcal{S}$ . Fig. 4(a) shows the spectral content of those eigenvectors sorted by decreasing eigenvalue. Interestingly, the largest eigenvalues are associated with the temporal singular vectors presenting the slowest variation. This is consistent with spatially coherent tissue signal supposed to be quite similar in neighboring pixels in a way that enables to reduce the  $n_x \times n_z$  realizations of tissue temporal signal on a much smaller subspace. As a consequence tissue signal is supposed to be condensed in the first singular vectors whereas blood and noise signals are described by the singular vectors associated with lower singular values. The eigenvalue itself is closely related to

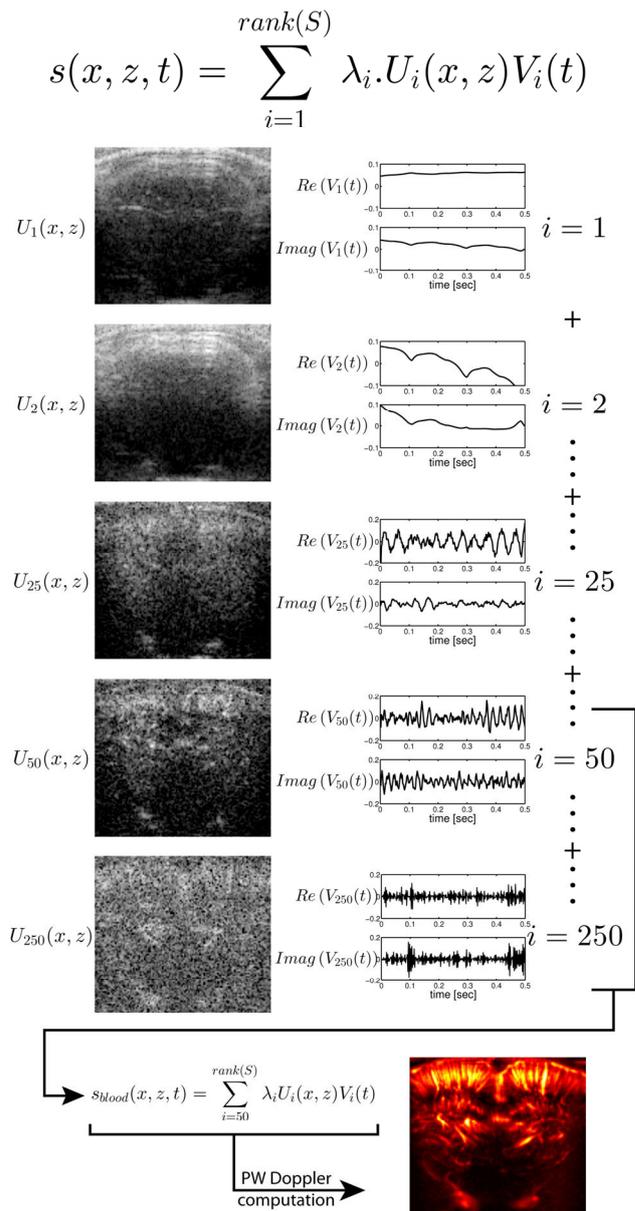


Fig. 5. The Ultrafast acquisition (same data than Fig. 1) is decomposed by the singular value decomposition into a set of spatiotemporal couples of vectors. The essential idea is that tissue signal is coherent enough to be quite similar over the entire image, and that it can be described by a set of vectors constituting a subspace of the temporal signal space, but much smaller. Indeed, by rejecting the first 49 couples of singular vectors, tissue signal is rejected and a very good PW Doppler image of the vascularisation in the rat brain is obtained.

the energy associated the corresponding singular vector and Fig. 4(b) depicts the relative variation of those singular values: the dashed red line shows that with a threshold of 50 rejected singular values (see Fig. 5) the SVD clutter rejection will discriminate the supposedly tissue from a signal 30 dB below, which is really consistent with the expected relative difference between tissue energy and blood energy at that range of US frequencies (15MHz). The weighted spatial vector  $\lambda_i U_i$  are then computed by the projection  $\mathcal{S}V$  as described in (5).

Finally using this decomposition,  $s(x, z, t)$  can be decomposed on both a temporal basis and a spatial basis of singular vectors (Fig. 5). Based on the assumption that tissue signal is gathered in the first singular vectors, clutter rejection is performed using a threshold  $n$  (whose influence and choice will be discussed in the next part) on the number of singular vectors removed from the raw signal (7):

$$s_{blood}(x, z, t) = s(x, z, t) - \sum_{i=1}^n \lambda_i I_i(x, z) V_i(t) \quad (7)$$

This filtered signal can then be processed using short time Fourier transform for blood flow speed measurement (as described in the methods section) or the energy per pixel can be computed (8) to produce the so called Power Doppler image.

$$PW(x, z) = \int |s_{blood}(x, z, t)|^2 dt \quad (8)$$

The efficiency of clutter rejection based on both space and time filtering of ultrafast data via SVD and its superiority to conventional temporal filtering will be demonstrated in the Results section with a phantom study and with several *in vivo* examples and in different imaging contexts.

### III. MATERIALS AND METHODS

*In vivo* Ultrafast acquisitions were performed using a programmable ultrasound scanner (Aixplorer, Supersonic Imagine, France) with dedicated Compound Plane Wave imaging ultrasound sequences [17][16]. This technique uses plane wave emissions instead of the classical focused emissions, which enables to increase the framerate from a factor 10 to 100, and focusing is only achieved in reception via the beamforming process. To recover resolution, compounding is done by coherently adding several tilted plane wave emissions. With such a process, the framerate can reach the theoretical limit imposed by the time of flight of ultrasound, typically 10 000 Hz.

#### A. Phantom study

In order to quantify the ability of SVD filtering to extract slow blood flows from moving tissue, a contrast to noise ratio (CNR) study has been conducted with ultrafast Doppler acquisitions on a Doppler phantom in presence of probe movement. The double benefit of using a phantom is to control precisely the acquisition conditions in terms of blood speed and tissue velocities, and to know exactly the geometry and position of the vessel for rigorous calculation of the CNR.

The ultrasonic probe was mounted on a linear motor (PI translation stage VT-80, one-directional repeatability  $0.8\mu\text{m}$ , bi-directional repeatability  $\pm 10\mu\text{m}$ ) to enable periodic translation along image depth of amplitude 1mm with a selected speed (1 to 10 mm/s with 1mm/s incremental steps). The field of view of the probe was adjusted on the longitudinal section of the 2mm diameter tube of a Doppler phantom (Model 523A, ATS Laboratories, 404 Knowlton St, Bridgeport CT 06608 USA). The tube was approximately at a 35 mm depth, with a  $75^\circ$  angle to the probe axis, giving the possibility of reaching small axial velocities. A blood mimicking fluid (Doppler test

fluid model 70, ATS Laboratories, 404 Knowlton St, Bridgeport CT 06608 USA) was injected in that tube with an adjustable pump (Ecoline VC-MS/CA8-6, ISMATEC) enabling mean fluid velocities measured at 1, 2, 4, 6 cm/s (thus 2.6, 5.1, 10.4 and 15.5 mm/s of axial velocities). Ultrafast acquisitions were performed using a 6 angles (ranging from  $-5^\circ$  to  $5^\circ$  with  $2^\circ$  incremental steps) compound plane wave ultrasound sequence and a 6 MHz ultrasonic probe (SL 10-2 Supersonic Imagine, France) (pitch 0.2 mm, elevation focus 35 mm, 96% Bandwidth @-6dB). The Pulse Repetition Frequency (PRF) was 6000 Hz, the frame rate of 1000 Hz and the number of frames 600. Twelve acquisitions were performed for each (tissue velocity, blood velocity) couple.

The imaged region of interest was 25.6 mm wide and ranged from 25 mm to 45 mm in depth. The known position of the tube was manually segmented on the BMode (avoiding bias of segmentation on the Doppler image) in order to give two areas (one for the vessel and one for the surrounding phantom (tissue), with a 0.5mm dead zone in between), and the CNR was calculated as the classical:

$$CNR = \frac{\overline{PW}_{tube} - \overline{PW}_{tissue}}{std(PW_{tissue})} \quad (9)$$

In this equation  $\overline{PW}$  stand for the mean value of the power Doppler signal (in the tube or in the surrounding tissue), and  $std$  for the standard deviation. Three filtering methodologies were investigated: the 4<sup>th</sup> order high-pass Butterworth filter, the varying phase increment down mixing approach described in [8] (consisting in a IQ demodulation using the lag one correlation phase averaged on a 5 pixel column neighborhood) followed by 4<sup>th</sup> order high-pass Butterworth filter, and the SVD filtering approach. To avoid any bias induced by the choice of the cut off, every cut off has been tested for the three filters (meaning every cut off frequency for the first two methods, and every singular value threshold for the SVD filter), and the one giving the maximum CNR was kept for each (tissue velocity, blood velocity) couple.

#### B. Rat brain imaging

All experiments followed European Union and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. Adult (>4-week-old) Sprague Dawley rats underwent a surgical thinning of the skull under anesthesia (Ketamine/Xylazine) to enable the propagation of ultrasound. They were then placed in a stereotaxic frame and maintained under 1.5% isoflurane during the time of the acquisition. Ultrafast Acquisitions were performed using a 15 angles (ranging from  $-14^\circ$  to  $14^\circ$  with  $2^\circ$  incremental steps) compound plane wave ultrasound sequence and a 15 MHz ultrasonic probe (Vermont, France) (pitch 0.08 mm, elevation focus 8 mm). Pulse Repetition Frequency (PRF) was 7500 Hz, enabling a frame rate of 500 Hz, enough to correctly sample axial blood flow speeds up to 2.6 cm/s. Ultrafast Doppler acquisitions lasted 0.5s, enough to acquire 250 frames and to capture 3 cardiac cycles). Data are used for Fig. 1 to Fig. 5 and for Fig. 7.

### C. Neonates brain Imaging

Ultrafast Acquisition were performed using a 6 angles (ranging from  $-5^\circ$  to  $5^\circ$  with  $2^\circ$  incremental steps) compound plane wave ultrasound sequence and a 6 MHz ultrasonic probe (SL 10-2 Supersonic Imagine, France) (pitch 0.2 mm, elevation focus 35 mm, 96% Bandwidth @-6dB). Pulse Repetition Frequency (PRF) was 6000 Hz, enabling a frame rate of 1000 Hz, enough to correctly sample axial blood flow speeds up to 10.3 cm/s. Ultrafast Doppler acquisitions lasted 1s, enough to acquire 1000 frames and to capture 2 to 3 cardiac cycles). This observational study was approved by the institutional review board (CCP: 'Comité de Protection des Personnes', i.e., Committee for the Protection of Persons, CCP agreement N° 120601) and local ethical committee, and strictly complies with the ethical principles for medical research involving human subjects of the World Medical Association Declaration of Helsinki, and written consent was obtained from parents of participants. Data were obtained via a transfontanelar (anterior fontanel) Ultrafast Doppler acquisition of a brain parasagittal section performed *in vivo* on a human neonate and Data are used for Fig. 8 to Fig. 11.

### D. Kidney Imaging/ Liver Imaging

Probe and acquisition parameters were the same as for neonate imaging, except (angles:  $-3^\circ$   $3^\circ$  ; frame rate: 3000 Hz) for liver imaging, and (angles:  $-5^\circ$  to  $3^\circ$ , step  $2^\circ$  ; frame rate 1600 Hz) for kidney imaging.

Concerning pediatric liver imaging, the observational study was approved by the institutional review board (CCP: 'Comité de Protection des Personnes', i.e., Committee for the Protection of Persons, CCP agreement N° PP-14020) and local ethical committee, and strictly complied with the ethical principles for medical research involving human subjects of the World Medical Association Declaration of Helsinki, and written consent was obtained from parents of the participants. Data are used for Fig. 12 and Fig. 13.

Kidney transplant imaging was incorporated in the framework of a study conducted to assess whether Ultrafast Doppler could help providing a parametric map of the transplant vascularization and assessing normal and abnormal vascularization within the transplant to detect fibrosis and inflammation. This clinical study was approved by the French national authorities (clinical trial number 2012-A01070-43). After imaging the morphology of the kidney with Bmode, imaging of the renal transplant vascularization was performed by one radiologist (J.M.C) in the longitudinal axis with conventional Doppler Imaging. Once a good imaging plane was found the Ultrafast Doppler acquisition was launched. Data are used for Fig. 13 and Fig. 14.

### E. Signal and image processing

Each Ultrafast Doppler acquisition was filtered using either a 4<sup>th</sup> order butterworth filter with a 'symmetric' initialization (mirror reflecting of the 20 first points of the signal) and those first 20 points were then removed to cancel any settling time of the filter, or using the SVD filter described in this paper, or using the varying phase increment down mixing approach

described in [8] (Fig. 6 and Fig. 11) prior to the same 4<sup>th</sup> order Butterworth filtering. The PW Doppler image was then calculated as the square root of the mean value of the squared filtered signal (thus corresponding to the energy normalized by the number of samples). This raw data was used directly for the CNR computations of the phantom study. In order to improve visualization for the reader and for fair comparison without inducing perceptive bias, for the all clinical examples PW Doppler images (regardless of the filtering process) were normalized with the highest value at 1 and the minimum value at 0, and histogram equalization was performed with rigorously the same parameters to improve the reader visualization without inducing any perceptive bias.

The spectrograms of Fig. 7(c)(d) were generated via short time Fourier transform (32 samples sliding window, lag 2) on the temporal dimension of the pixels in the ROI. Each Fourier transform (meaning each column of the spectrogram) has its maximum set to 1 in order to improve readability. The spectrograms were then averaged in magnitude to be representative of the spectral content (linked to the axial velocity) in the ROI.

## IV. RESULTS

### A. Phantom Study

The phantom study enabled to quantify the improvement of Ultrafast Doppler detection ability by using SVD filtering versus other well-known methods (high-pass filtering, without or with down mixing) in various experimental conditions representative of the clinical setting for the detection of small vessels: low (1mm/s) to important (10mm/s) tissue motion and moderate (15.5 mm/s) to slow (2.6mm/s) blood flow. Results of this study are presented in Fig. 6. It is striking to notice that even for very small tissue motion, the Butterworth filter alone gives very low values of CNR due to remaining clutter signal, compared to the two other approaches. If a reference value of 2 for the CNR is chosen for discrimination between tissue and flow, the Butterworth filter is unable to extract any blood signal of the explored blood speeds range as soon as tissue motion exceeds 4mm/s. The lowest value of blood flow speed (2.6mm/s) is not detected even for very low tissue speed (1mm/s). This is not surprising as a spectral method cannot separate 2 signals with comparable speeds and an unfavorable 40 to 60 dB difference of energy. For very slow tissue velocity (1mm/s) the down mixing approach and the SVD filtering give comparable results, except maybe at the slowest blood velocity that is better extracted via SVD filtering. But as soon as the tissue motion increases (tissue motion  $> 4$  mm/s), the CNR of the down mixing approach decreases rapidly whereas the SVD filtering seems more robust and tends to reach a plateau. This is due to fact that even if down mixing enables to bring back the spectrum of the tissue around the 0 Hz frequency, if the spectral content of tissue and blood flow are too overlapping because of comparable velocities they cannot be efficiently separated by a Fourier based filter, whereas the SVD filter can. SVD filtering appeared to be very robust in this configuration, since we measured a CNR above 2 for all the tested configurations, even

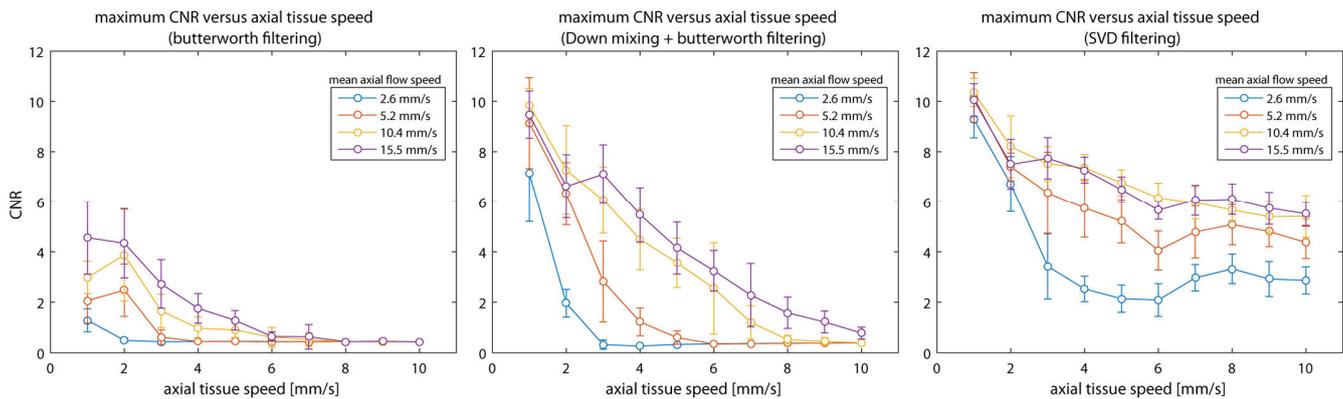


Fig. 6. Evolution of the CNR versus axial tissue velocity for various blood flow speed: phantom study. The same sets of data have been processed using 4<sup>th</sup> order butterworth high pass filtering (left), down-mixing prior to 4<sup>th</sup> order butterworth high pass filtering (middle), and SVD filtering (right). For each measurement, the maximum CNR was found by testing all the possible cut off, and for each experimental condition twelve measurements were pooled to compute mean value (graph circles) and standard deviation (error bars).

when the mean axial blood flow velocity was lower than the tissue velocity (for a blood flow of 5.2 mm/s and a tissue motion of 10 mm/s, the CNR was  $4.4 \pm 0.6$ ; for a blood flow of 2.6 mm/s and a tissue motion of 10 mm/s, the CNR was  $2.9 \pm 0.5$ ).

### B. The functional imaging case

A first comparison of SVD clutter filtering and IIR Butterworth filtering is given (Fig. 7) in the framework of functional ultrasound imaging of brain activity (fUltrasound) [18], [20], [27], [28]. In fUltrasound, it is required to achieve high sensitivity Doppler imaging in order to track the hemodynamic changes due to neurovascular coupling occurring in very small vessels (i.e. mm/s blood flows). This figure is of capital importance to understand how SVD filtering improves both imaging and quantification enabled by Ultrafast Doppler. Fig. 7(a) and (b) show the comparison between the Power Doppler (PW) images obtained using SVD and temporal high pass filtering respectively on a thinned skull rat brain. The threshold for singular values and cut-off frequencies were chosen in order to provide the best image quality for both approaches respectively. The key point of this figure lies in the difference of detection of low flow speed depending on the filter.

Pulse Wave Doppler is the classical ultrasound modality used to monitor the evolution of blood flow speed in one location of the image. The particularity of Ultrafast Doppler acquisition is that this kind of blood flow speed profile can be *a posteriori* computed in every location of the image, as described in [30]. A “Pulse Wave like” Doppler spectrogram can be computed in every pixel of the Ultrafast Doppler acquisition via short time Fourier transform of the In Phase/Quadrature signal, and has been calculated and averaged in magnitude over the region of interest (the set of pixel depicted by the cyan arrow) in both filtering cases (Fig. 7(c)(d)). What is of first importance on those spectrograms is the difference between the two filtered out bands of frequency depicted by the dashed red rectangles: the SVD filter is able to reject clutter without cutting entirely a the spectral band where tissue and flow are mixed, giving access to blood flow speed as low as 0.5 mm/s, whereas the

50Hz cut off butterworth filter tends to cut everything below 2.5 mm/s. This explains why the smallest vessels are better detected via SVD filtering than via butterworth filtering, and in the case of fUltrasound, this difference is primordial since neurovascular coupling occurs at the capillary level, and the blood flow speed in the latter is known to be included in the 0.5-1.5 mm/s range [31].

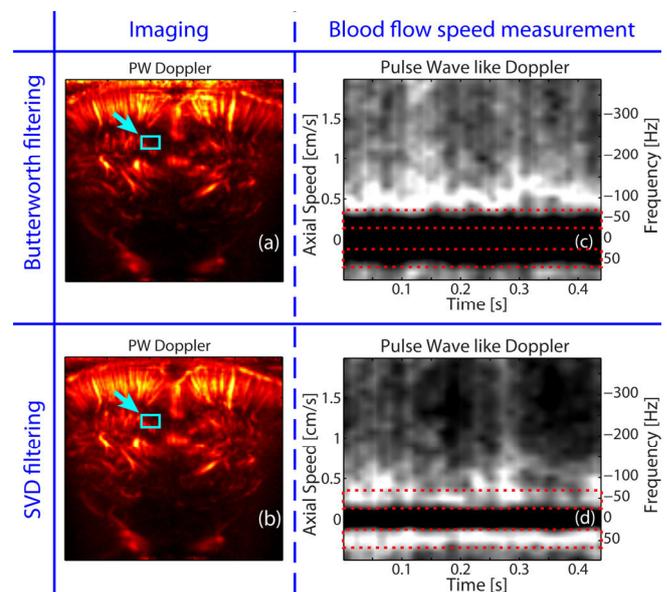


Fig. 7. Comparison of slow blood flow detection (critical for functional imaging) via temporal filtering and SVD filtering (same data than Fig. 1). In that case the rat is maintained in a stereotaxic frame and the probe is maintained in a probe support, the entire setup lying on an anti-vibration table. As a consequence the motion is minimum and consists only in the tissue pulsatility due to blood pressure changes during the cardiac cycle. The PW Doppler image obtained via temporal filtering (50Hz cut off frequency 4<sup>th</sup> order Butterworth filter) (a) can be compared to the PW Doppler imaged obtained via SVD (b). The cyan arrow indicates the set of pixels where a pulse wave like Doppler profile has been calculated from the Ultrafast Doppler acquisition, in the case of Butterworth filtering (c) and SVD filtering (d). The key point here is the difference between the spectral bands cut by both filters. Blood signal energy is kept via SVD filtering in the two area surrounded by the dotted red rectangles.

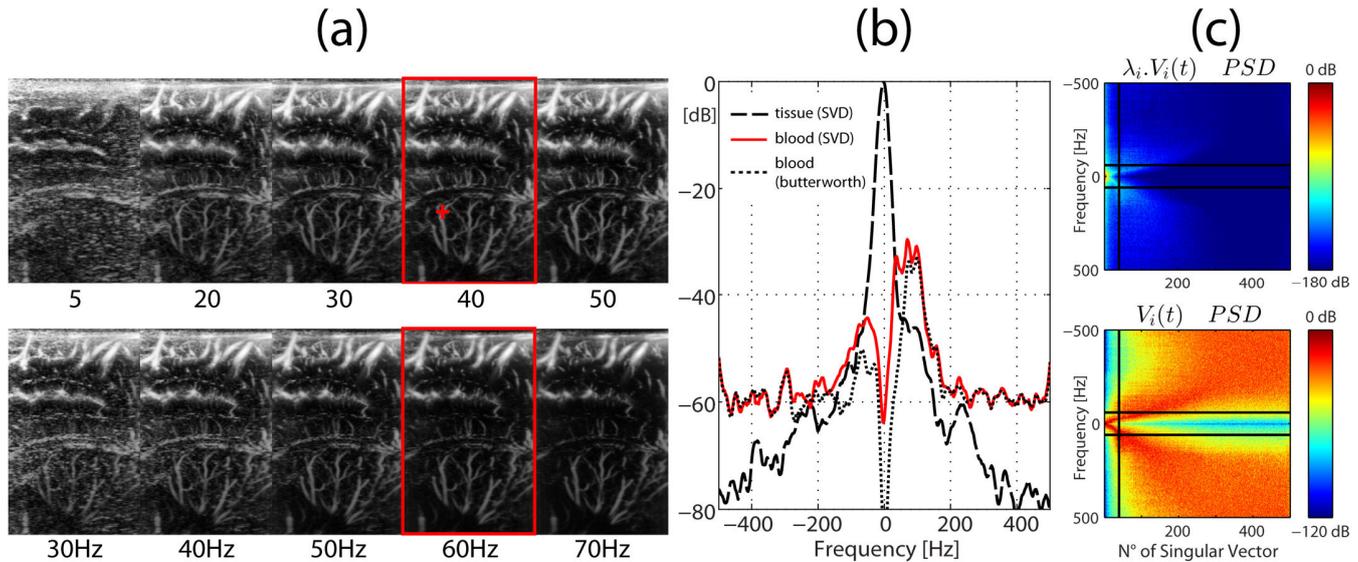


Fig. 8. Comparison between temporal filtering and SVD filtering, the ideal case: no motion and significant blood flow. (a) Effect of both increasing the number of rejected singular values (top) and increasing the temporal filter cut off frequency (bottom) on an Ultrafast Doppler acquisition (brain neonate imaging). For both methods the image that gave the best clutter rejection according to the clinicians has been framed in red. (b) A region of interest has been chosen (red cross in (a)) in a vessel and power spectral estimation has been computed on the tissue signal (black dashed line) and blood signal (red solid line) extracted via SVD filtering, and blood signal (black dotted line) extracted via temporal Butterworth filtering. (c) Spectral diagrams (see Fig. 4(a)) (PSD stands for Power spectral Density): on top weighted with the singular value and on the bottom without weighting. Black lines represent temporal (horizontal) and singular-based (vertical) filtering of the signal.

### C. Clinical imaging

#### 1) The ideal Doppler case

Beyond small animal imaging, the next comparisons are performed in clinical settings. A qualitative comparison of SVD clutter filtering and IIR Butterworth filtering is given by Fig. 8 to Fig. 10. The first example (Fig. 8) depicts the vasculature of cortical and thalamic areas. Motion is quite low during this acquisition and blood flow speeds are moderate (2 cm/s to 8cm/s). Several values have been chosen for the number of rejected singular values and the cut off frequency of the butterworth filter and resulting Power Doppler images are presented. Out of the five examples presented, the best clutter rejection is obtained for 40 rejected singular values and 60 Hz of cut off frequency for SVD processing and conventional temporal filtering respectively. Even though this imaging situation is ideal (no motion artifacts) for the Butterworth high pass filtering, the number of visible blood vessels is bigger for SVD filtering than for Butterworth high pass filtering. It can be noticed that contrast is slightly higher with SVD filtering than with temporal filtering. Contrary to previous publications [4]–[6], [8]–[10] that only give a schematic or simulated representation of spectral distribution for tissue and blood signal, the large ensemble length available with Ultrafast Doppler enables to truly plot the spectral content of blood and tissue signal extracted via SVD filtering and to explain why in general SVD presents a better clutter rejection than temporal filtering. This has been done for each case ((b) of Fig. 8 to Fig. 10) where the spectral content of tissue signal (black dashed line) and of blood signal (red solid line) of the ROI defined on the image by a red cross mark and extracted via SVD are displayed. As a comparison the blood signal filtered via Butterworth filtering has also been plotted (black dotted line).

In this imaging situation noise signal is roughly 60 dB below tissue signal, so the tails of the red solid spectra are mostly noise and not blood signal. In Fig. 8 it is clear that blood and tissue can be separated via temporal filtering because energy of blood signal is higher than energy of tissue in a certain spectral band (50 to 150 Hz), which is a required condition for the vessel to be detected in Power Doppler. This is the reason why temporal filtering gives quite good results in this first example. However it can be observed that the energy of blood signal extracted in the SVD processing is higher than in the temporal filtered extracted blood signal, which illustrates why SVD clutter rejection gives generally better contrast than temporal filters.

Fig. 8(c) represents the spectral content of  $\lambda_i V_i(t)$  (upper image) and of  $V_i(t)$  (lower image) versus the rank  $i$  of the singular value  $\lambda_i$ . On this representation in the singular vector space, the superimposed horizontal black lines represent the cutoff threshold of best Butterworth filtering and the vertical black line represent the cut-off threshold of best SVD filtering (vertical black line). The first image (top) enables to comprehend the relative differences in energy from the first singular vector to the last one, whereas the second one (bottom) enables to observe the differences between normalized spectral contents of individual temporal singular vector. For blood/tissue discrimination, the first image may be the most important, because it represents the repartition of the total signal energy in a frequency-singular value space: trying to maximize the energy of blood signal over tissue signal in a Power Doppler image is related to the maximization of the integration of the energy in a portion of this frequency-singular value space. In the case of temporal filtering this subspace is chosen as the two rectangles above and below the two horizontal black lines, whereas in the case of SVD clutter

rejection this subspace is chosen as the rectangle on the right of the vertical black line. With this representation the double advantage of SVD filtering over temporal filtering is obvious: whereas the latter leaves the “tails” of the tissue spectrum in the filtered signal and removes a great part of blood signal energy (low speeds), the vertical boundary of SVD filtering is much more optimal for the separation of tissue and blood. This explains the higher contrast for the SVD filtered Power Doppler image: although the main part of tissue signal is filtered by temporal Butterworth filtering, the huge difference of amplitude between tissue echoes and blood echoes makes the integration of the energy of tissue signal in the remaining

spectral band not negligible compared to the integration of blood signal energy. Also a small part of blood signal is removed between the two horizontal lines.

2) *The strong motion case*

In the presence of motion this difference becomes tremendous. Fig. 9 presents an acquisition done only two seconds after Fig. 8, but the neonate moved a little bit during this second acquisition, resulting in a strong motion artefact on the Power Doppler image. To recover a complete clutter rejection the cut off frequency of the temporal filtering as to be set to as high as 250 Hz (sampling frequency 1000Hz) whereas a slight increase to 80 rejected singular values is enough in the

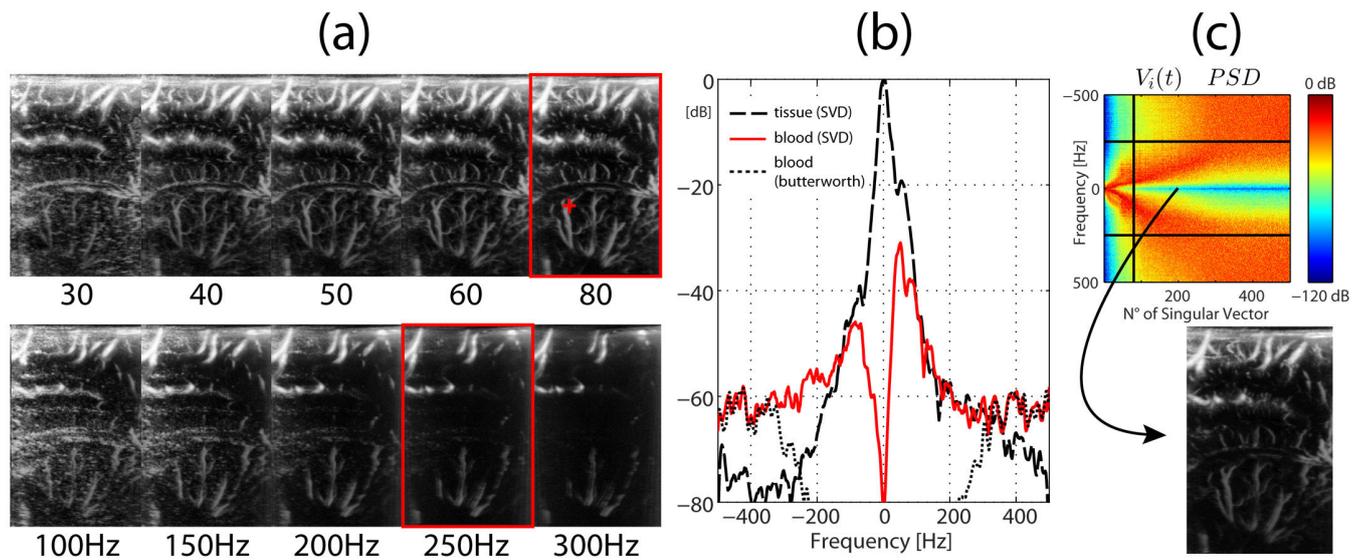


Fig. 9. Comparison between temporal filtering and SVD filtering, the strong motion case. Explanation of the different elements is the same than in Fig. 8, except for the image in (c) which depicts the image build from the energy lost in temporal filtering but kept in SVD filtering (i.e. the content of the energy in the rectangle drawn on spectral diagram top (c)). This acquisition was done 2 seconds after Fig. 8, the only difference is that strong motion was present in the moment of the acquisition.

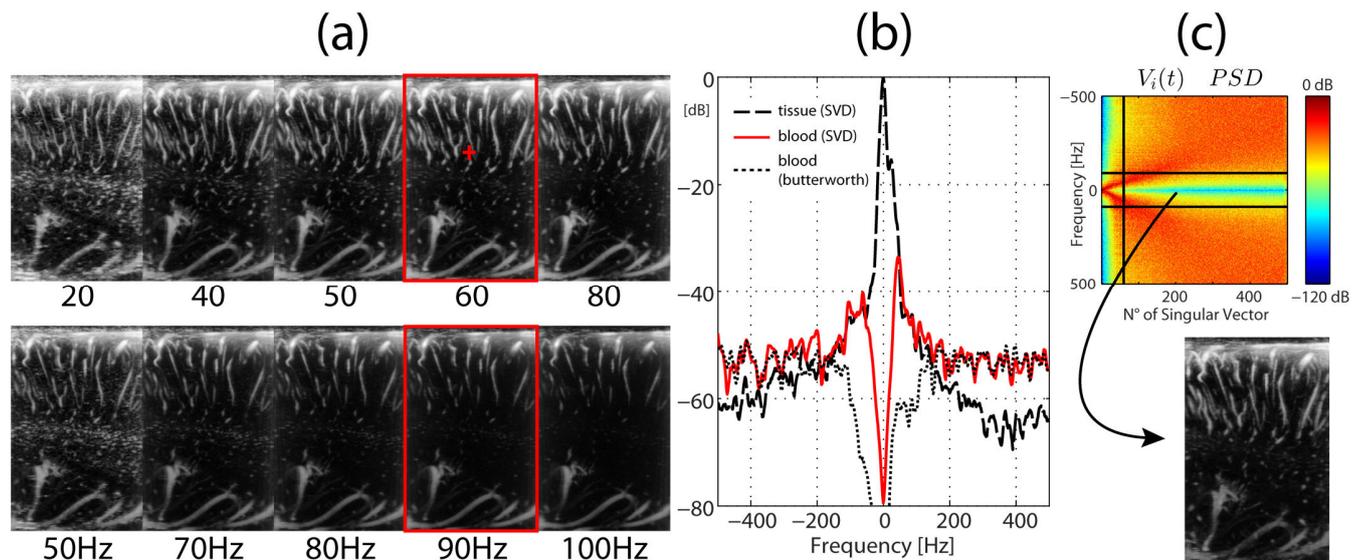


Fig. 1. Comparison between temporal filtering and SVD filtering, the very slow blood flow case. Explanation of the different elements is the same than in Fig. 9. This acquisition has been done in a parasagittal plane where blood vessels are smaller than in Fig. 8 and Fig. 9. The interest here is to show that without motion but in case of extremely slow blood flow, SVD filtering can still extract signal that could not be extracted via spectral discrimination.

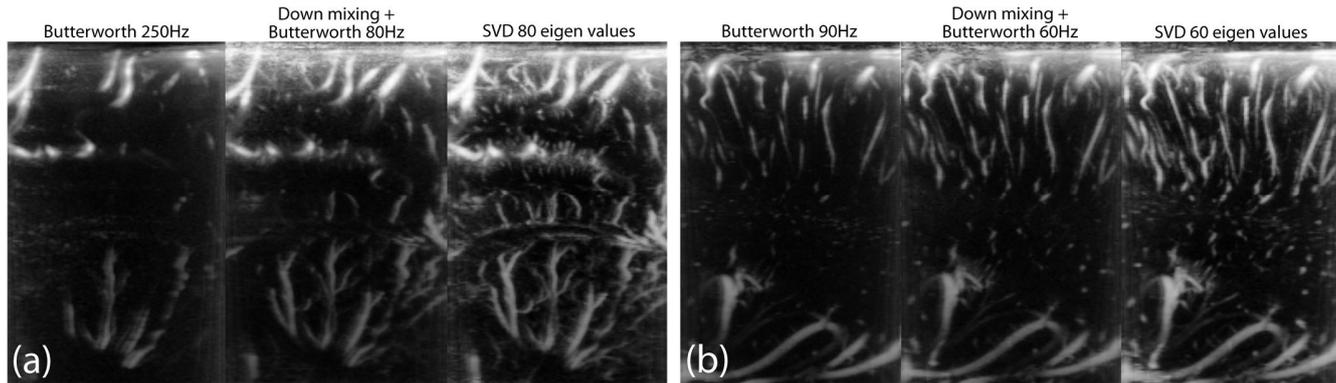


Fig. 11. Comparison of Butterworth filtering, down-mixing prior to Butterworth filtering and SVD filtering. (a) and (b) The data are the same than in Fig. 9 and Fig. 10 respectively and in each case the three images obtained with the best possible clutter rejection according to the clinician are presented side by side and in a larger format to enable proper comparison. Higher contrast and better small vessels delineation in the case of SVD filtering are unquestionable.

case of SVD filtering. Even if a certain level of clutter is tolerated, any image processed with temporal filtering is far from depicting as much vessels as the SVD filtered image. The effect on the Power Doppler is obviously explained by the frequency-singular value diagram presented in (c): to filter pronounced high frequencies in the tissue signal, the temporal filter strategy is to increase the gap between the two horizontal lines, and almost completely filters out the blood signal. As depicted in the central spectrum (b), the vessel marked by the red cross mark would never be detected by temporal filtering because its energy is below tissue signal in every spectral domain. In Fig. 9(c) is displayed the Power Doppler image computed from the energy lying in the rectangle delimited by the singular-value threshold and the two cut off of the temporal filter. In other words it is the blood energy lost by the temporal filter compared to the SVD filter. It shows that a large amount of information is lost in the small vessels when using a temporal filter instead of the SVD filter.

### 3) The very slow blood flow case

The last example in Fig. 10 shows that even with no motion artifacts, SVD filtering is much superior to detect really small vessels whose blood speed is not high enough to get out of the tail of the spectral content of tissue signal (red cross mark: a vessel appearing in SVD processed Power Doppler image and not in temporally processed Power Doppler image). Once again the contrast is higher with SVD processing. Finally, a zoomed view of the optimized Power Doppler images obtained respectively for temporal filtering, down mixing prior to temporal filtering, and SVD filtering is presented in Fig. 11 in order to emphasize the ability of multidimensional SVD filtering to provide better contrast and detect smaller vessels.

### D. The importance of the Plane wave imaging ensemble length

It was emphasized in the introduction that SVD filtering takes advantage of the large ensemble length provided by the Ultrafast Doppler technique compared to the classical focused emission technique. This is of primordial importance and is illustrated in Fig. 12. In this figure, Ultrafast Doppler data are processed as if they had been acquired with a swept scan strategy used in conventional Doppler: only the temporal points 1 to 16 are kept for the first column of the image, then only the

temporal points 17 to 32 are kept for the second column and so on. This simulates a swept scan strategy used in CFI where only 16 temporal samples can be acquired per line because of the need to electronically quickly move to another location. Those data are then processed as proposed by Ledoux in [9]. The huge

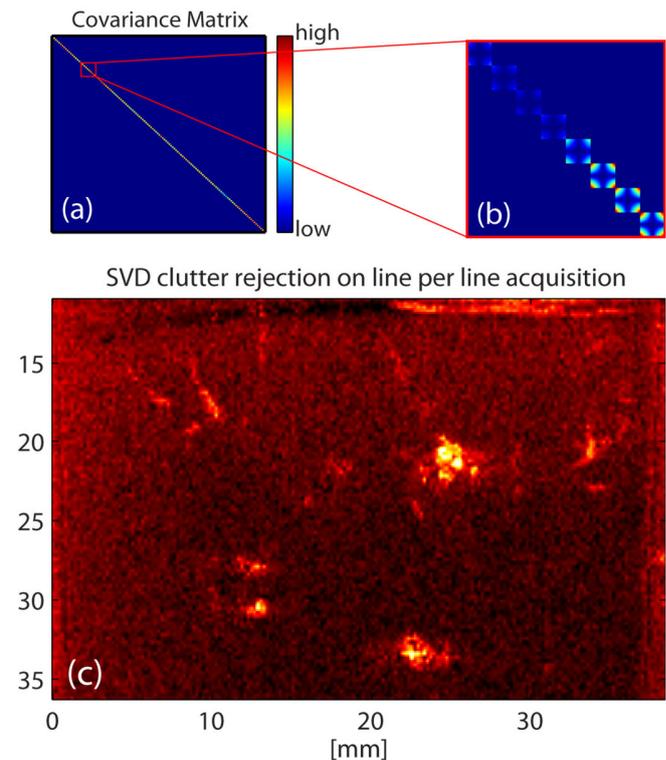


Fig. 12. Importance of the ensemble length for SVD Doppler filtering. An Ultrafast Doppler acquisition has been processed as if it were a line per line acquisition typical of focused ultrasound with the method described by Ledoux [9]. Instead of using all the data in the 3D matrix, only are kept the temporal points 1 to 16 for the first column of pixels, the temporal points 17 to 32 for the second column of pixels, and so on. This simulates a swept scan Doppler imaging strategy and the consequence is a lower ensemble length both for space and time. (a) Compared to the covariance matrix of Fig. 3, the covariance matrix for line per line acquisition is very sparse, with only 16x16 blocks on its diagonal. (b) a zoom on a small subregion on the covariance matrix reveals the small 16x16 blocks. (c) The Power Doppler image has been obtained using a SVD filter on each block of the covariance matrix, as would have been done in [9], with a removal of only the first singular vector. The image exhibits very poor sensitivity, and has to be compared to Fig. 13(a) which show the SVD filter result on the full matrix.

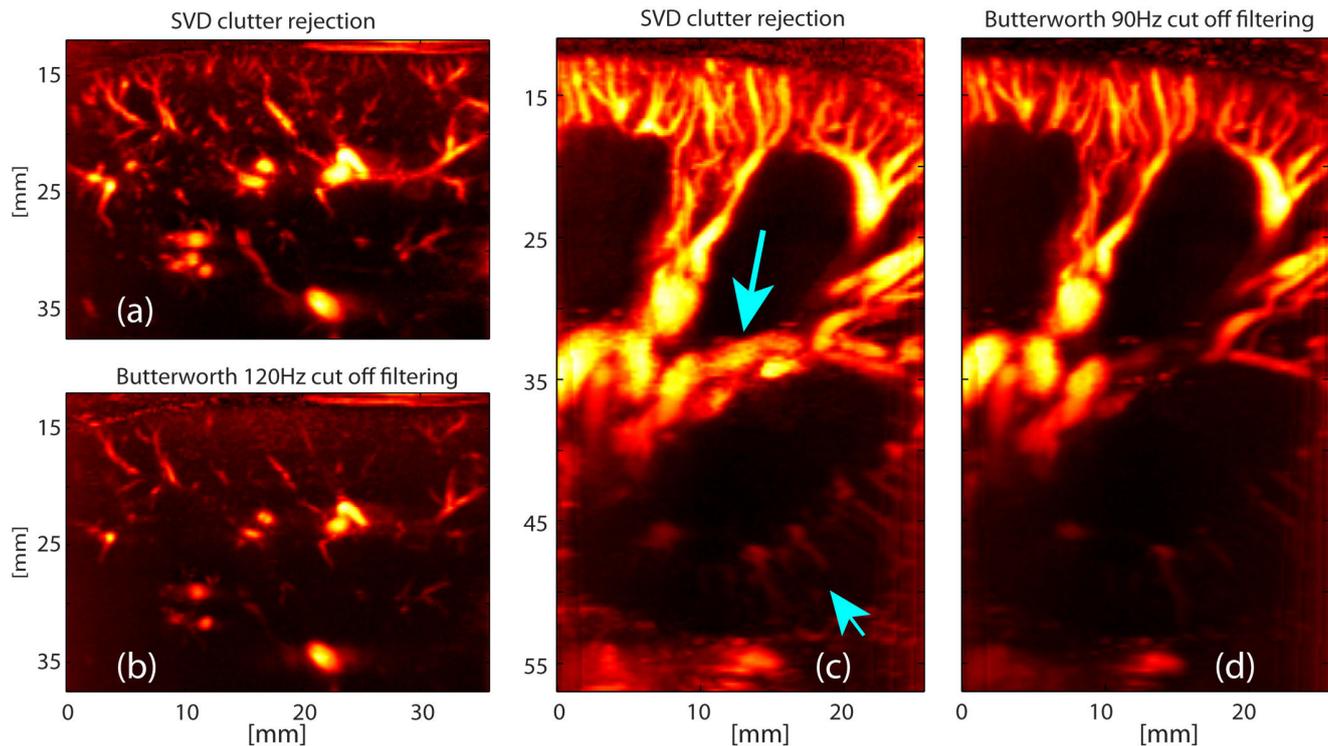


Fig. 13. Clinical examples of filtering improvement via SVD clutter rejection: (a) Ultrafast Doppler acquisition on a child (8 years old) liver processed via SVD, much more small vessels are detected than with butterworth filtering (b). (c) On a transplanted kidney, Ultrafast Doppler gives very good sensitivity with both processing but the few vessels with low flow speed (large vein, long arrow) (very small arteries, deep in the organ, small arrow) are almost completely filtered out by butterworth filtering (d).

difference with Ultrafast Doppler SVD filtering lies both in the small number of temporal point acquired in each location and the lack of simultaneity of these temporal acquisitions, and that difference can be understood directly by looking at the covariance matrix: in each block of the covariance matrix the SVD filter has to find a subspace for tissue. As a consequence its ability to efficiently compress the tissue signal on a few singular vector before the subtraction operation is highly impaired.

## V. DISCUSSION

SVD clutter rejection has been shown to improve significantly the sensitivity of Ultrafast Doppler in various imaging situations. It is especially efficient in two situations of major interest in Doppler imaging. It removes strong motion artifacts occurring during freehand exams usually downgrading the Doppler image quality. It also strongly improves detection of small vessels characterized by low flow speeds even if mild motion is present. For all studied configurations, SVD clutter rejection provided at least a higher contrast and generally superior detection capabilities. The outperformance of SVD clutter rejection is intrinsically linked with the ultrafast data acquisition. By providing multidimensional simultaneous ultrasonic data in 2D and soon in 3D at high frame rates, the ultrafast sequence can rely on much larger ensemble lengths in both time and space in order to discriminate tissue and probe motion from blood flow. Thus, the multidimensional SVD filter

outperforms conventional temporal filters and leads to better discrimination because it takes into account large spatial ensemble lengths and the average statistics of the complete image is included. Finally, even in the most difficult situation where tissue motion is not completely stationary but rather low frequency and quite local, the SVD filtering works effectively to discriminate it from blood flow due fractal intrinsic properties of the vasculature. Indeed, the fractal nature of the vasculature implies that very low blood flows are present almost only in very small vessels much smaller than typical regions of tissues affected by the same range of motion. As their spatial statistics are different, the temporal variations of tissue and blood flow are nicely separated.

SVD filtering should have an important impact in the field of fUltrasound (functional ultrasound imaging of brain activity) since local hemodynamic changes linked to neurovascular coupling occur mainly in very small vessels where the blood flow speed is not measurable with conventional approaches. Moreover, the application of SVD filtering to ultrafast Doppler in the brain will be of particular interest for fUltrasound brain imaging of awake and freely moving animals where the optimal discrimination between tissue/probe motion artifacts and blood flow in small vessels becomes crucial.

The SVD clutter rejection also improves sensitivity and motion filtering in clinical applications such as kidney, liver, thyroid, heart imaging (data not shown). In this manuscript, results in neonate brain (Fig. 8 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** to Fig. 11), child liver and transplanted kidney

(Fig. 13) were presented to illustrate the interest of this processing but many other unrepresented data were acquired in thyroid and cardiac imaging and lead to the same conclusions. Neonate brain imaging is an interesting example of imaging application where it is difficult to ask patients to hold their breath. In such situations respiration motion combined to the ever-present pulsatility motion, are unavoidable. It is then difficult to filter out optimally slowly moving tissue from slow blood flow signal with a butterworth filter. In the liver example shown (Fig. 13(a)(b)), tissue motion requires a 120Hz cut off frequency for the temporal filter and consequently vessels with blood speed below  $1.5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  disappeared of the image, whereas SVD filtering is able to reject clutter without losing those small vessels. In the kidney example shown (Fig. 13(c) (d)), tissue can be filtered out with a 90Hz cut off frequency for the temporal filter, and the blood flow speeds are consequent in most vessels ( $>1.2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ), however SVD filtering still improves detection on venous structures in the central part of the image (long arrow) that present very low flow speeds ( $\sim 0.8 \pm 0.2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and completely disappear with temporal filtering. It is the same for deep small vessels whose signal is quite weak due to absorption (small arrow) and that can be quickly filtered out by a temporal filter. The sensitivity of Ultrafast Doppler combined with the discrimination capabilities of SVD filtering offers a level of detection never reached before with an ultrasound modality, even with the use of contrast agent (Fig. 14).

SVD clutter rejection is a powerful and versatile tool for Ultrafast Doppler imaging filtering, effective in many clinical applications. However this study presents some limitations, and a lot of areas for improvement have to be investigated. The first point is that no adaptive method for the choice of the threshold used for singular vector rejection has been proposed, but this is mainly due to the fact that the adjustment of this value is not as critical as for cut off frequency choice. It can be noticed that in all the examples presented in this paper a threshold of 80 rejected singular values would have given images with good quality, whereas temporal filter had to be precisely adjusted to reject clutter, with cut off frequencies ranging from 60Hz to 250Hz. However different strategies can be imagined for adaptive SVD clutter rejection: energy considerations on the level of the cumulative sum of the singular value can help, given an energy ratio in dB between blood signal and tissue signal depending on the acquisition parameters (ultrasound frequency, absorption coefficient...), to discriminate between the tissue subspace and the blood subspace of the singular vector space. A more sophisticated strategy is to calculate the central frequency of each individual temporal singular vector and to reject singular vector below a certain central frequency (a certain speed), strategy which do not overcome the problem of choosing a threshold because a certain speed has to be chosen, but which is adaptive to the amplitude of the motion present during the acquisition. Also, threshold can be dynamically chosen during the different phases of the cardiac cycle because the dimension of the tissue subspace increases for example during systole because of stronger tissue motion. These strategies will be presented with ongoing research in future

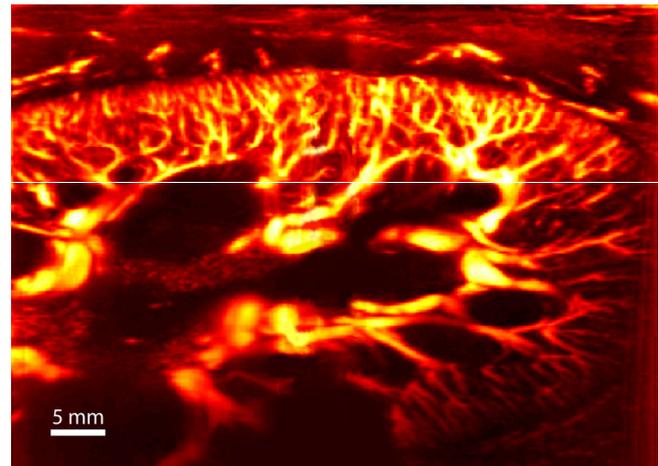


Fig. 14. Fusion (side to side concatenation with manual coregistration) of 2 Doppler images acquired in the same plane respectively on the left and right sides of the transplanted kidney of a human patient. The images are filtered via SVD filtering. The in vivo vascular network of the transplanted human kidney is delineated with a very high sensitivity without requiring the use of contrast agent.

work. Finally, the software beamforming capabilities provided by ultrasound scanners based on GPU boards [13] gives the physician the ability to adapt manually the singular value threshold to the desired image quality. This simplest strategy could turn out to be the most efficient compared to automatic approaches as the sonographers would rather manually optimize their image quality for different organs or patients.

Interestingly, robust and automatic approach for the choice of the filter threshold has been an extensive research topic in the applied mathematics community in the last decade. These approaches, i.e. the so-called Robust PCA [22], would permit to better choose the singular value thresholding. Our ultrasound problem fits to the context of robust PCA as the ultrasonic data acquired during ultrafast sequences can be seen as the superposition of a low-rank component (tissue motion) and a sparse component (blood motion).

First of all, the singular values of a random Gaussian matrix which corresponds to the noise component in (1) follows a Marchenko-Pastur distribution. This property can be taken benefit from to directly determine a rough statistical threshold by using Stein's Unbiased Risk Estimator (SURE method) as discussed by Candes *et al* and Donoho *et al* [21], [32]. In particular, Candes *et al* applied the SURE method in order to determine an automatic threshold for the SVD decomposition in the context of dynamic MRI processing. In particular, they demonstrated the efficient use of the singular value thresholding (SVT) unbiased risk estimate for automated and optimized denoising of dynamic cardiac MRI series. The SURE method clearly demonstrated an improved assessment of myocardial perfusion. In this approach, the thresholding of singular values is not a hard-thresholding rule (*ie* replacing a subset of singular values by zeros), but rather introduce a soft-thresholding rule consisting in shrinking the singular values towards zero by a constant amount to determine during an iterative process. The outperformance of this more

sophisticated approach will be evaluated in further works. Conversely to the other estimation approaches cited in Candes paper, we want to get rid of the main signal. Noise is present in addition to the blood signal in the low singular values subspace. However, as noted on Fig. 8(b), tissue signals (black curve) are 30 dB higher than blood flow signals (red curve) and blood flow signals are approximately 30 dB higher than the electronic noise level (tails of red curve). The accuracy and precision of local velocity estimation was studied both theoretically and experimentally in a previous paper using the same research platform [33].

Beyond the phantom study that provided quantitative Contrast to Noise Ratio data on the efficiency of SVD filtering compared to well-known other filtering algorithms, several points remain to clarify with quantitative data and controlled conditions, and will be addressed in future work. The range of tissue velocity explored in that phantom study has to be increased to cover high motion application, such as cardiac imaging, and the influence of the vessel size on the SVD filtering CNR has to be investigated and compared with other gold standard filters. Also, this study covered in plane tissue motion, but should also quantify the influence of out of plane motion.

The influence of the ensemble length has been underlined in this paper in terms of a comparison between really short ensembles (focused ultrasound) and very long ensembles (plane wave acquisitions). However the ensemble size used to build the Casorati matrix prior to SVD filtering has to be studied carefully, because it will be closely related to real-time capability of SVD filtering. In particular, temporal sliding windows or spatial-block processing will be investigated to find potential tradeoff between clutter rejection and computation time.

Computation is generally a bottleneck for real time imaging. With the current Matlab® implementation, and on an average quad core Xeon 2.66 GHz, the time to compute the SVD filtering is 0.5s for a (100x128x256) Ultrafast acquisition, 1.7s for a (100x128x512) Ultrafast acquisition, 3.4s for a (200x128x512) Ultrafast acquisition, and tend to be linear with the increase of the number of points in space and quadratic with the increase of the number of points in time (due to the choice of the covariance matrix presented in the method section). It is then indubitable that with the currently available processors, a reasonable choice for the processed temporal length of the Ultrafast Doppler acquisition and fastest C++ or GPU implementation, real time SVD filtering is reachable starting today.

Clinical data presented in this paper have been acquired with linear array and relatively high ultrasound frequency (6MHz and 15MHz). However this is not exclusive of other configuration and current work in our lab are conducted using Doppler SVD filtering with lower emission frequencies or phased array with diverging waves. Latest results on 3D ultrafast imaging rely on the use of SVD filtering with a 3MHz probe and plane and diverging waves.

For some applications requiring very high performance levels for clutter filtering, the multidimensional SVD filter will

become mandatory. It is the case for human brain ultrasound functional imaging, because freehand imaging of neurovascular coupling rest upon detection of really slow blood flow in arterioles and venules. Tremendous sensitivity of Ultrafast Doppler combined to optimal filtering abilities of SVD clutter rejection is a milestone toward that end. In cardiac imaging, the detection of myocardium vascularization without any contrast agents in the fast moving cardiac muscle would also strongly benefit from the use of such SVD approaches. Osmanski *et al* proposed for Ultrafast Doppler imaging a demodulation approach for the discrimination of myocardium blood and tissue motion in 2012 [34]. The SVD clutter filtering can outperform this approach for the visualization of coronary arteries without contrast agents. Such high sensitivity vascular imaging without contrast agents could also be interesting for tumor vascularization characterization as blood flow in the tumor micro vascularization is today impossible to detect due to limited cut-off frequency thresholds of classical clutter filters necessary to cancel tissue motion artifacts.

Finally, it has been shown in this article that the SVD filter performance is increasing with the ensemble length both in space and time, this is the reason why SVD filtering applied on 2D spatial data provided by ultrafast imaging outperforms SVD filtering applied to 1D spatial data provided by conventional focused emissions. For this reason, the extension of SVD clutter filtering to 4D ultrasonic data (3D space + 1D time) provided by ultrafast matrix arrays [35] should lead to even better results and an additional improvement of filtered data in 3D Ultrafast Doppler imaging.

#### REFERENCES

- [1] S. Bjaerum, H. Torp, and K. Kristoffersen, "Clutter filter design for ultrasound color flow imaging," *Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control IEEE Trans. On*, vol. 49, no. 2, pp. 204–216, 2002.
- [2] J. C. Willemetz, A. Nowicki, J. J. Meister, F. De Palma, and G. Pante, "Bias and variance in the estimate of the Doppler frequency induced by a wall motion filter," *Ultrason. Imaging*, vol. 11, no. 3, pp. 215–225, Jul. 1989.
- [3] C. Tysøe and D. H. Evans, "Bias in mean frequency estimation of Doppler signals due to wall clutter filters," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 21, no. 5, pp. 671–677, 1995.
- [4] Y. M. Yoo, R. Managuli, and Y. Kim, "Adaptive clutter filtering for ultrasound color flow imaging," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 29, no. 9, pp. 1311–1320, Sep. 2003.
- [5] A. P. Kadi and T. Loupas, "On the performance of regression and step-initialized IIR clutter filters for color Doppler systems in diagnostic medical ultrasound," *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 42, no. 5, pp. 927–937, Sep. 1995.
- [6] A. P. G. Hoeks, J. J. W. van de Vorst, A. Dabekaussen, P. J. Brands, and R. S. Reneman, "An efficient algorithm to remove low frequency Doppler signals in digital Doppler systems," *Ultrason. Imaging*, vol. 13, no. 2, pp. 135–144, Apr. 1991.
- [7] L. Thomas and A. Hall, "An improved wall filter for flow imaging of low velocity flow," in *1994 IEEE Ultrasonics*

- Symposium, 1994. Proceedings*, 1994, vol. 3, pp. 1701–1704 vol.3.
- [8] S. Bjaerum, H. Torp, and K. Kristoffersen, “Clutter filters adapted to tissue motion in ultrasound color flow imaging,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 49, no. 6, pp. 693–704, Jun. 2002.
- [9] L. A. F. Ledoux, P. J. Brands, and A. P. G. Hoeks, “Reduction of the Clutter Component in Doppler Ultrasound Signals Based on Singular Value Decomposition: A Simulation Study,” *Ultrason. Imaging*, vol. 19, no. 1, pp. 1–18, Jan. 1997.
- [10] A. C. H. Yu and L. Lovstakken, “Eigen-based clutter filter design for ultrasound color flow imaging: a review,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 57, no. 5, pp. 1096–1111, May 2010.
- [11] L. Lovstakken, S. Bjaerum, K. Kristoffersen, R. Haaverstad, and H. Torp, “Real-time adaptive clutter rejection filtering in color flow imaging using power method iterations,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 53, no. 9, pp. 1597–1608, Sep. 2006.
- [12] D. E. Kruse and K. W. Ferrara, “A new high resolution color flow system using an eigendecomposition-based adaptive filter for clutter rejection,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 49, no. 10, pp. 1384–1399, Oct. 2002.
- [13] M. Tanter and M. Fink, “Ultrafast imaging in biomedical ultrasound,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 61, no. 1, pp. 102–119, Jan. 2014.
- [14] J. Bercoff, M. Tanter, and M. Fink, “Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 51, no. 4, pp. 396–409, 2004.
- [15] M. Tanter, J. Bercoff, L. Sandrin, and M. Fink, “Ultrafast compound imaging for 2-D motion vector estimation: application to transient elastography,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 49, no. 10, pp. 1363–1374, 2002.
- [16] G. Montaldo, M. Tanter, J. Bercoff, N. Benech, and M. Fink, “Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 56, no. 3, pp. 489–506, 2009.
- [17] J. Bercoff, G. Montaldo, T. Loupas, D. Savery, F. Mézière, M. Fink, and M. Tanter, “Ultrafast compound Doppler imaging: providing full blood flow characterization,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 58, no. 1, pp. 134–147, Jan. 2011.
- [18] E. Mace, G. Montaldo, B. Osmanski, I. Cohen, M. Fink, and M. Tanter, “Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 60, no. 3, pp. 492–506, Mar. 2013.
- [19] C. R. Cooley and B. S. Robinson, “Synthetic focus imaging using partial datasets,” in *1994 IEEE Ultrasonics Symposium, 1994. Proceedings*, 1994, vol. 3, pp. 1539–1542 vol.3.
- [20] E. Macé, G. Montaldo, I. Cohen, M. Baulac, M. Fink, and M. Tanter, “Functional ultrasound imaging of the brain,” *Nat. Methods*, vol. 8, no. 8, pp. 662–664, Jul. 2011.
- [21] E. J. Candes, C. A. Sing-Long, and J. D. Trzasko, “Unbiased Risk Estimates for Singular Value Thresholding and Spectral Estimators,” *IEEE Trans. Signal Process.*, vol. 61, no. 19, pp. 4643–4657, Oct. 2013.
- [22] E. J. Candès, X. Li, Y. Ma, and J. Wright, “Robust principal component analysis?,” *J. ACM JACM*, vol. 58, no. 3, p. 11, 2005.
- [23] R. Otazo, E. Candès, and D. K. Sodickson, “Low-rank plus sparse matrix decomposition for accelerated dynamic MRI with separation of background and dynamic components,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 73, no. 3, pp. 1125–1136, Mar. 2015.
- [24] H. Gao, H. Yu, S. Osher, and G. Wang, “Multi-energy CT based on a prior rank, intensity and sparsity model (PRISM),” *Inverse Probl.*, vol. 27, no. 11, p. 115012, Nov. 2011.
- [25] Y. H. Sajan Goud Lingala, “Accelerated dynamic MRI exploiting sparsity and low-rank structure: k-t SLR,” *IEEE Trans. Med. Imaging*, vol. 30, no. 5, pp. 1042–54, 2011.
- [26] Z.-P. Liang, “Spatiotemporal Imaging with Partially Separable Functions,” in *Joint Meeting of the 6th International Symposium on Noninvasive Functional Source Imaging of the Brain and Heart and the International Conference on Functional Biomedical Imaging, 2007. NFSI-ICFBI 2007*, 2007, pp. 181–182.
- [27] C. Eckart and G. Young, “The approximation of one matrix by another of lower rank,” *Psychometrika*, vol. 1, no. 3, pp. 211–218, Sep. 1936.
- [28] B. F. Osmanski, C. Martin, G. Montaldo, P. Lanièce, F. Pain, M. Tanter, and H. Gurden, “Functional ultrasound imaging reveals different odor-evoked patterns of vascular activity in the main olfactory bulb and the anterior piriform cortex,” *NeuroImage*, vol. 95, pp. 176–184, Jul. 2014.
- [29] B. F. Osmanski, S. Pezet, A. Ricobaraza, Z. Lenkei, and M. Tanter, “Functional Ultrasound Imaging of Intrinsic Connectivity in the Living Rat Brain,” *Nature Communications*, Oct-2014.
- [30] C. Demené, M. Pernot, V. Biran, M. Alison, M. Fink, O. Baud, and M. Tanter, “Ultrafast Doppler reveals the mapping of cerebral vascular resistivity in neonates,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, Mar. 2014.
- [31] K. P. Ivanov, M. K. Kalinina, and Y. I. Levkovich, “Blood flow velocity in capillaries of brain and muscles and its physiological significance,” *Microvasc. Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 143–155, Sep. 1981.
- [32] D. Donoho and M. Gavish, “Minimax risk of matrix denoising by singular value thresholding,” *Ann. Stat.*, vol. 42, no. 6, pp. 2413–2440, Dec. 2014.
- [33] T. Deffieux, J.-L. Gennisson, B. Larrat, M. Fink, and M. Tanter, “The variance of quantitative estimates in shear wave imaging: Theory and experiments,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 59, no. 11, p. -, Nov. 2012.
- [34] B.-F. Osmanski, M. Pernot, G. Montaldo, A. Bel, E.

Messas, and M. Tanter, "Ultrafast Doppler Imaging of Blood Flow Dynamics in the Myocardium," *IEEE Trans. Med. Imaging*, vol. 31, no. 8, pp. 1661–1668, Aug. 2012.

- [35] J. Provost, C. Papadacci, J. E. Arango, M. Imbault, M. Fink, J.-L. Gennisson, M. Tanter, and M. Pernot, "3D ultrafast ultrasound imaging in vivo," *Phys. Med. Biol.*, vol. 59, no. 19, p. L1, Oct. 2014.

## 6.2. Article : "Multiplane wave imaging increases signal-to-noise ratio in ultrafast ultrasound imaging"

L'imagerie fUS repose sur une séquence Doppler ultrarapide qui consiste à émettre une onde plane répétée avec différents angles, puis de les combiner pour former une image *compound*. Cette méthode a permis d'améliorer considérablement la sensibilité en comparaison à la séquence Doppler conventionnelle. Toutefois, la séquence Doppler ultrarapide peut être optimisée pour augmenter le contraste, le signal sur bruit et la résolution des images ultrarapide. Appelé multi-onde plane ultrasonore (*Multiplane Wave Ultrasound*), cette nouvelle séquence repose sur deux étapes : (1) une émission d'une série d'ondes planes rapprochées avec des angles différents, qui prend à peu près le même temps que l'émission d'une seule onde plane dans la séquence Doppler ultrarapide standard, (2) une combinaison linéaire des échos avec des séries de coefficients qui permettent de recomposer des ondes comparables à celles de la séquence standard mais avec une amplitude accrue. La reconstitution d'échos virtuels associés à des ondes ultrasonores d'amplitudes augmentées apporte un gain de rapport signal/bruit sans diminuer la cadence d'acquisition.

Cet article détaille le principe de la séquence *Multiplane wave ultrasound* et montre les bénéfices apportés pour diverses modes d'imagerie. Pour l'imagerie fonctionnelle Doppler, cette séquence permet d'augmenter le ratio signal sur bruit de 3 à 6 dB des images ultrarapides en profondeur sans compromettre la cadence des images générées ni la résolution.

## Multiplane wave imaging increases signal-to-noise ratio in ultrafast ultrasound imaging

This content has been downloaded from IOPscience. Please scroll down to see the full text.

2015 Phys. Med. Biol. 60 8549

(<http://iopscience.iop.org/0031-9155/60/21/8549>)

View [the table of contents for this issue](#), or go to the [journal homepage](#) for more

Download details:

IP Address: 134.157.187.35

This content was downloaded on 18/01/2016 at 10:01

Please note that [terms and conditions apply](#).

# Multiplane wave imaging increases signal-to-noise ratio in ultrafast ultrasound imaging

Elodie Tiran<sup>1</sup>, Thomas Deffieux<sup>1</sup>, Mafalda Correia<sup>1</sup>,  
David Maresca<sup>1</sup>, Bruno-Felix Osmanski<sup>1</sup>, Lim-Anna Sieu<sup>2,3</sup>,  
Antoine Berge<sup>2,4</sup>, Ivan Cohen<sup>2</sup>, Mathieu Pernot<sup>1</sup> and  
Mickael Tanter<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ESPCI-ParisTech, PSL University, INSERM U979, CNRS UMR7587,  
Institut Langevin, 1 rue Jussieu, F-75005, Paris, France

<sup>2</sup> Neuroscience Paris Seine, University Pierre et Marie Curie UMCR18, INSERM  
U1130, CNRS UMR8246, 9 quai Saint Bernard, F-75005, Paris, France

<sup>3</sup> Institut des Neurosciences Translationnelles de Paris, Paris, France

<sup>4</sup> Ecole Doctorale Frontières du Vivant, Programme Bettencourt, Université Paris  
Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

E-mail: [mickael.tanter@espci.fr](mailto:mickael.tanter@espci.fr)

Received 30 June 2015, revised 8 September 2015

Accepted for publication 11 September 2015

Published 21 October 2015



CrossMark

## Abstract

Ultrafast imaging using plane or diverging waves has recently enabled new ultrasound imaging modes with improved sensitivity and very high frame rates. Some of these new imaging modalities include shear wave elastography, ultrafast Doppler, ultrafast contrast-enhanced imaging and functional ultrasound imaging. Even though ultrafast imaging already encounters clinical success, increasing even more its penetration depth and signal-to-noise ratio for dedicated applications would be valuable.

Ultrafast imaging relies on the coherent compounding of backscattered echoes resulting from successive tilted plane waves emissions; this produces high-resolution ultrasound images with a trade-off between final frame rate, contrast and resolution. In this work, we introduce multiplane wave imaging, a new method that strongly improves ultrafast images signal-to-noise ratio by virtually increasing the emission signal amplitude without compromising the frame rate. This method relies on the successive transmissions of multiple plane waves with differently coded amplitudes and emission angles in a single transmit event. Data from each single plane wave of increased amplitude can



Content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/). Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI.

then be obtained, by recombining the received data of successive events with the proper coefficients.

The benefits of multiplane wave for B-mode, shear wave elastography and ultrafast Doppler imaging are experimentally demonstrated. Multiplane wave with 4 plane waves emissions yields a  $5.8 \pm 0.5$  dB increase in signal-to-noise ratio and approximately 10 mm in penetration in a calibrated ultrasound phantom ( $0.7 \text{ d MHz}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). In shear wave elastography, the same multiplane wave configuration yields a  $2.07 \pm 0.05$  fold reduction of the particle velocity standard deviation and a two-fold reduction of the shear wave velocity maps standard deviation. In functional ultrasound imaging, the mapping of cerebral blood volume results in a 3 to 6 dB increase of the contrast-to-noise ratio in deep structures of the rodent brain.

Keywords: Ultrasound imaging, ultrafast imaging, signal-to-noise ratio, frame rate, B-mode, shear wave elastography, Doppler imaging

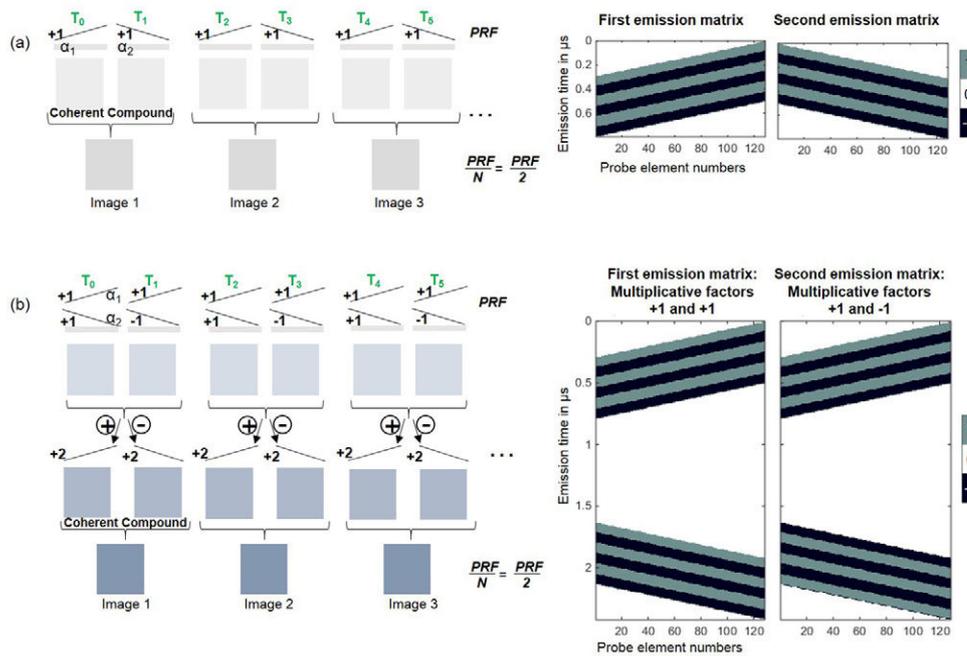
(Some figures may appear in colour only in the online journal)

## 1. Introduction

Ultrafast plane wave imaging was introduced in the last decade as a way to maximize ultrasound imaging frame rate, with the initial goal of tracking shear wave propagation within the body (Tanter *et al* 2008). In order to reach the highest frame rate, a single plane wave is transmitted instead of line-per-line focused beams. This allows imaging frame rates up to 10000 frames per second, depending only on the imaging depth. In this plane wave imaging approach there is no focalisation in transmission, but thanks to conventional beamforming in reception, the received data can be used to retrieve the localization of echoes. This lack of transmit focalization inevitably leads to poorer image quality, especially in terms of contrast, but ultrafast plane wave imaging still offered a new window on fast and transient phenomena.

Recently, our group developed a new way to improve the performance of ultrafast plane wave imaging by using coherent compounding of several tilted plane waves (Montaldo *et al* 2009, Bercoff *et al* 2011). By using appropriate time delays, the transmit focalization can be synthetically recreated in each pixel of the image thanks to the coherent summing of the backscattered echoes of a few plane waves transmitted with different angles. Such a coherent recombination was proposed in the framework of synthetic imaging for increased image quality (Karaman *et al* 1995, Lockwood *et al* 1998, Nikolov and Jensen 2003, Udesen *et al* 2008). Plane wave coherent compounding has been demonstrated to allow the realization of B-mode equivalent quality images as in the standard focused approach with only a third of the insonifications (Montaldo *et al* 2009), thus achieving both high quality and high frame rate, even in the case of very rapidly moving targets (Denarie *et al* 2013). A clear trade-off between high quality and high frame rate can be defined on the number of angles. This concept has then been applied to shear wave elastography and later to Doppler imaging (Bercoff *et al* 2011) and ultrafast diverging wave imaging (Papadacci *et al* 2014), and is now at the core of ultrafast imaging. The large number of current and potential future applications embraced by ultrafast ultrasound imaging (Tanter and Fink 2014) encourages the development of optimized sequences to improve the contrast, the signal-to-noise and the resolution of ultrafast images.

This paper investigates one of these improvements, as multiplane wave imaging is an ultrafast imaging technique based on coded coherent plane wave compounding that aims at



**Figure 1.** (a) Coherent plane wave compounding with  $N = 2$  plane waves. (b) Multiplane wave compounding with  $N = 2$  plane waves.

increasing the signal-to-noise ratio of ultrafast images without compromising neither frame rate nor resolution.

The multiplane wave method basic principles are detailed in section 2. Multiplane wave imaging performance is compared to the classical plane wave coherent compounding technique in section 3 in phantom B-mode acquisitions. Then multiplane wave imaging is also applied to shear wave elastography imaging and ultrafast Doppler imaging. We demonstrate how this novel imaging approach improves signal-to-noise ratio (SNR) and contrast of B-mode images, how it provides accurate elasticity maps with smaller variance for elastography applications, and how it detects deeper blood signals in Doppler mode. This technique could be of great interest for deep observations in the tissues where attenuation weakens the signal.

## 2. Multiplane wave imaging basic principles

A schematic representation of the classical coherent plane wave compounding method with  $N = 2$  plane waves is represented in figure 1(a) (left part). At time  $T_0$  the medium is insonified with a first plane wave tilted with an angle  $\alpha_1$  and the backscattered echoes are recorded. Then, at time  $T_1$ , the medium is insonified with a second plane wave tilted with an angle  $\alpha_2$  and the backscattered echoes are recorded. After delay-and-sum beamforming of the received data, two low quality radio frequency (RF) images are obtained. The coherent addition of these two images generates a higher quality image as described in Montaldo *et al* (2009). Each individual plane wave is transmitted with a fixed Pulse Repetition Frequency (PRF) which is limited by the propagation time, i.e. by the imaging depth. In the  $N = 2$  plane waves example, two images from two different plane waves are required to create a single final image; as a

result the final frame rate is half the PRF. More generally the final frame rate is equal to the PRF divided by the number of plane waves used in the coherent summation. Thus, the more plane waves are used for the final image, the better its quality but also the lower the frame rate. This highlights the conventional trade-off between image quality and frame rate of coherent plane wave compounding.

Multiplane wave imaging provides further improvement of the image signal-to-noise ratio for a given frame rate with an extremely simple mathematical and hardware implementation. The multiplane wave method improves the quality of final images by artificially increasing the amplitude of the transmit signal without compromising the frame rate. Indeed, the emitted waveform amplitude is often limited by ultrasound transducer electronic circuit characteristics, probe design or eventually by safety considerations such as Mechanical Index limits. Thus, as the amplitude is often already close to its maximum value, increasing the transmit amplitude is not directly possible.

The original solution proposed in this work is schematically represented in figure 1(b) (left part) in the case of  $N = 2$  plane waves. At transmit time  $T_0$ , two wavefronts tilted with two different angles  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  are quasi simultaneously transmitted into the medium with a very small interleaved delay  $dt$ . A multiplicative factor  $+1$  is applied on both wavefronts. The backscattered echoes are received and stored in memories. At transmit time  $T_1$ , the same wavefronts are transmitted again, but this time with multiplicative factors  $+1$  for the first wavefront and  $-1$  for the second one. Once again, the resulting echoes are received and stored in memories. At this step there are two RF images, one for each acquisition at times  $T_0$  and  $T_1$ . Then the two images are coherently summed: in a first combination, the contributions of angle  $\alpha_2$  disappear in the linear regime of propagation thanks to the multiplicative factors applied on the angle  $\alpha_2$  ( $(+1) + (-1) = 0$ ), whereas the contributions of angle  $\alpha_1$  are added ( $(+1) + (+1) = 2$ ). Thus the summation enables to obtain the same image as if only a single transmit, tilted with an angle  $\alpha_1$ , was sent with double amplitude. In a second combination, the subtraction of the two images makes the contributions of angle  $\alpha_1$  disappear ( $(+1) - (+1) = 0$ ) while contributions for angle  $\alpha_2$  add up ( $(+1) - (-1) = 2$ ). The subtraction enables to obtain the same image as if only a single transmit, this time tilted with an angle  $\alpha_2$ , was also sent with double amplitude. Finally, the time delay  $dt$  between the two tilted plane waves is compensated for, and the two resulting images are coherently summed to obtain the final image, as done in the coherent plane wave compounding method.

The time between two consecutive images is only limited by the propagation time in the medium. As a consequence, if this set of multiplane waves is sent with the same plane wave coherent compounding technique PRF, the final frame rate will also be equal to  $PRF/N$  (in this example  $PRF/2$ ). Thus, the multiplane approach leads to a virtual increase of the transmit signal amplitude without compromising the ultrafast frame rate.

In this multiplane wave example (figure 1(b)), since the emission matrix contains the two plane waves, its duration is at least twice longer (figures 1(a) and (b) right parts), resulting in a larger blind near field zone where the image cannot be reconstructed. Furthermore, a fixed pause approximately as long as the duration of the wavefront has been introduced between two plane waves to let transducers return to zero and avoid artefacts. Since the ultrasonic device cannot receive backscattered echoes until the emission is over, and as the emission matrix is longer in the multiplane wave case, the blind area on the surface of the image due to the emission duration is larger. The blind area is defined as  $d_{\text{blind}} \sim c \times t_{\text{em}}/2$ , with  $c$  the ultrasound celerity and  $t_{\text{em}}$  the emission duration. In this example (figures 1(a) and (b) right part) the classical coherent plane wave compounding method with  $\alpha = \pm 1^\circ$  gives  $d_{\text{blind}} \sim 1540 \times 0.8 \times 10^{-6}/2 \sim 0.6$  mm, whereas the  $N = 2$  multiplane wave case with same inclination ( $\alpha = \pm 1^\circ$ ) gives a larger blind area:  $d_{\text{blind}} \sim 1540 \times 2.4 \times 10^{-6}/2 \sim 1.8$  mm. The blind

area remains negligible for a small number of plane waves and for weak inclinations, but has to be taken into account in the case of a higher number of plane waves or higher inclinations. Fortunately, such a high number of plane waves will be mostly required for imaging deeper structures, relatively to the probe width.

The multiplane wave compounding method introduced with  $N = 2$  plane waves can be generalized to any values of  $N$ . An appropriate combination of multiplicative factors  $+1$  and  $-1$  has to be applied to each set of plane waves, in order to reconstruct each plane wave of the set as if it had been sent separately from the others. In this work, an Hadamard matrix has been used because it creates independent vectors with  $+1$  and  $-1$  components (i.e. without losing the maximum amplitude level for each transmission). Hadamard matrices have many applications in signal processing, coding or cryptography (Horadam 2007) and have already been applied to synthetic aperture imaging in Ultrasound (Chiao *et al* 1997, Mosca *et al* 2008). An Hadamard matrix is a square matrix with  $+1$  or  $-1$  coefficients and whose rows are mutually orthogonal. One of the interesting properties of these matrices is that the multiplication of  $H_N$  (Hadamard matrix of order  $N$ ) by its transpose is equal to  $N$  times the identity matrix:

$$H_N H_N^t = N.I.$$

This property is used for the multiplane wave emission matrix, in order to reconstruct each single plane wave separately. The order of an Hadamard matrix must be 1, 2 or a multiple of 4. The smallest Hadamard matrix is  $H_1 = [1]$ . The following ones, of order  $2^k$  (with  $2 \leq k \in N$ ), can be computed using Sylvester's construction (Sylvester 1867):

$$H_2^k = \begin{bmatrix} H_2^{k-1} & H_2^{k-1} \\ H_2^{k-1} & -H_2^{k-1} \end{bmatrix},$$

with  $H_2$  the Hadamard matrix of order 2,  $H_2 = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{bmatrix}$ . The column coefficients of  $H_N$  can be seen as the multiplicative factors used for the different emissions, whereas the row coefficients represent the combination of subtraction or addition operations needed to retrieve one plane wave individually with an amplitude  $N$  and cancel all the others (figure 2).

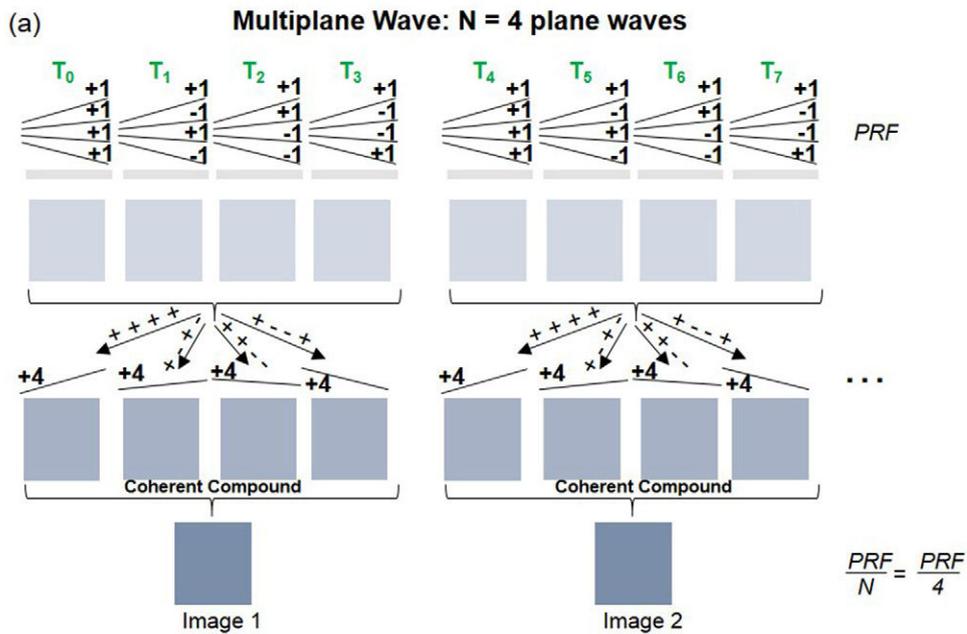
In this work, the Hadamard basis was used with  $N$  ranging from 2 to 32 plane waves.

The virtual increase of the emitted amplitude obtained by coherent summation is expected to result in an overall increase of the signal-to-noise ratio of the image. Assuming a white electronic noise in the acquisition boards, the time standard deviation of each pixel in the image should be divided by  $\sqrt{N}$ , ie a SNR gain of  $10 \cdot \log_{10}(N)$  on the energy. When electronic noise is dominant over side lobes and clutter, such as in deep structures, a significant increase of the contrast can be expected compared to coherent plane wave compounding. Similarly, the improvement of the signal-to-noise ratio has a direct impact on other imaging modalities based on ultrafast imaging, such as shear wave elastography or ultrafast Doppler imaging.

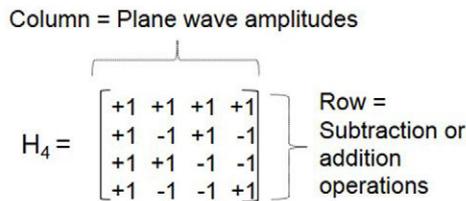
### 3. Results

#### 3.1. Performance quantification of B-mode imaging in phantom

The sequence was implemented on an Aixplorer<sup>TM</sup> ultrasound system (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) running Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). The performance was assessed both in terms of signal-to-noise ratio and in terms of contrast using an imaging phantom (Small parts phantom, model 551, ATS laboratories, Bridgeport, USA) of 3 mm diameter anechoic inclusions embedded in a homogeneous speckle environment. The



(b) **Use of Hadamard coefficients**



**Figure 2.** (a) Schematic representation of multiplane wave case with  $N = 4$  plane waves. (b) Example of Hadamard matrix with  $N = 4$ .

128 first elements of a 160-element array working at 6 MHz central frequency with a 0.2 mm pitch (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) were used and the receive bandwidth of the scanner was set at 90% using the on board finite impulse response (FIR) filter. One hundred frames were acquired both with coherent plane wave compounding and multiplane wave imaging.

In order to compare plane wave and multiplane wave image quality the SNR has been plotted as a function of depth. For each depth, the SNR has been averaged in the probe axis direction over a 10 pixels area containing inclusions. For each pixel, the ultrasonic signal has been computed as the mean over the 100 images and the noise as the standard deviation.

The performance was also assessed in terms of contrast. The contrast represents the ability of the imaging method to detect an anechoic object embedded in a homogeneous scattering medium. The contrast has been computed as follows:

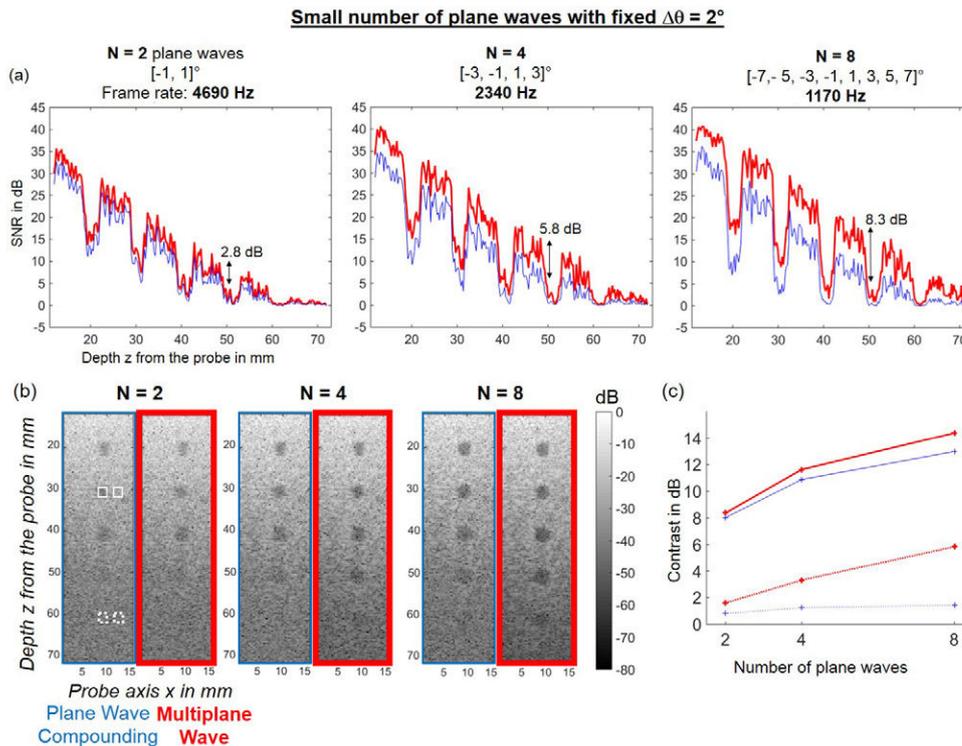
$$\text{Contrast} = 10 \cdot \log_{10} \frac{\int_{x,z \in D_{\text{out}}} |h(x,z)|^2 dx dz}{\int_{x,z \in D_{\text{in}}} |h(x,z)|^2 dx dz}.$$

The numerator represents the background signal. It is computed as the mean of the 100 images in the chosen region of interest (ROI) close to the inclusion ( $D_{\text{out}}$ ,  $10 \times 10$  pixels =  $2 \text{ mm} \times 2.4 \text{ mm}$  rectangle). The denominator represents the anechoic inclusion signal and is computed as the mean of the 100 images in the chosen ROI in the inclusion area ( $D_{\text{in}}$ , same size as  $D_{\text{out}}$ ).

SNR and contrast have been quantified for  $N$  ranging from 2 to 32 plane waves. In the case of a small number of plane waves, it is interesting to use a relatively high angular step  $\Delta\theta$  between two successive plane waves (in this case  $\Delta\theta = 2^\circ$ ). Such a value ensures a good decorrelation of the received signals in the compounding step even with a low number of plane waves. A small number of plane waves further achieves a very high frame rate. Thus, this strategy is typically employed for ultrafast imaging based modalities. In case where a large number of plane waves is preferred, in order to perform higher quality imaging at lower frame rate, this configuration will quickly yield angular values higher than the directivity of the probe. In the case of a very high number of plane waves it is thus better to use an alternative strategy where a fixed maximal angular aperture  $\theta_{\text{max}}$  is chosen within the probe directivity, and with a variable angular step  $\Delta\theta$  derived from the number of plane waves. In such a scenario, the frame rate is decreasing with the number of plane waves but quality is increasing.

**3.1.1. High frame rate configuration with small number of plane waves.** SNR graphs as a function of depth were plotted in figure 3(a) for  $N = 2, 4$  and 8 plane waves with a fixed  $\Delta\theta = 2^\circ$  between two successive plane waves. The blue thin curves represent the compound method and the red thick ones the multiplane method. Because of ultrasonic attenuation, the amplitude of the backscattered echoes decreases exponentially with depth, and as a result so does the recorded signal. On the contrary, noise mainly comes from electronics and can be assumed uniform in the image, whatever the depth. As a result the SNR, defined as the ratio between signal and noise, is decreasing exponentially with depth, as shown on all the SNR graphs in figure 3(a). The multiplane wave method always gives a better SNR than the compound method. Indeed, while the multiplane wave method emits  $N = 2, 4$  or 8 plane waves at the same time, the compound method only emits 1 plane wave per emission. As the reconstructed signal is expected to be  $N$  times higher with multiplane and as the electronic noise is equivalent, the theoretical gain is  $G_{\text{th}} = 10 \times \log_{10}(N_{\text{emissionMP}})$ ,  $N_{\text{emissionMP}}$  being the number of plane waves sent at each emission with the multiplane wave method. Gains of  $G_{\text{th}}(2) = 3$  dB,  $G_{\text{th}}(4) = 6$  dB and  $G_{\text{th}}(8) = 9$  dB can be assumed, which is consistent with the gains experimentally measured  $G_{\text{exp}}(2) = 2.8 \pm 0.4$  dB,  $G_{\text{exp}}(4) = 5.8 \pm 0.5$  dB, and  $G_{\text{exp}}(8) = 8.3 \pm 0.6$  dB. The multiplane wave imaging SNR improvement gets more visible with depth. While the blue curves—plane wave compounding method—are almost totally flat and equal to zero in the area of the 5th inclusion (around depth 60 mm), the last two red curves ( $N = 4$  and 8)—multiplane wave method—highlight the presence of the inclusion.

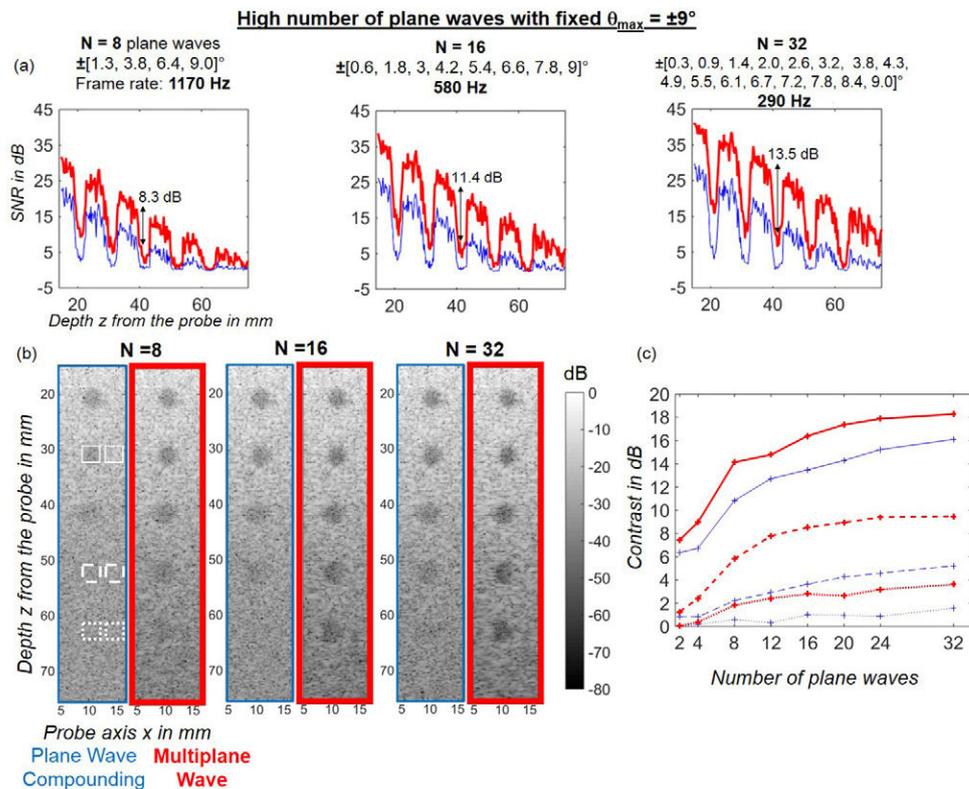
An improvement of image quality can clearly be seen in figure 3(b) where compound and multiplane wave images are compared side by side for the same number of plane waves. The multiplane wave method exhibits a visible improvement in deep areas. The deepest inclusion (around the depth 60 mm) emerges with the multiplane wave compound method using  $N = 4$  plane waves, it is clearly visible with  $N = 8$  plane waves, while it remains totally invisible with



**Figure 3.** Quantification in terms of SNR and contrast using a small number of plane waves: comparison between coherent plane wave compounding (blue thin line) and multiplane wave (red thick line) using  $N = 2, 4$  or  $8$  tilted plane waves with  $\Delta\theta = 2^\circ$ . (a) Signal-to-noise ratio as a function of depth computed on an area containing inclusions. Note the SNR increase obtained with multiplane wave for the last inclusions. Gains experimentally measured ( $G_{\text{exp}}(2) = 2.8 \pm 0.4$  dB,  $G_{\text{exp}}(4) = 5.8 \pm 0.5$  dB, and  $G_{\text{exp}}(8) = 8.3 \pm 0.6$  dB) are consistent with theoretical gains:  $G_{\text{th}} = 10 \times \log_{10}(N)$ , which corresponds respectively to 3 dB, 6 dB and 9 dB. (b) Corresponding B-mode images. (c) Contrast as a function of the number of plane waves used, for an inclusion close to the surface of the phantom (30 mm—solid line) and an inclusion deeper (60 mm—dotted line).

the coherent plane waves compound method, even with 8 plane waves. For both the methods, close to the surface the contrast improves when the number of plane waves increases. For the same number of plane waves - which also means the same frame rate—the contrast close to the surface increases slightly when using the multiplane wave method. These naked eye observations are confirmed with the graphs plotted in figure 3(c).

Two inclusions were investigated in figure 3(c): one close to the phantom surface (30 mm, framed with solid line) and another one deeper in the phantom (60 mm, framed with dotted line). The contrast of the inclusion closest to the surface is clearly improved by adding plane waves with both methods, yet the multiplane wave method only slightly improves contrast for the same amount of plane waves (figure 3(c) solid line). On the contrary, in deeper regions, the main factor improving contrast is the use of the multiplane wave method (figure 3(c) dotted line). With  $N = 8$  plane waves, the gain of multiplane wave versus compound method is 4 dB, whereas the use of 8 plane waves instead of 4 with classical compound method leads to almost no gain.



**Figure 4.** Quantification in terms of SNR and contrast for a high number of plane waves: comparison between coherent plane wave compounding (blue thin lines) and multiplane wave imaging (red thick lines). (a) SNR as a function of depth, computed on an area containing inclusions. (b) B-mode images using  $N = 8, 16$  or  $32$  tilted plane waves with a fixed  $\theta_{\max} = 9^\circ$ . The squares depict the localization of the inclusions used for contrast quantification in figure 4(c). (c) Contrast as a function of the number of plane waves used, for an inclusion close to the surface of the phantom (30 mm: solid line) and two inclusions deeper ( $\sim 50$  mm: dashed line and  $\sim 60$  mm: dotted line).

**3.1.2. High quality configuration with large number of plane waves.** In figure 4, the performance of plane wave compounding and multiplane wave imaging are compared, using a high number of plane waves (up to  $N = 32$  plane waves) with a fixed angular aperture.  $\theta_{\max}$  is set at  $9^\circ$ , which ensures an angular step  $\Delta\theta \geq 0.6^\circ$  (the lowest useful value according to equation (12) of Montaldo *et al* (2009) for this probe) even for  $N = 32$  plane waves. The blue thin curves represent the compound method and the red thick curves the multiplane method. Once again the SNR experimental gains  $G_{\text{exp}}(8) = 8.3 \pm 0.7$  dB,  $G_{\text{exp}}(16) = 11.4 \pm 0.7$  dB, and  $G_{\text{exp}}(32) = 13.5 \pm 0.6$  dB, are consistent with the theoretical gains  $G_{\text{th}}(8) = 9$  dB,  $G_{\text{th}}(16) = 12$  dB, and  $G_{\text{th}}(32) = 15$  dB, computed using  $G_{\text{th}} = 10 \times \log_{10}(N_{\text{emissionMP}})$ , as seen in figure 4(a). The B-mode images also highlight the improvement of the image quality in depth thanks to multiplane wave imaging (figure 4(b)). The inclusion around the depth 60 mm remains invisible with plane wave compounding imaging, even with  $N = 32$  plane waves, but is visible with multiplane wave imaging from  $N = 8$  plane waves. For a high number of plane waves, the angular step  $\Delta\theta$  becomes smaller, the plane waves are less decorrelated and the contrast starts to converge in figure 4(c).

Finally, for both small and large number of plane waves cases, the maximum achievable frame rate has been computed as  $F_{\text{rate}} = \frac{1}{N \times t_{B/F}}$  with  $t_{B/F}$  the back and forth time for the ultrasonic wave to reach the maximum imaging depth  $d_{\text{max}}$  ( $d_{\text{max}} = 80$  mm in these B-mode acquisitions) and  $N$  the number of plane waves. The values computed for  $N = 2, 4, 8$  and  $N = 8, 16, 32$  plane waves are respectively displayed in figures 3(a) and 4(a). Multiplane wave imaging has been previously introduced as a way to increase SNR without compromising frame rate but it can also be seen as a method to achieve a higher frame rate than plane wave compounding, with equivalent image quality.

As a conclusion, we experimentally confirmed here that the multiplane wave compound method performs better in terms of SNR and contrast, especially at depths where the electronic noise is the main factor of contrast loss. The use of the multiplane wave technique is of great help as it improves the image quality in terms of SNR but also in terms of contrast in deeper areas without decreasing the frame rate. In the following part, two modalities dedicated to applications that require a very high frame rate are presented: shear wave imaging (elastography) and ultrafast Doppler imaging. The benefits of the method will be investigated for both applications.

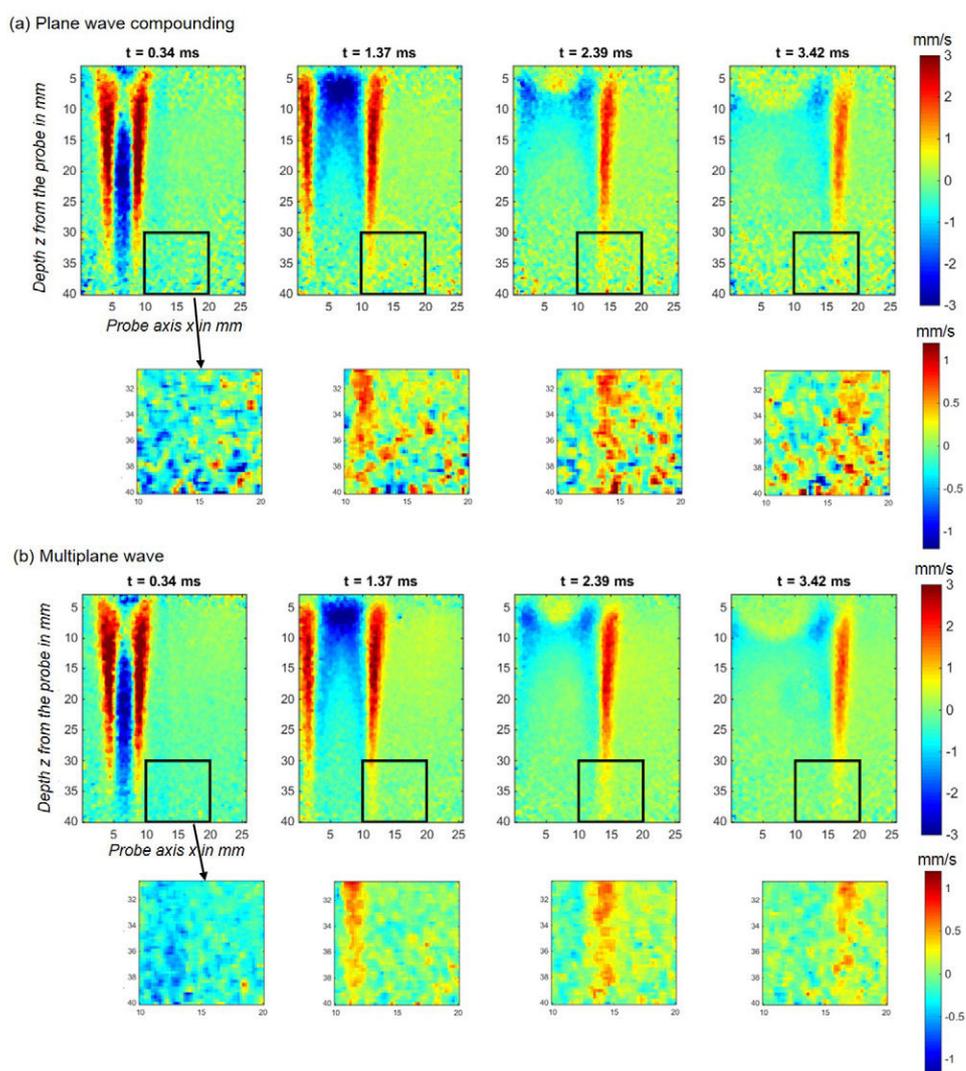
### 3.2. Shear wave imaging

In human soft tissues, low-frequency shear waves, typically 50 to 500 Hz, propagate at a very low speed ( $\sim 1$  to  $10$  m s<sup>-1</sup>). Shear wave elastography imaging consists in imaging the tissue displacement induced by the shear waves by using compressional ultrasonic waves propagating at a high speed, around  $1500$  m s<sup>-1</sup>. To observe the propagation of the shear wave, the frame rate must reach values typically higher than  $1000$  Hz. In this study, shear waves are generated by the acoustic radiation force of a  $150$   $\mu$ s ultrasonic focused beam using the Supersonic Shear Imaging technique (Tanter *et al* 2008). The sequence was implemented on an Aixplorer<sup>TM</sup> ultrasound system (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) running Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). The 128 first elements of a 160-element array working at 6 MHz central frequency with a 0.2 mm pitch (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) were used and the receive bandwidth of the scanner was set at 90% using the on board FIR filter.

The shear wave propagation induced in a breast phantom (breast elastography phantom model 059, CIRS, Norfolk, USA) was imaged using 4 plane waves ( $-3, -1, 1, 3^\circ$ ) with coherent plane wave compounding (figure 5(a)) or with multiplane wave imaging (figure 5(b)). In both cases the PRF was set at 11.7 kHz. After compounding, the echographic images were thus obtained at a 2.9 kHz frame rate.

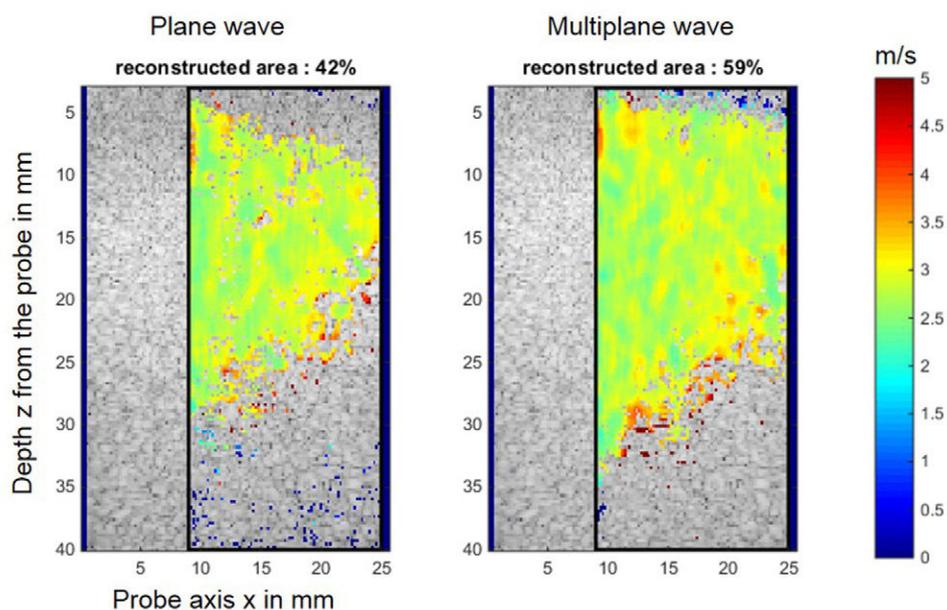
For both sequence, the time standard deviation of the particle velocity was quantified long after the shear wave propagation ( $N = 10$  images) and spatially averaged in the square ROI depicted in figure 5. Standard deviations of  $\sigma_{\text{PlaneWave}} = 0,329 \pm 0.004$  mm s<sup>-1</sup>, and  $\sigma_{\text{MultiplaneWave}} = 0,159 \pm 0.002$  mm s<sup>-1</sup> were measured (estimated over  $N_{\text{acq}} = 10$  acquisitions). As expected, the multiplane wave sequence with  $N = 4$  yields a two-fold reduction of the particle velocity time standard deviation ( $\sigma_{\text{PlaneWave}}/\sigma_{\text{MultiplaneWave}} = 2.07 \pm 0.05$ ). This value is consistent with the theory in the case of 4 plane waves emission. This reduction in noise thanks to multiplane wave imaging can be seen in the tissue velocity images displayed in figure 5, especially in depth, as shown in the square ROI depicted for the two methods.

Tissue velocity estimates directly impact the computation of shear wave velocity maps as recently shown by Deffieux *et al* (2012). The benefits in terms of standard deviation were quantified on several acquisitions. The extent of reconstructed area in the shear wave velocity



**Figure 5.** Shear wave imaging (elastography) on breast phantom using 4 angles ( $-3^\circ$ ,  $-1^\circ$ ,  $1^\circ$ ,  $3^\circ$ ) using (a) coherent plane wave compounding or (b) multiplane wave imaging.

map was also investigated. The local estimation of the shear wave velocity is done by using a simple time of flight algorithm (Tanter *et al* 2008). The time of flight  $\Delta t$  is estimated by a cross-correlation between the displacement time profile at location  $x$  and at location  $x + \Delta x$ . In this experiment,  $\Delta x$  has been set at 1.2 mm and the same acquisition has been repeated 10 times, for the two imaging methods. The average shear velocity maps obtained on a breast phantom using this algorithm are represented in figure 6. For each pixel of the image, the standard deviation over the 10 acquisitions has been estimated. Then, the shear velocity pixel was only drawn when the corresponding standard deviation was less than 20% of the mean shear velocity, which corresponds to  $0.4 \text{ m s}^{-1}$  in this experiment. ‘Reconstructed area’ denotes the area containing the pixels that are below the threshold. The background image is



**Figure 6.** Shear wave imaging (elastography) on a breast phantom using 4 angles ( $-3^\circ$ ,  $-1^\circ$ ,  $1^\circ$ ,  $3^\circ$ ). Comparison between coherent plane wave compound (left) and multiplane wave compound (right): average shear velocity map ( $N = 10$  acquisitions) superimposed over B-mode image. A threshold was put on the standard deviation to select the shear velocity pixels to draw ( $0.4 \text{ m s}^{-1}$ ). Using coherent plane wave compound 42% of the image in the black rectangular box is reconstructed, with multiplane wave the surface of reconstruction rises 59%.

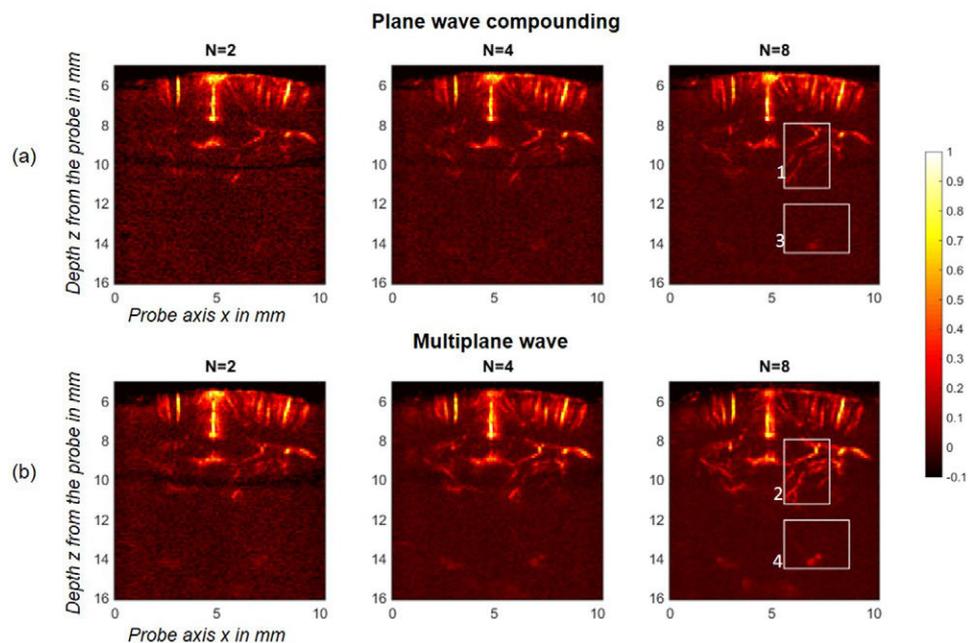
the B-mode image. By using coherent plane wave compound, 42% of the image in the black rectangular box is reconstructed, whereas with multiplane wave imaging the reconstructed area increases to 59%. Once again, the multiplane wave method enables deeper imaging than the coherent plane wave compounding method, thanks to the direct impact of the SNR on the estimation of shear wave velocity (Deffieux *et al* 2012).

The standard deviation of the shear wave velocity maps in the reconstructed area for the two sequences has been estimated using  $N = 10$  acquisitions. Standard deviations  $\sigma_{\text{PlaneWave}} = 0.15 \pm 0.09 \text{ m s}^{-1}$ , and  $\sigma_{\text{MultiplaneWave}} = 0.07 \pm 0.05 \text{ m s}^{-1}$ , were measured. As expected, the multiplane wave sequence with  $N = 4$  plane waves emission yields a halving of the shear wave velocity standard deviation in the reconstructed area. Once again, this value is consistent with the theory in the case of 4 plane waves emission since a decrease in the tissue velocity standard deviation also yields a decrease in shear wave velocity standard deviation (Deffieux *et al* 2012).

The multiplane wave approach leads to a strong improvement of the shear wave imaging accuracy: a noise reduction in the shear wave propagation movie induces a larger reconstruction of the shear velocity maps and a higher accuracy for the estimation of the local shear velocity.

### 3.3. *In vivo* ultrafast Doppler imaging

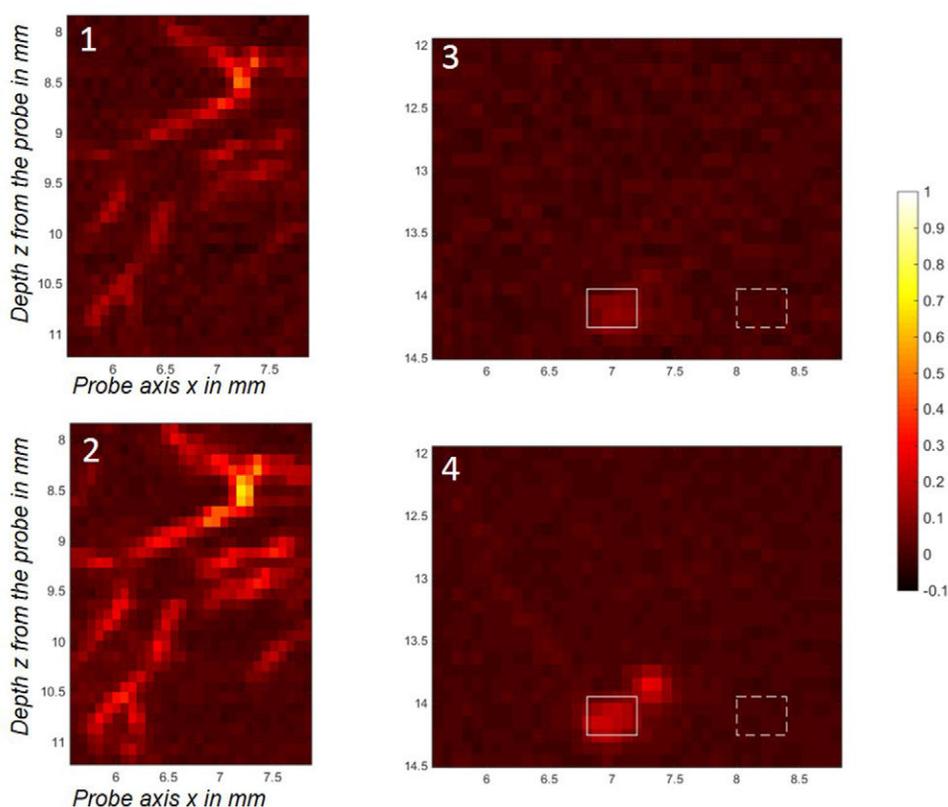
The multiplane wave imaging technique was applied to *in vivo* Ultrafast Doppler acquisitions of the living rat brain. Ultrafast Doppler imaging acquires samples simultaneously for all



**Figure 7.** *In vivo* ultrafast Doppler imaging on a rat brain: comparison between (a) coherent plane wave compounding and (b) multiplane wave imaging using  $N = 2, 4$  or  $8$  tilted plane waves:  $[-1\ 1]^\circ$ ,  $[-3\ -1\ 1\ 3]^\circ$ , and  $[-7\ -5\ -3\ -1\ 1\ 3\ 5\ 7]^\circ$ . Each image was normalized between its maximum value and its median background noise value ( $[0\ 1]$ ), the dynamic range was then set between  $-0.1$  and  $1$  in order to fully visualize the background noise dynamic. The four white rectangles are the areas zoomed and depicted in figure 8.

pixels in the image, whereas conventional Doppler successively focuses the beam along the transducer array to obtain the whole image (Bercoff *et al* 2011). Ultrafast Doppler acquisition relies on ultrafast frame rates, which means that typically for 1 s of acquisition, each pixel of the image contains 1000 temporal points. It has been shown that in the 16 plane waves coherent compounding case, this high frame rate enables a 30 times increase of the Doppler sensitivity compared to conventional Doppler (Mace *et al* 2013).

For this experiment the rat underwent a surgical thinning of the skull under anesthesia (Ketamine/Xylazine) to enable the propagation of ultrasound. It was then placed in a stereotaxic device and maintained under anesthesia (Ketamine/Medetomidine) during acquisition. The acquisitions were performed using a 15 MHz ultrasonic probe (128 elements, pitch 0.08 mm, Vermon, Tours, France) and an Aixplorer<sup>TM</sup> ultrasound system (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) running Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). The receive bandwidth of the scanner was again set at 90% using the on board FIR filter. The positioning was performed with a motor system controlled by Matlab. The two imaging methods were compared for  $N = 2, 4$  and  $8$  plane waves tilted with angles separated by  $2^\circ$ , corresponding to the following sets  $[-1\ 1]^\circ$ ,  $[-3\ -1\ 1\ 3]^\circ$ , and  $[-7\ -5\ -3\ -1\ 1\ 3\ 5\ 7]^\circ$ . The Pulse Repetition Frequency was set at 1600 Hz, 3200 Hz and 6400 Hz respectively, in order to achieve 800 Hz frame rate for the final Doppler images after recombination. This frame rate is sufficient to correctly sample axial blood flow speed up to  $4.1\text{ cm s}^{-1}$  without aliasing. Acquiring 200 frames in 0.4 s enables to capture 2 complete cardiac cycles. The Doppler images obtained by



**Figure 8.** Zoom in on the 4 areas depicted in figures 7(a) and (b) for  $N = 8$  planes waves case. Comparison between coherent plane wave compounding (up) and multiplane wave imaging (bottom) for vessels around 8.5 mm and 14 mm from the probe. The contrast to noise ratio has been calculated as  $CNR = (\overline{PW}_{\text{vessel}} - \overline{PW}_{\text{tissue}}) / \text{std}(PW_{\text{tissue}})$ , with  $\overline{PW}_{\text{vessel/tissue}}$  the mean value of the power Doppler in an area containing vessel (solid line) or tissue (dotted line), and  $\text{std}$  the standard deviation. CNR was estimated at  $-1.8$  dB,  $5.5$  dB and  $8.2$  dB for the plane wave Doppler image (respectively for 2, 4 and 8 plane waves) and  $3.9$  dB,  $8.5$  and  $14.0$  dB for the multiplane wave Doppler image (respectively for 2, 4 and 8 plane waves), showing a strong increase in detectability of the vessels in deep areas thanks to the multiplane sequence.

averaging over 200 frames are presented in figures 7(a) and (b) for the two ultrafast imaging techniques. For each set of plane waves, the multiplane wave method exhibits an improvement of the image compared to the coherent compound method: more vessels are visible, mostly in depth. The contrast-to-noise ratio (CNR) has been computed for vessels in a deep area (figure 8). The multiplane sequence leads to up to a 6 dB increase in detectability of the vessels in deep areas (around 14 mm from the probe) using  $N = 8$  plane waves.

This improvement could be of great interest in the particular case of deep organs Doppler imaging such as the kidney. The use of multiplane wave imaging could also be of great interest for functional ultrasound imaging to assess deep structures or to increase SNR in transcranial functional imaging. For example, deep functional areas in the rat brain such as substantia nigra, amygdala or hypothalamus usually suffer from a lack of detectability caused by their depth. Since these areas lie at a similar depth as the ROI in which we found a 6 dB increase

in CNR using 8 plane waves, we can expect a better signal-to-noise ratio for the functional activity of these areas thanks to multiplane wave imaging.

#### 4. Discussion

In this work, a new ultrasonic sequence was introduced for ultrafast imaging with improved SNR and improved contrast compared to conventional coherent compounding imaging. The sequence is based on the emission of multiple plane waves with different inclinations and different coded amplitudes within the same transmit event. A Hadamard matrix  $(-1, +1)$  was used to code the amplitude coefficients. By applying the appropriate coefficients on the received data, each data was reconstructed as if emitted by a single plane wave but with lower noise. The benefit of using an Hadamard matrix is twofold: first, it ensures the maximum amplitude level for each transmission. Second, the synthetic data recombination to retrieve the backscattered echoes for each plane wave is performed using extremely simple and robust operations (only additions and subtractions).

This sequence allows an increase of the SNR by a factor  $N$  and has successively been tested for  $N = 2, 4, 8, 16$  and  $32$  plane waves. This SNR increase translates into a better image contrast, especially in deep areas of the image where the loss of contrast is mostly governed by electronic noise rather than clutter. This is particularly interesting for high noise applications such as deep organs, highly attenuating media or hypoechogeneous tissue.

This SNR increase is beneficial not only for the B-mode contrast but also for shear wave experiments as tissue velocity estimation quality is directly linked to the acquisition SNR (Deffieux *et al* 2012). For  $N = 4$  emissions a halving of the tissue velocity standard deviation was observed.

A direct consequence of the SNR increase in the estimation of the tissue velocity field is a better estimation of shear wave velocity maps in shear wave elastography imaging. For  $N = 4$  emissions, a two-fold reduction of the standard deviation of the shear wave velocity maps was observed as predicted by theory (Deffieux *et al* 2012). This is particularly relevant for deep organs imaging and staging, such as liver fibrosis staging or liver cancer imaging, where the estimation accuracy is critical and where SNR can be poor because of the depth of the region of interest. Increasing the acquisition SNR decreases both the shear wave velocity standard deviation and its bias.

In the case of ultrasensitive Doppler, a high number of images increases the overall sensitivity (Mace *et al* 2013). Increasing the SNR by using multiplane wave imaging directly brings an additional sensitivity of the Doppler image and so enables the detection of new vessels in the brain. Together with better spatiotemporal clutter rejection as demonstrated recently in (Demene *et al* 2015), the multiplane sequence can further increase the sensitivity of ultrasensitive Doppler sequence. This will enable a better detection of small blood flow variation for functional ultrasound imaging (Mace *et al* 2013) and reduce the decorrelation artefacts caused by noise in functional connectivity imaging (Osmanski *et al* 2014).

The multiplane wave sequence with  $N$  emissions is equivalent, SNR wise, to averaging received data  $N$  times—sometimes denoted  $N$  buffers accumulation. However, for the same SNR, the benefit of the multiplane sequence is to not lower the final frame rate, which can be critical for imaging highly moving organs such as the heart, for quantifying the fast flow with ultrafast Doppler, or for making measurements in stiff tissue where shear waves propagate very fast. For a given frame rate and a given SNR, the multiplane sequence requires less reception buffers and as a consequence reduces the amount of transferred and processed data. Both approaches can be implemented directly on the acquisition board, using very

simple summations and subtractions prior to the data transfer to the main computer and beamforming.

The multiplane sequence is also equivalent in terms of SNR to a  $\sqrt{N}$  fold increase of the emitted amplitude of individual plane waves. However, increasing the emitted amplitude is not always possible due to pulser limitation, probe voltage limitation and also mechanical index (MI) limitation in some cases. For this reason, the sequence is promising for many applications where a high frame rate is needed and signal-to-noise ratio is limited. One such application is shear wave elastography of the liver where SNR is critical to obtain high accuracy of the shear wave velocity measurement for fibrosis staging and where high frame rate is required to avoid breathing artefacts. The sequence must then be adapted to a curved array for abdominal imaging. Another application requiring both high frame rate and high SNR is cardiac shear wave elastography (Papadacci *et al* 2014). For this purpose, the multiplane sequence can be adapted to the use of diverging waves instead of plane waves.

For an equivalent MI, the multiplane wave sequence gives a higher spatial peak temporal average Intensity (ISPTA) than conventional coherent compounding sequence. However, this ISPTA increase is not a limiting factor when the ultrafast frame rate is required during limited periods and not continuously. This is the case for shear wave elastography where ultrafast imaging is performed only during tens of milliseconds to produce a quantitative elasticity map. For such applications, the Food and Drug Administration (FDA) requirements for ISPTA limits the number of ultrafast bursts performed in one second. When the ISPTA is the limiting factor, the only advantage of the multiplane sequence is its higher frame rate.

For a given SNR, the multiplane sequence allows the use of lower pressure; as a result, it could be beneficial for applications where the MI is limited and where high frame rate is required, such as in ultrafast contrast imaging techniques relying on time-dependent microbubbles echoes in the fundamental mode (Couture *et al* 2009). It could also be useful for cornea or retina Doppler imaging or shear wave elastography for which FDA requirements limits the mechanical index to 0.23.

Compared to coded emissions such as chirp or Golay codes (Chiao and Thomas 2000, Misaridis and Jensen 2005a, 2005b, 2005c), the multiplane sequence enables higher frame rate with lower complexity. The coding is here performed both in space and time and the decoding operation is only made of extremely simple operations. On the contrary, chirp excitations require a more complex deconvolution process whose efficiency can be altered by the medium attenuation.

Contrarily to chirp excitations, no *a priori* on the insonified medium is required with multiplane wave, even though linearity of the propagation must be enforced. Indeed, in this paper, we assume that the cancellation  $(+1) + (-1) = 0$  is perfect, but non-linear propagation generates harmonic signals, that, if not filtered, will not cancel out in the combination step and will create range lobes, and ultimately reduce the image contrast. In our implementation, several steps have been made to filter out harmonic signals in the received data: emissions were made at the central frequency of the probes (6 and 15 MHz) and a 90% FIR bandwidth filter was applied at the reception. In such a configuration, the multiplane method is likely to work even in the presence of non-linearity.

Another possible limitation of the technique is fast motion, such as cardiac B-mode imaging where the cancellation of some waves might not be perfect due to phase coherence losses (Denarie *et al* 2013). In that case it might not be possible to use a large number of plane wave transmissions without additional motion correction steps. For a given number of plane waves and a given tissue velocity, the exact outcome of contrast decrease due to fast motion and of contrast enhancement due to lower noise is yet to be investigated.

The multiplane sequence relies on the amplitude encoding of plane waves instead of individual elements as in synthetic aperture. In this work, an Hadamard matrix was chosen and the different plane waves were encoded in amplitude ( $-1$  or  $+1$ ) with a small pause between them to avoid the superimposition of plane waves in the emission matrix. Superimposition of plane waves would allow shorter emission matrix and a reduction of the blind zone in the beginning of the image. However, the individual plane wave amplitudes would then have to be decreased to ensure that the superimposition amplitude remains below the maximum output amplitude of the scanner. Moreover, multiplane imaging will be mainly useful for deep imaging where a larger blind area caused by a long emission matrix is not a problem. However, it could be interesting to reduce the blind area by using more compact emissions matrix with appropriate plane waves superimposition in the particular case of high frequency imaging where attenuation can decrease the signal-to-noise ratio and where the probe driving voltage is generally much lower than the scanner maximum output.

## 5. Conclusion

In this work, a new ultrafast ultrasound imaging sequence based on multiple plane wave emission was proposed and validated. Multiplane wave imaging is a promising mode for ultrafast ultrasound imaging that allows the same high frame rates as coherent plane wave compounding, while significantly improving signal-to-noise ratio, without affecting spatial resolution. The improved signal-to-noise ratio directly impacts the contrast of B-mode images for deep structures where the electronic noise is predominant over clutter. It further significantly improves both the reconstruction and accuracy of shear wave velocity measurements and the overall quality of Power Doppler images. Multiplane wave imaging has the potential to further disrupt ultrafast based imaging modalities in many clinical applications especially for deep organs imaging.

## Acknowledgments

The research leading to these results has received the funding from the European Research Council under the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) / ERC grant agreement no 339244-FUSIMAGINE. This work was also partly supported by the Agence Nationale de la Recherche under the program 'Future Investments' with the reference Laboratory of Excellence ANR-10-LABX-24 LABEX WIFI within the French Program 'Investments for the Future' under reference ANR-10- IDEX-0001-02 PSL.

## References

- Bercoff J, Montaldo G, Loupas T, Savery D, Meziere F, Fink M and Tanter M 2011 Ultrafast compound Doppler imaging: providing full blood flow characterization *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **58** 134–47
- Chiao R Y and Thomas L J 2000 Synthetic transmit aperture imaging using orthogonal Golay coded excitation 2000 *IEEE Ultrasonics Symp.* vol 2 pp 1677–80
- Chiao R Y, Thomas L J and Silverstein S D 1997 Sparse array imaging with spatially-encoded transmits 1997 *IEEE Ultrasonics Symp. 1997 Proc.* vol 2 pp 1679–82
- Couture O, Bannouf S, Montaldo G, Aubry J-F, Fink M and Tanter M 2009 Ultrafast imaging of ultrasound contrast agents *Ultrasound Med. Biol.* **35** 1908–16
- Deffieux T, Gennisson J-L, Larrat B, Fink M and Tanter M 2012 The variance of quantitative estimates in shear wave imaging: theory and experiments *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **59** 2390–410

- Demene C et al 2015 Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast ultrasound data highly increases Doppler and ultrasound sensitivity *IEEE Trans. Med. Imag.* pp 1–1
- Denarie B, Tangen T A, Ekroll I K, Rolim N, Torp H, Bjastad T and Lovstakken L 2013 Coherent plane wave compounding for very high frame rate ultrasonography of rapidly moving targets *IEEE Trans. Med. Imag.* **32** 1265–76
- Horadam K J 2007 *Hadamard Matrices and Their Applications* (Princeton, NJ: Princeton University Press)
- Karaman M, Li P-C and O'Donnell M 1995 Synthetic aperture imaging for small scale systems *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **42** 429–42
- Lockwood G R, Talman J R and Brunke S S 1998 Real-time 3D ultrasound imaging using sparse synthetic aperture beamforming *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **45** 980–8
- Mace E, Montaldo G, Osmanski B, Cohen I, Fink M and Tanter M 2013 Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **60** 492–506
- Misaridis T and Jensen J A 2005a Use of modulated excitation signals in medical ultrasound: I. Basic concepts and expected benefits *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **52** 177–91
- Misaridis T and Jensen J A 2005b Use of modulated excitation signals in medical ultrasound: II. Design and performance for medical imaging applications *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **52** 192–207
- Misaridis T and Jensen J A 2005c Use of modulated excitation signals in medical ultrasound: III. High frame rate imaging *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **52** 208–19
- Montaldo G, Tanter M, Bercoff J, Benech N and Fink M 2009 Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **56** 489–506
- Mosca F, Nicolas J-M, Kopp L and Couade M 2008 Temporal approach of the synthetic aperture imaging using Hadamard matrix *J. Acoust. Soc. Am.* **123** 3083
- Nikolov S I and Jensen J A 2003 *In vivo* synthetic aperture flow imaging in medical ultrasound *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **50** 848–56
- Osmanski B-F, Pezet S, Ricobaraza A, Lenkei Z and Tanter M 2014 Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution *Nat. Commun.* **5** 5023
- Papadacci C, Pernot M, Couade M, Fink M and Tanter M 2014 High-contrast ultrafast imaging of the heart *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **61** 288–301
- Sylvester J J 1867 LX. Thoughts on inverse orthogonal matrices, simultaneous sign successions, and tessellated pavements in two or more colours, with applications to Newton's rule, ornamental tile-work, and the theory of numbers *Phil. Mag. Ser.* **4** 461–75
- Tanter M, Bercoff J, Athanasiou A, Deffieux T, Gennisson J-L, Montaldo G, Muller M, Tardivon A and Fink M 2008 Quantitative assessment of breast lesion viscoelasticity: initial clinical results using supersonic shear imaging *Ultrasound Med. Biol.* **34** 1373–86
- Tanter M and Fink M 2014 Ultrafast imaging in biomedical ultrasound *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **61** 102–19
- Udesen J, Gran F, Hansen K L, Jensen J A, Thomsen C and Nielsen M B 2008 High frame-rate blood vector velocity imaging using plane waves: simulations and preliminary experiments *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **55** 1729–43

## 6.3. Article : "4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography"

L'imagerie fUS permettait d'imager un seul plan du cerveau. J'ai montré qu'en scannant plusieurs plans, il était possible d'avoir accès à la majeure partie du système nerveux central, incluant le cortex, le thalamus et l'hippocampe. La tomographie par Doppler ultrarapide offre la perspective d'obtenir à la fois des informations anatomiques des vaisseaux et des informations hémodynamiques. La construction tomographique à partir d'une série d'images 2D conserve une bonne résolution dans le plan dans lequel les images ont été acquises, mais la résolution est moindre suivant l'axe perpendiculaire au plan d'imagerie. Pour améliorer cet aspect, une autre approche de scan tomographique a été réalisée. On a associé des translations et des rotations de la sonde, et on a amélioré l'intégration des signaux pour la reconstruction 3D. Cette dernière composante du traitement peut aussi bénéficier aux observations à partir d'une série de plans parallèles. La nouvelle technique ainsi mise au point est appelée la tomographie Doppler ultrarapide (*UltraFast Doppler Tomography*, UFD-T).

Cet article explique le principe d'acquisition. Pour illustrer la performance de cette approche, on présente le réseau vasculaire d'un cerveau de rat reconstruit avec une résolution isotrope en 20 min environ et l'évolution temporelle hémodynamique durant un cycle cardiaque.



Contents lists available at ScienceDirect

NeuroImage

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynimg](http://www.elsevier.com/locate/ynimg)

## 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography

Charlie Demené<sup>a,\*</sup>, Elodie Tiran<sup>a</sup>, Lim-Anna Sieu<sup>b</sup>, Antoine Bergel<sup>b</sup>, Jean Luc Gennisson<sup>a</sup>, Mathieu Pernot<sup>a</sup>, Thomas Deffieux<sup>a</sup>, Ivan Cohen<sup>b,1</sup>, Mickael Tanter<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Institut Langevin, ESPCI ParisTech, Paris Sorbonne Lettres Research University, CNRS UMR7587, INSERM U979, Paris, France

<sup>b</sup> Institut de Biologie Paris Seine, INSERM U1130, CNRS UMR8246, University Pierre & Marie Curie UMCR18, Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 July 2015

Accepted 4 November 2015

Available online xxx

#### Keywords:

Ultrasound imaging  
Blood flow  
Microvascular imaging  
Ultrafast Doppler  
3D rat brain  
Tomography  
Wiener filter

### ABSTRACT

4D ultrasound microvascular imaging was demonstrated by applying ultrafast Doppler tomography (UFD-T) to the imaging of brain hemodynamics in rodents. In vivo real-time imaging of the rat brain was performed using ultrasonic plane wave transmissions at very high frame rates (18,000 frames per second). Such ultrafast frame rates allow for highly sensitive and wide-field-of-view 2D Doppler imaging of blood vessels far beyond conventional ultrasonography. Voxel anisotropy ( $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ ) was corrected for by using a tomographic approach, which consisted of ultrafast acquisitions repeated for different imaging plane orientations over multiple cardiac cycles. UFD-T allows for 4D dynamic microvascular imaging of deep-seated vasculature (up to 20 mm) with a very high 4D resolution (respectively  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  and 10 ms) and high sensitivity to flow in small vessels ( $>1\ \text{mm/s}$ ) for a whole-brain imaging technique without requiring any contrast agent. 4D ultrasound microvascular imaging in vivo could become a valuable tool for the study of brain hemodynamics, such as cerebral flow autoregulation or vascular remodeling after ischemic stroke recovery, and, more generally, tumor vasculature response to therapeutic treatment.

© 2015 Published by Elsevier Inc.

### Introduction

#### Brain microvascular imaging

Both preclinical and clinical research on cardiovascular pathologies would strongly benefit from images that provide both anatomic and hemodynamic information with high spatial and temporal resolution deep into tissues. However, current in vivo methods for assessing vasculature and hemodynamic changes in small vessels are known to be suboptimal. Although microscopic computed tomography (micro-CT) and magnetic resonance imaging (MRI) are capable of detecting vessels as small as  $\sim 50\ \mu\text{m}$  with deep penetration, they remain limited by long scanning times and limited portability. In vivo acquisitions also suffer from supplementary limitations, mostly loss of resolution, control of the ionizing dose (CT) or the use of a contrast agent (Badea et al., 2008; Edelman, 1993). Moreover, their capability of assessing vascular hemodynamics remains very limited due to temporal resolutions that are much longer than a cardiac cycle. Without the use of a contrast agent, time-of-flight magnetic resonance angiography only enables the observation of the major vessels of small animal brains and requires several tens of minutes (Reese et al., 1999). Yet this technique allowed for the assessment

of the effect of an MCA occlusion (Beckmann et al., 1999) and the vascular variability among different strains of mice (Beckmann, 2000). In order to visualize smaller vessels, state-of-the-art MRI angiographic techniques use contrast agents, and studies have shown impressive examples of in vivo cerebral microvascular imaging in cats (scan time 35 min) (Bolan et al., 2006) and rats (scan time 76 min) (Lin et al., 2009) with resolutions of approximately a hundred microns. However, none of these contrast-enhanced MRI techniques enable time-resolved angiography: the most recent advances (Hadizadeh et al., 2014) achieved a temporal resolution on the order of one second in humans (Willinek et al., 2008), which is not sufficient to resolve blood dynamics within a cardiac cycle and is associated with a degraded spatial resolution (millimetric). Micro-CT enables higher resolution, i.e., up to a few tens of  $\mu\text{m}$  (Chugh et al., 2009). With a long-lasting contrast agent and careful control of the radiation dose, such resolution can be achieved in vivo, with the potential for use in longitudinal studies (Starosolski et al., 2015). However, MR or CT equipment is heavy and incompatible with awake and freely moving animal imaging. Furthermore, intravascular contrast agents could penetrate the brain tissue due to an impaired blood–brain barrier, for example after prolonged ischemia, and could affect brain function.

Among the most advanced techniques for cerebrovascular imaging, is near-infrared II fluorescence imaging (NIR-II) (Hong et al., 2012, 2014). Indeed, NIR-II is capable of accomplishing what is typically done by several traditional techniques, including micro-CT, ultrasonography and MRI, and incorporates many desirable features, such as high spatial resolution ( $\sim 30\ \mu\text{m}$ ) and fast acquisition ( $<200\ \text{ms}$ ), but

\* Corresponding author at: Institut Langevin, 1 rue Jussieu, 75238 Paris Cedex 05, France.

E-mail address: [charlie.demene@gmail.com](mailto:charlie.demene@gmail.com) (C. Demené).

<sup>1</sup> IC and MT are co-last authors.

unfortunately lacks tissue penetration (<1–3 mm). Compared to conventional ultrasonography, NIR-II imaging is capable of resolving both arterial and venous vessels anatomically and hemodynamically. Most importantly, NIR-II imaging can be used to acquire hemodynamic data in conditions of reduced flow, such as in arterioles or venules, far below the detection limit of conventional Doppler ultrasonography. Another very promising technique for similar applications is photoacoustic microscopy, in its acoustic resolution (AR-PAM) (Yao and Wang, 2014) and optical resolution (OR-PAM) (Yao et al., 2015) declinations. Both offer high resolution and discrimination between oxy and deoxy-hemoglobin, but their limited penetration (<3 mm) prevents their application to whole-brain imaging in rodents or large animal models. Due to its scanning strategies, improved temporal resolution is achieved at the cost of a reduced field of view, and the use of a pulsed laser source in conjunction with the ultrasound system limits the dissemination and portability of the technique. Finally, laser speckle imaging TOVI (Kalchenko et al., 2014) enables very high resolution (5  $\mu\text{m}$ ), but limited penetration depth (1 mm), which restricts it to cortical structures.

A representative and non-exhaustive panel of vascular imaging techniques used for cerebral imaging is given in Table 1. The ultrafast Doppler tomography (UFD-T) technique described in this study has also been included for comparison. This table highlights that UFD-T can occupy a particularly interesting position among preclinical cerebrovascular imaging techniques. On the left side of the table, whole-brain imaging techniques that provide 10 to several hundreds  $\mu\text{m}$  resolutions and real 3D capabilities, but rely on heavy and costly equipment, are shown. Imaging techniques on the right side of the table exhibit finer resolutions and increased portability, but lack a penetration depth sufficient for whole-brain imaging and real 3D capabilities. UFD-T stands in between, with a penetration depth enabling in vivo whole-brain imaging, a good spatial resolution, a very

high temporal resolution for dynamic imaging and equipment that is portable when compared to MRI, CT or an optical setup.

### 2D ultrafast ultrasound for vascular imaging

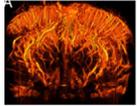
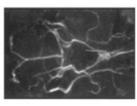
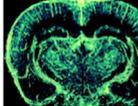
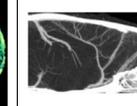
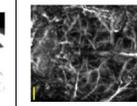
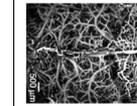
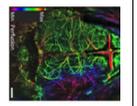
The recent advent of ultrafast ultrasound imaging (Tanter and Fink, 2014) led to the introduction of novel ultrasonic Doppler sequences based on plane wave transmissions (Bercoff et al., 2011) called ultrafast Doppler imaging. With the simultaneous acquisitions of echoes originating from a large field of view thousands of times per second, ultrafast Doppler imaging enables much higher sensitivity to small vessels than conventional Doppler, and allows for the measurement of flow velocities as low as 1 mm/s (compared to the typical 1–5 cm/s). Such an increase in sensitivity to slow flows, e.g. in small vessels, allowed for the imaging of the brain activity using *f*Ultrasound (by analogy to *f*MRI) in rodent models (Mace et al., 2013; Macé et al., 2011; Osmanski et al., 2014a, 2014b).

Although research into 3D acquisitions based on matrix probe technology is growing, ultrasound imaging remains today a 2D imaging technique with spatially anisotropic pixels, since the pixel dimension in the out-of-plane direction is typically 3 to 5 times larger than in the imaging plane: the in-plane resolution (the resolution linked to the transducer array aperture) is higher than in the transverse direction (the resolution linked to the acoustic lens focal width). For rodent brain imaging, it results in a typical  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$  resolution when using a 15-MHz linear array.

### Toward 3D: matrix arrays versus a mechanical scanning approach

3D ultrasound imaging can be based on two different acquisition modalities. Historically, the first one is based on a classical 1D array of

**Table 1**  
Review of the in vivo microvascular imaging techniques used for small animal cerebral monitoring. Note that only the first four columns can be considered to be whole-brain modalities. The last three columns cannot be considered to be 3D imaging techniques. \*UFD-T is invasive for the rat but could be performed through the skull for the mouse.

	Whole brain & in vivo							
In vivo imaging Modality	UFD-T	MRI (TOF)	MRI (contrast)	$\mu\text{CT}$ (low dose)	Photoacoustic (AR-PAM)	Photoacoustic (OR-PAM)	NIR-II	Laser speckle TOVI
Depth	Whole brain	Whole brain	Whole brain	Whole brain	3 mm	<1mm	3 mm	<1mm
Resolution	~100 $\mu\text{m}$	~mm	~100 $\mu\text{m}$	~40 $\mu\text{m}$	~50–100 $\mu\text{m}$	lateral 3 $\mu\text{m}$ axial 15 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$	~5 $\mu\text{m}$
Acquisition time	20 min	~5–30 min	76 min	50 min	unknown	1 s	0.2 s	4 s
Need for contrast agents	No	No	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes
In vivo	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Cost	€	€€€	€€€	€€	€€	€€	€	€
Non-Invasiveness	Skull removed or thinned*	Yes	Contrast injection	Contrast injection	Scalp removed (mice)	Scalp removed (mice)	Yes	Scalp removed
Portability	++	---	--	-	+	+	++	+
Example								
Reference	NA	(Beckmann et al., 1999)	(Lin et al., 2009)	(Starosolski et al., 2015)	(Yao and Wang, 2014)	(Yao et al., 2015)	(Hong et al., 2014)	(Kalchenko et al., 2014)

transducers capable of acquiring data in one 2D imaging plane and then translated along the transverse direction via a mechanical system to reconstruct a 3D volume (Downey and Fenster, 1995). It can be referred to as the mechanical scanning approach. The second modality is based on the technology of matrix arrays corresponding to 2D footprints of transducers: there is no need for a mechanical scan because addressing the 2D array of transducers with different electronic delays can mimic any position of the 1D array.

The focus dimensions constitute a fundamental difference between the two technologies. In the case of a 1D array, a good focus can be obtained in the imaging plane by applying delays to the recorded echoes. The size of the focal spot is typically of the order of the wavelength. However, in the elevation direction (out-of-plane direction), focusing is weak due to the small acoustical aperture in that direction, which results in anisotropic focalization properties in 3D. In the case of 2D matrix arrays, electronic delays can be applied along the two axes of the matrix and the focus spatial pitch becomes identical in all directions, hence resulting in isotropic voxels. On the other hand, 2D arrays are very expensive and require complex electronics, whereas 1D arrays are a widespread technology. As a first step toward 4D ultrafast Doppler imaging, the mechanical scanning approach was consequently more convenient to set up and for this reason was chosen for this study.

In this study, we propose an innovative imaging setup combining the high sensitivity of recently introduced ultrafast Doppler imaging and a novel tomographic strategy in order to perform 4D (three spatial dimensions and time) imaging of rodent whole-brain vasculature hemodynamics, with isotropic spatial voxels ( $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ) and an estimated  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  resolution. To recover an isotropic resolution, an original combination of rotations and translations was devised to ensure that spatial high-frequency information was available in every direction of the XY plane. All these acquisitions were then fused using a dedicated 3D Wiener deconvolution filter. We thus called this tomographic approach ultrafast Doppler tomography (UFD-T).

## Material and methods

### Ultrasonic acquisition sequence

Vascular images were obtained via the Ultrafast Compound Doppler Imaging technique (Bercoff et al., 2011). The electrocardiogram (ECG) of the rat was monitored and used to trigger the onset of each acquisition at the QRS segment of the ECG. Four hundred frames were acquired at a frame rate of 800 Hz for a total acquisition time of 0.5 s, thus ensuring the recording of several cardiac cycles (rodents generally have a 300 to 600 bpm cardiac frequency). Each frame was a Compound Plane Wave frame (Montaldo et al., 2009). In other words, it was built from the coherent summation of beamformed complex in-phase/quadrature images obtained from the successive insonification of the medium with plane waves tilted at specific angles. This compound plane wave imaging technique enables the re-creation, a posteriori, of a high-quality focus in the entire field of view with very few ultrasound emissions. Given the tradeoff between frame rate, resolution and imaging speed (images were beamformed and compounded on the fly to reduce the data size) of the whole volume, a frame consisted of eight compounded tilted plane waves separated by  $2^\circ$ . In order to discriminate blood signals from tissue clutter, the 400 Ultrafast Compound Doppler frame stacks were filtered using a dedicated spatiotemporal filter (Demene et al., 2015). This spatiotemporal filter used a singular value decomposition of the ultrasonic data to remove the tissue signal. Due to higher energy and higher spatial coherence, tissue signal was concentrated in the first pairs of temporal and spatial singular vectors. Therefore, by removing the first 60 singular values (a number based on experience) from the original signal, very efficient discrimination between tissue and blood signal was achieved and only the signal

originating from the blood scatterers  $c_\theta(x', y', z', t)$  was kept. The energy of this filtered in-phase/quadrature frame stack  $c_\theta(x', y', z', t)$  was then computed in each pixel to build the Power Doppler Image  $s_\theta(x', y', z')$ .

$$s_\theta(x', y', z') = \int c_\theta(x', y', z', t)^2 dt \quad (1)$$

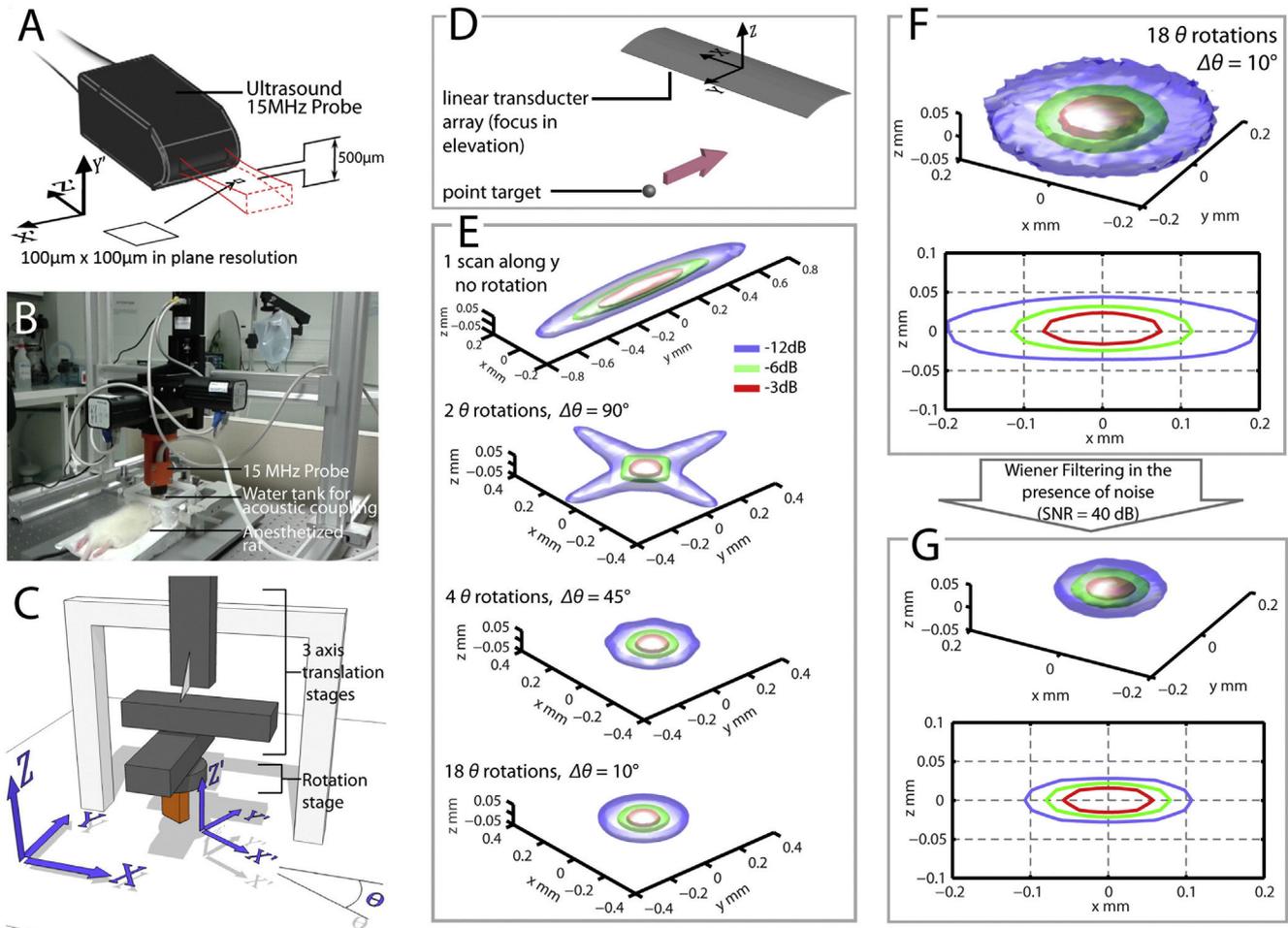
### Experimental setup

A 15-MHz probe (128 elements) with a 0.1-mm pitch was used in this study and enabled a typical  $100 \times 100\text{-}\mu\text{m}$  resolution in the imaging plane. This probe was fitted with an acoustic lens with an elevation focal distance of 8 mm and an elevation focal width of  $500 \mu\text{m}$  (Fig. 1A). This elevation focusing was achieved using an acoustic plastic curved lens located in front of the piezoelectric elements. It was mounted on a motorized setup enabling three degrees of translation (Physik Instrumente (PI) translation stage VT-80,  $0.8\text{-}\mu\text{m}$  one-directional repeatability,  $\pm 10\text{-}\mu\text{m}$  bi-directional repeatability) and one degree of rotation (PI rotation stage DT-80,  $0.01^\circ$  one-directional repeatability,  $\pm 0.2^\circ$  bi-directional repeatability). This setup enabled the acquisition of any vertical (i.e., containing the z-axis) (Figs. 1B and C) imaging planes. For a given orientation  $\theta$  of the probe, a volume was acquired by translating the probe in steps of  $200 \mu\text{m}$ . Then the probe was rotated along  $\theta$  with  $10^\circ$  steps (see the Simulation of the 3D Point Spread Function section). For example, to acquire a volume of  $12.8 \times 12.8 \times 20 \text{ mm}$ , 18 orientations  $\theta$  of the probe were used and for each orientation  $\theta$ , 65 translation/imaging steps were performed.

### Simulation of the 3D point spread function

In order to evaluate the efficiency of rotating the probe to reconstruct a volume with isotropic resolution, a simulation study was conducted using Field II (Jensen, 1996; Jensen and Svendsen, 1992) to estimate the 3D Point Spread Function (PSF) of the UFD-T imaging system. It is important for the understanding of the reader to precisely define the significance of “the UFD-T imaging system”: it is the combination of plane wave ultrasound propagation, RF data beamforming, power Doppler calculations and mechanical translations. Consequently, to estimate the 3D PSF, we computed the backscattered ultrasound signal originating from a point source, beamformed the simulated RF data, and computed the magnitude of the resulting image (since the Power Doppler image is linked to the energy of the signal). This process was then repeated when moving the point source according to the mechanical translations, resulting in a 3D volume. This 3D volume was rotated along  $\theta$  to build a final average volume, the latter being equal to the 3D PSF. Specifically, a 128-element focused linear array with the same technical characteristics as the ones detailed in the Experimental setup section was modeled in Field II. A point target was translated in the ultrasonic field from  $y = -1.4 \text{ mm}$  to  $y = 1.4 \text{ mm}$  with a  $y$  step of  $0.2 \text{ mm}$  (Fig. 1D), at  $x = 0$  and  $z = 12.8 \text{ mm}$  (corresponding aperture = 1), ( $x = 0, y = 0, z = 0$ ) being the geometric center of the transducer array. This gave the 3D PSF of an imaging system that would use only the translation and not the rotation around  $\theta$  (first 3D PSF of Fig. 1E), and, as expected, the  $-3 \text{ dB}$  width and  $-6 \text{ dB}$  width in the  $y$  dimension were  $560 \mu\text{m}$  and  $800 \mu\text{m}$ , respectively.

In order to evaluate the isotropy of the focal spot in the XY plane of the PSF when using the rotation along theta, the simulated volume was rotated around the z axis using different step sizes and averaged. As shown in Fig. 1E, two orthogonal orientations are not sufficient to recover the in-plane resolution, and even  $45^\circ$  rotation steps resulted in a PSF with preferred directions. The chosen volume reconstruction with  $10^\circ$  rotation steps is depicted in the bottom image: by averaging 18 volumes, an isotropic PSF was recovered and its  $-3 \text{ dB}$  width ( $150 \mu\text{m}$ ) ( $230\text{-}\mu\text{m}$   $-6 \text{ dB}$ -width) was improved when compared to what was obtained with only one scan in the elevation direction



**Fig. 1.** A. 1D linear array used for ultrafast Doppler imaging. When using a 15-MHz transmit frequency, the in-plane resolution is  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  and the out-of-plane resolution is  $\sim 500\ \mu\text{m}$ . B. Experimental 4D ultrasound angiography setup for rodent brain imaging. C. Schematic of the motorized axis: the 1D linear array was mounted on 3 translation axes and 1 rotation axis. The lab frame coordinates are  $(x,y,z)$  and the local frame coordinates of the imaging plane are  $(x',y',z')$ . D. Simulation of the 3D Point Spread Function (PSF) of the UFD-T system: using the software Field II, a linear transducer array mimicking our 15-MHz probe was designed and a point target was translated in the ultrasonic field along the  $y$  dimension. E. Evolution of the 3D PSF when rotating the probe along theta and averaging the translation PSFs: the 3 isosurfaces corresponding to  $-12\ \text{dB}$ ,  $-6\ \text{dB}$  and  $-3\ \text{dB}$  are depicted in 3D and perspective. The first one corresponds to one mechanical scan along  $y$ . The second one corresponds to the averaging of two scans along orthogonal directions, the third one to four directions of translation, and the last one to 18 directions of translation. F. 3D PSF for a reconstruction using 18 rotations  $10^\circ$  apart and corrupted by noise ( $\text{SNR} = 40\ \text{dB}$ ). The  $-3\ \text{dB}$  width and  $-6\ \text{dB}$  width of the isotropic PSF were  $150\ \mu\text{m}$  and  $230\ \mu\text{m}$ , respectively. G. Using the Wiener filter tuned with the known amplitude of the noise, this 3D PSF is reduced to a  $90\ \mu\text{m} - 3\ \text{dB}$  width ( $135\ \mu\text{m}$  for the  $-6\ \text{dB}$  width), which is comparable to the native in-plane resolution.

( $560\text{-}\mu\text{m} - 3\ \text{dB}$ -width). However, this was still lower than the in-plane resolution ( $93\text{-}\mu\text{m} - 3\ \text{dB}$  width). A Wiener deconvolution filter in the Fourier domain was designed to recover this exact resolution in 3D and the result of this filter is presented in Figs. 1F and G.

*Deconvolution filter*

As presented in the previous section, the issue of recovering the resolution after averaging the volumes associated with different rotation angles is a problem of deconvolution. In other words, we have assessed with our simulation how a point source is transformed into a wide 3D volume by the UFD-T imaging system, and now we want to cancel this widening to obtain a 3D volume as close as possible to the real data (i.e., the real 3D spatial arrangement of blood in the imaged area). Deconvolution is a standard problem in image processing and is usually performed using a Wiener filter.

In this theoretical explanation, lowercase letters represent variables in the direct space  $(x,y,z)$ , uppercase letters represent their Fourier transform in the  $k$ -space  $(k_x,k_y,k_z)$ , and bold uppercase letters represent their energy spectrum in the  $k$ -space. Our problem can be expressed as:

$$s(x,y,z) = psf(x,y,z) * e(x,y,z) + n(x,y,z) \tag{2}$$

where  $s(x,y,z)$  is the 3D volume acquired by UFD-T (i.e., the observation),  $psf(x,y,z)$  is the PSF described in the simulation section and displayed in Fig. 1E,  $e(x,y,z)$  is the distribution of blood scatterers in the imaged volume,  $n(x,y,z)$  is Gaussian white noise and  $*$  stands for convolution.

The optimal deconvolution in the presence of known noise was demonstrated by Wiener (1964) and consists of finding the filter  $W(k_x,k_y,k_z)$  that minimizes the mean squared error in the Fourier domain between the estimator  $\hat{E}(k_x, k_y, k_z) = W(k_x, k_y, k_z) \cdot S(k_x, k_y, k_z)$  and the input signal  $E(k_x, k_y, k_z)$ . The general form of the Wiener filter is given by:

$$W(k_x, k_y, k_z) = \frac{1}{PSF(k_x, k_y, k_z)} \cdot \frac{PSF(k_x, k_y, k_z) \cdot E(k_x, k_y, k_z)}{PSF(k_x, k_y, k_z) \cdot E(k_x, k_y, k_z) + N(k_x, k_y, k_z)} \tag{3}$$

The implementation of this filter required approximations, as certain quantities are not known a priori.  $N(k_x,k_y,k_z)$  was assumed to be the spectrum of Gaussian white noise and was estimated by computing the variance  $\sigma^2$  of the noise in the 3D observation volume, which was easily done in an area without blood.  $PSF(k_x, k_y, k_z) \cdot E(k_x, k_y, k_z)$  can

then be approximated by  $\mathbf{S}(k_x, k_y, k_z) - \sigma^2$ . Therefore the implemented Wiener filter can be expressed as:

$$\hat{W}(k_x, k_y, k_z) = \frac{1}{\text{PSF}(k_x, k_y, k_z)} \cdot \frac{\mathbf{S}(k_x, k_y, k_z) - \sigma^2}{\mathbf{S}(k_x, k_y, k_z)}. \quad (4)$$

The quantity  $\text{PSF}(k_x, k_y, k_z)$  used in this implementation is equal to the Fourier transform of the simulated PSF. The filtered UFD-T volume was ultimately computed as follows:

$$\hat{e}(x, y, z) = \text{TF}^{-1} \left[ \hat{W}(k_x, k_y, k_z) \cdot \mathbf{S}(k_x, k_y, k_z) \right]. \quad (5)$$

### Theoretical resolution

The improvement brought by the Wiener filtering process was quantified in order to determine the resolution of our technique. The key value for such a quantification is the SNR of UFD-T, which was evaluated to be 40 dB based on our experimental data. This very high value was due to the fact that noise averaging was present at several levels in the acquisition process: in the ultrafast power Doppler computation itself (averaging of 400 frames) and in the combination of the different angles (averaging of 18 angles). The result is a very low noise level, which in turn led to a very good performance of the Wiener filter. The Wiener filter offers a tradeoff between compression (in theory, in the absence of noise, the PSF could be shrunk to a spatial Dirac by the inverse filter) and distortion (in the presence of noise, the Wiener filter weighs the inverse filter based on the SNR). To compute the theoretical resolution, the simulated PSF was corrupted by Gaussian white noise in which the amplitude of the noise was 0.01 and the PSF amplitude was equal to 1 (Fig. 1F). Then the Wiener filter was applied. Fig. 1G shows a 90- $\mu\text{m}$  – 3 dB width and a 135- $\mu\text{m}$  – 6 dB width after Wiener filtering, which corresponds to the final resolution.

### Animal preparation

All animals received humane care in compliance with the European Communities Council Directive of 2008 (2008/0211), and the study was approved by the institutional and regional committees for animal care. Adult Sprague Dawley rats aged 4–6 weeks underwent surgical craniotomy and implant of ultrasound-clear plastic prosthesis. Anesthesia was induced with 2% isoflurane and maintained by ketamine/xylazine (80/10 mg/kg), while body temperature was maintained at 36 °C with a heating blanket (Bioseb, France). A sagittal skin incision was performed across the posterior part of the head to expose the skull. Parietal bones were removed by drilling rectangular flaps and gently moving the bone away from the dura mater. Half of the frontal bone was similarly removed, thus exposing the cortex comprised between the olfactory bulb and the cerebellum, from Bregma +2 to Bregma –8 mm, with a maximal width of 14 mm. A plastic sheet of polymethylpentene was sealed in place with acrylic resin (GC Unifast TRAD) and residual space was filled with saline. We chose to open a large window in order to observe the whole neocortex and underlying structures. The choice to perform a large craniotomy rather than a thinned skull approach as performed in Osmanski et al. (2014b) was made to provide the best possible imaging conditions for 4D brain atlas acquisition. This type of surgery enabled cerebral imaging in the same rat for an extended experimental period of several months. Particular care was taken not to tear the dura in order to prevent cerebral damage. Animals recovered quickly, and after a conservative one-week rest period they were used for ultrasound data acquisition. In recording sessions, rats were anesthetized with isoflurane and ketamine/xylazine, with the head fixed in a stereotaxic frame and body temperature kept constant.

### Data processing

Eighteen volumes with a rotation step size of 10° were acquired in vivo in a rat brain with the UFD-T system. Each volume was made of 65 Power Doppler (PW) images obtained as described in the Ultrasonic acquisition sequence subsection. Those volumes were interpolated to achieve an isotropic 50- $\mu\text{m}$ -wide voxel  $s_\theta(x', y', z')$ . Each volume was rotated around the Oz axis to recast all the data in the lab frame coordinates  $(x, y, z)$ :

$$s_\theta(x, y, z) = \text{ROT}_{xOy} \cdot s_\theta(x', y', z'). \quad (6)$$

Due to the lack of information concerning the precision of assembly of the transducer array in the plastic body of the probe, we could not be sure that the geometric center of the array coincided with the geometric center of the plastic body, and therefore with the geometric center of the rotation. The consequence of such misalignment was an apparent circular shift of the imaged structures in the xOy plane for the different angles  $\theta$ . This was taken into account by calculating the correlation in the xOy plane for each depth of a volume  $s_\theta$  with the reference volume  $s_\theta = 0^\circ$  and the median x lag  $\hat{x}_\theta^0$  and y lag  $\hat{y}_\theta^0$  for each angle theta.

The set of points  $(\hat{x}_\theta^0, \hat{y}_\theta^0)$  was then fitted on a circle using the Kasa method (Kasa, 1976) to take into account the a priori knowledge that the shift was circular and to smooth possible errors induced by the 2D correlation.

$$(\hat{x}_\theta^0, \hat{y}_\theta^0) \xrightarrow{\text{circle fit}} (\hat{x}_\theta^0, \hat{y}_\theta^0) \quad (7)$$

In the end the eighteen volumes were registered and summed to give

$$s(x, y, z) = \sum_{i=-9}^8 s_{\theta=i \cdot 10^\circ} (x - \hat{x}_\theta^0, y - \hat{y}_\theta^0, z) \quad (8)$$

$s(k_x, k_y, k_z)$  was then computed after a Tukey-window apodization of  $s(x, y, z)$ , onto which the deconvolution filter was applied to produce the final UFD-T volume  $\hat{e}(x, y, z)$ . Direct volume rendering of  $\hat{e}$  was performed using Amira® (Visualization Sciences Group, FEI).

### Spectral processing and blood speed profile calculation

If we consider the raw complex valued data  $c_\theta(x', y', z', t)$  before the PW Doppler calculation, in each imaging plane a time/frequency description (spectrogram) of this signal can be calculated as:

$$S_\theta(x', y', z', f, t_0) = \left| \int_{t_0}^{t_0+t_w} c_\theta(x', y', z', t) \cdot e^{-j2\pi f t} \cdot H\left(t - \left(t_0 + \frac{t_w}{2}\right)\right) \cdot dt \right|^2 \quad (9)$$

In this equation  $t_w$  is the temporal length of the Hann window  $H$  used to compute the Fourier transform. This calculation was used to compute the spectrograms in Fig. 8.

### Speed selection before PW Doppler calculation

After SVD filtering of raw data acquisitions, we could optionally apply several band-pass frequency filters (6th order Butterworth band-pass filter), each giving access to maps of blood flow in different velocity ranges. Afterward, the filtering PW Doppler calculations were conducted. As each frequency bandwidth corresponded to a different range of blood-flow velocities (Bonnefous and Pesqué, 1986), it provided interesting insight into the spatial organization of different kinds of vessels (high flow in large arteries and low flow in arterioles and venules). This separation based on the blood speed is presented in Fig. 8E.

### Power Doppler 4D imaging

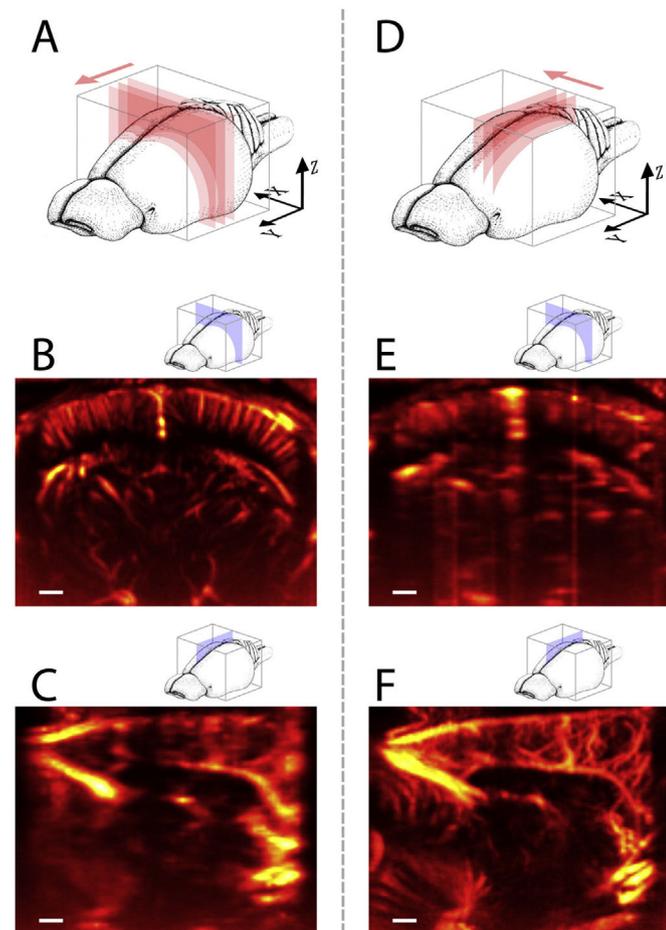
The following concerns only Supplementary Video 2. After spatiotemporal filtering, a 6th order Butterworth temporal high-pass filter was used to select only the energy of red blood cells moving faster than 1 cm/s. In so doing, a marked change in PW Doppler level was obtained during systole and diastole. For each acquisition, the successive cardiac cycles were registered and averaged to obtain the PW Doppler temporal dynamics during one cardiac cycle. This created PW Doppler 3D volumes evolving over time. These 3D power Doppler volumes were individually filtered using the Wiener deconvolution filter, resulting in a 3D PW Doppler that evolved with time, with isotropic spatial resolution of 100  $\mu\text{m}$  and a temporal resolution of 10 ms. This 4D volume is presented in Supplementary Video 2.

### Result

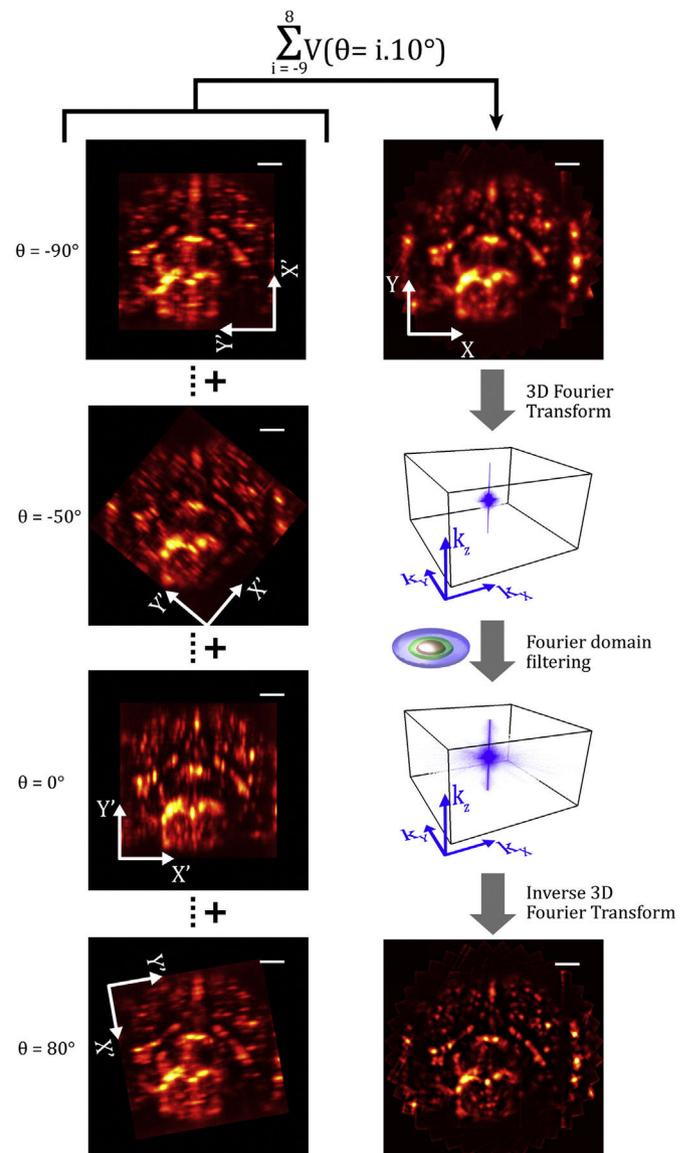
#### Ultrafast Doppler imaging alone yields high but anisotropic spatial resolution

The concrete limitation of a simple 2D UFD acquisition in terms of the resolution in elevation is presented in Fig. 2, which depicts central images of two volumes that were acquired with two orthogonal translation directions and in which the vascular network of a rat brain in vivo is

visible. In both cases the resolution in the imaging plane is high, but the resolution in the direction of the mechanical translation is deteriorated by the probe's low resolution in elevation (see Material and Methods section). In the case of acquisitions in the coronal XZ plane (Fig. 2A), small cortical arteries or deep ventral thalamic arteries could be observed in the coronal section (Fig. 2B), but resolution was highly deteriorated when the acquisition volume was observed in sagittal sections (Fig. 2C): the only vessels that were clearly discernible were the azygos pericallosal artery and the superior sagittal and straight sinuses. On the contrary, when the acquisition in the parasagittal YZ planes (Fig. 2D) was observed in sagittal sections of the volume (Fig. 2F), very small and deep vascular structures such as the median mesencephalic arteries or the dorsal periaqueductal arteries were observed, whereas almost nothing was distinguishable in coronal sections of the volume (Fig. 2E).



**Fig. 2.** Influence of the limited out-of-plane resolution. Scale bars: 1 mm. A. Acquisitions (pink rectangles) were performed as XZ coronal sections and the mechanical translation was conducted along the Y axis. B. 2D coronal image (blue rectangle) of the cerebral vasculature in the volume acquired in A: radial cortical vessels are precisely delineated, as well as deeper blood vessels in the hippocampus or thalamus. C. 2D sagittal image of the cerebral vasculature in the volume acquired in A: except for very large vessels, such as the venous sinuses or the pericallosal artery, the resolution of blood vessels is completely lost. D. Acquisitions (pink rectangles) were performed as YZ parasagittal sections and the mechanical translation was conducted along the X axis. E. 2D coronal image (blue rectangle) of the cerebral vasculature in the volume acquired in D: complete loss of resolution. F. 2D sagittal image of the cerebral vasculature in the volume acquired in D.



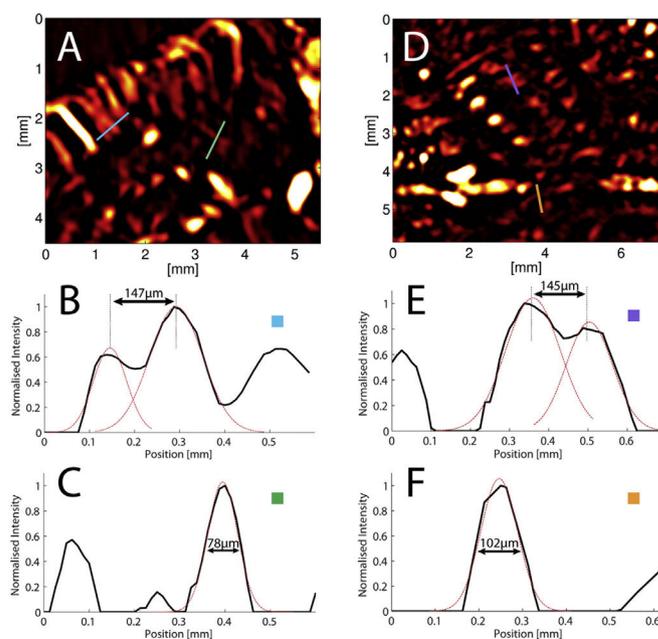
**Fig. 3.** Schematic representation of the acquisition and filtering process. Images on the left represent an XY transverse section of each raw volume  $s_0(x, y, z)$ . On the right, the raw summation of all the acquisitions performed at different angles (top), its 3D Fourier transform and the Fourier filtering process (middle) taking the 3D PSF into account, and the final result with improved resolution (bottom), are shown. Scale bar: 2 mm.

### High 3D isotropic spatial resolution using ultrafast Doppler tomography and the Wiener reconstruction

Raw data examples from one rat brain, displayed in transverse XY sections, are shown in Fig. 3: before summation, each volume  $s_{\theta}(x,y,z)$  (see Material and methods section) was rotated back into the lab frame coordinates  $(x,y,z)$ . Those transverse sections therefore represented the same vascular structures observed using different scanning orientations. It is interesting to note that the transverse sections of blood vessels appeared oblong in the Y' direction, as predicted by our simulated PSF study. After summation, while vascular structures appeared to be more isotropic, the resolution was not recovered. It was only after Fourier domain filtering that the 100- $\mu\text{m}$  resolution was recovered, in accordance with our simulation study (see Material and Methods section).

A precise qualitative comparison between raw summation and Wiener filtering is presented in Fig. 4: the raw summation resulted in blurry structures and it was difficult to distinguish two vessels, especially in situations in which one small vessel was close to a large one. The Wiener filter provided efficient deconvolution with a low level of noise. The Wiener filter approach was consequently validated for the reconstruction of in-vivo 3D UFD-T data. In Fig. 4B it can be noted that several vessels became discernible after filtering, whereas they were undetectable in Fig. 4A.

The limits of resolution were quantified both in the XY and in the XZ (equivalent to YZ) planes and results are shown in Fig. 5. The minimal distance required to distinguish two vessels appeared to be  $\sim 145 \mu\text{m}$ , while certain isolated vessels had a width at half maximum of  $\sim 80 \mu\text{m}$  in the XZ plane and of  $\sim 100 \mu\text{m}$  in the XY plane. Given the initial optimal resolution of the UFD-T technique without Wiener filtering ( $\sim 100 \mu\text{m}$  at  $-3 \text{ dB}$ ), these results illustrate the benefits of applying a 3D Wiener filter to UFD-T.

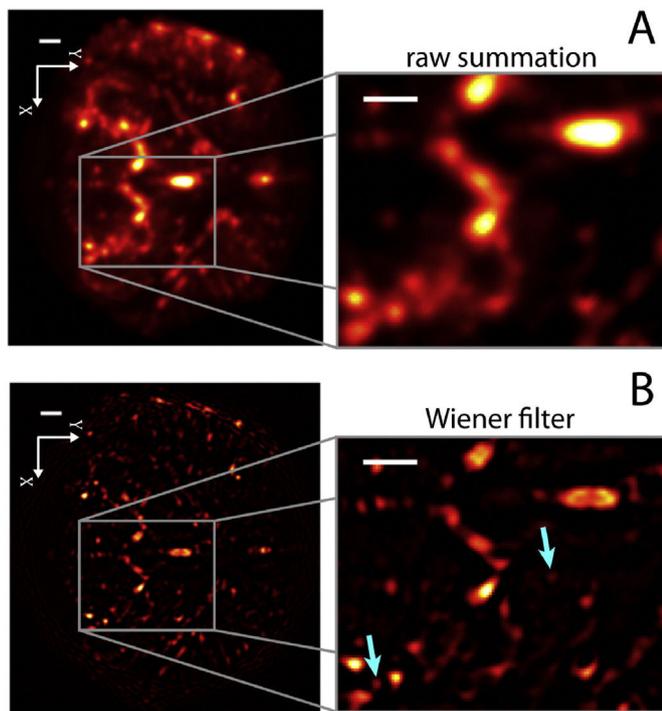


**Fig. 5.** Resolution evaluated in a 200- $\mu\text{m}$ -thick slice of the 3D volume. A. Region of interest (ROI) in an XZ section. The resolution was quantified by selecting the two closest vessels within the ROI (blue line) and the thinnest vessel observable in the ROI (green line). B. Intensity profile along the blue line in A, in which the two-vessel section was fitted with Gaussian functions. C. Intensity profile along the green line in A, in which one vessel section was fitted with a Gaussian function. D. ROI in an XY section, in which the resolution was quantified by selecting the two closest vessels within the ROI (purple line) and the thinnest vessel observable within the ROI (orange line). E. Intensity profile along the purple line in D, in which the two-vessel section was fitted with Gaussian functions. F. Intensity profile along the orange line in D, in which one vessel section was fitted with a Gaussian function.

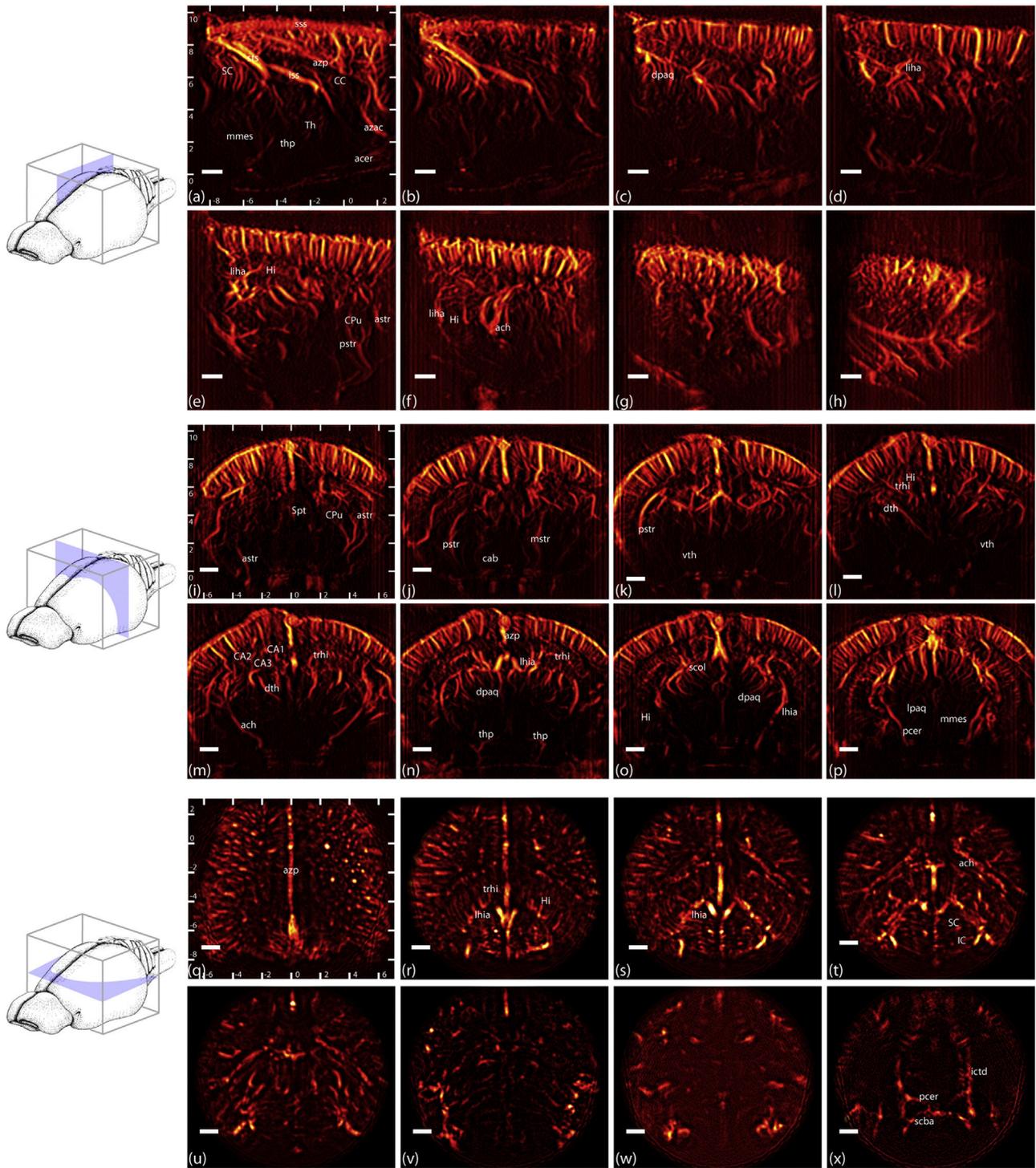
### In vivo rat whole-brain anatomical description

Fig. 6 summarizes the capabilities of UFD-T in terms of in vivo angiographic detection. Projections of 1-mm-thick slices were extracted from a UFD-T volume and compared against a reference in terms of rat blood vessel description, i.e., the *Scremin* chapter in *The Rat Nervous System* (Paxinos, 1995), which was obtained using a casting technique based on the injection of tainted neoprene into the arterial and venous system. The main sinuses, i.e., the superior sagittal sinus, the inferior sagittal sinus and the straight sinus were easily observable in a medial sagittal section (Fig. 6a). The corpus callosum occupied an area without blood vessels, and one can follow the path of the anterior cerebral artery to the azygos anterior cerebral artery and the azygos pericallosal artery. While the latter are big vessels, many smaller vessels could also be observed, such as the dorsal periaqueductal arteries, the median mesencephalic arteries and the thalamo-perforating arteries, irrigating respectively the superior colliculus, mesencephalon and medial thalamic nuclei. In a more lateral section (Fig. 6e), subcortical and cortical penetrating arteries were observable, as well as the big longitudinal hippocampal artery providing the main blood supply to the hippocampus. The anterior and posterior striate arteries, which irrigate the caudate putamen, were also well depicted.

The eight coronal sections presented in Fig. 6i–p are approximately the same as the eight sections presented in (Scremin, 1995) and depict the same arteries. In the rostral part (Fig. 6i–k), the anterior, medial and posterior striate arteries were observable. In the medial part (Fig. 6l–n), the vascular network of the hippocampus was clear, as were the dorsal and ventral thalamic arteries. The two anterior choroidal arteries, branching from the internal carotids, were clearly depicted. In the most caudal regions (Fig. 6o–p), the lateral and dorsal periaqueductal arteries, which irrigate the superior colliculus, and the posterior lateral



**Fig. 4.** Comparison between A. raw summation and B. Wiener filtering. In A, vascular structures have a large spatial extent and it is difficult to accurately assess the number of blood vessels, e.g., in the bottom-left corner of the image. Blood vessels that are indistinguishable in A become discernible using the Wiener filter (cyan arrows). Scale bar: 1 mm.



Arteries and Sinuses

acer	anterior cerebral artery
ach	anterior choroidal artery
astr	anterior striate arteries
azac	azygos anterior cerebral artery
azp	azygos pericallosal artery
cab	caudal ascending basal forebrain arteries
dpaq	dorsal periaqueductal arteries
dth	dorsal thalamic arteries
ictd	internal carotid artery
iss	inferior sagittal sinus
lapq	lateral periaqueductal arteries
lhia	longitudinal hippocampal artery

mms	median mesencephalic arteries
mstr	medial striate arteries
pcer	posterior cerebral artery
pstr	posterior striate arteries
scba	superior cerebellar arteries
scol	supracollicular arterial network
sss	superior sagittal sinus
sts	straight sinus
thp	thalamo-perforating arteries
trhi	transverse hippocampal arteries
vth	ventral thalamic arteries

Structures

CA1,2,3	fields CA1, CA2, CA3 of the hippocampus
CC	Corpus callosum
CPu	Caudate putamen
Hi	Hippocampus
IC	Inferior colliculus
Spt	Septum
SC	Superior colliculus
Th	Thalamus

choroidal arteries and longitudinal hippocampal arteries, which stem from the posterior cerebral artery, were clearly visible.

The eight transverse sections presented in Fig. 6q–x are of striking importance because they are the first transverse sections of the rat vascular network ever obtained with an ultrasound modality. Indeed the resolution in XY transverse sections is conditional upon the tomographic approach. In the first layers, one can observe the cross section of numerous cortical blood vessels (Fig. 6q). Fig. 6r shows, with an unprecedented resolution for an in vivo imaging modality, the parallel organization of the transverse hippocampal arteries stemming perpendicularly from the longitudinal hippocampal artery as described in (Coyle, 1978). Deeper in the volume, the vessels surrounding the superior colliculus and their branches penetrating inside can be observed (Fig. 6t–u). Another important result is the depth of penetration of ultrafast Doppler Imaging, which enabled the observation of an almost complete arterial circle (Circle of Willis) (Fig. 6x), including the superior cerebellar arteries, the posterior cerebellar arteries, the posterior communicating arteries, the internal carotid, and the partial observation in that section of the anterior cerebral arteries.

All of these cross sections showed that UFD-T is a whole-brain-capable 3D vascular imaging modality with high resolution (100  $\mu\text{m}$ ) and even higher detection abilities: some of the vessels depicted here were much smaller than 100  $\mu\text{m}$  (for example cortical penetrating arteries are generally between 50 and 100  $\mu\text{m}$ , and transverse hippocampal arteries between 30 and 70  $\mu\text{m}$ ). Finally, UFD-T allowed for a combination of penetration depth and resolution unprecedented for an in vivo angiographic method, and provided results comparable to ex vivo casting techniques with a detection ability roughly limited to vessels larger than 50  $\mu\text{m}$  in diameter.

#### High-quality 3D reconstruction of the rat whole-brain vasculature

UFD-T offers angiographic and complete 3D rendering abilities that can compete with state-of-the-art 3D vascular imaging techniques. Casting techniques often require complex perfusion protocols and samples that are cut in slices, which can result in damages and also dramatically complicate the vascular 3D reconstruction. UFD-T implemented in conjunction with the Wiener filter allowed for the direct acquisition and rendering of an entire 3D volume. This 3D rendering offered several advantages: an arbitrary cutting plane, segmentation of anatomical structures to isolate only the supplying vascular network and better architectural understanding of the vascular structures. This is illustrated in Fig. 7 and Video 1, which show views of a 3D rendering of the vascular network of a rat brain. In Figs. 7A and B, which represent views of the whole volume from the back and the front, respectively, one can appreciate the profusion of blood vessels depicted by the UFD-T technique: cortical blood vessels are the most numerous since they are in the first layers of the tissue where absorption of the ultrasound is very low, but deep vessels are also well depicted, e.g., around and inside the thalamus. The 3D vascular network supplying the hippocampus is depicted in blue in Fig. 7C: the longitudinal hippocampal artery and its perpendicular ramifications (transverse hippocampal arteries) are visible, as well as the hippocampal venous system that lies on the opposite side. The structure of the vascular supplying network of the hippocampus can be assessed, showing how the blood vessels wrap around the curved shape of this particular structure. The deep structures were also isolated (orange) to improve readability and render the Circle of Willis, and to highlight how the hippocampal

network is connected to the deep vessels. In Fig. 7D, a small portion of the caudal part of the vascular network was depicted to improve readability: the straight sinus is clearly visible, as well as cortical and supra-collicular vessels.

#### 4D hemodynamics assessment of the rat whole-brain vasculature

In addition to high 3D resolution, UFD-T also offers an intrinsically high temporal resolution. Fig. 8 illustrates how several quantities can be extracted from a single ultrafast Doppler acquisition, in addition to the Power Doppler image. For instance, Fig. 8B shows how the cardiac pulsations (red arrows) can be extracted from the tissue pulsatility obtained by analyzing the tissue motion in the entire imaging plane. Additionally, blood-flow speed profiles can be retrieved in each voxel of the 3D volume (Figs. 8C and D). This is particularly interesting for conducting a comparison between the blood-flow speed profiles extracted from various locations. For instance, in Fig. 8D, the blood flow accelerations due to cardiac impulses (red arrows) are detected, identifying this vessel as an artery, whereas in Fig. 8C, the blood flow is not pulsatile, indicating that the depicted vessel can be identified as a vein. This information was available throughout the entire UFD-T volume, thus enabling the computation of blood-flow speeds in different vessels and allowing for the discrimination between arterial and venous flow.

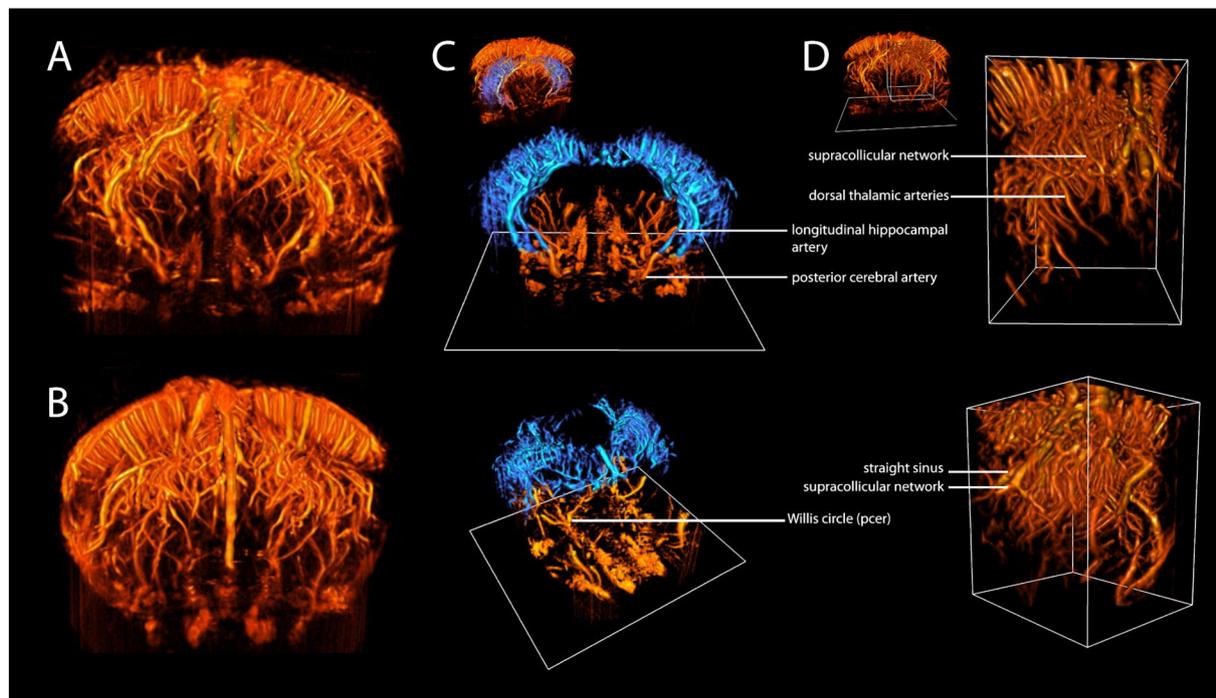
Video 2 shows the evolution of the power Doppler signal, obtained after filtering for blood flows above a given speed (1 cm/s), when sampled every 10 ms during one cardiac cycle in the entire 3D volume. In this movie, one can observe both the increase in PW Doppler during the cardiac systolic pulse and the small motion of the vessels due to changes in blood pressure during the cardiac cycle. Some veins can also be identified by their apparent non-pulsatile dynamics.

Discrimination based on the blood-flow speed could also be conducted, as presented in Fig. 8E. By applying a bank of band-pass filters onto the signal after SVD spatiotemporal filtering, a range of blood-flow speeds could be isolated, and, as a result, vessels could be selected according to their size. Insights into the spatial organization of different kinds of vessels (fast flow in large arteries and slow flows in arterioles and venules) could be inferred, as each frequency bandwidth corresponded to a different range of blood-flow velocities. Interestingly, one can see that vessels could be easily depicted with 1- to 2-mm/s flow velocities and even with velocities lower than 1 mm/s. Moreover, a clear differentiation could be achieved between regions corresponding to high speed (larger vessels) and low speed (small vessels). The 2-mm/s to 4-mm/s region was strongly apparent in the overall cortical and hippocampal areas, whereas larger vessels (16–18 mm/s) were clustered near the surface of the cortex before dividing into smaller vessels in deeper regions.

#### Discussion

In this study, UFD-T was introduced as a novel in vivo technique for 4D microvascular imaging and was demonstrated in small animal brains. Based on ultrafast Doppler ultrasound imaging, UFD-T is capable of providing high-sensitivity images at low speed flows (~1 mm/s), corresponding to small arterioles and venules of the brain. In order to achieve an isotropic resolution using a linear probe, a tomographic scanning approach requiring successive translation/rotation scans, in conjunction with a dedicated 3D Wiener deconvolution filter, was proposed. 3D rendering showed angiographic capabilities competitive

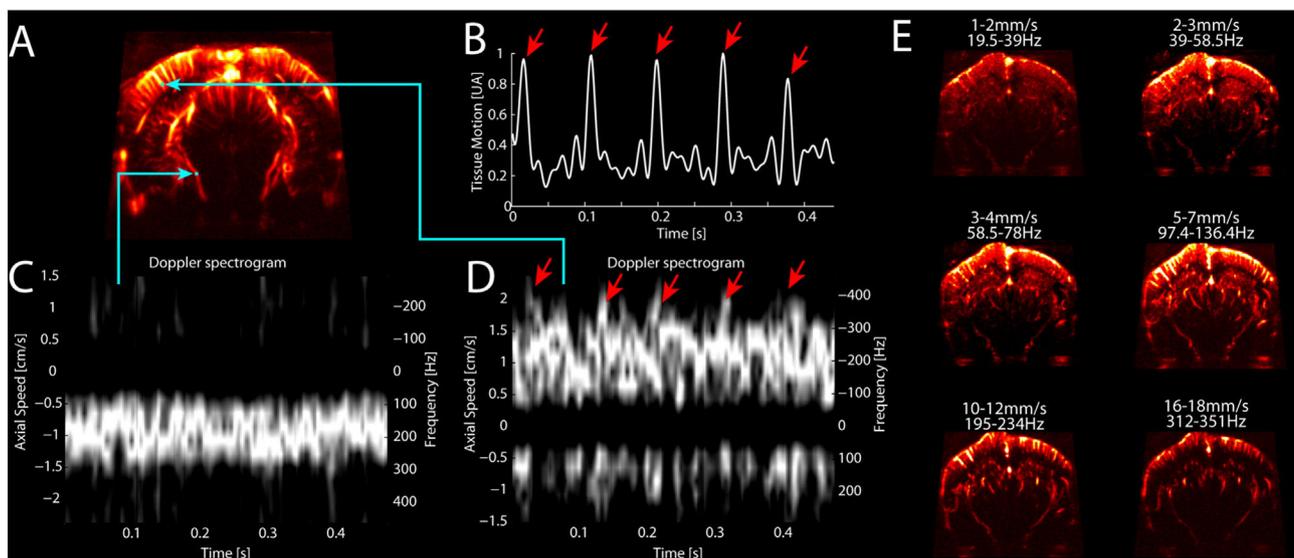
**Fig. 6.** Representative 1-mm-thick slices of the UFD-T volume acquired in one rat. All coordinates are defined according to the Paxinos Atlas (Paxinos, 1995). From (a) to (h), parasagittal sections centered respectively on lateral +0.25, +0.75, +1.75, +2.75, +3.75, +5.25, +5.65, +6.65. From (i) to (p), coronal sections centered on bregma +0.6, -0.4, -1.4, -2.4, -3.4, -4.4, -5.4, -6.4. From (q) to (x), transverse sections centered on interaural +7.75, +6.75, +6.25, +5.75, +5.25, +3.75, +2.25, +0.75. For each series, the first image includes a millimetric grid giving the coordinates as described in the Paxinos Atlas and with regard to the bregma and the interaural points. The main blood vessels are annotated, as are a few structures to help the orientation of the reader. Scale bar: 1 mm.



**Fig. 7.** Several views of 3D rendering of a UFD-T volume. A. Back view and B. front view of the complete vascular network acquired with the UFD-T technique. C. Segmentation of the hippocampus enabled the isolation of its vascular supplying network (in blue), and its connection to the deep vascular structures (in orange). Top is the back view, bottom is the three-quarters front view, inset is the location of the hippocampus structures within the whole vascular volume. D. Details of the supra collicular network and cortical arteries in the caudal part of the acquisition. Top is the front view, bottom is the three-quarters back view, inset is the location of the volume within the whole vascular system.

with state-of-the-art vascular imaging techniques and also presented several additional advantages. It enabled the depiction of rodent brain vasculature with high sensitivity ( $\sim 1$  mm/s), high resolution ( $\sim 100 \mu\text{m}^3$ ) and high penetration ( $> 15$  mm) without the use of a contrast agent. The technique also allowed for the creation of animal-specific vascular atlases. Since UFD-T is based on ultrafast Doppler imaging, a large quantity of information is available when compared to conventional focused ultrasound. Using techniques described in [Bercoff et al. \(2011\)](#) and [Demené et al. \(2014\)](#), the temporal evolution of blood volume and blood-flow speed during a cardiac cycle can be

retrieved in each pixel of an ultrafast Doppler acquisition. This enables both the capture of hemodynamics during one cardiac cycle and the calculation of parametric maps that describe the hemodynamic state of the vascular network. It gives access to time-resolved information on whole-brain hemodynamics with unprecedented temporal resolution ( $\sim 1$  ms). This temporal resolution is of particular interest for small-animal imaging. Indeed, although magnetic resonance imaging made tremendous progress in the last decade with the emergence of high temporal and spatial resolution MR angiography (4D-MRA) in clinics ([Hadizadeh et al., 2014](#); [Willinek et al., 2008](#)), the temporal



**Fig. 8.** 4D capabilities of UFD-T: in each imaging plane, the Doppler signal has a high temporal resolution. A. Image of slice 14 acquired at the angle  $\theta = 0^\circ$ , showing the locations where blood-flow speeds have been computed. B. In each slice, the global tissue motion (see [Material and methods](#)) can be retrieved and corresponds to the cardiac pulsations. Using a spectrogram description of the Doppler signal, the blood speed profile can be retrieved in each pixel: C. in the large vein indicated by a cyan arrow, the blood flow profile is quite regular, with a non-pulsatile flow; D. in the cortical artery indicated by a cyan arrow, the blood flow is pulsatile (velocity peaks are indicated by red arrows). E. By using a bank of band-pass filters, several ranges of speed can be selected and PW Doppler images constructed for each of these speed ranges. The image gain is the same for all six images.

resolution achieved in 4D-MRA imaging remains longer than one cardiac cycle.

The method proposed in this study will lead to several applications. The high temporal and spatial resolutions will provide a way to better understand and potentially revisit fundamental phenomenon, including cerebral autoregulation (Willie et al., 2014), for example after an insult, such as a cardiac arrest or a stroke. In numerous studies, autoregulation assessment is based on measurements of cerebral blood flow in one location only (Kainerstorfer et al., 2015; Lee et al., 2011; Petersen et al., 2015), whereas with our technique we envision the possibility of assessing autoregulation in different specific areas of the brain. Additionally, the possibility of keeping the animal alive during imaging with this kind of resolution opens a whole new field of applications in the monitoring of angiogenesis in various experimental conditions, such as longitudinal developmental studies, tumor injection or recovery and vascular remodeling (Liu et al., 2014) after stroke, or reperfusion following a drug injection such as rTPA. It will also be an interesting tool for stroke studies, as it will provide vascular information on blood flow dynamics, hyperperfusion and hypoperfusion, and resistivity index during stroke. Beyond brain applications, 4D ultrasound angiography could be of particular interest for tumor vasculature studies in small-animal models.

With the portability of ultrasound systems and the small size of ultrasonic probes, the use of UFD-T could extend to high resolution 3D imaging in awake animals. The extent of fUltrasound capabilities to portable imaging on awake and freely moving animals has already been done very recently with ultrafast Doppler imaging (Sieu et al., 2015; Urban et al., 2015), establishing the relevance of fUltrasound to neuroscience. While the paper from Urban et al. focuses on reproduction in awake animals of 2D fUS imaging results previously described in anesthetized animals such as resting state functional connectivity assessment (Osmanski et al., 2014b) and blood volume response in the barrel cortex during whisker stimulation (Macé et al., 2011), the study of Sieu et al. takes a step forward by presenting combined 3D portable fUltrasound imaging and EEG recording in awake and freely moving animals during absence seizures and behavioural tasks. Sieu et al. provided several imaging planes by using a very light micro-motor moving the ultrasound probe, which was mounted directly onto the skull of a rat, and was the first attempt at achieving 3D fUltrasound imaging in freely moving animals, although without achieving the resolutions presented herein with the tomographic approach. This setup (EEG + light motorized probes + fUltrasound) allowed, for example, for the correlation of hemodynamics and electrical activity during epileptic seizures in a selected strain of rat (GAERS) modeling absence seizure, showing adverse effect according to the spatial location in 3D. It also allowed for the correlation of fUltrasound whole-brain imaging with theta oscillations during behavioral tasks in a maze, showing during locomotion a hyperperfusion in the somato-sensory cortex and the hippocampus, and a hypoperfusion in the ventral thalamus. This approach is a first step toward 4D fUltrasound in freely moving rats.

It is also a required tool for the creation of animal-specific rodent neurovascular atlases. While standard vascular atlases and templates already exist, the most advanced approach for the construction of whole-brain vascular atlases in small animals requires the combination of 14 h of high-field MRI imaging and 2 h of  $\mu$ CT scans, both of which are conducted in ex vivo brains (Dorr et al., 2007) with a 30- $\mu$ m resolution. However, we think that in some particular cases it could be helpful to acquire an animal-specific vascular reference on the fly. This could be particularly relevant when studying models for developmental disorders, such as retarded growth, because growth cannot be approximated by a simple scaling of the structures. The availability of high-quality, on-the-fly whole-brain atlases will be vital in the emerging field of fUltrasound, as it will strongly ease the matching and registration between functional activity maps assessed by fUltrasound and the structural atlases of the brain. Even if in-vivo MRI and CT can provide

3D vascular imaging (Lin et al., 2009; Starosolski et al., 2015), the portability and versatility of an Ultrafast Ultrasound scanner will be an advantage in functional studies.

4D ultrasound UFD-T angiography also has limitations. For instance, attenuation tends to limit sensitivity at large depths (beyond ~15 mm at 15 MHz) and thus may lower the precision at which structures such as the Circle of Willis can be delineated. Strategies aiming to increase ultrasonic energy without reducing the imaging frame rate are currently being studied in our lab. Also, the necessity to trepan or at least to thin the skull bone to facilitate transcranial propagation is a clear limitation in the case of rat brain imaging. However, a large number of imaging techniques presented as minimally invasive (such as the last four columns of Table 1) are used for mouse brain imaging. Recent studies from our group, which have not yet been published, demonstrate that it is possible to perform very good transcranial acquisitions in mice and young rats, as their skull bone is thinner. In that case, our technique would be minimally invasive. Moreover, translation to clinical imaging could be possible for some niche but particularly interesting applications, such as human newborn imaging in pediatric radiology, since transfontanelar imaging of brain vasculature was recently acquired with unprecedented quality via ultrafast Doppler imaging (Demené et al., 2014).

A second limitation of our tomographic approach is the long acquisition time (typically 20 min of ultrasonic acquisition for the whole rat brain, completed with ~2 h of signal processing). This limitation is due in part to the acquisition of several cardiac cycles (~500 ms) for each 2D image. Nevertheless, even if this acquisition time is long, it remains competitive when compared to MRI/ $\mu$ CT approaches, and can be decreased by reducing the number of probe orientations, at the cost of a lower, yet still high, reconstruction quality. Specifically, using 30° steps instead of 10° steps resulted in an acquisition time reduced to 6 min. Further optimization of fast scanning sequences is the object of ongoing work. Moreover, this acquisition time limitation is not a physical bottleneck. Indeed, the future replacement of the tomographic approach using motorized 1D linear probes by ultrafast imaging using 2D matrix probes will lead to 4D acquisitions at ultrafast frame rates in real time, as recently demonstrated by our group in cardiac imaging (Provost et al., 2014). Using 2D matrix probes, the acquisition time for one-cardiac-cycle, 4D angiography could drop from 20 min down to real time, i.e., ~300 ms in rats. In the long term, the development of miniature ultrasonic matrix arrays equipped with miniaturized cables in conjunction with the UFD-T reconstruction approach should allow for the high-quality acquisition of the complete brain vascularization in awake and mobile rats in less than one second, enabling the observation of naturally occurring or induced vascular events in real time.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.11.014>.

## Acknowledgments

The research leading to these results has received funding from the European Research Council under the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013)/ERC grant agreement no 339244-FUSIMAGINE. This work was also partly supported by the Agence Nationale de la Recherche under the program "Future Investments" with the reference Laboratory of Excellence ANR-10-LABX-24 LABEX WIFI within the French Program "Investments for the Future" under reference ANR-10-IDEX-0001-02 PSL and the program "Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06.

## References

- Badea, C.T., Drangova, M., Holdsworth, D.W., Johnson, G.A., 2008. In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography. *Phys. Med. Biol.* 53, R319. <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/53/19/R01>.
- Beckmann, N., 2000. High resolution magnetic resonance angiography non-invasively reveals mouse strain differences in the cerebrovascular anatomy in vivo. *Magn.*

- Reson. Med. 44, 252–258. [http://dx.doi.org/10.1002/1522-2594\(200008\)44:2<252::AID-MRM12>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/1522-2594(200008)44:2<252::AID-MRM12>3.0.CO;2-G).
- Beckmann, N., Stirnimann, R., Bochen, D., 1999. High-resolution magnetic resonance angiography of the mouse brain: application to murine focal cerebral ischemia models. *J. Magn. Reson.* 140, 442–450. <http://dx.doi.org/10.1006/jmre.1999.1864>.
- Bercoff, J., Montaldo, G., Loupas, T., Savery, D., Mézière, F., Fink, M., Tanter, M., 2011. Ultrafast compound Doppler imaging: providing full blood flow characterization. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 58, 134–147. <http://dx.doi.org/10.1109/TUFFC.2011.1780>.
- Bolan, P.J., Yacoub, E., Garwood, M., Ugurbil, K., Harel, N., 2006. In vivo micro-MRI of intracortical neurovasculature. *NeuroImage* 32, 62–69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.03.027>.
- Bonnefous, O., Pesqué, P., 1986. Time domain formulation of pulse-Doppler ultrasound and blood velocity estimation by cross correlation. *Ultrason. Imaging* 8, 73–85.
- Chugh, B.P., Lerch, J.P., Yu, L.X., Pienkowski, M., Harrison, R.V., Henkelman, R.M., Sled, J.G., 2009. Measurement of cerebral blood volume in mouse brain regions using micro-computed tomography. *NeuroImage* 47, 1312–1318. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.03.083>.
- Coyle, P., 1978. Spatial features of the rat hippocampal vascular system. *Exp. Neurol.* 58, 549–561. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886\(78\)90108-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4886(78)90108-5).
- Demene, C., Deffieux, T., Pernot, M., Osmanski, B.F., Biran, V., Gennisson, J.-C., Sieu, L.-A., Bergel, A., Franqui, S., Correas, J.M., Cohen, I., Baud, O., Tanter, M., 2015. Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast ultrasound data highly increases Doppler and fUltrasound sensitivity. *IEEE Trans. Med. Imaging* 1–1. <http://dx.doi.org/10.1109/TMI.2015.2428634>.
- Demené, C., Pernot, M., Biran, V., Alison, M., Fink, M., Baud, O., Tanter, M., 2014. Ultrafast Doppler reveals the mapping of cerebral vascular resistivity in neonates. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2014.49>.
- Dorr, A., Sled, J.G., Kabani, N., 2007. Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *NeuroImage* 35, 1409–1423. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.12.040>.
- Downey, D.B., Fenster, A., 1995. Vascular imaging with a three-dimensional power Doppler system. *AJ. Am. J. Roentgenol.* 165, 665–668.
- Edelman, R.R., 1993. MR angiography: present and future. *Am. J. Roentgenol.* 161, 1–11. <http://dx.doi.org/10.2214/ajr.161.1.8517285>.
- Hadizadeh, D., Marx, C., Gieseke, J., Schild, H., Willinek, W., 2014. High temporal and high spatial resolution MR angiography (4D-MRA). *RöFo—Fortschritte Auf Dem Geb. Röntgenstrahlen Bildgeb. Verfahr.* 186, 847–859. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1366661>.
- Hong, G., Diao, S., Chang, J., Antaris, A.L., Chen, C., Zhang, B., Zhao, S., Atochin, D.N., Huang, P.L., Andreasson, K.L., Kuo, C.J., Dai, H., 2014. Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window. *Nat. Photonics* 8, 723–730. <http://dx.doi.org/10.1038/nphoton.2014.166>.
- Hong, G., Lee, J.C., Robinson, J.T., Raaz, U., Xie, L., Huang, N.F., Cooke, J.P., Dai, H., 2012. Multifunctional in vivo vascular imaging using near-infrared II fluorescence. *Nat. Med.* 18, 1841–1846. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2995>.
- Jensen, J.A., 1996. FIELD: A Program for Simulating Ultrasound Systems. 10th Nordicbaltic Conference on Biomedical Imaging vol. 4, Suppl. 1, pp. 351–353 (PART 1:351–353).
- Jensen, J.A., Svendsen, N.B., 1992. Calculation of pressure fields from arbitrarily shaped, apodized, and excited ultrasound transducers. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 39, 262–267. <http://dx.doi.org/10.1109/58.139123>.
- Kainerstorfer, J.M., Sassaroli, A., Tgavalekos, K.T., Fantini, S., 2015. Cerebral autoregulation in the microvasculature measured with near-infrared spectroscopy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 959–966. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2015.5>.
- Kalchenko, V., Israeli, D., Kuznetsov, Y., Harmelin, A., 2014. Transcranial optical vascular imaging (TOVI) of cortical hemodynamics in mouse brain. *Sci. Rep.* 4. <http://dx.doi.org/10.1038/srep05839>.
- Kasa, I., 1976. A circle fitting procedure and its error analysis. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* IM-25, 8–14. <http://dx.doi.org/10.1109/TIM.1976.6312298>.
- Lee, J.K., Brady, K.M., Mytar, J.O., Kibler, K.K., Carter, E.L., Hirsch, K.G., Hogue, C.W., Easley, R.B., Jordan, L.C., Smielewski, P., Czosnyka, M., Shaffner, D.H., Koehler, R.C., 2011. Cerebral blood flow and cerebrovascular autoregulation in a swine model of pediatric cardiac arrest and hypothermia. *Crit. Care Med.* 39, 2337–2345. <http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e318223b910>.
- Lin, C.-Y., Lin, M.-H., Cheung, W.-M., Lin, T.-N., Chen, J.-H., Chang, C., 2009. In vivo cerebrovasculature visualization using 3D  $\Delta R_2$ -based microscopy of magnetic resonance angiography (3D $\Delta R_2$ -mMRA). *NeuroImage* 45, 824–831. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.12.030>.
- Liu, J., Wang, Y., Akamatsu, Y., Lee, C.C., Stetler, R.A., Lawton, M.T., Yang, G.-Y., 2014. Vascular remodeling after ischemic stroke: mechanisms and therapeutic potentials. *Prog. Neurobiol.*, 2013 Pangu Meeting on Neurobiology of Stroke and CNS Injury: Progresses and Perspectives of Future 115, pp. 138–156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.004>.
- Macé, E., Montaldo, G., Cohen, I., Baulac, M., Fink, M., Tanter, M., 2011. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat. Methods* 8, 662–664. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1641>.
- Mace, E., Montaldo, G., Osmanski, B., Cohen, I., Fink, M., Tanter, M., 2013. Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 60, 492–506. <http://dx.doi.org/10.1109/TUFFC.2013.2592>.
- Montaldo, G., Tanter, M., Bercoff, J., Benech, N., Fink, M., 2009. Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 56, 489–506. <http://dx.doi.org/10.1109/TUFFC.2009.1067>.
- Osmanski, B.F., Martin, C., Montaldo, G., Lanièce, P., Pain, F., Tanter, M., Gurden, H., 2014a. Functional ultrasound imaging reveals different odor-evoked patterns of vascular activity in the main olfactory bulb and the anterior piriform cortex. *NeuroImage* 95, 176–184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.03.054>.
- Osmanski, B.-F., Pezet, S., Ricobaraza, A., Lenkei, Z., Tanter, M., 2014b. Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nat. Commun.* 5, 5023. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6023>.
- Paxinos, G., 1995. *The Rat Nervous System*. Gulf Professional Publishing.
- Petersen, N.H., Ortega-Gutierrez, S., Reccius, A., Masurkar, A., Huang, A., Marshall, R.S., 2015. Dynamic cerebral autoregulation is transiently impaired for one week after large-vessel acute ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 39, 144–150. <http://dx.doi.org/10.1159/000368595>.
- Provost, J., Papadacci, C., Arango, J.E., Imbault, M., Fink, M., Gennisson, J.-L., Tanter, M., Pernot, M., 2014. 3D ultrafast ultrasound imaging in vivo. *Phys. Med. Biol.* 59, L1. <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/59/19/L1>.
- Reese, T., Bochen, D., Sauter, A., Beckmann, N., Rudin, M., 1999. Magnetic resonance angiography of the rat cerebrovascular system without the use of contrast agents. *NMR Biomed.* 12, 189–196. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1492\(199906\)12:4<189::AID-NBM557>3.0.CO;2-O](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1492(199906)12:4<189::AID-NBM557>3.0.CO;2-O).
- Scremin, O.U., 1995. *Cerebral vascular system*. The Rat Nervous System. Academic Press, San Diego, pp. 3–35.
- Sieu, L.-A., Bergel, A., Tiran, E., Deffieux, T., Pernot, M., Gennisson, J.-L., Tanter, M., Cohen, I., 2015. EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats. *Nat. Methods* <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3506> (advance online publication).
- Starosolski, Z., Villamizar, C.A., Rendon, D., Paldino, M.J., Milewicz, D.M., Ghaghada, K.B., Annappagada, A.V., 2015. Ultra high-resolution in vivo computed tomography imaging of mouse cerebrovasculature using a long circulating blood pool contrast agent. *Sci. Rep.* 5, 10178. <http://dx.doi.org/10.1038/srep10178>.
- Tanter, M., Fink, M., 2014. Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 61, 102–119. <http://dx.doi.org/10.1109/TUFFC.2014.6689779>.
- Urban, A., Dussaux, C., Martel, G., Brunner, C., Mace, E., Montaldo, G., 2015. Real-time imaging of brain activity in freely moving rats using functional ultrasound. *Nat. Methods* 12, 873–878. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3482>.
- Wiener, N., 1964. *Extrapolation, Interpolation & Smoothing of Stationary Time Series—With Engineering Applications*. MIT Press, Cambridge, Mass.
- Willie, C.K., Tzeng, Y.-C., Fisher, J.A., Ainslie, P.N., 2014. Integrative regulation of human brain blood flow. *J. Physiol.* 592, 841–859. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2013.268953>.
- Willinek, W.A., Hadizadeh, D.R., von Falkenhausen, M., Urbach, H., Hoogeveen, R., Schild, H.H., Gieseke, J., 2008. 4D time-resolved MR angiography with keyhole (4D-TRAK): more than 60 times accelerated MRA using a combination of CENTRA, keyhole, and SENSE at 3.0 T. *J. Magn. Reson. Imaging* 27, 1455–1460. <http://dx.doi.org/10.1002/jmri.21354>.
- Yao, J., Wang, L.V., 2014. Photoacoustic brain imaging: from microscopic to macroscopic scales. *Neurophotonics* 1, 011003. <http://dx.doi.org/10.1117/1.NPh.1.1.011003>.
- Yao, J., Wang, L., Yang, J.-M., Maslov, K.L., Wong, T.T.W., Li, L., Huang, C.-H., Zou, J., Wang, L.V., 2015. High-speed label-free functional photoacoustic microscopy of mouse brain in action. *Nat. Methods* 12, 407–410. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3336>.

## 7. Bibliographie

- Aghakhani Y (2004). fMRI activation during spike and wave discharges in idiopathic generalized epilepsy. *Brain* **127**, 1127–1144.
- Aguirre GKEA (1998). The Variability of Human, BOLD Hemodynamic Responses. 1–10.
- Akin D, Ravizza T, Maroso M, Carcak N, Eryigit T, Vanzulli I, Aker RG, Vezzani A & Onat FY (2011). IL-1 $\beta$  is induced in reactive astrocytes in the somatosensory cortex of rats with genetic absence epilepsy at the onset of spike-and-wave discharges, and contributes to their occurrence. *Neurobiology of Disease* **44**, 259–269.
- Akman O, Demiralp T, Ates N & Onat FY (2010). Electroencephalographic differences between WAG/Rij and GAERS rat models of absence epilepsy. *Epilepsy Research* **89**, 185–193.
- Amaral DG & Witter MP (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *NSC* **31**, 571–591.
- ANGER HO (1952). Use of a gamma-ray pinhole camera for in vivo studies. *Nature* **170**, 200–201.
- Archer J (2003). fMRI “deactivation” of the posterior cingulate during generalized spike and wave. *NeuroImage* **20**, 1915–1922.
- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA & Newman EA (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* **468**, 232–243.
- Avanzini G, Curtis M, Marescaux C, Panzica F, Spreafico R & Vergnes M (1992a). Role of the thalamic reticular nucleus in the generation of rhythmic thalamo-cortical activities subserving spike and waves. In *Generalized Non-Convulsive Epilepsy: Focus on GABA-B Receptors*, pp. 85–95. Springer Vienna, Vienna.
- Avanzini G, de Curtis M, Marescaux C, Panzica F, Spreafico R & Vergnes M (1992b). Role of the thalamic reticular nucleus in the generation of rhythmic thalamo-cortical activities subserving spike and waves. *J Neural Transm Suppl* **35**, 85–95.
- Avoli M (2012). A brief history on the oscillating roles of thalamus and cortex in absence seizures. *Epilepsia* **53**, 779–789.
- Bai X, Vestal M, Berman R, Negishi M, Spann M, Vega C, DeSalvo M, Novotny EJ, Constable RT & Blumenfeld H (2010). Dynamic Time Course of Typical Childhood Absence Seizures: EEG, Behavior, and Functional Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Neuroscience* **30**, 5884–5893.
- Bancaud J (1969). *Physiopathogenesis of generalized epilepsies of organic nature (stereo-electroencephalographic study)*. The physiopathogenesis of the epilepsies.
- Barros LF & Deitmer JW (2010). Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Research Reviews* **63**, 149–159.
- Battaglia D, Karagiannis A, Gallopin T, Gutch HW & Cauli B (2013). Beyond the frontiers of neuronal types. *Front Neural Circuits* **7**, 13.

- Bausch SB (2005). Axonal sprouting of GABAergic interneurons in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior* **7**, 390–400.
- Bazelot M, Dinocourt C, Cohen I & Miles R (2010). Unitary inhibitory field potentials in the CA3 region of rat hippocampus. *The Journal of Physiology* **588**, 2077–2090.
- Bek S, Kaşıkçı T, Genç G, Demirkaya Ş, Gökçil Z & Odabaşı Z (2010). Lateralization of cerebral blood flow in juvenile absence seizures. *Journal of Neurology* **257**, 1181–1187.
- Ben-Ari Y (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* **3**, 728–739.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R & Gaiarsa JL (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* **416**, 303–325.
- Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E & Le Gal La Salle G (1979). A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Research* **163**, 176–179.
- Ben-Ari Y, Tremblay E & Ottersen OP (1980). Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *NSC* **5**, 515–528.
- BENNETT FE (1953). Intracarotid and intravertebral metrazol in petit mal epilepsy. *Neurology* **3**, 668–673.
- Benuzzi F, Mirandola L, Pugnaghi M, Farinelli V, Tassinari CA, Capovilla G, Cantalupo G, Beccaria F, Nichelli P & Meletti S (2012). Increased cortical BOLD signal anticipates generalized spike and wave discharges in adolescents and adults with idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* **53**, 622–630.
- Berg AT & Scheffer IE (2011). New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia* **52**, 1058–1062.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P & Scheffer IE (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* **51**, 676–685.
- Berger H (1929). Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* **87**, 527–570.
- Berman R, Negishi M, Vestal M, Spann M, Chung MH, Bai X, Purcaro M, Motelow JE, Danielson N, Dix-Cooper L, Enev M, Novotny EJ, Constable RT & Blumenfeld H (2010). Simultaneous EEG, fMRI, and behavior in typical childhood absence seizures. *Epilepsia* **51**, 2011–2022.
- Blanco VM, Stern JE & Filosa JA (2008). Tone-dependent vascular responses to astrocyte-derived signals. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* **294**, H2855–H2863.
- Blumenfeld H (2007). Functional MRI Studies of Animal Models in Epilepsy. *Epilepsia* **48**, 18–26.
- Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A & Le Gal La Salle G (1999). Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *NSC* **89**, 717–729.

- Buckmaster PS & Dudek FE (1997). Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol* **385**, 385–404.
- Buckmaster PS & Jongen-Rêlo AL (1999). Highly specific neuron loss preserves lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of kainate-induced epileptic rats. *J Neurosci* **19**, 9519–9529.
- Buxton RB (2009). *Introduction to Functional Magnetic Resonance Imaging*. Cambridge University Press.
- Buxton RB, Wong EC & Frank LR (1998). Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: the balloon model. *Magn Reson Med* **39**, 855–864.
- Buzsáki G (1991). The thalamic clock: emergent network properties. *NSC* **41**, 351–364.
- Buzsáki G (2001). Hippocampal GABAergic interneurons: a physiological perspective. *Neurochem Res* **26**, 899–905.
- Buzsáki G, Bickford RG, Ponomareff G, Thal LJ, Mandel R & Gage FH (1988). Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *Journal of Neuroscience* **8**, 4007–4026.
- Buzsáki G (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* **33**, 325–340.
- Carlsson C, Smith DS, Keykhah MM, Englebach I & Harp JR (1982). The effects of high-dose fentanyl on cerebral circulation and metabolism in rats. *Anesthesiology* **57**, 375–380.
- Carmignoto G & Gómez-Gonzalo M (2010). The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Research Reviews* **63**, 138–148.
- Cauli B (2004). Cortical GABA Interneurons in Neurovascular Coupling: Relays for Subcortical Vasoactive Pathways. *Journal of Neuroscience* **24**, 8940–8949.
- Cauli B (2010). Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling. *Front Neuroenerg* **2**, 1–8.
- Cavalheiro EA, Riche DA & Le Gal La Salle G (1982). Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: A method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* **53**, 581–589.
- Chahboune H, Mishra AM, DeSalvo MN, Staib LH, Purcaro M, Scheinost D, Papademetris X, Fyson SJ, Lorincz ML, Crunelli V, Hyder F & Blumenfeld H (2009). DTI abnormalities in anterior corpus callosum of rats with spike-wave epilepsy. *NeuroImage* **47**, 459–466.
- Chaigneau E, Oheim M, Audinat E & Charpak S (2003). Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 13081–13086.
- Chen JWY, O'Farrell AM & Toga AW (2000). Optical intrinsic signal imaging in a rodent seizure model. *Neurology* **55**, 312–315.
- Chipaux M, Charpier S & Polack PO (2011). Chloride-mediated inhibition of the ictogenic neurones initiating genetically-determined absence seizures. *Neuroscience* **192**, 642–651.
- Christoph M Michel TKDBLRRGAJWE (2009). Electrical Neuroimaging. 1–250.
- Christopher DA, Burns PN, Armstrong J & Foster FS (1996). A high-frequency continuous-wave Doppler ultrasound system for the detection of blood flow in the microcirculation. *Ultrasound in Medicine & Biology* **22**, 1191–1203.

- Coenen AML & Van Luijtelaar ELJM (2003). Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet* **33**, 635–655.
- Cohen I & Miles R (2000). Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges in in vitro hippocampus. *The Journal of Physiology* **524 Pt 2**, 485–502.
- Cohen I, Mace E, Tanter M, Montaldo G, Osmanski B-F & Fink M (2014). Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect, Freq Contr* **60**, 492–506.
- Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M & Miles R (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* **298**, 1418–1421.
- Conner CR, Ellmore TM, Pieters TA, DiSano MA & Tandon N (2011). Variability of the Relationship between Electrophysiology and BOLD-fMRI across Cortical Regions in Humans. *Journal of Neuroscience* **31**, 12855–12865.
- Cossart R, Bernard C & Ben-Ari Y (2005). Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends in Neurosciences* **28**, 108–115.
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M & Bernard C (2001). Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* **4**, 52–62.
- Cronin J & Dudek FE (1988). Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatment in rats. *Brain Research* **474**, 181–184.
- Crunelli V & Carmignoto G (2013). New vistas on astroglia in convulsive and non-convulsive epilepsy highlight novel astrocytic targets for treatment. *The Journal of Physiology* **591**, 775–785.
- Crunelli V & Leresche N (2002). CHILDHOOD ABSENCE EPILEPSY: GENES, CHANNELS, NEURONS AND NETWORKS. *Nature Reviews Neuroscience* **3**, 371–382.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurkó A, Mamiya A & Buzsáki G (1999). Fast network oscillations in the hippocampal CA1 region of the behaving rat. *J Neurosci* **19**, RC20.
- Dang-Vu TT, Schabus M, Desseilles M, Sterpenich V, Bonjean M & Maquet P (2010). Functional neuroimaging insights into the physiology of human sleep. *Sleep* **33**, 1589–1603.
- Danover L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M & Marescaux C (1998). Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Progress in Neurobiology* **55**, 27–57.
- Das A, Wallace GC IV, Holmes C, McDowell ML, Smith JA, Marshall JD, Bonilha L, Edwards JC, Glazier SS, Ray SK & Banik NL (2012). Hippocampal Tissue of Patients with Refractory TLE is associated with Astrocyte Activation, Inflammation, and Altered Expression of Channels and Receptors. *NSC* 1–28.
- David O, Guillemain I, SAILLET S, Reyt S, Deransart C, Segebarth C & Depaulis A (2008). Identifying Neural Drivers with Functional MRI: An Electrophysiological Validation ed. Valdes-Sosa P. *PLoS Biol* **6**, e315–e315.
- De Simone R, Placidi F, Diomedì M, Marciani MG & Silvestrini M (2002). Inter-hemispheric asymmetry of cerebral flow velocities during generalized spike-wave discharges. *Journal of Neurology* **249**, 1191–1194.
- DeFelipe J et al. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic

- interneurons. *Nature Reviews Neuroscience* **14**, 202–216.
- Dempsey E & Morison R (1942). *The production of rhythmic recurrent cortical potentials after local thalamic stimulation*. *Am. J. Psychiatry*.
- Depaulis A, David O & Charpier S (2016). The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. 1–16.
- Deransart C, Riban V, Lê B, Marescaux C & Depaulis A (2000). Dopamine in the striatum modulates seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *NSC* **100**, 335–344.
- Deransart C, Vercueil L, Marescaux C & Depaulis A (1998). The role of basal ganglia in the control of generalized absence seizures. *Epilepsy Research* **32**, 213–223.
- Devor A, Tian P, Nishimura N, Teng IC, Hillman EMC, Narayanan SN, Ulbert I, Boas DA, Kleinfeld D & Dale AM (2007a). Suppressed Neuronal Activity and Concurrent Arteriolar Vasoconstriction May Explain Negative Blood Oxygenation Level-Dependent Signal. *Journal of Neuroscience* **27**, 4452–4459.
- Devor A, Trevelyan A & Kleinfeld D (2007b). Is There a Common Origin to Surround-Inhibition as Seen Through Electrical Activity Versus Hemodynamic Changes? Focus on “Duration-Dependent Response in SI to Vibrotactile Stimulation in Squirrel Monkey.” *Journal of Neurophysiology* **97**, 1880–1882.
- Devor A, Ulbert I, Dunn AK, Narayanan SN, Jones SR, Andermann ML, Boas DA & Dale AM (2005). Coupling of the cortical hemodynamic response to cortical and thalamic neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 3822–3827.
- Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben-Ari Y & Esclapez M (2003). Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* **459**, 407–425.
- DRAKE C & IADECOLA C (2007). The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow. *Brain and Language* **102**, 141–152.
- Drew PJ, Shih AY & Kleinfeld D (2011). Fluctuating and sensory-induced vasodynamics in rodent cortex extend arteriole capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 8473–8478.
- Dufour P, Dufour S, Castonguay A, McCarthy N & De Koninck Y (2006). [Two-photon laser scanning fluorescence microscopy for functional cellular imaging: Advantages and challenges or One photon is good... but two is better!]. *Med Sci (Paris)* **22**, 837–844.
- Dunn AK, Devor A, Bolay H, Andermann ML, Moskowitz MA, Dale AM & Boas DA (2003). Simultaneous imaging of total cerebral hemoglobin concentration, oxygenation, and blood flow during functional activation. *Optics Letters* **28**, 28–30.
- Dunn AK, Devor A, Dale AM & Boas DA (2005). Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. *NeuroImage* **27**, 279–290.
- Dutuit M, Didier-Bazès M, Vergnes M, Mutin M, Conjard A, Akaoka H, Belin MF & Touret M (2000). Specific alteration in the expression of glial fibrillary acidic protein, glutamate dehydrogenase, and glutamine synthetase in rats with genetic absence epilepsy. *Glia* **32**, 15–24.
- Enager P, Piilgaard H, Offenhauser N, Kocharyan A, Fernandes P, Hamel E & Lauritzen M (2009).

- Pathway-specific variations in neurovascular and neurometabolic coupling in rat primary somatosensory cortex. **29**, 976–986.
- Engel AK, Fries P & Singer W (2001). Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nature Reviews Neuroscience* **2**, 704–716.
- Engel J (2006). Report of the ILAE Classification Core Group. *Epilepsia* **47**, 1558–1568.
- Fabene PF et al. (2008). A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nature Medicine* **14**, 1377–1383.
- Fang H, Maslov K & Wang LV (2007). Photoacoustic Doppler flow measurement in optically scattering media. *Appl Phys Lett* **91**, 264103–264103.
- Fang T, Fang F, Zhu H, Zhang G, Liu Z & Li Y (2013). Functional connectivity changes in patients with absence epilepsy studied using resting-state functional MRI. *Journal of Clinical Neuroscience* **20**, 413–418.
- Feig SL & Guillery RW (2000). Corticothalamic axons contact blood vessels as well as nerve cells in the thalamus. *European Journal of Neuroscience* **12**, 2195–2198.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P & Engel J (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **46**, 470–472.
- Fox PT, Mintun MA, Raichle ME, Miezin FM, Allman JM & Van Essen DC (1986). Mapping human visual cortex with positron emission tomography. *Nature* **323**, 806–809.
- Franceschini MA, Radhakrishnan H, Thakur K, Wu W, Ruvinskaya S, Carp S & Boas DA (2010). The effect of different anesthetics on neurovascular coupling. *NeuroImage* **51**, 1367–1377.
- Fredriksson I, Fors C & Johansson J (2007). Laser doppler flowmetry-a theoretical framework. *Department of Biomedical ...*
- Friedman A, Kaufer D & Heinemann U (2009). Blood–brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: Novel targets for the prevention of epilepsy. *Epilepsy Research* **85**, 142–149.
- Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I & Nishino H (1998). Changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> induced by GABAA receptor activation and reduction in Cl<sup>-</sup> gradient in neonatal rat neocortex. *Journal of Neurophysiology* **79**, 439–446.
- Ge S, Goh ELK, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming G-L & Song H (2005). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* **439**, 589–593.
- GELISSE P, THOMAS P, ENGRAND N, NAVARRO V & CRESPEL A (2009). Electroencéphalographie dans les états de mal épileptiques : glossaire, protocole et interprétation ☆. *Réanimation* **18**, 99–105.
- Gloor P (1968). Generalized cortico-reticular epilepsies. Some considerations on the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge. *Epilepsia* **9**, 249–263.
- Gloor P (1969). Epileptogenic action of penicillin. *Ann N Y Acad Sci* **166**, 350–360.
- Gloor P, Avoli M & Kostopoulos G (1990). Thalamocortical Relationships in Generalized Epilepsy with Bilaterally Synchronous Spike-and-Wave Discharge. In *Generalized Epilepsy*, pp. 190–212. Birkhäuser Boston, Boston, MA.

- Goertz DE, Christopher DA, Yu JL, Kerbel RS, Burns PN & Foster FS (2000). High-frequency color flow imaging of the microcirculation. *Ultrasound in Medicine & Biology* **26**, 63–71.
- Goodman JH & Sloviter RS (1992). Evidence for commissurally projecting parvalbumin-immunoreactive basket cells in the dentate gyrus of the rat. *Hippocampus* **2**, 13–21.
- Gordon GRJ, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GCR & MacVicar BA (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* **456**, 745–749.
- Gotman J, Grova C, Bagshaw A, Kobayashi E, Aghakhani Y & Dubeau F (2005). Generalized epileptic discharges show thalamocortical activation and suspension of the default state of the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 15236–15240.
- Gómez-Gonzalo M, Losi G, Brondi M, Uva L, Sato SS, Curtis M de, Ratto GM & Carmignoto G (2011). Ictal but Not Interictal Epileptic Discharges Activate Astrocyte Endfeet and Elicit Cerebral Arteriole Responses. *Front Cell Neurosci* **5**, 1–12.
- Gómez-Gonzalo M, Losi G, Chiavegato A, Zonta M, Cammarota M, Brondi M, Vetri F, Uva L, Pozzan T, de Curtis M, Ratto GM & Carmignoto G (2010). An Excitatory Loop with Astrocytes Contributes to Drive Neurons to Seizure Threshold ed. Huguenard JR. *PLoS Biol* **8**, e1000352–19.
- Gupta A, Wang Y & Markram H (2000). Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* **287**, 273–278.
- Halabisky B, Parada I, Buckmaster PS & Prince DA (2010). Excitatory input onto hilar somatostatin interneurons is increased in a chronic model of epilepsy. *Journal of Neurophysiology* **104**, 2214–2223.
- Handley R, Zelaya FO, Reinders AATS, Marques TR, Mehta MA, O'Gorman R, Alsop DC, Taylor H, Johnston A, Williams S, McGuire P, Pariante CM, Kapur S & Dazzan P (2013). Acute effects of single-dose aripiprazole and haloperidol on resting cerebral blood flow (rCBF) in the human brain. *Hum Brain Mapp* **34**, 272–282.
- Handwerker DA, Ollinger JM & D'Esposito M (2004). Variation of BOLD hemodynamic responses across subjects and brain regions and their effects on statistical analyses. *NeuroImage* **21**, 1639–1651.
- Harel N, Lee S-P, Nagaoka T, Kim D-S & Kim S-G (2002). Origin of negative blood oxygenation level-dependent fMRI signals. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **22**, 908–917.
- Hawco CS, Bagshaw AP, Lu Y, Dubeau F & Gotman J (2007). BOLD changes occur prior to epileptic spikes seen on scalp EEG. *NeuroImage* **35**, 1450–1458.
- Haydon PG & Carmignoto G (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* **86**, 1009–1031.
- Hill RA, Tong L, Yuan P, Murikinati S, Gupta S & Grutzendler J (2015). Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron* **87**, 95–110.
- Hillman EMC, Bernus O, Pease E, Bouchard MB & Pertsov A (2007). Depth-resolved optical imaging of transmural electrical propagation in perfused heart. *Opt Express* **15**, 17827–17841.
- Holter J, Carter D, Leresche N, Crunelli V & Vincent P (2005). A TASK3 channel (KCNK9) mutation in a genetic model of absence epilepsy. *J Mol Neurosci* **25**, 37–51.

- Hughes JR (2009). Absence seizures: A review of recent reports with new concepts. *Epilepsy & Behavior* **15**, 404–412.
- IADECOLA C (1998). *Cerebral circulatory dysregulation in ischemia*. Cerebrovascular diseases.
- Iadecola C & Nedergaard M (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* **10**, 1369–1376.
- Inoue M, Duysens J, Vossen JM & Coenen AM (1993). Thalamic multiple-unit activity underlying spike-wave discharges in anesthetized rats. *Brain Research* **612**, 35–40.
- Isokawa M, Levesque MF, Babb TL & Engel J (1993). Single mossy fiber axonal systems of human dentate granule cells studied in hippocampal slices from patients with temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience* **13**, 1511–1522.
- Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, Seiffert E, Heinemann U & Friedman A (2007). TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* **130**, 535–547.
- Jacobs J, LeVan P, Moeller F, Boor R, Stephani U, Gotman J & Siniatchkin M (2009). Hemodynamic changes preceding the interictal EEG spike in patients with focal epilepsy investigated using simultaneous EEG-fMRI. *NeuroImage* **45**, 1220–1231.
- Jakovcevic D & Harder DR (2007). Role of Astrocytes in Matching Blood Flow to Neuronal Activity. In, *Current Topics in Developmental Biology*, pp. 75–97. Elsevier.
- Janigro D (2012). Are you in or out? Leukocyte, ion, and neurotransmitter permeability across the epileptic blood-brain barrier. *Epilepsia* **53**, 26–34.
- JASPER H (1941). ELECTROENCEPHALOGRAPHIC CLASSIFICATION OF THE EPILEPSIES. *Archives of Neurology And Psychiatry* **45**, 903–943.
- JASPER H, Penfield W & Droogleever-Fortuyn J (1946). *Jasper: Origin of bilaterally synchronous epileptic...* - *Google Scholar*. Proc. Research Nerv. Ment. Dis.
- Jasper HH & Droogleever-Fortuyn J (1947). *Experimental studies on the functional anatomy of petit mal epilepsy*. Res. Publ. Ass. nerv. ment. dis.
- Jones EG (2002). Thalamic circuitry and thalamocortical synchrony. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **357**, 1659–1673.
- Jones NC, O'Brien TJ & Powell KL (2011). Morphometric changes and molecular mechanisms in rat models of idiopathic generalized epilepsy with absence seizures. *Neuroscience Letters* **497**, 185–193.
- Jöbsis FF (1977). Non-invasive, infra-red monitoring of cerebral O<sub>2</sub> sufficiency, bloodvolume, HbO<sub>2</sub>-Hb shifts and bloodflow. *Acta Neurol Scand, Suppl* **64**, 452–453.
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J & Bonvento G (1998). Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* **23**, 1–10.
- Karunakaran S, Grasse DW & Moxon KA (2012). Changes in network dynamics during status epilepticus. *Experimental Neurology* **234**, 454–465.
- Kawaguchi Y & Kubota Y (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat

- frontal cortex. *Cerebral Cortex* **7**, 476–486.
- Khazipov R, Valeeva G & Khalilov I (2014). Depolarizing GABA and Developmental Epilepsies. *CNS Neurosci Ther* **21**, 83–91.
- Kjonigsen LJ, Lillehaug S, Bjaalie JG, Witter MP & Leergaard TB (2015). Waxholm Space atlas of the rat brain hippocampal region: three-dimensional delineations based on magnetic resonance and diffusion tensor imaging. *NeuroImage* **108**, 441–449.
- Klausberger T & Somogyi P (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53–57.
- Klausberger T, Magill PJ, Márton LF, Roberts JDB, Cobden PM, Buzsáki G & Somogyi P (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* **421**, 844–848.
- Klausberger T, Márton LF, O'Neill J, Huck JHJ, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M, Csicsvari J & Somogyi P (2005). Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci* **25**, 9782–9793.
- Kleinfeld D, Blinder P, Drew PJ, Driscoll JD, Muller A, Tsai PS & Shih AY (2011). A Guide to Delineate the Logic of Neurovascular Signaling in the Brain. *Front Neuroenerg* **3**, 1–9.
- Kleinfeld D, Mitra PP, Helmchen F & Denk W (1998). Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15741–15746.
- Klimesch W (1999). EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev* **29**, 169–195.
- Koehler RC, Roman RJ & Harder DR (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in Neurosciences* **32**, 160–169.
- Kornblum HI, Araujo DM, Annala AJ, Tatsukawa KJ, Phelps ME & Cherry SR (2000). In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high resolution positron emission tomography (microPET). *Nat Biotechnol* **18**, 655–660.
- Kullmann DM (2011). Interneuron networks in the hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology* **21**, 709–716.
- Kurian M, Spinelli L, Seeck M & Michel CM (2006). Functional imaging in different epileptic syndromes. *Epileptologie*.
- Labate A, Briellmann RS, Abbott DF, Waites AB & Jackson GD (2005). Typical childhood absence seizures are associated with thalamic activation. *Epileptic Disord* **7**, 373–377.
- Lacroix A, Toussay X, Anenberg E, Lecrux C, Ferreirós N, Karagiannis A, Plaisier F, Chausson P, Jarlier F, Burgess SA, Hillman EMC, Tegeder I, Murphy TH, Hamel E & Cauli B (2015). COX-2-Derived Prostaglandin E2 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex. *J Neurosci* **35**, 11791–11810.
- Laufs H, Lengler U, Hamandi K, Kleinschmidt A & Krakow K (2006). Linking generalized spike-and-wave discharges and resting state brain activity by using EEG/fMRI in a patient with absence seizures. *Epilepsia* **47**, 444–448.

- Le Duigou C, Bouilleret V & Miles R (2008). Epileptiform activities in slices of hippocampus from mice after intra-hippocampal injection of kainic acid. *The Journal of Physiology* **586**, 4891–4904.
- Le Duigou C, Wittner L, Danglot L & Miles R (2005). Effects of focal injection of kainic acid into the mouse hippocampus in vitro and ex vivo. *The Journal of Physiology* **569**, 833–847.
- Le Van Quyen M, Adam C, Martinerie J, Baulac M, Clémenceau S & Varela F (2000). Spatio-temporal characterizations of non-linear changes in intracranial activities prior to human temporal lobe seizures. *European Journal of Neuroscience* **12**, 2124–2134.
- Le Van Quyen M, Martinerie J, NAVARRO V, Boon P, D'Havé M, Adam C, Renault B, Varela F & Baulac M (2001). Anticipation of epileptic seizures from standard EEG recordings. *Lancet* **357**, 183–188.
- Lecrux C, Toussay X, Kocharyan A, Fernandes P, Neupane S, Levesque M, Plaisier F, Shmuel A, Cauli B & Hamel E (2011). Pyramidal Neurons Are “Neurogenic Hubs” in the Neurovascular Coupling Response to Whisker Stimulation. *Journal of Neuroscience* **31**, 9836–9847.
- Liu X, Pillay S, Li R, Vizuite JA, Pechman KR, Schmainda KM & Hudetz AG (2013). Multiphasic modification of intrinsic functional connectivity of the rat brain during increasing levels of propofol. *NeuroImage* **83**, 581–592.
- Llinas RR (2006). Bursting of Thalamic Neurons and States of Vigilance. *Journal of Neurophysiology* **95**, 3297–3308.
- Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T & Oeltermann A (2001). Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* **412**, 150–157.
- Lu Y & Wang X (2013). Genes associated with idiopathic epilepsies: a current overview. *Neurological Research* **31**, 135–143.
- Lüttjohann A & van Luijtelaar G (2012). The dynamics of cortico-thalamo-cortical interactions at the transition from pre-ictal to ictal LFPs in absence epilepsy. *Neurobiology of Disease* **47**, 49–60.
- Lüttjohann A & van Luijtelaar G (2015). Dynamics of networks during absence seizure's on- and offset in rodents and man. *Front Physiol* **6**, 16.
- Ma H, Geneslaw A, Zhao M, Suh M, Perry C & Schwartz TH (2009). The importance of latency in the focality of perfusion and oxygenation changes associated with triggered after discharges in human cortex. **29**, 1003–1014.
- Ma H, Zhao M & Schwartz TH (2013). Dynamic Neurovascular Coupling and Uncoupling during Ictal Onset, Propagation, and Termination Revealed by Simultaneous In Vivo Optical Imaging of Neural Activity and Local Blood Volume. *Cerebral Cortex* **23**, 885–899.
- Mace E, Montaldo G, Cohen I, Baulac M, Fink M & Tanter M (2011). Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat Meth* **8**, 662–664.
- Magistretti PJ, Sorg O, Yu N, Martin JL & Pellerin L (1993). Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. *Dev Neurosci* **15**, 306–312.
- Maglóczy Z & Freund TF (1993). Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. *NSC* **56**, 317–335.
- Maglóczy Z (2010). Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of

- interneurons. *Epilepsy Research* **89**, 52–59.
- Maglóczy Z & Freund TF (1995). Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield. *Neuroscience* **66**, 847–860.
- Malonek D, Dirnagl U, Lindauer U, Yamada K, Kanno I & Grinvald A (1997). Vascular imprints of neuronal activity: relationships between the dynamics of cortical blood flow, oxygenation, and volume changes following sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14826–14831.
- Mandeville JB (2012). IRON fMRI measurements of CBV and implications for BOLD signal. *NeuroImage* **62**, 1000–1008.
- Maquet P, Degueldre C & Delfiore G (1997). Functional neuroanatomy of human slow wave sleep. *The Journal of ...*
- Marchi N & Lerner-Natoli M (2013). Cerebrovascular Remodeling and Epilepsy. *The Neuroscientist* **19**, 304–312.
- Marescaux C, Vergnes M & Depaulis A (1992). Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *J Neural Transm Suppl* **35**, 37–69.
- Margareta Melø T, Sonnewald U, AinaBastholm I & Nehlig A (2007). Astrocytes may play a role in the etiology of absence epilepsy: A comparison between immature GAERS not yet expressing seizures and adults. *Neurobiology of Disease* **28**, 227–235.
- Martin C, Jones M, Martindale J & Mayhew J (2006). Haemodynamic and neural responses to hypercapnia in the awake rat. *European Journal of Neuroscience* **24**, 2601–2610.
- Marx M, Haas CA & Häussler U (2013). Differential vulnerability of interneurons in the epileptic hippocampus. *Front Cell Neurosci* **7**, 167.
- Masterton RAJ, Carney PW, Abbott DF & Jackson GD (2013). Absence epilepsy subnetworks revealed by event-related independent components analysis of functional magnetic resonance imaging. *Epilepsia* **54**, 801–808.
- McBain CJ, Traynelis SF & Dingledine R (1990). Regional variation of extracellular space in the hippocampus. *Science* **249**, 674–677.
- McCaslin AFH, Chen BR, Radosevich AJ, Cauli B & Hillman EMC (2010). In vivo 3D morphology of astrocyte–vasculature interactions in the somatosensory cortex: implications for neurovascular coupling. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **31**, 795–806.
- McCormick DA & Pape HC (1990a). Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *The Journal of Physiology* **431**, 291–318.
- McCormick DA & Pape HC (1990b). Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones. *The Journal of Physiology* **431**, 319–342.
- McNamara JO (1994). Cellular and molecular basis of epilepsy. *Journal of Neuroscience* **14**, 3413–3425.
- Meeren H, van Luijtelaar G, Lopes da Silva F & Coenen A (2005). Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* **62**, 371–376.
- Meeren HKM, Pijn JPM, Van Luijtelaar ELJM, Coenen AML & Lopes da Silva FH (2002). Cortical

- focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* **22**, 1480–1495.
- Meltzer JA, Negishi M & Constable RT (2008). Biphasic hemodynamic responses influence deactivation and may mask activation in block-design fMRI paradigms. *Hum Brain Mapp* **29**, 385–399.
- Melø TM, Sonnewald U, Touret M & Nehlig A (2006). Cortical glutamate metabolism is enhanced in a genetic model of absence epilepsy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **26**, 1496–1506.
- Midzianovskaia IS, Kuznetsova GD, Coenen AML, Spiridonov AM & Van Luijckelaar ELJM (2001). Electrophysiological and pharmacological characteristics of two types of spike-wave discharges in WAG/Rij rats. *Brain Research* **911**, 62–70.
- Mishra AM, Bai X, Motelow JE, DeSalvo MN, Danielson N, Sanganahalli BG, Hyder F & Blumenfeld H (2013). Increased resting functional connectivity in spike-wave epilepsy in WAG/Rij rats. *Epilepsia* **54**, 1214–1222.
- Mishra AM, Ellens DJ, Schridde U, Motelow JE, Purcaro MJ, DeSalvo MN, Enev M, Sanganahalli BG, Hyder F & Blumenfeld H (2011). Where fMRI and Electrophysiology Agree to Disagree: Corticothalamic and Striatal Activity Patterns in the WAG/Rij Rat. *Journal of Neuroscience* **31**, 15053–15064.
- Moehring J, Moeller F, Jacobs J, Wolff S, Boor R, Jansen O, Stephani U & Siniatchkin M (2008). Non-REM sleep influences results of fMRI studies in epilepsy. *Neuroscience Letters* **443**, 61–66.
- Moeller F, LeVan P, Muhle H, Stephani U, Dubeau F, Siniatchkin M & Gotman J (2010). Absence seizures: Individual patterns revealed by EEG-fMRI. *Epilepsia* **51**, 2000–2010.
- Moeller F, Siebner HR, Wolff S, Muhle H, Boor R, Granert O, Jansen O, Stephani U & Siniatchkin M (2008a). Changes in activity of striato-thalamo-cortical network precede generalized spike wave discharges. *NeuroImage* **39**, 1839–1849.
- Moeller F, Siebner HR, Wolff S, Muhle H, Granert O, Jansen O, Stephani U & Siniatchkin M (2008b). Simultaneous EEG-fMRI in drug-naïve children with newly diagnosed absence epilepsy. *Epilepsia* **49**, 1510–1519.
- Morison RS & Dempsey EW (1941). A STUDY OF THALAMO-CORTICAL RELATIONS. *American Journal of Physiology -- Legacy Content* **135**, 281–292.
- Moro V, Kacem K, Springhetti V, Seylaz J & Lasbennes F (1995). Microvessels isolated from brain: localization of muscarinic sites by radioligand binding and immunofluorescent techniques. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **15**, 1082–1092.
- Mosso A (1880). *Sulla circolazione del sangue nel cervello dell'uomo*.
- Murray KN, Parry-Jones AR & Allan SM (2015). Interleukin-1 and acute brain injury. *Front Cell Neurosci* **9**, 18.
- Nadal A, Fuentes E, Pastor J & McNaughton PA (1995). Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 1426–1430.
- NADLER JV, PERRY BW & COTMAN CW (1978). Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* **271**, 676–677.

- Navarro V, Martinerie J, Le Van Quyen M, Clemenceau S, Adam C, Baulac M & Varela F (2002). Seizure anticipation in human neocortical partial epilepsy. *Brain* **125**, 640–655.
- Ndode-Ekane XE, Hayward N, Gröhn O & Pitkänen A (2010). Vascular changes in epilepsy: functional consequences and association with network plasticity in pilocarpine-induced experimental epilepsy. *Neuroscience* **166**, 312–332.
- Nehlig A, Vergnes M, Waydelich R, Hirsch E, Charbonne R, Marescaux C & Seylaz J (1996). Absence seizures induce a decrease in cerebral blood flow: human and animal data. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **16**, 147–155.
- Nersesyan H, Herman P, Erdogan E, Hyder F & Blumenfeld H (2004a). Relative Changes in Cerebral Blood Flow and Neuronal Activity in Local Microdomains During Generalized Seizures. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1057–1068.
- Nersesyan H, Hyder F, Rothman DL & Blumenfeld H (2004b). Dynamic fMRI and EEG Recordings During Spike-Wave Seizures and Generalized Tonic-Clonic Seizures in WAG/Rij Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 589–599.
- Nguyen J, Nishimura N, Fetcho RN, Iadecola C & Schaffer CB (2011). Occlusion of cortical ascending venules causes blood flow decreases, reversals in flow direction, and vessel dilation in upstream capillaries. **31**, 2243–2254.
- Nguyen TS, Winn HR & Janigro D (2000). ATP-sensitive potassium channels may participate in the coupling of neuronal activity and cerebrovascular tone. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* **278**, H878–H885.
- Niedermeyer E (2005). Ultrafast EEG activities and their significance. *Clin EEG Neurosci* **36**, 257–262.
- Nir Y, Massimini M, Boly M & Tononi G (2013). Sleep and Consciousness. In *Neuroimaging of Consciousness*, pp. 133–182. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Nishimura N, Schaffer CB, Friedman B, Lyden PD & Kleinfeld D (2007). Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 365–370.
- Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, Friedman A & Heinemann U (2012). Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis.
- Norden AD & Blumenfeld H (2002). The role of subcortical structures in human epilepsy. *Epilepsy Behav* **3**, 219–231.
- O'Keefe J & Nadel L (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford University Press, USA.
- Oberheim NA, Tian G-F, Han X, Peng W, Takano T, Ransom B & Nedergaard M (2008). Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci* **28**, 3264–3276.
- Obrig H & Villringer A (2003). Beyond the Visible—Imaging the Human Brain with Light. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **23**, 1–18.
- Ogawa S, Lee TM, Kay AR & Tank DW (1990). Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 9868–9872.
- Ortinski PI, Dong J, Mungenast A, Yue C, Takano H, Watson DJ, Haydon PG & Coulter DA (2010). Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nat Neurosci* **13**, 584–591.

- Osharina V, Ponchel E, Aarabi A, Grebe R & Wallois F (2010). Local haemodynamic changes preceding interictal spikes: a simultaneous electrocorticography (ECoG) and near-infrared spectroscopy (NIRS) analysis in rats. *NeuroImage* **50**, 600–607.
- Osmanski B-FEL, Pezet S, Ricobaraza A, Lenkei Z & Tanter M (1AD). Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nature Communications* **5**, 1–14.
- Osmanski BF, Martin C, Montaldo G, Lanièce P, Pain F, Tanter M & Gurden H (2014). Functional ultrasound imaging reveals different odor-evoked patterns of vascular activity in the main olfactory bulb and the anterior piriform cortex. *NeuroImage* **95**, 1–9.
- Papp EA, Leergaard TB, Calabrese E, Johnson GA & Bjaalie JG (2014). Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain. *NeuroImage* **97**, 374–386.
- Parri HR, Gould TM & Crunelli V (2001). Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* **4**, 803–812.
- Patterson MS, Andersson-Engels S, Wilson BC & Osei EK (1995). Absorption spectroscopy in tissue-simulating materials: a theoretical and experimental study of photon paths. *Appl Opt* **34**, 22–30.
- Paxinos G & Watson C (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates/George Paxinos*. Charles Watson.
- Penfield W (1954). Temporal lobe epilepsy. *British Journal of Surgery* **41**, 337–343.
- Perea G & Araque A (2002). Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *Journal of Physiology-Paris* **96**, 199–207.
- Peterson TE & Furenlid LR (2011). SPECT detectors: the Anger Camera and beyond. *Physics in Medicine & Biology* **56**, R145–R182.
- Petilla Interneuron Nomenclature Group et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Publishing Group* **9**, 557–568.
- Petzold GC & Murthy VN (2011). Role of Astrocytes in Neurovascular Coupling. *Neuron* **71**, 782–797.
- Phelps ME (1981). Positron computed tomography studies of cerebral glucose metabolism in man: Theory and application in nuclear medicine. *Seminars in Nuclear Medicine* **11**, 32–49.
- Pirttimäki T, Parri HR & Crunelli V (2012). Astrocytic GABA transporter GAT-1 dysfunction in experimental absence seizures. *The Journal of Physiology* **591**, 823–833.
- Polack P-O & Charpier S (2009). Ethosuximide converts ictogenic neurons initiating absence seizures into normal neurons in a genetic model. *Epilepsia* **50**, 1816–1820.
- Polack P-O & Charpier S (2010). Les crises d'absence : des pointe-ondes généralisées initiées par un foyer cortical. *Epilepsies* **22**, 33–41.
- Polack P-O, Mahon S, Chavez M & Charpier S (2009). Inactivation of the somatosensory cortex prevents paroxysmal oscillations in cortical and related thalamic neurons in a genetic model of absence epilepsy. *Cereb Cortex* **19**, 2078–2091.
- Polack PO, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A & Charpier S (2007). Deep Layer Somatosensory Cortical Neurons Initiate Spike-and-Wave Discharges in a Genetic Model of

- Absence Seizures. *Journal of Neuroscience* **27**, 6590–6599.
- Pollen DA, Perot P & Reid KH (1963). Experimental bilateral wave and spike from thalamic stimulation in relation to level of arousal. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* **15**, 1017–1028.
- Pouratian N, Cannestra AF, Martin NA & Toga AW (2002). Intraoperative optical intrinsic signal imaging: a clinical tool for functional brain mapping. *Neurosurgical FOCUS* **13**, 1–9.
- Powell KL, Cain SM, Ng C, Sirdesai S, David LS, Kyi M, Garcia E, Tyson JR, Reid CA, Bahlo M, Foote SJ, Snutch TP & O'Brien TJ (2009). A Cav3.2 T-Type Calcium Channel Point Mutation Has Splice-Variant-Specific Effects on Function and Segregates with Seizure Expression in a Polygenic Rat Model of Absence Epilepsy. *Journal of Neuroscience* **29**, 371–380.
- Prahl S (1999). (<http://omlc.org/spectra/hemoglobin/>)
- Prince DA & Farrell D (1969). *CENTRENCEPHALIC SPIKE-WAVE DISCHARGES FOLLOWING PARENTERAL PENICILLIN INJECTION IN CAT*. *Neurology*.
- Raabe A, Schmitz AK, Pernhorst K, Grote A, Brelie von der C, Urbach H, Friedman A, Becker AJ, Elger CE & Niehusmann P (2012). Cliniconeuropathologic correlations show astroglial albumin storage as a common factor in epileptogenic vascular lesions. *Epilepsia* **53**, 539–548.
- Raichle ME (1994). Visualizing the mind. *Sci Am* **270**, 58–64.
- Rigau V, Morin M, Rousset MC, de Bock F, Lebrun A, Coubes P, Picot MC, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, CRESPEL A & Lerner-Natoli M (2007). Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain* **130**, 1942–1956.
- Roche-Labarbe N, Zaaïmi B, Berquin P, Nehlig A, Grebe R & Wallois F (2008). NIRS-measured oxy- and deoxyhemoglobin changes associated with EEG spike-and-wave discharges in children. *Epilepsia* **49**, 1871–1880.
- Roche-Labarbe N, Zaaïmi B, Mahmoudzadeh M, Osharina V, Wallois A, Nehlig A, Grebe R & Wallois F (2010). NIRS-measured oxy- and deoxyhemoglobin changes associated with EEG spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy: The GAERS. *Epilepsia* **51**, 1374–1384.
- Roy CS & Sherrington CS (1890). On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *The Journal of Physiology* **11**, 85–158.17.
- Sarkisova K & van Luijckelaar G (2011). The WAG/Rij strain: A genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* **35**, 854–876.
- Schridde U, Khubchandani M, Motelow JE, Sanganahalli BG, Hyder F & Blumenfeld H (2008). Negative BOLD with Large Increases in Neuronal Activity. *Cerebral Cortex* **18**, 1814–1827.
- Schulz D, Southekal S, Junnarkar SS, Pratte J-F, Purschke ML, Stoll SP, Ravindranath B, Maramraju SH, Krishnamoorthy S, Henn FA, O'Connor P, Woody CL, Schlyer DJ & Vaska P (2011). Simultaneous assessment of rodent behavior and neurochemistry using a miniature positron emission tomograph. *Nat Meth* **8**, 347–352.
- SCREMIN OU (2004). Cerebral Vascular System. In *The Human Nervous System*, pp. 1325–1348. Elsevier.

- SCREMIN OU (2015). Cerebral Vascular System. In *The Rat Nervous System*, pp. 985–1011. Elsevier.
- Seidenbecher T, Staak R & Pape HC (1998). Relations between cortical and thalamic cellular activities during absence seizures in rats. *European Journal of Neuroscience* **10**, 1103–1112.
- Seiffert E (2004). Lasting Blood-Brain Barrier Disruption Induces Epileptic Focus in the Rat Somatosensory Cortex. *Journal of Neuroscience* **24**, 7829–7836.
- Sejnowski TJ, Churchland PS & Movshon JA (2014). Putting big data to good use in neuroscience. *Nature Publishing Group* **17**, 1440–1441.
- Shepherd, G (1988). *Neurobiology - 2nd ed.* : Oxford University Press.
- Sherpa AD, van de Nes P, Xiao F, Weedon J & Hrabetova S (2014). Gliotoxin-induced swelling of astrocytes hinders diffusion in brain extracellular space via formation of dead-space microdomains. *Glia* **62**, 1053–1065.
- Sheth SA (2004). Columnar Specificity of Microvascular Oxygenation and Volume Responses: Implications for Functional Brain Mapping. *Journal of Neuroscience* **24**, 634–641.
- Shih AY, Driscoll JD, Drew PJ, Nishimura N, Schaffer CB & Kleinfeld D (2012). Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. **32**, 1277–1309.
- Shih AY, Friedman B, Drew PJ, Tsai PS, Lyden PD & Kleinfeld D (2009a). Active dilation of penetrating arterioles restores red blood cell flux to penumbral neocortex after focal stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **29**, 738–751.
- Shih YYI, Chen CCV, Shyu BC, Lin ZJ, Chiang YC, Jaw FS, Chen YY & Chang C (2009b). A New Scenario for Negative Functional Magnetic Resonance Imaging Signals: Endogenous Neurotransmission. *Journal of Neuroscience* **29**, 3036–3044.
- Shmuel A, Augath M, Oeltermann A & Logothetis NK (2006). Negative functional MRI response correlates with decreases in neuronal activity in monkey visual area V1. *Nat Neurosci* **9**, 569–577.
- Shmuel A, Yacoub E, Pfeuffer J, Van de Moortele PF, Adriany G, Hu X & Ugurbil K (2002). Sustained negative BOLD, blood flow and oxygen consumption response and its coupling to the positive response in the human brain. *Neuron* **36**, 1195–1210.
- Silva AC, Koretsky AP & Duyn JH (2007). Functional MRI impulse response for BOLD and CBV contrast in rat somatosensory cortex. *Magn Reson Med* **57**, 1110–1118.
- Sitnikova E & van Luijtelaar G (2007). Electroencephalographic Characterization of Spike-Wave Discharges in Cortex and Thalamus in WAG/Rij Rats. *Epilepsia* **0**, 070810012536001–???
- Sitnikova E & van Luijtelaar G (2009). Electroencephalographic precursors of spike-wave discharges in a genetic rat model of absence epilepsy: Power spectrum and coherence EEG analyses. *Epilepsy Research* **84**, 159–171.
- Sitnikova E, Kulikova S, Birioukova L & Raevsky VV (2011). Cellular neuropathology of absence epilepsy in the neocortex: a population of glial cells rather than neurons is impaired in genetic rat model. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **71**, 263–268.
- Slaght SJ (2004). On the Activity of the Corticostriatal Networks during Spike-and-Wave Discharges in a Genetic Model of Absence Epilepsy. *Journal of Neuroscience* **24**, 6816–6825.

- Slone E, Westwood E, Dhaliwal H, Federico P & Dunn JF (2012). Near-infrared spectroscopy shows preictal haemodynamic changes in temporal lobe epilepsy. *Epileptic Disord* **14**, 371–378.
- Sloviter RS (1991). Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* **1**, 41–66.
- Snead OC (1995). Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Ann Neurol* **37**, 146–157.
- Somogyi P & Klausberger T (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *The Journal of Physiology* **562**, 9–26.
- Sperk G, Lassmann H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F & Hornykiewicz O (1983). Kainic acid induced seizures: Neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience* **10**, 1301–1315.
- Staley KJ, White A & Dudek FE (2011). Interictal spikes: harbingers or causes of epilepsy? *Neuroscience Letters* **497**, 247–250.
- Stark CE & Squire LR (2001). When zero is not zero: the problem of ambiguous baseline conditions in fMRI. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 12760–12766.
- Stefanovic B, Hutchinson E, Yakovleva V, Schram V, Russell JT, Belluscio L, Koretsky AP & Silva AC (2007). Functional reactivity of cerebral capillaries. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **28**, 961–972.
- Steriade M (2003). The corticothalamic system in sleep. *Front Biosci* **8**, d878–d899.
- Steriade M & Amzica F (2003). Sleep Oscillations Developing into Seizures in Corticothalamic Systems. *Epilepsia* **44**, 9–20.
- Steriade M & Contreras D (1995). Relations between cortical and thalamic cellular events during transition from sleep patterns to paroxysmal activity. *Journal of Neuroscience* **15**, 623–642.
- Steriade M & Contreras D (1998). Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. I. Role of neocortex and thalamus. *Journal of Neurophysiology* **80**, 1439–1455.
- Steriade M & Deschenes M (1984). The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain Research Reviews* **8**, 1–63.
- Steriade M & Llinas RR (1988). The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol Rev* **68**, 649–742.
- Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sørensen JC & Onteniente B (1995). Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* **64**, 665–674.
- Syková E & Nicholson C (2008). Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev* **88**, 1277–1340.
- Takata N, Mishima T, Hisatsune C, Nagai T, Ebisui E, Mikoshiba K & Hirase H (2011). Astrocyte Calcium Signaling Transforms Cholinergic Modulation to Cortical Plasticity In Vivo. *Journal of Neuroscience* **31**, 18155–18165.
- Tauk DL & Nadler JV (1985). Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *Journal of Neuroscience* **5**, 1016–1022.
- Tenney JR, Duong TQ, King JA & Ferris CF (2004). fMRI of Brain Activation in a Genetic Rat

- Model of Absence Seizures. *Epilepsia* **45**, 576–582.
- Tenney JR, Duong TQ, King JA, Ludwig R & Ferris CF (2003). Corticothalamic modulation during absence seizures in rats: a functional MRI assessment. *Epilepsia* **44**, 1133–1140.
- Theodosis DT, Poulain DA & Oliet SHR (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* **88**, 983–1008.
- Thomas P & Arzimanoglou A (2000). *Épilepsies*. Elsevier Masson.
- Touret M, Parrot S, Denoroy L, Belin M-F & Didier-Bazes M (2007). Glutamatergic alterations in the cortex of genetic absence epilepsy rats. *BMC Neurosci* **8**, 69–7.
- Traub RD & Bibbig A (2000). A model of high-frequency ripples in the hippocampus based on synaptic coupling plus axon-axon gap junctions between pyramidal neurons. *J Neurosci* **20**, 2086–2093.
- Tukker JJ, Fuentealba P, Hartwich K, Somogyi P & Klausberger T (2007). Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo. *J Neurosci* **27**, 8184–8189.
- Turjman F, Massoud TF, Sayre JW, Viñuela F, Guglielmi G & Duckwiler G (1995). Epilepsy associated with cerebral arteriovenous malformations: a multivariate analysis of angioarchitectural characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol* **16**, 345–350.
- van Raay L, Jovanovska V, Morris MJ & O'Brien TJ (2012). Focal administration of neuropeptide Y into the S2 somatosensory cortex maximally suppresses absence seizures in a genetic rat model. *Epilepsia* **53**, 477–484.
- van Vliet EA, da Costa Araujo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E & Gorter JA (2007). Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* **130**, 521–534.
- Vanzetta (2010). A BOLD assumption. *Front Neuroenerg* 1–4.
- Vanzetta I, Flynn C, Ivanov AI, Bernard C & Benar CG (2010). Investigation of Linear Coupling Between Single-Event Blood Flow Responses and Interictal Discharges in a Model of Experimental Epilepsy. *Journal of Neurophysiology* **103**, 3139–3152.
- Vaucher E, Tong XK, Cholet N, Lantin S & Hamel E (2000). GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow. *J Comp Neurol* **421**, 161–171.
- Vega-Zelaya L, Ortega GJ, Sola RG & Pastor J (2014). Plasma albumin induces cytosolic calcium oscillations and DNA synthesis in human cultured astrocytes. *Biomed Res Int* **2014**, 539140–10.
- Vergnes M & Marescaux C (1992). Cortical and thalamic lesions in rats with genetic absence epilepsy. *J Neural Transm Suppl* **35**, 71–83.
- Vezzani A, Friedman A & Dingledine RJ (2013). The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology* **69**, 16–24.
- Wang H (2004). Synaptic and Vascular Associations of Neurons Containing Cyclooxygenase-2 and Nitric Oxide Synthase in Rat Somatosensory Cortex. *Cerebral Cortex* **15**, 1250–1260.
- Wenzel HJ, Woolley CS, Robbins CA & Schwartzkroin PA (2000). Kainic acid-induced mossy fiber sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats. *Hippocampus* **10**, 244–260.

- WILLIAMS D (1953). A study of thalamic and cortical rhythms in petit mal. *Brain*.
- Winship IR, Plaa N & Murphy TH (2007). Rapid Astrocyte Calcium Signals Correlate with Neuronal Activity and Onset of the Hemodynamic Response In Vivo. *Journal of Neuroscience* **27**, 6268–6272.
- Wittner L, Magloczky Z, Borhegyi Z, Halász P, Tóth S, Eross L, Szabó Z & Freund TF (2001). Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *NSC* **108**, 587–600.
- Wu Y, Liu D & Song Z (2015). REVIEW NEURONAL NETWORKS AND ENERGY BURSTS IN EPILEPSY. *NSC* **287**, 175–186.
- Ylinen A, Soltész I, Bragin A, Penttonen M, Sik A & Buzsáki G (1995). Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus* **5**, 78–90.
- Zattoni M, Mura ML, Deprez F, Schwendener RA, Engelhardt B, Frei K & Fritschy J-M (2011). Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **31**, 4037–4050.
- Zhang W & Buckmaster PS (2009). Dysfunction of the dentate basket cell circuit in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **29**, 7846–7856.
- Zhang W, Huguenard JR & Buckmaster PS (2012). Increased Excitatory Synaptic Input to Granule Cells from Hilar and CA3 Regions in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuroscience* **32**, 1183–1196.
- Zhang W, Yamawaki R, Wen X, Uhl J, Diaz J, Prince DA & Buckmaster PS (2009). Surviving hilar somatostatin interneurons enlarge, sprout axons, and form new synapses with granule cells in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **29**, 14247–14256.
- Zhao M, Ma H, Suh M & Schwartz TH (2009). Spatiotemporal Dynamics of Perfusion and Oximetry during Ictal Discharges in the Rat Neocortex. *Journal of Neuroscience* **29**, 2814–2823.
- Zhao M, Nguyen J, Ma H, Nishimura N, Schaffer CB & Schwartz TH (2011). Preictal and Ictal Neurovascular and Metabolic Coupling Surrounding a Seizure Focus. *Journal of Neuroscience* **31**, 13292–13300.
- Zhao M, Suh M, Ma H, Perry C, Geneslaw A & Schwartz TH (2007). Focal Increases in Perfusion and Decreases in Hemoglobin Oxygenation Precede Seizure Onset in Spontaneous Human Epilepsy. *Epilepsia* **48**, 2059–2067.
- Zheng TW, O'Brien TJ, Morris MJ, Reid CA, Jovanovska V, O'Brien P, van Raay L, Gandrathi AK & Pinault D (2012). Rhythmic neuronal activity in S2 somatosensory and insular cortices contribute to the initiation of absence-related spike-and-wave discharges. *Epilepsia* **53**, 1948–1958.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann K-A, Pozzan T & Carmignoto G (2002). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* **6**, 43–50.

# Résumé

---

Les épilepsies sont des hyperactivités neuronales pathologiques largement distribuées au sein du système nerveux. Aborder la question de l'organisation spatiotemporelle de ces crises est un premier pas crucial vers la dissection des mécanismes qui les sous-tendent. Alors qu'il existe de nombreux modèles d'hyperactivité épileptiforme, il est plus difficile d'étudier les crises spontanées, qui sont altérées par la sédation. Dans cette thèse, j'ai développé une approche combinant l'électroencéphalogramme (EEG) avec l'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS), sur le rat mobile. Ainsi, sur un modèle d'épilepsie absence, j'ai pu enregistrer simultanément la survenue des crises et les variations hémodynamiques, marqueurs du métabolisme cellulaire. Le suivi additionnel de l'activité hémodynamique n'avait pas d'effet en soi sur l'occurrence et la durée des crises épileptiques. L'analyse des enregistrements a permis de mettre en évidence des corrélations entre les activités électriques et vasculaires durant les crises. Tandis que le thalamus présentait des zones d'hyperperfusion pendant les crises, le cortex présentait des corrélats variables suivant les aires, avec une hyperémie des aires somato-sensorielles accompagnée parfois d'une baisse de perfusion des tissus adjacents. La sensibilité du fUS a révélé, à partir d'événements uniques, qu'une série de pointe-ondes observée par une électrode EEG ne s'accompagne pas toujours d'une hyperactivité vasculaire au même endroit. Ainsi, cette approche permet de délimiter le contour des aires présentant une activité vasculaire pendant les crises et montre une dichotomie partielle entre les composantes électriques et vasculaires des crises.

# Summary

---

Epilepsies consist in neuronal hyperactivities distributed across the nervous system that need first to be located in order to later decipher the mechanisms of these pathologies. While there are many models of epileptiform hyperactivity, it is more difficult to study spontaneous seizures, which are altered by sedation. In this thesis, I developed an approach that combines electroencephalography (EEG) and functional ultrasound imaging (fUS), on the mobile rat. Thus, on a model of absence epilepsy, I could record simultaneously the occurrence of seizures and the hemodynamic variations, which reflect cellular metabolism. Seizures were unaltered by the recording protocol, compared to rats with EEG alone. Correlations were observed between electric and vascular activities. The thalamus showed areas of hyperperfusion during seizures. The cortex exhibited different correlates in distinct areas, with hyperaemia in somato-sensory areas, occasionally associated with a decrease in perfusion in adjacent tissue. The sensitivity of fUS, which could resolve blood changes from single occurrences, revealed that series of spike-wave discharges recorded from an EEG electrode were not always associated with vascular hyperactivity in the same region. Thus, this approach can delimit the contour of areas presenting vascular activity during seizures and shows a partial dichotomy between the electric and vascular components of seizures.