



HAL
open science

Neuroimagerie fonctionnelle ultrasonore 4D et connectivité fonctionnelle cérébrale chez l'animal éveillé

Claire Rabut

► **To cite this version:**

Claire Rabut. Neuroimagerie fonctionnelle ultrasonore 4D et connectivité fonctionnelle cérébrale chez l'animal éveillé. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS328 . tel-03139826

HAL Id: tel-03139826

<https://theses.hal.science/tel-03139826>

Submitted on 12 Feb 2021

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

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

Sorbonne Université

Ecole doctorale SMAER U391

Laboratoire Physique pour la Médecine Paris - INSERM U1273

Neuroimagerie fonctionnelle ultrasonore 4D et connectivité fonctionnelle cérébrale chez l'animal éveillé

Par Claire RABUT

Thèse de doctorat de Physique Acoustique

Dirigée par Mickaël TANTER et Thomas DEFFIEUX

Présentée et soutenue publiquement le 8 novembre 2019

Devant un jury composé de :

MELODELIMA David	Laboratory of Therapeutic Applications of Ultrasound	Rapporteur
BAUD Olivier	Hôpitaux Universitaires de Genève	Rapporteur
BRIDAL Lori	Laboratoire d'Imagerie Biomédicale	Examinatrice
BOURGEAIS Laurence	Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris	Examinatrice
BOUBENEC Yves	Laboratoire des Systèmes Perceptifs	Examinateur
ESCOFFRE Jean-Michel	Imagerie, Biomarqueurs et Thérapie	Examinateur
TANTER Mickaël	Laboratoire Physique pour la Médecine	Directeur de Thèse
DEFFIEUX Thomas	Laboratoire Physique pour la Médecine	Co-directeur de Thèse

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier infiniment mes deux encadrants de thèse:

Mickaël, tu es un mentor exceptionnel et si humain. Ta passion et ton enthousiasme pour notre domaine est contagieuse. Merci de m'avoir fait confiance il y a trois ans pour intégrer ton équipe, de m'avoir montré mes erreurs pour m'aider à progresser et de m'avoir fait découvrir les neurosciences, moi qui manquais terriblement d'ouverture d'esprit à ce sujet en arrivant au laboratoire.

Thomas, ton honnêteté intellectuelle et ta sincérité humaine sont extraordinaires. Je suis très chanceuse d'avoir pu travailler avec toi qui es tellement brillant et si modeste. Merci pour ton encadrement, ta bienveillance et ta stimulation intellectuelle. Merci aussi de m'avoir montré que les lacets n'ont pas toujours besoin d'être faits.

Un immense merci à Sophie : tu as été d'une présence exceptionnelle tout au long de ma thèse. Ton accompagnement intellectuel pour mon travail en neurosciences, ta patience quant à mes (grandes) lacunes en biologie et ta gentillesse ont énormément contribué à rendre cette thèse si agréable.

Mes deux incroyables co-bureaux, qui ont fait de ce bureau, mon endroit préféré de Paris. J'ai l'impression de rentrer à la maison quand j'arrive le matin et vous y êtes: Jack, tu es comme un frère pour moi, avec qui on ne se dispute jamais. Merci de m'avoir appris à coder, de m'écouter quand je parle trop et d'être si patient avec moi. Ta sensibilité et ton calme m'ont apporté énormément de sérénité au quotidien.

Charlie, c'est toi en fait le grand frère, qui nous soutiens et nous supportes, parce que dans le fond on sait bien que tu nous adores. Merci pour tes conseils scientifiques et humains, pour tes cours de français quotidiens et des conseils de lecture qui m'ont ouvert (un tant soit peu !) l'esprit.

Merci à vous deux d'avoir supporté ma musique et mes sursauts quotidiens à chaque entrée dans le bureau. Je suis vraiment très triste de quitter ce bureau, et je me sens extrêmement chanceuse d'avoir partagé ces trois ans avec vous.

Merci à l'ensemble des membres du Jury, Mme. Bridal, Mme. Bourgeois, M. Boubenec, M. Escoffre et plus particulièrement M. Melodelima et M. Baud pour avoir accepté de rapporter ma thèse malgré le court délai de ma demande.

Merci à l'ERC Fusimice d'avoir rendu possible ce projet de thèse.

Merci à toute l'équipe de Physique pour la Médecine,

Jérôme, pour ta gentillesse en toute circonstance, tes aides multiples et précieuses tant dans le domaine scientifique que comme complices de nos surprises,

Florian, pour avoir été un partenaire de projet de ma dernière année sans pareil,

Charlotte, pour nos excursions nature, nos verres de rhum et de bières et nos discussions toutes thématiques confondues,

Momo, pour ta gentillesse au travail comme en dehors. Merci de ton aide illimitée sur la Vera.

Tu as été un coloc de deux semaines génial, et j'ai hâte que ton genou soit rétabli pour que l'on reparte sur les chemins de trail,

Mafalda, parce que même si tu me cries dessus, je sais que tu m'aimes très fort et que j'adore papoter de toutes choses avec toi,

Antoine, pour m'avoir montré toutes tes astuces en chirurgies et pour avoir donné une seconde vie à mes meubles adorés,

Adrien, parce que ça a été génial de partager ce projet avec toi et que ton humour a rendu si légères nos heures d'habituance de souris et de manips éveillées.

Mousse, merci de m'avoir fait découvrir Alain Damasio, de m'avoir entraîné au Go et d'avoir supporté mon stress en chirurgie. Ta bonne humeur et ta bienveillance me manquent beaucoup

Jérémy, ton calme et ton dévouement sont si exceptionnels. Que ce soit en salle de manips ou dans des bars à tapas de San Sebastian, c'est toujours aussi agréable de passer du temps à tes côtés,

Hicham, pour ta prévenance pour tout le laboratoire, tes organisations des Cantines, et ce porte-clefs qui m'est fétiche !

Nathalie, pour ton aide inestimable à l'animalerie,

Patricia, notre maman à tous : merci pour les disques durs externes et les cookies !

Et tous les autres, ceux qui sont partis et ceux qui restent : Marion, Justine, Bruno, Daniel, Alex, Harita, Baptiste, Laura, Victor, Sofiane, Hanna, Olivier V., Béatrice, Mai, ... et de façon plus générale, à toute l'équipe pour cette ambiance exceptionnelle.

Ma famille si extraordinaire, repère d'amour et de soutien: à Nhu et Bà Ngoai.

Mes parents qui m'inspirent beaucoup, mes frères, mes tatas et tontons épatants et mes cousins en flops.

Aaron, mon amour, mon meilleur ami et le plus fantastique partenaire de voyage. Merci d'avoir corrigé mes abstracts en anglais et de m'avoir aidé dans toutes les démarches de ma thèse jusqu'au post-doc.

Résumé

Ces travaux de thèse portent sur l'application de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore à des nouvelles techniques d'imagerie préclinique chez le rongeur. L'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) est une modalité d'imagerie cérébrale développée depuis 2011 qui se base sur l'imagerie Doppler. Cette technique permet d'imager l'activité vasculaire cérébrale avec une très bonne sensibilité en utilisant des ondes ultrasonores grâce à une méthode innovante d'illumination du milieu acoustique. L'imagerie fUS atteint de très bonnes résolutions spatio-temporelles et s'appuie sur des échographes ultrarapides de pointe. Cette nouvelle modalité, unique en son genre, ouvre de nouvelles perspectives en matière de neurosciences et a été utilisée avec succès dans une variété de contextes et de modèles animaux allant des souris anesthésiées aux primates éveillés.

Dans un premier temps, un nouveau dispositif d'acquisition a été mis au point pour permettre l'imagerie fonctionnelle bidimensionnelle transcrânienne et quasi non-invasive chez la souris éveillée, libre de ses mouvements. Nous avons appliqué ce dispositif à l'observation de l'altération de la connectivité fonctionnelle induite par un modèle médicamenteux de la maladie d'Alzheimer. L'étude fUS pharmacodynamique chez la souris éveillée nous a permis de mesurer des altérations de la connectivité fonctionnelle stables, significatives et dépendantes de la dose administrée. La robustesse de ces mesures a été validée par un classifieur automatisant la distinction des états pathologiques par apprentissage supervisé.

En utilisant un nouveau type de scanner échographique ultrarapide et en implémentant des nouvelles séquences d'illumination acoustique codées, nous avons également élargi le champ de vue de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore bidimensionnelle à la troisième dimension. La technologie implémentée a permis d'étendre les capacités d'acquisition des ultrasons fonctionnels à l'imagerie fonctionnelle 4D du cerveau entier. Des films de haute qualité de la dynamique vasculaire cérébrale volumique ont été obtenus chez le rat et ont montré la faisabilité de la technologie 4D fUS à travers différentes applications de mesure fonctionnelle. Enfin, nous avons appliqué la méthode d'élastographie ultrasonore par onde de cisaillement à l'évaluation de la dureté de zones fonctionnelles dans le cerveau. Après avoir implémenté une séquence combinée hémodynamique-élastographique, nous avons pu contrôler l'activité cérébrale en suivant les variations de volume sanguin et dans le même temps générer des ondes de cisaillement pour déterminer la dureté de régions fonctionnelles activées suite à des stimulations extérieures.

Ces travaux de thèse ont permis d'étendre les perspectives de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore préclinique pour la recherche en neurosciences.

Summary

This thesis focuses on the application of functional ultrasound imaging for new pre-clinical imaging modalities in rodents. Functional Ultrasound imaging (fUS) is a brain imaging modality based on Doppler imaging and has been in development since 2011. This technique makes it possible to image the cerebral vascular activity with a very good sensitivity by using ultrasonic waves thanks to an innovative method of acoustic illumination. fUS imaging achieves very good spatio-temporal resolutions by relying on state-of-the-art ultrafast research scanners. This unique new modality opens new perspectives in neuroscience and has been used successfully in a variety of contexts and animal models ranging from anesthetized mice to awake primates.

As a first step, a new acquisition device was developed to allow two-dimensional transcranial and quasi-invasive functional imaging in awake, freely moving mice. We applied this device to measure the alteration of functional connectivity induced by a drug model of Alzheimer's disease. The pharmacodynamic study in awake mice allowed us to measure stable, significant and dose dependent alterations in functional connectivity. The robustness of these measurements was validated by a classifier automating the distinction of the pathological states using supervised learning.

Using a new type of ultrasound scanner and implementing new coded acoustic illumination sequences, we have also expanded the field of view of two-dimensional ultrasonic functional imaging to the third dimension. The implemented technology has extended functional ultrasound acquisition capabilities to 4D functional imaging of the entire brain. High quality films of the volume cerebral blood dynamics were obtained in rats and showed the feasibility of 4D fUS technology through different functional measurement applications.

Finally, we applied the method of supersonic shear wave elastography to the evaluation of the stiffness of functional areas in the brain. After implementing a combined hemodynamic-elastographic sequence, we were able to monitor the brain activity by tracking changes in blood volume and at the same time generating shear waves to determine the stiffness of activated functional regions following external stimulations.

The work carried out in this thesis has expanded the perspectives of pre-clinical ultrasound functional imaging for neuroscience research.

Table des matières

Abréviations et anglicismes utilisés	2
--------------------------------------	---

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Etat de l'art de l'imagerie neuro-fonctionnelle	5
1.1.1. Explorer le cerveau	5
1.1.2. Modalités d'imagerie fonctionnelle d'aujourd'hui	7
1.1.3. Les défis de l'imagerie fonctionnelle de demain	17
1.2. L'imagerie fonctionnelle ultrasonore	17
1.2.1. Principes généraux de l'échographie	18
1.2.2. Imagerie ultrarapide par ondes planes	21
1.2.3. L'imagerie fonctionnelle ultrasonore cérébrale	27
1.3. Objectifs de la thèse	48
1.3.1. Chapitre 2: Imagerie ultrasonore de la connectivité fonctionnelle chez la souris anesthésiée puis éveillée sous modulation pharmacologique	48
1.3.2. Chapitre 3 : Développement de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore 4D	49
1.3.3. Chapitre 4 : Vers l'élastographie fonctionnelle	49
1.4. Bibliographie du chapitre d'introduction	50

Chapitre 2 : Imagerie Fonctionnelle Ultrasonore Pharmacologique chez la souris éveillée libre de ses mouvements

2.1. Introduction : La nécessité d'une modalité d'imagerie cérébrale chez le rongeur éveillé	55
2.1.1. Connectivité fonctionnelle au repos: un indicateur potentiel de l'altération des fonctions cérébrales	55
2.1.2. La maladie d'Alzheimer	61
2.2. Etude pharmacodynamique sous anesthésie	65
2.2.1. Peut-on mesurer la connectivité fonctionnelle en fUS chez la souris anesthésiée ?	65
2.2.2. Matériel et méthodes	66
2.2.3. Résultats et interprétation	74
2.2.4. Conclusion de l'étude sous anesthésie	78
2.3. Etude pharmacologique fonctionnelle ultrasonore chez la souris éveillée	79
2.3.1. Matériel et méthodes	80
2.3.2. Analyses de données et filtrages	84
2.3.3. Résultats de l'étude éveillée et conclusion	88
2.3.4. Discussion et conclusion de l'étude chez la souris éveillée	100
2.4. Conclusion du chapitre 2 et ouverture vers le prochain chapitre	103
2.5. Bibliographie du chapitre 2	104

Chapitre 3 : Imagerie fonctionnelle ultrasonore 4D par multi-ondes planes

3.1. Motivations du passage de l'imagerie fUS bidimensionnel au fUS 4D	110
3.1.1. Connectivité fonctionnelle volumique	110
3.1.2. Le 3D en ultrasons fonctionnels	112
3.2. Protocole expérimental	114
3.2.1. Pilotage de la sonde matricielle	114
3.2.2. Vers l'imagerie par multi-ondes planes en 3D	117
3.2.3. Séquences ultrasonores fonctionnelles 4D et acquisition sur rat trépané	128
3.3. Résultats	133
3.3.1. Activation de zones fonctionnelles.....	133
3.3.2. Mesure de la connectivité fonctionnelle dans tout le volume	136
3.3.3. Suivi de la propagation d'ondes de dépression corticales pendant la crise de type épileptique.....	139
3.4. Discussion et perspectives	142
3.4.1. Discussion	142
3.4.2. Perspectives.....	143
3.4.3. Ouverture vers le chapitre suivant	143
3.5. Bibliographie du Chapitre 3	144

Chapitre 4 : Vers l'élastographie fonctionnelle

4.1. Elastographie et propriétés mécaniques du cerveau	148
4.1.1. Etat de l'art de l'élastographie	148
4.1.2. Elasticité du cerveau.....	158
4.1.3. Hypothèse sur la modification des propriétés mécaniques lors de l'activation fonctionnelle	161
4.2. Elastographie fonctionnelle ultrasonore par ondes de cisaillement	165
4.2.1. Génération d'ondes de cisaillement et détection par les ultrasons.....	165
4.2.2. Matériel et méthodes.....	171
4.2.3. Traitement des données.....	176
4.3. Résultats	179
4.3.1. Stimulation de moustaches	179
4.3.2. Stimulation visuelle	183
4.3.3. Résumé des premiers résultats et interprétation	184
4.4. Conclusion de ce chapitre	189
4.5. Bibliographie du Chapitre 4	190

Conclusion générale	195
Publications et Congrès	197
Distinctions	199
Annexe	200

Abréviations et anglicismes utilisés

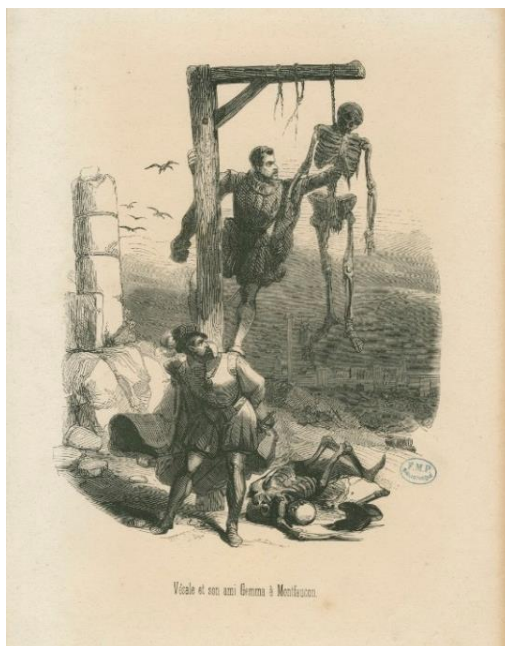
Beamforming	Formation de voies (ou formation de faisceaux)
B-Mode	Imagerie en mode B, imagerie anatomique de base en ultrasons
BOLD	Blood oxygenation level dependent – Mesure d’oxygénation en IRM fonctionnel
CBV	Cerebral blood volume
Coherent compounding	Méthode d’illumination acoustique par ondes planes inclinées
EEG	Electro-encéphalographie
fUS	Functional ultrasound – Imagerie fonctionnelle par ultrasons
IQ	In phase / Quadrature, données complexes beamformées
IRM-f	Imagerie de résonance magnétique fonctionnelle
PRF	Pulse Repetition Frequency : cadence des tirs ultrasonores
RF	Radiofréquence. Les données RF sont l’enregistrement de l’onde acoustique incidente sur les piézoélectriques
ROI	Région d’intérêt
Seed	Petite région sélectionnée dans le cerveau pour observer les corrélations entre cette région et le reste du cerveau
SSI	SuperSonic Imaging – Elastographie ultrasonore par ondes de cisaillement
SVD	Décomposition en valeurs singulières

1.1. Etat de l'art de l'imagerie neuro-fonctionnelle

1.1.1. Explorer le cerveau

La science face aux croyances

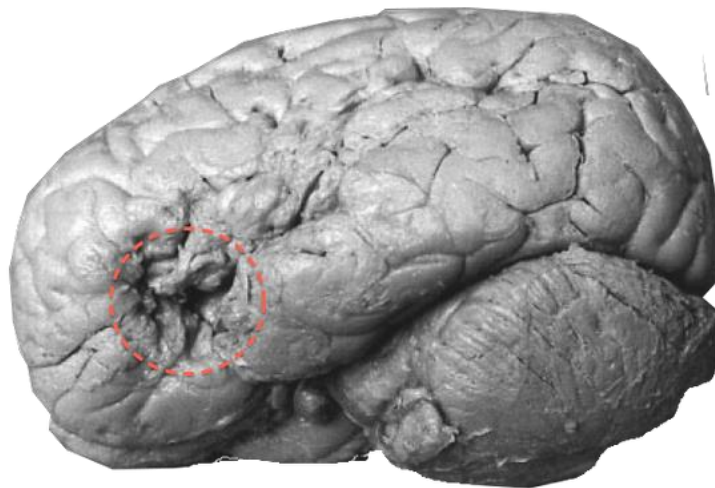
A travers l'histoire et les civilisations, l'exploration du cerveau fut sans cesse remise en question par les contextes culturels et religieux. Dès l'Antiquité, les savants se sont penchés sur cet organe pour en comprendre le fonctionnement. Malgré de nombreux obstacles culturels et des outils très rudimentaires, des premières représentations anatomiques sont apparues. En matière d'avancées scientifiques, le Moyen Age est la période des interdits et des tabous. Durant cette période, il n'était pas de bon ton de « toucher » au corps humain et il fallut attendre la Renaissance pour que la dissection sur l'Homme soit autorisée. Léonard de Vinci (1452-1519) fit de nombreux croquis anatomique du cerveau suite aux dissections qu'il s'autorisa. Mais celui qui introduisit une véritable révolution en matière d'anatomie humaine fut André Vésale (1514-1564). Bravant les interdits, il réalise des dissections en allant notamment voler des cadavres. Il décrivit très précisément l'anatomie du cerveau. Il distingua la substance blanche et la substance grise et décrivit parfaitement les ventricules, la glande pinéale, les tubercules quadrijumeaux et les pédoncules.



André Vesale volant des cadavres pour ses recherches anatomiques

La Science Moderne

Le XVII^e siècle voit naître la science dite moderne et le bouleversement des mentalités. Thomas Willis (1621-1675) était un médecin anatomiste qui inventa le terme « neurologie ». C'est à lui que l'on doit la découverte du polygone de Willis, une partie du système vasculaire du cerveau. Au cours de dissections chez l'homme, Willis injecte dans la carotide externe de l'alcool teinté d'encre, et fait apparaître un polygone artériel d'où naissent toutes les artères cérébrales. Luigi Galvani (1737-1798) montra qu'on pouvait contracter les muscles de la cuisse d'une grenouille par le biais d'une décharge électrique. Peu à peu, la vision d'une transmission nerveuse régie par des courants électriques se répandit. Enfin, le neurologue français Paul Broca (1824-1880) mis en évidence que les différentes fonctions du cerveau étaient localisées anatomiquement.



Photographie du cerveau à partir duquel Broca établit la théorie de la localisation des fonctions cérébrales. Ce cerveau est celui du patient ayant perdu l'usage de la parole avant son décès en 1861. La lésion qui produit ce genre de déficit est identifiée par un cercle

Les Neurosciences contemporaines

Depuis la fin du XIX^e siècle à nos jours, l'augmentation et le perfectionnement des outils d'imagerie, d'analyse et d'étude ainsi que l'évolution des mentalités ont permis l'émergence de nouveaux questionnements mais aussi de nouvelles façons d'appréhender le cerveau en tant qu'objet de recherche. La notion particulièrement importante de **connectome**: cartographie des connexions neuronales du cerveau, apparaît au début de notre siècle.

1.1.2. Modalités d'imagerie fonctionnelle d'aujourd'hui

En 2005, la connectomique a été définie comme la science qui s'intéresse à l'assemblage et l'analyse de données de connectomes. Cette science ne s'intéresse plus seulement à l'anatomie de l'encéphale, mais aux réseaux reliant les différentes régions fonctionnelles et à leur dynamique. Différentes techniques permettant de mesurer l'activité du cerveau au cours du temps existent: elles sont regroupées sous le terme d'**imagerie fonctionnelle**. De la mesure d'un signal cérébral ultra-localisé à l'imagerie grand champ de l'activité de l'ensemble du cerveau, cette partie présente de façon concise les principales techniques d'imagerie fonctionnelle.

1.1.2.1. Modalités mesurant directement l'activité neuronale

L'électroencéphalographie

L'électroencéphalographie (EEG) mesure les signaux électriques produits par l'activité des neurones. Des potentiels d'action sont créés au niveau des synapses lors d'échanges ioniques et créent une différence de potentiel électrique. Le champ électrique, induit à l'échelle de l'ensemble des synapses en action est mesuré à l'aide d'électrodes placées sur le cuir chevelu. Le signal EEG obtenu admet une excellente résolution temporelle (>1000 Hz), mais le champ de potentiels étant recueilli en surface, le problème inverse - *quelle est la configuration de sources qui en est à l'origine ?* - n'a pas de solution unique. Il en résulte une résolution spatiale très dégradée pour cette méthode d'imagerie. De plus, l'activité enregistrée est principalement corticale, les signaux EEG en profondeur étant difficilement enregistrables. Cette méthode présente l'avantage d'être peu coûteuse, facile à réaliser et non-invasive.

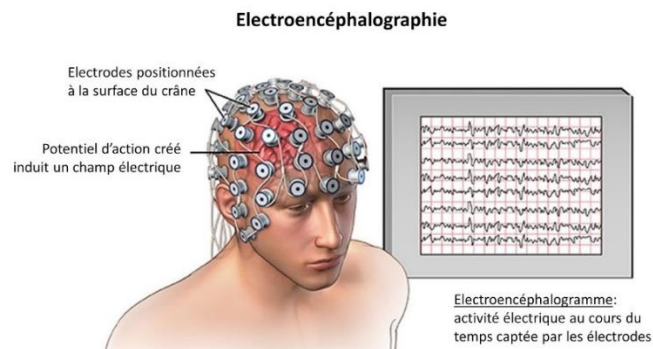


Figure 1. Principe de l'électroencéphalographie : l'activité électrique du cerveau est mesurée par des électrodes placées sur le cuir chevelu

La Magnétoencéphalographie

La magnétoencéphalographie MEG s'est développée grâce à la découverte des matériaux supraconducteurs. Deux supraconducteurs reliés permettent de transformer une variation même très faible du champ magnétique en une tension électrique. Les activités magnétiques sont beaucoup moins sensibles aux milieux traversés que les activités électriques. La MEG aurait ainsi une grande capacité pour discriminer des activités différentes. Malgré cet avantage théorique de la MEG, les apports respectifs des localisations de source MEG et EEG restent débattus (Barkley 2004; Baumgartner 2004). Les deux outils, MEG et EEG sont en fait complémentaires puisqu'ils présentent des sensibilités différentes selon les différents types de sources intracérébrales. Leur résolution temporelle est totalement comparable. Cependant, bien que la technique soit totalement non-invasive, les capteurs MEG (refroidis à l'hélium liquide) et le sujet doivent être placés dans une chambre blindée pour effectuer des enregistrements moins perturbés par l'environnement.

Le Potentiel de Champ Local

Le Potentiel de Champ Local (ou plus connu comme Local Field Potential (LFP) en anglais) est le potentiel électrique enregistré directement dans le tissu cérébral. Le LFP est donc une technique invasive puisqu'il requiert l'implantation de micro-électrodes (en métal, silicone ou même en verre) directement dans le cerveau. Contrairement à l'EEG ou de la MEG, il permet la mesure de signaux de populations de neurones très localisées et en profondeur. Deux électrodes séparées d'un millimètre peuvent enregistrer des signaux très différents. Il a été constaté que les signaux EEG et LFP présentent le même type d'oscillations durant les états d'éveil et de sommeil (Steriade 2003).

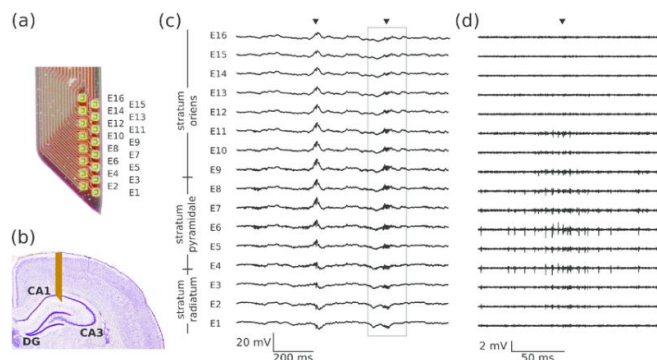


Figure 2. Electrode mesurant un Potentiel de Champ Local chez le rat (a) Distribution spatiale des électrodes sur une sonde implantée dans l'hippocampe d'un rat (b) Emplacement de la sonde dans l'hippocampe (c) Exemple de potentiel de champ local enregistré par la sonde implantée (d'après (Michon et al. 2016))

Imagerie Optique par Colorant sensible au Potentiel

L'imagerie optique VSD (VSDOI: *Voltage Sensitive Dye Optical Imaging*) est une technique d'imagerie fonctionnelle récente et populaire qui utilise des colorants fluorescents sensibles à la tension (VSD) pour révéler l'activité de la population de neurones corticaux chez les animaux éveillés, à haute résolution spatiale ($0,5\mu\text{m}$ pour les enregistrements à une seule cellule et $50\mu\text{m}$ pour les enregistrements de population) et une précision temporelle inférieure à la milliseconde. Cette technique invasive nécessite une ouverture du crâne pour avoir un accès direct au cortex et injecter les colorants. Les molécules colorantes se lient ensuite à la membrane plasmique de tous les types de cellules présentes dans le cortex, notamment des cellules gliales et des neurones. Les molécules colorantes sont polarisées et émettent de la lumière avec une intensité proportionnelle à leur polarisation en raison du potentiel électrique au niveau des synapses. Les cellules gliales contribuent moins que les neurones au signal VSD en raison de leur activité électrique inférieure par rapport aux neurones. Ainsi, la lumière émise du cortex par les colorants et enregistrés par VSDOI sont principalement dus à l'activité électrique des neurones.

Cependant, les colorants sensibles au potentiel peuvent réagir très différemment d'une préparation à l'autre; en général, des dizaines de colorants doivent être testés afin d'obtenir un signal optimal. De plus les colorants ne pénètrent souvent pas dans le tissu conjonctif ou ne se déplacent pas dans les espaces intracellulaires jusqu'à la région de la membrane souhaitée pour l'étude. Enfin, comme la modalité se base sur l'enregistrement d'un signal optique, la profondeur d'imagerie reste limitée à quelques micromètres.

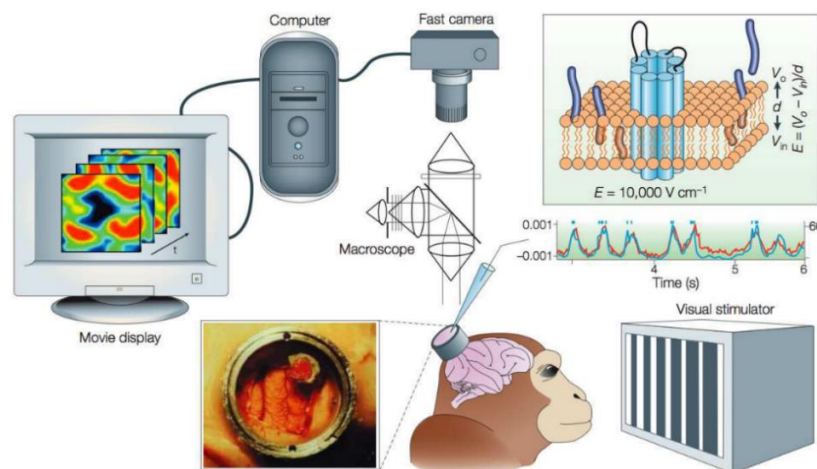


Figure 3. Principe de VSDOI: à travers une fenêtre crânienne du singe éveillé, la VSDOI a accès à l'activité corticale superficielle. Une caméra enregistre la fluorescence causée par les molécules VSD polarisées liées à la membrane plasmique des neurones corticaux. Un film de l'activité de la population distribuée est obtenu, avec de hautes résolutions spatiales et temporelles (d'après (Grinvald and Hildesheim 2004))

Imagerie Calcique

Les canaux calcium membranaires dépendants du voltage (VDCC: voltage-dependent calcium channels), sont un groupe de canaux ioniques potentiel-dépendants que l'on trouve dans la membrane des cellules dites "excitables": cellules musculaires, gliales, neurones, etc. Dans le cas du neurone, ces canaux se trouvent au niveau des synapses (jonction entre les neurones) et participent à la transmission de l'information entre neurones. En effet, l'influx nerveux est transmis le long d'un neurone sous la forme d'une séquence de potentiel d'action. Au niveau d'une synapse chimique, l'information change de nature : elle est transmise par **une libération de neurotransmetteurs dans l'espace synaptique**. Le changement de polarité de membrane provoqué par l'arrivée d'un potentiel d'action (PA) au niveau d'une synapse déclenche l'ouverture des canaux calcium. Cette ouverture entraîne une entrée brusque de calcium dans la membrane pré-synaptique ce qui provoque, avec d'autres mécanismes chimiques, (comme la libération de glutamate) la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Les neurotransmetteurs libérés atteignent la membrane post-synaptique par simple diffusion, et le potentiel d'action est transmis au neurone post-synaptique (Figure 4.a).

La présence de calcium au niveau des membranes synaptiques témoigne donc de la transmission d'un signal nerveux. Dès les années 1970, des chercheurs se sont donc penchés sur l'imagerie calcique comme marqueur de l'activité neuronale (Hallett and Carbone 1972; Llinás and Nicholson 1975). L'imagerie du calcium implique deux processus parallèles : le développement d'indicateurs calcique, et le développement de l'instrumentation appropriée. Au fil des ans, beaucoup d'indicateurs de calcium, sous forme de colorant notamment, avec une large gamme de spectres d'excitation ont été introduits pour l'imagerie neuronale calcique (Figure 4). Cela naturellement a été accompagné par le développement de nouveaux instruments d'imagerie, comme les caméras CCD (Connor 1986) et les microscopes confocaux (Eilers et al. 1995). La puissance des sondes fluorescentes en combinaison avec ces technologies émergentes a par la suite permis d'observer en temps réel les processus biologiques au niveau de la cellule unique: l'introduction de la microscopie à deux photons par Winfried Denk (Denk et al. 1990) et son utilisation pour l'imagerie du calcium dans le système nerveux ont constitué un progrès majeur au début des années 1990 (Figure 4.c). L'imagerie à deux photons a révolutionné le domaine de l'imagerie calcique et est maintenant utilisée dans de nombreux laboratoires dans le monde entier.

Elle permet l'imagerie en temps réel de l'activation neuronale au niveau du neurone unique, et est possible chez l'animal éveillé en mouvement (Figure 4.c). Elle nécessite cependant l'ouverture du crâne pour les animaux plus gros que la souris et admet une profondeur de pénétration limitée à quelques micromètres.

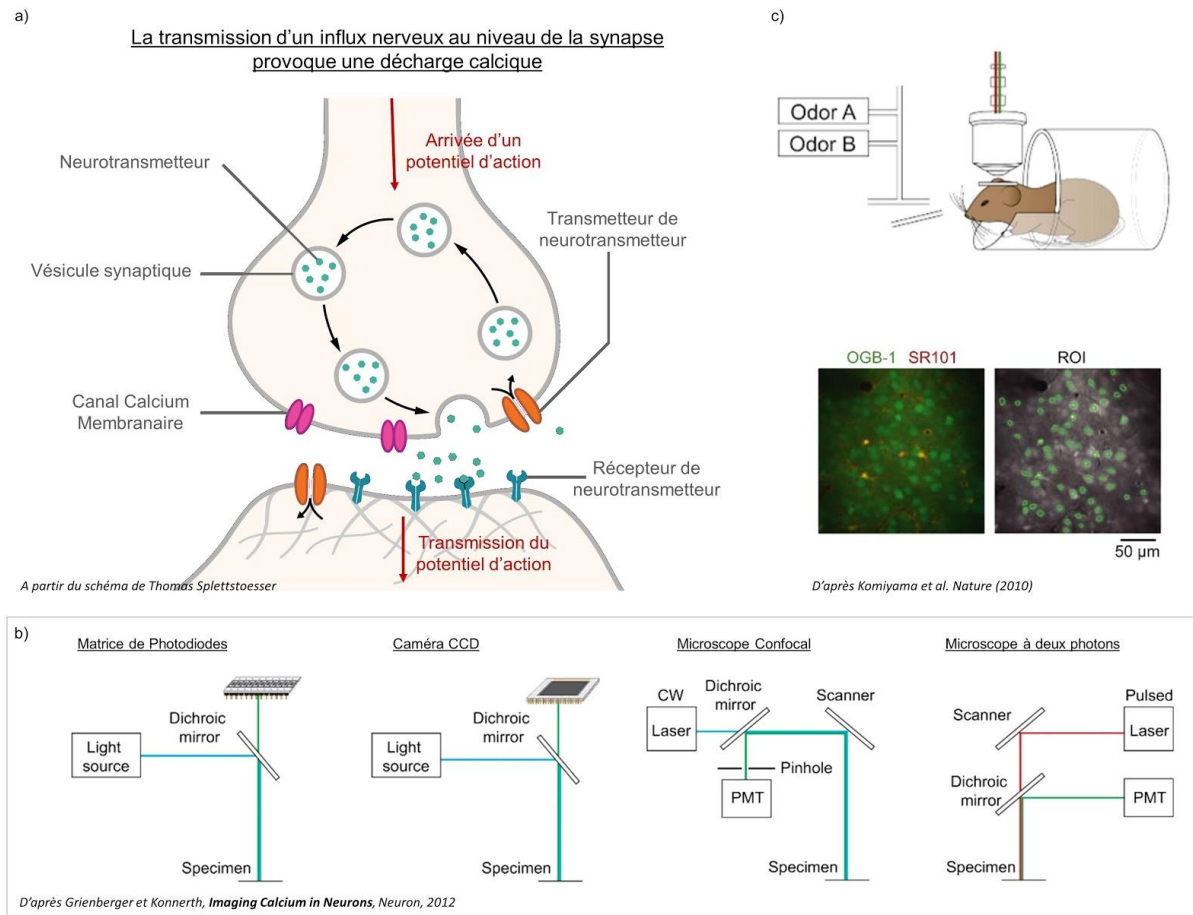


Figure 4. Principe de l'Imagerie Calcique: a) L'arrivée d'un potentiel d'action provoque l'ouverture de canaux électro-dépendants au calcium ce qui aboutit à la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. b) Différents dispositifs d'imagerie calcique c) Le microscope à deux photons envoient deux photons à deux niveaux d'énergie: leur interférence permet d'exciter les molécules fluorescentes calcium-sensibles pour qu'elles émettent leur lumière. Des images d'activation neuronales ultra-résolues peuvent être obtenues

1.1.2.2. Modalités mesurant un effet indirect de l'activité neuronale

Le couplage neurovasculaire

L'activité des neurones est maintenue grâce à l'apport d'énergie sous forme de **nutriments** et d'**oxygène** apportés par le sang **via le réseau vasculaire cérébral**. Pour alimenter les neurones, le cortex est approvisionné en sang par des artérioles qui y pénètrent en profondeur. Une fois les nutriments distribués, le sang est évacué par des veinules qui remontent en surface.

Le cerveau possède donc un mécanisme interne permettant des variations locales du flux vasculaire en correspondance avec des variations locales d'activité fonctionnelle. Ce mécanisme, nerveux et chimique, permet la vasodilatation des vaisseaux qui entraîne mécaniquement une augmentation du flux sanguin cérébral (CBF: Cerebral Blood Flow).

Comme décrit au paragraphe précédent, l'activation neuronale est transmise par les axones des neurones jusqu'aux synapses. Les astrocytes, **cellules gliales qui entourent les synapses**, sont en contact direct avec les vaisseaux du cerveaux: leurs "pieds" sont accrochés tout autour des capillaires et artérioles. Au moment de l'influx nerveux, en plus de la décharge de calcium dans les membranes pré-synaptiques (voir Imagerie Calcique), les synapses libèrent également du glutamate, qui stimulent la synthèse et la libération de **neurotransmetteurs vasodilatateurs** au niveau des astrocytes (qui gonflent par absorption d'eau) et même des neurones (voir Figure 5). Les vaisseaux ainsi **dilatés mécaniquement** (il faut s'imaginer que les pieds des astrocytes "tirent" sur les vaisseaux en se gonflant) permettent d'augmenter le flux sanguin localement. L'augmentation des flux sanguins entraînent une augmentation locale du volume sanguin. Les astrocytes re-transmettent ensuite vers les neurones le glucose et l'O₂ apporté par le sang dont le flux a augmenté pour compenser la dépense énergétique due à l'activation neuronale.

Ainsi, par ce phénomène appelé **couplage neurovasculaire**, le cerveau est capable de modifier localement la dynamique du sang, en réponse à une activation neuronale. Détecter ces changements locaux permet indirectement de cartographier les zones activées. En effet, bien que ce phénomène soit relativement lent (de l'ordre de deux secondes (Jones et al. 2004), il reste suffisamment localisé (Sheth et al. 2004; Hillman et al. 2007) pour imager précisément les fonctions cérébrales. Différents paramètres permettent d'évaluer ce couplage : le taux d'oxygénation du sang et de l'hémoglobine, la

vitesse du sang (Cerebral Blood Flow, CBF) et le volume de sang (Cerebral Blood Volume, CBV). De nombreuses techniques visent à mesurer les variations de ces grandeurs.

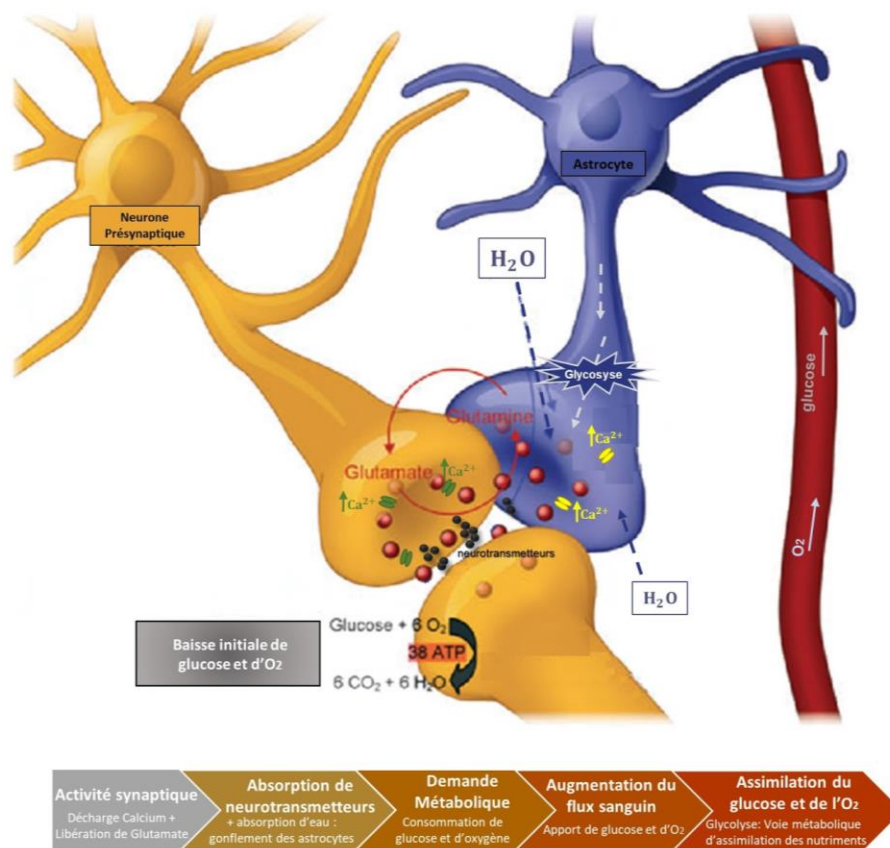


Figure 5. Schéma simplifié du couplage neurovasculaire: l'arrivée d'un influx nerveux déclenche la libération de neurotransmetteurs qui entraînent le gonflement des astrocytes. Ceux-ci tirent sur les vaisseaux pour augmenter le flux sanguin et ainsi compenser la consommation de nutriments par la région synaptique (figure adaptée de (Figley and Stroman 2011)).

Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle

L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRM-f) est une application de l'imagerie par résonance magnétique (IRM). La localisation des zones cérébrales activées est basée sur l'effet BOLD (Blood Oxygen Level Dependant). Lorsque des neurones sont stimulés, nous avons vu précédemment que le débit sanguin cérébral local et la consommation en oxygène augmentent dans les zones cérébrales activées. Cependant, l'augmentation du débit sanguin est proportionnellement plus importante que la consommation d'oxygène. Il s'ensuit une **suroxygénation du sang veineux** (le surcroît

d'oxygène inutilisé passant des artérioles aux capillaires et veinules) qui modifie localement **les propriétés magnétiques des tissus**, ce que détecte l'IRM. Le principe de l'IRM-f est donc d'enregistrer par un IRM des séquences spécifiques permettant de mettre en évidence le signal BOLD. On obtient ainsi pour chaque pixel (de l'ordre de $500 \mu\text{m}^2$) une valeur de ce signal: l'ensemble des pixels correspondants à des cartes paramétriques. La cadence d'imagerie IRM-f est typiquement de l'ordre du hertz. Les variations du signal BOLD étant très faibles (de l'ordre de 1%), il est souvent nécessaire de répéter une stimulation, afin de moyenner les signaux sur plusieurs essais et visualiser les zones cérébrales activées.

L'IRM-f est **la principale modalité d'imagerie fonctionnelle cérébrale**: elle permet d'imager tout le cerveau, aussi bien chez l'homme en clinique, que pour la recherche plus fondamentale chez l'homme, le primate ou le rongeur. Elle est totalement non invasive.

Cependant, l'IRM est une technologie très coûteuse et encombrante et elle requiert l'immobilité du sujet imagé. Si cela ne pose pas de problème de demander l'immobilité chez l'Homme adulte, cela devient très compliqué, voire impossible chez le nouveau-né. De même chez l'animal, et notamment le rongeur: la constriction ou la sédation deviennent alors nécessaires pour les séquences d'IRM-f. Ces contraintes soulèvent des problématiques de modification de la connectivité fonctionnelle due au stress de la constriction ou aux drogues sédatives.

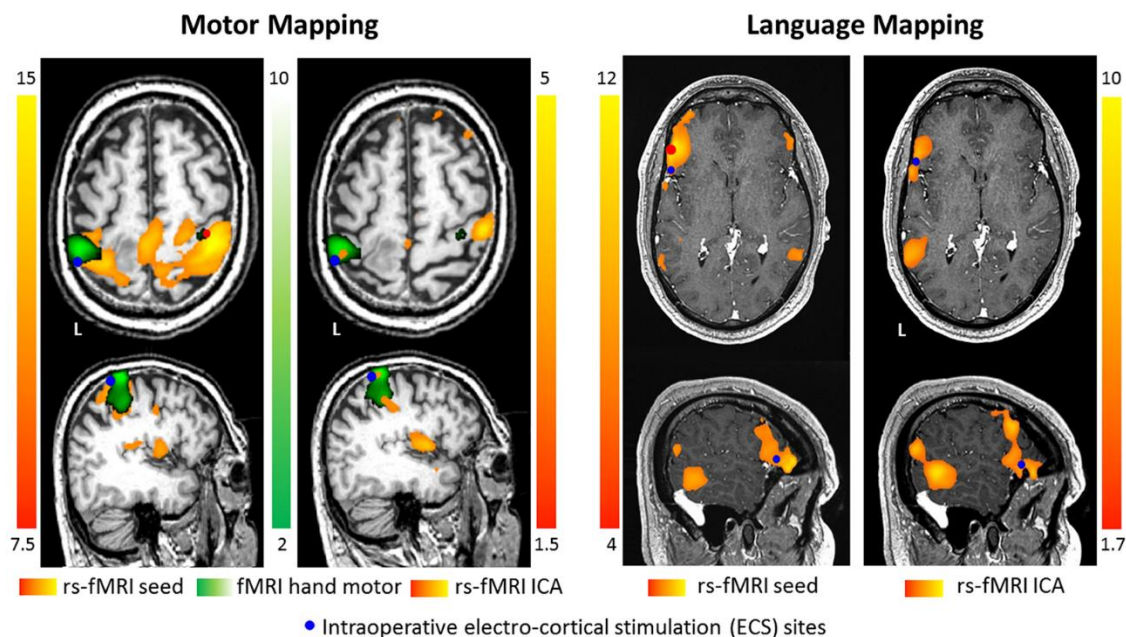


Figure 6. Carte fonctionnelles acquises en IRM-fonctionnelle, du cortex moteur et des régions cérébrales associées au langage chez l'Homme. Figure issue de (Rosazza et al. 2018)

Imagerie Optique fonctionnelle du signal intrinsèque

L'imagerie Optique du signal intrinsèque s'appuie sur la détection des modifications des propriétés optiques des tissus dues aux effets hémodynamiques observés lors d'une activation cérébrale. Elle repose sur l'enregistrement par une caméra CCD d'une image à deux dimensions de la réflectance des tissus via un ensemble de couples source-détecteur. La réalisation d'une fenêtre optique permet d'utiliser des longueurs d'ondes visibles, généralement autour de 600 à 650 nm où la pénétration dans les tissus reste importante. La méthode la plus simple pour calculer les cartes d'activation cérébrale se fait par soustraction ou par division d'une image de référence aux images contenant l'activation. On obtient alors une cartographie des zones cérébrales où les paramètres hémodynamiques ont été modifiés par rapport à l'activité basale. L'enregistrement de séquences d'images permet également d'obtenir une mesure dynamique du signal intrinsèque dans les zones activées. La résolution spatiale des cartes enregistrées est inférieure ou égale à quelques dizaines de microns ce qui a permis d'étudier avec succès tous les cortex sensoriels (Grinvald et al. 1986). Elle admet cependant une faible profondeur d'imagerie. En effet, à cause de la diffusion multiple de la lumière, au-delà de quelques micromètres de profondeur, il devient très complexe de réaliser une image. Cette méthode est réservée aux mesures en surface du cerveau avec craniotomie.

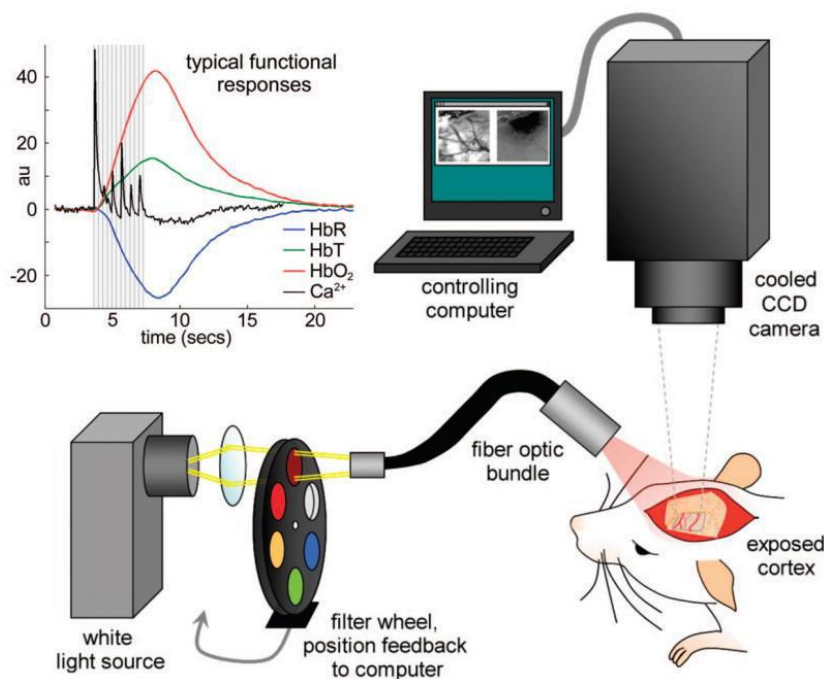


Figure 7. Configuration typique pour l'imagerie par caméra du cortex exposé. L'encart montre des réponses hémodynamiques et calcium-sensibles typiques dans le cortex somatosensoriel du rat au stimulus de la patte (d'après (Hillman 2007))

L'imagerie photoacoustique est une modalité d'imagerie émergente qui fournit des images non invasives à haute résolution (20 à 100 μm) de tout le cerveau dans un contexte préclinique en temps quasi réel (résolution temporelle 100 μs). L'imagerie photoacoustique forme des images en détectant la pression acoustique induite par l'expansion thermoélastique à la suite de l'absorption de l'énergie optique, par exemple par irradiation de la lumière laser. Par conséquent, le contraste d'image est principalement déterminé par les propriétés d'absorption de la lumière du tissu, et la fréquence d'imagerie n'est limitée que par le taux de répétition d'impulsion du laser (10 Hz à 5 kHz) et la vitesse du son dans les tissus (généralement 1,5 mm/ μs). Dans les tissus cérébraux, l'absorbeur optique dominant est l'hémoglobine, ce qui permet de réaliser de l'imagerie vasculaire sans agent de contraste. Contrairement aux méthodes optiques, cette technologie permet une neuroimagerie entièrement non invasive à faible profondeur.

L'imagerie photoacoustique permet donc une imagerie fonctionnelle basée sur l'imagerie des vaisseaux sanguins. Néanmoins, la nécessité de coupler un dispositif de détection acoustique à une source laser rend les dispositifs assez complexes et volumineux: ils ne peuvent fonctionner que sur table optique avec des animaux anesthésiés et les études sur animaux éveillés restent très peu répandues en raison de la difficulté de la mise en place du dispositif (Nadella et al. 2016). Enfin, due à la distorsion acoustique des ondes ultrasonores lors du passage du crâne, les cavités du crâne et des os dégradent nettement la qualité de l'imagerie cérébrale profonde lorsque celle-ci est faite de façon non-invasive.

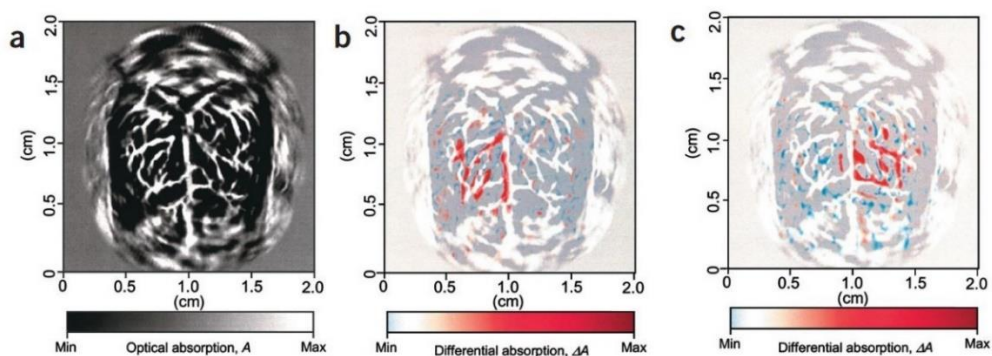


Figure 8. Imagerie fonctionnelle photoacoustique des changements hémodynamiques cérébraux suivant des stimulations de moustaches (a) Image photoacoustique d'une couche superficielle de cortex de rat acquise avec peau et crâne intacts (b,c) Image fonctionnelle photoacoustique non invasive répondant respectivement à la stimulation des moustaches du côté gauche et du côté droit (d'après (Wang et al. 2003))

1.1.3. Les défis de l'imagerie fonctionnelle de demain

Imager à haute résolution l'activité fonctionnelle cérébrale ne serait pas uniquement précieux pour la recherche en neurosciences, mais pourrait bénéficier directement aux patients souffrants de pathologies neuronales comme l'épilepsie ou la maladie d'Alzheimer. Des développements sur les méthodes existantes ou l'apparition de nouvelles méthodes sont nécessaires pour permettre la compréhension totale des mécanismes complexes du cerveau. En 2011, He et al. (He et al. 2011) concluait leur revue sur les différentes techniques d'imagerie fonctionnelles existantes alors par:

« En ce qui concerne l'avenir, un développement diversifié de nouvelles approches ainsi que des études expérimentales connexes sont nécessaires pour aborder pleinement les défis rencontrés dans l'activité cérébrale et l'imagerie de connectivité. Le développement de nouvelles techniques d'imagerie de meilleure résolution spatiale ou temporelle amélioreraient encore notre capacité à visualiser l'activité neuronale sous-jacente à des échelles temporelles et spatiales très fines. Il reste beaucoup de travail à faire pour corrélérer l'activité du réseau neural discernée avec les résultats neurophysiologiques in vivo. Que ce soit avec des modalités mesurant l'électrophysiologie ou l'hémodynamique, il y a un besoin d'outils d'analyse pour étudier les réseaux de connectivité cérébrale à l'état de repos et dans d'autres conditions de travail. Un tel développement de techniques d'imagerie non-invasive à haute résolution spatio-temporelle aurait un impact significatif sur les neurosciences fondamentales et médicales, pour mieux comprendre les mécanismes de perception, d'attention, d'apprentissage, etc.. »

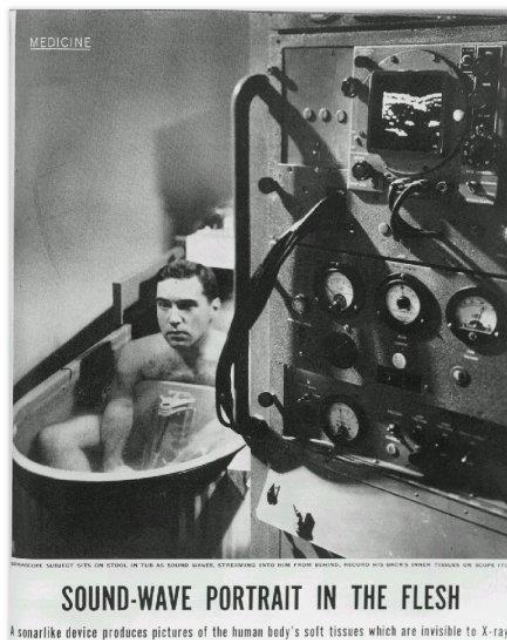
1.2. L'imagerie fonctionnelle ultrasonore

Un des buts principaux de cette thèse fut de continuer le développement de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore préclinique chez le rongeur. L'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) fut introduite dans notre laboratoire en 2011 (Macé et al. 2011) et a ouvert la voie à une nouvelle modalité d'exploration dynamique de l'activité cérébrale. Dans cette section, nous présenterons en détail cette modalité issue de l'échographie traditionnelle.

1.2.1. Principes généraux de l'échographie

1.2.1.1. Histoire de l'échographie

L'étude de la propagation des ondes sonores naît en 1830, lorsque Jean-Daniel Colladon en étudie les propriétés pour la première fois sur le lac Léman à Genève. Il parvient à déterminer la vitesse de propagation du son dans l'eau. Cette découverte fut essentielle dans le développement de plusieurs outils reposant sur l'émission et la réception d'ondes sonores. S'en suit 10 ans plus tard en 1840, la découverte par Christian Doppler de l'effet éponyme. Et en 1880, Pierre Curie découvre l'effet piézo-électrique d'un cristal soumis à une impulsion électromagnétique. Toutes ces découvertes ont permis à Paul Langevin, en 1910, d'étudier la propagation et la réflexion des ondes sur des objets. Ces recherches donnèrent naissance au système de détection anti sous-marin SONAR (« SOund NAvigator Ranging » ou « Navigation dirigée par le son »), technique très largement développée en raison des deux guerres mondiales. Dans les années 1950, l'échographie diagnostique fait ses débuts au niveau du cœur et du sein, bien que les développements intéressants aient lieu surtout dans le domaine de la gynécologie obstétrique. En 1957 au Royaume Uni, l'ingénieur Tom Brown et le gynécologue Ian Donald inventent un appareil à balayage manuel pour l'examen du corps : la première sonde échographique.



Le Somascope original de Howry, Bliss, Posakony et Cushman apparaît dans la section Médecine du Life Magazine® en 1954. Le Somascope est un scanner motorisé à immersion d'eau en B-mode. Cette image montre le système en fonctionnement. Posakony était le sujet et son rein scanné peut être vu sur l'écran de l'oscilloscope.

Afin d'éviter le passage des ondes par l'air les premiers examens échographique se déroulent dans des baignoires. Et ce jusqu'en 1963, avec l'apparition des appareils d'échographie à bras articulé permettant un examen « au sec » avec l'utilisation d'un gel spécial. Avec le perfectionnement des outils de traitements de l'information, les progrès dans le domaine de l'informatique, on obtient des images de plus en plus détaillées et contrastées.

1.2.1.2. Principe physique de l'échographie standard

Avec l'échographie dite "standard", l'image d'une coupe en deux dimensions du corps humain est acquise en concentrant, séquence par séquence, l'énergie ultrasonore le long de différentes lignes de faisceaux. Chaque faisceau est créé par une barrette composée de N transducteurs piezo-électriques (généralement entre 64 et 256) contrôlés électroniquement. Le principe d'acquisition se déroule en deux étapes distinctes :

L'émission : Les transducteurs de la barrette émettent un signal identique mais décalés dans le temps les uns par rapport aux autres. Leur loi de retard est calculée afin que tous les signaux arrivent en même temps au même point, c'est-à-dire à la focale du signal ultrasonore créé par la barrette. Le processus (réalisé par l'échographe) qui consiste à calculer la loi de retard est appelé couramment « **beamforming en émission** » (traduction de "formation de faisceaux")

La réception : Suite à cet éclairage, les signaux sont rétrodiffusés par le milieu. Ils sont enregistrés par les N éléments de la même barrette et numérisés. Il en découle une matrice spatio-temporelle appelée matrice de « signaux RF » (Radio- Fréquence). Elle contient la signature acoustique brute de la ligne du milieu éclairée par le faisceau. L'échographe applique ensuite le « **beamforming en réception** » (ou formation de voies) aux données brutes pour obtenir la signature acoustique de la ligne sondée. Cela consiste d'abord à décaler les signaux dans le temps afin de mettre en phase toutes les réponses acoustiques provenant d'une même profondeur donnée de la ligne, puis à sommer ces signaux sur l'ensemble des voies.

Nous utiliserons pas la suite, pour l'ensemble de ce manuscrit l'anglicisme **beamforming** pour désigner le processus de formation de voies.

On réitère ces deux étapes pour chaque ligne de l'image échographique et l'image finale obtenue est donc la juxtaposition des lignes ainsi calculées. Le nombre de lignes de l'image correspond alors au nombre de transducteurs N de la barrette échographique utilisée.

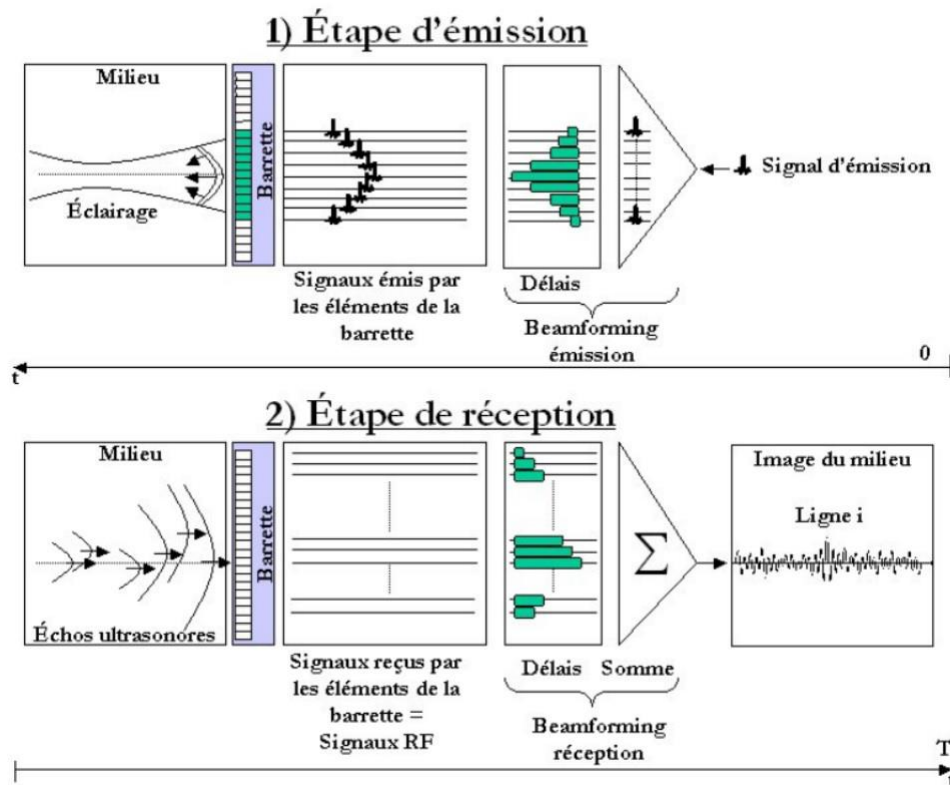


Figure 9. Deux étapes constituent l'acquisition en échographie standard :(1):l'émission d'un signal focalisé (2): La réception des échos de la ligne du milieu éclairée par les ultrasons (Issue de (Bercoff et al. 2004))

Notion de cadence d'imagerie

Le temps d'acquisition d'une **ligne de l'image** est fixé par le temps d'aller-retour des signaux ultrasonores jusqu'à la profondeur maximale imagée. Il est de l'ordre de quelques dizaines de microsecondes. Le temps d'acquisition d'une image échographique ne peut donc être inférieur à N fois le temps d'acquisition d'une ligne. Il est classiquement de l'ordre de **quelques dizaines de millisecondes**. Ainsi par exemple si la vitesse des ultrasons dans le milieu considéré est de 1500 m/s, et si la profondeur de l'image dans le tissu est de 60 mm, alors le temps d'acquisition d'une ligne est de 80 μ s. Le temps d'acquisition d'une image avec une barrette linéaire de 128 éléments est donc de 10 ms, soit une cadence maximale d'imagerie de 100Hz.

Le mode d'échographie le plus connu et le plus couramment utilisé est le mode brillance ou mode-B (ou encore **B-mode**). L'image obtenue en mode-B est une image en deux dimensions des structures traversées. Les points lumineux de l'image sont affichés en échelle des gris: ils sont transcrits selon leur intensité sous forme d'une gamme de nuance allant du blanc (milieu très échogène) au noir (anéchoïque). L'échographe **balaye le milieu avec un faisceau focalisé** afin d'obtenir l'image entière du plan à observer.

Plusieurs régions de l'organisme sont ainsi très bien explorées par échographie mode-B: l'abdomen et les systèmes urinaire et génital. Différents organes tels que les reins et le foie, ou encore le cœur, sont particulièrement bien étudiés. Son usage le plus connu du grand public et sans doute le plus populaire, reste le suivi de la grossesse.

Néanmoins elle ne permet pas de suivre l'activité rapide des organes observés si la cadence d'imagerie nécessaire est nettement supérieure à 100 Hz. Le balayage du milieu par le faisceau ultrasonore focalisé limite en effet la cadence. De plus, l'air ou les structures à base de calcium (comme les os) se comportent comme des barrières à la propagation et absorbent des ondes sonores ce qui empêche l'analyse des organes à l'ombre de ces structures.

1.2.2. Imagerie ultrarapide par ondes planes

1.2.2.1. Principe de l'imagerie ultrarapide par ondes planes

Grâce à ses performances et son faible coût, le mode d'échographie standard fut pratiquement le seul mode d'acquisition utilisé en échographie avant les années 2000. La cadence d'acquisition des images était cependant insuffisante pour permettre de voir les **phénomènes rapides du corps** comme la propagation d'ondes mécaniques ou certains flux sanguins très rapides notamment dans le cœur.

L'imagerie par ondes planes

Le mode "onde plane" a été proposé dès la fin des années 1980 (Shattuck et al. 1984) comme nouvelle stratégie d'insonification rapide d'un milieu et validé expérimentalement une vingtaine d'années plus tard (Sandrin et al. 2002; Tanter et al. 2002) : au lieu d'envoyer N ondes focalisées pour imager un plan, l'échographe envoie une seule onde plane dans le milieu d'intérêt. Cette onde est créée par les N transducteurs de la barrette échographique qui envoient en même temps la même impulsion sonore. L'onde se

rétrodiffuse ensuite sur tous les diffuseurs du plan traversé et les échos retours sont enregistrés sur une mémoire RAM pendant tout le temps de rétrodiffusion. On peut ensuite *beamformer* sur la base d'un calcul de retard et **sommation toute l'image d'un coup** plutôt que de *beamformer* une seule ligne après l'insonification d'un seul faisceau focalisé.

Ainsi, au lieu de sonder le milieu et de reconstruire l'image ligne par ligne, le milieu est sondé par une seule onde plane échographique et la reconstruction ne s'applique qu'une seule fois, à tous les échos enregistrés provenant de ce seul tir d'onde (Tanter and Fink 2014). Le facteur gain de temps pour faire l'image échographique de tout un plan est donc équivalent au nombre d'éléments de la sonde: les sonde classiques de 128 transducteurs admettent donc en théorie un facteur 128 de gain de temps. Cette nouvelle méthode d'imagerie a alors été appelée **imagerie ultrarapide** en référence à l'insonification ultrarapide de tout le plan d'imagerie. La dynamique du milieu peut alors être suivie avec une bien plus haute cadence d'imagerie (voir Figure 10).

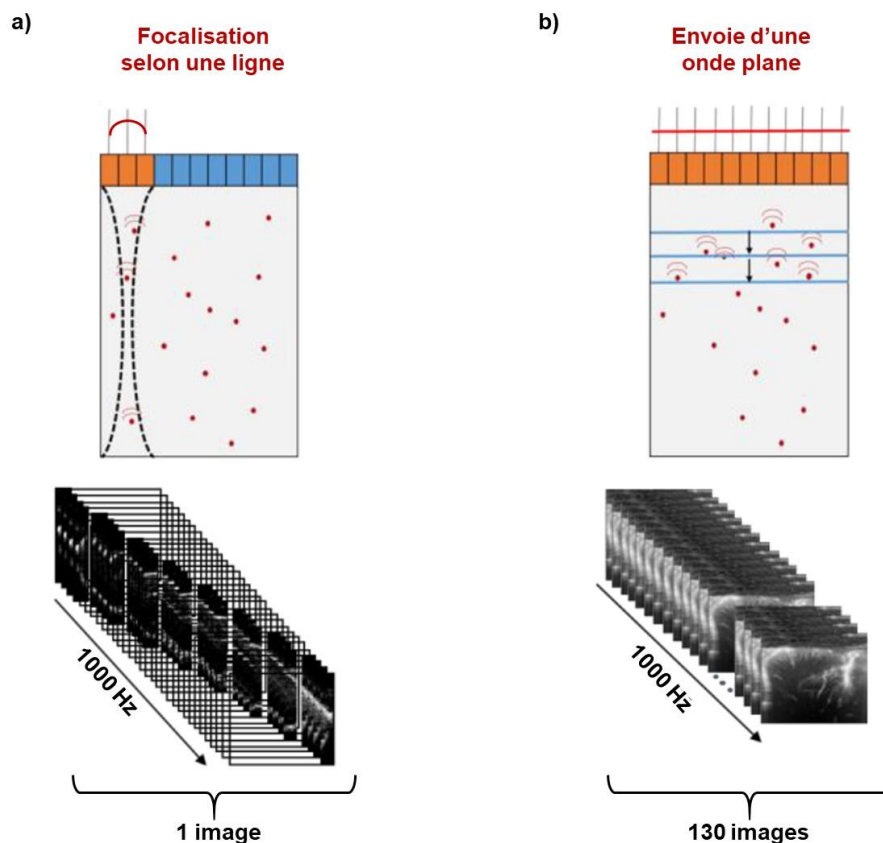


Figure 10. a) Acquisition échographique conventionnel. Les transducteurs piézoélectriques focalisent ligne par ligne un faisceau ultrasonore dans le milieu afin de sonder tout le plan d'imagerie. Une image est obtenue en environ 0.25 s b) Acquisition par ondes planes. Le plan d'imagerie est entièrement insonifié à chaque tir par une onde plane. La cadence d'imagerie est ainsi bien plus élevée et est équivalente à la cadence de tir.

En imagerie médicale, l'imagerie ultrarapide par ondes planes fut d'abord développée pour l'élastographie. La rapide cadence d'acquisition permettait alors de suivre la propagation d'ondes de cisaillement provoquées par une forte pression ultrasonore. La vitesse des ondes se propageant dans un milieu étant directement reliée à la dureté de ce milieu (voir Chapitre 4), il a été démontré en 2004 que l'on pouvait évaluer l'élasticité des tissus en imageant à haute cadence les ondes de cisaillement s'y propageant (Bercoff et al. 2004).

Cette cadence d'imagerie permet de voir les phénomènes rapides qui étaient alors invisibles: le terme ultrarapide désigne la rapidité de la séquence d'acquisition qui permet de visualiser des phénomènes rapides. Les premières années pourtant (il fallut attendre 2008 pour traiter en temps réel les images d'ondes de cisaillement), le traitement des séquences d'imageries étaient plus lents que la vitesse d'acquisition: l'imagerie n'était alors pas en temps-réel. La puissance des ordinateurs de calculs augmentant linéairement au fil des ans (Loi de Moore), les séquences d'acquisition ondes planes en 2D d'aujourd'hui sont calculées en temps réel.

Le “*Coherent Compounding*”

Envoyer des ondes planes dans le milieu présente cependant le désavantage de ne plus focaliser les ondes dans le milieu lors de l'émission. La focalisation est dite “en réception” puisqu'on calcule la contribution de chaque pixel dans les échos retours pendant l'étape de *beamforming*. L'énergie n'est plus focalisée le long d'une ligne, mais répartie dans tout le plan imagé: cela engendre une perte de contraste et de résolution pour l'image reconstruite finale.

Pour répondre à cette problématique, Mickaël Tanter et al (Tanter et al. 2002) ont proposé en 2002 une méthode de transmission ultrarapide d'ondes planes avec différents angles. Ce mode “Ultrafast Compound” permettait d'améliorer la qualité d'estimation de mouvement des tissus notamment pour avoir accès à une information vectorielle sur les champs de déplacement. En 2009, Gabriel Montaldo et al. (Montaldo et al. 2009) proposèrent d'utiliser ces transmissions d'ondes planes de différentes inclinaisons pour augmenter la résolution et le contraste de l'image. Il s'agit de la méthode de ***coherent compounding*** : le principe étant de transmettre dans le milieu une combinaison de différentes ondes planes inclinées individuelles puis de recombinaison les images acquises par sommation cohérente (Figure 11.a) pour récupérer des images échographiques de haute qualité (Figure 11.b).

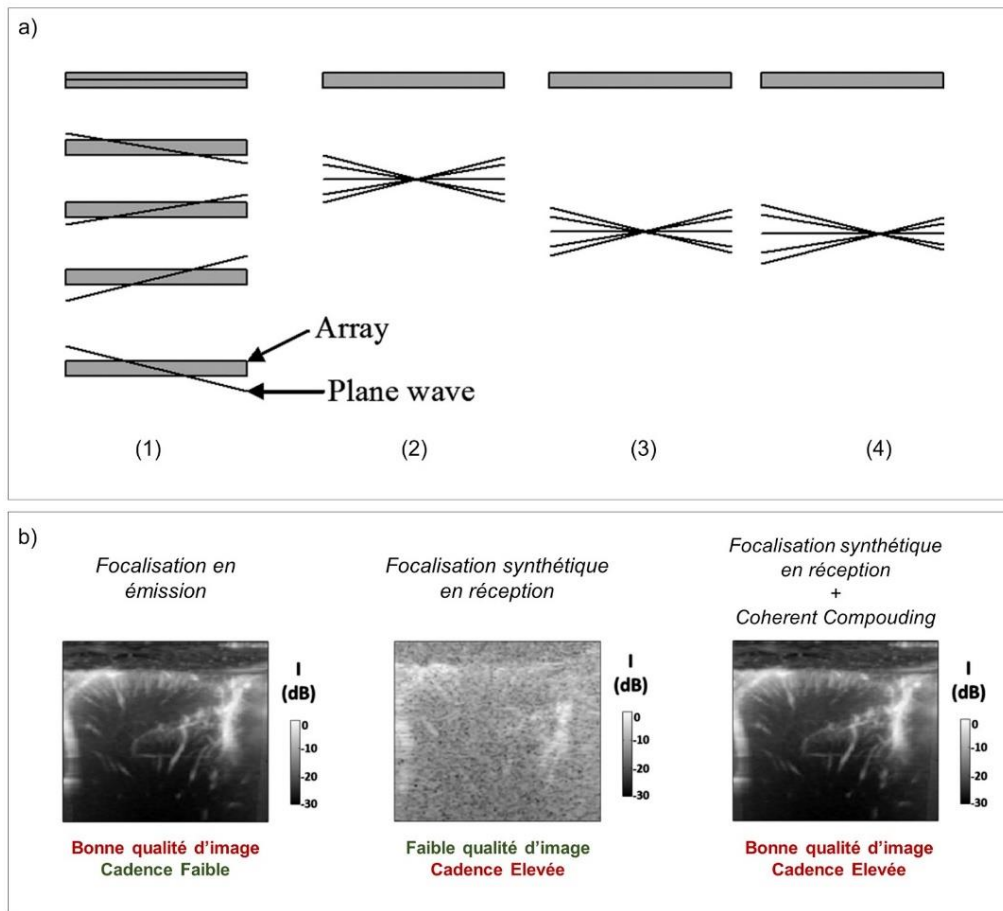


Figure 11. a) Méthode de *Ultrafast Coherent Compounding* (1) : Transmission: Ondes planes inclinées envoyées individuellement dans le milieu. (2) (3) et (4) : La sommation des ondes planes avec les retards adéquats permet de focaliser à différentes profondeurs et latéralement. C'est donc une focalisation synthétique. b) Comparaison des différentes méthodes de focalisation sur images peropératoires d'un Homme après ouverture d'une fenêtre crânienne

En pratique, cela compromet légèrement la cadence d'imagerie puisqu'il a été montré que la transmission d'une dizaine à une quarantaine (dépendant des paramètres) d'ondes planes inclinées individuelles était nécessaire pour obtenir une image avec exactement le même contraste qu'avec la focalisation en émission. Nous verrons que dans les applications qui concernent ce sujet de thèse, nous utilisons entre 8 et 12 ondes planes inclinées. La cadence d'imagerie reste donc nettement supérieure à celle de l'imagerie focalisée (~500 Hz) et permet une excellente sensibilité spatiotemporelle pour les applications présentées par la suite.

1.2.2.2. Première application en élastographie et intérêt clinique

La première application clinique de l'imagerie ultrarapide a été introduite dans le domaine de l'imagerie d'élasticité.

L'imagerie ultrarapide permet de filmer avec une très haute cadence des événements rapides transitoires. En 2004, Bercoff et al. (Bercoff et al. 2004) ont proposé de combiner l'avantage la palpation à distance induite par la force de rayonnement acoustique (Nightingale et al. 2002) avec celle de l'élastographie transitoire (Bercoff et al. 2003) en une technique appelée élastographie supersonique par ondes de cisaillement (Supersonique Shear Imaging (SSI) en anglais) (voir Chapitre 4).

En bref, l'application de focalisations ultrasonores successives à différentes profondeurs dans un tissu mou va créer par interférence un cône de Mach ultrasonore. Ce cône de Mach génère une onde de cisaillement cylindrique en trois dimensions perpendiculaire à la ligne des foyers de focalisations. Cette onde apparaît comme deux fronts d'onde plans dans le plan d'imagerie observé, qui se déplacent dans des directions opposées (Figure 12). Leurs vitesses de propagation v_c est directement relié à la rigidité μ du milieu biologique traversé par:

$$\begin{aligned} v_c &= \sqrt{\frac{\mu}{\rho}} \\ &= \sqrt{\frac{E}{3 \cdot \rho}} \end{aligned}$$

dans un milieu quasi-incompressible (hypothèse dans les tissus biologiques essentiellement composés d'eau).

où :

μ = module de cisaillement (=rigidité)

E = Module d'Young

$= \frac{\sigma}{\epsilon}$ avec : σ = la contrainte appliquée au milieu et ϵ = la déformation du milieu

ρ = masse volumique ($\sim 1000 \text{ kg/m}^3$ dans les tissus biologiques)

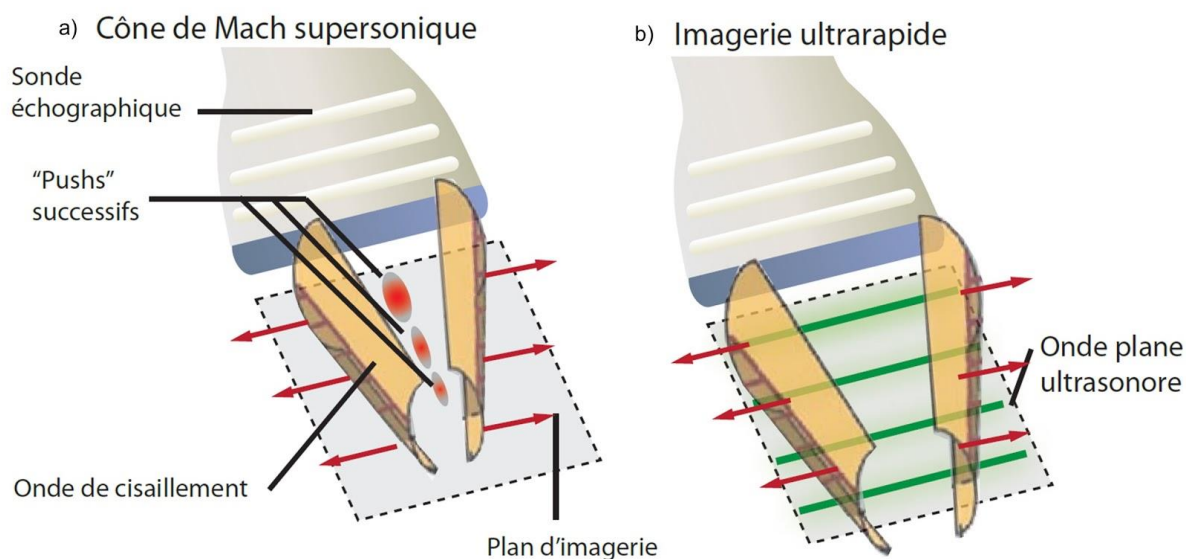


Figure 12. Principe de l'imagerie supersonique par ondes de cisaillement a) Les ultrasons sont focalisés successivement à des profondeurs différentes pour créer des poussées par pression de radiation ("pushs"). Les interférences constructives des ondes de cisaillement forment un cône de Mach supersonique (dans lequel la vitesse de la source est supérieure à celle de l'onde générée) et une onde plane de cisaillement est créée. b) L'échographe passe ensuite en mode d'imagerie ultrarapide pour suivre l'onde de cisaillement qui se propage dans le milieu (issue de (Deffieux 2008))

L'acquisition ultrarapide permet d'imager immédiatement après la création du cône de mach les images B-mode du tissu avec une cadence d'imagerie très rapide (Figure 12.b). En corrélant ensuite les images échographiques le long d'une fenêtre temporelle, on peut détecter la propagation de l'onde de cisaillement. On utilise en effet la phase de l'interférence entre une l'image de speckle obtenue à un temps t et celle obtenue au temps $t+dt$ pour comparer les deux états du tissu et en déduire le déplacement entre les deux instant: c'est l'**interférométrie de speckle** (ou "interférométrie des tavelures": mise au point en 1970 par Antoine Labeyrie).

L'élastographie supersonique par ondes de cisaillement a été évaluée dans le domaine clinique depuis plus de 10 ans. En effet, la variation du module de Young dans les tissus biologiques offre un contraste bien plus intéressant que l'échographie conventionnelle. L'élastographie par ondes de cisaillement fournit une nouvelle caractéristique pour **évaluer la rigidité des tissus** et a montré que l'élasticité des tissus est d'une grande valeur pour le diagnostic de caractéristique de tissus comme la distinction entre tumeur bénigne et maligne sans nécessité de biopsie (examen invasif et douloureux). Cette

technique a notamment abouti à la création en 2005 de la compagnie SuperSonic Imagine® par les chercheurs à son origine. La première publication clinique a été réalisée dans le cadre du diagnostic du cancer du sein et a démontré sur une vingtaine de patientes la possibilité de réaliser un diagnostic beaucoup plus fiable en combinant à la fois les paramètres échographiques et l'imagerie de dureté des tissus (Tanter et al. 2008). Les échographes commercialisés par SuperSonic Imagine® permettent aux médecins de visualiser et de quantifier la rigidité des tissus en temps réel, de façon fiable et reproductible. Depuis 2008, près de 400 publications ont démontré l'intérêt de l'élastographie par onde de cisaillement pour la gestion clinique des patients dans un large éventail de maladies.

1.2.3. L'imagerie fonctionnelle ultrasonore cérébrale

L'imagerie échographique ultra-rapide a révolutionné plusieurs domaines de la médecine, et celui qui peut apparaître comme le plus improbable quand on pense à l'échographie est celui des neurosciences. Si l'échographie doppler est connue notamment pour l'étude des artères du cou, de l'aorte ou des artères et veines des membres inférieurs, elle est également utilisée en examen clinique en transcrânien en mode Doppler pour évaluer le flux dans l'artère cérébrale moyenne, l'artère cérébrale antérieure ou l'artère cérébrale postérieure.

En 2011, Mace et al (Macé et al. 2011) ont réalisé la preuve de concept d'une nouvelle modalité d'imagerie cérébrale préclinique chez le rongeur permettant d'accéder avec une excellente résolution spatio-temporelle à la dynamique vasculaire du cerveau: l'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS).

1.2.3.1. Du principe Doppler à l'imagerie Doppler Puissance

L'application médicale de l'effet doppler, découvert en 1843 par Johann Christian Doppler, n'est apparue que dans les années 1960. Depuis quelques années, les progrès techniques ont conduit à différentes techniques d'imagerie utilisant directement ou indirectement l'effet doppler: le doppler continu, le doppler pulsé, le doppler couleur, doppler puissance. L'imagerie fonctionnelle ultrasonore est une technique de **Doppler Puissance**.

Rappelons le principe de l'effet Doppler et présentons les principales techniques d'imagerie médicales échographique l'utilisant.

L'effet Doppler

L'effet doppler est un changement de fréquence d'une source d'onde lorsqu'il y a déplacement relatif de la source ou de l'observateur. La fréquence perçue par l'observateur est différente de la fréquence émise : elle augmente si la source ou l'observateur se rapproche, elle diminue en cas contraire. L'application médicale de l'effet doppler n'est réalisée que vers les années 1960 avec l'utilisation d'ondes ultrasonores. Ainsi lorsqu'un faisceau d'ultrasons émis par une source rencontre une cible fixe, la fréquence réfléchi par cette cible est identique à la fréquence émise. Quand la cible se déplace, la fréquence réfléchi est différente de la fréquence émise. Cette différence F_d entre la fréquence d'émission de la sonde F_e et la fréquence de réception F_r s'appelle fréquence doppler. F_d est exprimée en hertz (Hz) et s'exprime comme:

$$1. \quad F_d = (F_r - F_e) = \frac{2 \cdot F_e \cdot V \cdot \cos(\theta)}{c}$$

Avec : θ = angle entre la direction de déplacement de la source et l'horizontale

V = vitesse de déplacement de la source

c = vitesse des ultrasons dans le milieu

Ainsi, l'effet Doppler peut être utilisé pour déceler tout mouvement dans le milieu imagé. Si l'on connaît l'ordre de grandeur de la vitesse des sources en mouvement à détecter, on peut filtrer les fréquences doppler hors de la bande spectrale d'intérêt et ne conserver que l'information du mouvement des sources à étudier. Cela permet donc par exemple de détecter le flux sanguin dans un vaisseau: les ultrasons se réfléchissant sur les globules rouges.

Le choix de la fréquence d'émission résulte d'un compromis entre l'atténuation de l'onde ultrasonore (fonction de la fréquence et de la profondeur) et la résolution spatiale qui est d'autant meilleure que la fréquence est élevée. On notera de plus que le paramètre implique que l'on ne reçoit théoriquement aucun signal doppler d'un vaisseau perpendiculaire à l'axe d'émission de l'onde ultrasonore.

Doppler Continu

Le principe de l'imagerie en Doppler Continu (Figure 13.a) est d'insonifier en continu une ligne ultrasonore à une fréquence donnée et d'en écouter les fréquences retour. L'équation (1) permet de retrouver la vitesse des éléments en mouvement. Le Doppler Continu permet la détection des vitesses les plus rapides dans le milieu, mais admet le gros désavantage de ne pas pouvoir fournir d'information en profondeur.

La variation de fréquence du faisceau incident résulte en effet de la sommation de tous les flux rencontrés sur le trajet du faisceau ultrasonore. Il y a donc ambiguïté en profondeur.

Doppler pulsé

Pour palier à l'ambiguïté sur la profondeur du Doppler Continu, le Doppler pulsé (Figure 13.b) émet un faisceau ultrasonore puis arrête son émission et passe en mode réception pour écouter les signaux réfléchis par le milieu. Cette nouvelle séquence d'émission change la façon de percevoir le mouvement: l'information du mouvement n'est plus donnée par la variation de la fréquence reçue, mais est mesurée grâce à la variation de phase des données pulsées en quadrature de phase reçues. C'est le principe des de la **modulation IQ**. Nous développons ce principe dans le paragraphe 1.2.3.2: **Le Signal IQ** qui suit.

Le délai entre deux impulsions détermine la fréquence de répétition. Ce délais est communément appelé la **PRF** (pour Pulse Repetition Frequency),

où:
$$PRF = \frac{c}{2.d}$$

avec: c = vitesse des ultrasons dans le milieu

d = profondeur jusqu'à laquelle on souhaite imager

La PRF détermine donc la profondeur du champ d'exploration, car il faut attendre le retour de tous les échos avant d'émettre une nouvelle impulsion. Les échos venant des zones les plus profondes fixent ainsi l'intervalle de temps à respecter avant un nouveau tir. La PRF détermine également la sensibilité aux flux. Une PRF basse est nécessaire pour explorer en profondeur et détecter des flux lents. Une PRF élevée est nécessaire pour bien analyser les flux rapides.

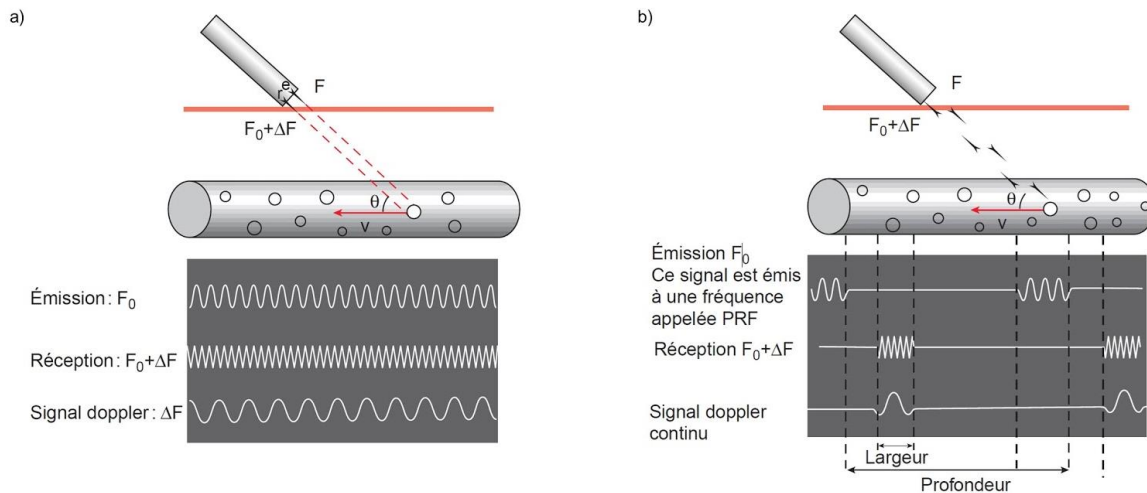


Figure 13. Principe de l'imagerie par Doppler Continu et par Doppler Pulsé a) Courbes de vitesses obtenues sur un doppler continu b) Schéma d'un doppler pulsé. L'émission spectrale du signal F_0 est discontinue et inversement proportionnelle à la profondeur. Le nombre de signaux émis par seconde est la PRF.

Doppler couleur

L'imagerie par Doppler couleur est une application du Doppler Pulsé. Elle se déroule en deux étapes: 1-visualisation par échographie en mode-B des contours des organes du plan imagé, puis 2-délimitation d'une zone dans un vaisseau sanguin pour l'estimation de la vitesse du flux dans le vaisseau. Limiter la surface de de l'image à analyser permet la réduction en profondeur et donc l'augmentation de la PRF, et la réduction en largeur afin diminuer le nombre de lignes à balayer. La couleur visible à l'intérieur du vaisseau reflète à la fois la vitesse du sang et sa direction par rapport à la sonde (Figure 14): tout ce qui va vers la sonde d'échographie est coloré en rouge et tout ce qui s'en éloigne en bleu.

Doppler Puissance

Dans cette technique, qui est également une application du Doppler Pulsé: la donnée obtenue n'est pas reliée à la vitesse ou au sens mais à **l'intensité du mouvement**. Pour le Doppler Puissance, on s'intéresse donc à l'aire sous l'enveloppe du signal temporel reçu (Figure 14). Le principe est de déterminer une fenêtre de temps sur laquelle se fera l'intégration temporelle et de reporter dans chaque pixel la valeur de l'aire sous la courbe du signal doppler reçu par ce pixel. On obtient donc **la puissance du signal doppler**. L'intensité du signal est plus élevée qu'en doppler fréquentiel, mais toute notion

hémodynamique est perdue. En revanche, le doppler puissance admet une quasi-indépendance vis-à-vis de l'angle et une sensibilité plus élevée aux flux ce qui permet de bien visualiser les vaisseaux, même si leur trajet est sinueux. Toutefois, la cadence d'image obtenue est faible puisqu'il faut mesurer plusieurs points temporels par pixel avant d'obtenir une valeur de doppler puissance.

Le temps pour former une image ne dépend plus que du temps d'aller-retour en profondeur et du temps de balayage de l'image du faisceau ultrasonore mais aussi maintenant du nombre de points temporels nécessaires à l'intégration temporelle.

L'imagerie Doppler Puissance permet donc en théorie d'imager la vascularisation d'un cerveau. Chez le rongeur par exemple, un temps d'intégration du signal doppler d'environ 400 ms serait nécessaire pour moyennner la valeur de puissance sur plusieurs cycles cardiaques. Cependant, comme le faisceau ultrasonore balaye le cerveau pendant ces 400ms, seuls une dizaine de points temporels par pixel peuvent être acquis pendant cette fenêtre temporelle (Figure 16.a).

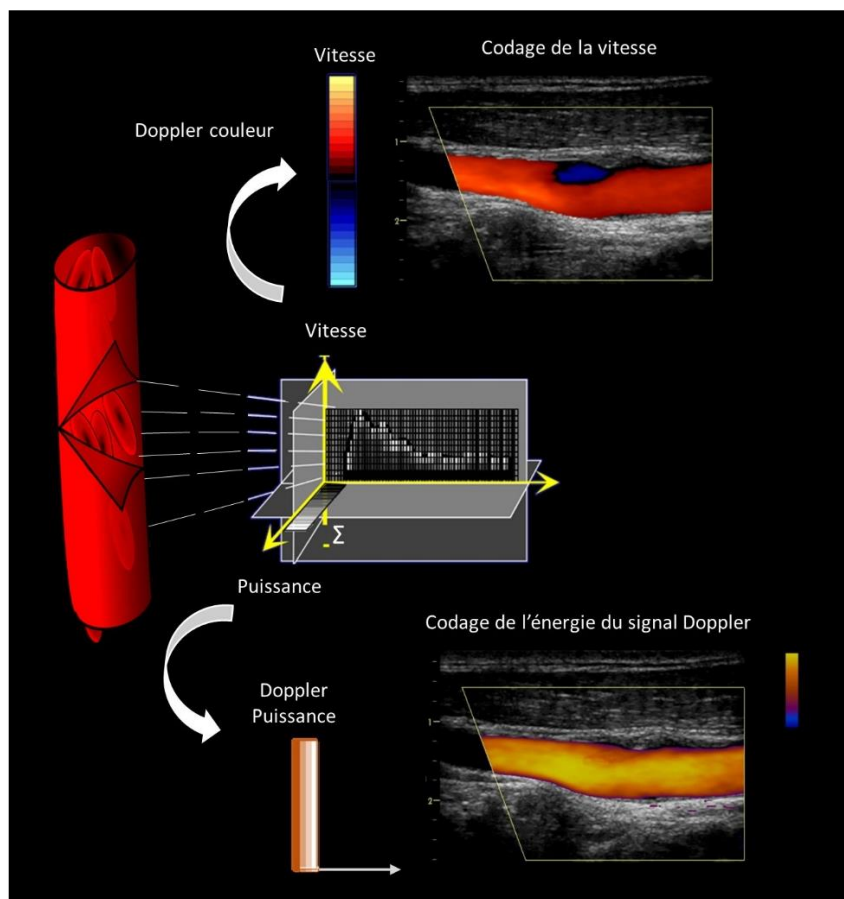


Figure 14. Différence entre le Doppler Couleur et le Doppler Puissance: le Doppler Couleur évalue le spectre du signal Doppler pulsé pour coder la vitesse dans un vaisseau, tandis que le Doppler Puissance somme tout le signal temporel dans un vaisseau pour en sortir l'énergie dans un laps de temps donné.

1.2.3.2. Le Signal IQ

Afin d'extraire des informations des échos reçus du milieu insonifié par une séquence de Doppler Pulsé (pour obtenir la vitesse en Doppler Couleur ou l'intensité du mouvement Doppler Puissance des particules en mouvement dans le milieu), il est nécessaire de bien choisir la "séquence de pulse". En effet, l'information du mouvement d'un objet dans le milieu ne peut plus être obtenue avec un signal continu: il faut donc réussir à mesurer une porteuse du signal qui contient l'information de la vitesse que l'on démodule ensuite. Dans le cas du Doppler Pulsé, le signal RF utilisé pour le *beamforming* doppler est le résultat d'une modulation IQ (**In-phase Quadrature**) ou **modulation de phase en quadrature**. C'est une forme de modulation de phase d'une porteuse par composition de deux signaux modulateurs déphasés l'un de l'autre de $\pi/2$: en quadrature de phase (Figure 15).

En pratique pour récupérer des signaux en quadrature de phase, si l'on envoie dans le milieu un train d'onde à f_0 , on échantillonne le signal renvoyé par le diffuseur (sinusoïde de fréquence f_0) à une fréquence d'échantillonnage de $4*f_0$, et 2 échantillons consécutifs sont bien en quadrature de phase.

Ce sont les phases de deux signaux consécutifs modulateurs qui portent l'information sur le milieu que traverse l'onde: nous les appellerons ici RF1 et RF2 (les deux composantes du signal RF: voir Figure 15) :

- Si le diffuseur qui renvoie l'onde est **immobile au cours du temps** (Figure 15.a), le signal renvoyé revient toujours au même moment. Et l'échantillonnage du signal par RF1 et RF2 est toujours à la même phase du pulse retour. RF1 et RF2 sont donc **constants au cours du temps**.
- Si le diffuseur **est en mouvement** (Figure 15.b), le pulse diffusé est enregistré avec un décalage au cours du temps. Ce décalage est proportionnel à la vitesse du diffuseur vers la sonde. RF1 et RF2 échantillonnent le pulse retour à des phases différentes de la sinusoïde à chaque acquisition: **ils oscillent tous deux à la fréquence Doppler**.

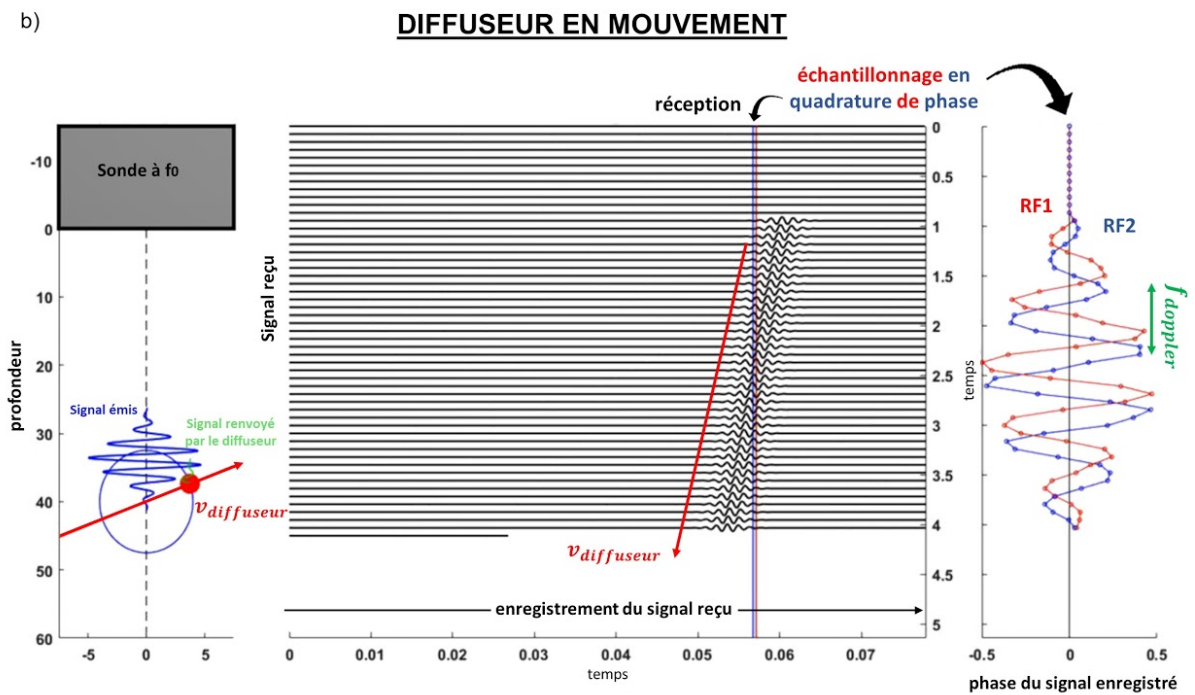
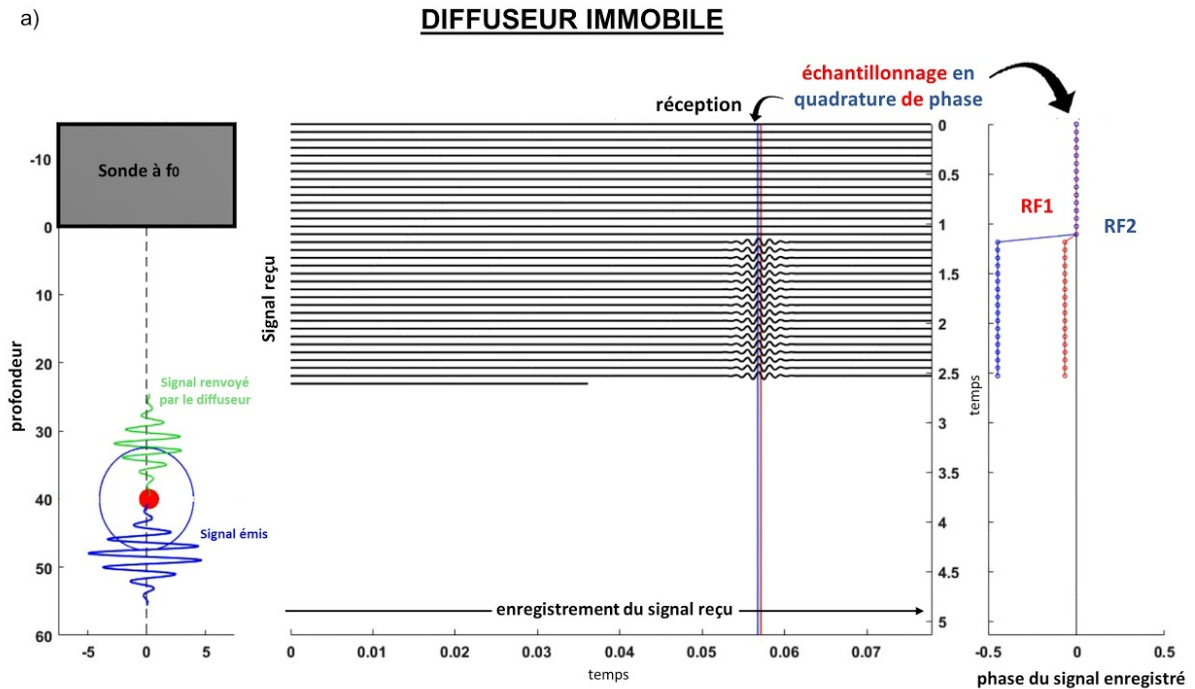


Figure 15. Principe du Signal IQ. Un pulse fréquentiel est envoyé dans le milieu et renvoyé par un diffuseur. Le signal est échantillonné en quadrature de phase a) Si le diffuseur est immobile, les signaux reçus RF1 et RF2 admettent une phase constante au cours du temps. b) Si le diffuseur se déplace, RF1 et RF2 oscillent à la fréquence Doppler. *Image retouchée avec la permission de Jérôme Baranger*

Démoduler les signaux RF1 et RF2 pour en extraire les informations voulues nécessite un peu de trigonométrie:

Commençons par l'égalité:

$$\cos(a + b) = \cos(a) \cdot \cos(b) - \sin(a) \cdot \sin(b)$$

où : a : représente la phase instantanée de l'onde renvoyée par le diffuseur à f_0

b : représente le signal de la porteuse modulante (de fréquence f_{doppler})

Posons : $a = 2 \cdot \pi \cdot f_0$ et $b = \varphi(t)$, il vient :

$$\cos(2\pi f_0 t + \varphi(t)) = \cos(2\pi f_0 t) \cdot \cos(\varphi(t)) - \sin(2\pi f_0 t) \cdot \sin(\varphi(t))$$

Puis en posant : $I(t) = \cos(\varphi(t))$ et $Q(t) = \sin(\varphi(t))$, l'équation devient :

$$\cos(2\pi f_0 t + \varphi(t)) = \cos(2\pi f_0 t) \cdot I(t) - \sin(2\pi f_0 t) \cdot Q(t)$$

On peut avoir le même raisonnement en utilisant la formule:

$$\sin(a + b) = \cos(a) \cdot \sin(b) + \cos(b) \cdot \sin(a)$$

On obtient alors le système suivant :

$$\begin{cases} \cos(2\pi f_0 t + \varphi(t)) = \cos(2\pi f_0 t) \cdot I(t) - \sin(2\pi f_0 t) \cdot Q(t) \\ \sin(2\pi f_0 t + \varphi(t)) = \sin(2\pi f_0 t) \cdot I(t) + \cos(2\pi f_0 t) \cdot Q(t) \end{cases}$$

qui est équivalent à:

$$\begin{cases} \cos(2\pi f_0 t + \varphi(t)) = \cos(2\pi f_0 t) \cdot I(t) + \cos\left(2\pi f_0 t + \frac{\pi}{2}\right) \cdot Q(t) \\ \sin(2\pi f_0 t + \varphi(t)) = \sin(2\pi f_0 t) \cdot I(t) + \sin\left(2\pi f_0 t + \frac{\pi}{2}\right) \cdot Q(t) \end{cases}$$

Dans chaque équation, on voit alors que les signaux $I(t)$ et $Q(t)$ sont appliqués à des signaux en quadrature de phase. $\cos(2\pi f_0 t + \varphi(t))$ et $\sin(2\pi f_0 t + \varphi(t))$ correspondent donc aux signaux modulants que l'on a mesuré: RF1 et RF2.

$$\begin{cases} RF1 = \cos(2\pi f_0 t) \cdot I(t) - \sin(2\pi f_0 t) \cdot Q(t) \\ RF2 = \sin(2\pi f_0 t) \cdot I(t) + \cos(2\pi f_0 t) \cdot Q(t) \end{cases}$$

Où :

- RF1 et RF2 sont bien en quadrature
- $I(t)$ et $Q(t)$ sont respectivement les parties en phase et en quadrature de phase du signal modulant. $I(t)$ et $Q(t)$ sont inconnus.
- $\cos(2\pi f_0 t)$ et $\sin(2\pi f_0 t)$ représentent les parties complexe et imaginaire de l'onde émise.

La résolution de ce système donne :

$$2. \quad \begin{cases} I(t) = RF1(t) \cdot \cos(2\pi f_0 t) + RF2(t) \cdot \sin(2\pi f_0 t) \\ Q(t) = -RF1(t) \cdot \sin(2\pi f_0 t) + RF2(t) \cdot \cos(2\pi f_0 t) \end{cases}$$

Le but de la démodulation IQ est donc de lire les valeurs RF1(t) et RF2(t) mesurées pour en déduire I(t) et Q(t) avec l'équation (2).

Comme I et Q sont en quadrature de phase, on peut ensuite les regrouper dans une variable complexe qu'on appelle couramment "IQ" telle que :

$$IQ(t) = I(t) + i \cdot Q(t)$$

Où : $|IQ(t)| = \text{amplitude du signal}$
 $\arg(IQ(t)) = f_{\text{doppler}}$

Le module de IQ est donc l'énergie du signal, autrement dit: le signal **B-mode**. Pour obtenir le Doppler Puissance, on intègre dans le temps le signal B-mode. L'argument de IQ correspond donc à la fréquence Doppler. Mesurer cet argument revient à faire de l'imagerie Doppler Couleur.

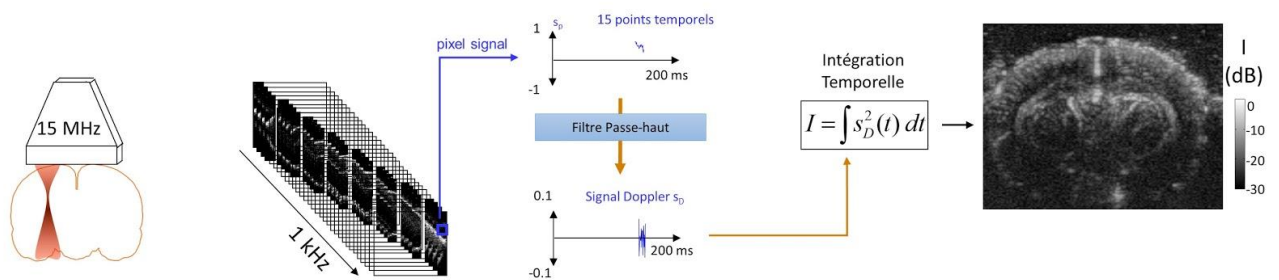
1.2.3.3. Première images fonctionnelles ultrasonores cérébrales ultrarapides et applications

Preuve de concept

Si les ondes planes permettent de visualiser le déplacement d'une onde de cisaillement dans tout le plan d'imagerie, elles permettent également de suivre avec une grande sensibilité de bien plus petits déplacements.

L'imagerie doppler puissance conventionnelle est relativement limitée pour l'imagerie des petits vaisseaux à flux rapide. Comme vu juste au dessus, seuls une dizaine de points temporels par pixel sont utilisés pour l'intégration puissance du signal Doppler d'un cerveau de rat ce qui résulte en une mauvaise distinction des petits vaisseaux du cerveau (Figure 16.a).

a) Doppler Puissance Conventionnel



b) Doppler Puissance par ondes planes

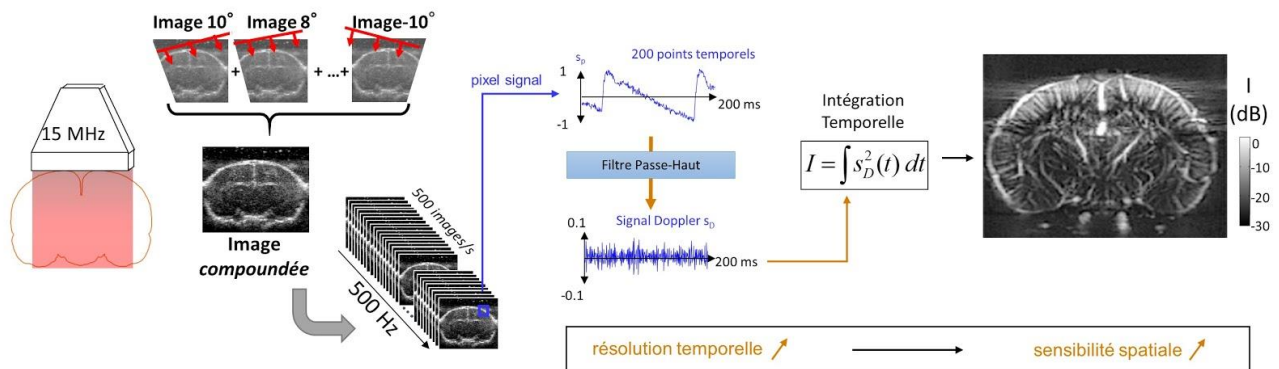


Figure 16. Comparaison des Doppler Puissances conventionnel et par ondes planes. a) En Doppler Puissance Conventionnel, le nombre d'échantillons temporels par pixel est faible. La sensibilité de l'image est donc également faible. b) En Doppler par ondes planes, l'illumination de tout le plan d'imagerie à chaque tir ultrasonore permet d'acquérir beaucoup plus de points temporels en un même temps d'acquisition. La sensibilité de l'image de puissance en est donc nettement améliorée.

Insonifier le milieu avec des ondes planes permet dans un même temps d'intégration, d'avoir accès à un nombre de points temporels par pixel bien plus élevé. En 2011, l'équipe de l'institut Langevin (Macé et al. 2011) a démontré la capacité des ultrasons à cartographier avec une très bonne sensibilité la vascularisation du rat. Pour cela, une séquence ultrasonore à 15 MHz d'ondes planes inclinées est envoyée dans le cerveau d'un rat trépané anesthésié pour permettre l'obtention d'images *compoundées* à 500 Hz. Ainsi, lors d'une acquisition de 400 millisecondes, 200 points temporels sont accessibles pour la détermination de l'intensité de chaque pixel. Après un filtrage passe-haut qui permet l'élimination du mouvement lent du cerveau (notamment associé au mouvement des tissus dû à la respiration), l'intégration temporelle permet d'obtenir avec une excellente sensibilité spatiale l'image Doppler Puissance du réseau vasculaire du cerveau du rat (Figure 16.b) en 400ms. L'augmentation de la cadence d'imagerie (temporelle) assurée par les ondes planes engendre donc **une nette amélioration de la sensibilité** (spatiale) de l'image Doppler Puissance.

De la simple cartographie des vaisseaux du cerveau, la séquence ultrasonore peut être répétée dans le temps pour obtenir un film de l'évolution de l'intensité du flux sanguin dans le cerveau. La preuve de concept de l'imagerie **fonctionnelle UltraSonore (fUS)** a également été présentée en 2011 par l'équipe de l'Institut Langevin. Il a été montré que, suite à la stimulation des moustaches d'un rat anesthésié (Figure 17), la séquence d'imagerie ultrasonore était capable de mesurer l'augmentation du volume sanguin dans les zones du cerveau qui traitent les informations reliées aux moustaches: le cortex préfrontal somatosensoriel (S1BF) controlatéral et le thalamus (VPM) controlatéral. En corrélant (corrélation de Pearson) le signal doppler puissance de chaque pixel du cerveau avec le schéma temporel de stimulation des moustaches (Figure 17.b), on peut construire une carte de corrélation où les régions cérébrales ayant été activées admettent un signal doppler au cours du temps fortement corrélé avec signal de stimulation. Comme anticipé, les régions S1BF et VPM apparaissent comme les zones activées pendant la stimulation des moustaches (Figure 17.c).

Les ultrasons deviennent avec cette preuve de concept un nouvel outil pour l'exploration fonctionnelle du cerveau.

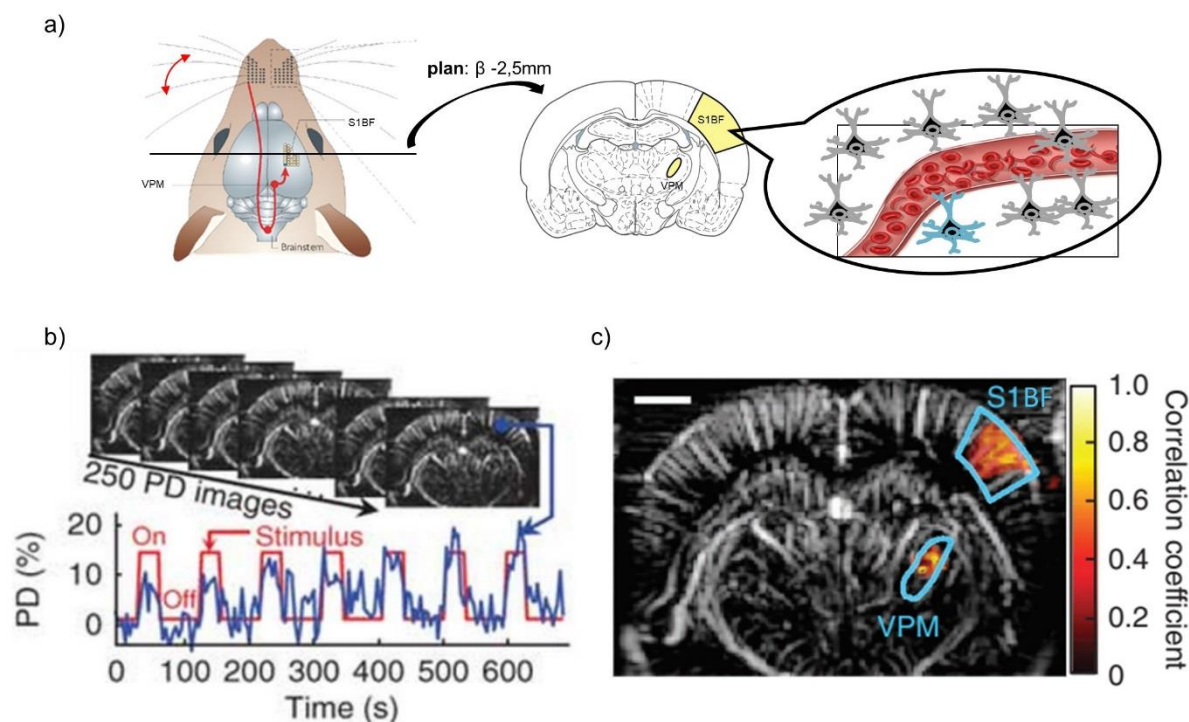


Figure 17. La stimulation des vibrisses du rat entraîne une augmentation du flux sanguin dans le cortex préfrontal controlatéral et le thalamus controlatéral. b) L'augmentation du flux sanguin dans les zones activées suit le schéma du stimulus. c) On peut ainsi construire des cartes d'activation basée sur le coefficient de corrélation entre le cours temporel du signal doppler puissance et le schéma du stimulus (issue de (Macé et al. 2011))

1.2.3.4. Filtrage spatiotemporel

Comme évoqué précédemment l'obtention de la vascularisation du cerveau nécessite un filtrage des données échographiques enregistrées afin de séparer les mouvements du tissu et du flux sanguin. Nous avons indiqué en Figure 16.a qu'un filtre passe-haut est appliqué aux données IQ avant l'intégration Doppler Puissance.

Cependant, appliquer un filtre passe-haut à un set de données IQs temporelles pour ne conserver que les flux sanguins consiste à supposer que **le signal réfléchi par le sang "bouge" plus rapidement que celui réfléchi par les tissus**. En effet, le mouvement des tissus est très largement dû à la respiration et à la pulsativité cardiaque, et l'hypothèse est faite que ceux-ci admettent un mouvement très lent voir immobile par rapport aux diffuseurs du flux sanguin dont le spectre est centré autour de la fréquence doppler.

La Figure 18.a présente le spectre temporel d'une acquisition fUS de 3 min d'un rat anesthésié trépané. Nous nous sommes concentrés ici sur un pixel d'un vaisseau cortical.

Nous constatons que le spectre présente en effet un fort pic centré autour de zéro, qui peut être attribué au premier abord au spectre associé au tissu. Le spectre présente également un deuxième pic sensiblement moins intense et un peu plus large autour de 60 Hz, pourrait être attribué au flux sanguin. En Figure 18.b est représenté par-dessus le spectre non-filtré, le spectre après filtrage passe-haut à 30 Hz. Nous constatons que le spectre a bien récupéré le pic intuitif, centré autour de 60 Hz.

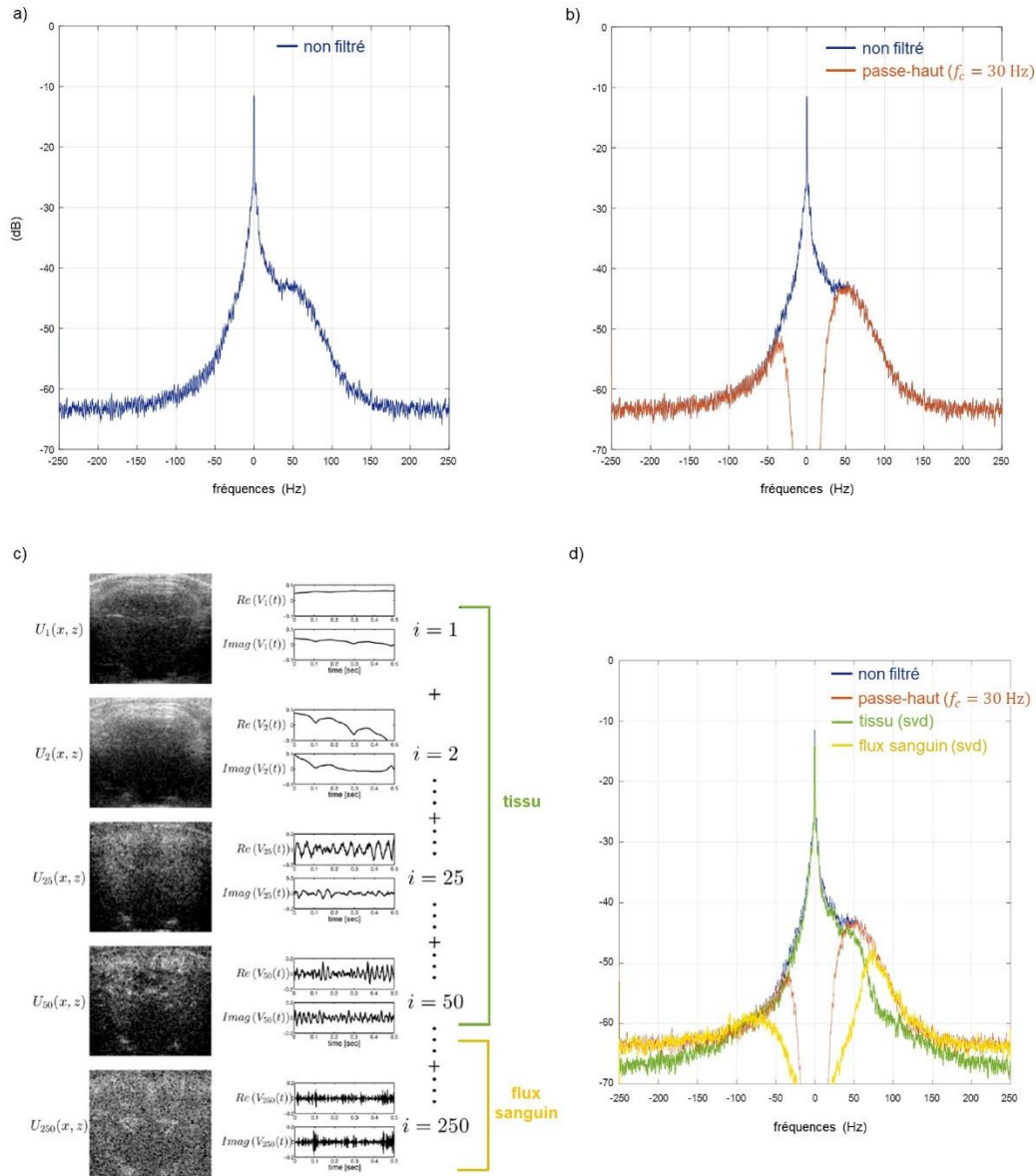


Figure 18. Comparaison entre filtre passe-haut et filtrage SVD a) spectre des données IQ non filtrées d'un pixel d'un vaisseau cortical de rat d'une acquisition fonctionnelle de 3 min après craniotomie b) Spectre après filtrage passe-haut (freq. coup.=30 Hz) des données IQs c) Modes spatiotemporels de la décomposition SVD. Les premiers modes correspondent aux modes d'énergie du tissu tandis que les modes suivants sont associés au bruit plus chaotique (dont le flux sanguin) d) Spectres de l'acquisition non-filtrée, après filtrage passe-haut à 30 Hz après filtrage SVD (valeur de coupure=60 valeurs singulières) où sont affichés les spectres du tissu et du flux sanguin.

Cependant, l'hypothèse que le flux sanguin et les tissus sont décorrélés temporellement n'est pas tout à fait exacte. Le tissu peut bouger rapidement ou subir des artefacts de mouvement (pendant des stimulations de moustaches par exemple si l'animal n'est pas parfaitement stéréotaxé), et le flux sanguin peut être lent: dans les petits vaisseaux notamment. Appliqué un filtre passe-haut comme celui montré en Figure 18.b n'est alors pas optimal pour bien discriminer les deux types de mouvement.

Depuis 2015, une nouvelle approche de traitement de signal a été proposée par Charlie Demene, alors en thèse à l'Institut Langevin. Ce filtre ne se base plus uniquement sur la discrimination temporelle des données, mais sur une **décomposition spatiotemporelle**: le filtrage SVD (SVD pour Singular Value Decomposition).

La méthode s'appuie sur l'hypothèse que le tissu cérébral admet un mouvement spatialement cohérent dans le temps. En effet, même rapides, les mouvements du tissu conserveront toujours une grande cohérence spatiale dans l'image puisque les tissus cérébraux sont pratiquement un seul même organe présent dans toute l'image. Tandis que les diffuseurs du flux sanguin, même à une échelle très locale, admettent très peu de cohérence spatiale entre eux du fait du réarrangement constant des hématies dans le plasma et puisqu'ils ne sont pas présents dans toute l'image mais surtout dans l'arbre vasculaire. Ainsi, la discrimination peut se faire sur la cohérence spatiotemporelle.

Pour ce faire la méthode consiste à réarranger la matrice spatio-temporelle en trois dimensions (x, y, t) du film Doppler, en une matrice dite de Casorati C_a de deux dimensions (x, y, t) . Une décomposition en valeurs singulière (opération "svd" pour singular values decomposition) de cette matrice est ensuite réalisée. Cela revient à trouver une factorisation de C_a de la forme :

$$3. \quad C_a = U.S.V$$

Où : U correspond aux vecteurs singuliers spatiaux de C_a de dimension (x, y, x, y)

V correspond aux vecteurs singuliers temporels de C_a de dimension (t, t)

S est une matrice rectangulaire diagonale de dimension (x, y, t)

La décomposition en valeurs singulières peut être considérée comme la décomposition de la matrice C_a en une somme pondérée de matrices séparables A_i tels que $A_i = U_i \otimes V_i$ pondérés par les valeurs s_i de la diagonale de S .

On peut alors réécrire C_a tel que : $C_a = \sum_i s_i \cdot U_i \cdot V_i$

où chaque colonne V_i est un signal temporel de longueur t et chaque colonne U_i est un vecteur spatial de longueur $x \cdot y$ qui peut être associé à une image spatiale 2D de taille (x, y) . Les valeurs s_i sont rangées par ordre décroissant et donne le poids de chaque mode spatiotemporel $U_i \otimes V_i$ dans la matrice C_a , donc dans le film Doppler. C'est à dire que pour une valeur de s_i élevée, $U_i \otimes V_i$ est un mode de forte énergie spatiotemporelle dans le film Doppler. Tandis qu'une faible valeur de s_i indique que le mode $U_i \otimes V_i$ n'est pas très cohérent spatiotemporellement.

En organisant alors la matrice S de sorte que les valeurs de s_i soient classées dans l'ordre décroissant, on comprend donc que (Figure 18.c) :

- les premiers modes de la matrice C_a correspondent à des modes de grande cohérence spatiotemporelle

- la cohérence diminuant avec i croissant: les modes suivants correspondent à tous les mouvements peu cohérents, que l'on associe au flux sanguin

On peut ainsi décider de ne conserver que les modes spatiotemporels admettant une valeur de s_i supérieure à une certaine valeur: supérieur à $i=50$ par exemple (voir (Baranger et al. 2018) pour le choix de la valeur de coupure), afin de retirer les modes spatiotemporels associées au tissu dans l'acquisition Doppler.

En observant le spectre de la Figure 18.d, on constate que les spectres de tissu et de flux déterminés grâce au filtrage SVD se recouvrent: ils n'auraient donc pas pu être discriminés par un simple filtrage temporel. D'ailleurs, on observe que le spectre associé au filtrage passe-haut (de fréquence de coupure de 30 Hz) recouvre également largement le spectre du tissu: le filtrage passe-haut conserve donc beaucoup de composantes associées au mouvement du tissu.

Effectuer un filtrage passe-haut avec une fréquence de coupure plus élevée permet en effet de récupérer un peu de signal dans les vaisseaux (Figure 19.a,b,c), mais le filtrage SVD est bien plus performant et fait apparaître le réseau vasculaire beaucoup plus nettement (Figure 19.d).

Le filtrage désormais utilisé en imagerie fUS est un filtrage SVD et permet d'avoir une bien meilleure sensibilité au signal de flux.

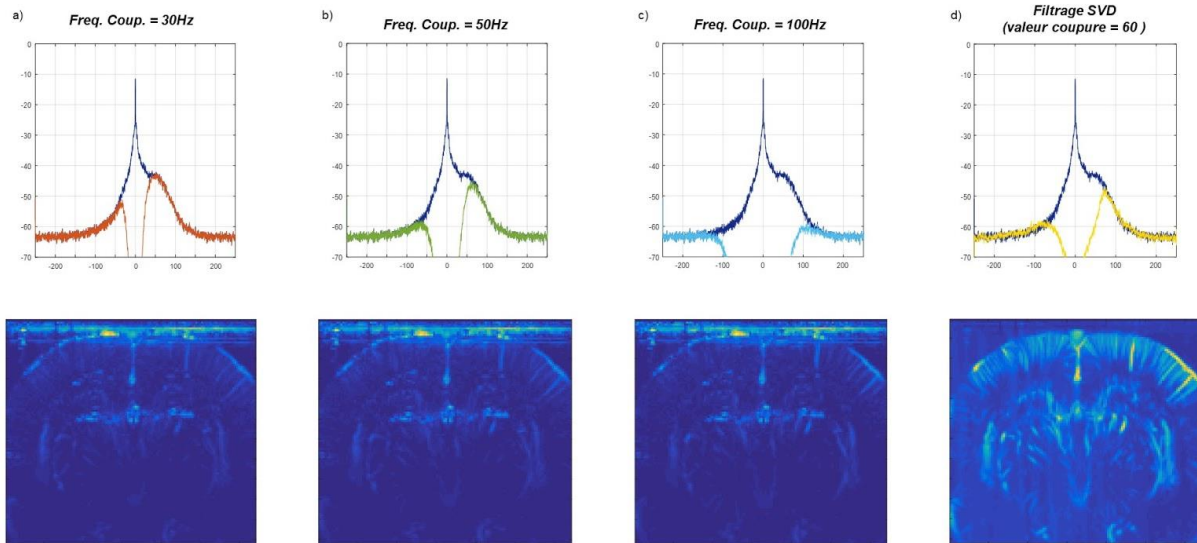


Figure 19. Figure I.19: Comparaison des images Doppler après filtrage passe-haut à: a) 30 Hz b) 50 Hz c) 100 Hz et après filtrage SVD (valeur de coupure=60 valeurs singulières)

Comparaison du fUS avec les autres modalités

Nous avons vu que les ultrasons fonctionnels recouvrent un large champ de vue, ce qui permet d'imager les cerveaux de rongeurs en entier lors de l'insonification par des ondes planes. Pour imaginer des plans plus larges que la sonde (cerveaux de primates, d'humains), l'utilisation d'ondes divergentes permet d'étendre le champ de vue. Cela démarque donc la technique de toutes les modalités fonctionnelles à champ d'imagerie restreint (à profondeur limitée notamment pour les techniques optiques), ou sans imagerie du tout: comme l'EEG, ou comme le Potentiel de Champ Local qui permet une mesure ultra-localisée mais sans pouvoir donner d'image du cerveau entier. Les deux modalités d'imagerie fonctionnelle qui permettent également l'acquisition de l'ensemble du cerveau sont l'IRM et l'imagerie photo-acoustique.

L'imagerie fUS ne mesure pas une activité directe de l'activation neuronale mais les **conséquences du couplage neurovasculaire** (en mesurant les variations du volume sanguin cérébral) tout comme l'IRM-f ou l'imagerie photo-acoustique. Cependant comparée à ces deux modalités, l'imagerie fUS ne nécessite qu'un dispositif échographique très simple, peu coûteux et très facilement transportable.

La limitation majeure des ultrasons fonctionnels reste donc **la présence du crâne**. S'il est possible de focaliser très précisément un foyer ultrasonore derrière un crâne de primate ou d'humain (Pernot 2007; Deffieux et al. 2013; Constans et al. 2017), les fronts d'onde

plans envoyés lors de séquences fUS restent considérablement distordus par le crâne conduisant à de fortes aberrations et une impossibilité d'effectuer des images du cerveau sans agent de contraste. Cette lacune majeure ne permet donc pas aux ultrasons d'être compétitifs par rapport à l'IRM pour l'imagerie cérébrale clinique chez l'Homme dans l'optique d'examen de routine, mais peut-être contournée chez l'Homme dans deux domaines où l'IRM-f a failli: l'imagerie peropératoire (Imbault et al. 2017) et l'imagerie du nouveau-né (Demené et al. 2019). Cela reste tout de même en imagerie pré-clinique que l'on trouve les applications les plus courantes du fUS: chez le rongeur et le primate notamment.

Un avantage notable du fUS que l'on peut souligner pour l'imagerie fonctionnelle par rapport à l'IRM est la possibilité d'imager un animal éveillé. Plusieurs études ont en effet présenté des mesures fonctionnelles chez l'animal en mouvement: soit dans un dispositif de tête fixée: chez le furet (Bimbard et al. 2018), la souris et le primate (Dizeux et al. 2019); ou chez le rongeur en mouvement libre pour lequel une sonde ultrasonore miniature est fixée sur le dessus du crâne (Sieu et al. 2015; Tiran et al. 2017). L'IRM-f, nécessite l'immobilité totale du sujet à imager: c'est évidemment tout à fait concevable de demander à un Homme adulte de rester sans bouger pendant un scan IRM, mais cela est exclu chez le bébé. Cela devient aussi bien plus compliqué chez l'animal. Les primates peuvent être entraînés à l'immobilité mais il est évidemment inconcevable de "demander" à un rongeur de rester immobile pendant un scan IRM. Il faut alors contraindre le rongeur, ce qui provoque un fort stress, ou l'anesthésier : ces deux dernières solutions peuvent induire des biais importants dans les mesures d'activité cérébrale, et notamment pour l'étude de la connectivité fonctionnelle (voir Chapitre 2.1).

A l'inverse, l'EEG (Paulson et al. 2018) ou le Potentiel de Champ Local (Okun et al. 2010) sont des modalités qui s'adaptent très bien au petit animal en mouvement, puisque des électrodes peuvent être placées sous anesthésie et que l'animal peut ensuite être réveillé pour des mesures en éveillé . De même, de nombreuses études en imagerie Optique par Colorant sensible au Potentiel (Gong et al. 2015), en imagerie calcique (Komiyama et al. 2010), en imagerie Optique Intrinsèque (Kim et al. 2017) et en imagerie photo-acoustique (Tang et al. 2015) ont présenté des dispositifs d'imagerie chez l'animal éveillé. La résolution temporelle du fUS peut être modulée de 400ms à (Dizeux et al. 2019) ce qui la rend attractive par rapport à l'IRM qui admet une résolution temporelle d'environ 1s. La résolution reste cependant lente par rapport aux modalités mesurant directement l'activité neuronale comme l'EEG, le Potentiel de Champ Local et l'imagerie Calcique.

1.2.3.5. *L'imagerie fonctionnelle ultrasonore aujourd'hui et ses défis futurs*

Depuis le papier de 2011 de Mace et al, l'imagerie fonctionnelle ultrasonore s'est développée comme nouvel outil d'imagerie fonctionnelle en neurosciences dans plusieurs types d'applications et sur différents modèles d'animaux.

Imagerie fUS chez le petit animal

Il a été montré (Osmanski et al. 2014) que l'imagerie fUS permettait de reproduire les principaux résultats d'imagerie fonctionnelle comme la mesure de connectivité fonctionnelle chez le rat anesthésié (voir le Chapitre 2 pour les détails sur la connectivité fonctionnelle) ou la détection de l'activation cérébrale suivant une stimulation chez le petit animal anesthésié (souris, rat (Macé et al. 2011)).

Si les premières images fUS étaient obtenues après craniotomie et chez l'animal anesthésié, il a été montré que ces deux contraintes pouvaient être contournées. Errico et al. ont en effet démontré la possibilité d'obtenir des images cérébrales par ultrasons chez le rat en transcrânien grâce à l'utilisation de micro-bulles comme agents de contraste (Errico et al. 2016)(Tiran et al. 2017)(Figure 20.a) tandis que Tiran et al. ont montré la faisabilité de l'imagerie fUS transcrânienne totalement non-invasive chez la souris et le jeune rat sans aucun agent de contraste (Tiran et al. 2017).

La première étude d'imagerie fUS chez l'animal non-anesthésié a été publiée en 2015 par Sieu et al. (Sieu et al. 2015) où un dispositif de sonde miniaturisée avec électrodes implantées et prothèse crânienne acoustiquement transparente a été proposé. Cette configuration a permis l'étude de l'activation fUS chez les animaux éveillés en association avec des enregistrements électrophysiologiques grâce à l'utilisation d'électrodes implantées (Figure 20.b).

S'en est suivi d'autres études fUS sur petits animaux éveillés: l'étude de Tiran et al. (Tiran et al. 2017) présente un dispositif permettant également l'enregistrement fUS chez la souris libre de ses mouvements. Le système auditif du furet éveillé a été étudié en 2018 (Bimbard et al. 2018) et également remarquable: les capacités de localisation du champ magnétique ont été étudiées en fUS chez le pigeon éveillé (Rau 2017).

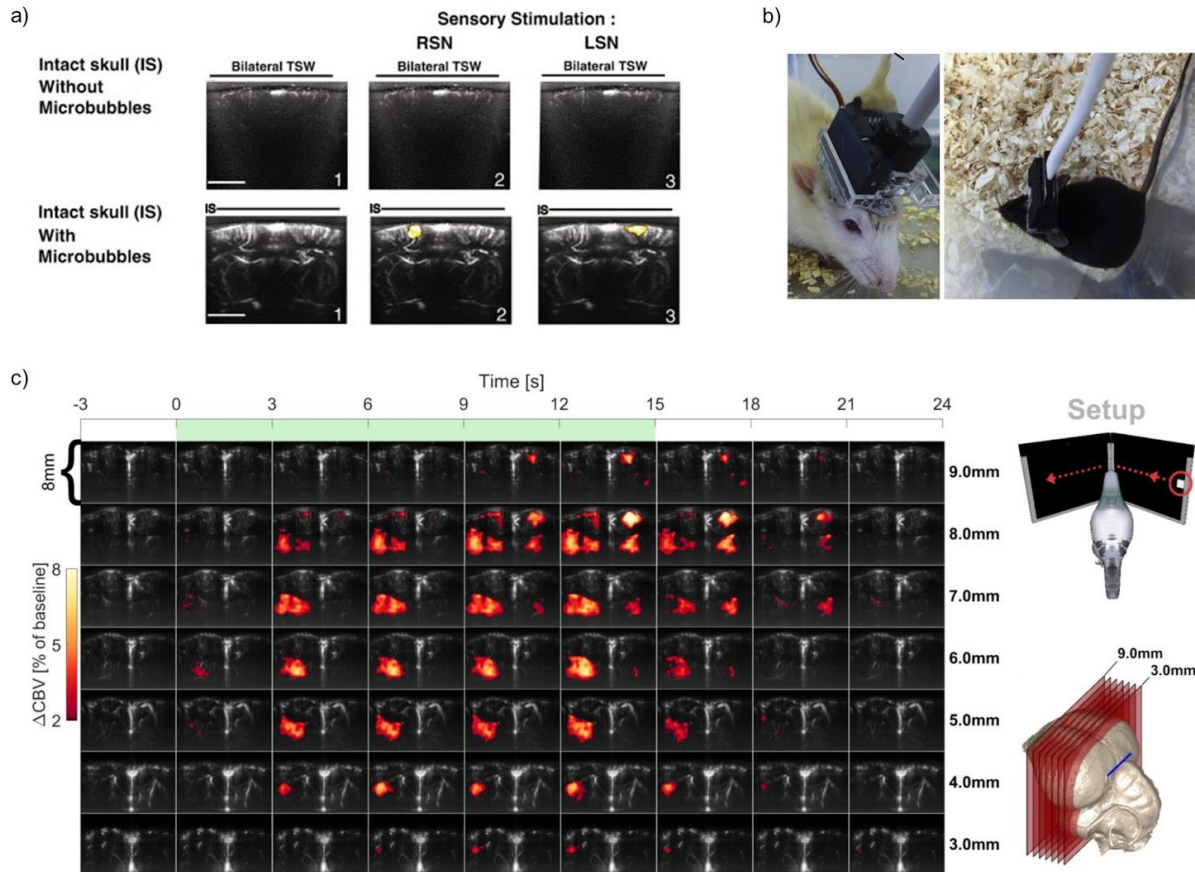


Figure 20. Plusieurs applications de l'imagerie fUS préclinique a) Activité fonctionnelle détectée dans le cortex du rat après stimulation. L'acquisition est faite à travers le crâne intact et avec injection de microbulles comme agents de contraste (Errico et al. 2016) b) Dispositif d'imagerie du rat et de la souris éveillée. Une sonde miniature est fixée sur la tête de l'animal. Le rat est suffisamment fort pour porter la sonde lui-même tandis que l'expérimentateur doit porter le câble pour la souris et suivre ses mouvements c) Imagerie en 3D du système visuel du pigeon par fUS (Rau et al. 2017)

Cependant, les mécanismes cérébraux et la connectivité fonctionnelle sont intrinsèquement tridimensionnels, le développement de l'imagerie du cerveau complet en 3D est donc crucial. Demene et al ont présenté en 2015 les premières images ultrasonores de la vascularisation d'un cerveau de rat en trois dimensions (Demené et al. 2016). Le volume cérébral étant obtenu par tomographie, le volume était acquis en environ 20min. En 2017, Gesnik et al ont montré les premières cartes fonctionnelles fUS en 3D avec l'activation des zones cérébrales visuelles suivant des stimulations lumineuses (Gesnik et al. 2017), Rau et al. ont également appliqué cette méthode afin d'obtenir des cartes fonctionnelles visuelles et magnétiques chez le pigeon (Figure 20.c)(Rau et al. 2017). Dans ces deux exemples, les cartes fonctionnelles 3D étaient obtenues par répétition du schéma de stimulation à chaque acquisition bi-dimensionnelle du scan linéaire.

Imagerie fUS chez le primate non-humain

L'étude du cerveau du singe présente un avantage certain ; sa connectivité, sa taille, ses régions fonctionnelles (démontrées par ses capacités motrices et comportementales) et son processus de vieillissement sont similaires aux nôtres. Il est donc d'intérêt majeur de pouvoir étudier l'activité cérébrale des primates bien que les recherches biologiques ayant recours à ces animaux nécessitent une justification supplémentaire et des normes élevées de bien-être animal. Un autre avantage notable de l'étude chez le singe est la possibilité d'entraîner l'animal à l'accomplissement de tâches précises. L'imagerie fUS est ensuite possible grâce à l'ouverture par chirurgie d'une fenêtre de trépanation dans le crâne du primate afin de pouvoir insérer une sonde ultrasonore miniature au-dessus de la zone cérébrale à imager. Ainsi, le champ oculaire supérieur (SEF: Supplementary Eye Field) a par exemple récemment été détecté chez le primate effectuant des tâches saccades et antisaccades visuelles (Dizeux et al. 2019) ou des schémas d'anticipations d'actions ont également pu être calculés en post-processing par un système de BCI (Brain-Computer-Interface) utilisant les ultrasons fonctionnels (Norman et al. 2018).

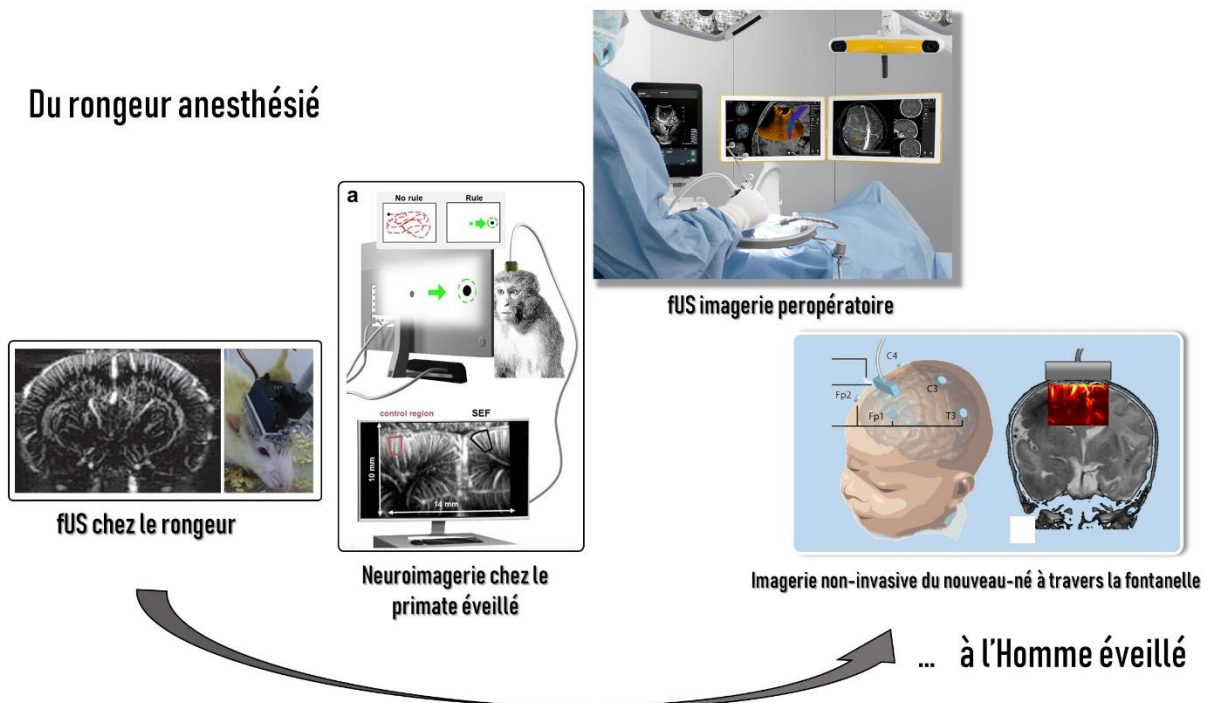
Imagerie chez l'Homme

Les ultrasons fonctionnels présentent le gros désavantage d'être très fortement altérés par le crâne. Comme énoncé pour les cas animaux, la trépanation est la plupart du temps nécessaire pour l'imagerie fUS. C'est bien sûr difficilement concevable d'en faire un examen clinique routinier chez l'Homme dans ces conditions.

Cependant, la technique s'est révélée complémentaire des autres modalités dans des certains cas spécifiques d'imagerie cérébrale chez l'Homme. Chez le nourrisson: pour lequel le placement en scan IRM est difficile, et pour l'imagerie peropératoire.

- **Imagerie du nouveau-né:** la fontanelle bregmatique (ou grande fontanelle) est un espace situé entre les os du crâne supérieur du nouveau-né, dont l'ossification n'est pas encore totalement terminée. Elle possède une forme de losange de 3 à 4 cm de large et se ferme à partir de l'âge de 18 mois. En l'absence de structure osseuse calcifiée, la fontanelle est une réelle fenêtre naturelle transparente pour les ultrasons. En 2017, il a été montré que l'imagerie fUS permettait le suivi totalement non-invasif d'une partie de l'activité corticale du bébé (Demene et al. 2017).

- **Imagerie peropératoire:** Bien que la neuro-imagerie fonctionnelle durant une intervention chirurgicale serait très bénéfique pour maximiser l'élimination des tumeurs tout en préservant les zones cérébrales fonctionnelles; aucune technique d'imagerie en profondeur chez l'Homme ne fournissait jusque là une modalité intra-opératoire simple et portable. En 2017, il a été montré que les ultrasons fonctionnels permettaient la cartographie fonctionnelle du cerveau durant une la chirurgie afin de minimiser le risque de déficits post-opératoires et améliorer la survie à long terme des patients (Imbault et al. 2017).



Mace & Al. *Nature Methods*, 2011 ; Dizeux & Al. *Nature Com.*, 2019 ; Demene & Al, *STM*, 2018 ; M. Imbault & Al. *Scientific Reports*, 2017.

Les ultrasons fonctionnels ont donc ouvert de nouvelles perspectives d'imagerie pour le domaine des neurosciences. Ils offrent une combinaison unique en terme de résolution spatiotemporelle, de sensibilité et portabilité. Ils apportent des informations complémentaires par rapport aux principales techniques IRM et optiques. La technique souffre toutefois actuellement de limitations :

En préclinique, l'imagerie transcrânienne sans agent de contraste reste impossible en dehors de chez la souris. De plus, les expériences fUS sur souris éveillées n'en sont qu'à l'état de preuves de concept et n'ont pas permis de prouver leur utilité pour les applications en neurosciences. La possibilité d'imager l'activité fonctionnelle dans toute le volume cérébral a également été démontré chez le petit animal (Gesnik et al. 2017; Rau et al. 2017), mais l'acquisition par tomographie utilisée ne permet pas le suivi d'évènements transitoire dans tout le cerveau (voir Chapitre 3).

En clinique, l'imagerie fUS transcrânienne serait une avancée sans précédent. Si nous sommes très proches d'y parvenir grâce à l'utilisation de micro-bulles (Demene 2018), il semble que nous sommes très loin d'y parvenir sans agent de contraste. Les applications sur nouveau-nés ou pour l'imagerie peropératoire sont très prometteuses bien que très spécifiques, donc destinées à des utilisations de niches.

C'est dans ce contexte scientifique que je suis arrivée en thèse en octobre 2016 au laboratoire et que m'ont été confiés différents objectifs afin de contribuer à certaines avancées pour l'imagerie fUS.

1.3. Objectifs de la thèse

Les chapitres de cette thèse présentent les différents objectifs de mon projet doctoral. Tous ont pour point commun de tenter d'apporter des outils précliniques basés sur les ultrasons pour aider à la compréhension des mécanismes du cerveau.

1.3.1. Chapitre 2: Imagerie ultrasonore de la connectivité fonctionnelle chez la souris anesthésiée puis éveillée sous modulation pharmacologique

La connectivité fonctionnelle du cerveau permet de comprendre comment à un temps t , les structures du cerveau se parlent entre elles, même sans stimulus extérieur. Cette cartographie intrinsèque – sorte de code barre du cerveau- est développée depuis plusieurs années par IRM en préclinique avec une résolution spatiotemporelle inférieure à l'imagerie fUS et uniquement sur animal anesthésié. La connectivité fonctionnelle est un marqueur important du fonctionnement du cerveau et peut s'altérer considérablement lorsqu'une pathologie affecte le cerveau. Elle a été mesurée pour la première fois en ultrasons en 2014 par Bruno Osmanki chez le rat anesthésié.

Ce premier chapitre présente le développement de la technique sur des modèles de souris dont la connectivité est modulée pharmacologiquement afin de mettre en évidence de nouveaux marqueurs de pathologies cérébrales. La modulation pharmacologique est induite par injection de scopolamine, modèle transitoire d'alzheimer. La connectivité fonctionnelle et ses altérations ont d'abord été mesurées chez la souris anesthésiée, puis, un dispositif de mesure de connectivité chez la souris éveillée est mis en place pour une mesure de connectivité fonctionnelle non biaisée par l'anesthésie.

1.3.2. Chapitre 3 : Développement de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore 4D

Au cours des dernières années, des efforts considérables ont été développés pour prouver que l'imagerie fUS pouvait fournir une imagerie 3D dynamique de l'activité cérébrale. Cette extension de l'imagerie fUS au 4D (3D spatiales + 1D temps) est présentée dans ce chapitre. Elle a bénéficié du développement d'un prototype de scanner ultrasonore capable de piloter un prototype de sonde ultrasonore 2D-matricielle. La sonde matricielle permet d'insonifier et d'enregistrer les échos de tout le volume cérébral à chaque tir ultrasonore. La mise en œuvre de transmissions spatiotemporelles d'ondes codées et de post-traitements innovants est présentée. Ces développements méthodologiques étendus sont expliqués et validés à l'aide de trois expériences illustratives chez le rat: imagerie cérébrale complète de stimuli multisensoriels dans la même session d'imagerie, imagerie de connectivité fonctionnelle en trois dimensions et enfin suivi 4D de la propagation de crise de type épileptique.

1.3.3. Chapitre 4 : Vers l'élastographie fonctionnelle

L'élastographie ultrasonore par onde de cisaillement repose sur la mesure de dureté de tissus biologiques par estimation de la vitesse de propagation d'onde de cisaillement provoquée par une contrainte. Ces 20 dernières années, de multiples méthodes pour le diagnostic de pathologies liées à la dureté des tissus ont émergées. De plus, plusieurs études ont récemment suggéré (Tsurugizawa et al. 2013; Abe et al. 2017) qu'un phénomène de gonflement des cellules neuronales, indépendant du couplage neurovasculaire, apparaît lors de l'activation cérébrale et diminue l'espace extracellulaire. Cette nouvelle théorie semble être un nouveau marqueur physiologique de la dynamique cérébrale. Nous explorons dans ce chapitre des méthodes d'élastographie

cérébrales afin d'étudier ce changement de structure fonctionnelle lors d'activation. En particulier, nous mettons au point une méthode d'imagerie ultrasonore permettant simultanément de cartographier de manière dynamique les propriétés mécaniques du cerveau et les zones cérébrales activées par couplage neurovasculaire.

1.4. Bibliographie du chapitre d'introduction

- Abe Y, Tsurugizawa T, Bihan DL (2017) Water diffusion closely reveals neural activity status in rat brain loci affected by anesthesia. *PLOS Biology* 15:e2001494. doi: 10.1371/journal.pbio.2001494
- Baranger J, Arnal B, Perren F, et al (2018) Adaptive Spatiotemporal SVD Clutter Filtering for Ultrafast Doppler Imaging Using Similarity of Spatial Singular Vectors. *IEEE Transactions on Medical Imaging* PP:1–1. doi: 10.1109/TMI.2018.2789499
- Barkley GL (2004) Controversies in neurophysiology. MEG is superior to EEG in localization of interictal epileptiform activity: Pro. *Clin Neurophysiol* 115:1001–1009. doi: 10.1016/j.clinph.2003.12.011
- Baumgartner C (2004) Controversies in clinical neurophysiology. MEG is superior to EEG in the localization of interictal epileptiform activity: Con. *Clin Neurophysiol* 115:1010–1020. doi: 10.1016/j.clinph.2003.12.010
- Bercoff J, Chaffai S, Tanter M, et al (2003) In vivo breast tumor detection using transient elastography. *Ultrasound In Medicine and Biology* 29:1387–1396. doi: 10.1016/S0301-5629(03)00978-5
- Bercoff J, Tanter M, Fink M (2004) Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 51:396–409. doi: 10.1109/TUFFC.2004.1295425
- Bimbard C, Demené C, Girard C, et al (2018) Multi-scale mapping along the auditory hierarchy using high-resolution functional UltraSound in the awake ferret. *eLife* 7:. doi: 10.7554/eLife.35028
- Constans C, Deffieux T, Pouget P, et al (2017) A 200–1380-kHz Quadrifrequency Focused Ultrasound Transducer for Neurostimulation in Rodents and Primates: Transcranial In Vitro Calibration and Numerical Study of the Influence of Skull Cavity. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 64:717–724. doi: 10.1109/TUFFC.2017.2651648
- Deffieux T (2008) Palpation par force de radiation ultrasonore et échographie ultrarapide : applications à la caractérisation tissulaire in vivo. Thesis, Paris 7
- Deffieux T, Younan Y, Wattiez N, et al (2013) Low-Intensity Focused Ultrasound Modulates Monkey Visuomotor Behavior. *Current Biology* 23:2430–2433. doi: 10.1016/j.cub.2013.10.029

- Demene C (2018) Deep Transcranial Ultrasound Localization Microscopy of the adult human brain vascularization
- Demene C, Baranger J, Bernal M, et al (2017) Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns. *Science translational medicine* 9:eaah6756
- Demené C, Mairesse J, Baranger J, et al (2019) Ultrafast Doppler for neonatal brain imaging. *NeuroImage* 185:851–856. doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.04.016
- Demené C, Tiran E, Sieu L-A, et al (2016) 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *NeuroImage* 127:472–483. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.11.014
- Dizeux A, Gesnik M, Ahnine H, et al (2019) Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates. *Nature Communications* 10:. doi: 10.1038/s41467-019-09349-w
- Errico C, Osmanski B-F, Pezet S, et al (2016) Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultrasensitive Doppler. *NeuroImage* 124:752–761. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.09.037
- Figley CR, Stroman PW (2011) The role(s) of astrocytes and astrocyte activity in neurometabolism, neurovascular coupling, and the production of functional neuroimaging signals. *The European journal of neuroscience* 33:577–588. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07584.x
- Gesnik M, Blaize K, Deffieux T, et al (2017) 3D functional ultrasound imaging of the cerebral visual system in rodents. *NeuroImage* 149:267–274. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.01.071
- Gong Y, Huang C, Li JZ, et al (2015) High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor. *Science* 350:1361–1366. doi: 10.1126/science.aab0810
- Grinvald A, Hildesheim R (2004) VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nat Rev Neurosci* 5:874–885. doi: 10.1038/nrn1536
- Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, et al (1986) Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324:361–364. doi: 10.1038/324361a0
- He B, Yang L, Wilke C, Yuan H (2011) Electrophysiological Imaging of Brain Activity and Connectivity – Challenges and Opportunities. *IEEE Trans Biomed Eng* 58:1918–1931. doi: 10.1109/TBME.2011.2139210
- Hillman EMC (2007) Optical brain imaging in vivo: techniques and applications from animal to man. *J Biomed Opt* 12:051402. doi: 10.1117/1.2789693
- Hillman EMC, Devor A, Bouchard MB, et al (2007) Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation. *NeuroImage* 35:89–104. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.11.032
- Imbault M, Chauvet D, Gennisson J-L, et al (2017) Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity. *Scientific Reports* 7:. doi: 10.1038/s41598-017-06474-8

- Jones M, Hewson-Stoate N, Martindale J, et al (2004) Nonlinear coupling of neural activity and CBF in rodent barrel cortex. *NeuroImage* 22:956–965. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.02.007
- Kim E, Anguluan E, Kim JG (2017) Monitoring cerebral hemodynamic change during transcranial ultrasound stimulation using optical intrinsic signal imaging. *Sci Rep* 7:1–9. doi: 10.1038/s41598-017-13572-0
- Komiyama T, Sato TR, O'Connor DH, et al (2010) Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits of behaving mice. *Nature* 464:1182–1186. doi: 10.1038/nature08897
- Macé E, Montaldo G, Cohen I, et al (2011) Functional ultrasound imaging of the brain. *Nature Methods* 8:662–664. doi: 10.1038/nmeth.1641
- Michon F, Aarts A, Holzhammer T, et al (2016) Integration of silicon-based neural probes and micro-drive arrays for chronic recording of large populations of neurons in behaving animals. *Journal of neural engineering* 13:046018. doi: 10.1088/1741-2560/13/4/046018
- Montaldo G, Tanter M, Bercoff J, et al (2009) Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 56:489–506. doi: 10.1109/TUFFC.2009.1067
- Nadella KMNS, Roš H, Baragli C, et al (2016) Random-access scanning microscopy for 3D imaging in awake behaving animals. *Nature Methods* 13:1001–1004. doi: 10.1038/nmeth.4033
- Nightingale K, Soo MS, Nightingale R, Trahey G (2002) Acoustic radiation force impulse imaging: in vivo demonstration of clinical feasibility. *Ultrasound in Medicine & Biology* 28:227–235. doi: 10.1016/S0301-5629(01)00499-9
- Okun M, Naim A, Lampl I (2010) The Subthreshold Relation between Cortical Local Field Potential and Neuronal Firing Unveiled by Intracellular Recordings in Awake Rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:4440–8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5062-09.2010
- Osmanski B-F, Pezet S, Ricobaraza A, et al (2014) Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nature Communications* 5:. doi: 10.1038/ncomms6023
- Paulson C, Chien D, Lin F, et al (2018) A Novel Modular Headmount Design for non-invasive Scalp EEG Recordings in Awake Animal Models*. pp 5422–5425
- Pernot M Compensating for bone interfaces and respiratory motion in high-intensity focused ultrasound. *International Journal of Hyperthermia*
- Rau R (2017) Functional Ultrasound Imaging of the Avian Brain
- Rau R, Scheffer W, Belau M, et al (2017) 3D functional ultrasound imaging of the visual system in the pigeon brain. In: 2017 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS). pp 1–1
- Rosazza C, Zacà D, Bruzzone M (2018) Pre-surgical Brain Mapping: To Rest or Not to Rest? *Frontiers in Neurology* 9:. doi: 10.3389/fneur.2018.00520

- Sandrin L, Tanter M, Catheline S, Fink M (2002) Shear modulus imaging with 2-D transient elastography. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 49:426–435. doi: 10.1109/58.996560
- Shattuck DP, Weinschenker MD, Smith SW, von Ramm OT (1984) Explososcan: a parallel processing technique for high speed ultrasound imaging with linear phased arrays. *J Acoust Soc Am* 75:1273–1282. doi: 10.1121/1.390734
- Sheth SA, Nemoto M, Guiou M, et al (2004) Linear and Nonlinear Relationships between Neuronal Activity, Oxygen Metabolism, and Hemodynamic Responses. *Neuron* 42:347–355. doi: 10.1016/S0896-6273(04)00221-1
- Sieu L-A, Bergel A, Tiran E, et al (2015) EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats. *Nature Methods* 12:831–834. doi: 10.1038/nmeth.3506
- Steriade M (2003) *Neuronal Substrates of Sleep and Epilepsy*. Cambridge University Press
- Tang J, Xi L, Zhou J, et al (2015) Noninvasive high-speed photoacoustic tomography of cerebral hemodynamics in awake-moving rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 35:1224–1232. doi: 10.1038/jcbfm.2015.138
- Tanter M, Bercoff J, Athanasiou A, et al (2008) Quantitative Assessment of Breast Lesion Viscoelasticity: Initial Clinical Results Using Supersonic Shear Imaging. *Ultrasound in Medicine & Biology* 34:1373–1386. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2008.02.002
- Tanter M, Bercoff J, Sandrin L, Fink M (2002) Ultrafast compound imaging for 2-D motion vector estimation: application to transient elastography. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 49:1363–1374. doi: 10.1109/TUFFC.2002.1041078
- Tanter M, Fink M (2014) Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control* 61:102–119
- Tiran E, Ferrier J, Defieux T, et al (2017) Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. *Ultrasound in Medicine & Biology* 43:1679–1689. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.011
- Tsurugizawa T, Ciobanu L, Le Bihan D (2013) Water diffusion in brain cortex closely tracks underlying neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:. doi: 10.1073/pnas.1303178110
- Wang X, Pang Y, Ku G, et al (2003) Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat Biotechnol* 21:803–806. doi: 10.1038/nbt839

Chapitre 2. Imagerie Fonctionnelle
Ultrasonore Pharmacologique chez la souris
éveillée libre de ses mouvements

2.1. Introduction : La nécessité d'une modalité d'imagerie cérébrale chez le rongeur éveillé

2.1.1. Connectivité fonctionnelle au repos: un indicateur potentiel de l'altération des fonctions cérébrales

2.1.1.1. *IRM-f: découverte de la connectivité fonctionnelle*

Notre cerveau est constitué d'un grand nombre de régions cérébrales différentes qui sont en constant échange d'information. À ce titre, l'information dans le cerveau est continuellement traitée et transportée entre régions structurellement et fonctionnellement liées. Deux réseaux: structurel et fonctionnel forment le domaine de la **connectomique** (Biswal et al. 1995; Sporns et al. 2005; Hagmann et al. 2008). Alors que le premier fait référence aux zones cérébrales anatomiques reliées par les voies neuronales, qui restent relativement constantes sur de longues durées, le second fait référence à toute mesure de la co-variation entre signaux cérébraux à différents endroits et dépend fortement du paradigme et de la fenêtre temporelle considérée.

Dès les années 1990, des premières études cliniques d'IRM-f ont démontré que lorsqu'elle est calculée sur des sessions de repos suffisamment longues, la carte des connexions fonctionnelles de l'ensemble du cerveau révèle certaines similitudes avec le connectome structurel (Belliveau et al. 1991; Greicius et al. 2003).

La **connectivité fonctionnelle** est ainsi définie comme la **corrélacion temporelle** des signaux mesurant l'activité neuronale entre régions cérébrales structurellement différentes (Aertsen et al. 1989; Friston et al. 1993). Examiner le cerveau comme un réseau d'interactions fonctionnelles des régions cérébrales peut fournir de nouvelles informations sur la communication neuronale à grande échelle (Figure 21). Ce réseau est une plate-forme pour examiner comment la connectivité fonctionnelle et l'intégration de l'information sont reliées au comportement et à l'état physiologique, et comment cette organisation peut être modifiée dans les maladies neurodégénératives (Greicius 2008; Bullmore and Sporns 2009).

Par exemple, des études en EEG (Ahmadlou and Adeli 2011) ont révélé que les patients souffrants de déficience de l'attention et d'hyperactivité admettaient des perturbations de leur réseaux de connectivité. De même, les patients atteints de sclérose en plaques

révèlent de fortes baisses de corrélation entre leur cortex préfrontal et dorsolatéral et leur cortex frontal supérieur et cingulaire supérieur par rapport aux sujets contrôles (Cader et al. 2006). De nombreuses autres pathologies cognitives (comme la schizophrénie (Konrad and Winterer 2008), la maladie d'Alzheimer (Brier et al. 2014), l'autisme (Assaf et al. 2010) ou la dépression (Greicius et al. 2007)) ont révélées des dysfonctionnements de la connectivité fonctionnelle à l'état de repos chez l'Homme.

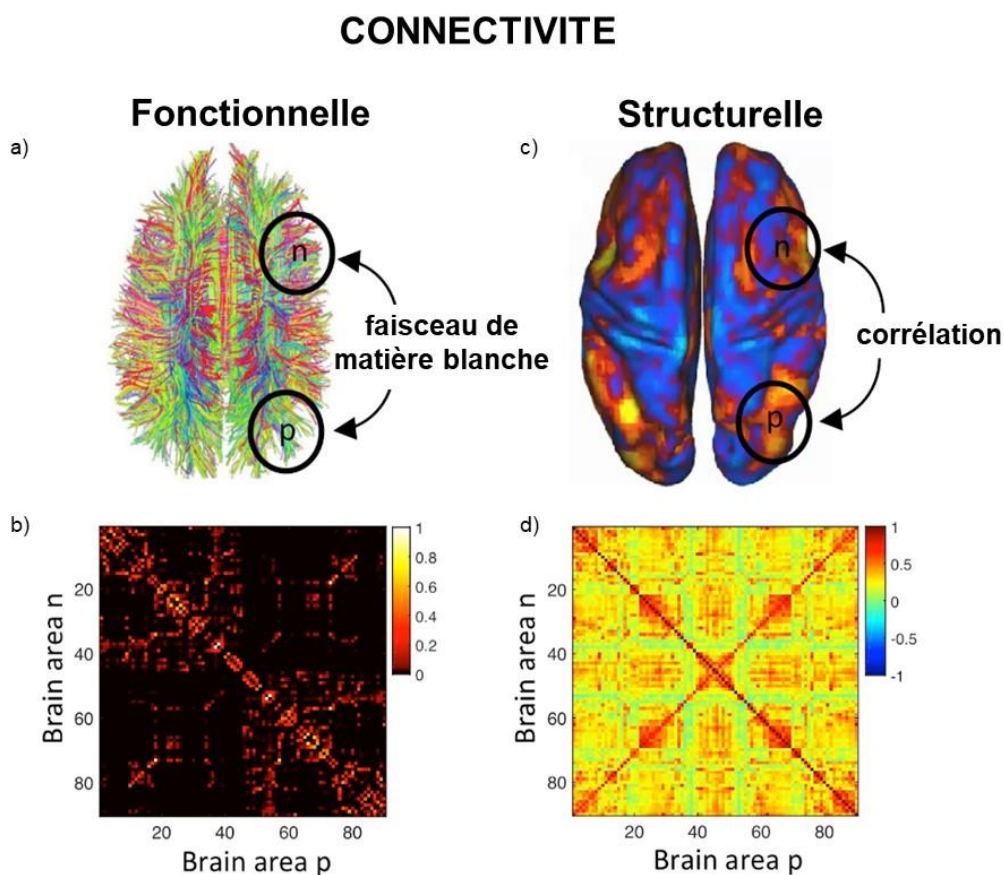


Figure 21. Connectivité structurelle (à gauche) versus connectivité fonctionnelle (à droite). Connectivité structurelle: la matrice de connectivité structurelle (b) est calculée ici en fonction du nombre de faisceaux de matière blanche détectés entre deux zones cérébrales en IRM de diffusion (a). Connectivité fonctionnelle: la matrice de connectivité fonctionnelle (d) est calculée comme la corrélation entre l'activité cérébrale (par exemple, le signal BOLD) estimée sur toute la durée d'enregistrement (figure extraite de (Cabral et al. 2017))

L'une des nombreuses caractéristiques intéressantes de l'IRM fonctionnelle est qu'elle est facilement transposable de l'Homme à l'animal et vice versa. Les changements de connectivité fonctionnelle observés dans les études humaines peuvent être suivis chez

l'animal par des expériences plus invasives pour déterminer la base neurophysiologique des altérations, tandis que des travaux exploratoires sur des modèles animaux peuvent identifier des biomarqueurs possibles pour des études plus poussées chez l'Homme. Ces types d'expériences cliniques et précliniques ont un impact potentiellement important sur les neurosciences et la pratique médicale: c'est l'enjeu de la **recherche translationnelle**.

Néanmoins, la compréhension des mécanismes intrinsèques chez l'Homme reste limitée. Étant donné la complexité du cerveau, il est impossible de reproduire à l'identique ses fonctions in vitro ou en s'appuyant sur des modèles informatiques. Pour en faire une étude approfondie il a fallu mettre en place des expériences sur animaux choisis pour explorer certaines fonctions particulières. Cependant, une expérimentation animale reste au niveau du modèle animal. Les différences entre l'homme et ceux qui lui sont proches comme les primates sont fondamentales, ne serait-ce qu'en terme de nombres de neurones (environ 10^{10} neurones chez le primate et 10^{12} chez l'Homme). Beaucoup d'expérimentations réussies chez la souris ou le rat n'arrivent pas à être transposées chez l'homme. A titre d'exemple, 172 médicaments développés pour traiter la maladie d'Alzheimer ont échoué chez l'Homme, malgré des résultats concluants chez l'animal. Cela est d'autant plus vrai pour les études cognitives: où l'on explore les processus de décision, de jugement ou d'intelligence. De très nombreuses expérimentations et de multiples tests sont utilisés chez les animaux pour en caractériser certains traits, mais la transposition dans ce domaine reste difficile.

2.1.1.2. Etude de la connectivité fonctionnelle avec les ultrasons chez le rat anesthésié

L'IRM fonctionnelle a été pendant longtemps la seule modalité d'imagerie capable d'imager en champ large le cerveau et d'en mesurer les réseaux de connectivité fonctionnelle chez l'Homme ou chez l'animal.

En 2014, Bruno Osmanski, qui effectuait sa thèse dans notre laboratoire a démontré la capacité des ultrasons fonctionnels à décrire l'organisation fonctionnelle du cerveau au repos chez le rat anesthésié (Osmanski et al. 2014)(voir Figure 22). Cette première preuve de concept a ouvert la voie à l'étude de la connectivité fonctionnelle par ultrasons sur plusieurs modèles d'animaux. Chez la souris, modèle le plus commun pour la recherche en neurosciences, il a été montré (Tiran,2017) que le réseau de connectivité diminuait avec la profondeur de l'anesthésie. Chez le rat, des schémas de connectivité spécifiques

au sommeil paradoxal ont été découvert lors d'acquisition fUS chez le rat dormant de façon naturelle (Bergel et al. 2018). Il a également été montré que la connectivité fonctionnelle des rats nés d'une femelle ayant subi un régime faible en protéine durant la gestation était altérée (Novais et al. 2016).

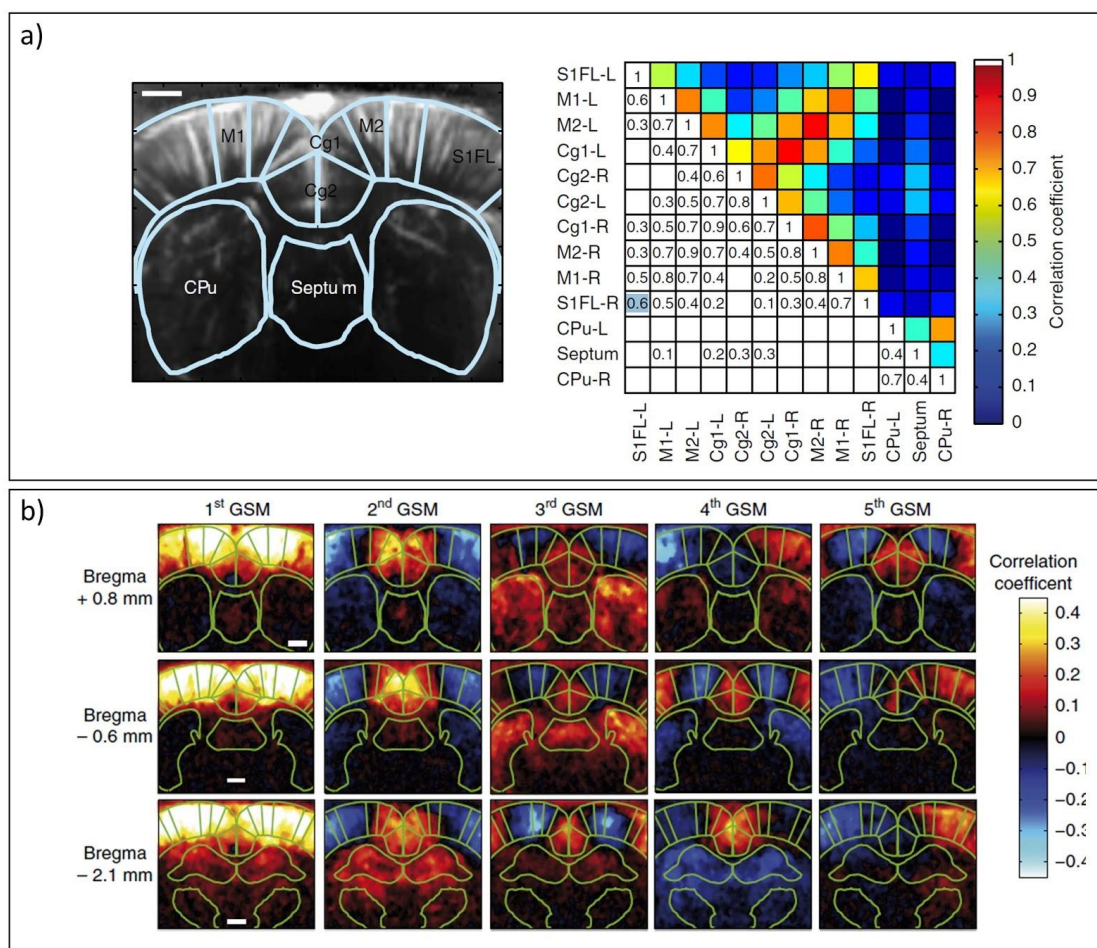


Figure 22. Connectivité fonctionnelle chez le rat anesthésié mesurée avec les ultrasons fonctionnels (issu de (Osmanski et al. 2014)). a) 13 régions d'intérêts sont sélectionnées puis le coefficient de corrélation de Pearson entre chacune d'entre-elles est reportée sur la matrice de connectivité. Cette matrice peut être vue comme le code-barres de la connectivité fonctionnelle de l'animal à l'état de repos. Lors de pathologie neuronale, cette matrice est altérée. b) Modes Spatiaux Globaux (Global Spatial Modes: GSM) de la connectivité fonctionnelle moyennés sur 4 rats, dans trois plans coronaires. Ces modes spatio-temporels représentent la répartition spatiale de l'énergie durant les acquisitions de connectivité fonctionnelle d'ultrasons fonctionnels au cours du temps. Le GSM n°1 est le mode spatial de plus forte énergie, c'est-à-dire celui le plus présent en moyenne. Le mode n°2 est le deuxième le plus énergétique, etc...

2.1.1.3. *L'anesthésie: un biais pour l'étude de connectivité fonctionnelle et la reproductibilité*

L'anesthésie ou la sédation sont généralement utilisées dans les études d'IRM des animaux pour obtenir des conditions physiologiques stables.

L'**anesthésie** se définit comme la suppression de la sensibilité à la douleur à la suite d'une lésion nerveuse, de l'action d'un médicament ou de celle du froid. C'est un processus réversible induisant une perte de conscience, une relaxation musculaire et une analgésie. Tandis que la **sédation** est définie comme la diminution de la vigilance et de la douleur par l'administration d'un anesthésique, d'un analgésique ou d'un tranquillisant pour faciliter un acte effractif et calmer le sujet.

L'anesthésie générale provoque donc la sédation mais l'une et l'autre peuvent être décorréliées. Lors de chirurgie en expérimentation animale au laboratoire, il est par exemple courant d'avoir recours à un analgésique (comme la kétamine) et un sédatif (comme la médétomidine) afin d'assurer l'anesthésie générale d'un animal.

L'anesthésie

Il a été démontré tant chez les humains, chez les primates ou le rat que des réseaux fonctionnels peuvent être détectés par l'IRM-f chez les sujets anesthésiés (Vincent et al. 2007; Lu et al. 2012). Néanmoins l'anesthésie altère fortement les constantes physiologiques (rythme cardiaque, fréquence respiratoire...), l'activité neuronale et de ce fait la connectivité fonctionnelle (Gyulai 2004). Par exemple, l'inconscience induite par l'anesthésie peut résulter d'un mécanisme de déconnexion thalamo-corticale (comme avec l'utilisation de la kétamine), dans lesquels les agents anesthésiques compromettent les schémas de connexions naturels des neurones du réseau thalamique et bloquent la transmission synaptique de l'information sensorielle par le thalamus (White and Alkire 2003).

La sédation par la médétomidine

Afin d'éviter l'anesthésie générale, la sédation est en effet souvent préférée pour les études de neuroimagerie fonctionnelle. Au cours des dernières années, la médétomidine a été introduite dans les études d'IRM-f chez les rongeurs. C'est un antagoniste adrénergique (le terme *antagoniste adrénergique* désigne des substances médicamenteuses possédant la

capacité d'agir sur les récepteurs équivalents de l'adrénaline. Ces substances freinent les récepteurs (inhibent) et s'opposent à l'action de l'adrénaline) qui induit la sédation. La médétomidine est populaire pour les études de connectivité fonctionnelle car elle comporte de nombreux avantages comme l'anxiolyse, la stabilisation de la pression artérielle et la sédation sans dépression respiratoire ou déficience cognitive importante (Cormack et al. 2005). De plus, elle n'induit pas de vasodilatation contrairement à l'isoflurane.

Cependant, chez l'Homme aussi bien que chez l'animal, l'administration de médétomidine entraîne une diminution du flux sanguin (CBF: Cerebral Blood Flow) et selon certains auteurs, elle découlerait d'une vasoconstriction cérébrale (Drummond et al. 2008; Fukuda et al. 2012). Chez le rat, l'administration prolongée de médétomidine induirait des fluctuations spontanées du signal BOLD au cours du temps (Magnuson et al. 2014). Cette variabilité du couplage neurovasculaire et de l'état métabolique sous sédation est un facteur de confusion potentiel pour les études en IRM-f. Afin de contourner les altérations de connectivité dues à l'anesthésie, certains chercheurs se sont donc tournés vers l'étude chez l'animal éveillé.

Etude de connectivité fonctionnelle chez l'animal éveillé

Ces dix dernières années, des études de connectivité fonctionnelle chez le rongeur éveillé en IRM-f (Liang et al. 2012), en imagerie optique (Wright et al. 2017), en imagerie PET (Thanos et al. 2013) et en EEG (Sellers et al. 2015) se sont développées. Pour pouvoir imager l'activité cérébrale chez les rongeurs éveillés, toutes ces modalités d'imagerie nécessitent de contraindre l'animal à l'immobilité: soit en fixant sa tête au système d'imagerie, soit en contraignant tout son corps. Les rongeurs doivent être alors entraînés à s'acclimater au stress de la contrainte pendant plusieurs jours afin de minimiser le stress aigu induit. Cependant, le processus d'acclimatation lui-même peut avoir un effet car il pourrait être considéré comme une situation de stress chronique. Certains groupes ont par exemple utilisé la constriction comme une approche efficace pour développer un modèle de dépression chez les rongeurs (Stepanichev et al. 2014).

Pour minimiser les artefacts, il semblerait donc que l'étude de la connectivité fonctionnelle chez le petit animal doit être faite sans sédation ou anesthésie, ni constriction. Pour cette étude, nous nous sommes intéressés à un modèle pharmacologique de la maladie d'Alzheimer: la scopolamine. Nous avons d'abord étudié

les effets de la prise de scopolamine chez la souris anesthésiée. Devant les difficultés rencontrées à obtenir des états de référence stables, nous avons ensuite tourné notre étude chez la souris éveillée, en mouvement libre.

2.1.2. La maladie d'Alzheimer

En section précédente, nous avons introduit l'idée que les altérations de connectivité par IRM-f au repos peuvent être des biomarqueurs de certaines pathologies neuronales, et notamment de la maladie d'Alzheimer pour laquelle la mesure des modifications des réseaux fonctionnels apparaît à un stade précoce de la maladie (Wang et al. 2006; Sperling et al. 2011).

2.1.2.1. Un défi mondial

Selon le World Alzheimer Report de 2018, 50 millions de personnes dans le monde seraient touchées par des formes de démence: deux-tiers d'entre elles sont atteints d'Alzheimer. Les autres souffrent de démence vasculaire, de démence à corps de Lewy, de démence fronto-temporale ou sémantique. Toutes ces démences sont considérées comme irréversibles. Le nombre de malades atteindraient 150 millions d'ici à 2050. Le coût total actuel de ces maladies dans le monde est estimé à environ un milliard (10^{12}) de dollars américain par an et devrait doubler d'ici à 2030.

On considère qu'un nouveau cas d'Alzheimer est diagnostiqué toutes les trois secondes dans le monde. Depuis 1998, plus d'une centaine de médicaments ont été testés mais seuls quatre d'entre eux sont autorisés sur le marché. Ces médicaments restaurent la neurotransmission cholinergique (voir paragraphe suivant sur le système cholinergique) dans le cerveau.

Ces médicaments ont récemment été retirés de la liste des médicaments remboursables. Pour cause : leur bénéfice n'est pas flagrant pour le patient et son entourage. Ils n'améliorent pas l'état du malade : en général, ils ralentissent sa dégradation ou, au mieux, ils le stabilisent. **La recherche sur les traitements de la maladie et de ses symptômes est très active mais peu de résultats nets se démarquent.** L'un des critères indispensables pour trouver un traitement adapté est la bonne compréhension de la maladie et l'existence de biomarqueurs fiables permettant de suivre son évolution. Plusieurs hypothèses existent quant à son origine mais il n'y a pas encore d'indice mesurable de celle-ci.

2.1.2.2. Le système cholinergique

Au cours de l'influx nerveux, de l'**acétylcholine** est libérée au niveau des synapses dites cholinergiques du système nerveux, pour transmettre l'information nerveuse d'un neurone au suivant. Le système cholinergique est impliqué dans les mécanismes de mémorisation et de cognition: il admet de longues projections dans un très grand nombre de structures cérébrales (voir Figure 23). Ainsi, l'activité d'un assez petit nombre de neurones cholinergiques peut influencer des structures neuronales relativement grandes.

Son dysfonctionnement pourrait être la cause des symptômes observés dans la maladie d'Alzheimer, c'est l'hypothèse cholinergique. Elle suggère en effet que le dysfonctionnement du système parasympathique serait la cause de certains des symptômes observés dans la maladie d'Alzheimer (Francis et al. 1999).

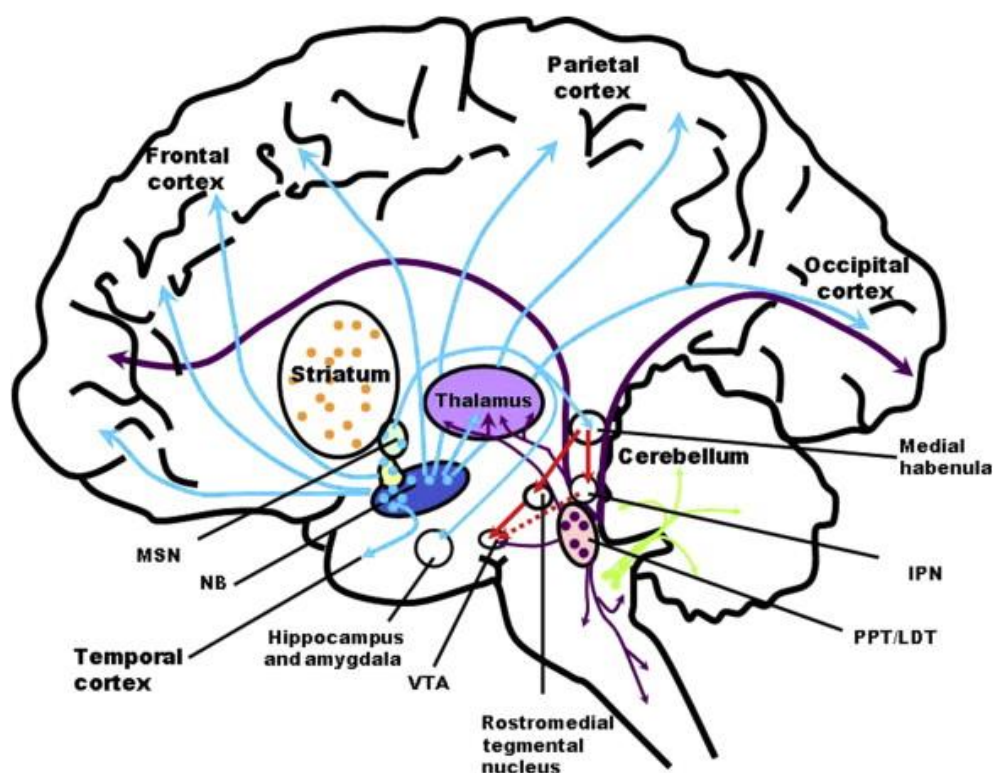


Figure 23. Principales ramifications du système cholinergique dans le cerveau humain (Perry et al. 1999)

2.1.2.3. La scopolamine: un modèle de démence approprié pour l'étude préclinique de l'Alzheimer

Comme expliqué au paragraphe précédent, trouver des traitements appropriés pour lutter contre la démence nécessite de bien comprendre la maladie. Les études sur petit animal permettent le suivi longitudinal des maladies pour mieux les prévenir et rendent possible les essais médicamenteux. Cependant, il est indispensable de travailler sur un modèle adapté et efficace de démence avant toute étude. Haider et al (Haider et al. 2016) ont comparé cinq modèles de démence chez le rat utilisés en laboratoire afin de déterminer lequel était le plus adapté à l'étude de la maladie l'Alzheimer (deux modèles pharmacologiques, deux modèles environnementaux et le modèle de vieillissement naturel).

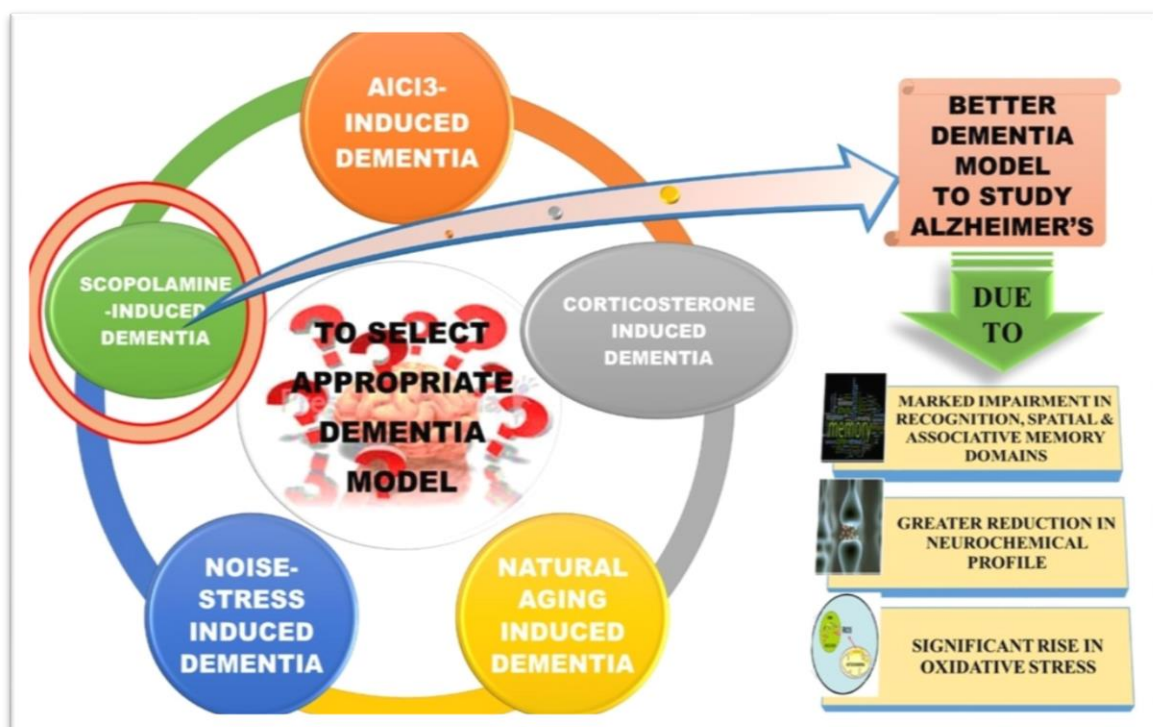


Figure 24. La scopolamine comme modèle pharmacologique privilégié pour l'étude de la maladie d'Alzheimer. D'après (Haider et al. 2016)

Après une exposition aux traitements pendant deux semaines pendant lesquels les comportements des animaux étaient reportés, les cerveaux des animaux étaient prélevés. Pour tous les modèles, il a été observé une baisse du taux de monoamine et d'acétylcholine, cette baisse étant la plus significative pour le modèle de scopolamine

pour lequel des marqueurs de fort stress oxydatif étaient également constatés: la démence étant régulièrement associée à une hausse du stress oxydatif. Enfin, malgré une baisse notable des fonctions cognitives pour tous les modèles de démence, l'analyse des tests comportementaux a révélé que le modèle de scopolamine admettait la baisse la plus significative après 14 jours d'étude.

La scopolamine a été également testée comme modèle transitoire (prise unique et mesure immédiatement après la diffusion du médicament) et a été de même, validée comme modèle d'Alzheimer sur du court-terme (de l'ordre de l'heure) chez l'homme (Flicker et al. 1990; Bajo et al. 2015).

2.1.2.4. Mécanismes et utilisation classique de la scopolamine

Outil de recherche

La scopolamine inhibe les récepteurs d'acétylcholine. En occupant ses récepteurs, la scopolamine bloque l'effet pharmacologique naturelle de l'acétylcholine et s'oppose à ses fonctions naturelles: on dit qu'elle est un antagoniste cholinergique ou un anticholinergique.

La scopolamine est utilisée comme outil de recherche pour étudier l'encodage de la mémoire. Des essais cliniques ont montré que des doses relativement faibles de scopolamine induisaient des défauts cognitifs temporaires. Depuis, la scopolamine est devenue un médicament courant pour induire expérimentalement des anomalies cognitives chez les animaux. Elle produit des effets néfastes sur la mémoire à court terme, entre autres: l'acquisition de mémoire, l'apprentissage, la mémoire visuelle, la mémoire spatiale et la vitesse psychomotrice (Ridley et al. 1984; Flicker et al. 1990).

En clinique

Le blocage des effets de l'acétylcholine par la scopolamine entraîne une diminution des sécrétions salivaires et à moindre degré, des sécrétions bronchiques. La scopolamine engendre également une diminution de la viscosité des sécrétions: elle est ainsi parfois prescrite comme traitement pré-chirurgical pour une évacuation facilitée des sécrétions durant une opération.

Elle est également prescrite en prévention du mal des transports, en cas de douleurs digestives et gynécologiques aiguës (la scopolamine entraîne une contraction du tube digestif) ou encore en soins palliatifs pour désencombrer les voies aériennes.

Effets secondaires

La scopolamine peut entraîner des irritations oculaires dus à l'assèchement des muqueuses, de la constipation et de la rétention urinaire. D'un point de vue cérébral, elle peut causer somnolence, troubles de la mémoire et de la concentration, confusion. A forte dose et chez les personnes âgées: elle peut provoquer des hallucinations. Si les quantités absorbées sont élevées, les séquelles psychiatriques sont observables plusieurs mois après la prise: d'où l'utilisation préclinique comme modèle pharmacologique longitudinal pour l'Alzheimer.

Ces effets secondaires ont été exploités à d'autres fins pour servir de "sérum de vérité" pour des interrogatoires jusqu'aux années 1990 (House 1931; Bimmerle 1993). La scopolamine est également tristement populaire en Colombie sous le nom de "burundanga" ou "souffle du diable" comme drogue utilisée par les escrocs pour voler des victimes droguées dont la volonté est totalement suspendue sous les effets de l'absorption d'une forte dose (Domínguez 2016).

2.2. Etude pharmacodynamique sous anesthésie

2.2.1. Peut-on mesurer la connectivité fonctionnelle en fUS chez la souris anesthésiée ?

Cette première étude a eu pour but de mesurer pour la première fois **la connectivité fonctionnelle** de manière non invasive **chez la souris anesthésiée**.

Travailler chez la souris anesthésiée permet de placer précisément l'animal sur un cadre stéréotaxique et d'en assurer son immobilité pendant la séquence d'imagerie. L'immobilité est un gros avantage: elle permet de surveiller les constantes physiologiques (température, rythme respiratoire, rythme cardiaque) afin d'assurer la stabilité physiologique de l'animal imagé. En effet, la souris, fixée au cadre stéréotaxique par deux barres d'oreilles et une barre de gueule, repose sur un tapis chauffant dont nous adaptons la température afin d'assurer une température interne (donnée par une sonde rectale) stable et aux alentours de 36°C. La respiration peut être modulée par l'apport en oxygène

d'un tube placé directement devant le nez de la souris. Il a été montré (Tiran et al. 2017) que l'imagerie fonctionnelle ultrasonore transcrânienne totalement non-invasive est possible chez la souris même après l'âge d'un an. Nous avons ici travaillé chez des souris âgées de 6 à 8 semaines afin de s'accorder avec les études déjà existantes sur les effets de la scopolamine chez la souris : ces études mesurant l'altération de la connectivité par le comportement (Xu et al. 2016), avec d'autres modalités d'imageries comme l'IRM-f (Shah et al. 2015) ou par étude biochimique après sacrifice des animaux (Habibyar et al. 2016).

Le choix du protocole d'anesthésie idéal pouvant être l'objet d'une thèse à part entière tant celui-ci dépend de différents facteurs (espèce d'animal, âge, paramètre physiologique mesuré, temps d'acquisition,...), nous avons décidé de reproduire dans notre étude le protocole d'anesthésie utilisé par l'équipe de Shah. et al (Shah et al. 2015) avec laquelle nous collaborons dans le cadre du projet européen FUSIMICE. Cette équipe a en effet étudié en IRM-f les effets de la scopolamine chez la souris anesthésiée. Il a été montré dans cette étude que la scopolamine engendrait une baisse de la connectivité chez les souris injectées en scopolamine en comparaison à un état de référence ou à une injection en saline. Cependant, la connectivité basale étant très faible, il est difficile d'interpréter cette altération post-injection chez la souris anesthésiée.

2.2.2. Matériel et méthodes

2.2.2.1. Préparation des animaux

Tous les animaux ont reçu des soins en accord avec les directives de 2010 de la Communauté Européenne. Cette étude a été approuvée par le Comité local d'éthique en matière d'expérimentation animale et a reçu le numéro 20171117235858. Nous avons imagé dans cette étude 10 souris mâles C57Bl/6 de 6 à 8 semaines d'environ 25g. Chaque souris n'a été imagée qu'une seule fois. Une séance d'imagerie dure au total environ 2h à partir de l'induction jusqu'au réveil spontané de l'animal.

Induction et sédation

- Induction de la souris à l'isoflurane à 3% jusqu'à endormissement profond (diminution de la fréquence respiratoire de 160/min à environ 90/min)
- Bolus sous-cutané de médétomidine (à 0.3 mg/kg)

- Inhalation d'isoflurane pendant encore 5 min à 2%

Après placement de la souris et pendant la séquence d'imagerie: maintien de la sédation par une injection continue sous-cutanée de médétomidine à 0.6 mg/kg/hr.

Préparation pré-imagerie

- Pendant la deuxième session d'isoflurane, rasage et passage de crème dépilatoire sur le dessus du crâne de l'animal. Les poils gênant le passage des ultrasons.

Puis :

- Placement de la souris sur cadre stéréotaxique et installation de la sonde rectale. La température de l'animal est modulable grâce au tapis chauffant sur lequel repose la souris.

Positionnement de la sonde échographique

La sonde échographique (miniature - voir paragraphe suivant-) est fixée à des moteurs de translation 3 axes installés au-dessus du cadre stéréotaxique. Le logiciel Neuroscan (collaboration Inserm 1273 / Iconeus) permet de les piloter à 0.2 mm près. Ainsi, après avoir étalé du gel sur le haut du crâne de l'animal et positionné la sonde juste au-dessus (écart d'environ 0.5mm entre la sonde et le haut du crâne): le système de visualisation doppler en temps réel de Neuroscan permet de vérifier en direct le plan d'imagerie. Avec les moteurs, nous pouvons translater la sonde d'avant en arrière jusqu'au plan coronal souhaité.

→ Plan coronal d'imagerie choisi: **Bregma -2.3mm.**

Ce plan sera le même pour toutes les acquisitions afin de rendre possible les comparaisons et moyennages.

Pharmacologie

Afin de visualiser les effets de la scopolamine sur la connectivité fonctionnelle des souris, nous avons testé trois groupes de souris:

- Un premier groupe (N=4 souris): groupe "**scopo 3mg/kg**" injecté avec 300µL de **scopolamine à 3 mg/kg** après les 10 premières minutes d'acquisition initiale

- Un deuxième groupe (N=2 souris): groupe “**scopo 0.5mg/kg**” injecté avec 300µL de **scopolamine à 0.5mg/kg**
- Un troisième groupe (N=4 souris) contrôle : groupe “*saline*” injecté avec 300µL de **saline**

2.2.2.2. Imagerie fonctionnelle ultrasonore

Séquences

Les séquences d'imagerie ultrasonore sont acquises avec un prototype de sonde linéaire miniature ultra-légère de 15 MHz fabriquée par la société Vermon (Tours, France). Celle-ci est composée 128 transducteurs d'émission-réception de largeur 0.110-mm (focale = 8mm, épaisseur du plan d'imagerie = 400µm). Elle est connectée à un prototype de scanner ultrasonore ultrarapide de recherche préclinique et pilotée par le logiciel Neuroscan. Chaque image doppler est obtenue par intégration temporelle de 200 images combinées acquises à 500 Hz. Une image combinée est le résultat de la somme cohérente de 11 images échographiques du milieu, acquises à 5500 Hz avec 11 ondes planes inclinées tous les 2°. (inclinaison des ondes [-10°, -8°, -6°, -4°, -2°, 0°, 2°, 4°, 6°, 8°, 10°]). Une image doppler est donc acquise en $200/500=0.4s$: l'acquisition étant continue, la fréquence d'imagerie doppler est donc de 2.5 Hz. Afin d'obtenir les images vasculaires cérébrales, un filtre SVD (voir chapitre introduction) de fréquence de coupure 60 est appliqué.

La taille des pixels de l'image doppler est de 100µm en profondeur et 110µm en axial.

Session d'imagerie

Une fois que l'animal est placé correctement, que ses constantes physiologiques sont stabilisées et que la sonde est placée dans le plan coronal choisi, la session d'imagerie peut commencer. *A posteriori*, nous avons tout intérêt à être le plus rapide possible dans la préparation de l'animal et de la mise en place de la sonde car malgré l'injection continue sous-cutanée de médétomidine, les souris se réveillaient toujours environ 45min après l'induction.

Nous avons découpé la session d'acquisition comme suit:

- 10min d'**acquisition initiale**
- Injection de scopolamine (ou de saline pour contrôle) en sous-cutanée en laissant la souris placée
- 10 min d'acquisition: **post-injection 1**
→ suivi immédiatement après de:
- 10 min d'acquisition: **post-injection 2**
→ suivi immédiatement après de:
- 10 min d'acquisition : **post-injection 3**

Les quatre souris ayant reçu une injection de 3mg/kg se sont toutes réveillées spontanément durant l'acquisition post-injection 3, ce qui a arrêté la séquence d'imagerie pour ce groupe avant la dernière acquisition.

Pour les deux autres groupes étudiés, les souris se réveillaient spontanément environ 40min après l'injection, ce qui nous permettait d'effectuer la troisième acquisition post-injection de 10min.

2.2.2.3. Traitements des données fUS de connectivité fonctionnelle

Filtrage des données et concaténation des acquisitions

Afin d'étudier le réseau de connectivité fonctionnel des souris imagées, les signaux récupérés doivent d'abord être filtrés et normalisés. Ainsi, pour chaque acquisition de chaque souris, un filtre passe-bas à 0.2 Hz est appliqué afin d'éliminer les composantes temporelles trop rapides hors du spectre de la connectivité fonctionnelle [0.01 Hz - 0.2 Hz] (Osmanski et al. 2014). Un lissage spatial par application d'un filtre impulsionnel fini (matrice 3x3 normalisée spatialement) est ensuite appliqué pour une meilleure analyse des tendances spatiales globales. Chaque signal filtré $s(\mathbf{x}, \mathbf{z})$ associé au pixel de coordonnées (\mathbf{x}, \mathbf{z}) ainsi obtenu est ensuite normalisé tel que:

$$s_{norm}(\mathbf{x}, \mathbf{z}) = \frac{s(\mathbf{x}, \mathbf{z}) - \overline{s(\mathbf{x}, \mathbf{z})}}{\sqrt{\sum_{t=1}^{N_t} (s(\mathbf{x}, \mathbf{z}) - \overline{s(\mathbf{x}, \mathbf{z})})^2}}$$

avec : $\overline{s(\mathbf{x}, \mathbf{z})}$ = moyenne temporelle de $s(\mathbf{x}, \mathbf{z})$

Une seconde analyse SVD, sur le film Doppler cette fois, est ensuite effectuée pour décomposer les données fUS en variables spatiales et temporelles distinctes, sans *a priori* nécessaire. Une acquisition fUS peut en effet être interprétée comme une matrice tridimensionnelle : une carte spatiale bidimensionnelle de vascularisation acquise à plusieurs points temporels. En introduisant $fUS(x, z, t)$ comme matrice spatiotemporelle d'une acquisition fUS, où x et z sont les variables spatiales qui décrivent la distance latérale et la profondeur d'une image Doppler Puissance, et t indique le temps à laquelle l'image Doppler Puissance a été acquise. L'analyse SVD peut être considérée comme la décomposition d'une matrice en une somme pondérée, ordonnée des matrices séparées. Par conséquent, la matrice d'acquisition $fUS(x, z, t)$ peut s'écrire après traitement SVD comme :

$$fUS(x, z, t) = \sum_{mode}^N \lambda_{mode} \cdot U_{mode}(x, y) \cdot V_{mode}(t)$$

où : U_{mode} représente les modes spatiaux

V_{mode} représente les modes temporels

λ_{mode} représente le poids de chaque mode spatiotemporel

Les modes sont orthogonaux entre eux.

Cette écriture est ainsi une nouvelle base orthogonale de décomposition de l'acquisition fUS où les modes orthogonaux sont pondérés par leur point énergétique λ_{mode} dans la matrice $fUS(x, z, t)$. Une valeur élevée de λ_{mode} signifie que les représentations spatio (avec $U_{mode}(x, y)$) – temporelles $V_{mode}(t)$ associées sont très représentatives des fluctuations spatiotemporelles de la matrice. Une valeur faible de λ_{mode} signifie que les représentations spatiotemporelles associées décrivent uniquement du bruit ou du mouvement spatialement et temporellement incohérent. Ainsi, regarder les modes d'une acquisition nous donne des informations sans à priori sur la dynamique principale des signaux.

Après observations des modes de toutes les acquisitions fUS des souris, il a été choisi de retirer systématiquement le premier mode SVD. En Figure 25 ont été représentés les quatre premiers modes des quatre souris du groupe saline avant l'injection. On observe en effet que le mode 1 est, pour chaque souris, spatialement étalé dans tout le cerveau et que le mode temporel associé contient une composante très basse fréquence. Ce premier mode ne semble donc pas décrire une organisation structurelle spécifique, mais semble plus être un bruit de fond étalé spatialement, cohérent avec tous les pixels de l'image et

donc très probablement la trace d'un artefact de mouvement résiduel. De plus, étant le mode le plus énergétique, il masque les modes suivants, qui eux, admettent des fréquences plus élevés, dans des régions bien plus localisées. Si l'on s'intéresse aux modes 2 des quatre souris représentées en Figure 25 par exemple, on constate que le cortex ressort nettement: cela suggère donc que la région cortex admet un signal cohérent qui se distingue dans la décomposition SVD du signal fUS.

Le choix est donc fait de le retirer de toutes les acquisitions le mode SVD n°1. Il est à noter que cette approche est similaire à la régression globale utilisée en IRM-f pour supprimer les artefacts de mouvement. Retirer cette composante très basse fréquence peut être assimilé à l'application d'un filtre passe-haut (le spectre de la connectivité fonctionnelle étant souvent minoré par la fréquence 0.01 Hz dans la littérature).

Cette opération revient à résoudre le même type de problématique que "le problème de la soirée cocktail" qui se porte sur détecter un signal sonore d'intérêt (la voix d'un invité de la soirée qui discute) dans un contexte auditif complexe (le bruit de fond des autres conversations). Notre filtrage y reviendrait à éteindre la musique de la soirée afin de pouvoir écouter distinctement chaque conversation. Un mode SVD correspondrait à une conversation et la musique au mode N°1 qui masque les autres modes.

Ainsi filtrées et normalisées, les acquisitions sont combinées. Pour chaque groupe (groupe **scopo 3mg/kg**, groupe **scopo 0.5mg/kg**, groupe **saline**) et pour chaque acquisition (état initial, injection 1, ...), les matrices des acquisitions fUS des souris sont concaténées temporellement. Pour le groupe **saline** par exemple, les quatre matrices d'acquisition fUS de l'état initial (10min d'acquisition par souris) des quatre souris ont été concaténées selon la dimension temporelle pour former une seule grande matrice combinée de dimensions [profondeur, largeur, (10minx4)]: voir Figure 25. Cette nouvelle matrice alors formée est de nouveau normalisée temporellement. L'étude pharmacologique des groupes se fait alors sur ces matrices combinées.

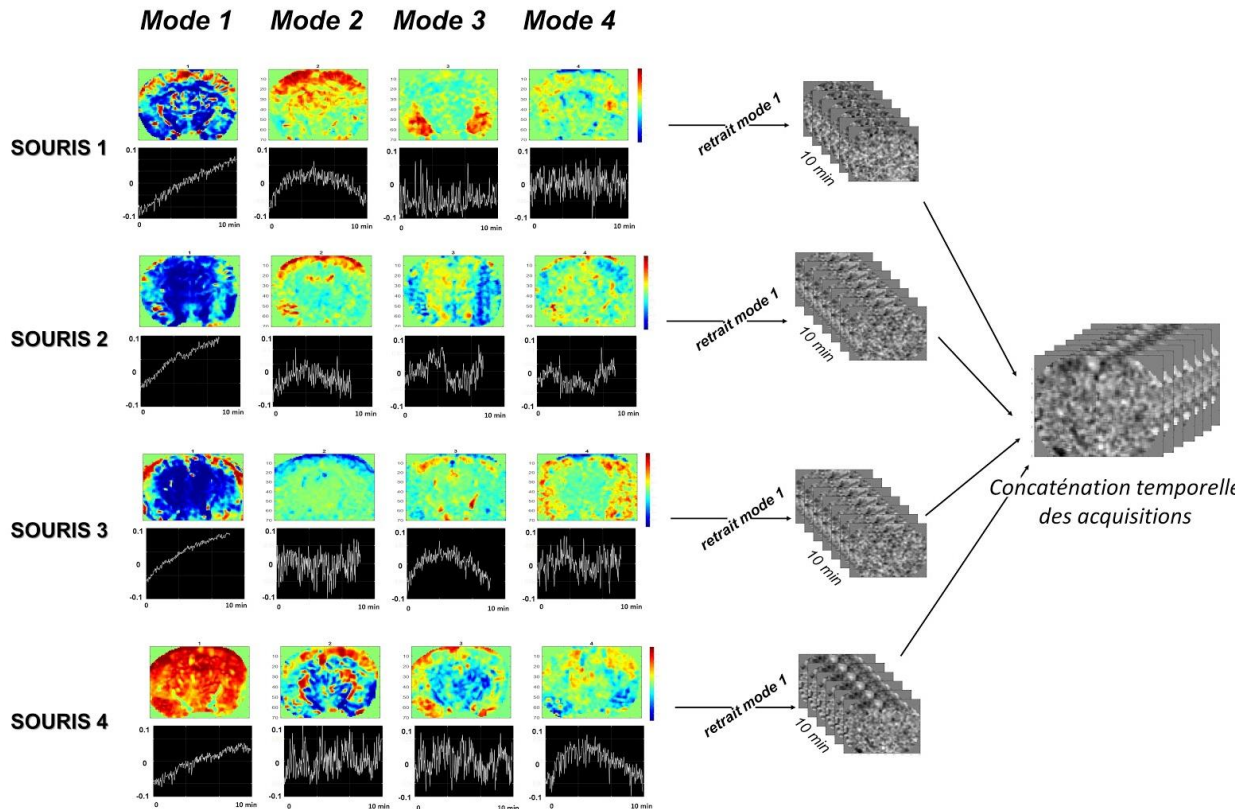


Figure 25. Quatre premiers modes spatio-temporels des souris du groupe saline avant injection. Le premier mode semble être un bruit fort étalé spatialement et très basse fréquence. Il n’apporte pas d’information ni sur la distribution spatiale de la connectivité fonctionnelle, ni sur son évolution temporelle durant les 10min d’acquisition, de plus sa forte énergie risque de masquer les modes suivants: il est donc choisi de le retirer. Une fois le mode retiré, les acquisitions sont concaténées dans le temps pour l’étude de la connectivité moyenne.

Matrice de connectivité

Douze régions d’intérêts ont été choisies dans le plan d’étude afin d’analyser le réseau de connectivité fonctionnelle. Celle-ci ont été définies avec l’Atlas de Paxinos (Paxinos 2015). Les régions 1 à 8 sont disposées dans le cortex, les régions 9 et 10 délimitent les hippocampes droit et gauche et les régions 11 et 12 sont dans le thalamus (voir Figure 26). Construire **une matrice de connectivité \mathbf{M}** basée sur des régions d’intérêts revient à calculer le coefficient de corrélation de Pearson entre les signaux de toutes les régions choisies deux à deux distinctes. Pour deux ROIs $n^{\circ}i$ et $n^{\circ}j$, cela revient à calculer $r_{i,j}$:

$$r_{i,j} = \frac{\sum_{t=1}^{N_t} (s_i(t) - \bar{s}_i)(s_j(t) - \bar{s}_j)}{\sqrt{\sum_{t=1}^{N_t} (s_i(t) - \bar{s}_i)^2} \sqrt{\sum_{t=1}^{N_t} (s_j(t) - \bar{s}_j)^2}}$$

où : \bar{s}_i = valeur moyenne temporelle de s_i

La valeur de $r_{i,j}$ est ensuite reportée dans la cellule $M_{i,j}$ de la matrice \mathbf{M} .

Nous pouvons noter que toutes les cellules $M_{j,j}$ de la diagonale de la matrice sont égales à 1 puisque le coefficient de Pearson de deux signaux normalisés identiques est égal à 1.

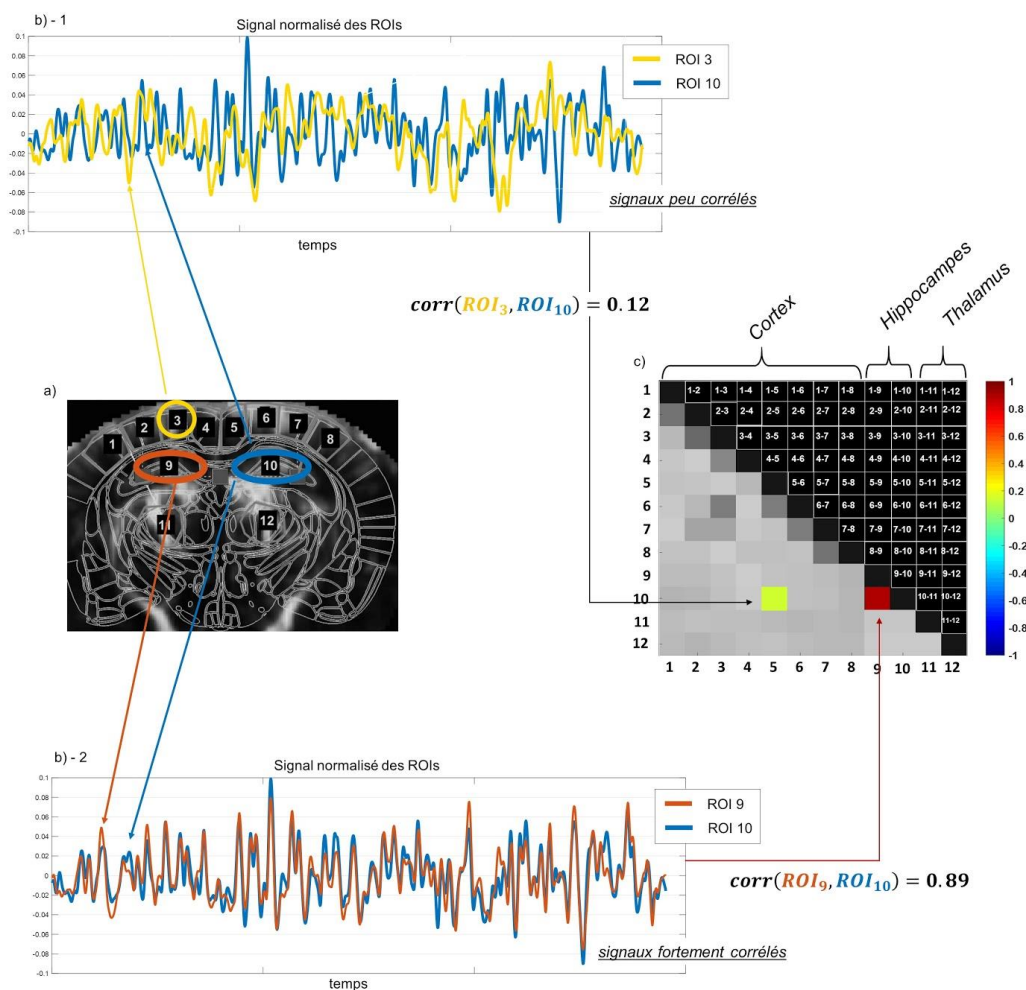


Figure 26. Construction d'une matrice de connectivité à partir du signal Doppler puissance normalisé d'une souris anesthésiée avant injection de scopolamine a) Détermination de 12 régions d'intérêt dans le cerveau de la souris au plan coronal Bregma -2.3mm. Les signaux de deux régions sont extraits pour calculer la corrélation croisée. b)-1 Ici, une région du cortex (région 3) et l'hippocampe droit (région 10). Les signaux de ces deux régions sont faiblement corrélés: leur corrélation de Pearson est égale à 0.12. On reporte ce coefficient de corrélation sur la matrice de connectivité. b)-2 Les signaux des deux régions hippocampiques sont extraits: régions 9 et 10. Les deux signaux sont fortement corrélés au cours du temps. Leur corrélation de Pearson est égale à 0.89. c) Paire à paire, on peut construire toute la matrice de connectivité moyenne du groupe étudié.

2.2.3. Résultats et interprétation

2.2.3.1. Résultats

Etat initial

Les matrices de connectivité moyennées par groupe sont présentées en Figure 27.

A l'état initial, la matrice de connectivité du groupe **saline** présente une forte corrélation intra-corticale (représentée par le carré délimité par les régions 1 à 8), tel que : score moyen de corrélation intra-corticale* : $\overline{c_{cortex}} = 0.59$ et une bonne connexion intra-hippocampique $c_{9-10} = 0.44$, mais une faible corrélation entre régions symétriques du thalamus $c_{11-12} = 0.23$.

Cette première matrice à l'état initial témoigne de l'existence de connexions bilatérales dans le cerveau des souris anesthésiées.

Cette connectivité bilatérale se retrouve à l'état initial dans les deux autres groupes, avec quelques nuances:

La matrice état initial du groupe **scopo 0.5mg/kg** présente une bonne corrélation intra-thalamique $c_{11-12} = 0.52$, une forte corrélation intra-hippocampique $c_{9-10} = 0.70$, mais les coefficients de l'anti-diagonale corticale ne sont pas nettement supérieurs au score moyen de corrélation de la matrice** ($\overline{c_{matrice}} = 0.13$) : $c_{1-8} = 0.03$; $c_{2-7} = 0.08$; $c_{3-6} = 0.18$; $c_{4-5} = 0.59$.

La matrice de connectivité du groupe **scopo 3mg/kg** de l'état initial présente des coefficients de corrélation tous supérieurs à 0.27 sur l'anti-diagonale des régions 1 à 8 justifiant de connexions entre régions deux à deux symétriques du cortex : $c_{1-8} = 0.27$; $c_{2-7} = 0.35$; $c_{3-6} = 0.48$; $c_{4-5} = 0.30$. De plus, on constate une forte corrélation entre les deux hippocampes $c_{9-10} = 0.72$. La corrélation intra-thalamique ($c_{11-12} = 0.19$) s'élève légèrement au dessus de la valeur moyenne de la matrice ($\overline{c_{matrice}} = 0.13$).

*: score moyen de corrélation intra-corticale = valeur moyenne des cellules de la corrélation intra-corticale (cellules dans le carré délimité par les régions 1 à 6 dans la matrice de connectivité)

** : score moyen de corrélation de la matrice = valeur moyenne de toutes les cellules de la demi-matrice de corrélation (sans prendre en compte la diagonale d'autocorrélation)

Ces matrices à l'état initial témoignent toutes d'une connectivité bilatérale chez la souris anesthésiée, mais les différences dans les schémas de connectivité entre les matrices des trois groupes (notamment dans les corrélations intra-corticales: très fortes dans le groupe saline, et faibles dans le groupe scopo 0.5mg/kg) rendent difficile l'interprétation de la connectivité de référence chez la souris anesthésiée. En effet, une mesure robuste de la connectivité fonctionnelle chez la souris anesthésiée doit amener à des matrices de référence semblables pour les trois groupes puisque les protocoles sont exactement identiques à l'état initial.

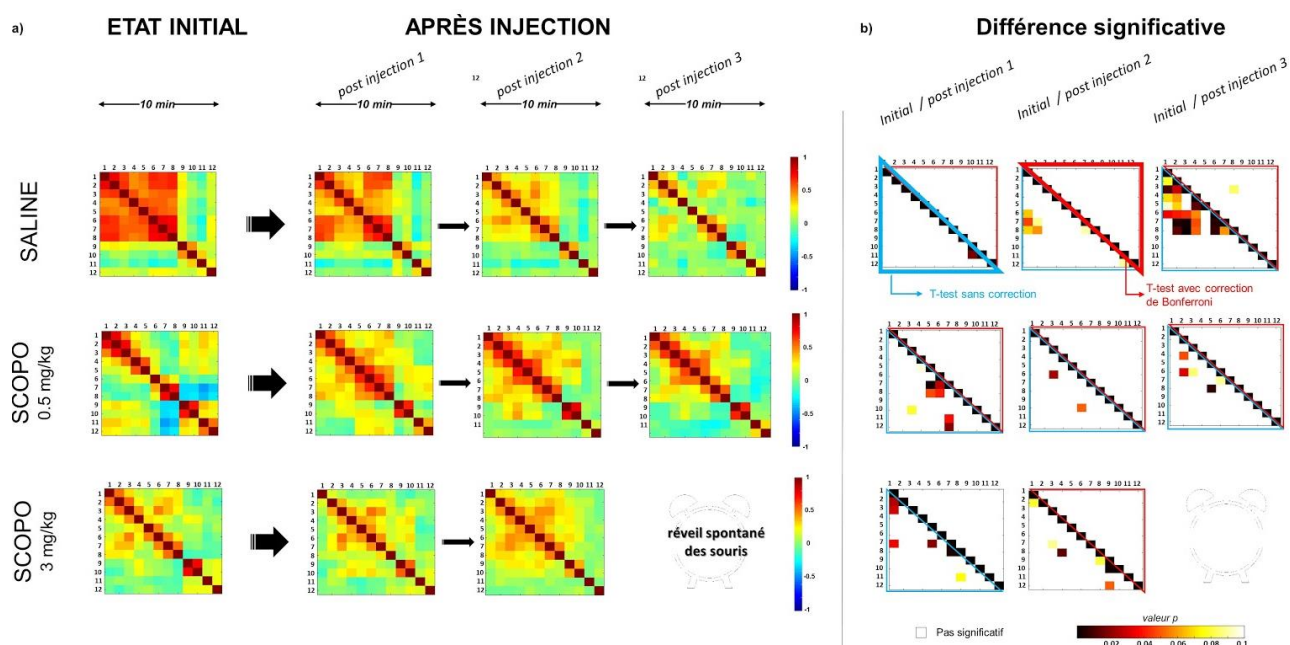


Figure 27. Matrice de connectivité des souris anesthésiées. a) Matrices des trois groupes d'études aux différents états (état initial, puis états post-injection) b) Matrices de différence significative entre les états post-injection et l'état initial de chaque groupe: la moitié inférieure des matrices (sous la diagonale) est calculée avec des t-test appariés sans correction tandis que la moitié supérieure (au-dessus de la diagonale) est calculée par des t-test appariés avec correction de Bonferroni). N=4 souris pour groupe saline et scopo 3mg/kg et N=2 souris pour groupe scopo 0.5mg/kg

Après injection

Afin de comparer les états initiaux et post-injection, nous avons calculé (Figure 27.b) les matrices de différences significatives.

Pour tester la significativité:

1- des t-tests appariés **sans correction** ont été réalisés et les valeurs p résultantes sont affichées dans la partie inférieure des matrices (sous la diagonale)

2- des t-tests appariés **avec correction de Bonferroni*** ont également été réalisés, et les valeurs résultantes affichées dans la partie supérieure des matrices (au dessus de la diagonale). Pour cette correction, nous multiplions les valeurs p trouvées du le t-test simple par le nombre d'itérations différentes, c'est à dire par $N_{\text{ROIs}}*(N_{\text{ROIs}}-1)/2 = (12 \times 11)/2$ dans notre cas.

**La correction de Bonferroni a pour but de compenser les chances que, lors de tests multiples, un test peut apparaître significatif par simple fait de l'itération des calculs de corrélation. Cette correction est plus rigoureuse, mais rend les valeurs "plus difficilement significatives".*

L'intérêt d'effectuer deux tests, l'un sans correction et l'autre avec correction de Bonferroni est donc: de pouvoir d'abord observer des tendances avec les valeurs données par le test statistique sans correction, puis de calculer rigoureusement la significativité de ces tendances en ajoutant la correction de Bonferroni. Mathématiquement, nous ne pouvons pas donner de conclusion si les tests corrigés ne sortent pas de différence significative, cependant, nous pouvons toujours commenter les tendances sorties sans correction.

Après injection, il n'y a pas de différence significative aux états post-injection 1 et post-injection 2 du groupe **saline**, mais à l'état post-injection 3, on observe une diminution de la corrélation intra-corticale (corrélation entre les régions [1] à [8]). Cette diminution est significative avec un t-test simple sans correction mais une seule cellule de la corrélation intra-corticale reste significativement différente de l'état initial après correction de Bonferroni.

Après l'injection de **0.5mg/kg** de scopolamine, les matrices post-injection présentent quelques différences faibles par rapport à la matrice de l'état initial, mais ces différences ne sont pas consistantes d'un état à l'autre (voir Figure 27.b). En effet, les états post-injection 1, post-injection 2 et post-injection 3 du groupe 0.5mg/kg présentent entre deux et cinq cellules significativement différentes de l'état initial (avec t-test sans correction) mais les cellules ne sont pas situées aux mêmes endroits dans les matrices. Avec correction de Bonferroni, il n'y a pas de différence significative observable.

Après l'injection de **3mg/kg** de scopolamine (acquisition post-injection 1 et post-injection 2), on observe également quelques cellules différentes significativement (sans correction) de l'état initial, mais ces cellules ne sont pas les mêmes d'un état au suivant.

2.2.3.2. Interprétation

Nos résultats de mesure de connectivité fonctionnelle chez la souris anesthésiée montrent à quel point la robustesse et fiabilité de ce type d'acquisition est faible, en accord d'ailleurs avec les résultats obtenus dans les mêmes conditions en IRM-f.

Tout d'abord, nous n'avons pas réussi à obtenir un schéma de connectivité fonctionnelle stable et robuste au cours du temps et entre groupes. En effet, la mesure contrôle (injection de saline) n'est pas stable au cours du temps. La tendance semble être à la baisse de la corrélation intra-corticale. Cette baisse étant notable notamment à partir de la troisième session d'imagerie post-injection, elle peut être associée à une baisse des fonctions cognitives due à l'état de sédation prolongé (les souris se réveillant cependant environ 5min à 10min après cette acquisition post-injection 3, il serait alors plus probable que durant cette dernière acquisition, les animaux soient dans un état proche de l'éveil.) Ces variations de l'état basal pour ce groupe contrôle entraîne donc d'autant plus de biais lors de l'étude des variations dues aux injections de scopolamine.

Bien que l'on ait retrouvé à chaque état initial un schéma de connectivité fonctionnelle bilatérale pour les deux groupes scopolamine (0.5mg/kg et 3 mg/kg), les états post-injection ne semblent pas présenter une modification connectivité cohérentes: les quelques modifications significatives constatées ne sont pas identiques d'un instant à l'autre ou d'une dose à l'autre.

2.2.3.3. Conclusion

L'imagerie fUS semble capable de mesurer une organisation fonctionnelle chez la souris anesthésiée puisque pour nos trois groupes d'étude, nous avons été capables de mesurer des structures de connections entre région. Cependant, les structures observées ne sont pas stables et robuste au cours du temps, et d'un groupe à l'autre. L'étude du groupe contrôle (groupe **saline**) a révélé une baisse des corrélations intra-corticales 30 min après l'injection. Sous sédation mais sans injection médicamenteuse, il semblerait donc que la

connectivité fonctionnelle chez la souris anesthésiée ne soit pas stable au cours du temps d'imagerie qui nous était permis avant le réveil spontanée de l'animal.

Cela rend l'étude pharmacologique d'autant difficile à interpréter. Les changements dus à l'injection de la scopolamine sont difficilement interprétables car non consistants dans le temps aux deux doses injectées durant le temps de mesure permis. Malgré l'injection continue de sédatif, les souris se réveillaient spontanément: à 30 min pour le groupe scopo 3mg/kg et à 40min pour le groupe scopo 0.5mg/kg. Cela ne nous a donc pas permis de prolonger les études pour évaluer si la scopolamine avait un effet sur la connectivité fonctionnelle sur des temps plus long.

Ces premières observations renvoient aux résultats de connectivité chez la souris anesthésiée de l'étude de (Shah et al. 2015): bien qu'une organisation fonctionnelle chez la souris anesthésiée peut est mesurée par mesure du couplage neuro-vasculaire et que des variations peuvent être observées sous différentes conditions; la définition d'un état basal est complexe et les altérations sont difficiles à interpréter.

2.2.4. Conclusion de l'étude sous anesthésie

Cette première partie a démontré que l'imagerie fUS chez la souris anesthésiée permet la mesure de réseaux de connectivité fonctionnelle. Cependant, avec le protocole d'anesthésie choisi, nous n'avons pas été capable de prouver que ces réseaux étaient stables au cours du temps pour le groupe contrôle ou entre les différents groupes d'études à leur état initial. De plus, les temps d'imagerie étaient limités car, bien que la sédation soit continue, les animaux se réveillent spontanément au bout d'environ 45min.

Après injection de scopolamine, nous n'avons pas réussi à mesurer d'effets significatifs induits par la scopolamine. Il est toutefois notable que les quatre souris du groupe scopo 3mg/kg se sont systématiquement réveillées plus tôt que les autres souris étudiées (30min après l'injection contre environ 45min pour les autres souris). Cela laisse à penser que la scopolamine induit bien un effet chez la souris. Cet effet semble plus fort à la plus forte dose, puisque les souris se sont toutes réveillées plus tôt après injection de scopolamine à 3mg/kg, contrairement aux deux autres groupes.

Le choix d'utiliser un anesthésiant plus fort n'a pas été retenu puisqu'il a été montré de nombreuses fois dans la littérature (Nallasamy and Tsao 2011; Jonckers et al. 2014;

Grandjean et al. 2014) que la profondeur de l'anesthésie dégradait les réseaux de connectivité fonctionnelle.

Faire une étude pharmacologique chez la souris anesthésiée requiert donc une étude plus poussée du protocole d'anesthésie afin de comprendre les conséquences physiologiques de l'anesthésiant choisi et d'adapter au besoin le protocole de sédation à la mesure voulue (Grandjean et al. 2014). Nous avons décidé de ne pas pousser l'étude à recherche d'un protocole d'anesthésie plus optimal. En effet, même si nous avons trouvé la bonne combinaison anesthésique pour mesurer une connectivité fonctionnelle stable au cours du temps, les effets du médicament étudié peuvent ensuite entrer en conflit avec les effets de l'anesthésie. De plus, dans certaines études longitudinales, les variations fonctionnelles doivent être observées sur des temps allant d'une heure à plusieurs heures, et anesthésier une souris sur des temps si longs peut être problématique (ralentissement et altération du système physiologique pour des anesthésies trop longues).

Afin d'étudier la connectivité fonctionnelle chez la souris dans des conditions optimales, nous nous sommes donc tournés vers des mesures chez la souris éveillée, qui nous semblaient envisageable en raison du caractère plus portable des ultrasons comparativement à l'IRM.

2.3. Etude pharmacologique fonctionnelle ultrasonore chez la souris éveillée

En 2015, (Sieu et al. 2015) ont montré la possibilité d'enregistrer des signaux fUS chez le rat éveillé. Un cadre en métal fixé sur le crâne du rat maintenait la sonde ultrasonore pendant les sessions d'imagerie: le rat se déplaçait dans une boîte au-dessus de laquelle le câble de la sonde était accroché. Afin de permettre à l'animal de se déplacer, le câble n'était pas complètement tendu. Le rat devait donc porter une partie du poids de la sonde lorsqu'il se déplaçait. Le poids du rat (environ 400g) étant nettement supérieur à celui de la sonde (environ 100g), ceci n'est pas une grosse contrainte chez le rat entraîné. En 2017, (Tiran et al. 2017) ont présenté la preuve de concept de l'imagerie fUS chez la souris éveillée. La souris étant beaucoup plus légère (environ 25g) que le rat, celle-ci ne peut pas porter elle-même la sonde. L'expérimentateur doit alors: soit porter le câble en suivant les mouvements de l'animal, soit placer la souris dans un système tête-fixée + plateau sur coussins d'air.

Ces deux dernières options présentent des désavantages: si l'opérateur doit tenir le câble, il n'est pas raisonnable d'imaginer de longues sessions d'imagerie dépassant l'heure. Le système tête fixée permet lui de longues séances d'acquisition sur le rongeur éveillé, mais restreint physiquement la souris, ce qui induit un stress pouvant provoquer des biais dans la mesure de la connectivité fonctionnelle. Nous nous sommes donc tournés vers un système passif amélioré, facile de mise en place et moins contraignant pour l'animal, permettant d'imager plus longtemps et sans stress. Un dispositif hybride entre la tête fixée et le câble porté par l'expérimentateur: la sonde échographique est fixée sur la tête de la souris qui peut se déplacer dans une boîte mobile sur billes. Le câble reliant la sonde à l'échographe est mou, et est fixé sur une potence au-dessus de la boîte mobile (Figure 28.e).

2.3.1. Matériel et méthodes

2.3.1.1. Expérimentation animale et procédure chirurgicale

Pour assurer l'enregistrement des variations du CBV chez les souris éveillées et libres de leurs mouvements, nous nous sommes dirigés vers un prototype de sonde ultra-légère et miniaturisée (Figure 28.a) développée par notre laboratoire et fabriquée par la société Vermon (Tours). Afin d'assurer le maintien de cette sonde sur la tête des souris pendant des sessions d'imagerie éveillée, nous avons fabriqué un porte-sonde magnétique (Figure 28.b) capable de se fixer à un petit cadre métallique chirurgicalement implantable sur le crâne des souris. Ce cadre métallique est d'abord implanté chirurgicalement huit à dix jours avant la séance d'imagerie. Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles C57Bl/6 (Janvier Labs), âgées de 7 semaines au début de la procédure d'expérimentation (en commençant par l'implantation du cadre métallique sur le crâne). Après avoir suivi une formation d'expérimentation animale en début de doctorat, j'ai pu effectuer toutes les chirurgies de mon projet de thèse.

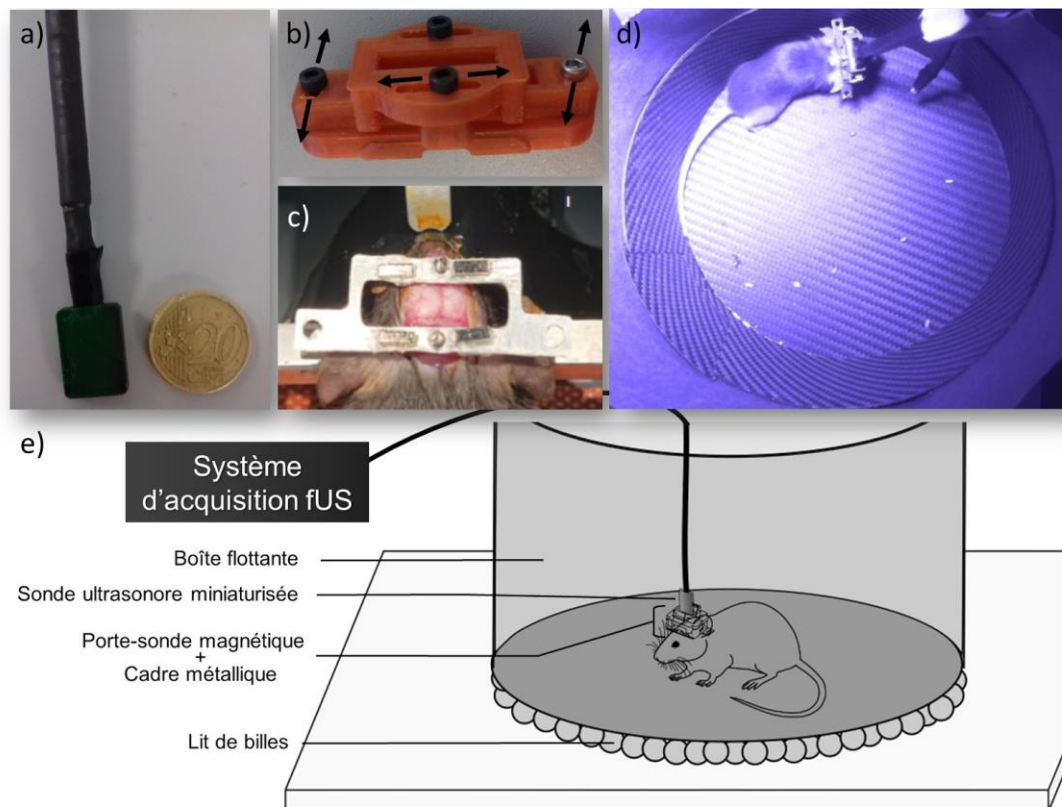


Figure 28. Dispositif d'imagerie fUS pour la souris éveillée: a) Sonde ultrasonore miniaturisée de 64 transducteurs (0.1mm/transducteur) b) Porte-sonde magnétique translatale permettant le choix du plan d'imagerie pour chaque session d'imagerie. c) Cadre métallique implanté sur le dessus de la tête de la souris. Les vis sont positionnées devant Bregma et derrière Lambda. Le champ d'imagerie est d'environ 5mm de large. d) Photo d'une souris se déplaçant librement dans la boîte flottante durant une expérience. e) Schéma montrant le dispositif d'imagerie avec la souris dans la boîte flottante (posée sur des billes assurant le mouvement de la boîte suivant le mouvement de la souris). La sonde est fixée sur la tête de la souris grâce au porte-sonde magnétique clipsé sur le cadre métallique implanté sur la tête de l'animal. La sonde est connectée à l'échographe qui enregistre les échos de rétrodiffusion en direct du cerveau, et renvoie les images Doppler en temps réel.

Pour l'implantation chirurgicale du cadre métallique, les souris sont anesthésiées à l'aide d'un mélange de kétamine (100 mg/kg, ip) et de médétomidine (1 mg/kg, ip) et placées sur un cadre stéréotaxique. Après vérification de la perte du réflexe patellaire, la peau et le périoste ont été enlevés pour exposer le crâne. Le cadre métallique est fixé sur le crâne avec deux vis d'ancrage chirurgicales (Figure 28.c). La stabilité de la structure métallique est assurée en utilisant du ciment dentaire (ciment à résine adhésive dentaire - Super bond C&B). La fenêtre du cadre (allant approximativement du crâne aux points de repère bregma à lambda) est recouverte de Silicon Elastomer KwikCast® (World Precision Instruments) pour assurer la protection et l'intégrité de l'os. Puis, l'anesthésie est reversée par une injection sous-cutanée d'Atipamezole (1 mg/kg, Antisedan). Toutes les souris reçoivent ensuite une administration prophylactique d'antibiotiques (Borgal

24%, 0,6 ml/kg/jour, s.c.) et de Meloxicam (Metacam 5 mg/kg/jour, s.c.) pour prévenir la douleur post-opératoire. Enfin, les souris sont laissées au repos dans des cages séparées (afin d'éviter que les souris se blessent entre elles avec leur cadres métalliques) pendant deux jours pour se remettre de cette procédure. Les souris portent de façon chronique uniquement le cadre métallique et deux vis, correspondant à un poids total de 4g. L'activité normale des souris portant ce dispositif dans leur cage n'est pas notablement perturbée.

2.3.1.2. Dispositif expérimental

Au cours des six jours précédant les séances d'imagerie, les souris sont entraînées chaque jour à se tenir dans une boîte cylindrique en fibre de carbone fabriquée au laboratoire. Afin de ne pas immobiliser la tête de la souris, le câble de la sonde est accroché au-dessus de la boîte (Figure 28.e) et la sonde fixée magnétiquement au cadre métallique implanté de la souris via grâce à le porte-sonde magnétique (Figure 28.b). Alors que la souris n'a pas la tête immobilisée et est libre de se déplacer à l'intérieur de la boîte, la torsion du câble de la sonde limite sa possibilité de rotation autour d'elle-même. La boîte est placée sur un lit de billes (billes métalliques de 7mm de diamètre réparties équitablement sous la boîte) (Figure 28.e). Ce lit de billes a été conçu pour permettre un mouvement libre supplémentaire de la boîte, permettant ainsi à la boîte de tourner autour de la souris si nécessaire. Cette configuration de "boîte flottante" peut-être vu comme un dispositif hybride entre l'installation à tête fixée et celle l'installation où l'expérimentateur tient le câble mou au-dessus de la tête de la souris. Après quelques séances d'accoutumance, les souris semblent détendues et se déplacent librement dans la boîte. De l'eau et de la nourriture sont laissés en petite quantité dans la boîte pendant toute la durée de l'expérience.

Afin de d'abord sélectionner le meilleur plan d'imagerie pour effectuer l'acquisition, chaque souris est d'abord anesthésiée rapidement sous anesthésie volatile (isoflurane 2%). La couche de Kwik-Cast® protégeant le crâne est enlevée et le crâne est nettoyé avec de la solution saline. La position du porte-sonde est réglée manuellement à l'aide de petites vis de translation et le plan d'imagerie visualisé à l'aide de la visualisation en temps réel des images Doppler par le logiciel Neuroscan. Pour toute cette étude, nous avons choisi d'enregistrer l'activité cérébrale dans le plan coronal **Bregma -2.3mm**. Avant de commencer l'acquisition, la souris est laissée au repos pendant environ 30min afin de récupérer des effets de l'isoflurane. Les acquisitions commencent après cette période de récupération initiale.

2.3.1.3. Etude pharmacologique

- **Étude de suivi pharmacodynamique:** La première étude (un groupe de cinq souris) est une étude de suivi pharmacodynamique pour illustrer l'estimation de l'effet de la scopolamine sur la connectivité fonctionnelle au cours du temps. Pour ce faire, nous avons d'abord acquis un film Doppler de 30 min (acquisition initiale). Nous avons ensuite injecté par voie sous-cutanée 300 µL de scopolamine à 3mg/kg à la souris éveillée puis avons relancé l'acquisition d'un film Doppler pendant une heure.

- **Étude de dose-dépendance :** La deuxième étude vise évaluer les effets de dose-dépendance induits par la scopolamine puis l'effet de l'agoniste récepteur muscarinique acétylcholine : la milameline. Cette étude a été réalisée sur cinq groupes différents. Quatre doses différentes de scopolamine (0,1 mg/kg; 0,2mg/kg; 0,5mg/kg : 3mg/kg) : 5 souris par groupe; et une dose méthyl-scopolamine (1 mg/kg) : 4 souris ont été injectées, définissant les cinq groupes étudiés. Tous ces groupes de souris ont été soumis au protocole suivant:

Une première acquisition fUS de 30min est enregistrée, après quoi la scopolamine (0,1mg/kg; 0,2mg/kg; 0,5mg/kg; 3mg/kg) ou la méthyl-scopolamine (3mg/kg) (volumes injectés : 0,3ml) a été administrée par voie sous-cutanée. 15 min plus tard (le temps que le médicament soit métabolisé), une seconde acquisition fUS de 30 min est enregistrée. Enfin, les souris sont injectées avec de la milameline (1 mg/kg) et un troisième film Doppler de 30 minutes est enregistrée (film débute 15 min après l'injection de milameline) (volumes injectés: 0,2ml).

*La méthyl-scopolamine est un dérivé méthylé de la scopolamine: elle présente les mêmes caractéristiques de liaison aux récepteurs de l'acétylcholine que la scopolamine; mais ne peut traverser la barrière hémato-encéphalique. Ses effets à court terme sur le système nerveux périphérique sont cependant similaires à ceux de la scopolamine (Andrews et al. 1994), entraînant le même type d'altérations motrices et sensorielles (Pakarinen and Moerschbaecher 1993; Herremans et al. 1995). Elle est ainsi utilisée comme **médicament contrôle** pour évaluer les performances cognitives et effets périphériques de la scopolamine sans atteindre le cerveau.*

2.3.1.4. Séquence d'imagerie

Les acquisitions ont été effectuées à l'aide d'un prototype de sonde ultrasonore ultralégère de 15 MHz (fréquence centrale de 15 MHz, 64 éléments, pas de 0,110 mm, distance focale

d'élévation de 8 mm et épaisseur de tranche de 400 μm , Vermon®, Tours) connecté au logiciel Neuroscan du système de recherche fUS, co-développé avec la startup Iconeus. Chaque image est obtenue à partir de 200 images combinées acquises à une fréquence de 500 Hz, à l'aide de 11 ondes planes inclinées séparées par des° 2 (-10°, -8°, -6°, -4°, -2°, 0°, 2°, 4°, 6°, 8°, 10°) acquises à une PRF de 5500 Hz. Les séances d'imagerie duraient environ une heure et demi et étaient effectuées par des acquisitions continues en temps réel de blocs successifs de 400 ms d'imagerie d'ondes planes combinées. Chaque bloc a été traité à l'aide d'un filtre SVD de fréquence de coupure 60.

2.3.2. Analyses de données et filtrages

2.3.2.1. Sélection d'une plage temporelle, filtrage et régression des mouvements

Comme avec n'importe quelle modalité d'imagerie, l'imagerie fUS est sensible aux mouvements et, bien que l'utilisation de la boîte flottante lisse les mouvements forts, des artefacts de mouvements subsistent dans le signal Doppler. Comme ils apparaissent dans plusieurs structures cérébrales en même temps, ces artefacts peuvent conduire à des corrélations artificiellement élevées entre les structures, ces corrélations n'étant pas dues aux signaux neuronaux mais au mouvement. Pour atténuer ces effets dans nos résultats, plusieurs traitements des signaux ont été appliqués. Tout d'abord, nous avons utilisé un filtre basé sur la décomposition de valeurs singulières pour séparer le mouvement du sang du mouvement du tissu en utilisant la cohérence spatio-temporelle (filtrage SVD, voir paragraphe *Filtrage spatiotemporel* du Chapitre 1). En second lieu, nous avons identifié les images qui devaient être retirées de chaque acquisition en utilisant une combinaison de seuils: un premier seuil pour les signaux Doppler, tous les signaux Doppler normalisés hors de l'intervalle $\pm 10\%$ sont retirés (Figure 29.c) et un deuxième seuil à l'aide d'un estimateur de la vitesse de mouvement des tissus cérébraux: cet estimateur est basé sur l'évaluation du mouvement dans les données IQ après *beamforming* mais avant filtrage SVD (Kasai et al. 1985). Ce deuxième seuil écarte du traitement final toutes les données dont le mouvement tissulaire moyenné est hors de l'intervalle $\pm 10\%$ (Figure 29.d). Troisièmement, parmi les plages temporelles restantes, nous n'avons conservés que des plages formant une période ininterrompue successive de 80 secondes ou plus pour éviter des périodes individuelles fragmentées trop petites.

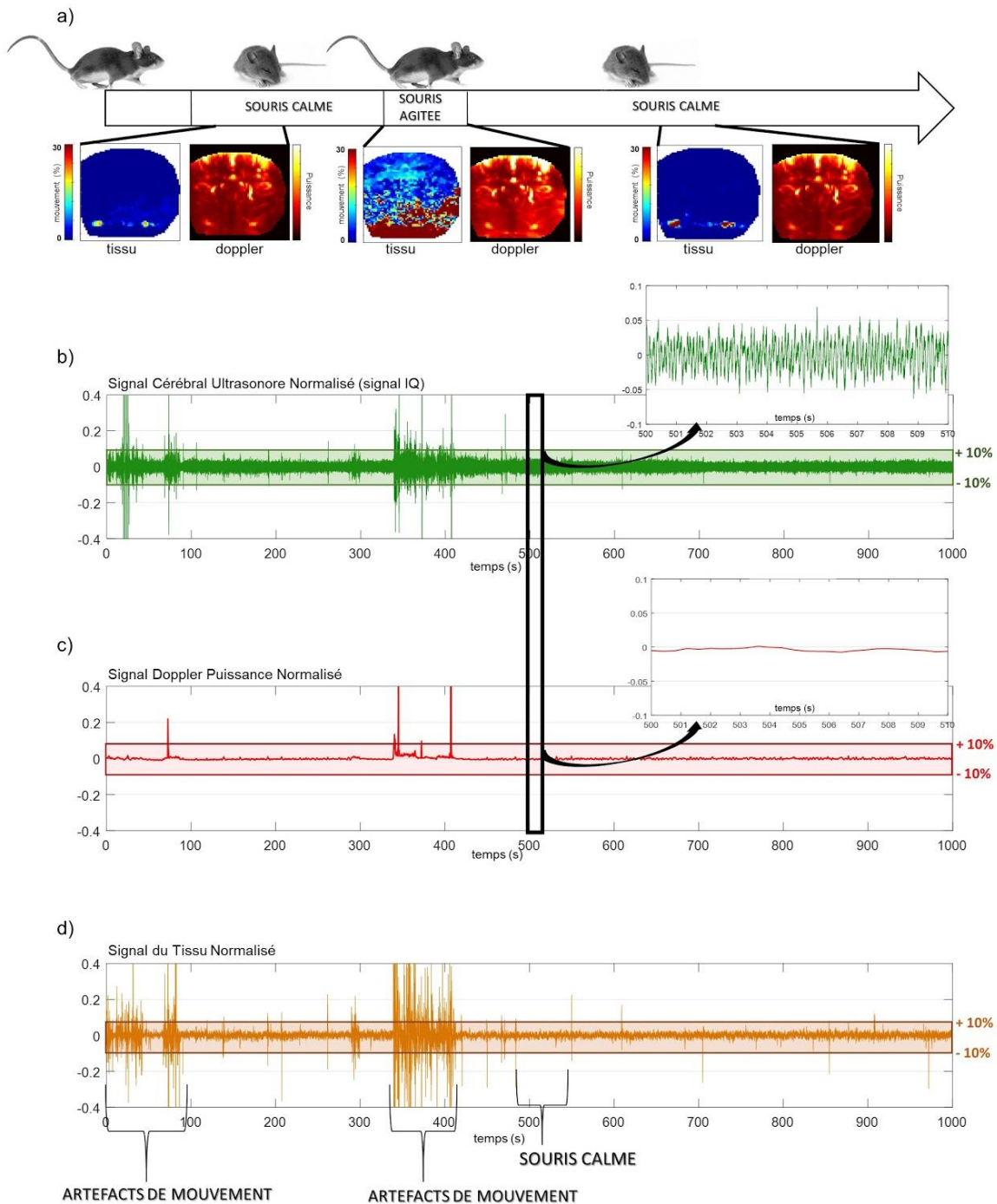


Figure 29. Exemple de sélection d'une période de temps calme a) Trois périodes représentatives de l'activité de la souris pendant l'enregistrement. Les mouvements des tissus peuvent être extraits et séparés du signal Doppler. Le mouvement tissulaire admet des valeurs élevées dans tout le cerveau pendant le temps d'agitation de la souris, alors que ce mouvement est difficilement détectable dans le signal Doppler. b) Signal cérébral ultrasonore normalisé (auss appelé signal IQ) non filtré. Il montre tous les échos de rétrodiffusion reçus du cerveau. c) Signal Doppler Puissance normalisé (filtrage SVD pour éliminer les premiers modes d'énergie dans une nouvelle base orthogonale spatio-temporelle (Demene et al. 2015). Il montre l'évolution temporelle du signal les vaisseaux sanguins cérébraux. Le rectangle noir se concentre sur une période de 10s où l'écart-type des deux signaux normalisés ne dépasse pas 10%. Cela semble être une période calme. d) Nous confirmons le choix d'une période de temps par l'analyse du signal tissulaire: une fois normalisé, le signal tissulaire choisi doit également admettre un écart-type inférieur à 10%.

Pour toutes les études de groupe, les plages sélectionnées des souris d'un même groupe sont d'abord concaténées les unes à la suite des autres après avoir recalé les vascularisations de chaque souris dans le même repère. A toute l'acquisition concaténée, nous avons appliqué un filtre passe-bas à 0,2 Hz pour supprimer les composantes à haute fréquence tout en préservant la bande de fréquence à l'état de repos. Le signal est ensuite filtré avec un ajustement polynomial de l'ordre 4 pour éliminer les fluctuations de basse fréquence. Enfin, une décomposition de valeur singulière des données est appliquée.

Le premier mode SVD étant associé à des artefacts de mouvement dans tout le cerveau: il est systématiquement retiré. Bien que la régression globale des signaux puisse conduire à des valeurs d'anti-corrélation entre des structures difficiles à interpréter, il est préférable d'éviter tout signal de mouvement global restant qui affecte l'ensemble du tissu cérébral et induit des corrélations artificiellement fortes.

2.3.2.2. Matrices de connectivité fonctionnelle et cartes *seed-based*

Afin de construire des matrices de connectivité \mathbf{M} , nous utilisons le signal CBV extrait de 10 régions d'intérêt. La méthode de construction de la matrice \mathbf{M} est identique à la partie précédente.

Nous avons également utilisé l'analyse par carte *seed-based* (corrélation temporelle avec une petite région d'intérêt déterminée par l'opérateur). Pour cela, nous déterminons d'abord une petite région spécifique du cerveau (la "*seed*": 5x5 pixels) pour laquelle on extrait le signal hémodynamique (Doppler Puissance) filtré au cours du temps. Nous déterminons ensuite la corrélation temporelle (en utilisant le produit de Pearson) entre son signal et le signal Doppler Puissance de **tous les autres pixels** de la carte cérébrale filtrée. Ceci crée une carte de connectivité de covariance du cerveau entier **pixel par pixel** avec la région *seed*. Il s'agit d'une méthode basée sur l'hypothèse, car elle répond à une hypothèse précise sur la connectivité fonctionnelle de la région *seed* par rapport à tout le reste du cerveau.

Deux petites régions *seed* différentes ont été choisies, chacune large d'environ 5 pixels² : une dans l'hippocampe gauche (*seed* S_h), et une dans le cortex frontal gauche (*seed* S_c), les deux situées dans le plan **Bregma -2,3mm** étudié (voir Figure 30.a).

2.3.2.3. Extraction des périodes calmes

Pour chacune des 5 souris de l'**étude de suivi pharmacodynamique**, nous avons pu extraire de leurs acquisitions longitudinales sept différents blocs de « signal utile » de 80 à 120 s (comme décrit dans la section 2.3.2.1) et correspondant à sept périodes distinctes de l'acquisition. Deux périodes avant l'injection de scopolamine T1 et T2, et quatre périodes successives après l'injection de scopolamine de T3 à T7. Les plages temporelles de ces différents blocs sont détaillées en Table 1.

Périodes	Acquisition	Plages Temporelles
<i>T1</i>	<i>Avant Scopolamine</i>	<i>T= 2min -> 6min</i>
<i>T2</i>	<i>Avant Scopolamine</i>	<i>T= 22min -> 26min</i>
<i>T3</i>	<i>Après Scopolamine</i>	<i>T= 1min -> 5min</i>
<i>T4</i>	<i>Après Scopolamine</i>	<i>T= 13min -> 17min</i>
<i>T5</i>	<i>Après Scopolamine</i>	<i>T= 28min -> 31min</i>
<i>T6</i>	<i>Après Scopolamine</i>	<i>T= 44min -> 47min</i>
<i>T7</i>	<i>Après Scopolamine</i>	<i>T= 55min -> 60min</i>

Table 1 : Plages temporelles utilisées pour l'étude pharmacodynamique

2.3.2.4. Statistiques

Des T-tests appariés ont été utilisés pour comparer les conditions d'injection pré-injection, post-scopolamine et post-milameline pour les différents groupes étudiés (étude pharmacodynamique: Figure 30, et étude dose-dépendance: Figure 31).

Une première approche est de comparer les valeurs paires à paires des matrices aux différentes conditions (pré-injection, post injection). **Nous avons représenté les différences significatives sous la même forme que lors de l'étude en anesthésié** (Figure 27), c'est à dire: sur les matrices de significativité de la Figure 30.c nous représentons dans la moitié inférieure (sous la diagonale) les valeurs p de significativité données par un T-test sans correction, puis (moitié supérieure, au dessus de la diagonale des matrices) nous utilisons la correction de Bonferroni pour éliminer les risques de corrélations fortuites liées au nombre de tests effectués. Les valeurs p trouvées avec le t-test simple sont multipliés par le nombre d'itérations différentes, soit par $10 \times 9 / 2$.

Puis (Figure 30.d et e. et Figure 31.b), nous considérons uniquement un score composite constitué des valeurs de corrélation entre les zones corticales et hippocampiques qui nous est apparu comme pertinent après observation des matrices de connectivité. Dans ce cas nous n'appliquons pas de correction, même si cela est discutable, car la formation du score provient d'une observation a posteriori des données. Afin de lever cette ambiguïté, nous présentons en fin de chapitre, une approche entièrement non biaisée où un score est construit automatiquement sur un premier jeu de données et est ensuite validé sur un second jeu de données indépendant.

2.3.3. Résultats de l'étude éveillée et conclusion

2.3.3.1. Étude de suivi pharmacodynamique

Analyse des cartes seed-based

Pour cette étude longitudinale, nous avons suivi l'évolution des cartes *seed-based* au cours du temps. Les cartes corrélées avec la *seed* située dans le cortex frontal gauche S_c et les cartes de corrélation avec la *seed* située dans l'hippocampe gauche S_h (voir Figure 30.a).

On peut constater en observant les cartes Figure 30.a **qu'avant l'injection de scopolamine** (aux temps T1 et T2), les deux hippocampes sont les seules régions corrélées avec S_h , illustrant le fort couplage contralatéral des structures.

De même, selon les cartes *seed-based* (Figure 30.a), les seules régions corrélées avec S_c avant l'injection de scopolamine sont les zones du cortex.

Avec ces premières cartes pré-injection chez la souris éveillée, nous retrouvons les connexions bilatérales de connectivité fonctionnelle mesurées chez la souris anesthésiée présentées à la partie précédente de ce chapitre.

Juste **après l'injection de scopolamine** (temps T3), les cartes ne montrent pas de différence claire avec les cartes de T1 et T2 : les zones corrélées avec les deux régions S_h et S_c sont sensiblement les mêmes qu'avant l'injection au regard des cartes Figure 30.a.

A partir du temps T4, on observe une forte augmentation de la corrélation hippocorticale. Sur les cartes *seed-based* Figure 30.a, on observe une forte corrélation entre le cortex et la *seed* S_h (exprimée par le "rougissement" de la zone corticale dans la carte *seed-based* avec S_h). De même, les zones des hippocampes "rougissent" dans la carte *seed-based* avec S_c .

Au temps T5, T6 et T7, d'après les cartes *seed-based*, cette corrélation hippo-corticale est maintenue.

Ces cartes post-scopolamine suggèrent une augmentation de la connexion hippo-corticale suite à l'injection de scopolamine.

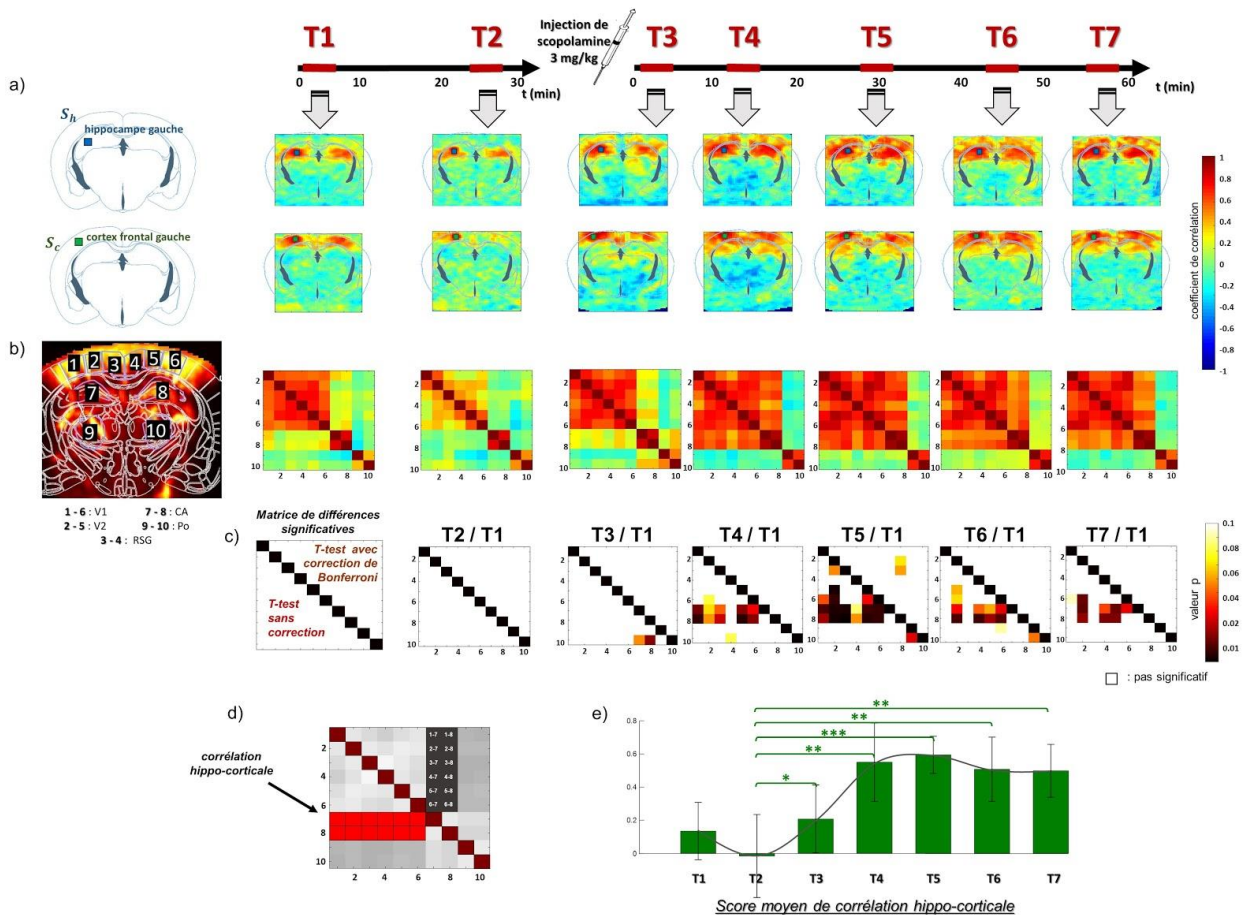


Figure 30. Etude de suivi pharmacodynamique: acquisition initiale pendant 30min, suivi d'une injection de 300 μ L de scopolamine à 3mg/kg, suivi d'une acquisition continue d'une heure. Plan étudié : Bregma -2.3mm. Les acquisitions continues (avant et après l'injection de scopolamine) sont divisées en sept périodes temporelles durant de 80s à 120s : T1 à T7. a) Cartes de connectivité, utilisant la méthode d'analyse du "seed-based": carte de corrélation au cours du temps entre chaque pixel du cerveau et la *seed* S_h (située dans l'hippocampe gauche) ou la *seed* S_c (située dans le cortex préfrontal gauche). b) Matrices de connectivité: matrices reportant dans chaque cellule $M_{i,j}$ les corrélations entre deux régions d'intérêts i et j (numérotation des régions indiquée sur la carte Doppler) c) Matrices de différences significatives entre le temps T1 (initiale) et les autres temps (de T2 à T7) de l'étude de suivi. Les valeurs p calculées paires à paires avec un t-test sans correction sont affichées en dessous de la diagonale des matrices tandis que les valeurs p calculées avec un t-test avec correction de Bonferroni sont affichées au-dessus de la diagonale d) Cellules des matrices de connectivité impliquées dans la corrélation hippo-corticale. e) Score moyen de corrélation hippo-corticale des matrices de connectivité: moyennes des cellules de la corrélation hippo-corticale.

Matrices de connectivité fonctionnelle

Les premières observations faites sur les cartes *seed-based* sont confortées par l'étude des matrices de connectivité présentées en Figure 30.b. Ces matrices représentent les corrélations appariées entre régions d'intérêts (ROIs) définies selon l'Atlas de Paxinos (Paxinos 2015). Dix régions ont été retenues et sont affichées sur la carte doppler en Figure 30.b: les régions 1 à 6 sont situées dans le cortex, les régions 7 et 8 délimitent respectivement les hippocampes gauche et droit, et enfin les régions 9 et 10 sont situées dans les thalamus droit et gauche.

Aux temps T1 et T2, on peut observer sur les matrices de connectivité que les régions corticales (régions 1 à 6) sont fortement corrélées entre elles, mais admettent une faible corrélation avec les régions hippocampiques (régions 7 et 8) et les régions thalamiques (régions 9 et 10). Au temps T3, la connectivité la forte est observée dans les régions intra-régionale (cortico-corticale + hippo-hippocampique + thalamo-thalamique) et la plus faible corrélation cortico-hippocampique (cortex avec [7] et [8]) et cortico-thalamique (cortex avec [9] et [10]). A partir du temps T4 et jusqu'au temps T7, dans la matrice de connectivité une augmentation substantielle des coefficients de corrélation entre les régions corticales ([1] à [6]) et les régions hippocampiques ([7] et [8]).

Afin d'estimer ces changements de connectivité suite à l'injection de scopolamine, les matrices de différences significatives entre T1 (acquisition initiale, de référence) et les acquisitions des temps suivants sont affichées en Figure 30.c. En dessous de la diagonale des matrices, sont données les valeurs p de significativité calculées avec des t-tests appariés **sans correction**, tandis qu'au-dessus de la diagonale, une **correction de Bonferroni** a été appliquée au t-tests appariés.

On observe tout d'abord que les matrices de connectivité entre T1 et T2 ne sont pas significativement différentes. Au temps T3: seules deux cellules (de la corrélation entre les hippocampes et le côté gauche du thalamus) sont significativement différentes (sans correction) de l'état initial (et pas de différence significative avec correction de Bonferroni).

Au temps T4, on observe que les **cellules impliquées dans la corrélation hippo-corticale** (voir Figure 30.d pour les positions des cellules de la corrélation hippo-corticale) sont significativement différentes du temps T1 *avec un t-test sans correction*. Avec la correction de Bonferroni en revanche, ces différences significatives disparaissent.

Au temps T5 de même, on observe que **ces même cellules** de la corrélation hippo-corticale (plus quelques cellules intra-corticales) sont significativement différentes de l'état initial *avec le t-test sans correction*. Avec la correction de Bonferroni, deux cellules de la corrélation hippo-corticale (cellules [2,8] et [3,8]) restent significativement différentes de l'état basal.

Enfin, aux temps T6 et T7, les t-test *sans correction* désignent de nouveau les cellules hippo-corticales comme significativement différentes du temps T1, mais ces cellules n'apparaissent pas significatives après correction de Bonferroni.

Bien qu'en étant rigoureux, les matrices post-injection ne sont pas significativement différentes de l'état basal; les t-tests appariés sans correction de Bonferroni montrent des différences au niveau de la corrélation hippo-corticale après injection. D'après ces premières estimations, nous faisons alors le choix de nous intéresser à **la dynamique au cours temps de la corrélation hippo-corticale** (Figure 30.d).

On évalue à chaque temps T le score moyen de corrélation hippo-corticale, qui est calculé comme la valeur moyenne des cellules impliquées dans la corrélation hippo-corticale. Les valeurs de ce score au cours du temps sont reportées sur le graphe Figure 30.e :

- Au temps T1 et T2, les scores moyens hippo-corticaux sont tous deux faibles: avec $score_{T1} = 0.13$ et $score_{T2} = -0.016$.
- A T3, le score augmente à 0,22.
- A partir du temps T4, on mesure une augmentation significative de ce score moyen hippo-cortical [$score_{T4} = 0.55$, $p(T4/T1) = 0.018$].
- Ce score reste significativement supérieur au score de l'état initial pour les temps T5, T6 et T7 : [$score_{T5} = 0.59$, $p(T5/T1) = 0.0011$] , [$score_{T6} = 0.51$, $p(T6/T1) = 0.019$] , [$score_{T7} = 0.50$, $p(T7/T1) = 0.014$].

2.3.3.2. Étude de dose-dépendance

Nous avons ensuite effectué une étude de doses sur cinq groupes différents : 5 souris par étude (sauf pour l'étude de la méthyl-scopolamine qui a été menée sur quatre souris). Pour chaque groupe, nous avons d'abord effectué 30 min d'une acquisition de base continue, puis 30 min d'une acquisition continue après injection de scopolamine (groupe 1 : 0,1mg/kg, groupe 2 : 0,2mg/kg, groupe 3 : 0,5mg/kg, groupe 4 : 3mg/kg et groupe 5 : méthyl-scopolamine à 1mg/kg), et nous avons terminé avec 30 min d'acquisition

continue après injection de milameline. Pour chaque souris et chaque acquisition continue, nous avons extrait des périodes de temps de 80 à 120 s de signal utile (voir la section 2.3.2.1). Comme pour l'étude de suivi pharmacodynamique, nous avons suivi l'évolution de la corrélation entre le cerveau entier et deux régions *seed* : l'une dans le cortex frontal gauche S_c et l'autre dans l'hippocampe gauche S_h . Nous avons également étudié les matrices de corrélation FC donnant les corrélations appariées entre les 10 régions d'intérêt (ROIs) définies à la Figure 30.b.

Connectivité fonctionnelle initiale (avant injection)

Pour les cinq groupes, la connectivité fonctionnelle moyenne initiale est caractérisée par **une forte corrélation intra-régionale** (c'est à dire cortico-corticale, hippo-hippocampique et thalamo-thalamique (Figure 32.a) et une faible corrélation cortico-hippocampique (voir les matrices de connectivité Figure 31.a). En effet, pour toutes les études à l'état initiale, nous pouvons observer sur les cartes *seed-based* (Figure 31.a) que les hippocampes sont les seules zones corrélées (rappel: corrélées= en couleur chaude) avec la *seed* S_h et que la région du cortex est la seule corrélant avec S_c .

De même, si on s'intéresse aux matrices de connectivité Figure 31.a, on peut évaluer là encore le score moyen de corrélation hippo-corticale (graphique Figure 31.b): sa valeur reste dans l'intervalle $[-0,2 ; 0,1]$ pour les cinq groupes à l'état initial. Ceci illustre la capacité du fUS à mesurer des matrices de connectivité fonctionnelle reproductibles chez les souris éveillées.

Connectivité fonctionnelle après injection de scopolamine

Après l'injection de scopolamine, la carte *seed-based* et la matrice de connectivité **groupe 1** (dose de scopolamine : 0,1 mg/kg) sont semblables à l'état initial. D'après le graphe Figure 31.b, le score moyen de corrélation hippo-corticale augmente légèrement après l'injection de scopolamine (de $score_{init} = -0.025$ à $score_{scop} = 0.23$) mais cette augmentation n'est pas significative ($p = 0.12$).

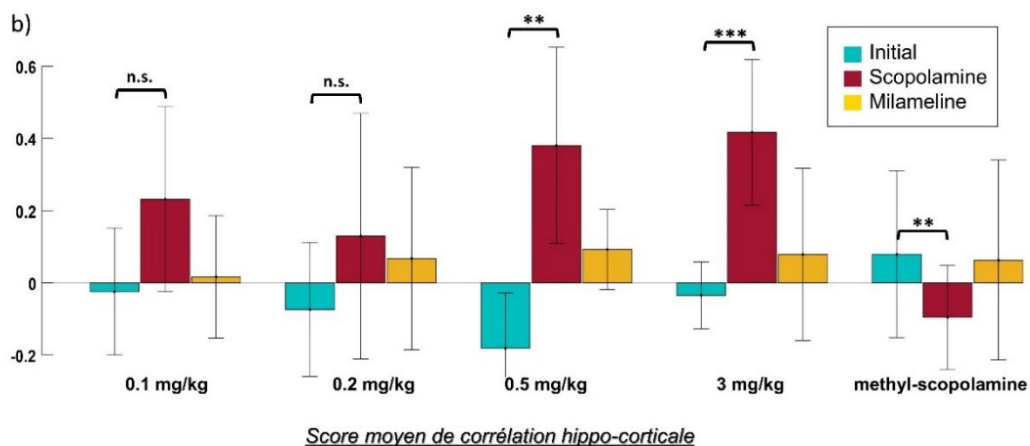
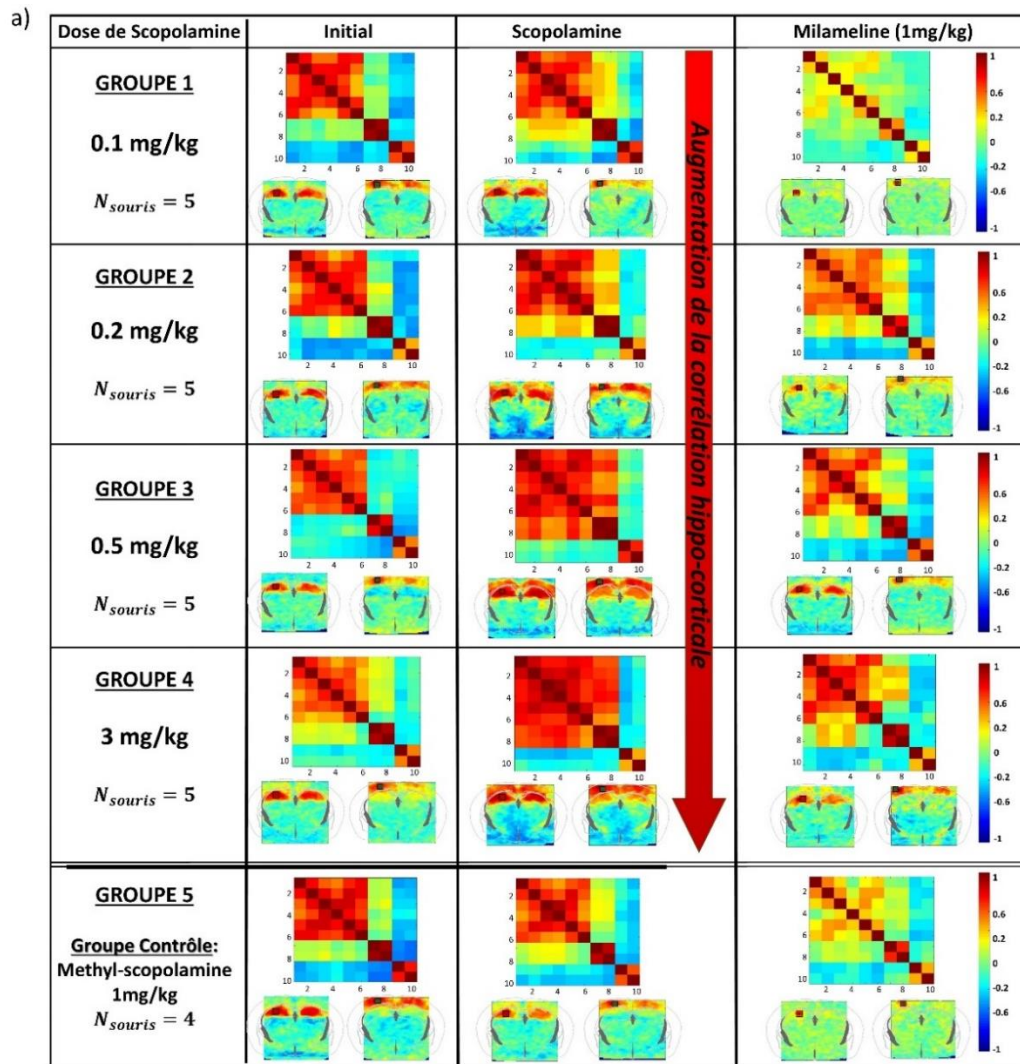


Figure 31. Etude Dose-Dépendance: Effets liés à la dose de la scopolamine injectée et étude de l'effet inverse de la milameline a) Matrices de connectivité et cartes *seed-based* des cinq groupes-dose de souris étudiés aux trois étapes de l'étude: initiale, sous scopolamine puis après injection de milameline b) Graphique du score moyen de corrélation hippo-corticale à chaque étape de l'étude pour les cinq groupes. Les augmentations du score hippo-corticale après l'injection de scopolamine ne sont pas significatives pour le groupe 1 ($p=0.12$) et le groupe 2 ($p=0.28$), mais le sont pour le groupe 3 ($p=0.013$) et le groupe 4 ($p=0.0067$). Il y a une diminution significative de la corrélation hippo-corticale après l'injection de méthyl-scopolamine pour le groupe 5 ($p=0,04$).

Pour le **groupe 2** (dose de scopolamine = 0,2 mg/kg), une légère augmentation de la corrélation cortico-hippocampique est observée dans la matrice de connectivité: le score hippo-cortical (graphe Figure 31. b) passe de -0,075 (état initial) à 0,15 (après injection de scopolamine). Toutefois, cette augmentation n'est pas significative ($p = 0.28$).

Pour le **groupe 3** (dose de scopolamine : 0,5 mg/kg), les valeurs de corrélation hippo-corticale sont toutes supérieures à 0,4 (matrice Figure 31.a) et l'augmentation du score hippo-cortical par rapport à l'état initial est significatif ($score_{init} = -0.19$, $score_{scop} = 0.43$, $p = 0.013$). Dans les cartes *seed-based*, les régions corticales apparaissent maintenant clairement dans les régions corrélées avec S_h , ainsi que les hippocampes avec S_c .

Pour le **groupe 4** (dose de scopolamine : 3 mg/kg), nous retrouvons des résultats semblables à ceux de l'étude 1 : nous mesurons en effet une augmentation significative ($p = 0.0067$) du score hippo-cortical (de -0,034 à 0,46) après l'injection de scopolamine à cette dose.

Enfin, **pour le groupe 5** (méthyl-scopolamine à 1 mg/kg): il n'y a pas d'augmentation significative du score hippo-cortical après injection de méthyl-scopolamine ($score_{init} = 0.080$, $score_{scop} = -0.09$). On peut même constater une diminution significative de ce score de corrélation hippo-corticale ($p = 0.04$).

Connectivité fonctionnelle après injection de milameline

Après l'injection de milameline, les scores moyens de corrélation hippo-corticale des cinq groupes (graphe Figure 31.b) redescendent sous 0,1. Pour le groupe 1: la connectivité globale semble nettement diminuée. Plus particulièrement, le score moyen de corrélation intra-régionale (Figure 32.a pour la visualisation des cellules impliquées dans le score intra-régional) décroît de façon significative par rapport à l'état initial après l'injection de milameline ($p = 0.0023$, Figure 31.b).

Néanmoins, du groupe 2 au groupe 4, on retrouve dans les matrices de connectivité une organisation et des valeurs similaires à ceux des états initiaux. (Forte corrélation intra-régionale et faible corrélation cortico-hippocampique). Il n'y a pas de variation significative du score moyen de corrélation intra-régionale entre les états initiaux et sous milameline.

Le groupe 5, en revanche, présente une matrice de connectivité après injection de milameline semblable à celle observée après milameline du groupe 1, c'est à dire avec de faibles connexions intra-régionales. La diminution du score moyen de corrélation intra-régionale est significative ($p=0.036$).

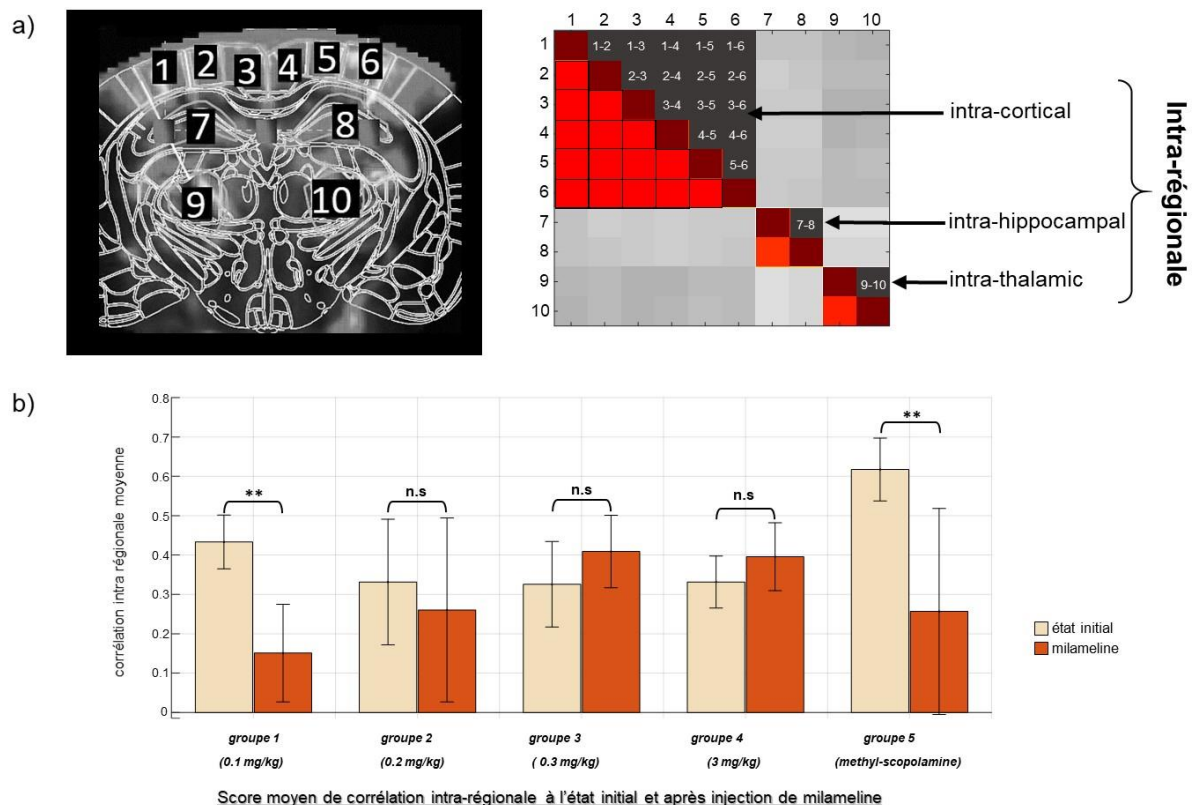


Figure 32. Comparaison de la corrélation intra-régionale à l'état initial et après l'injection de milameline pour les cinq groupes de l'étude dépendante de la dose. a) Rappel des régions d'intérêts (ROIs) sélectionnées b) Illustration des cellules de la matrice de connectivité impliquées dans le score de corrélation intra-régionale c) Score moyen de corrélation intra-régionale à l'état initial (beige) et après injection de milameline (orange). Dose de Milameline= 1mg/kg. N=5 rats pour les groupes 1 à 4 et N=4 rats pour le groupe 5.

2.3.3.3. Reconnaissance automatique des états pathologiques

Comme nous l'avons vu, de façon à étudier les effets de la scopolamine sur les souris éveillées, nous avons d'abord détecté les régions impliquées dans les changements en observant les cartes *seed-based* et les matrices de connectivité. Nous avons ensuite mesuré ces changements: principalement les variations de la corrélation entre les hippocampes et

le cortex, notamment via le score moyen de corrélation hippo-corticale. Toutefois pour d'autres études, la modification de connectivité peut s'exprimer à travers de nombreux autres paramètres et l'étude des variations devraient être généralisable sans *a priori* initiaux. De plus, notre approche précédente peut souffrir d'un biais statistique puisque notre score a été déterminé *a posteriori* sur les mêmes données. Nous explorons donc ici une méthode nouvelle de différenciation de l'état pathologique de l'état de référence, sans assomption sur les marqueurs de différenciation. Cette méthode s'apparente dans notre cas à un classifieur qui permet la discrimination entre les états sous scopolamine et les états de référence chez les souris éveillées. Elle peut-être transposable à tout type de groupes pathologiques à comparer à un groupe de référence.

Classification SVM

Nous avons entraîné un algorithme (modèle de régression linéaire de type **Machine à Vecteurs de Support : SVM**) pour reconnaître les états pathologiques des états sains dans un jeu de données (Figure 34.a). Le but d'un classifieur SVM, est d'apprendre à bien placer une frontière entre deux catégories d'entraînement. Dans un espace à N dimensions, deux ensembles de points (d'entraînement) de N coordonnées appartenant à deux catégories différentes seront séparés grâce à la régression linéaire par une hyperdroite "optimale". Cette droite (de N dimensions) correspond à la frontière la plus éloignée de tous les points : on dit qu'elle a la 'meilleure capacité de généralisation'. Ainsi, le but d'un SVM est de trouver cette frontière optimale, en **maximisant la distance entre les points d'entraînement et la frontière** (Figure 33).

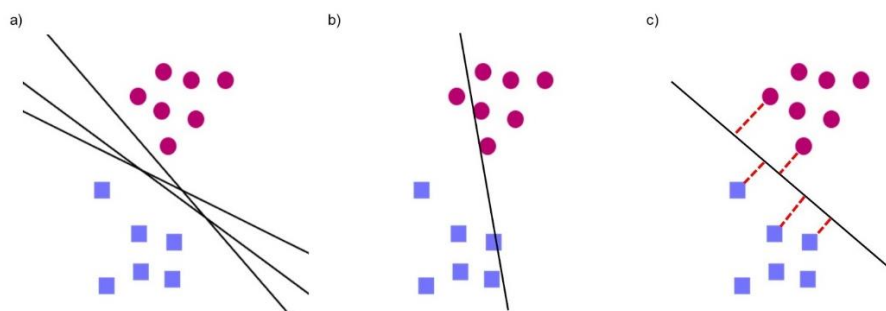


Figure 33. Principe de la discrimination de groupes par régression linéaire a) Entraînement du modèle avec des droites séparant deux catégories de points b) Une frontière non-optimale, qui passe très près des points d'entraînement. Cette frontière classe de façon erronée un rond rouge clair comme un carré bleu c) La frontière optimale maximise la distance entre tous les points et sépare bien distinctement les deux catégories d'entraînements

Entraînement et résultats de la régression linéaire

Nous avons utilisé les matrices de corrélation des cinq souris de l'étude de suivi pharmacodynamique au temps T1 (référence) et au temps T5 (état pathologique: souris sous scopolamine à la plus forte dose (3mg/kg) comme données prédictives : au total 10 matrices (cinq matrices à l'état basal, cinq matrices après scopolamine). Nous avons attribué un score=0 aux cinq matrices de référence et un score=1 aux cinq matrices des animaux traités à la scopolamine (Figure 33.a).

Après entraînement, l'équation de l'hyperplan séparant les deux groupes s'écrit:

$$\text{score} = \mathbf{P} \cdot \mathbf{M} + b$$

- \mathbf{M} est la matrice scorée
- \mathbf{P} est une matrice de même taille que \mathbf{M} dont les valeurs des cellules représentent leur poids dans la discrimination entre les groupes. Les valeurs de \mathbf{P} sont comprises entre -0.098 et 0.11
- $b = 0,1575$: ordonnées à l'origine de l'hyperplan.

Comme illustré en Figure 34.b, les valeurs les plus élevées de significativité sont données par les **cellules de corrélation cortico-hippocampique**, en particulier : $P_{1,7} = 0.088$, $P_{2,7} = 0.089$, $P_{3,7} = 0.097$, $P_{6,7} = 0.11$, $P_{2,8} = 0.080$, $P_{3,8} = 0.11$, $P_{6,8} = 0.093$. La valeur moyenne des poids des cellules de corrélation hippo-corticale est de **0,70** alors que la valeur moyenne du reste des cellules de \mathbf{P} est de **-0,0091**: cette différence est très significative ($p = 2 \times 10^{-6}$). Ce résultat conforte notre première intuition et notre première hypothèse de **choisir la corrélation hippo-corticale comme score composite et facteur discriminatoire pertinent** pour les différents états de scopolamine.

Nous avons ensuite utilisé cet algorithme pour prédire l'état des souris dans une nouvelle cohorte de souris (seconde étude). Pour cela, nous avons utilisé **8 souris différentes des 5 souris utilisées pour entraîner le modèle**: pour chaque souris, nous avons d'abord effectué 30min d'acquisition doppler initial, puis injecté de la scopolamine à la dose 3mg/kg et enfin réitéré une acquisition d'imagerie de 30min. Cinq de ces huit souris sont également présentées dans l'étude de dose-dépendance (groupe 4). À partir de toutes ces acquisitions, nous avons appliqué les mêmes filtres et traitements que pour les études précédentes.

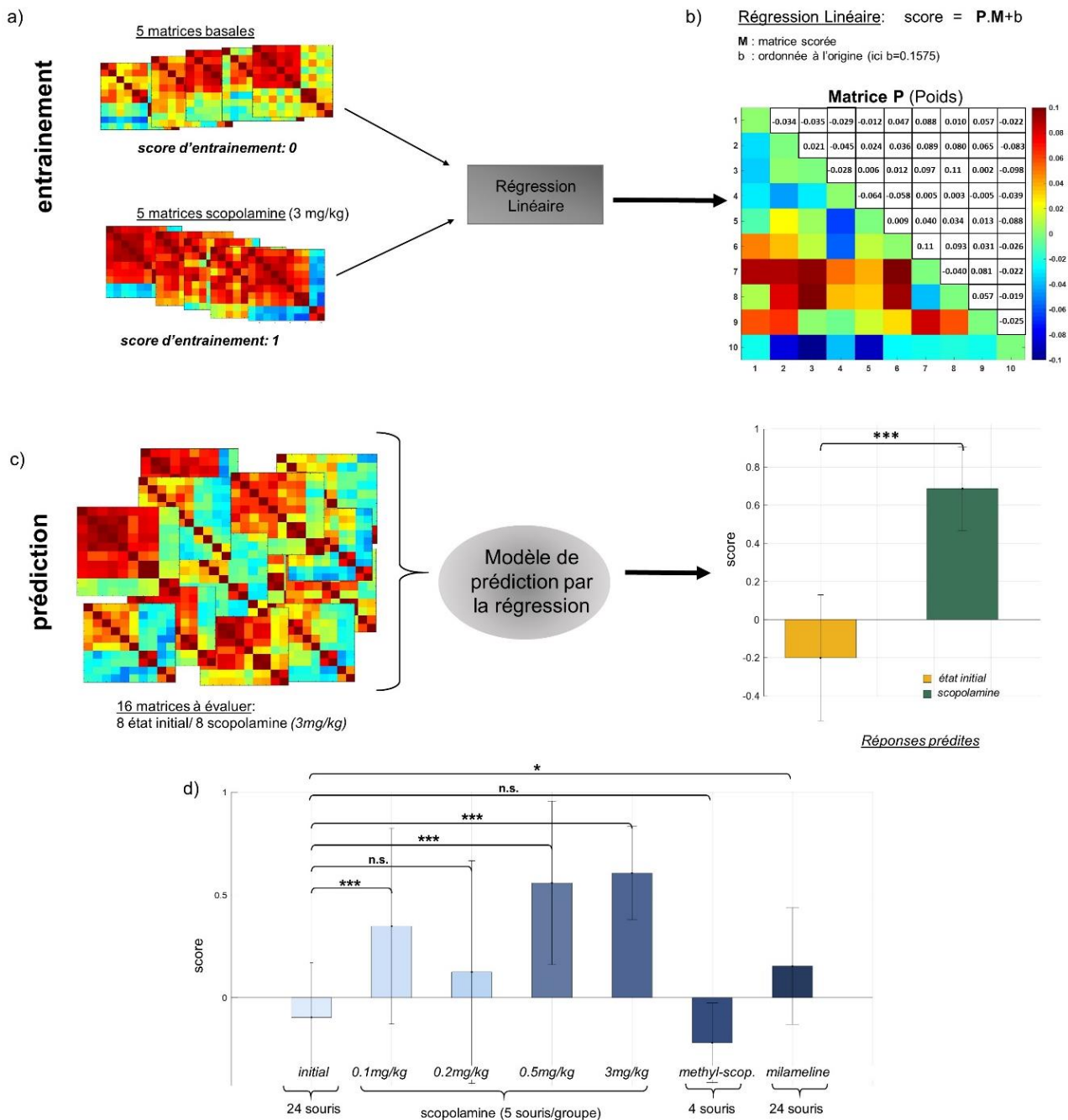


Figure 34. États pathologiques prédits automatiquement sur la base d'un modèle de régression linéaire de type Machine à Vecteurs de Support. a) 10 matrices (5 matrices basales et 5 matrices scopolamine) sont utilisées pour entraîner le modèle de régression linéaire. En sortie de ce modèle, une matrice de poids comme coefficient directeur de dimension 10x10 du modèle linéaire: les valeurs des cellules de cette matrice expriment leur importance dans l'attribution d'un score selon le modèle calculé. b) 16 matrices indépendantes des matrices d'entraînements sont ensuite testées par le modèle afin qu'un score soit attribué à chacune d'entre-elles. Le score des matrices est ensuite reporté sur l'histogramme. En jaune est représenté le score moyen attribué aux matrices des états initiaux. En vert, le score moyen des matrices sous-scopolamine. c) Résultat sous forme d'histogramme des scores évalués par le modèle de prédiction pour les matrices de connectivité de l'étude dose-dépendance.

Nous évaluons ensuite le score prédit par le modèle SVM pour chacune de ces matrices. Les résultats du modèle prédictif sont présentés dans le graphique de la Figure 34.c. On remarque que le modèle a pu différencier significativement les deux états pharmacologiques ($p=0,0007$) sur ces nouvelles données : le score moyen des matrices de référence est évalué à -0,2 et le score moyen des matrices de scopolamine est évalué à 0,69 (score maximal étant de 1). Cette première prévision met en évidence la capacité d'un modèle de régression linéaire à déterminer automatiquement l'état pharmacologique des souris **avec très peu de données d'entraînement**. Cela ouvre la voie à une automatisation du traitement des données compte tenu de quelques résultats connus.

Pour aller plus loin, nous avons évalué le score de toutes les matrices de l'étude de dose-dépendance (24 matrices à l'état initial, cinq matrices de dose=0,1mg/kg, cinq matrices de dose=0,2mg/kg, cinq matrices de dose=0,5mg/kg, cinq matrices de dose=0,5mg/kg, cinq matrices de méthyl-scopolamine et 24 matrices de milameline). En utilisant le même modèle de régression ainsi calculé en Figure 34.a, nous avons évalué chaque groupe de dose : les résultats sont rapportés dans la Figure 34.d.

Comme prévu, le score prédit pour le groupe des matrices de l'état initial est faible ($score_{init} = -0.09$). Toutes les matrices de la scopolamine sont évaluées avec un score supérieur à 0,13 : $score_{scopo0.1} = 0.35$, $score_{scopo0.2} = 0.13$, $score_{scopo0.5} = 0.56$, $score_{scopo3} = 0.61$. Ces scores sont tous significativement différents du groupe des états initiaux (*les valeurs p présentées ici sont calculées à l'aide d'un test T d'ordre 2, pour pouvoir comparer deux jeux de valeurs de tailles différentes*): $p(initial/scopo0.1) = 0.0059$; $p(initial/scopo0.5) = 3 \times 10^{-4}$; $p(initial/scopo03) = 7 \times 10^{-6}$; sauf pour le groupe dose = 0,2 mg/kg ($p(initial/scopo0.2) = 0.17$).

Cette non-significativité peut s'expliquer par l'écart-type élevé au sein du groupe 0.2mg/kg: $std_{scopo0.2} = 0.54$ alors que la déviation standard moyenne des autres groupes est de 0,31.

Le groupe méthyl-scopolamine n'est pas significativement différent du groupe de référence, ce qui conforte le statut du groupe methyl-scopolamine comme groupe contrôle. Le groupe milameline est en revanche significativement différent du groupe de référence ($p(initial/milameline) = 0.011$).

Cette deuxième évaluation confirme la **pertinence d'une régression linéaire pour distinguer les états pharmacologiques des états de référence**. En outre, cette étude montre que les données pharmacologiques acquises par imagerie fUS peuvent être classées et discriminées sans hypothèse initiale.

2.3.4. Discussion et conclusion de l'étude chez la souris éveillée

Cette étude démontre la capacité de l'imagerie fUS à mesurer la connectivité fonctionnelle de façon **reproductible et robuste** chez des souris libres éveillées, et libre de leur mouvement, sans le biais de l'anesthésie. Elle révèle également le potentiel du fUS-éveillé à détecter des altérations de connectivité dues à l'induction de l'antagoniste cholinergique: la scopolamine. Les acquisitions fUS ont également révélé une récupération de cette altération après l'injection de l'agoniste cholinergique milameline. Nous avons proposé une méthodologie complète pour permettre l'enregistrement **transcrânien de l'activité cérébrale chez les souris éveillées pendant plusieurs heures**. Nous explorons également différentes méthodologies pour différencier les états pharmacologiques : nous avons montré **qu'un classifieur entraîné avec peu de données était capable de distinguer les différents états de connectivité sans aucune hypothèse d'entrée**. Ces résultats sont confirmés par l'observation d'une différence significative entre les différents états pharmacologiques en observant les connexions entre l'hippocampe et le cortex. *L'objectif ici n'étant pas d'établir un diagnostic (trouver la pathologie qui se cache derrière une matrice de connectivité) mais permettre l'évaluation simple de l'efficacité d'une molécule sur un modèle animal pathologique.*

1 - Dans ce travail, nous avons donc développé un nouveau dispositif qui **rend possible l'enregistrement de façon quasi non-invasive de l'activité cérébrale des souris éveillées libres de leur mouvement**. Il a été démontré en 2014 que l'imagerie fUS pouvait mesurer la connectivité fonctionnelle chez les rats anesthésiés (Osmanski et al. 2014), cependant, à notre connaissance, les patrons de connectivité fonctionnelle n'ont jamais été mesuré chez les rongeurs éveillés libres de leur mouvement par ultrasons fonctionnels. Pour ce faire, nous avons construit un environnement expérimental dans lequel les souris peuvent se déplacer librement tout en enregistrant leur activité cérébrale. La simplicité de l'installation (boîte cylindrique en feuille de carbone faite maison sur un lit billes) **la rend facilement reproductible**. La mesure de l'activité vasculaire cérébrale est assurée par une sonde ultrasonore miniaturisée montée sur la tête de la

souris (voir Figure 28). Pour assurer la fixation de la sonde, un cadre métallique est placé sur le crâne de la souris, ce qui nécessite une intervention chirurgicale peu invasive. Après une période de repos et quelques jours d'entraînement, les souris sont habituées à rester jusqu'à 3h avec la sonde fixée sur leur tête dans la boîte flottante. Le lit de billes compense les déplacements afin que les animaux ne soient pas contraints.

2 - Nous avons réalisé deux études dans lesquelles nous avons continuellement enregistré l'activité cérébrale: ce qui nous a permis de suivre la dynamique cérébrale durant l'état basal, puis après l'induction d'antagonistes et d'agonistes cholinergiques. **Malgré le mouvement aléatoire des souris au cours de l'acquisition, la connectivité fonctionnelle était mesurable** : l'acquisition continue de 30min de chaque état pharmacologique nous a permis d'isoler des périodes de temps calmes (d'environ 1min30). Les signaux sélectionnés ont ensuite été filtré pour assurer une analyse correcte de la connectivité fonctionnelle.

Pour tous les états de référence (étude de suivi pharmacodynamique : T1 et T2, et étude de dose : acquisitions de référence pour les cinq groupes), nous avons pu retrouver les schémas de connectivité fonctionnelle décrit dans la littérature sur d'autres modèles animaux (Honey et al. 2009; Gopinath et al. 2016; Chuang and Nasrallah 2017). En effet, dans toutes les acquisitions basales, nous avons mesuré une forte corrélation intra-régionale associée à une faible corrélation inter-régionale. Ces résultats sont révélés à la fois par les matrices de connectivité et les cartes seed-based (Figure 30 et Figure 31).

3 - Nous avons ensuite injecté de la scopolamine par voie sous-cutanée et observé:
- Pour la première étude (étude de suivi pharmacodynamique) : l'évolution continue des effets de la scopolamine administrée à 3mg/kg sur la connectivité fonctionnelle
- Puis pour la seconde étude (étude dose-dépendance) : la relation dose-dépendance de la scopolamine sur la connectivité fonctionnelle, suivi des effets de l'agoniste mAChR: la milameline, 45min après le début de la séance d'imagerie sur la scopolamine.

L'étude de suivi pharmacodynamique établit que la scopolamine augmente considérablement la corrélation cortico-hippocampique dans le cerveau des souris 15 min après une injection sous-cutanée à 3mg/kg. (voir Figure 30, temps T3 à T7). La scopolamine induit donc une perte de la spécificité des connections intra-régionales dans le cerveau. Cet effet dure au moins 60 min et permet l'étude d'un effet inverse de la milameline pour l'étude de dose-dépendance, 45 min après la première injection de scopolamine (30min d'acquisition sous scopolamine + injection de milameline + 15min de latence pour laisser le médicament se répandre). Ces modulations n'apparaissent pas

dans les matrices statistiques par des t-tests avec correction de Bonferroni : cette correction est justement utilisée pour rendre « plus difficile » la significativité des tests statistiques. Afin d'obtenir des matrices de significativité robuste, nous devrions en théorie augmenter le nombre de souris à étudier. Cependant, grâce aux tendances observées sans correction de Bonferroni, nous avons pu cibler les régions impliquées dans les altérations de connectivité et les étudier statistiquement.

Dans **l'étude dose-dépendance de la scopolamine**, nous avons montré que l'augmentation de la corrélation cortico-hippocampique dépendait de la dose et est significative pour des doses de 0,5 mg/kg de scopolamine et plus. On peut remarquer une augmentation de la corrélation cortico-hippocampique pour les groupes 1 et 2 (0,1 mg/kg et 0,2 mg/kg) mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative. L'altération de connectivité est mesurable en calculant un score moyen de corrélation hippo-corticale, mais est également estimé grâce à un score attribué par régression linéaire.

La méthyl-scopolamine n'a elle, pas montré d'effet significatif sur la connectivité fonctionnelle. La méthyl-scopolamine ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, mais ses effets périphériques à court terme sont similaires aux altérations constatées sous scopolamine (Andrews et al. 1994). Cette mesure contrôle suggère donc que les altérations mesurées sous scopolamine ne sont *a priori* pas de sources vasculaires ou périphériques. En effet, bien que le système nerveux périphérique soit identiquement modifié sous scopolamine et sous méthylscopolamine; seule la scopolamine, qui pénètre la barrière hémato-encéphalique, altère la connectivité fonctionnelle.

Pour les cinq groupes, l'injection de milameline a réduit la corrélation cortico-hippocampique. En outre, il semble que la milaméline aide à récupérer la connectivité latérale initiale et la connectivité spécifique intra-régionale lorsque les connexions sont dégradées; mais qu'elle contribue à une diminution globale des connexions cérébrales lorsque l'état initial est sain (voir Figure 32).

4- Nous avons mis en place un classifieur capable d'automatiser la distinction entre état basal et état pathologique grâce à une régression linéaire entraînée sur un petit nombre de données. Ce classifieur démontre la robustesse des mesures pharmacologiques et démontre quelles sont les régions altérées pendant les études sous scopolamine. Nous avons ainsi pu confirmer sans biais statistique que la corrélation hippo-corticale était bien la structure la plus altérée durant l'étude pharmacologique. Ce classifieur permet ainsi d'effectuer des statistiques non biaisées entre différents groupes classés par leur score (Figure 34).

Pris ensemble, ces résultats prouvent que l'imagerie fUS permet **la mesure robuste au cours du temps de la connectivité fonctionnelle chez les souris éveillées**. Cette preuve de concept pourrait fournir de nouvelles informations sur le fonctionnement du cerveau et l'altération du connectome durant les études pharmacologiques.

2.4. Conclusion du chapitre 2 et ouverture vers le prochain chapitre

L'imagerie fUS permet des mesures minimalement invasives de la connectivité fonctionnelle chez la souris, modèle privilégié par la communauté neuroscientifique. Nous avons d'abord effectué des mesures de connectivité fonctionnelle chez la souris anesthésiée, mais nous n'avons pas été capables d'extraire des patrons de connectivité stables entre différents groupes d'étude, et au cours du temps pour le groupe contrôle. Nous avons donc ensuite mis en place une étude de mesure de connectivité fonctionnelle pharmacodynamique chez la souris éveillée et avons mesuré des altérations stables et significatives. Ces altérations répondent à un effet dose, et sont caractérisables sans *a priori* par un modèle de régression linéaire. Ce chapitre a donc mis en évidence la capacité prometteuse de l'imagerie fUS comme outil de mesure de connectivité cérébrale chez la souris: modèle principal de la recherche en neurosciences, dans des conditions peu restrictives (animal éveillé, bonne résolution spatio-temporelle, faible coût de la technique, plus grande portabilité que l'IRM-f,...). Nous avons enfin démontré que la capacité de l'imagerie fUS à réaliser une évaluation de la connectivité sans le biais de l'anesthésie est un avantage majeur dans le développement d'un outil performant de neuroimagerie pharmacologique.

Cependant, l'étude complète du connectome fonctionnel ne peut se limiter à des mesures dans un seul plan et il est primordial d'accéder à la troisième dimension spatiale pour l'étude intégrale du réseau cérébral. Cette extension de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore vers la troisième dimension est présentée au chapitre suivant.

2.5. Bibliographie du chapitre 2

- Aertsen AM, Gerstein GL, Habib MK, Palm G (1989) Dynamics of neuronal firing correlation: modulation of “effective connectivity”. *Journal of neurophysiology* 61:900–917. doi: 10.1152/jn.1989.61.5.900
- Ahmadlou M, Adeli H (2011) Functional community analysis of brain: A new approach for EEG-based investigation of the brain pathology. *NeuroImage* 58:401–408. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.04.070
- Andrews JS, Jansen JHM, Linders S, Princen A (1994) Effects of disrupting the cholinergic system on short-term spatial memory in rats. *Psychopharmacology* 115:485–494. doi: 10.1007/BF02245572
- Assaf M, Jagannathan K, Calhoun VD, et al (2010) Abnormal functional connectivity of default mode sub-networks in autism spectrum disorder patients. *NeuroImage* 53:247–256. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.05.067
- Bajo R, Pusil S, López ME, et al (2015) Scopolamine effects on functional brain connectivity: a pharmacological model of Alzheimer’s disease. *Scientific Reports* 5:. doi: 10.1038/srep09748
- Belliveau JW, Kennedy DN, McKinstry RC, et al (1991) Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. *Science* 254:716–719. doi: 10.1126/science.1948051
- Bergel A, Deffieux T, Demené C, et al (2018) Local hippocampal fast gamma rhythms precede brain-wide hyperemic patterns during spontaneous rodent REM sleep. *Nat Commun* 9:1–12. doi: 10.1038/s41467-018-07752-3
- Bimmerle G (1993) “Truth” Drugs in Interrogation. Central Intelligence Agency
- Biswal B, Yetkin FZ, Haughton VM, Hyde JS (1995) Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magn Reson Med* 34:537–541. doi: 10.1002/mrm.1910340409
- Brier MR, Thomas JB, Fagan AM, et al (2014) Functional connectivity and graph theory in preclinical Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging* 35:757–768. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.081
- Bullmore E, Sporns O (2009) Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nature Reviews Neuroscience* 10:186–198. doi: 10.1038/nrn2575
- Cabral J, Kringelbach ML, Deco G (2017) Functional connectivity dynamically evolves on multiple time-scales over a static structural connectome: Models and mechanisms. *NeuroImage* 160:84–96. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.03.045
- Cader S, Cifelli A, Abu-Omar Y, et al (2006) Reduced brain functional reserve and altered functional connectivity in patients with multiple sclerosis. *Brain* 129:527–537. doi: 10.1093/brain/awh670
- Chuang K-H, Nasrallah FA (2017) Functional networks and network perturbations in rodents. *NeuroImage* 163:419–436. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.09.038

- Cormack J, Orme R, Costello T (2005) The role of α -agonists in neurosurgery. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 12:375–8. doi: 10.1016/j.jocn.2004.06.008
- Demene C, Deffieux T, Pernot M, et al (2015) Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 34:2271–2285. doi: 10.1109/TMI.2015.2428634
- Domínguez I (2016) Burundanga: the stealth drug that cancels the victim’s willpower. *El País*
- Drummond JC, Dao AV, Roth DM, et al (2008) Effect of Dexmedetomidine on Cerebral Blood Flow Velocity, Cerebral Metabolic Rate, and Carbon Dioxide Response in Normal Humans. *Anesthesiology* 108:225–232. doi: 10.1097/01.anes.0000299576.00302.4c
- Flicker C, Serby M, Ferris SH (1990) Scopolamine effects on memory, language, visuospatial praxis and psychomotor speed. *Psychopharmacology* 100:243–250. doi: 10.1007/BF02244414
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer’s disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:137–147. doi: 10.1136/jnnp.66.2.137
- Friston KJ, Frith CD, Liddle PF, Frackowiak RSJ (1993) Functional Connectivity: The Principal-Component Analysis of Large (PET) Data Sets. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:5–14. doi: 10.1038/jcbfm.1993.4
- Fukuda M, Vazquez A, Zong X, Kim S-G (2012) Effects of the α 2-adrenergic receptor agonist dexmedetomidine on neural, vascular and BOLD fMRI responses in the somatosensory cortex. *The European journal of neuroscience* 37:. doi: 10.1111/ejn.12024
- Gopinath K, Maltbie E, Urushino N, et al (2016) Ketamine-induced changes in connectivity of functional brain networks in awake female nonhuman primates: a translational functional imaging model. *Psychopharmacology* 233:3673–3684. doi: 10.1007/s00213-016-4401-z
- Grandjean J, Schroeter A, Batata I, Rudin M (2014) Optimization of anesthesia protocol for resting-state fMRI in mice based on differential effects of anesthetics on functional connectivity patterns. *NeuroImage* 102:838–847. doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.08.043
- Greicius M (2008) Resting-state functional connectivity in neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Neurology* 21:424. doi: 10.1097/WCO.0b013e328306f2c5
- Greicius MD, Flores BH, Menon V, et al (2007) Resting-State Functional Connectivity in Major Depression: Abnormally Increased Contributions from Subgenual Cingulate Cortex and Thalamus. *Biological Psychiatry* 62:429–437. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.09.020
- Greicius MD, Krasnow B, Reiss AL, Menon V (2003) Functional connectivity in the resting brain: A network analysis of the default mode hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:253–258. doi: 10.1073/pnas.0135058100
- Gyulai FE (2004) Anesthetics and cerebral metabolism: *Current Opinion in Anaesthesiology* 17:397–402. doi: 10.1097/00001503-200410000-00008

- Habibyar AF, Sharma N, Khurana N (2016) PASS assisted prediction and pharmacological evaluation of hesperidin against scopolamine induced amnesia in mice. *European Journal of Pharmacology* 789:385–394. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.07.013
- Hagmann P, Cammoun L, Gigandet X, et al (2008) Mapping the Structural Core of Human Cerebral Cortex. *PLOS Biology* 6:e159. doi: 10.1371/journal.pbio.0060159
- Haider S, Tabassum S, Perveen T (2016) Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of dementia: A comparative study. *Brain Research Bulletin* 127:234–247. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.10.002
- Herremans AH, Hijzen TH, Olivier B, Slangen JL (1995) Cholinergic drug effects on a delayed conditional discrimination task in the rat. *Behav Neurosci* 109:426–435. doi: 10.1037//0735-7044.109.3.426
- Honey CJ, Sporns O, Cammoun L, et al (2009) Predicting human resting-state functional connectivity from structural connectivity. *PNAS* 106:2035–2040. doi: 10.1073/pnas.0811168106
- House RE (1931) The Use of Scopolamine in Criminology. *Amer J of Police Science*, Vol. 2, No. 4
- Jonckers E, Palacios RD y, Shah D, et al (2014) Different anesthesia regimes modulate the functional connectivity outcome in mice. *Magnetic Resonance in Medicine* 72:1103–1112. doi: 10.1002/mrm.24990
- Kasai C, Namekawa K, Koyano A, Omoto R (1985) Real-Time Two-Dimensional Blood Flow Imaging Using an Autocorrelation Technique. 7
- Konrad A, Winterer G (2008) Disturbed Structural Connectivity in Schizophrenia—Primary Factor in Pathology or Epiphenomenon? *Schizophrenia bulletin* 34:72–92. doi: 10.1093/schbul/sbm034
- Liang Z, King J, Zhang N (2012) Anticorrelated resting-state functional connectivity in awake rat brain. *Neuroimage* 59:1190–1199. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.08.009
- Lu H, Zou Q, Gu H, et al (2012) Rat brains also have a default mode network. *PNAS* 109:3979–3984. doi: 10.1073/pnas.1200506109
- Magnuson ME, Thompson GJ, Pan W-J, Keilholz SD (2014) Time-dependent effects of isoflurane and dexmedetomidine on functional connectivity, spectral characteristics, and spatial distribution of spontaneous BOLD fluctuations. *NMR Biomed* 27:291–303. doi: 10.1002/nbm.3062
- Nallasamy N, Tsao DY (2011) Functional Connectivity in the Brain: Effects of Anesthesia. *Neuroscientist* 17:94–106. doi: 10.1177/1073858410374126
- Novais ARB, Pham H, Looij YV de, et al (2016) Transcriptomic regulations in oligodendroglial and microglial cells related to brain damage following fetal growth restriction. *Glia* 64:2306–2320. doi: 10.1002/glia.23079
- Osmanski B-F, Pezet S, Ricobaraza A, et al (2014) Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nature Communications* 5:. doi: 10.1038/ncomms6023

- Pakarinen ED, Moerschbaecher JM (1993) Comparison of the effects of scopolamine and methylscopolamine on the performance of a fixed-ratio discrimination in squirrel monkeys. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 44:815–819. doi: 10.1016/0091-3057(93)90011-H
- Paxinos G (2015) Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact. Accessed 15 Sep 2019
- Perry E, Walker M, Grace J, Perry R (1999) Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci* 22:273–280
- Ridley RM, Bowes PM, Baker HF, Crow TJ (1984) An involvement of acetylcholine in object discrimination learning and memory in the marmoset. *Neuropsychologia* 22:253–263. doi: 10.1016/0028-3932(84)90073-3
- Sellers KK, Bennett DV, Hutt A, et al (2015) Awake vs. anesthetized: layer-specific sensory processing in visual cortex and functional connectivity between cortical areas. *J Neurophysiol* 113:3798–3815. doi: 10.1152/jn.00923.2014
- Shah D, Blockx I, Guns P-J, et al (2015) Acute modulation of the cholinergic system in the mouse brain detected by pharmacological resting-state functional MRI. *NeuroImage* 109:151–159. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.01.009
- Sieu L-A, Bergel A, Tiran E, et al (2015) EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats. *Nature Methods* 12:831–834. doi: 10.1038/nmeth.3506
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7:280–292. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.003
- Sporns O, Tononi G, Kötter R (2005) The Human Connectome: A Structural Description of the Human Brain. *PLOS Computational Biology* 1:e42. doi: 10.1371/journal.pcbi.0010042
- Stepanichev M, Dygalo NN, Grigoryan G, et al (2014) Rodent Models of Depression: Neurotrophic and Neuroinflammatory Biomarkers. *Biomed Res Int* 2014:. doi: 10.1155/2014/932757
- Thanos PK, Robison L, Nestler EJ, et al (2013) Mapping Brain Metabolic Connectivity in Awake Rats with μ PET and Optogenetic Stimulation. *J Neurosci* 33:6343–6349. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4997-12.2013
- Tiran E Imagerie cérébrale et étude de la connectivité fonctionnelle par échographie Doppler ultrarapide chez le petit animal éveillé et en mouvement. 158
- Tiran E, Ferrier J, Deffieux T, et al (2017) Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. *Ultrasound in Medicine & Biology* 43:1679–1689. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.011
- Vincent J, Patel G, Fox M, et al (2007) Intrinsic functional architecture in the anesthetized monkey brain. *Nature* 447:83–6. doi: 10.1038/nature05758

- Wang L, Zang Y, He Y, et al (2006) Changes in hippocampal connectivity in the early stages of Alzheimer's disease: Evidence from resting state fMRI. *NeuroImage* 31:496–504. doi: 10.1016/j.neuroimage.2005.12.033
- White NS, Alkire MT (2003) Impaired thalamocortical connectivity in humans during general-anesthetic-induced unconsciousness. *NeuroImage* 19:402–411. doi: 10.1016/S1053-8119(03)00103-4
- Wright PW, Brier LM, Bauer AQ, et al (2017) Functional connectivity structure of cortical calcium dynamics in anesthetized and awake mice. *PLOS ONE* 12:e0185759. doi: 10.1371/journal.pone.0185759
- Xu H, You Z, Wu Z, et al (2016) WY14643 Attenuates the Scopolamine-Induced Memory Impairments in Mice. *Neurochem Res* 41:2868–2879. doi: 10.1007/s11064-016-2002-1

**Chapitre 3. Imagerie fonctionnelle
ultrasonore 4D par multi-ondes planes**

3.1. Motivations du passage de l'imagerie fUS bidimensionnel au fUS 4D

3.1.1. Connectivité fonctionnelle volumique

Comprendre le fonctionnement du cerveau implique de l'explorer dans sa totalité: des plus petits détails au champ de vue le plus large. Le défi du petit est notamment relevé grâce l'imagerie calcique par microscopie à deux-photons, ou encore par l'imagerie optique intrinsèque. Cependant, ces techniques restent limitées à une profondeur millimétrique. Nous avons vu que l'imagerie fonctionnelle ultrasonore permet d'imager en champ large la vasculature cérébrale et de suivre au cours du temps l'activité neuronale via le couplage neurovasculaire de modèles variés: des petits animaux aux modèles cliniques. La résolution spatio-temporelle de l'imagerie fUS ($\approx 400\text{ ms}, 100\ \mu\text{m}$) permet l'exploration fine des signaux Doppler, témoins de l'activité cérébrale, dans tout le plan cérébral d'imagerie.

Cependant, c'est principalement l'IRM-f qui se place comme le *Gold Standard* pour l'imagerie fonctionnelle non invasive en champ large, chez l'Homme, le primate et le rongeur (résolution spatio-temporelle $\approx 1\text{ s}, 400\ \mu\text{m}$). Une des forces de l'IRM-f est notamment sa capacité à mesurer le signal BOLD dans tout le volume cérébral par scan rapide. Cette extension vers la troisième dimension permet en particulier d'étudier la connectivité fonctionnelle dans tout le cerveau, sans être restreint à l'étude bidimensionnelle. De nombreuses études en IRM-f mettent ainsi en évidence les réseaux de connectivité volumique en trois dimensions (voir Figure 35).

La sensibilité et les performances spatio-temporelles de l'imagerie fUS au service de l'imagerie cérébrale volumique permettraient aux ultrasons fonctionnels d'être un outil d'exploration de la connectivité fonctionnelle compétitif. Jusque-là, les mesures hémodynamiques dans le cerveau par acquisition fUS étaient en effet effectuées dans un plan uniquement, ou par scans linéaires pour l'obtention de volumes vasculaires. Cependant, nous verrons dans la partie qui suit que les méthodes d'acquisitions volumiques existantes (par scan linéaire ou tomographie) en imagerie fonctionnelle ultrasonore ne permettent pas de suivre des événements rapides et spatialement étendus dans les trois dimensions du cerveau. Nous présentons dans ce chapitre l'extension de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore bidimensionnelle à l'imagerie fUS 4D: qui permet l'acquisition de films de l'activité fonctionnelle en trois dimensions.

Nous exposerons d'abord les méthodes d'imagerie volumiques existantes en imagerie ultrasonore, qui nécessitent la répétition d'acquisitions bidimensionnelles. Nous présenterons ensuite le dispositif échographique utilisé dans ce projet, qui a permis l'extension de l'imagerie fUS bidimensionnelle à l'acquisition volumique quasi-instantanée. Les séquences et traitements de données adaptés à l'imagerie volumique seront développés. Enfin, les premières applications de cette technique effectuées chez le rat anesthésié seront présentées: activation fonctionnelle par stimulations extérieures, suivi d'un événement cortical transitoire de type épileptique, et mesure de la connectivité fonctionnelle.

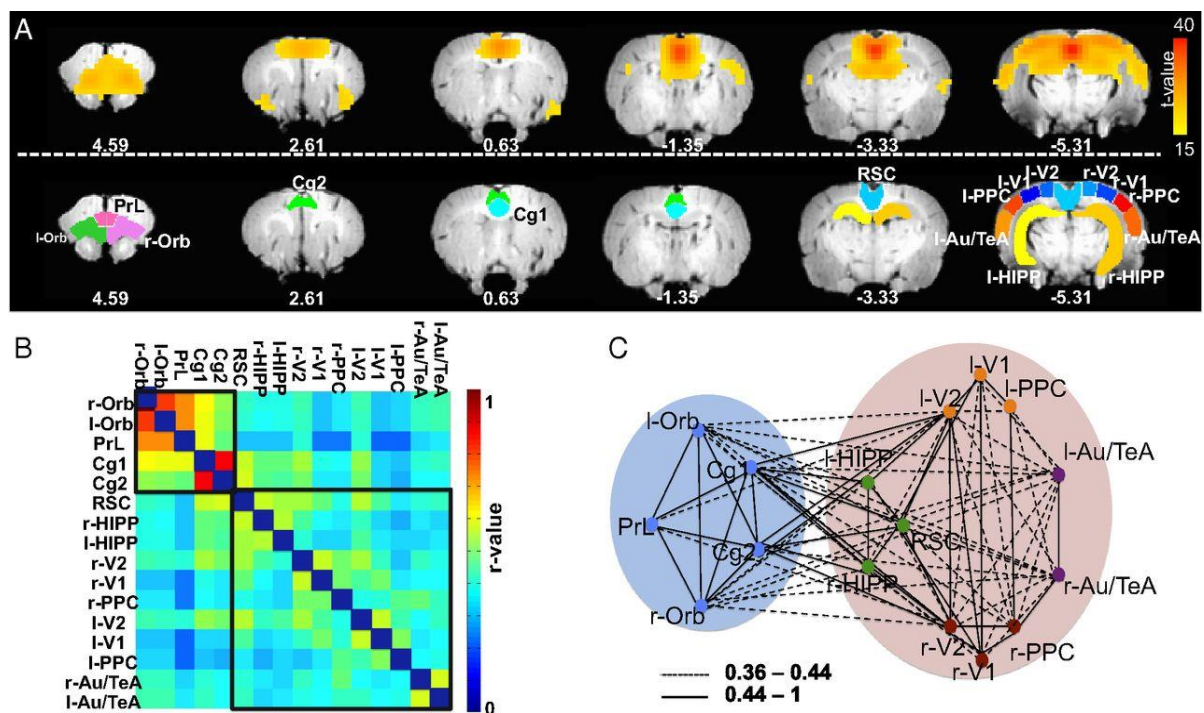


Figure 35. Réseaux de connectivité observés chez le rat anesthésié en IRM-f 3D. Le cerveau est scanné linéaire afin d'enregistrer le signal BOLD dans tout le volume. Chaque coupe est acquise en 60 ms, à raison de 30 coupes par volume soit un volume toutes les 2s. La connectivité fonctionnelle mesurée en IRM-f étant basée sur des oscillations très basses fréquences du signal BOLD, il est ainsi possible: (A) d'extraire les modes de connectivité DMN (Default Modes Network) dans tout le volume, puis: (B) de tracer la matrice de connectivité des régions principalement impliquées dans les DMN. © Un réseau de connectivité cérébrale en 3D est ainsi révélé (figure extraite de (Hsu et al. 2016))

3.1.2. Le 3D en ultrasons fonctionnels

3.1.2.1. Tomographie

En 2015, (Demené et al. 2016) ont publié les premières images haute résolution isotrope de volumes doppler cérébraux acquis en ultrasons. La technique développée permet de scanner le cerveau par acquisition Doppler selon une dizaine d'orientations afin de recouvrir le champ de vue volumique (voir Figure 36.a.i et ii.). Cette approche a permis de passer d'une taille de voxel anisotrope de $100*100*500 \mu\text{m}$ (due à la largeur des tranches d'imagerie lors d'un simple scan selon un seul axe) à une taille de voxel isotrope de $100*100*100 \mu\text{m}$. Les volumes doppler obtenus en une vingtaine de minutes sont des réelles cartes vasculaires 3D du cerveau entier de rat et permettent la compréhension structurelle de tout le réseau vasculaire cérébral (Figure 36.a.iii. et vi.). La tomographie permet d'obtenir avec une grande sensibilité des volumes doppler mais ne permet pas d'étudier les phénomènes dynamiques cérébraux à la résolution temporelle utile pour les mécanismes neuronaux.

3.1.2.2. Première preuve de concept de cartographie de régions fonctionnelles en 3D par ultrasons

En 2017, Marc Gesnik, qui a soutenu sa thèse dans notre laboratoire fin 2017, a lui cartographié par ultrasons en 3D les régions fonctionnelles associées à la vision (Gesnik et al. 2017). En imageant plan par plan le cerveau d'un rat trépané et en répétant durant toute la durée du scan un stimulus visuel (Figure 36.b.i), il a obtenu la délimitation des zones fonctionnelles visuelles dans tout le volume du cerveau (cortex visuel, colliculus, et les deux nucléus latéraux : voir Figure 36.b.ii. et iii.). Le scan n'étant fait que selon l'axe antérieur-postérieur, les voxels sont anisotropes de taille $100*100*500\mu\text{m}$. Afin de détecter avec une bonne sensibilité les zones activées, chaque plan coronal était imagé pendant 330s pendant lesquels le stimulus visuel était répété 10 fois (par intermittence de 30s). Vingt-deux plans ont été nécessaires pour reconstruire le volume : l'acquisition du volume fonctionnel total prend donc plus d'une heure.

La représentation en volume des zones activées démontre la capacité de l'imagerie fUS à cartographier des zones fonctionnelles dans tout le volume cérébral.

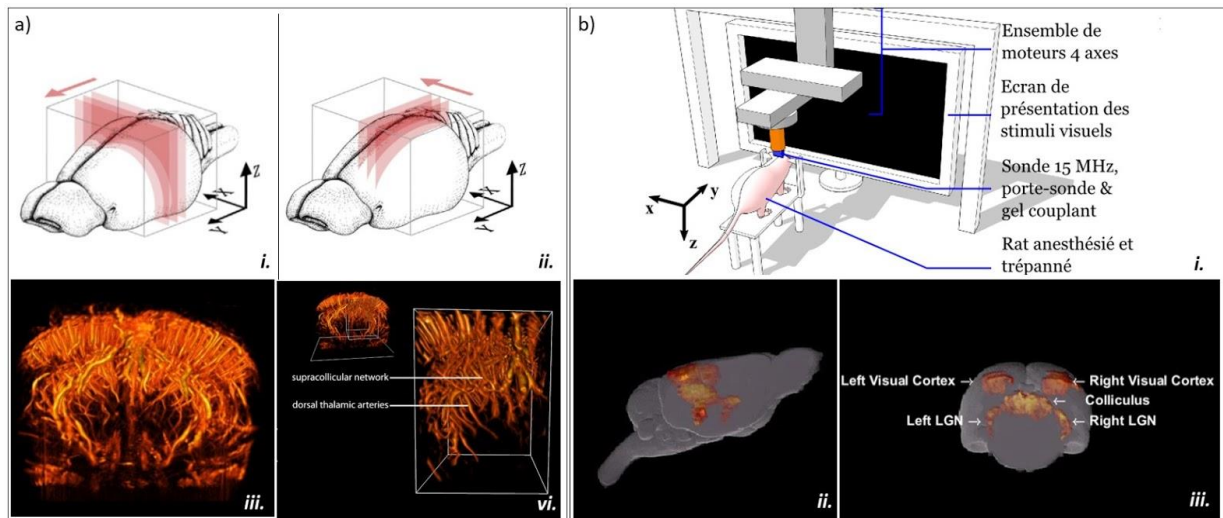


Figure 36. a) D'après (Demené et al. 2016): cartes volumiques isotropes du système vasculaire cérébral acquises en ultrasons Doppler par tomographie i-ii) Tomographie Doppler d'un cerveau de rat. iii-vi) La technique développée permet d'obtenir des cartes volumiques isotropes du système vasculaire cérébral b) D'après (Gesnik et al. 2017) Cartographie volumique du système visuel chez le rat anesthésié. i) Les stimuli visuels sont répétés durant toute la durée du scan cérébral (>1h). ii-iii) Les régions fonctionnelles du système visuel sont cartographiées dans tout le cerveau

Par la suite, d'autres études de scans 3D fUS ont permis de visualiser des régions d'activations suite à l'application d'une stimulation sur d'autres modèles animaux comme les zones du système visuel du pigeon (Rau et al. 2017) ou de la souris éveillée en tête fixée (Macé et al. 2018).

Cependant, ces applications de cartographie fonctionnelle ultrasonore ne permettent pas de suivre la cinétique d'une activité cérébrale volumique unique. On pourrait penser qu'une solution serait d'accélérer autant que possible la vitesse des scans linéaires. Cependant, cette vitesse est intrinsèquement limitée par le temps nécessaire à l'acquisition (~400 ms en fUS pour mesurer les variations de CBV avec une sensibilité suffisante), et est également mécaniquement limitée par le déplacement des moteurs et leur temps de stabilisation mécanique avant une nouvelle acquisition de plan. De plus, même si des méthodes de balayage très rapides sont atteintes, cette approche ne permettrait pas de mesurer un événement ponctuel, spatialement étendu dans tout le volume. Il apparaît donc qu'afin de mesurer toute l'activité cérébrale volumique, la stratégie de l'acquisition plan-par-plan doit évoluer vers une acquisition volumique globale.

C'est pour répondre à cette problématique que nous avons approché l'imagerie fonctionnelle 3D avec **une sonde ultrasonore matricielle**, pilotée par un système d'acquisition fabriqué au laboratoire et permettant l'acquisition volumique par ultrasons.

3.2. Protocole expérimental

3.2.1. Pilotage de la sonde matricielle

3.2.1.1. Une sonde matricielle pour imager tout le volume

Nous avons vu que pour comprendre la dynamique cérébrale volumique, il est nécessaire d'utiliser une sonde qui soit capable d'insonifier le volume à chaque tir, et de collecter les échos réfléchis par tout le volume. En 2014, (Provost et al. 2014) ont utilisé pour la première fois une sonde ultrasonore matricielle pour des acquisitions ultrasonores ultrarapides *in vivo* en trois dimensions. Cette sonde était composée de **32x32 transducteurs piézo-électriques** (voir Figure 37) : 1024 éléments, pitch 0.3mm, fréquence centrale 3MHz, fabriquée par la société française Vermon à Tours. La capacité de cette sonde à reproduire en 3D des acquisitions ultrasonores a été validée par Provost et al. 2014 par le suivi doppler de la cavité au cours du cycle cardiaque.

Cette première preuve de concept a ouvert la voie au « vrai » 3D ultrarapide: le 3D acquis en une seule séquence de tir, grâce à l'utilisation d'une sonde matricielle envoyant des ultrasons dans tout le volume et qui récupère les signaux réfléchis avec tous ses éléments.

Toutes les expériences présentées ensuite dans ce chapitre ont été effectuées avec une sonde ultrasonore matricielle pratiquement identique à celle de l'étude de (Provost et al. 2014), de 32x32 transducteurs piézo-électrique de pitch isotrope de 0.3mm, de fréquence centrale 8 MHz, également fabriquée par la société Vermon. Afin de diminuer la résolution spatiale et parce que la bande passante d'émission de la sonde est suffisamment large, nous avons effectué toutes les expériences à 9 MHz.

3.2.1.2. Quatre échographes ultrarapides pour un scanner ultrasonore 3D

Afin de piloter une telle matrice en mode ultrarapide, l'ensemble de ses 1024 transducteurs sont reliés à des canaux électroniques indépendants. Les cartes échographiques ultrarapides conventionnelles ne possèdent au maximum que 256 canaux (256 émissions et 128 en réception, multiplexé à 256): ce sont donc quatre échographes ultrarapides (Aixplorer, Supersonic Imaging®, France) (voir Figure 37.a) assemblés ensemble et surtout synchronisés les uns aux autres qui pilotent la sonde matricielle. Un système d'horloge entre chaque scanner est présent dans le dispositif afin que les échographes se synchronisent dans le temps à chaque tir de la sonde matricielle. Les **quatre machines** pilotant les éléments d'**une seule sonde matricielle**, il est en effet primordial que les échographes soient parfaitement synchronisés. Ce dispositif a été validé par l'imagerie en 3D de plusieurs organes *in vivo*: élastographie du sein (Imbault 2017), visualisation d'une thyroïde chez l'Homme (Provost et al. 2015) , quantification du débit volumétrique d'artères de carotides humaines (Correia et al. 2016) ou encore imagerie de la dynamique de l'orientation des fibres cardiaques chez le cochon (Papadacci et al. 2017).

3.2.1.1. Des séquences spécifiques pour piloter les quatre machines

Des séquences spécifiques ont été mises en place pour piloter l'unique sonde matricielle. L'opérateur crée les séquences ultrasonores sur l'Ordinateur Maître (Figure 37.b) qui distribue ensuite les informations aux quatre ordinateurs secondaires reliés aux quatre échographes de 256 voies. Chaque unité contrôle donc un quart des 1024 éléments de la sonde et comporte 256 canaux d'émission et 128 canaux en réception. Les 1024 canaux indépendants peuvent être utilisés simultanément dans la transmission alors que les canaux de réception sont **multiplexés** à un des deux éléments transducteurs. Par conséquent, **chaque émission est répétée deux fois**, la première moitié des éléments recevant pendant la première émission, et la seconde moitié des éléments recevant pendant la deuxième émission: les données provenant des deux réceptions sont ensuite combinées en post-traitement. Tous les codes sont en langages Matlab et CUDA. Les échos retours reçus par la sonde sont enregistrés par chacun des ordinateurs pilotant un quart de sonde et le tout est renvoyé dans l'ordinateur Maître pour le stockage des données.

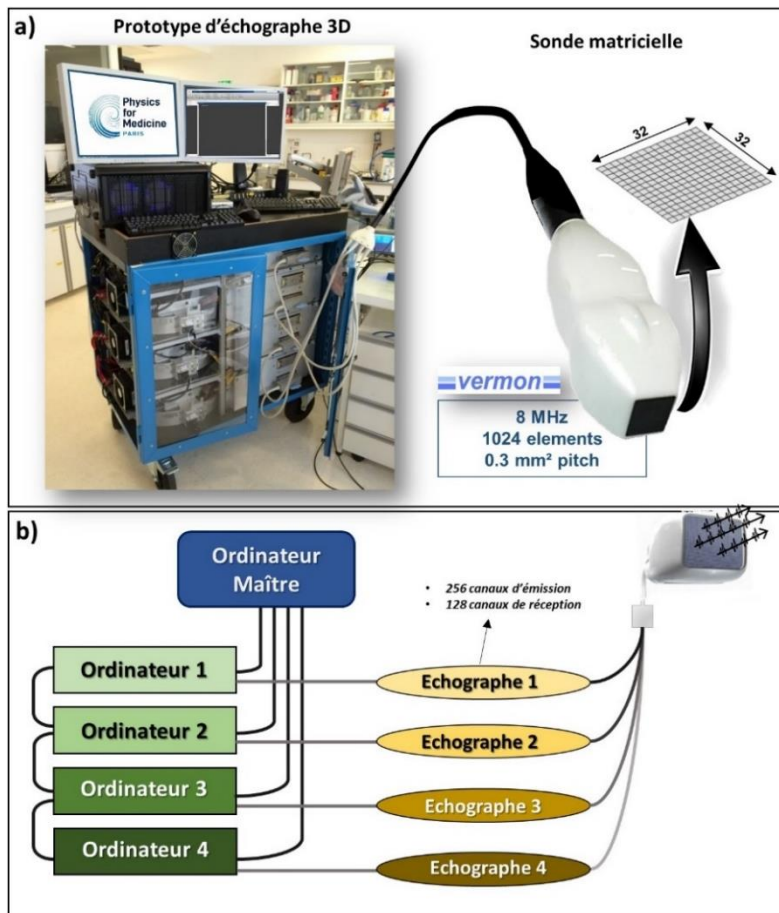


Figure 37. Système d'échographie 3D ultra-rapide. a) Prototype d'échographe avec 1024 canaux d'émission/réception. Ce prototype peut piloter une sonde matricielle de 1024 éléments (32x32 éléments, pitch=0.3 mm², centrée à 8 MHz) b) Schéma modélisant les communications entre le prototype échographique 3D constitué de quatre échographes conventionnels piloter par quatre ordinateurs indépendants. Un ordinateur "Maître" envoie les séquences aux quatre ordinateurs et chaque échographe pilote 256 éléments de la matrice.

Afin de générer des ondes planes pour l'imagerie fonctionnelle 3D, on modélise l'émission de sources ultrasonores placées infiniment loin derrière le réseau matriciel de la sonde. Tout comme en imagerie fonctionnelle 2D, nous cherchons à émettre des ondes planes inclinées pour le *coherent compounding*.

En pratique, on modélise **un réseau virtuel à 60m** (distance quasi infinie à l'échelle de la longueur d'onde ultrasonore et considérée comme suffisamment loin de la sonde pour que les ondes émises au niveau du réseau soient quasi-planes) derrière la sonde: on place sur ce réseau des **sources ultrasonores virtuelles** et on calcule le trajet de chaque onde émise jusqu'au réseau de la sonde (voir Figure 38). Arrivées à hauteur de la sonde, les ondes sphériques par un point source si lointain sont quasi-planes, ce qui nous ramène à notre configuration classique d'imagerie ultrarapide par ondes planes. Différentes positions de sources virtuelles entraînent différentes inclinaisons des ondes planes.

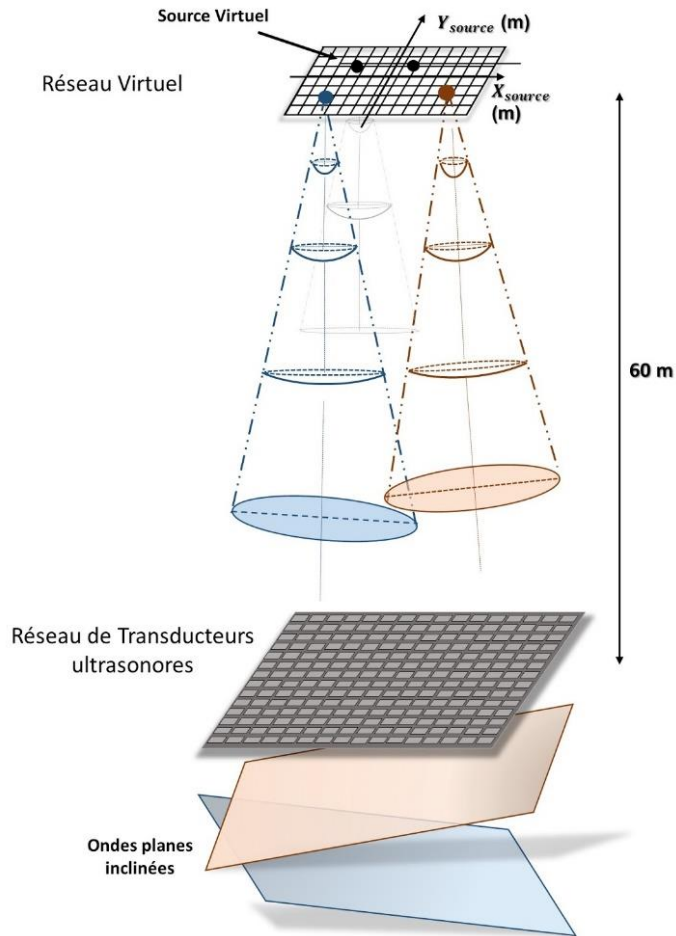


Figure 38. Calcul des délais pour l'émission d'ondes planes par le réseau matricielle ultrasonore. On modélise l'émission de sources virtuelles situées à $z=60\text{m}$ derrière le réseau de transducteurs. Arrivées au niveau du réseau de transducteurs, les ondes émises initialement sphériques sont quasi-planes: on peut ainsi appliquer les délais calculés depuis le réseau virtuel pour émettre des ondes planes depuis le réseau de transducteurs.

3.2.2. Vers l'imagerie par multi-ondes planes en 3D

3.2.2.1. Imagerie par onde plane simple et coherent compounding en 3D

Séquence ultrasonore

Sur le même modèle que les séquences fonctionnelles en deux dimensions, une séquence de *coherent compounding* en 3D a été mise en place. Idéalement, une séquence totalement identique à ce qui existe en 2D aurait été utilisée. C'est-à-dire: envoyer 12 ondes planes inclinées, récupérer successivement les échos retours après chaque insonification, puis en

faire la somme cohérente et le *beamforming* immédiatement afin de ne pas conserver les données brutes. Puis répéter en continue cette séquence pendant laquelle seules les données *beamformées* sont conservées.

Cependant, les données brutes acquises en 3D sont bien plus importantes que ce qui est acquis dans un seul plan. A titre de comparaison, un set de données brutes reçues pendant 400 ms (temps d'intégration temporelle pour une image de Doppler puissance) d'une image Doppler 2D (12 ondes planes, sonde linéaire de 128 voies, 15 MHz) jusqu'à une profondeur de 1 cm pèse environ 15 Go. Les scanners ultrasonores d'imagerie fonctionnelle parviennent à les *beamformer* en temps réel aujourd'hui. Tandis qu'un set de données brutes reçues pendant 400 ms après illumination par 8 ondes planes d'un volume cérébral par une sonde matricielle de 9 Mhz de 1024 voies jusqu'à une profondeur de 1 cm utilise environ 650 Go de mémoire. Il en découle que *beamformer* un seul volume *compoundé* de 400ms prend environ 3 min avec des calculs optimisés sur processeur graphique (Graphics Processing Unit (GPU) en anglais). Il est donc impossible de penser à *beamformer* en temps réel les données pour une séquence d'imagerie fonctionnelle cérébrale en 3D.

La seule solution pour répéter rapidement les tirs ultrasonores est donc de stocker toutes les données puis de les *beamformer* en post-traitement en fin d'expérience. Cependant, la vitesse de transfert des données des échographes vers leurs ordinateurs associés étant limitée à 16 Gb/s, il est -avec les vitesses de transfert actuelles- impossible de répéter les tirs et d'enregistrer en continue les échos provenant du milieu insonifié. De plus, les échographes utilisés n'étant pas prévu pour l'enregistrement de telles acquisitions, ils ne peuvent stocker dans leur mémoire interne que très peu de données: conserver toutes les données d'une acquisition fonctionnelle sur les échographes est donc impossible, elle doivent être transférées sur leurs ordinateurs associés. Un réel compromis est donc à trouver **entre vitesse de répétition** de la séquence ultrasonore et **vitesse de transfert** des données brutes.

La séquence présentée ici permet de satisfaire une cadence suffisante pour faire de l'imagerie vasculaire cérébrale chez le rat, et permet également d'enregistrer avant chaque répétition les données des échos rétrodiffusés par le volume de l'insonification précédente:

Séquence ondes planes - *coherent compounding* 3D

[Tirs à **390 Hz** de sets de 8 ondes inclinées pour le *coherent compounding* (136 répétition de sets de 8 ondes = 350 ms soit environ deux cycles cardiaques chez le rat)

PRF : 3120 Hz (fréquence de répétition entre chaque onde inclinée)

Fréquence d'émission: 9 Mhz

Profondeur de tir: 10 mm

Coordonnées (en m) dans le réseau virtuel des 8 sources virtuelles émettant les ondes planes inclinées: S1(-2 ; 0) , S2(2 ; -2) , S3(0 ; 0) , S4(0 ; -2) , S5(-2 ; 2) , S6(0 ; 2) , S7(2 ; 0) , S8(-2 ; -2) (voir Figure 38)]

→ **Durée**: [350 ms]

[Pause de 1,15 s pour permettre le transfert des données brutes des échographes vers les ordinateurs]

Durée: [1,15 s]

⇒ **Répétition de cette séquence 1,5 s après le début de la séquence précédente**

D'après le principe de Nyquist, afin de décrire de façon non ambiguë le signal à enregistrer, la fréquence d'échantillonnage doit être au minimum égale à deux fois la fréquence du signal reçu. Ici, comme nous faisons l'hypothèse d'une propagation en régime linéaire dans le milieu, nous devons donc échantillonner au minimum à 2×9 MHz, c'est-à-dire 18 MHz. Un choix d'une fréquence d'échantillonnage plus élevée permet une meilleure résolution temporelle, mais implique aussi augmentation de la taille des données stockées. Étant déjà très limité par la taille des données reçues, nous avons conservé le choix d'un échantillonnage à 100%: c'est-à-dire deux fois la fréquence du signal reçu.

Traitement des données

Comme expliqué juste au-dessus, nous traitons les données après leur acquisition, et non pas en continu durant les séances d'imagerie. En pratique: toute l'expérience est conduite, puis en fin de journée les calculs sont lancés. Le traitement consiste à *beamformer* les

données brutes puis à effectuer le traitement Doppler sur les IQs *beamformés* afin d'obtenir les cartes de Doppler puissance.

Beamforming

Mise à part la taille des données, le *beamformer* en 3D n'est pas conceptuellement différent du *beamformer* en 2D. Pour chaque voxel du volume, on somme la contribution de chaque onde plane inclinée en ayant calculé le temps de trajet aller-retour entre les éléments de la sonde et le voxel.

La taille des voxels reconstruits dépend de l'échantillonnage spatial choisi. Ici, nous choisissons d'échantillonner deux voxels par transducteurs en latéral et de reconstruire à $\lambda/2$ en profondeur (Figure 39). Un choix de maillage plus fin pourrait être choisi, mais dépend encore une fois du temps de calcul.

Les voxels ainsi reconstruits, sont anisotropes et de taille $150 \times 150 \times 85 \mu\text{m}$.

Cette étape est calculée sur processeur graphique, ce qui permet de répartir les calculs et minimiser le temps de *beamforming*. Malgré tout, *beamformer* une acquisition volumique de 350 ms (136 volumes IQs) prend environ 3min.

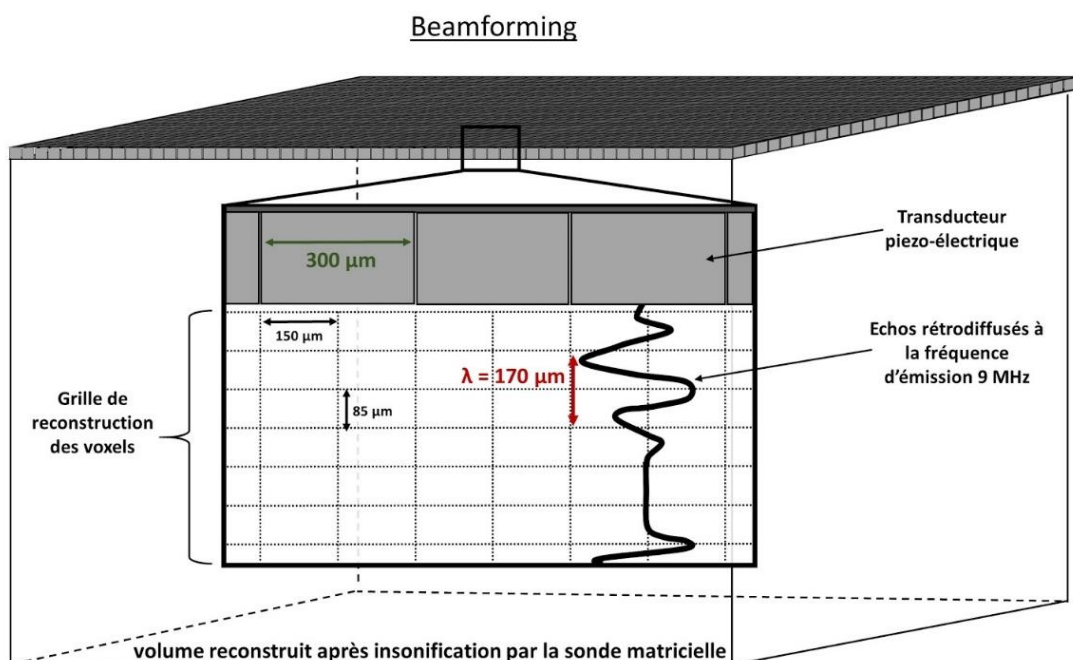


Figure 39. Reconstruction volumique des données rétrodiffusées. Le maillage de reconstruction est défini avec une résolution de $150 \mu\text{m}$ en latéral et $85 \mu\text{m}$ en profondeur. Cela correspond à la reconstruction de deux pixels par transducteur et de deux pixels par longueur d'onde.

Traitement Doppler

Puis, le traitement Doppler s'effectue également de la même manière qu'en 2D. Les 200 volumes IQs sont concaténés les uns à la suite des autres dans une matrice 4D spatio-temporelle (3D spatiales + 1D temps). Cette matrice 4D est ensuite réarrangée en une matrice 2D appelée \mathbf{S} dont une dimension est l'espace et l'autre le temps :

$$IQ_{temp} \rightarrow reshape(IQ) = \mathbf{S}$$

$$dimensions : \quad [x, y, z, t] \rightarrow [(x, y, z), t]$$

La décomposition en valeurs singulière pourrait être réalisée sur cette matrice \mathbf{S} . Cependant compte tenu des trois dimensions spatiales réorganisées dans une seule dimension, cette matrice admet beaucoup plus de points spatiaux (typiquement $n_x * n_y * n_z$ nombre de volumes = $64 * 64 * 100 * 200 = 81 \times 10^6$ points) que de points temporels (ici $n_t = 136$). Il est donc bien moins lourd d'un point de vue calcul informatique de former d'abord la matrice de covariance $cov(\mathbf{S}) = \mathbf{S}^* . \mathbf{S}$ de dimension $n_t = 136$ (Figure 40) :

$$\mathbf{S} \rightarrow cov(\mathbf{S}) = \mathbf{S}^* . \mathbf{S}$$

$$dimensions : \quad [(x, y, z), t] \rightarrow [t, (x * y * z)][(x * y * z), t] = [t, t]$$

Diagonaliser $cov(\mathbf{S})$ revient à calculer les vecteurs propres temporels de S et leurs valeurs propres associées:

$$Diag(\mathbf{S}) = vect. propres \times val. propres$$

$$dimensions : \quad Diag([t, t]) = [t, t] \times [t, t] = [t, t]$$

On classe ensuite dans l'ordre décroissant de leur valeur propre les vecteurs propres, puis on abaisse à zéro les 30 premières valeurs propres, dont les vecteurs temporels sont associés au mouvement du tissu dans le cerveau.

$$Retrait des premiers modes \rightarrow \mathbf{S} \times Diag_{(1 \rightarrow 30=0)}(\mathbf{S}) = \mathbf{S}_{filtré}$$

$$dimensions : \quad \rightarrow [(x * y * z), t] \times [t, t] = [(x * y * z), t]$$

Après multiplication de \mathbf{S} par sa nouvelle base, puis réorganisation en 4 dimensions :

$$\text{reshape}(\mathbf{S}_{\text{filtré}}) \rightarrow \mathbf{IQ}_{\text{filtré}}$$

dimensions : $[(x * y * z), t] \rightarrow [x, y, z, t]$

On obtient la nouvelle acquisition temporelle $\mathbf{IQ}_{\text{filtré}}$ dont le mouvement tissulaire est retiré. Les vaisseaux sanguins apparaissent alors dans ces images filtrées (Figure 40).

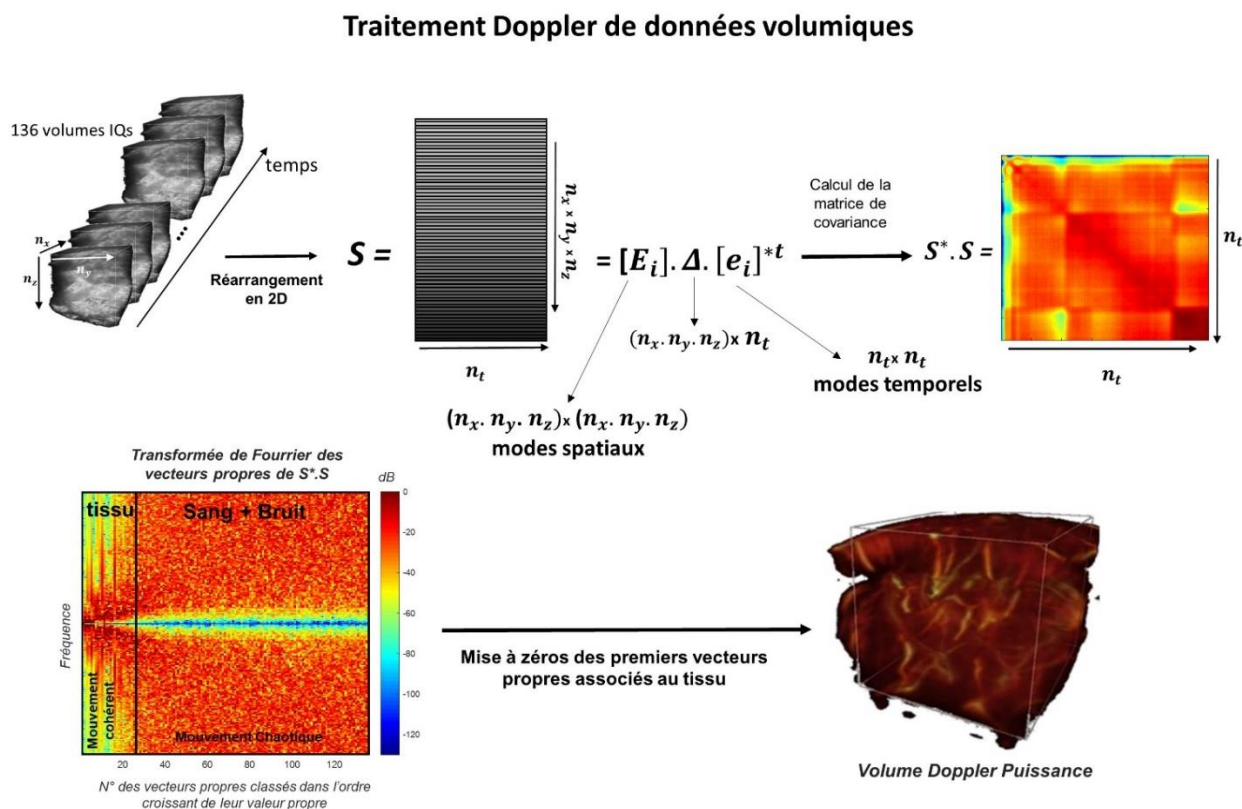


Figure 40. Traitement Doppler volumique. L'acquisition 4D (3D spatiale + 1D temporelle) est réarrangée dans une matrice \mathbf{S} à deux dimensions: $[n_x * n_y * n_z] \times [n_t]$. Puis une transformation SVD est effectuée sur la matrice de covariance de \mathbf{S} , et le filtrage des 30 premiers vecteurs propres est effectué. Un réarrangement de la matrice ainsi filtrée en quatre dimensions permet l'obtention d'un volume Doppler après intégration temporelle.

3.2.2.2. Séquences multi-ondes planes 3D pour améliorer la sensibilité

Amplitude d'émission virtuellement augmentée

Bien que les premiers volumes Doppler obtenus nous aient permis de visualiser les principaux vaisseaux chez le rat anesthésié et trépané, nous avons anticipé que la faible sensibilité individuelle des éléments par rapport aux sondes linéaires 1D classiques deviendraient critiques pour les applications qui nécessitent une sensibilité élevée comme pour les applications de neuro-imagerie fonctionnelle.

Pour contrebalancer le manque de sensibilité intrinsèque à la sonde, nous avons mis en place un mode de séquence **multi-ondes planes 3D avec encodage d'amplitude Hadamard** inspiré du mode multi-ondes planes 2D développé en 2015 au laboratoire (Tiran et al. 2015) mais qui n'a jamais été implémenté pour l'imagerie 3D.

L'imagerie par multi-ondes planes repose sur des séquences d'émissions d'amplitudes codées (Figure 41). Au lieu d'envoyer une seule onde plane inclinée par émission pour la reconstruction en *coherent compounding*, chaque émission transmet un ensemble de N ondes planes inclinées successives: chaque onde plane inclinée admet une polarité d'amplitude codée donnée (-1 ou +1). N transmissions de N ondes planes successives sont émises avec la même combinaison d'inclinaisons des ondes planes mais différentes combinaisons de polarité. En utilisant différentes polarités, on peut alors reconstruire les ondes planes individuelles indépendamment avec des opérations linéaires sur les blocs de réception en utilisant la formation linéaire (Figure 41).

Pour optimiser les combinaisons de polarité pour les N émissions des N ondes planes inclinées: p_1, \dots, p_n une matrice Hadamard d'ordre N a été utilisée pour obtenir des vecteurs colonnes orthogonaux de composantes +1 et -1. Sachant que la multiplication de H_N (matrice de Hadamard d'ordre N) par sa transposée est égale à N fois la matrice d'identité I : $H_N.H_N^t = N.I$, les échos rétrodiffusés de chaque onde plane indépendante peuvent être reconstruits individuellement par une sommation cohérente des signaux de réception successifs.

Ainsi, en additionnant de manière cohérente les blocs de données de réception initiales des N transmissions successives avec les bons coefficients donnés par les lignes de la matrice de Hadamard, nous pouvons reconstruire N nouveaux blocs de données correspondant aux échos rétrodiffusés d'ondes planes individuelles uniquement, mais avec une amplitude virtuellement N fois plus élevée.

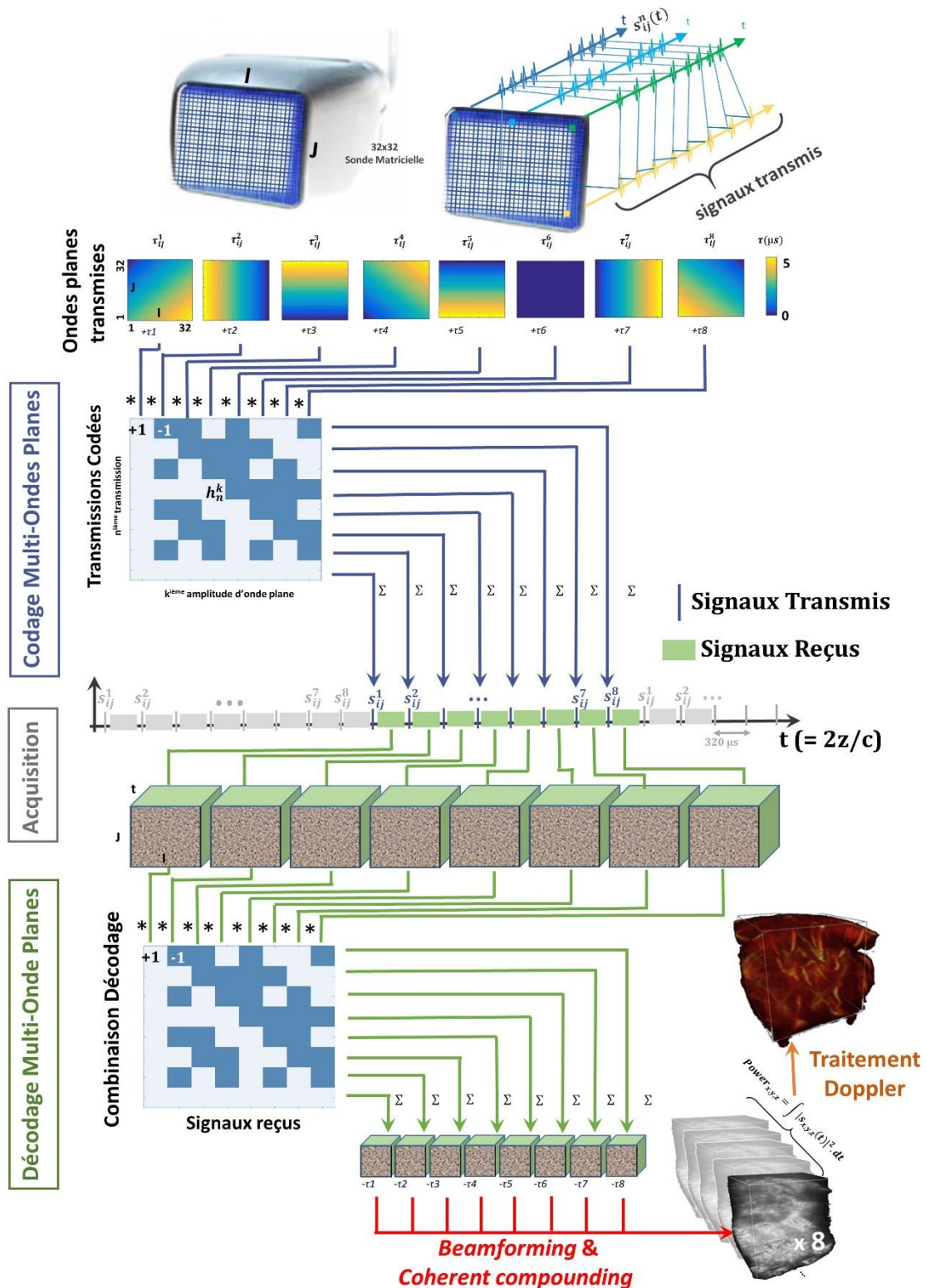


Figure 41. Traitement Doppler volumique. L'acquisition 4D (3D spatiale + 1D temporelle) est réarrangée dans une matrice S à deux dimensions: $[n_x * n_y * n_z] \times [n_t]$. Puis une transformation SVD est effectuée sur la matrice de covariance de S , et le filtrage des 30 premiers vecteurs propres est effectué. Un réarrangement de la matrice ainsi filtrée en quatre dimensions permet l'obtention d'un volume Doppler après intégration temporelle.

À titre d'exemple, pour $N=2$, les lignes et colonnes de la matrice Hadamard $H_2 = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{bmatrix}$ sont utilisées pour le codage et pour le décodage de deux transmissions d'ondes multiples successives. p_1 est une onde plane d'inclinaison angulaire 1 et p_2 une onde plane d'inclinaison angulaire 2. Les première et deuxième transmissions de la séquence multi-ondes planes correspondent respectivement aux émissions combinées de p_1+p_2 et de p_1-p_2 basées sur : $H_2 \cdot \begin{bmatrix} p_1 \\ p_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} p_1+p_2 \\ p_1-p_2 \end{bmatrix}$. En multipliant les signaux rétrodiffusés qui en résultent par H_2^t , on peut décoder les échos et reconstruire synthétiquement les signaux virtuellement transmis par $2.p_1$ et $2.p_2$ comme on le voit avec : $H_2^t \cdot \begin{bmatrix} p_1+p_2 \\ p_1-p_2 \end{bmatrix} = H_2^t \cdot H_2 \cdot \begin{bmatrix} p_1 \\ p_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 2.p_1 \\ 2.p_2 \end{bmatrix}$.

L'ordre d'une matrice Hadamard (et donc le nombre d'ondes planes inclinées) doit être égal à 2 ou à un multiple de 4. Dans notre séquence, **nous avons utilisé $N=8$ ondes planes** (séquence de transmission multi-ondes planes à 8 angles) (le tableau b. de la Figure 44 indique les angles utilisés pour cette séquence), permettant **un gain important $\sqrt{8}$ de signal sur bruit** sans compromettre la fréquence d'image (390 Hz).

Beamforming des acquisitions multi-ondes planes

La première étape du processus de *beamforming* est le décodage et la compilation cohérente des données brutes des canaux. Comme décrit précédemment, nous avons d'abord sommé les données reçues des transmissions successives avec les coefficients donnés par la matrice Hadamard H_8 (Figure 42.a.b). Par conséquent, chaque séquence de 8 transmissions contenant les 8 ondes planes inclinées est recombinaisonnée de sorte que chacune d'entre-elle semble résulter d'une seule émission d'onde plane inclinée avec une amplitude 8-fois plus élevée. Nous avons ensuite compensé chaque retard temporel des ondes inclinées (car envoyées les unes à la suite des autres dans le temps: voir Figure 42.b), et les blocs de données résultants ont été additionnés de manière cohérente pour obtenir un bloc IQ, comme dans la méthode de *coherent compounding* avec ondes transmises individuellement (Figure 42.c).

Le *beamforming* 3D décrit à la partie 3.2.2.1 pour les acquisitions par ondes planes individuelles a ensuite été lancé sur processeur graphique (GPU K6000, Nvidia, Santa Clara, CA) puis le traitement Doppler également décrit en 3.2.2.1 est appliqué pour l'obtention de volumes Doppler Puissance 3D.

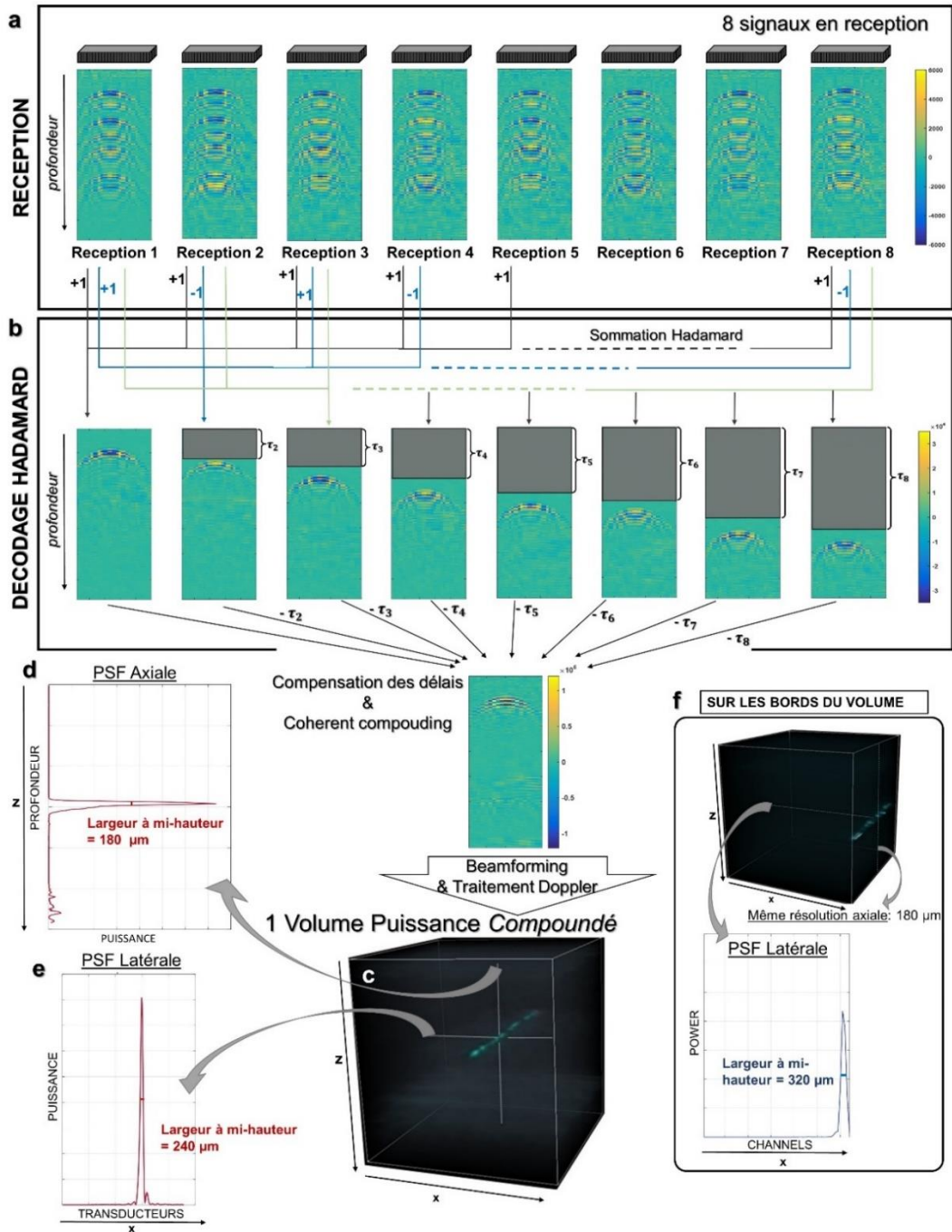


Figure 42. Processus de décodage Hadamard sur les données de radiofréquence (RF) reçues d'un fil de nylon statique de 80 μm . Nous ne montrons ici qu'une ligne de réception de 32 canaux de la sonde matricielle 32x32. a) Réception des 8 échos du fil après l'émission de 8 ondes planes polarisées inclinées successives. On peut voir les différentes polarisations des fronts d'onde qui reviennent du fil: les polarisations émises +1 / -1 correspondent aux coefficients de la matrice de Hadamard. b) Sommations cohérentes (suivant les coefficients de H_8) des 8 réceptions. Dans la première combinaison, les contributions des échos des angles $n^{\circ}2$ à $n^{\circ}8$ disparaissent grâce aux facteurs multiplicatifs appliqués, alors que les contributions du premier angle sont ajoutées: $(+1)+(+1)+\dots+(+1)=8$. L'image obtenue est équivalente à une situation où une seule transmission individuelle est envoyée avec une amplitude $\times 8$. Le délai correspondant au temps écoulé avant l'émission de l'onde est ensuite compensé et les huit volumes résultants sont sommés de manière cohérente. c) Pour obtenir le volume de puissance final, le volume d'imagerie obtenu est élevé au carré. d) -e) Résolution axiale et latérale calculées avec la fonction d'étalement du point (PSF en anglais) de puissance d'un fil de nylon de 80 μm . La résolution spatiale est quantifiée comme la largeur à mi-hauteur. Des résolutions de $\Delta z = 180 \mu\text{m}$ (axiale) et $\Delta x = 240 \mu\text{m}$ (latérale). La même expérience a été réalisée avec une rotation du fil de 90 degrés et une résolution latérale similaire a été trouvée ($\Delta y = 240 \mu\text{m}$). f) Sur le bord du volume, la résolution axiale ne change pas, mais la résolution latérale augmente jusqu'à 320 μm .

3.2.2.3. Performance de l'imagerie multi-ondes planes

Résolution spatiale

Afin d'estimer la résolution spatiale de l'imagerie fUS 4D à l'aide de la matrice 9 Mhz et de la séquence de transmission multi-ondes planes, un fil de nylon de 80 μm de diamètre a été imagé dans de l'eau en appliquant le décodage 3D et le *beamforming* 3D avec une taille de voxel isotrope 85*85*85 μm . Ce fil a été placé à différents endroits en profondeur et dans des directions latérales afin d'estimer la résolution spatiale au centre et à la périphérie du volume imagé. Nous avons trouvé une résolution spatiale de 240*240*180 μm au milieu du volume 3D imagé (Figure 42.c.d et .e). Cette résolution spatiale diminue légèrement et continuellement vers les limites latérales du volume imagé jusqu'à une valeur de 320*320*180 μm près des coins (Figure 42.f).

Comparaison avec l'imagerie conventionnelle par ondes planes individuelles

En utilisant de telles émissions multi-ondes planes codées, nous avons réussi à obtenir des volumes Doppler de grande sensibilité grâce à une augmentation artificielle de l'amplitude du signal d'émission. Afin d'estimer l'amélioration obtenue par la transmission multi-ondes planes par rapport à la transmission "conventionnelle" à ondes planes individuelles, une expérience de comparaison des deux méthodes de transmission a été effectuée (Figure 43). Une séquence de d'acquisition multi-ondes planes avec N=8 angles d'une durée de 350 ms (cadence 390 MHz) a été utilisée pour imager le cerveau d'un rat trépané anesthésié. Immédiatement après cette première acquisition, une seconde acquisition de transmission d'ondes individuelles avec N=8 angles, a été réalisé. Les paramètres de la transmission ondes planes ont été conservé à l'identique: cadence=390 MHz, angles identiques, durée=350 ms.

L'augmentation de 9 dB du SNR obtenue en imagerie multi-ondes planes (Figure 43.b&d) par rapport à l'imagerie "conventionnelle" par ondes individuelles (Figure 43.a&c) permet de détecter de nombreux petits vaisseaux qui n'étaient pas visibles avec la séquence de transmission conventionnelle.

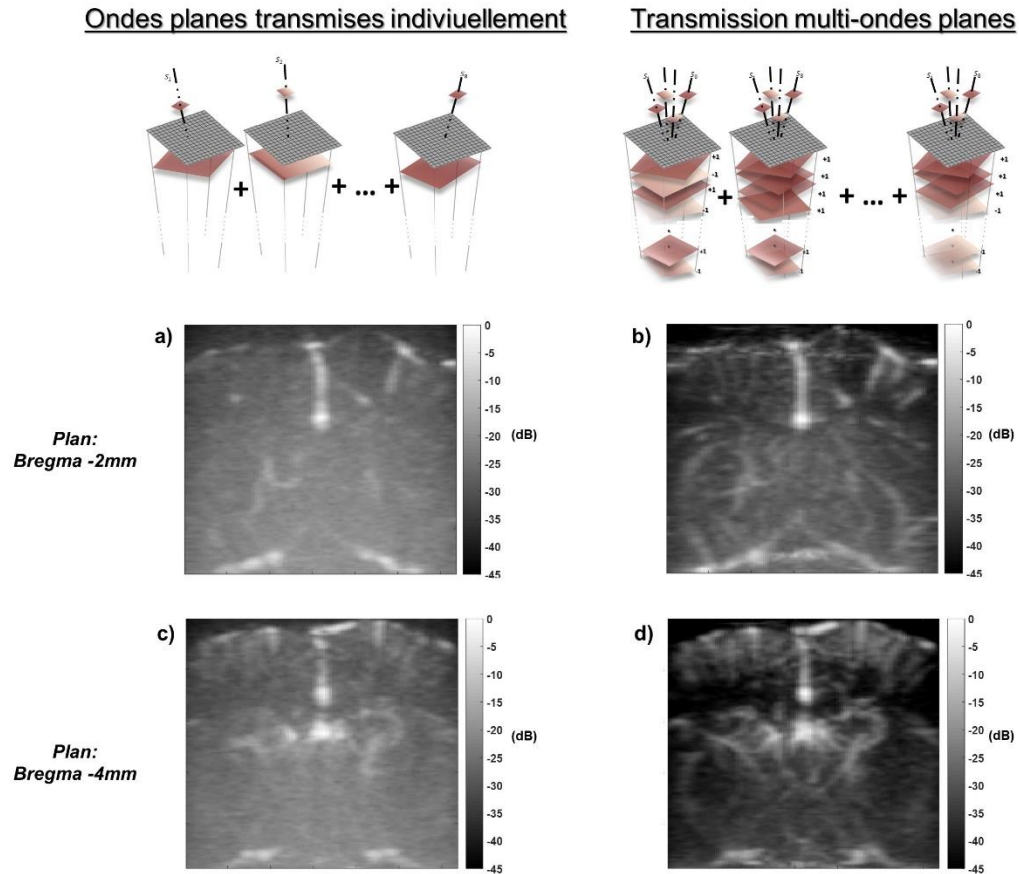


Figure 43. Comparaison entre l'imagerie ultrarapide "conventionnelle" par ondes planes inclinées individuelles et l'imagerie multi-ondes planes: exemple de deux plans d'imagerie coronaires chez un rat trépané, acquis avec a) -c): la méthode de transmission conventionnelle utilisant la transmission / réception successive d'ondes planes inclinées ou b) -d): la méthode de transmission multi-ondes planes utilisant la transmission simultanée de plusieurs ondes planes inclinées. Pour être comparables, les données sont normalisées et affichées en échelle logarithmique (-40 dB à 0 dB).

3.2.3. Séquences ultrasonores fonctionnelles 4D et acquisition sur rat trépané

3.2.3.1. Chirurgie et procédure animale

Tous les animaux ont reçu des soins conformément à la directive du Conseil des Communautés européennes de 2010 (2010/63/UE), et l'étude a été approuvée par le comité institutionnel et régional pour le soin animal : CEEA (Comité d'Ethique pour l'expérimentation animale) numéro 59 - "Paris Centre et Sud" Protocole # 2017-23). Des rats mâles Sprague Dawley ont été utilisés dans cette étude (âgés de 6 à 8 semaines, de 250 à 400g). N=10 animaux ont été utilisés: N=3 animaux ont été imagés pendant des expériences de stimulations fonctionnelles (visuelles et/ou de moustache). N=3 animaux

ont été imagés après injection corticale de 4-aminopyridine (4-AP) provoquant une activité cérébrale chaotique de type épileptique. Et N=4 animaux ont été imagés afin de cartographier leur connectivité fonctionnelle 3D.

Pour chaque animal, une craniotomie a été effectuée pour éviter les effets dus au crâne: qui peut produire une atténuation significative et une distorsion des signaux ultrasonores aux fréquences employées. J'ai effectuée toutes les chirurgies, après avoir été formée en expérimentation animale.

Durant les chirurgies et les séances d'imagerie, les animaux ont été anesthésiés au moyen d'une injection initiale intra-péritonéale de médétomidine (Domitor®, 0,3 mg kg⁻¹) et de kétamine (Imalgene, 40 mg kg⁻¹). A partir d'une heure après l'induction, les animaux étaient maintenus par injection continue sous-cutanée de médétomidine (Domitor, 0,1 mg.kg⁻¹ h⁻¹) et kétamine (Imalgene, 12,5 mg.kg⁻¹ h⁻¹). Les animaux étaient placés sur un cadre stéréotaxique où leur tête était maintenu avec barres de gueule et d'oreilles, et une fenêtre crânienne de 1x1 cm était enlevée par forage (Foredom, États-Unis) à basse vitesse à l'aide d'une fraise micro-foret d'acier (numéro de fraise 19007-07, Fine Science Tools, Vancouver, Canada). La dure-mère était laissée intacte afin de prévenir les processus inflammatoires dans le cerveau.

Après la chirurgie, le cerveau était rincé avec une solution saline stérile, et le gel de couplage à ultrasons placé sur la fenêtre cérébrale. La sonde matricielle 2D était placée directement au-dessus de la fenêtre crânienne avant l'acquisition.

Pendant la craniotomie et la séance d'imagerie, la température corporelle a été maintenue constante à l'aide d'un coussin chauffant (Physitemp), et les fréquences cardiaque et respiratoire ont été surveillées (MouseOx plus, Starr Life Science Corp.). Les yeux de l'animal ont été recouverts d'un cache noir pendant la chirurgie afin que la lumière de la lampe scialytique ne sature pas les récepteurs oculaires des animaux pour les expériences de stimulations visuelles.

Différentes séquences ont été implémentées pour les expériences d'imagerie fonctionnelles ultrasonores 4D. Toutes les séquences multi-ondes planes 8-angles ont été modélisées avec un réseau virtuel positionné à 60 m derrière la sonde (Figure 44.a). Les délais des ondes planes ont été calculés avec des sources virtuelles placées sur le réseau virtuel de coordonnées indiquées en Figure 44.b. Les angles des ondes transmises par la sonde sont également listés sur le tableau de la Figure 44.b.

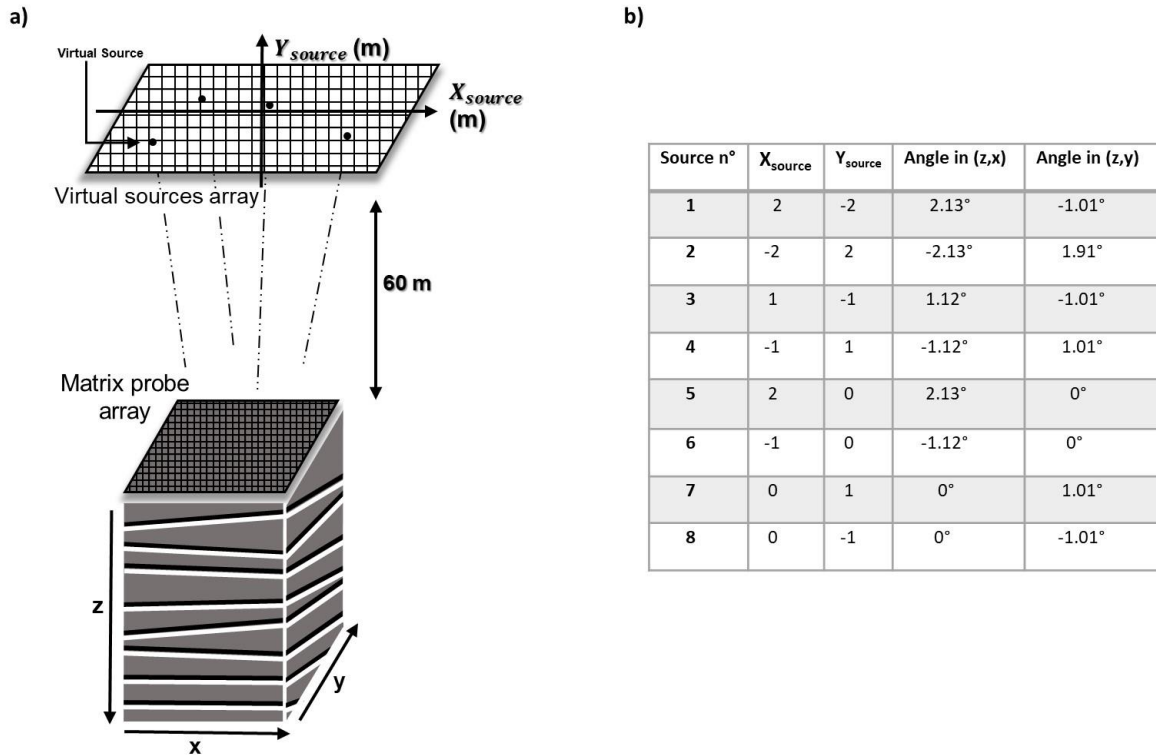


Figure 44. Sources virtuelles émettant une séquence multi-ondes planes. a) Les acquisitions sont définies par des sources ultrasonores virtuelles placées sur un réseau virtuel situé loin derrière la sonde (60m). Pour chaque source individuelle, les délais du réseau virtuel jusqu'au réseau de transducteurs sont calculés et des ondes planes sont obtenus en émission b) Coordonnées des sources virtuelles et valeurs des angles correspondants dans les deux plans du milieu insonifié

3.2.3.2. Acquisition de l'activation fonctionnelle suivant une stimulation

Une séquence d'émission multi-ondes planes à 8 angles (fréquence de transmission de 3120 Hz) est répétée à 390 Hz pendant 350 ms pour moyennner approximativement deux cycles cardiaques: on enregistre donc 136 volumes IQs ultrarapides. Après traitement Doppler (décrit précédemment en 3.2.2.1), ce bloc de 136 IQs permet l'obtention d'un volume Doppler Puissance. Chaque volume Doppler Puissance est répété tous les 1,5 s (1,15 s pause) pendant 180 s.

Pour mettre en évidence la spécificité spatio-temporelle du système d'imagerie 3D, nous avons effectué (sur les mêmes rats anesthésiés placés sur cadre stéréotaxique -N=3 au total-) deux stimulations différentes les unes après les autres : stimulation des moustaches et stimulation visuelle.

Stimulation des moustaches : l'ensemble (gauche) des moustaches a été stimulé manuellement à l'aide d'un coton-tige en utilisant les paramètres suivants : période de **15 s OFF** (pas de stimulation), **suivi d'une période de 15 s ON**, 5-7 Hz, 1 cm d'amplitude. Ce schéma de stimulation a été répété 6 fois pour une durée d'acquisition totale de 180 s.

Stimulation visuelle : Des stimuli visuels ont été émis à l'aide d'une LED verte (=532 nm) positionnée à 3 cm devant l'œil droit ou gauche des rats. À cette distance, la luminance était de 18 lx lorsque la lumière était « ON » et de 0,01 lx lorsque la lumière était éteinte. Les schémas de stimulation consistaient en un scintillement périodique (3 Hz) de la LED verte en utilisant les paramètres suivants : **15 s LED éteinte** suivi de **15 s de scintillement**, répétés 6 fois pour une durée totale de 180 s. Entre les sessions de stimuli, les rats étaient gardés dans un environnement sombre.

3.2.3.3. *Connectivité fonctionnelle en trois dimensions*

Il a été montré que des schémas intrinsèques de connectivité fonctionnelle chez le rat anesthésié pouvaient être mesurés par acquisition fUS: nous avons suivi le même protocole d'anesthésie que (Osmanski et al. 2014) qui en a fait la preuve de concept afin de reproduire ces résultats en trois dimensions. L'animal était anesthésié en continue (injection sous-cutanée régulée au pousse-seringue) avec un mélange de médétomidine (Domitor®, 0,3 mg kg⁻¹) et kétamine (Imalgene®, 40 mg kg⁻¹). Afin d'attendre une stabilisation des constantes physiologiques de l'animal, et pour une meilleure reproductibilité, les acquisitions de connectivité fonctionnelle commençaient environ 2 heures après l'induction.

Huit sessions fUS de 90s chacune ont été acquise puis concaténée avec les autres dans le temps. Les ensembles de données ont été filtrés indépendamment avec un filtre passe-haut de fréquence de coupure de 0,05 Hz .

La même séquence de transmission multi-ondes planes 8-angles qu'en 3.2.2.2 (répétition à 390 Hz de volume *compoundés* pendant 350 ms) est utilisée. Les blocs d'imagerie sont également répétés tous les 1,5 s (1,15 s pause) pendant 300 s.

La connectivité fonctionnelle a ensuite été étudiée sous l'angle de deux analyses: Nous avons **d'abord** sélectionné deux zones de référence appelées "*seeds*" (voir Chapitre 2 pour la description de l'analyse *seed-based*) : une située dans l'hippocampe gauche, et l'autre située dans le cortex frontal gauche. Les cartes de

corrélation *seed-based* ont été formées en calculant le coefficient de corrélation normalisé de Pearson entre le signal moyen de ces deux *seeds* et le signal moyen de chaque voxel individuel de l'ensemble de données.

Ensuite, en utilisant le volume Doppler ultrasensible, des régions d'intérêts ont été enregistrées manuellement en utilisant des repères vasculaires connus à deux atlas cérébraux : le Waxholm Space atlas (Papp et al. 2014) pour les structures subcorticales et l'atlas de Hernandez pour les structures corticales (Hernandez et al. 2011). Les libellés des structures ont ensuite été hiérarchisées à l'aide de l'Ontologie des Neurones de Bowden (Bowden et al. 2012) pour les regrouper dans six régions plus vastes (néocortex ,cerveau central, inter-cerveau, télencéphale). Les signaux moyens extraits de chaque région ont été normalisés spatialement et filtrés temporelles puis corrélés les uns avec les autres pour former une matrice de connectivité (une par rat) à l'aide du logiciel MATLAB. Une matrice de connectivité moyenne ($N_{\text{rats}} = 4$) reflétant la connectivité interrégionale est présentée à la Figure 46.b . Les noms des régions d'intérêts sélectionnées correspondants aux numéros de la matrice (103 au total) sont listés dans le tableau « Régions d'intérêts pour l'étude de la connectivité 3D » en Annexe. La connectivité fonctionnelle 3D a été mesurée chez 4 rats pour prouver la robustesse de notre modalité à détecter les modèles fonctionnels. Nous n'avons pas utilisé plus de rats afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés.

Une représentation volumique des réseaux de connectivité cérébrale a été construite à partir de la matrice de connectivité en créant des lignes du réseau de connectivité codées par couleur, en utilisant la valeur de corrélation Pearson et en reliant le barycentre de chaque région d'intérêt en trois dimensions (Figure 46.c).

3.2.3.4. Induction d'une crise de type épileptique

Les crises de type épilepsie ont été induites par injection corticale de 1 μ l de solution de 4-aminopyridine (4-AP; Sigma-Aldrich) à une concentration de 15 mmol/l à l'aide d'une aiguille Hamilton de 150 μ m de diamètre, 1 mm de profondeur dans le cortex de l'animal anesthésié (anesthésie par injection continue sous-cutanée de médétomidine (Domitor, 0,1 mg.kg-1.hr-1) et de kétamine (Imalgene, 12,5 mg.kg-1.hr-1)). Il convient de noter que notre modèle d'injection 4-AP n'a pas été conçu pour fournir de nouveaux aperçus sur la dynamique des crises. Le but est uniquement de provoquer un événement cortical de type épileptique afin de suivre la propagation des ondes de dépression corticales dans tout le volume.

Dans cet ensemble d'expériences, une séquence de transmission multi-ondes planes 8 angles (PRF 390 Hz, pendant 350 ms, 136 volumes *compoundés*) répétée toutes les 3 s pendant 360 secondes a été utilisée pour suivre la propagation de la crise. Comme nous avons pu détecter de manière très robuste la propagation des ondes dépressives chez 2 rats, nous n'avons pas utilisé plus d'animaux pour cette preuve de concept afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés.

Pour ces trois applications, les pauses entre les blocs d'imagerie et les répétitions de séquence ont été choisies comme compromis entre la fréquence d'échantillonnage (pour assurer un échantillonnage adéquat des variations du volume sanguin) et une pause (nécessaire à la fois pour le stockage continu des données brutes et pour éviter tout dommage possible de notre prototype sonde en raison de tout chauffage interne accumulé). À l'avenir, nous nous attendons à ce que les unités de stockage soient plus rapides et à ce que l'on adopte une approche moins conservatrice en matière de sécurité des sondes afin de réduire le plus possible les temps morts. Cela augmenterait l'échantillonnage temporel pour obtenir une mesure continue du volume sanguin, comme c'est actuellement possible avec l'imagerie par ultrasons fonctionnels 2D.

3.3. Résultats

Des exemples de codes Matlab et de données expérimentales pour toutes les étapes de post-traitement sont inclus dans le fichier "Supplementary Materials" du papier qui a découlé de ce travail: (Rabut, et al. 2019) sur le site du journal Nature Methods. Tous les traitements de données ont été effectués sur MATLAB (MathWorks, Cambridge, MA, USA)

3.3.1. Activation de zones fonctionnelles

3.3.1.1. Calcul de cartes de corrélation

Les cartes de corrélation indiquent les régions cérébrales activées suivant une stimulation détectées en fUS. Elles sont calculées à partir de la corrélation normalisée entre le signal temporel $dop^{vox}(t)$ de chaque voxel du volume et le motif temporel du stimulus $stim(t)$ par produit-moment de Pearson r_{vox} .

Avec :

$$r_{vox} = \frac{\sum_{t=1}^N (dop^{vox}(t) - \overline{dop^{vox}(t)}) \cdot (stim(t) - \overline{stim(t)})}{\sqrt{\sum_{t=1}^N (dop^{vox}(t) - \overline{dop^{vox}(t)})^2} \cdot \sqrt{\sum_{t=1}^N (stim(t) - \overline{stim(t)})^2}}$$

Où : $dop^{vox}(t)$ = signal du voxel à l'instant t
 $\overline{dop^{vox}(t)}$ = moyenne temporelle du voxel

Nous avons choisi un niveau de significativité de $z > 3,1$ en appliquant la transformation de Fisher ($P=0,001$, test unilatéral), qui correspond à $r > 0,193$. La carte fonctionnelle (visuelle et moustache) volumique après seuillage est présentée en Figure 45.b . Les structures cérébrales (S1BF, VPM) ont été identifiées à l'aide de l'atlas cérébral de rat de Paxinos et Waston (Paxinos and Waston 1982)

Les volumes Doppler Puissance et les volumes de corrélation ont ensuite été importés dans un logiciel 3D pour la visualisation (logiciel Amira 6.0.1, Visualization Sciences Group, Burlington, MA).

3.3.1.2. Zones fonctionnelles détectées en 3D

Les **stimulations des moustaches** ont induit une nette augmentation du volume sanguin cérébral (CBV: Cerebral Blood Volume) dans les deux zones associées aux vibrisses chez le rat. En Figure 45.a, on constate que le signal moyen normalisé du cortex sensoriel primaire (S1BF) gauche est fortement corrélé au motif temporel de stimulation des moustaches droites du rat ($r=0,68$); et lors de la stimulation visuelle qui suit, l'augmentation du CBV au cours du temps dans le S1BF reste en moyenne autour de 0.

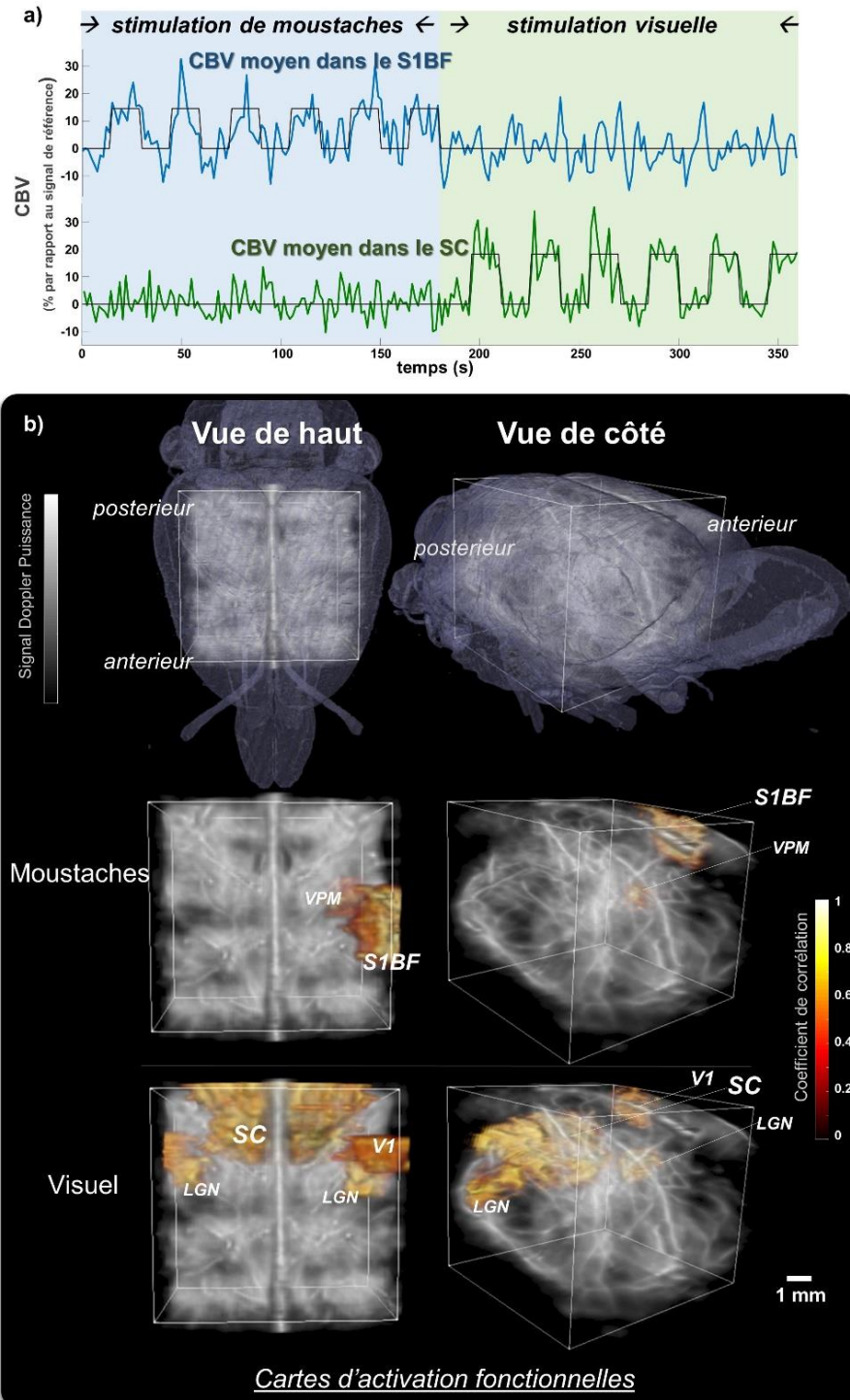


Figure 45. Activation fonctionnelle en 3D durant des stimulations sensorielles. a) Signal CBV moyen normalisé des pixels des zones activées en réponse aux deux schémas de stimulation: courbe bleue = signal CBV moyen en S1BF; courbe verte = signal CBV moyen en SC. b) Cartes d'activation (vues de dessus et de biais) obtenues avec le même rat après stimulation des moustaches gauches et stimulation visuelle. La couleur grise représente le signal Doppler de base et les régions activées sont représentées en couleurs chaudes. ROI activées: Pendant la stimulation des moustaches le cortex sensoriel primaire (S1BF) et le noyau thalamique (VPM) sont activés tandis que pendant la stimulation visuelle, le cortex visuel primaire (V1), le colliculus supérieur et le noyau géniculaire latéral sont activés.

De même, le signal temporel du noyau thalamique (ventral postero-médian thalamus : VPM) gauche admet une corrélation significative ($r=0,58$) avec le schéma d'activation des moustaches droites. Nous avons ainsi pu construire une carte d'activation robuste des moustaches droites chez le rat (Figure 45.b) dans laquelle les deux régions (S1BF et VPM) apparaissent nettement en volume dans le cerveau.

De façon similaire, si l'on observe à présent au cours du temps le signal du colliculus supérieur (SC), zone centrale sous-corticale appartenant à la voie auditive du cerveau, on constate que: l'augmentation du CBV moyen au cours du temps est quasi-nulle pendant les stimulations des moustaches mais elle augmente d'environ 30% à chaque stimulation visuelle (Figure 45.a). **Les stimulations visuelles** ont donc également induit une carte fonctionnelle d'activation spécifique dans laquelle se délimitent significativement le colliculus supérieur ($r=0,91$, Figure 45.b) et le noyau géniculaire latéral (LGN) ($r=0,82$). Comme prévu, le cortex visuel primaire ipsilatéral (gauche pour stimulation dans l'œil droit) affiche également un CBV accru lors des stimulations ($r=0,23$).

Pour la première fois en ultrasons fonctionnels, des zones activées peuvent être détectées entièrement de **manière simultanée** dans tout le volume cérébral en quelques secondes. Comme on le constate sur la Figure 45.b, 150s seulement sont nécessaires à créer des cartes d'activation robuste avec la répétition de seulement 6 stimuli par sens stimulés.

3.3.2. Mesure de la connectivité fonctionnelle dans tout le volume

Pour mesurer la connectivité fonctionnelle dans tout le volume cérébral des quatre animaux imagés, nous avons examiné les fluctuations cérébrales spontanées à basse fréquence (0,05 à 0,3 Hz) observées dans les lignées des études 2D fUS (Osmanski et al. 2014) et IRM-fonctionnelle (De Luca et al. 2006).

Si on se concentre d'abord sur l'analyse *seed-based*, on constate que les deux hippocampes sont fortement corrélés ($r=0,7$) avec la *seed* située dans l'hippocampe gauche (Figure 46.a). Ce résultat est en accord avec la littérature montrant des liens solides à la fois anatomiquement et fonctionnellement (van den Heuvel and Hulshoff Pol 2010) entre l'hippocampe droit et gauche, mais aussi des liens corticaux bilatéraux, en raison de projections cortico-corticales. On observe en effet également que les côtés droit et gauche du cortex frontal sont fortement corrélés à la *seed* du cortex frontal gauche ($r=0,68$).

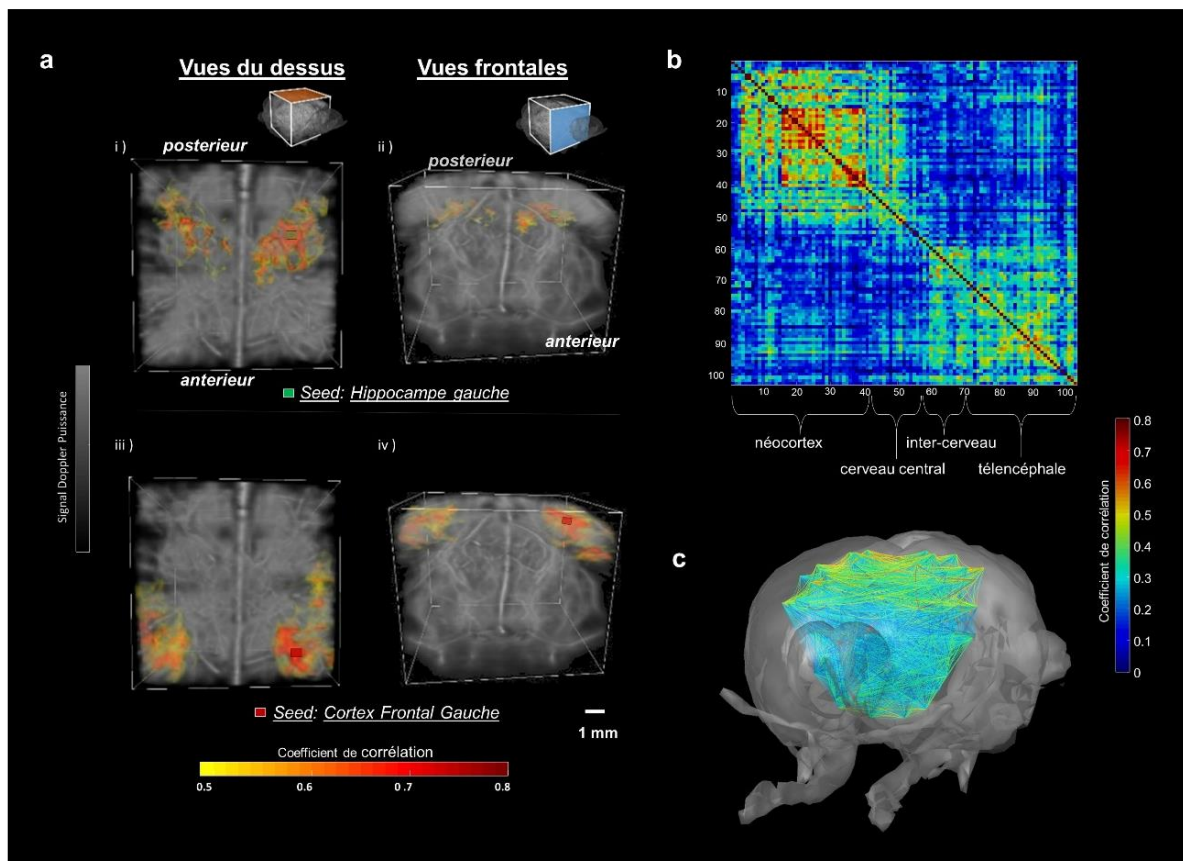


Figure 46. Connectivité fonctionnelle 3D: a) Cartes de corrélation 3D obtenues chez un rat avec des analyses *seed-based*. La couleur grise représente le signal Doppler de base et les régions présentant une corrélation significative avec les *seeds* sont affichées en couleurs chaudes. *Seed* positionnée dans l'hippocampe gauche (carré vert): i) vue de dessus et ii) vue coronale. *Seed* positionnée dans le cortex frontal (carré rouge): iii) vue de dessus et iv) vue coronale. Les cartes de corrélation ont été obtenues en calculant le coefficient de corrélation de Pearson normalisé entre les signaux temporels d'une *seed* et de chaque voxel du cerveau. B) Matrice de connectivité moyenne ($N_{rats} = 4$) de 103 régions corticales et sous-corticales. c) Graphique de connectivité moyenne (coefficient de corrélation > 0,45 entre deux régions liées) illustrant 70 connexions au cours de l'état de repos. L'échelle de couleur représente la force des connexions fonctionnelles.

Avoir étendu l'imagerie fUS à l'acquisition 3D du cerveau entier a permis d'augmenter la taille des matrices de connectivité fonctionnelle chez le rat d'un ordre de grandeur par rapport aux résultats récents et permet ainsi le développement de l'étude de connectivité dans la troisième dimension spatiale.

Des repères vasculaires connus des régions fonctionnelles 3D dans le volume vasculaire Doppler Puissance ont ainsi été délimité manuellement à en se basant sur des atlas fonctionnels. Les corrélations par paire entre 103 de régions d'intérêt communes aux

quatre rats imagés ont ensuite été analysées pour construire une matrice de connectivité fonctionnelle par rat puis, la matrice moyenne du groupe de N=4 rats (Figure 46.b). Comme pour les études existantes en IRM-f (De Luca et al. 2006), des groupements de régions fonctionnelles synchronisées temporellement correspondant à de grandes régions du cerveau peuvent être observées: on constate notamment la forte intra-corrélation entre régions du néocortex (révélée par le carré délimité par les régions 1 à 45 dans la matrice. $r_{\text{néocortex}} = 0.35$ et entre régions du télencéphale (révélée par le carré délimité par les régions 72 à 103 dans la matrice. $r_{\text{télencéphale}} = 0.31$) – ainsi que par de fortes connexions bilatérales – révélées par des antidiagonales dans la matrice (Figure 46.b.c). Les connexions du réseau dans le cerveau sont visualisables directement dans le volume cérébral 3D de la Figure 46.c: on observe de fortes corrélations corticales ($r_{\text{cortex}} \in [0.45 \ 0.65]$ pour les lignes traversant le cortex de gauche à droite) entre les deux hémisphères droit et gauche, mais on peut également constater les liens existants entre le cortex et les régions thalamiques plus profondes grâce aux lignes de connectivité plongeant dans le cerveau.

En Figure 47 sont présentées les quatre matrices de connectivité individuelle des quatre rats étudiés. La reproductibilité inter-animaux de ces cartes de connectivité semble satisfaisante entre les animaux.

Les régions du néocortex sont bien intra-corrélées chez les rats 1, 2 et 3 :

-Rat 1 : $r(\text{intra} - \text{néocortex}) = 0,37$ tandis que $r(\text{néocortex} - \text{autres}) = 0,19$

-Rat 2 : $r(\text{intra} - \text{néocortex}) = 0,37$ tandis que $r(\text{néocortex} - \text{autres}) = 0,09$

-Rat 3 : $r(\text{intra} - \text{néocortex}) = 0,40$ tandis que $r(\text{néocortex} - \text{autres}) = 0,13$

-Rat 4 : $r(\text{intra} - \text{néocortex}) = 0,24$ tandis que $r(\text{néocortex} - \text{autres}) = 0,21$

ainsi que les régions du télencéphale chez tous les rats:

-Rat 1 : $r(\text{intra} - \text{télencéphale}) = 0,29$ tandis que $r(\text{endbrain} - \text{autres}) = 0,21$

-Rat 2 : $r(\text{intra} - \text{télencéphale}) = 0,33$ tandis que $r(\text{endbrain} - \text{autres}) = 0,11$

-Rat 3 : $r(\text{intra} - \text{télencéphale}) = 0,28$ tandis que $r(\text{endbrain} - \text{autres}) = 0,11$

-Rat 4 : $r(\text{intra} - \text{télencéphale}) = 0,36$ tandis que $r(\text{endbrain} - \text{autres}) = 0,21$

où : $r(\text{intra} - \text{néocortex})$ = corrélation moyenne entre régions du néocortex

$r(\text{néocortex} - \text{autres})$ = corrélation moyenne entre régions du néo-cortex et toutes les autres ROIs de la matrice

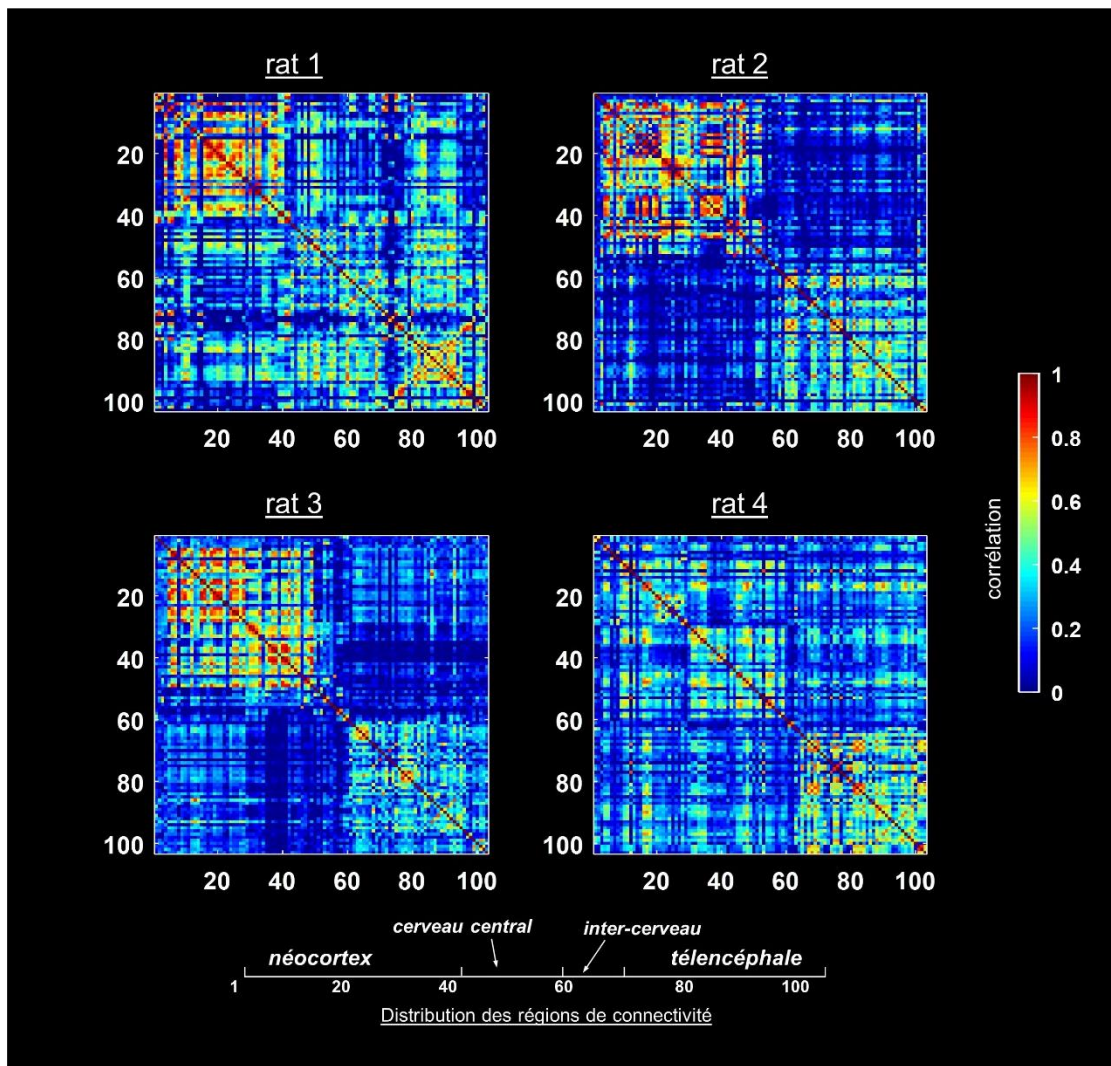


Figure 47. Matrices de connectivité de quatre rats anesthésiés calculées à partir de 103 régions d'intérêt corticales et sous-corticales communes. Une forte corrélation peut être observée pour les quatre animaux dans le néocortex et le télencéphale.

3.3.3. Suivi de la propagation d'ondes de dépression corticales pendant la crise de type épileptique

Pour cette étude, nous avons lancé l'acquisition fUS 3D 5s avant l'injection de corticale de 4-AP dans l'hémisphère gauche puis avons continué l'acquisition pendant 360s. Après *beamforming* et traitement Doppler des données enregistrées, nous avons cartographié toutes les variations relatives du volume sanguin cérébral de **15% au-dessus de la moyenne temporelle**.

Nous avons pu observer chez deux rats la propagation d'ondes de dépression corticale dans l'hémisphère d'injection et également dans l'hémisphère controlatéral. En Figure 48, on observe sur un rat que ces ondes s'étalent circulairement (voir également [vidéo en supplément: T=30s à 100s](#)) et longent le sinus sagittal supérieur sans jamais traverser vers l'autre hémisphère. Il est intéressant de souligner que le foyer de l'onde représentée sur la Figure 48 est situé à l'endroit même de l'injection de 4-AP. L'onde corticale se propage vers la partie antérieure du cerveau et plonge en profondeur en longeant le sinus sagittal inférieur.

Sur la [vidéo en supplément](#) montrant les 360s d'enregistrement de la crise de type épileptique reportée en Figure 48, on observe également: la propagation d'une seconde onde de dépression corticale partant exactement du même foyer que la première et se propageant dans la même direction, puis 60s plus tard, une troisième onde corticale débutant dans l'hémisphère controlatéral et s'étalant sphériquement dans tout cortex, jusqu'au sinus sagittal supérieur sans traverser vers l'autre hémisphère.

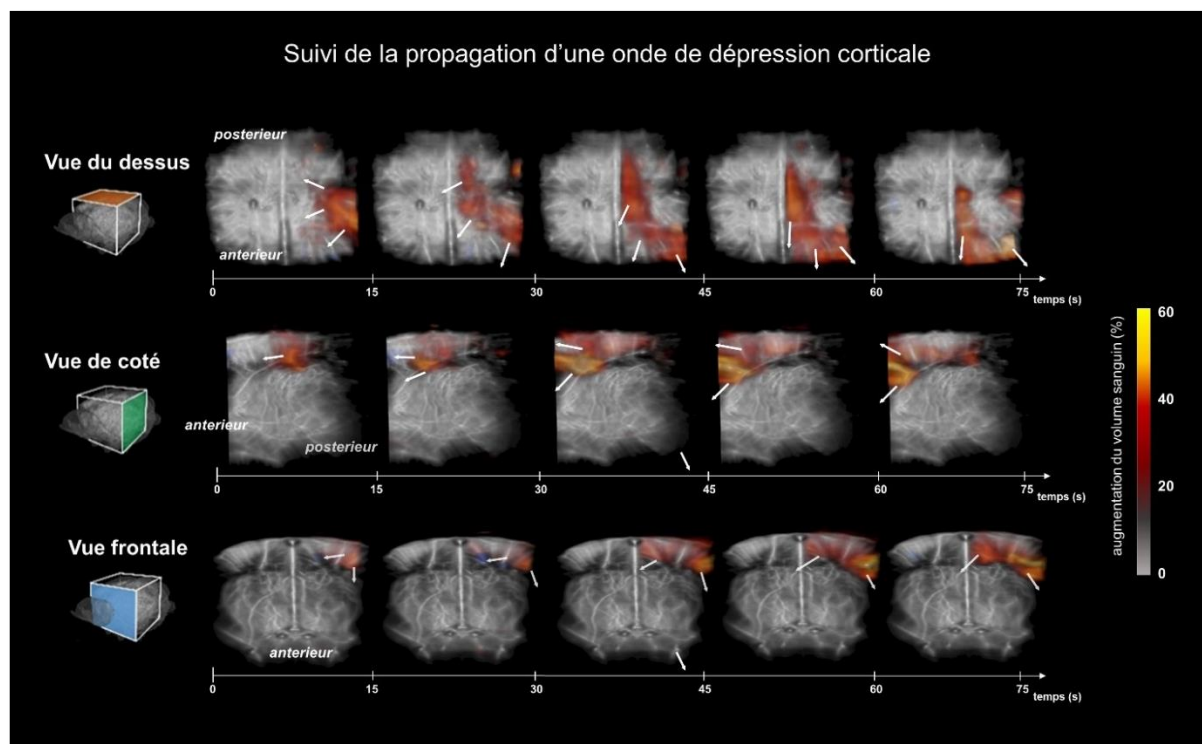


Figure 48. Trois vues de la propagation d'une onde de dépression corticale chez un seul rat lors d'une crise de type épileptique induite par une injection corticale du bloqueur de canaux potassiques : 4-AP. Le volume sanguin Doppler Puissance augmente entre 15% et 50% au cours de l'activité critique. Vitesse de déplacement de l'onde = $3 \pm 0,3$ mm / min.

À l'aide de cartes isochrones (Figure 49), la zone d'émergence de la "spreading depression" et la vitesse de propagation de cette activité a été mesurée à $3 \pm 0,3$ mm/min, ce qui correspond aux vitesses mesurées dans d'autres études chez le lapin en EEG (Ayata and Lauritzen 2015) ou le rat en IRM de diffusion (Cain et al. 2017).

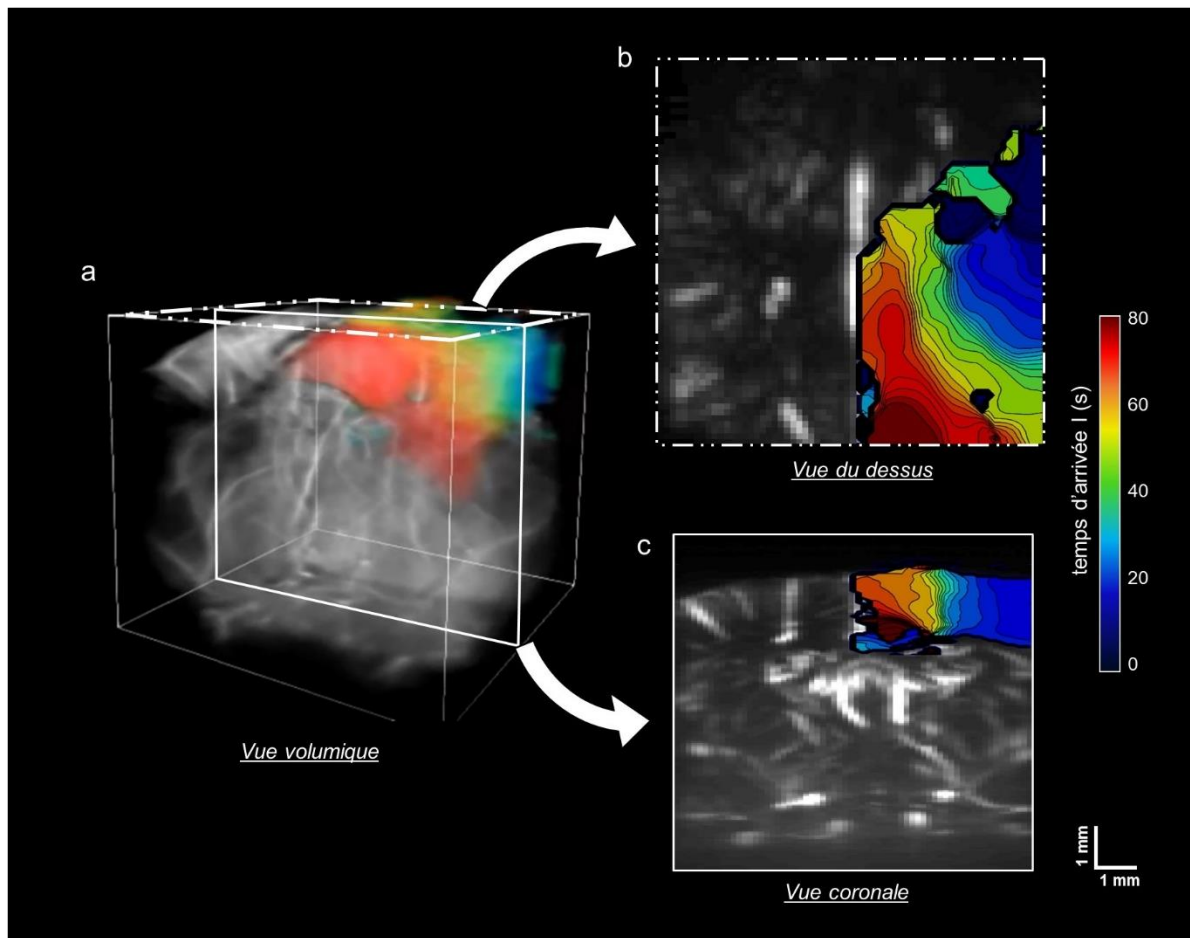


Figure 49. Cartes isochrones du temps d'arrivée de l'activité d'une onde de dépression corticale pendant la crise de type épilepsie a) volume et b & c) coupes 2D avec superposition des cartes isochrones en code couleur (une ligne toutes les 7 s) montrant la propagation d'une onde de dépression corticale. L'onde de dépression qui se propage commence par une source localisée et se dirige vers le cerveau avant, elle s'arrête au sinus longitudinal supérieur sans traverser dans l'hémisphère gauche.

3.4. Discussion et perspectives

3.4.1. Discussion

Ce travail de thèse a donc mis au point pour la première fois l'imagerie fUS 4D et a démontré que celle-ci peut être utilisée pour l'imagerie fonctionnelle dynamique du cerveau entier sur des modèles de rongeurs.

Ce travail s'est basé sur le développement au laboratoire d'une technologie qui étend les capacités de l'échographie fonctionnelle à la neuro-imagerie 4D du cerveau entier. Pour ce projet, une séquence de transmissions multi-ondes planes sur la sonde matricielle pour enregistrer les variations de volume sanguin cérébral à haute résolution spatio-temporelle a été implémentée. Cette approche a été illustrée par plusieurs preuves de concept chez le rat anesthésié : stimuli sensoriels multiples en temps réel, connectivité fonctionnelle 4D et suivi instantané d'une crise de type épileptique dans tout l'ensemble du cerveau. Chacune de ces preuves de concept a démontré la robustesse du fUS 4D multi-ondes planes pour mesurer dans tout le cerveau la dynamique vasculaire cérébrale. C'est à notre connaissance la première modalité d'imagerie fonctionnelle ultrasonore cérébrale qui permet l'acquisition volumique sans balayer plan à plan le cerveau.

Cependant, comme toute autre modalité de neuro-imagerie, l'imagerie fUS 4D admet ses limites. Tout d'abord, le signal Doppler est sensible aux variations du CBV et, à ce titre, elle ne mesure l'activité cérébrale que par le prisme du couplage neurovasculaire. L'imagerie fUS est donc limitée par le retard inhérent du couplage neurovasculaire. Sa résolution temporelle pouvant atteindre les 20 ms, elle pourrait néanmoins être utilisée pour cartographier la propagation directionnelle de l'activité vasculaire en se basant sur les corrélations de retard, comme récemment démontré chez les primates pendant les tâches visuelles (Dizeux et al. 2019).

D'autre part, la résolution spatiale actuelle, estimée à 240x240x180 microns au centre du volume imagé et à 320x320x180 microns sur les bords de volume (Figure 42) est inférieure à celle de l'imagerie bidimensionnelle (de 100x100 microns). La résolution pourrait être améliorée en utilisant une sonde dont les transducteurs sont de taille égale à une longueur d'onde (la taille de 300 μ m actuelle, représente presque deux fois la longueur d'onde $\lambda=170$ μ m à 9 MHz) ou en augmentant la fréquence jusqu'à 15 MHz. Ces améliorations technologiques dépendent de la capacité des constructeurs à élaborer une sonde avec de si petits éléments: le risque de surchauffe de tant d'éléments sur une si petite surface doit notamment être pris en compte.

De plus, il a été indispensable de réaliser avant les séances d'acquisition une craniotomie chez les rats imagés, ce qui rend la technique particulièrement invasive. L'imagerie transcrânienne 3D serait éventuellement imaginable à l'aide d'injection intraveineuse d'agents de contraste (de type micro-bulles).

Enfin, bien que l'un des grands avantages de l'imagerie 2D fUS soit que les sondes sont suffisamment petites pour être utilisées chez l'animal éveillé libre de ses mouvements (Chapitre 2 de ce manuscrit ou (Sieu et al. 2015)) c'est à ce jour impossible avec ce dispositif. En raison du grand nombre de câbles et du poids de la sonde matricielle, il n'est pas possible de travailler sur un animal se déplaçant librement directement dans ces conditions, mais nous pouvons tout à fait imaginer utiliser un système à tête fixée pour l'imagerie du rongeur éveillé.

3.4.2. Perspectives

Les récentes démonstrations cliniques de la technique 2D fUS pourraient également bénéficier directement de notre stratégie 4D à la fois de manière non-invasive chez les nouveau-nés humains par la fenêtre transfontanellaire (Demene et al. 2017) et chez les adultes pendant la chirurgie (Imbault et al. 2017). L'imagerie clinique en 4D permettrait alors de fournir rapidement des données fonctionnelles complètes sans qu'il soit nécessaire de placer la sonde dans un plan particulier avant l'acquisition.

Pour la recherche fondamentale, la mise en place de dispositifs d'imagerie combinée fUS 4D et électrophysiologie (ou optogénétique) pourrait fortement étendre les capacités d'exploration du cerveau entier grâce à l'acquisition multimodales en volume.

3.4.3. Ouverture vers le chapitre suivant

L'imagerie Doppler demeure un témoin indirect de l'activité neuronale via le couplage neurovasculaire. Et sa résolution temporelle sera toujours limitée par le temps d'intégration en Doppler puissance.

Les ultrasons peuvent-ils mesurer d'autres manifestations de l'activité neuronale, indépendantes du couplage neurovasculaire, à des échelles temporelles différentes?

Pour répondre à cette question, nous nous sommes intéressés aux propriétés biomécaniques de cerveau. En effet, dès le début des années 1950 (Hill 1950), une théorie sur l'influence de l'activité neuronale sur des variations du volume cérébral et de son

élasticité émerge. Par la suite, de nombreux travaux ont démontré des changements fonctionnels de la structure cérébrale.

Le prochain chapitre explore une nouvelle méthode ultrasonore pour mesurer l'activité fonctionnelle basée sur l'élastographie afin d'exploiter les autres échelles spatio-temporelles des ultrasons pour l'étude de la dynamique du cerveau.

3.5. Bibliographie du Chapitre 3

- Ayata C, Lauritzen M (2015) Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiological Reviews* 95:953–993. doi: 10.1152/physrev.00027.2014
- Bowden DM, Song E, Kosheleva J, Dubach MF (2012) NeuroNames: An Ontology for the BrainInfo Portal to Neuroscience on the Web. *Neuroinform* 10:97–114. doi: 10.1007/s12021-011-9128-8
- Cain SM, Bohnet B, LeDue J, et al (2017) In vivo imaging reveals that pregabalin inhibits cortical spreading depression and propagation to subcortical brain structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:2401–2406. doi: 10.1073/pnas.1614447114
- Correia M, Provost J, Tanter M, Pernot M (2016) 4D ultrafast ultrasound flow imaging: In vivo quantification of arterial volumetric flow rate in a single heartbeat. *Physics in Medicine and Biology* 61:L48–L61. doi: 10.1088/0031-9155/61/23/L48
- De Luca M, Beckmann CF, De Stefano N, et al (2006) fMRI resting state networks define distinct modes of long-distance interactions in the human brain. *NeuroImage* 29:1359–1367. doi: 10.1016/j.neuroimage.2005.08.035
- Demene C, Baranger J, Bernal M, et al (2017) Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns. *Science translational medicine* 9:eaah6756
- Demené C, Tiran E, Sieu L-A, et al (2016) 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography. *NeuroImage* 127:472–483. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.11.014

- Dizeux A, Gesnik M, Ahnine H, et al (2019) Functional ultrasound imaging of the brain reveals propagation of task-related brain activity in behaving primates. *Nature Communications* 10:. doi: 10.1038/s41467-019-09349-w
- Gesnik M, Blaize K, Deffieux T, et al (2017) 3D functional ultrasound imaging of the cerebral visual system in rodents. *NeuroImage* 149:267–274. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.01.071
- Hernandez V, Antonio P, Sumiyoshi A, et al (2011) An in vivo MRI Template Set for Morphometry, Tissue Segmentation, and fMRI Localization in Rats. *Front Neuroinform* 5:. doi: 10.3389/fninf.2011.00026
- Hill DK (1950) The volume change resulting from stimulation of a giant nerve fibre. *The Journal of Physiology* 111:304–327. doi: 10.1113/jphysiol.1950.sp004481
- Hsu L-M, Liang X, Gu H, et al (2016) Constituents and functional implications of the rat default mode network. *PNAS* 113:E4541–E4547. doi: 10.1073/pnas.1601485113
- Imbault M (2017) Quantitative and functional ultrafast ultrasound imaging of the human brain. Thesis, Sorbonne Paris Cité
- Imbault M, Chauvet D, Gennisson J-L, et al (2017) Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity. *Scientific Reports* 7:. doi: 10.1038/s41598-017-06474-8
- Osmanski B-F, Pezet S, Ricobaraza A, et al (2014) Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nature Communications* 5:. doi: 10.1038/ncomms6023
- Papadacci C, Finel V, Provost J, et al (2017) Imaging the dynamics of cardiac fiber orientation in vivo using 3D Ultrasound Backscatter Tensor Imaging. *Scientific Reports* 7:. doi: 10.1038/s41598-017-00946-7
- Papp EA, Leergaard TB, Calabrese E, et al (2014) Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain. *NeuroImage* 97:374–386. doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.04.001
- Paxinos G, Watson C (1982) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier
- Provost J, Papadacci C, Arango JE, et al (2014) 3D ultrafast ultrasound imaging in vivo. *Phys Med Biol* 59:L1. doi: 10.1088/0031-9155/59/19/L1

- Provost J, Papadacci C, Demene C, et al (2015) 3-D ultrafast doppler imaging applied to the noninvasive mapping of blood vessels in Vivo. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 62:1467–1472. doi: 10.1109/TUFFC.2015.007032
- Rabut C, Correia M, Finel V, et al (2019) 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents. *Nat Methods* In press:
- Rau R, Scheffer W, Belau M, et al (2017) 3D functional ultrasound imaging of the visual system in the pigeon brain. In: 2017 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS). pp 1–1
- Sieu L-A, Bergel A, Tiran E, et al (2015) EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats. *Nature Methods* 12:831–834. doi: 10.1038/nmeth.3506
- Tiran E, Deffieux T, Correia M, et al (2015) Multiplane wave imaging increases signal-to-noise ratio in ultrafast ultrasound imaging. *Physics in Medicine and Biology* 60:8549–8566. doi: 10.1088/0031-9155/60/21/8549
- van den Heuvel MP, Hulshoff Pol HE (2010) Exploring the brain network: A review on resting-state fMRI functional connectivity. *European Neuropsychopharmacology* 20:519–534. doi: 10.1016/j.euroneuro.2010.03.008

4.1. Elastographie et propriétés mécaniques du cerveau

4.1.1. Etat de l'art de l'élastographie

4.1.1.1. La palpation

La palpation est une pratique médicale ancestrale qui consiste à sentir la dureté des tissus d'un patient avec les mains du praticien. La palpation manuelle remonte au moins à 1500 avant J.-C. Les plus anciens traités médicaux égyptiens écrits sur des papyrus donnaient déjà des instructions sur le diagnostic avec palpation. Dans la Grèce antique, de nombreuses formes de diagnostic utilisant la palpation: des seins, des intestins, de l'utérus, et des tumeurs étaient pratiquées. Dans le monde occidental moderne, la palpation est devenue une méthode de diagnostic reconnue depuis les années 1930. Depuis, la pratique de la palpation s'est répandue et est considérée comme une méthode efficace de détection des tumeurs et d'autres pathologies.

Ainsi, de nos jours, les médecins glanent beaucoup d'informations utiles de la palpation manuelle. Essentiellement, ce qu'ils détectent est l'élasticité et les différences dans les élasticités des différents tissus, senti par le déplacement des tissus résultant de la pression appliquée. La pression appliquée peut être interne, en raison du sang circulant le long d'une artère (le pouls), ou externe, par la main de l'examineur. La palpation manuelle, bien qu'elle soit indispensable à l'examen médical de routine, a ses limites.

Elle est limitée aux tissus accessibles à la main du médecin, elle est déformée par tout tissu intervenant, et elle est qualitative mais pas quantitative.

L'élastographie qui mesure la rigidité des tissus par imagerie médicale, vise à relever ces défis.

4.1.1.2. Notion d'élasticité

L'élasticité d'un matériau décrit sa capacité à augmenter sa taille et sa forme d'origine après avoir été soumise à une force de déformation. Les fluides peuvent changer de forme, mais pas de volume. Il n'y a donc pas d'élasticité fluide. Les solides eux sont rigides, ils admettent donc une élasticité de cisaillement: ce qui veut dire qu'ils peuvent changer

de forme et de volume. Le changement de taille ou de forme est appelé déformation et s'exprime sous forme de rapport (par exemple, le rapport de changement de longueur). La déformation d'un solide est produite par un système de forces agissant sur une zone du solide: c'est la contrainte. Plusieurs constantes intrinsèques aux propriétés d'un solide permettent d'en décrire l'élasticité:

Pour un solide isotrope homogène, le rapport contrainte/déformation est une constante appelée **module d'élasticité d'Young E** tel que:

$$4. \quad E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

avec : σ : la contrainte appliquée au solide

ϵ : la déformation produite avec $\epsilon = \frac{\Delta L}{L}$

où : L = longueur initiale du solide

ΔL = déplacement sous la contrainte

Ainsi, la palpation en médecine qui évalue la rigidité des tissus estime qualitativement le module d'Young. Plus le tissu sera rigide, moins la déformation produite sera importante et plus le module d'Young sera élevé.

Le **coefficient de Poisson γ** qui exprime la déformation du solide dans la direction opposée à la contrainte avec :

$$5. \quad \gamma = \frac{\Delta L_{\perp}}{\Delta L_{//}}$$

où : ΔL_{\perp} = allongement transversal relatif

$\Delta L_{//}$ = allongement longitudinal relatif

qui s'exprime également en fonction de E par: $\gamma = \frac{E}{2\mu} - 1$

γ vaut 0.5 pour les liquides incompressibles et est supérieur à 0.49 dans les tissus biologiques (principalement composés d'eau) alors considérés comme quasi-incompressibles.

Le **module de cisaillement** μ , qui caractérise la déformation transverse (de cisaillement) du solide par :

$$6. \quad \mu = \frac{F \Delta x}{S l}$$

voir Figure 50 pour définition de F , S , Δx et l

Le module de cisaillement est relié à E et γ par :

$$7. \quad \mu = \frac{E}{2.(1+\gamma)}$$

On constate alors que dans un milieu quasi-incompressible où l'approximation $\gamma = 0.5$ est faite, on a :

$$8. \quad \mu \approx \frac{E}{3}$$

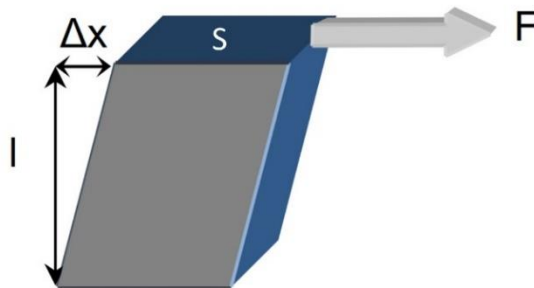


Figure 50. Déformation transverse x d'un solide de hauteur l par une force F sur la surface S du solide

Le **module de compression** K , qui définit sa variation relative de volume sous une contrainte homogène sur toutes les surfaces.

On a : $K = -\frac{1}{V} \frac{dV}{dP}$ avec $V =$ volume du solide
 $P =$ pression exercée

On peut également le relier à E et γ par:

$$9. \quad K = \frac{E}{3.(1-2.\gamma)}$$

Dans un milieu quasi-incompressible, on a :

$$10. \quad K \gg 1$$

Le principe de l'élastographie repose sur la mesure quantitative du module d'Young E . Accéder au module d'Young d'un tissu nécessite donc: 1 : l'application d'une contrainte puis, 2: la mesure des paramètres de la déformation et donc du module d'Young.

La contrainte appliquée aux tissus peut être **statique** ou **dynamique**. Ces deux régimes définissent deux domaines de l'élastographie et différentes modalités en découlent.

4.1.1.3. Elastographie statique

L'élastographie statique se base sur l'application d'une contrainte continue au milieu. La mesure se fait alors sur le déplacement des tissus engendré entre la position au repos et la position sous contrainte. La mesure du déplacement donne accès au calcul du paramètre de déformation directement relié au module d'Young E par l'équation (4). En pratique, un opérateur applique une contrainte manuellement, et le déplacement est évalué en corrélant les images spatiales initiale et finale. On peut alors obtenir des cartes paramétriques permettant de différencier les structures "dures" des structures "molles": les structure molles se déplacent et se déforment tandis que les structures rigides se déplacent mais ne se déforment pas (voir Figure 51). C'est une technique non quantitative et opérateur-dépendante.

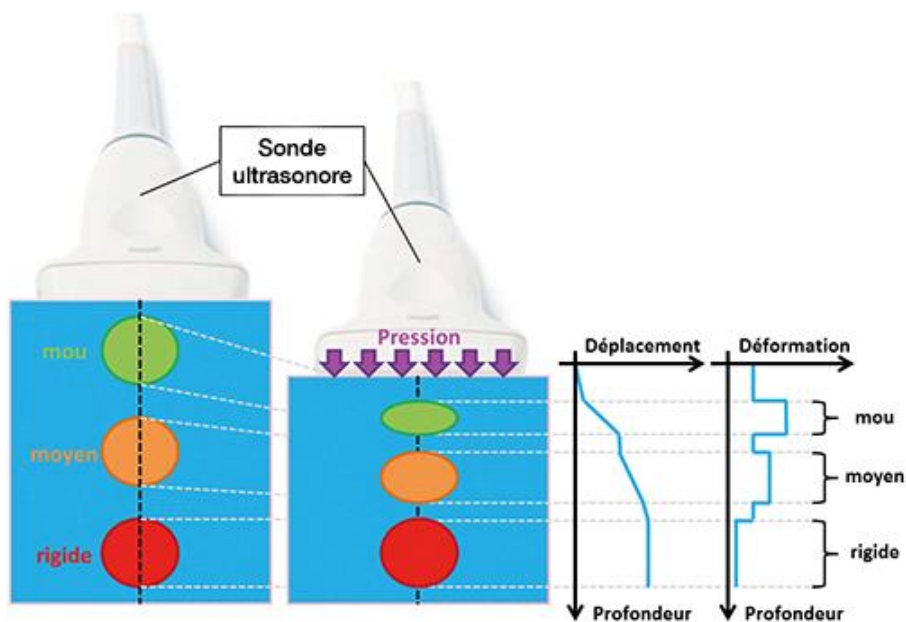


Figure 51. Principe de l'élastographie ultrasonore statique: une contrainte continue est appliquée au milieu. Les structure molles vont se déplacer et se déformer, tandis que les structures plus rigides conserveront leur forme et se déplaceront peu. (issue de (Bertrand-Grenier 2015))

Des échographes commerciaux proposent toutefois cette modalité au vue de la simplicité de la mise en place de la mesure. Les échographes effectuent les calculs de déplacement par corrélation des images B-mode avant et après l'application d'une pression. Cela permet une estimation rapide et indolore de l'élasticité du milieu. Au-delà du facteur uniquement qualitatif de la mesure, la technique est limitée aux organes superficiels: en clinique, elle s'effectue principalement pour le sein. De plus, sous compression, les objets peuvent se déplacer dans ou hors de l'image, causant des problèmes d'interprétation.

4.1.1.4. Élastographie dynamique

Dans les méthodes dynamiques, une force variable dans le temps est appliquée au tissu: elle peut être une force courte mécanique transitoire, ou une force oscillatoire avec une fréquence fixe. La déformation subie va se propager sous forme d'une onde élastique. Dans les solides, deux modes d'ondes planes élastiques existent:

- **le mode longitudinal:** lorsque l'onde plane se propage parallèlement à la force appliquée. L'onde associée est appelée onde de compression (onde P en sismologie: Figure 52.a) et sa vitesse est donnée par :

$$11. \quad c_P = \sqrt{\frac{K}{\rho}}$$

- **le mode transverse:** lorsque l'onde plane se propage perpendiculairement à la force. L'onde associée est appelée onde de cisaillement (onde S en sismologie: Figure 52.b) et sa vitesse s'écrit:

$$12. \quad c_S = \sqrt{\frac{\mu}{\rho}}$$

où : ρ = est la densité volumique du milieu et est égale à 1000 kg/m^3 dans les tissus biologiques (principalement composés d'eau)

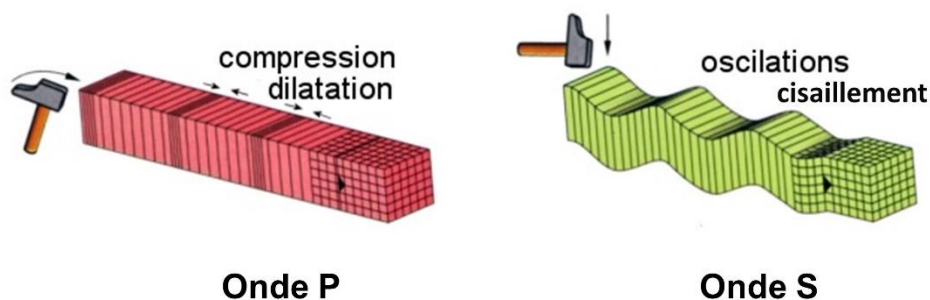


Figure 52. Onde de Compression (ou onde P) et Onde de Cisaillement (ou onde S)

D'après les équations (8) et (10), la vitesse de compression c_P est très supérieure à la vitesse de cisaillement c_S . Typiquement, c_P est de l'ordre de 1500 m/s et c_S de l'ordre de 10 m/s. Les ondes de compression sont donc les ondes acoustiques se déplaçant dans le milieu solide.

En élastographie dynamique (sauf en élastographie ARFI, voir plus bas), on mesure la vitesse de propagation des ondes de cisaillement, ce qui permet de remonter à la valeur du module d'Young $E=3.\mu$ (d'après l'équation 8). Les techniques d'élastographie dynamique peuvent produire des cartes d'élasticité quantitatives. L'utilisation des ondes de cisaillement, nécessite cependant un système plus complexe, capable de générer l'onde de cisaillement (vibrateur mécanique ou pression de radiation ultrasonore) et d'imager des petits déplacements induits par l'onde de cisaillement (IRM, ou ultrasons).

De façon non exhaustive, voici les principales méthodes d'élastographie dynamique:

ARFI

L'élastographie par impulsions de force de rayonnement acoustique (ARFI: Acoustic Radiation Force Imaging) utilise l'échographie pour créer une carte **qualitative 2-D** de la rigidité des tissus. L'application d'une force de radiation ultrasonore selon une ligne de focalisation **déplace légèrement le tissu** au foyer du faisceau d'ultrasons focalisés (Figure 53). Le déplacement du tissu et sa relaxation le long de l'axe du faisceau en reflète la rigidité; un tissu mou se déplacera plus facilement qu'un tissu plus rigide. ARFI permet d'obtenir une valeur de rigidité qualitative le long de l'axe du faisceau acoustique. En focalisant le faisceau dans tous les pixels du plan étudié, une carte de la rigidité des tissus peut être construite. Cette technique souffre de l'information uniquement qualitative de la dureté des tissus et du temps du balayage du foyer ultrasonore.

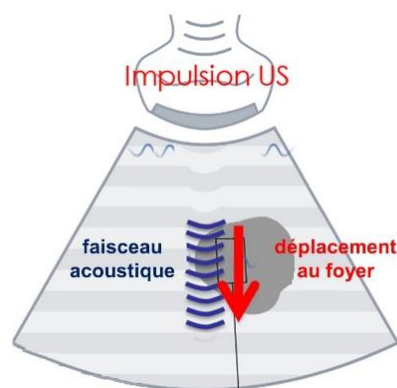


Figure 53. Principe de l'élastographie ARFI. Un faisceau acoustique déplace le tissu au foyer du faisceau. La rigidité quantitative du tissu sera caractérisée par ce déplacement et la relaxation du tissu

Elastographie Impulsionnelle transitoire

L'élastographie impulsionnelle transitoire consiste à générer une impulsion transitoire mécanique (petit choc) sur le milieu, puis à enregistrer l'onde de cisaillement qui s'y propage en utilisant un transducteur à ultrasons. Le déplacement produit par l'onde de cisaillement peut être évalué en corrélant spatialement les images du speckle échographique acquises à cadence rapide. La vitesse de l'onde de cisaillement permet ensuite de remonter au module de Young par l'équation (8). Un tir permet ainsi d'obtenir une valeur unique de dureté sur une ligne (ou un plan dans le cas de l'élastographie impulsionnelle 2D) de tissu, pour une fenêtre de profondeur donnée (entre 25 et 65 mm) en regard de la sonde.

La technique, développée au Laboratoire Ondes et Acoustique (laboratoire à l'origine du Laboratoire Physique pour la Médecine), a d'abord été implémentée en une dimension (Figure 54.a) au cours de la thèse de Stefan Catheline puis a été étendue en deux dimensions au cours de la thèse de Laurent Sandrin avec le développement de l'imagerie ultrarapide par ondes planes (Figure 54.b).

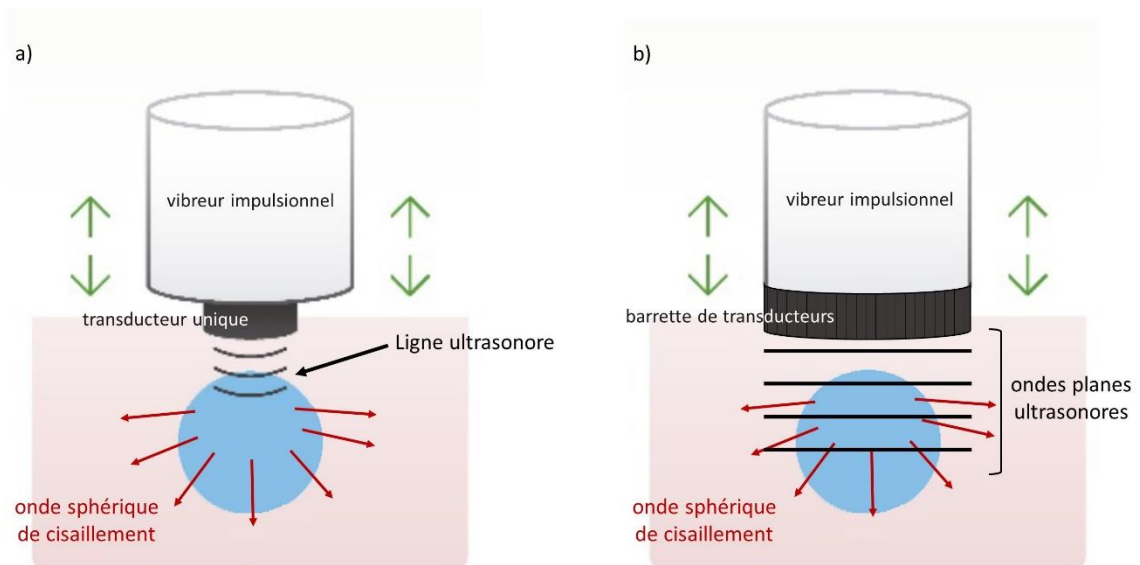


Figure 54. Principe de l'élastographie impulsionnelle transitoire a) en 1D et b) en 2D avec l'utilisation de l'imagerie par ondes planes

Depuis 2001, la société **Echosens** commercialise des scanners d'élastographie impulsionnelle 1D, sous le nom de *FibroScan*. Ce dispositif permet de quantifier la fibrose hépatique en donnant un score global d'élasticité dans une fenêtre de profondeur donnée (de 20 à 60 mm). L'élastographie impulsionnelle 1D est une méthode non invasive et est

devenue une technique de référence dans l'évaluation des maladies chroniques du foie: elle permet une réduction de plus de 50% des biopsies du foie. Les avantages de cette technique sont sa rapidité, sa bonne reproductibilité non opérateur-dépendante et ses performances diagnostiques reconnues.

Des premiers résultats *in vivo* en élastographie impulsionnelle 2D de 2003 furent encourageants (Bercoff et al. 2003) mais le dispositif encombrant, lourd et difficile à utiliser dans la pratique n'a pas permis un développement de la technique pour l'application clinique depuis.

Elastographie supersonique par ondes de cisaillement

En 2004, Bercoff et al. proposent de combiner l'avantage de l'élastographie impulsionnelle 2D (imagerie ultra-rapide par ondes planes des ondes de cisaillement) avec la palpation à distance induite par force de rayonnement acoustique (Bercoff et al. 2004). Cette technique appelée **élastographie supersonique par ondes de cisaillement (Supersonic Shear Imaging: SSI)** a résolu le problème de l'utilisation de vibreurs 2D lourds et encombrants, tout en profitant de la vitesse d'imagerie ultra-rapide par ondes planes.

Comme toutes les techniques d'élastographie décrites précédemment, l'élastographie SSI se déroule en deux étapes: la création d'une déformation dans le milieu, et la mesure de cette déformation qui donne accès à la valeur du module d'Young. Comme avec l'ARFI, la pression de radiation ultrasonore est le phénomène physique utilisé pour exciter le milieu, en générant des ondes de cisaillement au sein même des tissus examinés à partir du point focal. Fortement atténuées dans les tissus biologiques (visco-élastiques)(Figure 55.a), les ondes de cisaillement sont ici amplifiées par un phénomène d'**interférences constructives** le long d'un **cône de Mach**. Cela est possible en procédant à des focalisations successives du faisceau ultrasonore avec des profondeurs progressivement croissantes (Figure 55.b), à condition que la vitesse de déplacement du point focal (où sont produites les ondes de cisaillement qui nous intéressent) soit supérieure à la célérité de ces dernières.

Les déplacements tissulaires provoqués par les ondes de cisaillement sont imagés grâce à l'émission d'ondes planes à une cadence très élevée (Figure 55.c). Une seule acquisition admet typiquement une cadence de 5000 images/s à 30.000 images/s dans le cas d'organes tels que les artères périphériques ou l'œil. Il n'y a donc pas besoin de répéter l'acquisition plusieurs fois par stroboscopie pour acquérir l'ensemble du champ de vitesse. Cela permet non seulement de faire des images en temps réel, ce qui facilite l'examen mais également de moyennner les images acquises très rapidement pour en augmenter la qualité.

Cette technique a été implémentée sur une plateforme d'imagerie échographique, l'AixPlover (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) et son intérêt clinique ainsi que sa reproductibilité et sa répétabilité ont été démontrés sur plusieurs organes du corps, en particulier le sein (Tanter et al. 2008; Cosgrove et al. 2012), la thyroïde (Lim et al. 2012), le foie (Cassinotto et al. 2014) et la prostate (Sang et al. 2017)

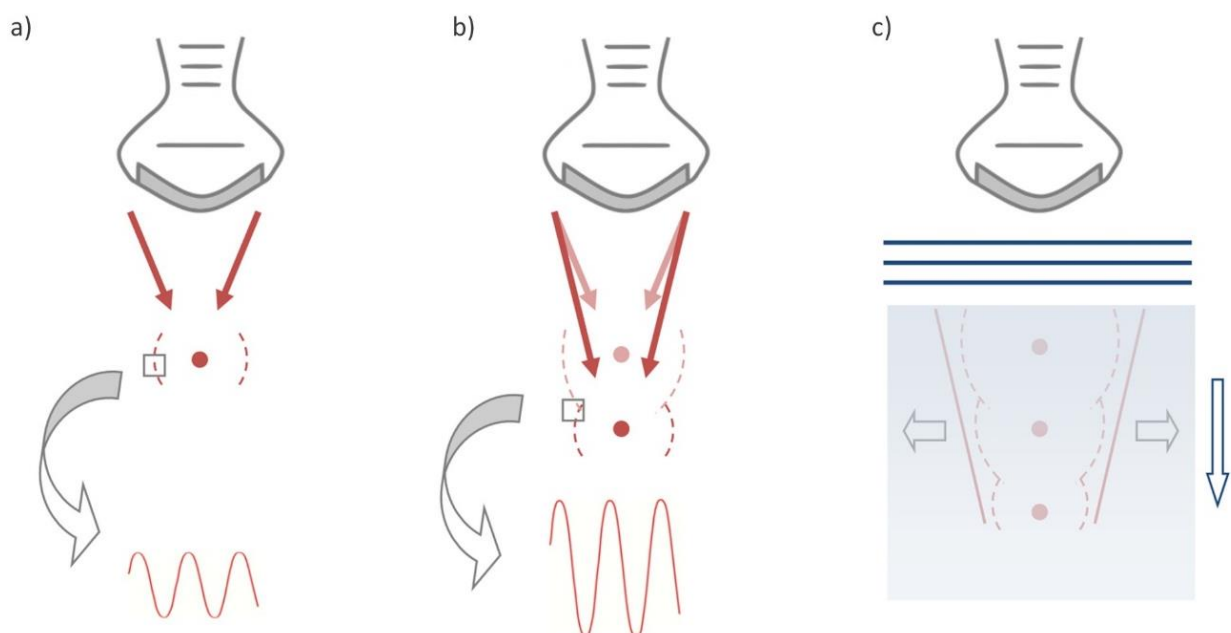


Figure 55. Principe de l'élastographie supersonique par ondes de cisaillement a) La focalisation à une profondeur donnée génère des ondes de cisaillement de faibles amplitudes de part-et-d'autre du point focal, grâce à la pression de radiation acoustique. b) Focalisations successives à des profondeurs croissantes: interférences constructives des ondes de cisaillement le long d'un cône de Mach qui engendrent un gain en amplitude sur les deux fronts d'ondes c) Imagerie ultrarapide ultrasonore: suivi des déplacements provoqués par les ondes de cisaillement sur les deux fronts d'ondes, via l'émission d'ondes planes ultrasonores à une cadence très élevée

Elastographie par résonance magnétique

En élastographie par résonance magnétique (ERM), un vibreur mécanique est utilisé pour créer des ondes de cisaillement. Les séquences de mesure d'élastographie par résonance magnétique exigent ensuite la synchronisation entre la vibration mécanique et la mesure de gradients magnétiques, dits de sensibilisation au mouvement (GSM), oscillants à la même fréquence (voir Figure 56). Théoriquement, cette méthode permet de détecter des déplacements mécaniques inférieurs à 100 nm (Muthupillai et al. 1995).

L'ERM permet l'évaluation quantitative non invasive de l'élasticité des tissus (taille d'un voxel $0.5 \times 0.5 \times 2 \text{ mm}^3$) et permet notamment la cartographie en trois dimensions des propriétés viscoélastiques du milieu. Le coût élevé et la disponibilité limitée d'appareils capables d'effectuer les mesures de dureté limitent son adoption en clinique. Cependant, elle est régulièrement utilisée en recherche préclinique, et notamment pour l'étude des propriétés mécaniques du cerveau chez le petit animal. Elle admet notamment le net avantage de pouvoir s'effectuer en transcrânien, de façon totalement non-invasive: les vibrations sont alors appliquées à tout le support sur lequel le sujet étudié est maintenu (table d'examen chez l'homme, cadre stéréotaxique pour le petit animal).

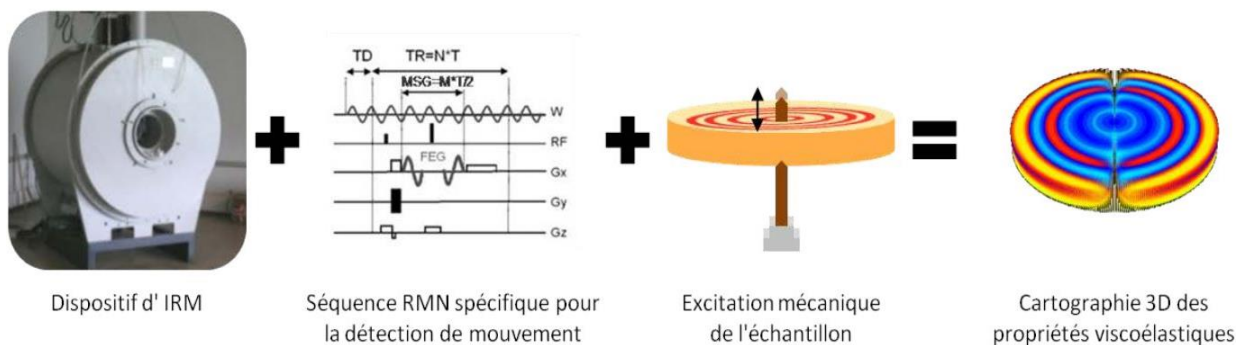


Figure 56. Principe de l'élastographie par résonance magnétique. Une séquence de d'imagerie par résonance magnétique est synchronisée à la séquence de vibration mécanique des tissus à imager pour permettre une cartographie d'élasticité de tout le milieu

4.1.2. Elasticité du cerveau

Plusieurs études chez l'homme en élastographie par résonance magnétique ont rapporté des différences physiologiques entre régions distinctes du cerveau (Hiscox et al. 2016). De même, des modifications des paramètres viscoélastiques dans diverses maladies (tumeur, hydrocéphalie et maladie neurodégénérative) ont été mesurées en ERM (Klein et al. 2014; Majumdar and Klatt 2017) et en élastographie SSI (Chan et al. 2014; Chauvet et al. 2015). Ces preuves de concept ont motivé l'application de l'élastographie chez les rongeurs en tant qu'étape cruciale pour l'identification des processus physiologiques et physiopathologiques sous-jacents aux modifications de l'élasticité cérébrale. À ce jour, l'élastographie par résonance magnétique a nettement contribué à fournir les caractérisations mécaniques *in vivo* de cerveaux de rongeurs sains et pathologiques même si des résultats inégaux peuvent être mis en évidence (voir Figure 57.b).

4.1.2.1. Elasticité cérébrale régionale

Depuis une dizaine d'année, l'élasticité cérébrale a été largement étudiée en ERM chez le rongeur. Cependant, les valeurs rapportées dans la littérature des paramètres viscoélastiques **varient considérablement**. Chez le rat par exemple, la valeur du module de cisaillement μ dans le cortex varie de 4 à 10.5 kPa d'une publication (Vappou et al. 2008) à l'autre (Munder et al. 2018). Ce manque de cohérence peut être attribué en premier lieu à la large gamme de fréquence de vibrations utilisées entre différents protocoles: selon le modèle de loi de puissance, le module de cisaillement augmente avec la fréquence de vibrations utilisée (Figure 57.a). D'autres différences méthodologiques dans la configuration de l'imagerie MRE, la méthode de reconstruction ou les filtres peuvent contribuer à ces divergences. Même si l'ERM quantitative de référence n'a pas encore été réalisée, plusieurs rapports comparant les structures cérébrales ont montré des tendances communes (Figure 57.b): il a été constaté chez les rongeurs que l'hippocampe était plus rigide que le thalamus, mais plus mou que le cortex (Boulet et al. 2011; Chatelin et al. 2016) ce qui correspond à des observations chez l'homme (Hiscox et al. 2016). Le cervelet s'est également révélé plus mou que le cerveau chez la souris (Millward et al. 2015) et dans plusieurs études sur l'homme (Hiscox et al. 2016). Enfin, le corps calleux a été identifié comme la zone la plus rigide du cerveau (Schregel et al. 2012), ce qui renforce également des observations faites chez l'Homme (Arani et al. 2015).

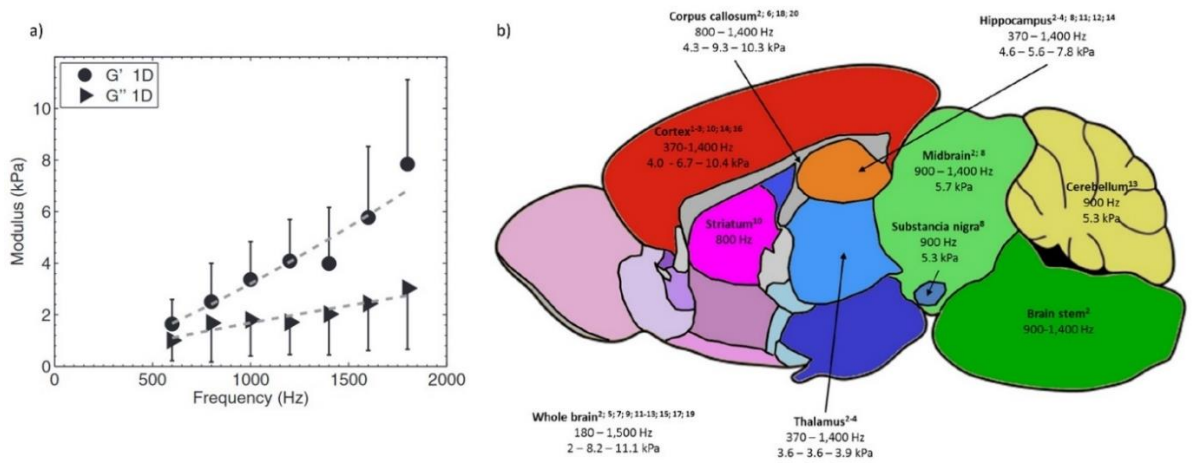


Figure 57. a) Variation mesurée en ERM du module de cisailment complexe $\mu(i,\omega)=G'(w)+i.G''(w)$ en fonction de la fréquence de vibration (Clayton et al. 2011) b) Gamme de valeurs du module de cisailment dans les différentes régions cérébrales du rat obtenues dans la littérature en ERM (Bigot et al. 2018)

A notre connaissance, une seule étude de 2011 en élastographie ultrasonore SSI, a étudié les caractéristiques d'élasticité du cerveau de rongeur (Macé et al. 2010). Ces premiers résultats ont confirmé les tendances données en ERM, à savoir que les hippocampes semblent plus mous que le cortex et le reste du cerveau et que le corps calleux tend à être une région plus rigide (Figure 58). De nombreuses études sur d'anisotropie en imagerie par tenseur de diffusion ont révélé que le corps calleux est une région très anisotrope du cerveau (Pfefferbaum and Sullivan 2003; Hermoye et al. 2006): cette anisotropie structurale pourrait permettre d'expliquer les propriétés biomécaniques différentes observées.

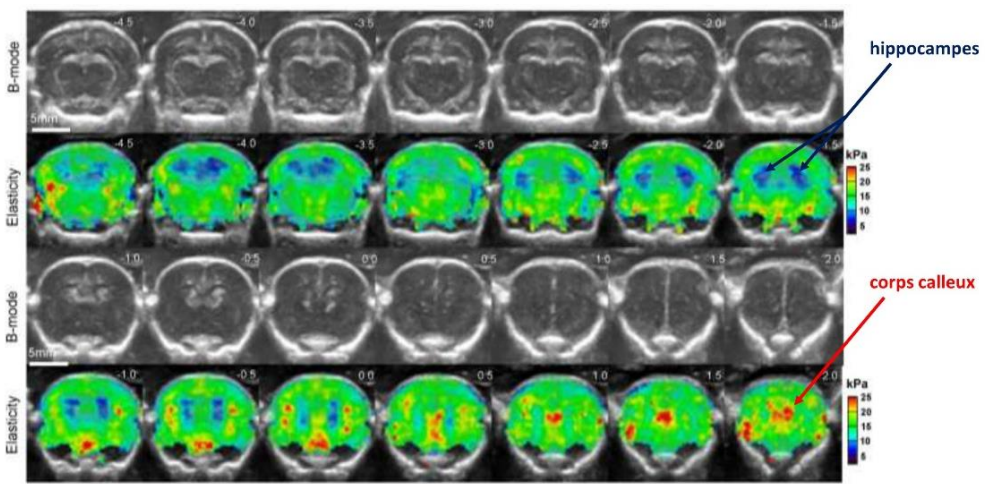


Figure 58. Cartes cérébrales coronales B-mode et d'élasticité moyennées sur quatre rats obtenues par élastographie ultrasonore SSI. On constate que les hippocampes admettent un module de cisailment plus faible que le reste du cerveau et qu'à l'inverse, le corps calleux semble plus dur (issue de (Macé et al. 2010)).

4.1.2.2. Élasticité pathologique

Plusieurs pathologies semblent affecter les propriétés biomécaniques du cerveau selon de nombreuses études en ERM. Des modèles de lésion cérébrale traumatique chez le rat présentent une nette diminution de la dureté dans les zones lésées (Boulet et al. 2011, 2013). Les tumeurs cérébrales sont mesurées dans de nombreuses études comme étant plus molles que le reste du cerveau (Jamin et al. 2015; Feng et al. 2016; Schregel et al. 2018). Une baisse de la rigidité est également mesurée dans les cerveaux de modèles de souris de sclérose en plaque (Riek et al. 2012), et dans l'hémisphère lésé de souris ayant été sujets à un accident vasculaire cérébral (Freimann et al. 2013).

Il a été montré que des mesures d'élastographie ultrasonore par ondes de cisaillement (SSI) chez le sujet trépané durant une chirurgie permettaient de révéler une augmentation de la dureté d'une lésion épileptique (Figure 59.a) alors que celle-ci était invisible à l'IRM ou en imagerie échographique B-mode standard (Chan et al. 2014). De même, des mesures d'élasticité ultrasonores peropératoires chez le patient à crâne ouvert ont permis de distinguer significativement des tumeurs cérébrales dans le tissu cortical et de catégoriser le grade des gliomes en fonction de leur dureté et confirment que les lésions cérébrales malignes sont significativement plus molles que les lésions cérébrales bénignes (Figure 59.b)(Chauvet et al. 2015).

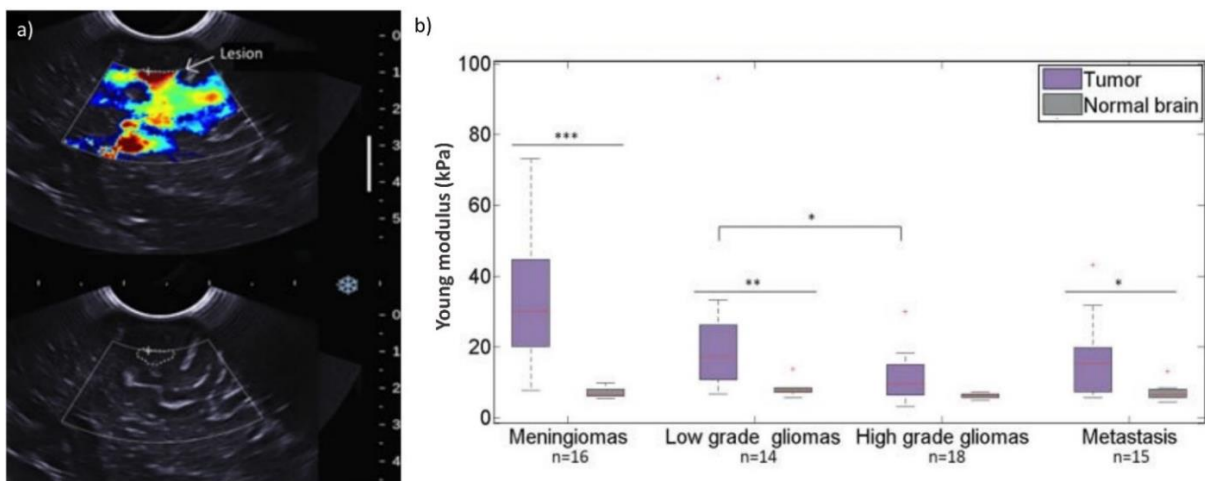


Figure 59. a) Carte d'élasticité obtenue en ultrasons SSI (en haut) et image B-mode de la même région (en bas). La zone de plus rigide (flèche) était à environ 1,5 cm de la surface du cerveau. L'image en B-mode ne montre aucune anomalie (Chan et al. 2014) b) Modules de Young de quatre types tumeurs cérébrales. Les lésions bénignes (Ménigiomes et gliomes de bas grade) sont plus dures que les lésions malignes (lésions métastatiques et gliomes de haut grade) (Chauvet et al. 2015).

4.1.3. Hypothèse sur la modification des propriétés mécaniques lors de l'activation fonctionnelle

4.1.3.1. Gonflement des cellules neuronales

Depuis le début des années 1950 (Hill 1950) des modifications mécaniques au niveau des cellules neuronales lors d'une activation sont mesurées, et ceci à une échelle de temps bien plus rapide que le couplage neurovasculaire (Iwasa et al. 1980). Un étirement des fibres nerveuses pendant le potentiel d'action a en effet été observé dans Iwasa et al. à une échelle de temps d'environ 5 ms: les images d'un axone d'un neurone en culture démontrent un gonflement lors d'une stimulation électrique provoquée par un flux transmembranaire d'ions et d'eau; l'axone retrouvant son volume initial après cessation du potentiel d'action. Ces observations sont appuyées par une autre étude mettant en évidence le gonflement de la moelle épinière lors d'excitations électriques provoquées (Tasaki and Byrne 1983)(Figure 60). En 1996, une expérience ex-vivo sur cerveau de rat en optique intrinsèque (Holthoff and Witte 1996) montre en effet un changement du volume des cellules corticales suivant des stimulations électriques.

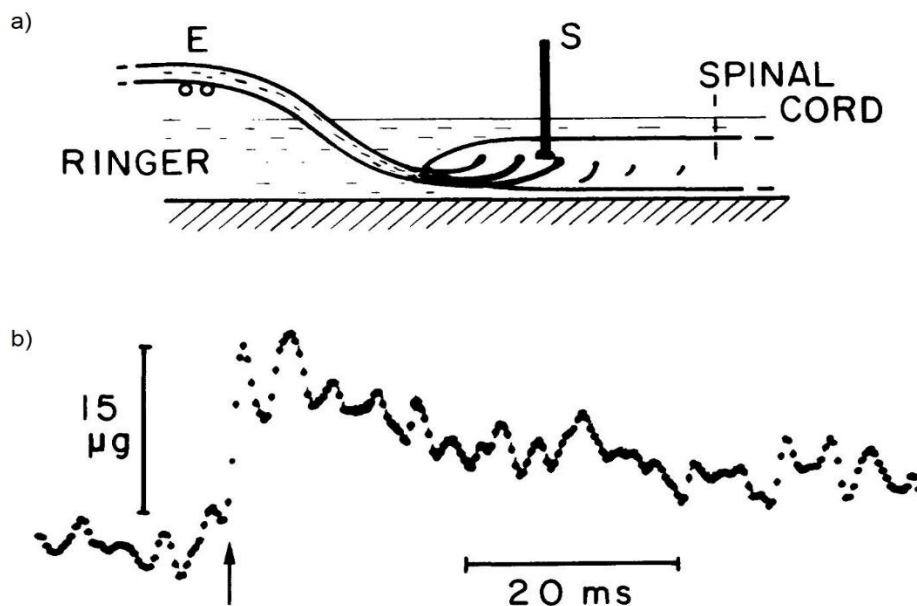


Figure 60. Expérience de 1983 de Tasaki et Byrne (Tasaki and Byrne 1983) mettant en évidence le gonflement de la moelle épinière suivant une expérience électrique. a) Schéma de l'expérience où E représente l'électrode de stimulation et S le stylographe reportant le changement de volume. b) Enregistrement de l'augmentation du volume de la moelle épinière produite par une volée d'impulsions afférentes. La flèche indique la livraison d'un choc électrique.

Ces résultats sont confirmés par d'autres études qui montrent une diminution de l'espace extra-cellulaire dans le cerveau lors de l'augmentation de l'activité neuronale (Svoboda and Syková 1991; Rusakov and Fine 2003; Nicholson and Hrabětová 2017) , ce qui est cohérent avec l'idée d'un gonflement des cellules neuronales (qui restreint donc l'espace entre les cellules)(Figure 61).

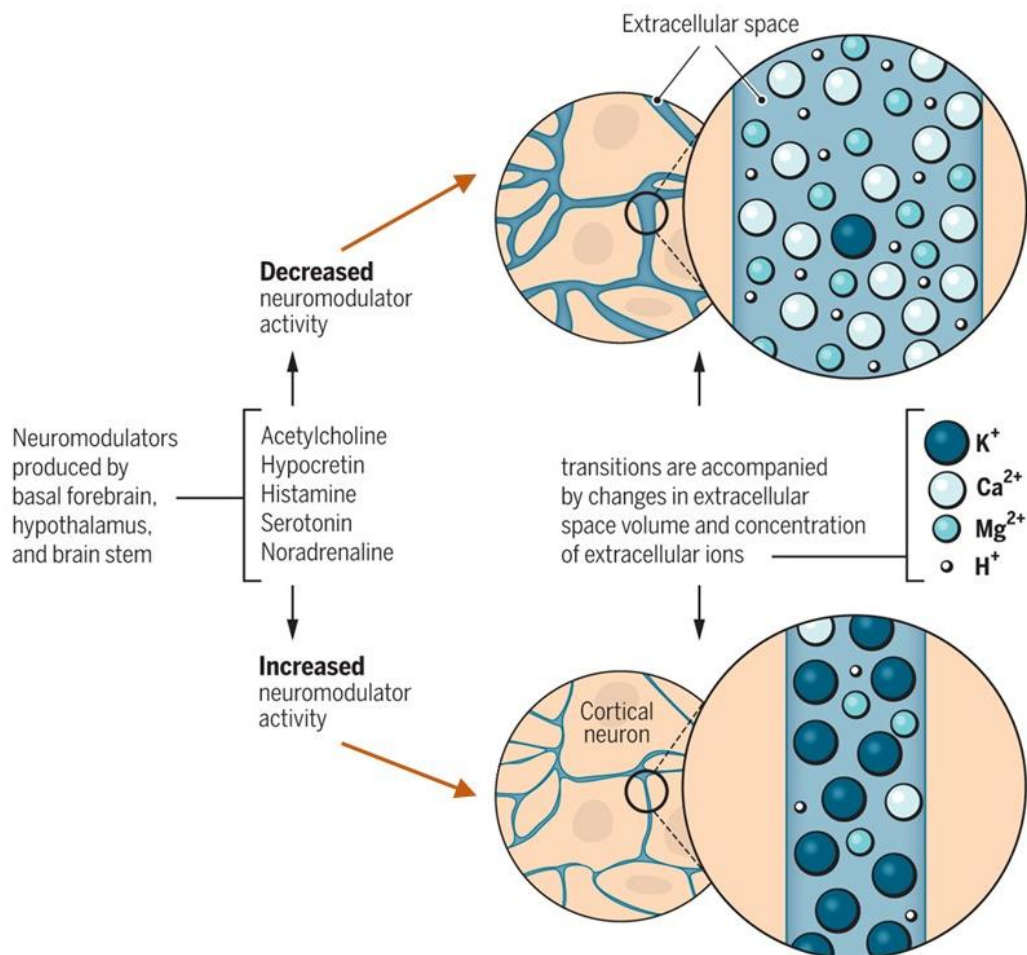


Figure 61. Diminution de l'espace extra-cellulaire durant l'augmentation de l'activité neuromodulatrice (issue de (Landolt and Holst 2016))

Selon Korkotian et Segal (Korkotian and Segal 2001) qui ont étudié ces phénomènes ex-vivo sur des dendrites extraites d'hippocampes de rats, les potentiels d'action se propageant dans les axones provoquent des contractions transitoires des dendrites Figure 62 susceptibles d'être induites par l'influx de Ca^{2+} (ce qui rejoint l'hypothèse de (Landolt and Holst 2016), voir Figure 61). L'ampleur de la contraction a été mesurée à environ 5 à 10% pour une épine d'environ 1 mm, avec une contraction transitoire à des échelles de temps de quelques millisecondes jusqu'à 2s.

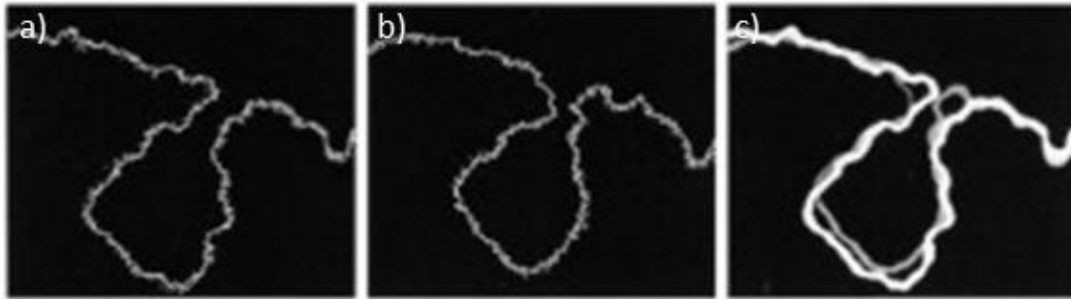


Figure 62. Dendrite d'hippocampe de rat. a) Avant l'application d'un potentiel ionique b) Après l'application du potentiel ionique c) Différence entre les deux états: on constate un rétrécissement de la dendrite après l'application du potentiel (issue de (Korkotian and Segal 2001))

Enfin l'équipe de Denis Le Bihan (NeuroSpin, CEA, Saclay) a établi à partir de 2013 grâce à l'IRM de diffusion un lien direct entre diffusion moléculaire de l'eau dans les cellules neuronale et activité cérébrale (Tsurugizawa et al. 2013) dans différentes conditions de stimulation neuronale et de couplage neurovasculaire (Abe et al. 2017). Les changements observés suggèrent une modulation dynamique de la structure du tissu neural lors de l'activation, décorrélée des effets du couplage neuro-vasculaire.

Depuis les premières études sur les nerfs de calamar, jusqu'aux mesures in-vivo de diffusion de l'eau, ces travaux sur la modification de la structure cérébrale lors de l'activation neuronale représentent un changement de concept significatif par rapport aux principes de couplages électrochimiques et neurovasculaires utilisés pour l'imagerie cérébrale et ouvrent des pistes uniques pour étudier les mécanismes sous-jacents à la fonction cérébrale.

4.1.3.2. Modification de la dureté

Puisque l'activité neuronale génère des modifications structurelles réversibles des cellules cérébrales, on peut se demander si elle engendre par la même occasion une modification de l'élasticité cérébrale dans les zones activées. Cette hypothèse a été explorée récemment en élastographie par résonance magnétique (Patz et al. 2019) : des stimulations de différentes durées et à différentes fréquences ont été réalisées chez le rat anesthésié afin d'évaluer les modifications de dureté suivant des stimulations électriques (directement exercées sur le nerf de la patte arrière de l'animal). L'utilisation de différentes durées et fréquences de stimulations a pour but de prouver l'indépendance entre le couplage neuro-vasculaire et le phénomène recherché à mesurer: à savoir le changement d'élasticité. Il a

été mesuré **une augmentation de la dureté** du gyrus cingulaire et du cortex retrosplénial **durant les périodes OFF** des schémas de stimulation ON/OFF (Figure 63). Durant les stimulations ultra-rapides (ON = 0.1s / OFF = 0.1 s) à ultra-haute fréquence (100 Hz), une augmentation de la dureté dans le thalamus a également été mesurée pendant les périodes OFF de stimulation.

Ces observations sont intéressantes. Cependant, il convient de noter que les stimulations électriques de la patte correspondent à des stimulations très fortes et ne permettent pas de déduire d'une modification de rigidité locale pour des activités plus physiologiques. De plus, elles ne permettent pas de conclure si l'augmentation de rigidité locale est dû à une contrainte passive induite par les changements de flux sanguin ou de la pression artérielle dans ou proche de cette zone cérébrale.

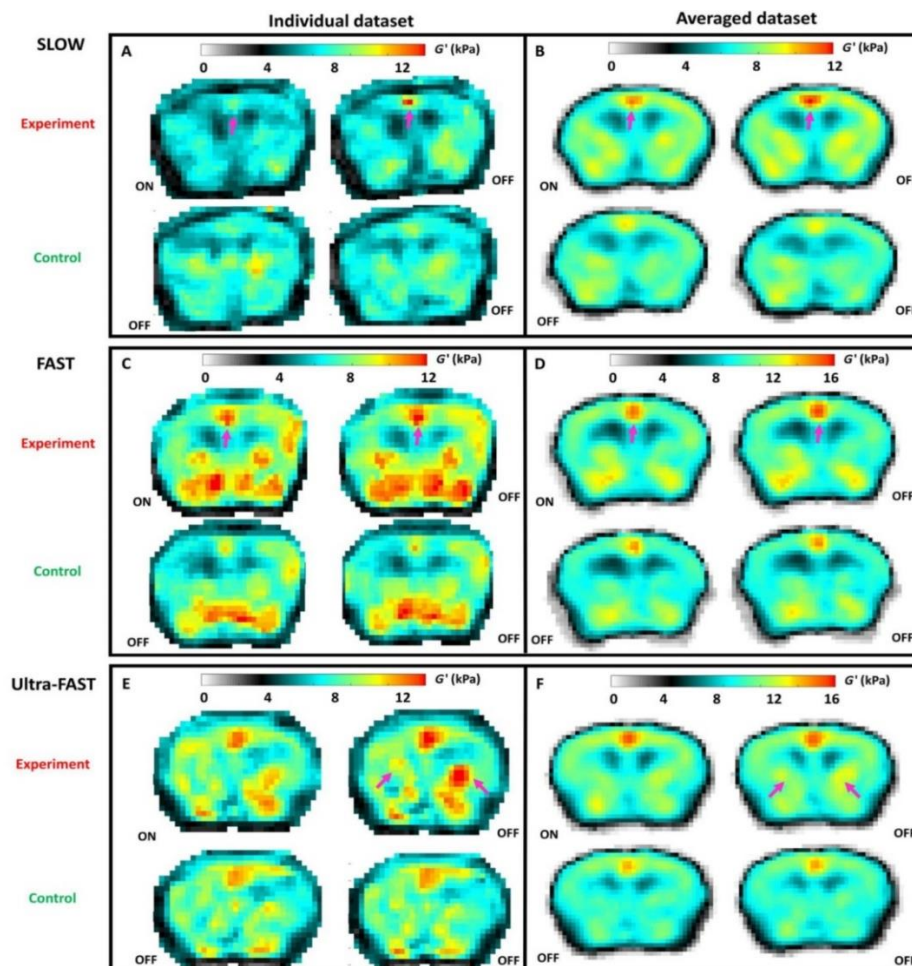


Figure 63. Changement de dureté cérébrale mesuré à l'ERM durant des stimulations de la patte arrière gauche chez le rat. Une augmentation de la dureté dans le gyrus cingulaire et dans le cortex retrosplénial est observée pendant les périodes OFF quelques soit les schémas de stimulation ON/OFF (SLOW: pulses répétés à 3 Hz pendant 9 s, FAST: pulses répétés à 10 Hz pendant 0.9 s et ULTRAFast: pulses répétés à 100 Hz pendant 0.1s) (issue de (Patz et al. 2019))

4.1.3.3. Objectif de ce chapitre

Puisque plusieurs facteurs semblent modifier la dureté cérébrale, je me suis donc intéressée dans le cadre de ma thèse sur l'imagerie fonctionnelle par ultrasons, à **l'hypothèse d'une modification de la dureté locale lors de l'activation neuronale suivant une stimulation**. Pour ce projet, j'ai également travaillé avec Florian Laszlo, étudiant en deuxième année au laboratoire. Notre premier enjeu fut de mettre en place une séquence capable de détecter l'activité fonctionnelle hémodynamique (imagerie fUS) et dans le même temps, de provoquer des ondes de cisaillement dans le milieu et de les imager afin d'en mesurer la vitesse de propagation (élastographie SSI). Dans un second temps, nous avons mis en place les expériences fonctionnelles adaptées à ces mesures sur rat trépané anesthésié. Enfin, les données ont été récoltées et analysées. Ce projet ayant commencé durant ma troisième année de thèse, y seront présenté ici les premiers travaux encore préliminaires.

4.2. Elastographie fonctionnelle ultrasonore par ondes de cisaillement

4.2.1. Génération d'ondes de cisaillement et détection par les ultrasons

Pour ces expériences, nous avons choisi la technique d'élastographie ultrasonore supersonique par ondes de cisaillement (SSI) pour évaluer les variations de dureté pendant des activations fonctionnelles chez le rat anesthésié. Elle a en effet été retenue car elle est à ce jour la technique ultrasonore la plus robuste.

Revenons un peu sur les détails de la technique: le principe de l'élastographie SSI est d'appliquer une pression de radiation pour engendrer une perturbation dans le milieu qui se propagera sous la forme d'une onde mécanique (dans un milieu solide). C'est donc **l'application d'une pression de radiation acoustique** qui démarque l'élastographie SSI des techniques ayant recours à des vibrations externes (comme l'élastographie ultrasonore impulsionnelle transitoire ou l'ERM).

4.2.1.1. Force de radiation acoustique

La pression de radiation acoustique est une force issue d'un transfert de quantité de mouvement entre l'onde et le milieu dans lequel elle se propage: la force qu'elle engendre dans le milieu est appelée **force de radiation acoustique** et dépend du milieu de propagation. Cette force est définie comme la variation moyenne de quantité de mouvement subie par le milieu.

Les tissus biologiques sont considérés comme des milieux visqueux, homogènes et atténuants (de coefficient d'atténuation α), dans lesquels le champ ultrasonore est quasi-plan ET monochromatique, et enfin pour lesquels la propagation de l'onde est linéaire. Dans de telles conditions, la pression de radiation p_0 appliquée par un faisceau acoustique orienté selon l'axe \vec{r} engendre une force de radiation acoustique égale à:

$$13. \quad \vec{f} = - \frac{d\bar{\Pi}}{dz} \cdot \vec{r}$$

où Π est le tenseur de flux de quantité de mouvement, donc $\bar{\Pi}$ est la valeur moyenne de flux de quantité de mouvement sur une période tel que:

$$14. \quad \frac{d\bar{\Pi}}{dz} = -2 \cdot \alpha \cdot \frac{p_0^2}{\rho_0 \cdot c^2}$$

avec ρ_0 : la masse volumique du milieu

c : la célérité de l'onde acoustique dans le milieu

donc :

$$15. \quad \vec{f} = -2 \cdot \alpha \cdot \frac{p_0^2}{\rho_0 \cdot c^2} \cdot \vec{r}$$

et :

$$16. \quad f(\vec{r}, t) = -2 \cdot \alpha \cdot \frac{p_0^2}{\rho_0 \cdot c^2} \cdot \text{rect}(T)$$

- p_0 est proportionnel au carré de l'amplitude de l'onde acoustique envoyée dans le milieu. Cela justifie donc l'utilisation d'une loi de focalisation en transmission pour augmenter l'amplitude des ultrasons au point de focalisation et générer **un pic de force f localisé**.
- T correspond à la durée du train d'onde ultrasonore émis pour générer la force f . T ne modifie donc pas l'intensité de cette force, mais sa durée d'application. En élastographie SSI, on a en général $T \approx 100 \mu\text{s}$.

Réponse élastique du milieu

En milieu élastique, la réponse du milieu à la force acoustique ponctuelle $\vec{f}(\vec{r}, t) = \vec{a} \cdot \delta(t) \cdot \delta(\vec{r})$ où a : amplitude de la force

\vec{a}/a : direction de la force

se calcule avec la fonction de Green dite “élastique” (Aki and Richards 1980), telle que :

$$17. \quad G(\vec{r}, t) = g^P(\vec{r}, t) + g^S(\vec{r}, t) + g^{P,S}(\vec{r}, t)$$

où :

- $g^P(\vec{r}, t)$ est prop. à $\frac{1}{c_p^2} \cdot \frac{1}{r} \cdot \delta\left(t - \frac{r}{c_p}\right) \cdot \vec{r}_{//}$ correspond à l'**onde de compression**

avec : $c_p = \sqrt{\frac{K}{\rho}}$ (d'après l'équation (11)) : la vitesse des ondes de compression

et : $\vec{r}_{//}$: direction de propagation de l'onde de compression, parallèle à la direction \vec{r} d'application de la force \vec{f}

- $g^S(\vec{r}, t)$ est prop. à $\frac{1}{c_s^2} \cdot \frac{1}{r} \cdot \delta\left(t - \frac{r}{c_s}\right) \cdot \vec{r}_{\perp}$ correspond à l'**onde de cisaillement**

avec : $c_s = \sqrt{\frac{\mu}{\rho}}$ (d'après l'équation (12)) : la vitesse des ondes de cisaillement

et : \vec{r}_{\perp} : direction de propagation de l'onde de cisaillement, perpendiculaire à la direction \vec{r} d'application de la force \vec{f}

- $g^{P,S}(\vec{r}, t)$ est un terme de couplage entre onde de cisaillement et onde de compression et est proportionnel à $\frac{1}{r^2}$. C'est donc un terme de champ proche qui s'atténue avec le carré de la distance tandis que les amplitudes de l'onde de compression et de l'onde de cisaillement décroissent comme l'inverse de la distance au point focal. Une version plus complète de la fonction de Green intégrant les phénomènes de viscosité a aussi été proposée par (Bercoff et al. 2004).

Comme vue au paragraphe 4.1.1.4, on s'intéresse en élastographie aux ondes de cisaillement car mesurer leur vitesse $c_s = \sqrt{\frac{\mu}{\rho}}$ nous permet de remonter directement au module d'Young du milieu avec $E=3\cdot\mu$.

4.2.1.2. Cône de Mach

L'amplitude d'une onde de cisaillement générée par force acoustique reste cependant assez faible et décroît rapidement en raison de forte diffraction dans les tissus biologiques. En déplaçant alors la source (en profondeur par exemple: voir Figure 64) avec une vitesse supérieure à celle de l'onde : toutes les ondes de cisaillement impulsives créées rapidement les unes après les autres par cette "source supersonique" interfèrent constructivement le long d'un cône de Mach et une onde de cisaillement intense confinée dans ce cône est ainsi générée. Cette "onde conique" en 3D apparaît dans le plan d'imagerie de la sonde comme deux ondes planes se propageant en sens opposé. L'angle entre ces deux ondes planes dépend directement du rapport entre la vitesse de l'onde de cisaillement par la vitesse de la source supersonique.

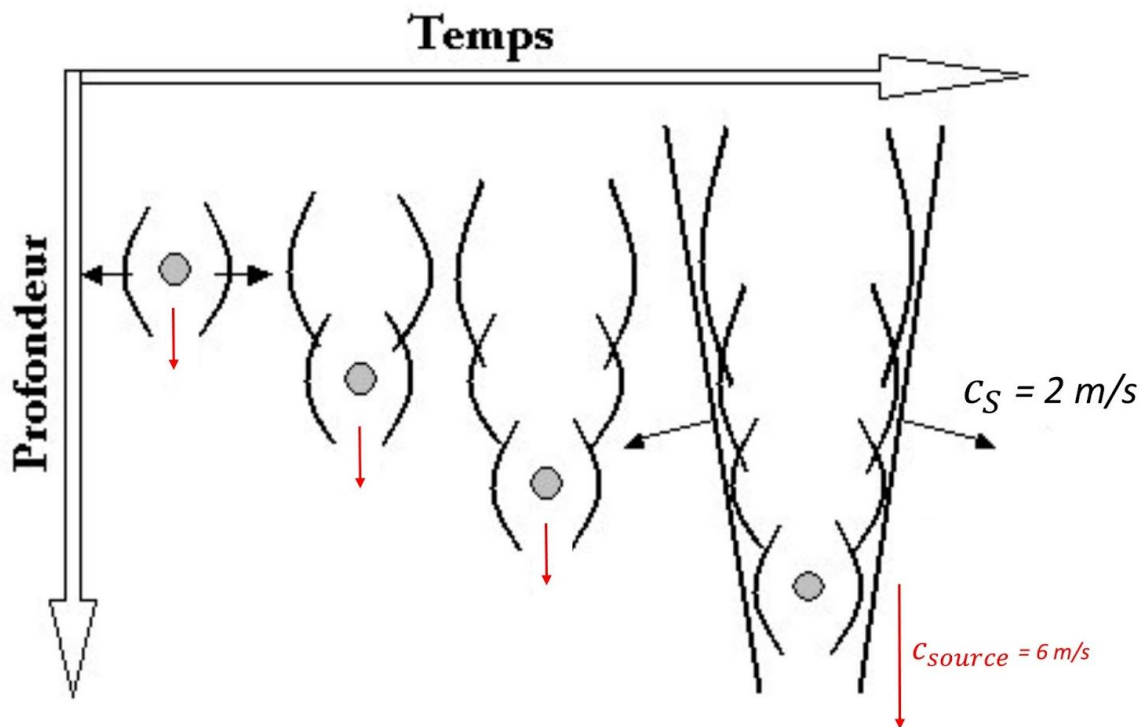


Figure 64. Source supersonique de cisaillement créée par pression de radiation. Elle engendre une onde de cisaillement très intense confinée dans un cône. Ici la source se déplace à Mach 3 (trois fois plus vite que l'onde) (issue de (Bercoff 2004))

4.2.1.3. Détection de la propagation des ondes de cisaillement

Nous avons vu dès le chapitre introductif que la transmission d'ondes planes à haute cadence dans le milieu permet d'imager les événements rapides. Dans les tissus biologiques les ondes de cisaillement se propagent d'environ 1.5 m/s à 10 m/s: une cadence d'imagerie ultrasonore par ondes planes de 10 000 images/s par exemple, permet l'acquisition de 10 images pendant la propagation d'une onde de cisaillement très rapide (10 m/s) sur 1 cm. Pour mesurer le déplacement des ondes de cisaillement, on compare chaque image temporelle avec la suivante afin de mesurer le décalage temporel généré par la perturbation (l'onde de cisaillement). C'est la technique d'**interférométrie speckle ultrasonore** (Walker et al. 1993).

Cela revient à mesurer dans chaque pixel en (x, z) la différence de phase entre les signaux $sign_{x,z}(t)$ et $sign_{x,z}(t + dt)$. Plus dt sera court, meilleur sera l'échantillonnage de la vitesse: dt étant directement lié à la cadence d'imagerie. Une première méthode lorsque l'on a accès à des signaux réels non complexes et de calculer la corrélation axiale (selon la profondeur) des deux signaux $sign_{x,z}(t)$ et $sign_{x,z}(t + dt)$: puis de calculer le délais dt pour lequel la corrélation est maximisée (illustrée en Figure 65)

Or, nous avons vu au chapitre introductif qu'en imagerie ultrarapide par ondes planes, on récupère très souvent pour chaque pixel de coordonnées (x, z) les signaux "IQ". Ils sont donc complexes et de la forme:

$$IQ_{x,z}(t) = I(t) + i.Q(t)$$

où $I(t)$ et $Q(t)$ sont en quadrature de phase

Le formalisme du calcul de déphasage est un tout petit peu différent du simple calcul de corrélation entre les deux signaux mais revient exactement à trouver le décalage dt entre $IQ_{x,z}(t)$ et $IQ_{x,z}(t + dt)$.

En effet, on peut réécrire IQ en notation exponentielle de la forme:

$$IQ(t) = A.e^{i.\omega.t}$$

et donc à l'instant $t + dt$:

$$IQ(t) = A.e^{i.\omega.(t+dt)}$$

Calculer dt revient donc à chercher la phase entre ces deux signaux, (c'est-à-dire l'argument) de:

$$IQ(t + dt).IQ(t)^* = A.e^{i.\omega.dt}$$

Or, pour z nombre complexe, $\arg(z) = \frac{Im(z)}{Re(z)}$

$$\begin{aligned} \text{Ici: } IQ(t + dt).IQ(t)^* &= (I(t + dt) + i.Q(t + dt)).(I(t) - i.Q(t)) \\ &= I(t + dt).I(t) - i.I(t + dt).Q(t) + i.Q(t + dt).I(t) + Q(t + dt).Q(t) \\ &= (I(t + dt).I(t) + Q(t + dt).Q(t)) + i.(-I(t + dt).Q(t) + Q(t + dt).I(t)) \end{aligned}$$

Donc :

$$\arg(IQ(t + dt).IQ(t)^*) = \arctan\left(\frac{-I(t+dt).Q(t)+Q(t+dt).I(t)}{I(t+dt).I(t)+Q(t+dt).Q(t)}\right)$$

D'où :

$$dt_{x,z} = \frac{1}{\omega} \cdot \arctan\left(\frac{-I(t+dt).Q(t)+Q(t+dt).I(t)}{I(t+dt).I(t)+Q(t+dt).Q(t)}\right)$$

Enfin, si on veut avoir le déplacement axial entre deux intervalles du temps espacés de dt on a:

$$18. \quad dt(x, z) = \frac{dt \cdot c}{2} \cdot F_{\text{echantillonnage}}$$

On peut ainsi calculer partir des signaux IQ complexes le décalage à chaque image $t + dt$ par rapport à l'image t de la perturbation axiale se propageant dans milieu.

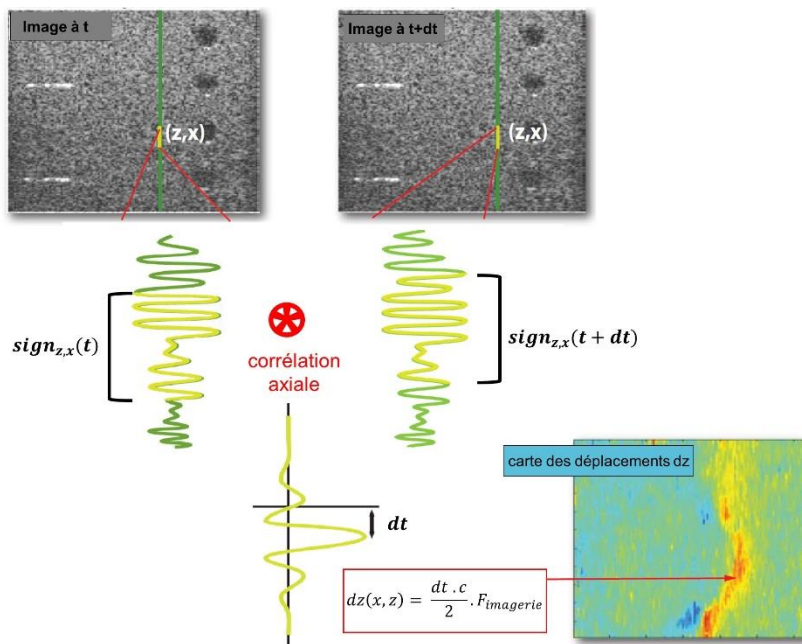


Figure 65. Calcul des déplacements axiaux dus à une perturbation dans le milieu (onde de cisaillement) sur des signaux non démodulés. Lorsque les signaux sont complexes, le principe de calcul du déphasage dt est le même (issus de la thèse de (Deffieux 2008)).

4.2.1.4. Sommatation cohérente ou cadence d'imagerie ?

Nous avons vu au chapitre d'introduction que l'usage du *coherent compounding* permettait un net gain en contraste et sensibilité. Cependant, puisqu'il implique de moyennner successivement des acquisitions d'angles différents, il induit une diminution de la cadence d'imagerie. On pourrait donc penser que le *coherent compounding* est un inconvénient pour l'échantillonnage du déplacement des ondes de cisaillement.

Les ondes de cisaillement in-vivo dans le cerveau de rongeur (≈ 12 mm de propagation) admettent des fréquences entre $f_{\text{cisai}} = 300\text{Hz}$ et $f_{\text{cisa}} = 1000\text{Hz}$: d'après le théorème de Shannon on alors peut n'échantillonner qu'entre 600 Hz (pour $f_{\text{cisai}} = 300\text{Hz}$) et 2000 Hz (pour $f_{\text{cisa}} = 1000\text{Hz}$) pour évaluer correctement la vitesse de la propagation. Ainsi, on peut réduire la fréquence d'imagerie pour utiliser la cadence de tirs rapide pour le *coherent compounding*, ce qui est très efficace pour augmenter la sensibilité. Il a été montré (Deffieux 2008, Chap.2.2) qu'une fréquence d'imagerie diminuée par rapport à la fréquence maximale d'un facteur 4 ou 6 ne dégradait pas la qualité de l'image d'élasticité mais permettait d'utiliser ce facteur pour appliquer le *coherent compounding* et ainsi réduire efficacement le bruit des images.

4.2.2. Matériel et méthodes

4.2.2.1. Séquence ultrasonore combinée hémodynamique-élastographique

La séquence mise en place a été implémentée sur le scanner ultrasonore de recherche Verasonics. La sonde utilisée pour cette étude est une sonde linéaire Hockey Stick de la société Vermon, de 192 éléments de fréquence centrale 14 MHz, de taille d'élément 0.15 mm, d'élévation 3 mm et de focale 15mm. Pour cette séquence, nous n'avons utilisé que les 128 éléments centraux de la sonde (pour l'imagerie Doppler, les focalisations, et l'imagerie des ondes de cisaillement).

La séquence proposée pour évaluer les modifications de dureté lors d'activation fonctionnelle combine: une séquence fUS pour la mesure des variations hémodynamique dans le cerveau (afin de vérifier l'activation d'une zone par augmentation du CBV), avec une séquence d'élastographie de type SSI pour évaluer la dureté. Cette séquence combinée hémodynamique - élastographique est composée de quatre étapes distinctes, qui se

succèdent pour une durée totale de 1.6 s (voir Figure 66), puis qui est répétée au cours du temps durant l'expérience fonctionnelle.

Etape 1 [400 ms] - *Validation de l'activation fonctionnelle des zones stimulées avec une mesure contrôle hémodynamique* -

→ Séquence de Doppler Puissance: 200 images *compoundées* (12 angles, PRF=6000 Hz) répétée à 500 Hz pour une durée totale de 400 ms. Fréquence d'imagerie 12,5 MHz.

Etape 2 [300 μ s] - *Création des ondes de cisaillement* -

Envoie de trois focalisations successives en profondeur: 3mm, 5mm, 7mm de 100 μ s chacune. Les tirs ultrasonores sont émis à 7.9 MHz, à une amplitude de 36 V et interfèrent constructivement le long d'un cône de Mach: création des ondes de cisaillement de part et d'autres de la ligne de focalisation.

Etape 3 [5 ms] - *Imagerie de la propagation des ondes de cisaillement* -

→ Séquence d'imagerie ultrarapide des ondes de cisaillement: 25 images *compoundées* (4 angles, PRF=20000 Hz) répétée à 5000 Hz pour une durée totale de 5 ms.

Les vitesses de propagation des ondes de cisaillement dans les tissus biologiques sont comprises entre environ 1.5 m/s et 10 m/s. Dans la situation la "plus lente": imager une onde de vitesse 1.5 m/s pendant 5 ms permet de voir le parcours de l'onde sur une distance $d = v.t = 1.5 \times 5.10^{-3} = 10$ mm. Or un cerveau de rat est large d'environ 12 mm, donc même si les tirs de focalisation sont placés sur un côté du cerveau, les 5 ms d'imagerie suffisent à imager la propagation de l'onde qui traverserait tout le tissu.

Au besoin, les étapes 2 et 3 sont répétées afin de créer des cônes de Mach à différentes positions latérales dans le plan d'imagerie pour optimiser le trajet de l'onde de cisaillement dans la zone d'intérêt.

Etape 4 [1.1 s] - *Beamforming* et enregistrement des données -

→ Application d'un *beamforming delay-and-sum* aux RFs de la séquence Doppler puis de la séquence d'imagerie des ondes de cisaillement

→ Enregistrement des données *beamformées*

Durée totale \simeq 1.6

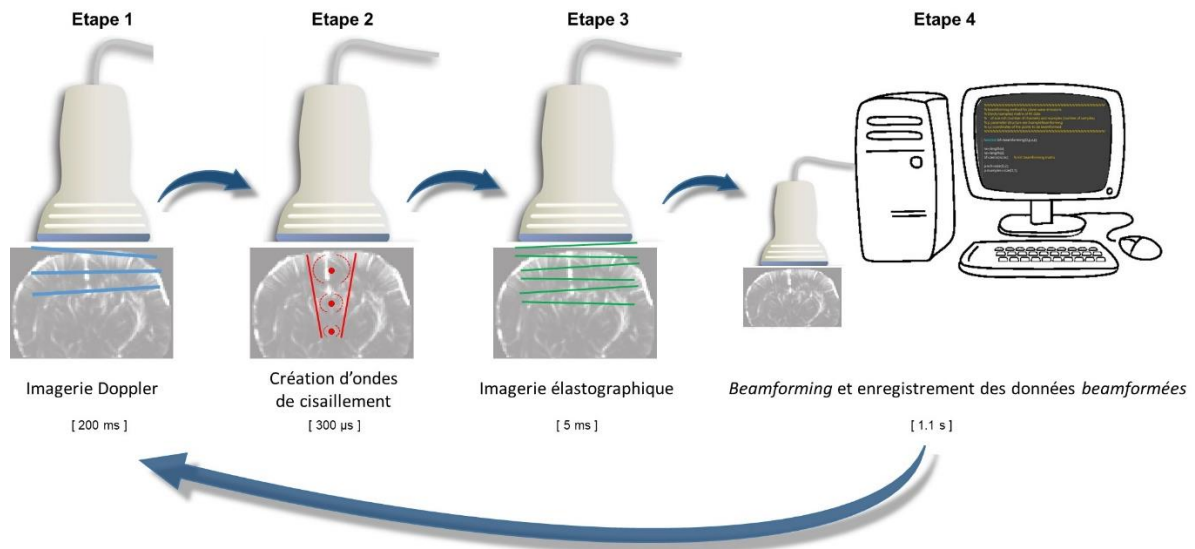


Figure 66. Séquence combinée hémodynamique-élastographique. Etape 1: Acquisition Doppler contrôle pour s'assurer de l'activation hémodynamique d'une zone stimulée. Etape 2: Création d'un cône de Mach dans le milieu pour provoquer des ondes de cisaillement. Etape 3: Acquisition ultra-rapide pour détecter la propagation des ondes de cisaillement. Etape 4: *Beamforming* et enregistrement des données *beamformées* pour ne pas conserver les données RF brutes (lourdes en mémoire)

4.2.2.2. Expérimentation animale et procédure chirurgicale

Tous les animaux ont reçu des soins conformément à la directive du Conseil des Communautés européennes de 2010 (2010/63/UE), et l'étude a été approuvée par les comités institutionnels et régionaux pour le soin des animaux : CEEA (Comité d'Ethique pour l'expérimentation animale) numéro 59 - "Paris Centre et Sud" Protocole # 2017-23). Des rats mâles Sprague Dawley ont été utilisés dans cette étude (âgés de 7 à 9 semaines, de 300 à 500 g). Avant chaque session d'acquisition, une craniotomie a été effectuée. La procédure de chirurgie et d'anesthésie réalisée est exactement identique à celle décrite en section 2.2.2 du chapitre 2 de ce manuscrit. En fin de chirurgie, une couche de gel échographique est appliquée sur le cerveau et la sonde est placée au-dessus, en contact direct avec le gel. Le placement dans le plan coronal voulu (dépendamment de la stimulation appliquée) est effectué grâce à des moteurs translationnels trois axes.

4.2.2.3. Acquisitions fonctionnelles

Les rats étudiés ont été placés (dès la chirurgie) sur cadre stéréotaxique et maintenus sous anesthésie selon le protocole décrit au Chapitre 3, section 2.2.

Deux systèmes sensoriels ont été stimulés pour cette étude: le système sensoriel associé aux moustaches et le système visuel.

Stimulation des moustaches : l'ensemble (droit) des moustaches a été stimulé manuellement à l'aide d'un coton-tige en utilisant les paramètres suivants : période de **24 s OFF** (pas de stimulation) -ce qui correspond à 15 répétitions de séquence combinée hémodynamique-élastographique-, suivi d'une période de **24 s ON**, 5-7 Hz, 1 cm d'amplitude. La stimulation a été répétée 4 fois pour une durée d'acquisition totale de 192 s (ce qui correspond à 120 répétitions de séquences).

Stimulation visuelle : De même que pour les expériences du Chapitre 3, les stimuli visuels ont été émis à l'aide d'une LED verte (= 532 nm) positionnée à 3 cm devant l'œil droit ou gauche des rats. Les essais de stimulation consistaient en un scintillement périodique (3 Hz) de la LED verte en utilisant les paramètres suivants : période de **24s LED éteinte**, puis **24s de scintillement**. La stimulation a été répétée 4 fois pour une durée d'acquisition totale de 192s. Entre les sessions de stimuli, les rats étaient gardés dans un environnement sombre.

N=3 rats ont été étudié pour l'instant

Pour le **rat 1**: nous avons réalisé huit acquisitions de stimulations de moustaches

Pour le **rat 2**: nous avons réalisé cinq acquisitions de stimulations de moustaches

Pour le **rat 3**: nous avons réalisé dix acquisitions de stimulations visuelles

4.2.2.4. Positionnement des tirs de focalisation

Puisque l'on s'intéresse à la modification de dureté dans les zones activées suivant des stimulations, il faut que les ondes de cisaillement générées traversent bien les régions d'intérêt. De plus, afin d'effectuer des mesures contrôles, nous chercherons aussi à évaluer la dureté des régions controlatérales aux zones activées quand cela est possible.

Positions des tirs pendant les stimulations moustaches droites

D'après l'Atlas Paxinos (Paxinos and Watson 1982) , le cortex préfrontal somatosensoriel (S1BF) est situé à environ 5 mm de l'axe central du cerveau lorsque l'on se place dans

le plan coronal Bregma -3.6. Nous avons donc pensé à deux solutions pour le positionnement des tirs de focalisations: ces deux solutions sont schématisées Figure 67.a.

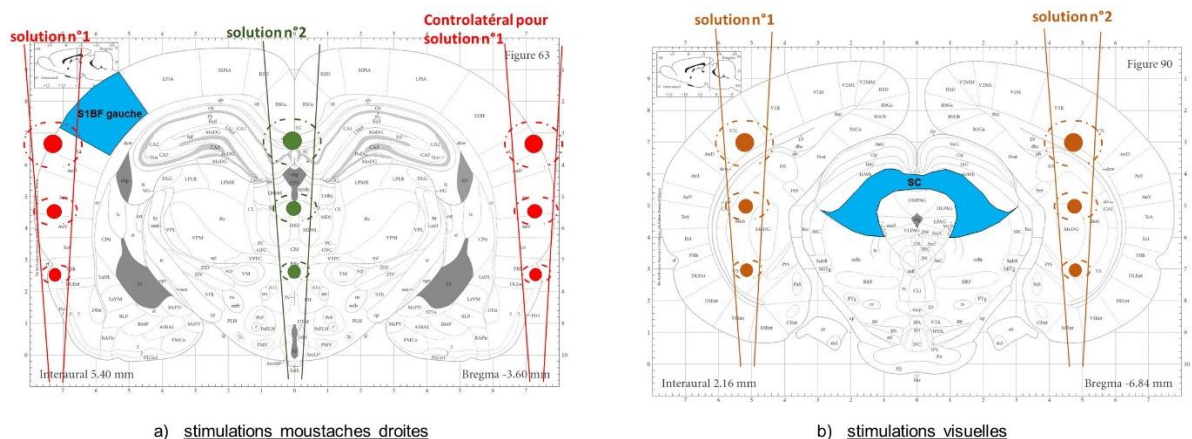
Solution 1: Les tirs sont positionnés à l'extrémité du cerveau. A gauche (-7mm), pour que les ondes de cisaillement traversent la zone activée, et à droite (+7mm) pour tester la région controlatérale. L'inconvénient de cette solution réside dans la position des tirs: ils sont en effet très proches de la zone activée. La région risque alors de se trouver dans la zone des focalisations et non sur le trajet de propagation des ondes de cisaillement.

Solution 2 (solution testée uniquement sur le rat 2) : Un tir est positionné au centre du cerveau (0 mm), et puisque les ondes de cisaillement se propagent de part et d'autre du cône de Mach: les deux régions (activée et controlatérale) sont traversées par les ondes de cisaillement. Avec cette solution, les focalisations sont suffisamment loin des régions d'intérêts. Cependant, le cône de Mach est créé exactement à l'intersection entre les deux hémisphères qui présentent beaucoup d'inhomogénéités: la propagation des ondes risque alors d'être perturbée, ce qui détériorerait la mesure de vitesse de la propagation.

Positions des tirs pendant les stimulations visuelles

La région du colliculus supérieur est située au centre de plan coronal retenu ici: Bregma -6.84mm. Pour assurer la propagation des ondes de cisaillement dans la zone du colliculus, nous avons choisi de tirer soit à gauche (solution 1: -5mm), soit à droite (solution 2: +5mm) du centre du cerveau (voir Figure 67.b). La position centrale du colliculus ne permet pas d'évaluer la vitesse des ondes de cisaillement dans une zone contrôle. Malgré l'inhomogénéité du centre du cerveau, nous avons pu évaluer la vitesse de propagation des ondes de cisaillement dans cette partie centrale. Comme ces tirs sont symétriques, les valeurs de vitesses obtenues avec l'une ou l'autre solution ne sont pas sorties très différentes. Nous avons en pratique moyenné les valeurs données par les deux tirs pour sortir une mesure plus robuste.

Pour rappel: *afin de générer le cône de Mach, nous avons choisi de focaliser successivement les ultrasons à trois profondeurs: -3mm , -5mm , et -7 mm: chaque tir focalisé dure 100 μ s.*



4.2.3. Traitement des données

4.2.3.1. Imagerie Doppler

Pour les trois rats, les activations fonctionnelles ont été validées grâce aux mesures fUS avec lesquelles nous avons pu mesurer une augmentation de CBV dans les zones stimulées. En suivant le même traitement de données des acquisitions doppler qu'au chapitre 2, la corrélation de Pearson a été calculée pixel par pixel entre les signaux doppler des trois acquisitions de rat et le schéma de stimulation OFF-ON. Nous avons pu observer dans l'hémisphère controlatéral au côté de stimulation, une activation dans le cortex préfrontal somatosensoriel (S1BF) et le thalamus (VPM) (Figure 69.a) chez les deux rats stimulés aux moustaches. De la même manière, nous avons également pu visualiser grâce aux acquisitions doppler l'activation du colliculus et du cortex visuel lors des stimulations visuelles chez le rat stimulé par la LED. Cependant, l'activation du cortex visuel étant mesurée bien plus faible, nous nous sommes concentrés sur le colliculus durant nos expériences.

4.2.3.2. Carte spatiale de la variation de phase

Comme expliqué à la section précédente, afin de calculer le déplacement de la perturbation entre les instants t et $t + dt$, on calcule pour chaque pixel de l'image doppler la différence de phase entre les deux signaux $IQ(t)$ et $IQ(t + dt)$ (c'est à dire, l'argument de $IQ(t + dt) \cdot IQ(t)^*$). A chaque instant $t + dt$, on a ainsi accès à la distribution spatiale des déphasages (Figure 69.b) par rapport au temps précédent t . Les pas temporel dt sont directement liés à la cadence d'imagerie : $dt = n \cdot 1/F_{imagerie}$. Pour notre étude, nous choisissons $n=3$.

Il y a en effet un compromis à trouver entre une valeur de n petite qui permet un meilleur échantillonnage temporel mais qui est plus sensible aux petites variations de phase (donc plus bruité); et une valeur de n grande qui permet de mieux lisser l'enveloppe de la perturbation, mais qui donne alors accès à moins de points temporels pour ensuite estimer la vitesse de l'onde de cisaillement (Figure 68).

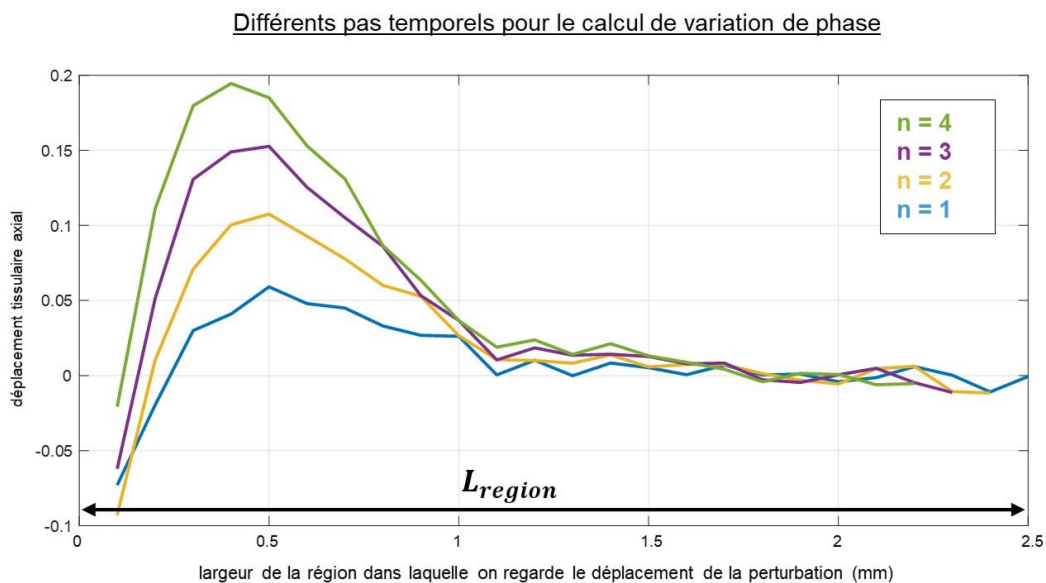


Figure 68. Perturbation le long d'une région d'intérêt calculée par différence de phase entre les instants t et $t + dt$ pendant lesquels l'onde traverse la région en question. On a représenté ici la variation de phase calculée avec différents pas temporel $dt = n \cdot 1/F_{imagerie}$; $n = 1, \dots, 4$. Avec un échantillonnage dt petit, on a accès à plus de points temporels de l'onde de cisaillement pendant qu'elle traverse la région d'intérêt, mais (pour $n=1$ par exemple) les déphasages apparents sont moins importantes et plus difficile à détecter, et le signal de variation de phase plus bruité. Pour n plus grand, les variations de phase sont plus importantes (puisque l'onde a "plus bougé" dans l'intervalle de temps dt plus grand) mais nous aurons accès à moins de points temporels de l'onde traversant la région d'intérêt.

4.2.3.3. Vitesse de l'onde de cisaillement

Le front d'onde de l'onde de cisaillement est repérable dans la carte spatiale de variation de phase comme le maximum des déphasages apparents. En observant ces cartes au cours du temps, on arrive à voir ce front d'onde se déplacer. Dans l'exemple de la Figure 69.b, les focalisations ayant été envoyées sur le côté gauche du cerveau, on peut visualiser le front d'onde traverser le cerveau de gauche à droite en observant les maximums de variation de phase se déplacer vers la droite.

On calcule ensuite ce champ de variation d'intensité de phase à **une profondeur donnée** (par exemple, celle dans laquelle la région activée apparaît: qui est ici représentée en pointillés jaunes): ce champ au cours du temps est représenté pour toute la largeur de la barrette échographique en Figure 69.c. On visualise très bien le déplacement de l'onde de cisaillement: la pente du déplacement observé correspond à sa vitesse.

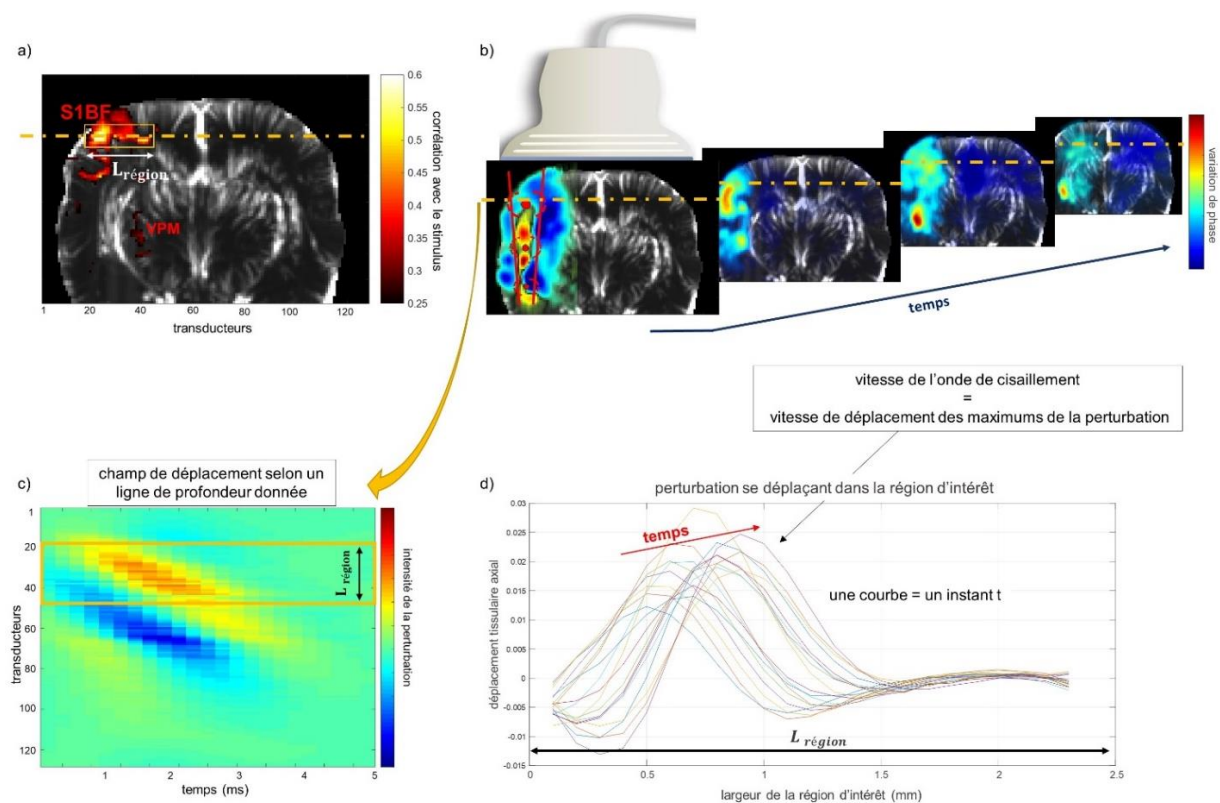


Figure 69. Traitement des données de la séquence combinée hémodynamique - élastographique a) On valide l'activation de la région stimulé grâce à la séquence doppler. On peut ainsi repérer une ligne sur laquelle on va calculer le déplacement latéral de l'onde de cisaillement b) Cartes spatiales de déplacement tissulaire au cours du temps pendant le déplacement de l'onde de cisaillement: distribution spatiale de variation de phase à chaque instant montre la propagation de l'onde de cisaillement dans le cerveau c) On regarde le déplacement de l'onde de cisaillement selon une ligne horizontale qui traverse la région activée d) On s'intéresse ensuite à la vitesse de propagation de la perturbation pour évaluer la vitesse de l'onde de cisaillement

Plusieurs approches sont possibles pour calculer cette vitesse; comme par exemple calculer les corrélations temporelles croisées paires à paires de tous les signaux t et $t + dt$ de variations de phase (représentées en Figure 69.d) et accéder au maximum de leur corrélation pour calculer la distance parcourue par l'onde pendant les intervalles de temps dt .

Pour cette étude, nous avons plutôt choisi de calculer directement la variation des déphasages. Cela revient à repérer la position du maximum de variation de phase pour tous les instants t (Figure 69.d) pour en déduire la pente du déplacement $\frac{d\text{maximum}(t)}{dt}$ qui est exactement égale à la vitesse de l'onde de cisaillement.

4.3. Résultats

4.3.1. Stimulation de moustaches

Rat 1

Nous avons réalisé huit acquisitions de stimulations de moustaches (Figure 70.b pour le schéma de stimulation) chez le rat 1. Nous avons ensuite calculé la vitesse des ondes de cisaillement après les deux tirs de focalisation effectués aux extrémités du cerveau (comme expliqué à la section 2.5, nous avons testé la solution 2 d'un tir au centre, uniquement pour le rat 2). Cette vitesse a été calculée dans la région activée, et dans la région controlatérale. Puis pour ces deux régions, nous avons moyenné pour chaque acquisition les vitesses pendant la stimulation (ON) et pendant les temps de repos (OFF). Les résultats de cette expérience sont présentés en Figure 70.

Pour chaque acquisition, nous avons donc quatre valeurs de vitesse: vitesse(région activée-OFF); vitesse(région activée-ON) (Figure 70.c) et vitesse(région controlatérale-OFF) ; vitesse(région controlatérale-ON) (Figure 70.d)

Dans la région activée, nous pouvons observer sur le graphe Figure 70.c que la vitesse moyenne des ondes de cisaillement diminue durant la stimulation ON par rapport à la vitesse durant le repos OFF. Cette diminution est constatée sur 6 acquisitions (sur un total de 8 acquisitions). La valeur moyenne des vitesses de cisaillement sur toutes les acquisitions durant les intervalles OFF a été calculée à $v_{activ}^{OFF} = 2,99 \text{ m/s}$. Tandis que durant les stimulations ON, nous avons trouvé $v_{activ}^{ON} = 2,92 \text{ m/s}$, soit une diminution de

vitesse de 2,4 %. Bien que cette diminution soit faible, elle est évaluée **significative** (par t-test), valeur de significativité $p = 0.019$.

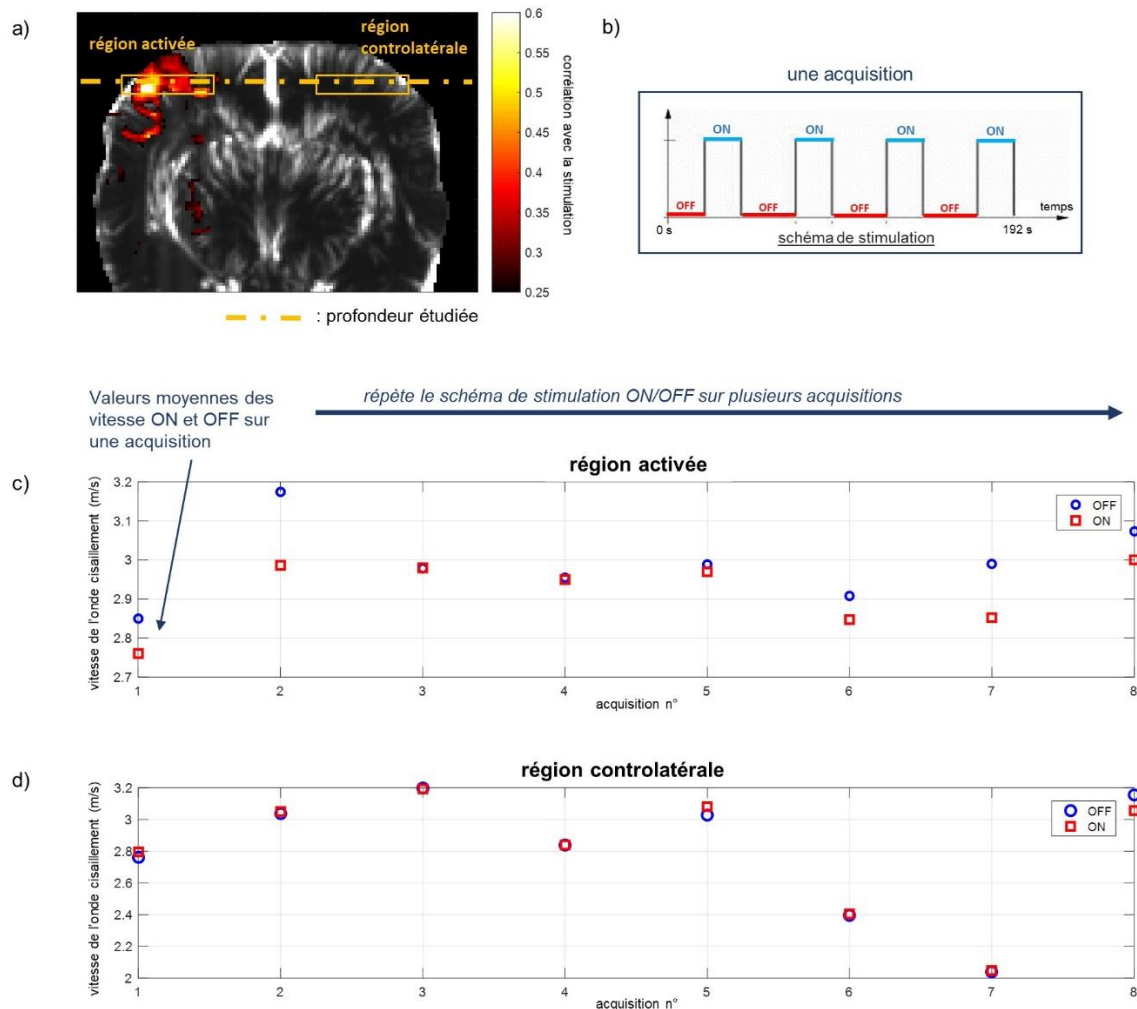


Figure 70. Distribution des vitesses dans a) les régions activée et controlatérale du cortex préfrontal somatosensoriel pendant b) les intervalles OFF et ON du schéma de stimulation. c) Une diminution de la vitesse de cisaillement est observée pendant la stimulation dans la région activée. Cette diminution de 2,4% est significative ($p=0.019$, t-test) d) Cette diminution n'est pas constatée dans la région controlatérale. Les vitesses moyennes pendant les intervalles OFF et ON sont identiques.

Dans la région controlatérale, nous n'observons pas de baisse de la vitesse des ondes de cisaillement durant les périodes ON des acquisitions, excepté sur l'acquisition n°5 où la vitesse passe de 3.08 m/s (OFF) à 3.03 m/s (ON). La valeur moyenne des vitesses calculée sur toutes les acquisition durant les intervalles OFF est de $v_{controlat}^{OFF} = 2.81$ m/s .

Nous avons trouvé cette même valeur moyenne pour les vitesses durant les stimulations:
 $v_{controlat}^{ON} = 2.81 \text{ m/s}$.

Nous observons une variabilité importance dans la distribution de valeurs de vitesses au cours des acquisitions dans les deux régions étudiées. Cependant, cette différence entre régions n'est **pas significative**. En appliquant un t-test entre toutes les valeurs de vitesse de la région activée et toutes les valeurs de vitesse de la région controlatérale, nous trouvons une p valeur de $p = 0.15$.

Ces premiers résultats suggèrent donc une légère diminution de la vitesse des ondes de cisaillement (donc une diminution de dureté) **dans les zones activées pendant la stimulation**. Cette diminution n'a pas été observée dans les zones controlatérales aux régions activées. De plus, bien que les vitesses obtenues varient d'une région à l'autre: cette variabilité n'est pas significative.

Rat 2

Pour le rat 2, nous avons effectué cinq acquisitions de stimulations des moustaches droites. Nous avons réalisé la solution n°2 de tirs focalisés (tirs au centre)(voir Figure 71.a). Des tirs latéraux ont également été réalisés, mais le tir de droite a été positionné trop à l'extérieur du cerveau durant cette expérience ce qui ne nous a pas permis de mesurer la vitesse dans la région controlatérale à l'activation. Nous ne présentons donc ici en Figure 71.c et d. que les résultats des tirs centraux dans le cerveau du rat 2. Les tirs centraux permettent la propagation d'ondes de cisaillement dans les deux hémisphères: nous avons donc également mesuré ces vitesses dans quatre conditions: dans la région activée hors intervalle de stimulation (v_{activ}^{OFF}) et pendant stimulation (v_{activ}^{ON}); et dans la région controlatérale hors stimulation ($v_{controlat}^{OFF}$) et pendant stimulation ($v_{controlat}^{ON}$).

Dans la région activée: nous n'observons une diminution de la vitesse de cisaillement pendant les stimulations que sur deux acquisitions (sur total de 5 acquisitions). En moyenne, la vitesse pendant les stimulations ON est même légèrement plus grande ($v_{activ}^{ON}=2,58 \text{ m/s}$) que la vitesse hors stimulation ($v_{activ}^{OFF}=2,57 \text{ m/s}$). Cette augmentation de 0.6% n'est pas significative.

Dans la région controlatérale, nous n'observons pas non plus de tendance de changement de vitesse entre les intervalles OFF et ON. La faible diminution de vitesse ($v_{controlat}^{OFF} = 2,66m/s$ et $v_{controlat}^{ON} = 2,65m/s$) de 0.3% n'est pas significative.

La variabilité entre les valeurs de vitesses mesurées dans chaque groupe a été calculée comme non-significative (t-test).

Nous n'avons donc pas retrouvé au cours de cette deuxième expérience de stimulations de moustache les résultats observés chez le premier rat. C'est à dire, nous n'avons pas mesuré de diminution de vitesse du cortex préfrontal somatosensoriel lors de son activation. Nous discuterons de cette différence par rapport au rat 1 à la prochaine section de ce chapitre.

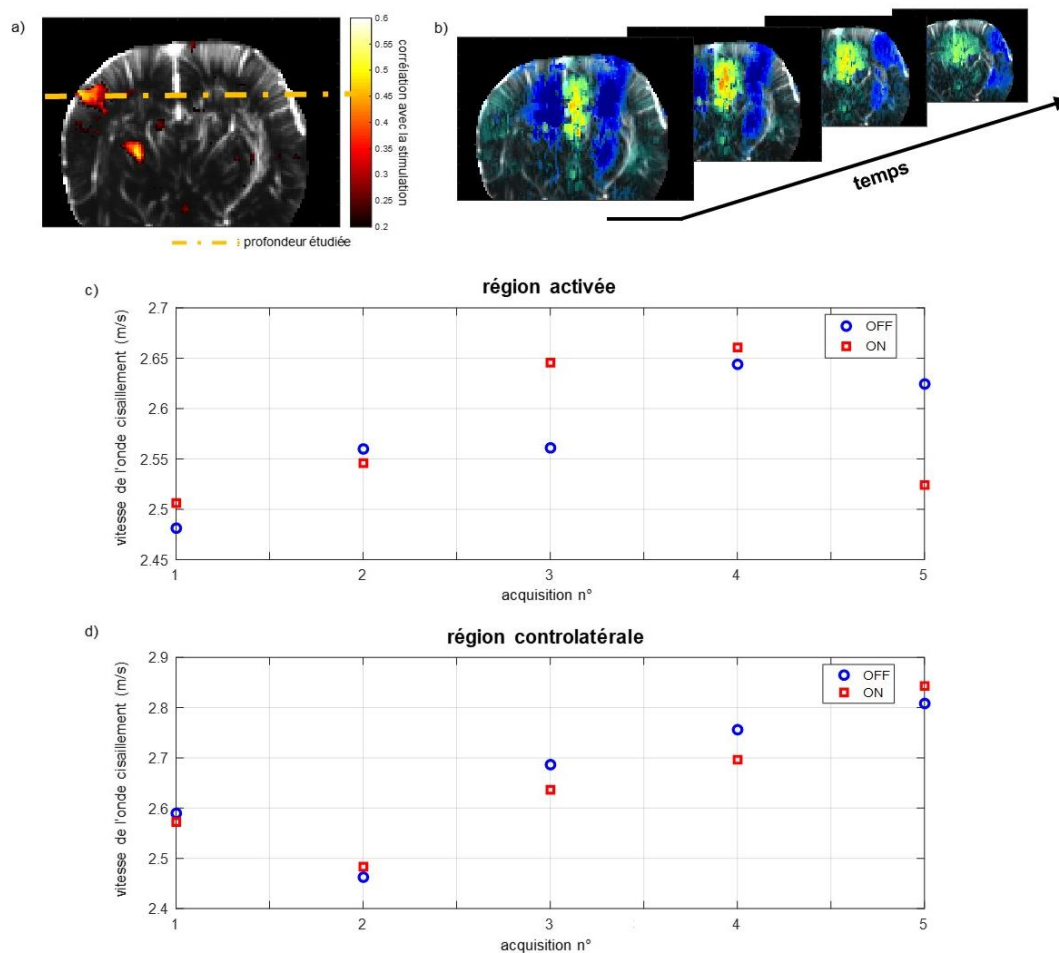


Figure 71. Résultats de l'expérience d'élastographie fonctionnelle suivant des stimulations de moustaches chez le rat 2. a) La mesure fUS contrôlée nous certifie bien que le S1BF et le VPM s'activent durant les stimulations. b) Les tirs réalisés dans cette expérience sont centraux. Les ondes de cisaillement se propagent alors de part et d'autre de sinus central. c) Distribution des valeurs de vitesse de cisaillement dans le cortex S1BF activé. Nous n'observons pas de variation significative des vitesses entre les intervalles ON et OFF c) Distribution des valeurs de vitesse de cisaillement dans la région controlatérale au cortex S1BF activé. Nous n'observons pas non plus de variations significatives entre les vitesses ON et OFF

4.3.2. Stimulation visuelle

Rat 3

Nous avons réalisé dix acquisitions de stimulations visuelles chez le rat 3. Nous avons ensuite calculé la vitesse des ondes de cisaillement après les deux tirs de focalisation effectués aux coordonnées +/-3mm du cerveau. Pour chaque acquisition, et chaque condition OFF ou ON, nous avons moyenné la valeur de vitesse de cisaillement obtenue par les deux tirs pour une estimation plus robuste de cette vitesse dans le colliculus. Les valeurs de vitesses durant les intervalles OFF et les intervalles ON ont été reportées sur le graphique Figure 72.b.

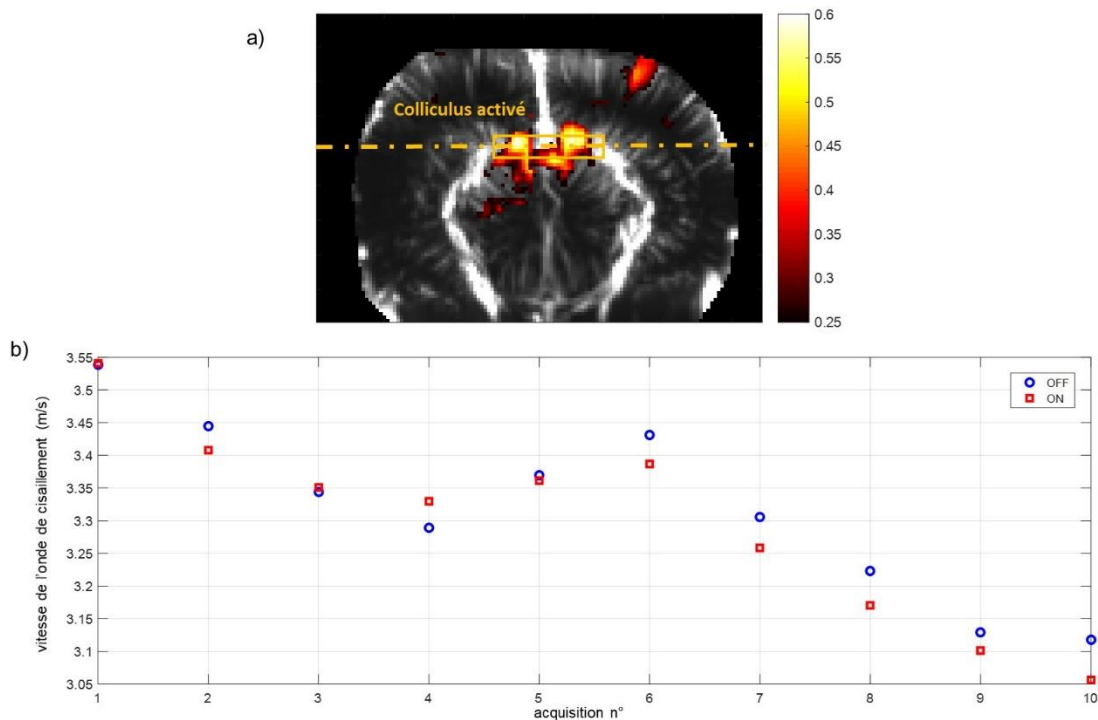


Figure 72. Résultats de l'expérience d'élastographie suivant des stimulations visuelles chez le rat n°3. a) On observe une forte activation du colliculus et une faible activation du cortex visuel droit. Nous nous sommes concentré sur la mesure des ondes de cisaillement dans le colliculus b) Distribution des valeurs de vitesse des ondes de cisaillement dans le colliculus au cours des acquisitions pendant les intervalles OFF et ON des stimulations. On observe une diminution de la valeur des vitesses durant les intervalles de temps ON.

Nous observons sur sept acquisitions (sur 10 acquisitions au total) une diminution de la vitesse des ondes de cisaillement lors de l'activation du colliculus. La vitesse moyenne pendant les stimulations ($v_{colliculus}^{ON} = 3,29 \text{ m/s}$) est en effet inférieure à la vitesse

moyenne hors stimulation ($v_{colliculus}^{OFF} = 3,32 \text{ m/s}$) : cela ne représente cependant que 0.7% de diminution. Les deux groupes de vitesses OFF et ON sont très proches d'être significativement différents (ici, $p = 0.051$: les deux groupes auraient été significativement différents pour $p = 0.050$).

Enfin, nous pouvons constater une diminution progressive des valeurs de vitesses au fil des acquisitions.

4.3.3. Résumé des premiers résultats et interprétation

4.3.3.1. Résultats cohérents avec les études précédentes

Les résultats des trois expériences sont résumés en Figure 73 où sont reportées pour chaque rat les valeurs des vitesses des ondes de cisaillement traversant les régions d'intérêt (S1BF pour rat 1 et 2 et colliculus pour rat 3) pendant les intervalles OFF et les intervalles ON de stimulation.

On constate que pour les deux rats stimulés aux moustaches (rat 1 et rat 2), les valeurs des vitesses des ondes de cisaillement dans leurs cortex préfrontaux somatosensoriels (S1BF) sont stables et très proches d'un rat à l'autre: elles sont centrées autour de 2.88 m/s pour le rat 1 et 2.61 m/s pour le rat 2.

De plus, ces valeurs sont cohérentes avec les valeurs de module d'élasticité trouvé en 2011 par (Macé et al. 2010) : d'après la Figure 58, le module de Young du cortex est évaluée aux alentours de 20 kPa. D'après les équations (8) et (12), on a :

$$19. \quad E = 3 \cdot v_{cisail}^2 \cdot \rho$$

Donc ici :

$$\text{rat 1 : } E = 2 \times 2,88^2 \times 1 = 24,8 \text{ kPa}$$

$$\text{rat 2 : } E = 2 \times 2,61^2 \times 1 = 20,4 \text{ kPa}$$

La différence de valeur trouvée entre ces deux modules d'Young pourrait être due à une différence inter-animal. Des études futures devraient nous permettre de faire des statistiques plus robustes, mais ces premiers résultats cohérents avec l'étude d'élasticité déjà réalisée en élasticité SSI en 2010 sont encourageants.

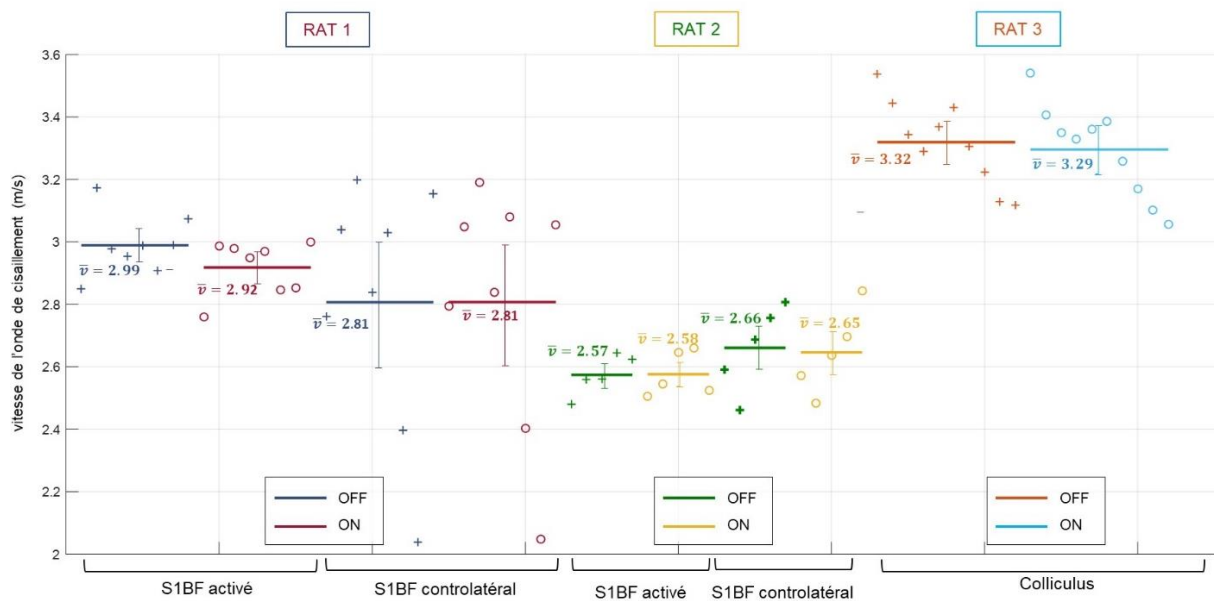


Figure 73. Vitesses des ondes de cisaillement dans les régions cérébrales étudiées des rats 1, 2 et 3. On constate que les vitesses estimées dans les S1BF des rats 1 et 2 sont du même ordre de grandeur ($\overline{v_{rat\ 1}} = 2.88\ m/s$ et $\overline{v_{rat\ 2}} = 2.61\ m/s$), tandis que les vitesses calculées dans le colliculus du rat 3 sont plus élevées ($\overline{v_{rat\ 1}} = 3.31\ m/s$), ce qui témoigne d'une plus grande rigidité pour le colliculus. Ces résultats sont cohérents avec les valeurs trouvées en 2010 par (Macé et al. 2010)

Pour le Rat 3, on peut observer que les vitesses de cisaillement estimées dans le colliculus sont plus élevées que celles estimées dans le S1BF des rats 1 et 2. En effet, la vitesse moyenne des ondes de cisaillement dans le colliculus est ici de 3,31 m/s, ce qui est équivalent à un module de Young de $E=30,8\ kPa$. Toujours d'après (Macé et al. 2010), le corps calleux est effectivement évalué plus rigide que le cortex. Les valeurs trouvées dans l'étude de 2010 sont cependant plutôt aux environs de 25 kPa. Bien que nos valeurs trouvées diffèrent légèrement, cette tendance de corps calleux plus rigide par rapport au cortex (également mesurée en ERM) a bien été retrouvée.

4.3.3.2. Analyse des rapports de vitesse ON/OFF

Nous avons ensuite reportés en Figure 74 les pourcentages de diminution des vitesses durant les stimulations ON par rapport aux intervalles de repos OFF.

On retrouve la diminution significative observée en 4.3.1 des vitesses de cisaillement dans le S1BF activé pendant les stimulations du **rat 1**. Tandis que dans le S1BF controlatéral,

les vitesses entre les intervalles ON et OFF sont quasi-identiques. La différence entre ces deux rapports de vitesse est significative ($p = 0.03$).

Chez le rat 2, il n'y a pas de diminution significative des vitesses durant les stimulations dans la région activée. Il y a bien une différence de rapport de vitesses ON-OFF entre les deux S1BF bilatéraux, mais cette différence n'est pas significative.

Enfin, **chez le rat 3**, on observe une diminution de 0.7% des vitesses durant les stimulations par rapport aux vitesses hors stimulation, et cette diminution est proche de la significativité ($p = 0.051$).

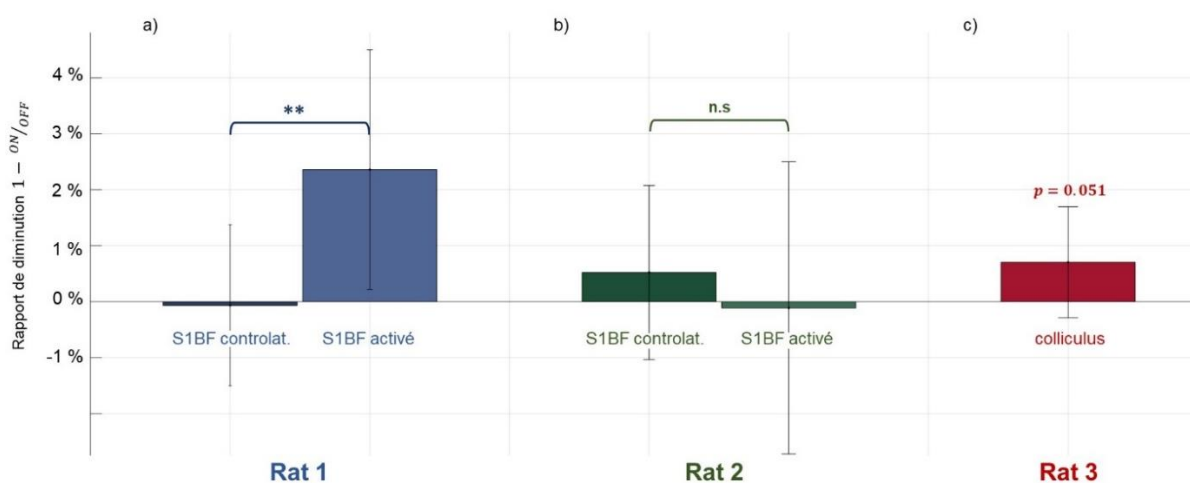


Figure 74. Histogramme des variations de vitesse de cisaillement entre les intervalles OFF et ON des stimulations [soit: $(1 - ON/OFF)$: en pourcentage]. a) Pour le rat 1, on observe une diminution de 2.4% des valeurs de vitesses de cisaillement dans la région activée pendant les intervalles ON. Cette variation est minime dans la région controlatérale (-0.07%). La différence entre ces deux rapport est significative ($p=0.03$). b) Pour le rat 2, nous n'observons pas de diminution significative de la vitesse entre les intervalles ON et OFF dans les régions activée et controlatérale du S1BF. Bien qu'il y ait une différence entre les rapports ON/OFF de ces deux régions, celle-ci n'est pas significative. c) Pour le rat 3, une diminution de 0.7% des vitesses dans le colliculus durant les stimulations est observée. Cette diminution est proche de la significativité ($p=0.051$)

Dans ces premiers résultats préliminaires, nous avons observé une diminution de la vitesse des ondes de cisaillement **dans les régions activées durant les stimulations** chez deux rats sur trois. Cette diminution est significative chez un rat (rat 1: $p=0.019$), et très proche de la significativité chez le deuxième ($p=0.051$; le seuil de significativité étant de 0.5). Cette diminution est faible (-2.4% pour le rat 1, -0.7% pour le rat 2), mais est significativement différente de la variation de vitesses ON/OFF dans la région controlatérale chez le rat 1 ($p=0.03$).

Nous n'avons pas observé de variation significative de vitesses hors et pendant les stimulations chez le rat 2. Comme piste de réflexion sur cette différence de résultat (par rapport aux résultats du rat 1), nous soulevons l'hypothèse que les ondes de cisaillement se propagent moins bien lorsqu'elles sont générées dans la région centrale du cerveau, c'est à dire dans le corps calleux. Nous avons vu en effet en section 4.1.2.1 que le corps calleux est une région très anisotrope du cerveau, et que cette différence de structure en change les propriétés biomécaniques. Pour appuyer cette hypothèse, nous présentons en Figure 75 la propagation des ondes de cisaillement à une profondeur p donnée (dans laquelle la région d'intérêt: S1BF se situe) lorsque les tirs focalisés ont été réalisés sur le côté gauche du cerveau (Figure 75.a), puis lorsque les tirs ont été réalisés aux centre du cerveau (Figure 75.b).

Nous pouvons constater dans la situation du tir latéral que la perturbation se propage unidirectionnellement dans la région S1BF à étudier et que le signal est peu bruité. Cependant, la propagation de l'onde de cisaillement est très absorbée plus loin, au passage entre les deux hémisphères: l'onde de cisaillement semble même arrêter sa propagation. Une hypothèse pourrait être que l'anisotropie du corps calleux tend à diffracter et absorber les ondes de cisaillement.

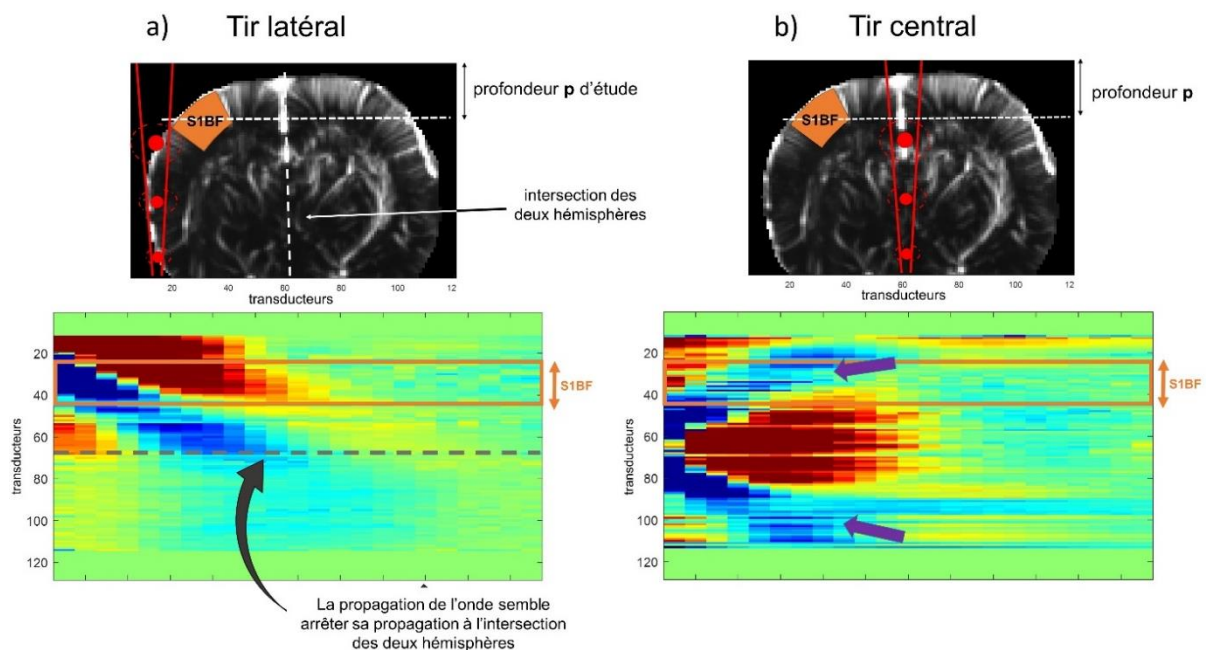


Figure 75. Carte de propagation d'ondes ondes de cisaillement générées par des tirs focalisés à deux positions: a) Sur le côté gauche du cerveau, juste à côté de la zone à étudier: la perturbation se propage linéairement dans le S1BF puis est arrêté à l'intersection des deux hémisphères. b) Au centre du cerveau: la perturbation est bruitée (voir flèche violette) à son passage dans le S1BF, ce qui diminue notre sensibilité pour en mesurer sa vitesse

Sur la Figure 75.b, on peut observer la propagation des ondes de cisaillement suite au tir central dans le cerveau. Cependant, on constate que leur propagation est rapidement altérée (flèches violettes) et le signal dans la région S1BF est bruité. L'hypothèse d'une mauvaise propagation des ondes de cisaillement dans le centre du cerveau à cette hauteur coronale expliquerait donc que la propagation des ondes de cisaillement se fasse plus difficilement.

Cette hypothèse du signal altéré dans la région d'intérêt lors du tir de focalisation au centre pourrait donc expliquer que nous avons manqué de sensibilité pour mesurer des variations de vitesse de cisaillement dans l'expérience de stimulation chez le rat 2. Des études futures seront nécessaires pour confirmer ou infirmer cette conjecture.

4.3.3.3. Conclusion de ces premiers résultats

Ces premières expériences nous ont permis de reproduire des mesures de dureté cérébrale dans des régions d'intérêts grâce à l'élastographie supersonique par ondes de cisaillement. Dans les régions étudiées, nous avons retrouvé des valeurs de module d'Young cohérentes avec l'étude faite en 2010 (Macé et al. 2010) également en élastographie SSI. Nous avons aussi mesuré une augmentation de la rigidité dans le centre du cerveau (corps calleux), ce qui a également été démontré en élastographie SSI et dans plusieurs études en ERM.

De plus, les premières analyses des résultats des expériences de stimulations fonctionnelles tendent donc à confirmer les observations faites par (Patz et al. 2019), à savoir qu'il y a une diminution de la dureté cérébrale durant les intervalles de stimulation fonctionnelle (notamment chez le rat 1 et le rat 3). Nous avons mesuré une diminution transitoire de la vitesse de cisaillement dans les régions fonctionnelles de 0.7% à 2.4%. Le Module d'Young étant proportionnel à la vitesse au carré des ondes de cisaillement (d'après l'équation (19)), cela équivaut à des variations de rigidités mesuré de 0.5% à 5.7%.

Contrairement à l'étude de (Patz et al. 2019), les variations ont été ici mesurées **dans les zones fonctionnelles activées** durant les stimulations alors que l'élasticité restait invariante dans les zones non activées. Si ces mesures de variation de dureté sont confirmées par des expériences futures, elles pourront donc très probablement être interprétées comme fonctionnellement liées à la stimulation, puisque localisées dans les zones d'activation.

4.4. Conclusion de ce chapitre

Dans ce chapitre, nous avons exploré un nouveau marqueur d'activation fonctionnelle avec les ultrasons. En se basant sur des travaux existants postulants sur la modification structurelle des régions cérébrales lors de leur activation, nous avons construit un dispositif expérimental afin d'évaluer avec les ultrasons la dureté de régions fonctionnelles lors de stimulation. Pour cela, nous avons mis en place un nouveau type de séquence ultrasonore combinant mesure hémodynamique et séquence élastographique dans le cerveau de rats trépanés anesthésiés. Cette séquence nous a permis d'une part, de vérifier les activations fonctionnelles des régions stimulées par acquisition Doppler et d'autre part, de générer des ondes de cisaillement dans le cerveau de rats trépanés puis d'en imager à haute cadence la propagation.

Sur les trois rats imagés, nous avons pu mesurer des valeurs d'élasticité (par le module d'Young) cohérentes avec les études d'élastographie SSI précédentes. Nous avons réalisé des expériences de stimulations fonctionnelles où les moustaches (rat 1 et rat 2) ou le système visuel (rat 3) ont été stimulés suivant un schéma ON/OFF. Pour N=2 rats, il a été mesuré une diminution de la vitesse de propagation des ondes de cisaillement dans les régions activées durant les intervalles ON de stimulation. Les acquisitions de vitesse de cisaillement dans ces régions ont été accompagnées de mesures dans les régions controlatérales afin d'apporter des données contrôles. Sur les deux rats pour lesquels cette mesure controlatérale a été possible (pas de mesure controlatérale possible quand le colliculus est la région étudiée), nous n'avons pas mesuré de différence significative des vitesses de cisaillement entre les intervalles stimulation ON et stimulation OFF.

Ces premiers résultats encourageants nécessitent d'être complétés par plus de données expérimentales afin de sortir de vraies tendances.

Cette nouvelle méthode d'imagerie ultrasonore nous permet d'explorer l'activité cérébrale fonctionnelle à travers une autre stratégie que l'observation de la dynamique vasculaire, ce qui pourrait nous dispenser d'étudier l'activité fonctionnelle par le prisme du couplage neurovasculaire. De plus, cette méthode pourrait également permettre d'étudier plus fondamentalement le couplage neurovasculaire, et notamment sa dynamique grâce à la séquence combinée hémodynamique-élastographique mise en place. En effet, cette séquence nous donne accès simultanément aux variations de CBV et à la dureté locale: si la variation de dureté est bien un effet direct de l'activité neuronale, les séquences ultra-rapides d'élastographie seront capables de la mesurer avec une excellente résolution

temporelle (cadence d'imagerie = 5 000 Hz). La dynamique du couplage neurovasculaire pourrait ensuite être très précisément évalué puisque nous avons simultanément accès aux variations du CBV.

Cette méthode d'imagerie nous semble prometteuse, et au-delà de la simple question posée dans ce chapitre sur la variation de dureté fonctionnelle, elle pourrait être utilisée pour d'autres études pour les neurosciences fondamentales.

4.5. Bibliographie du Chapitre 4

- Abe Y, Tsurugizawa T, Bihan DL (2017) Water diffusion closely reveals neural activity status in rat brain loci affected by anesthesia. *PLOS Biology* 15:e2001494. doi: 10.1371/journal.pbio.2001494
- Aki K, Richards PG (1980) *Quantitative Seismology Theory and Methods*. University Science Books
- Arani A, Murphy MC, Glaser KJ, et al (2015) Measuring the effects of aging and sex on regional brain stiffness with MR elastography in healthy older adults. *NeuroImage* 111:59–64. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.02.016
- Bercoff J, Chaffai S, Tanter M, et al (2003) In vivo breast tumor detection using transient elastography. *Ultrasound In Medicine and Biology* 29:1387–1396. doi: 10.1016/S0301-5629(03)00978-5
- Bercoff J, Tanter M, Fink M (2004) Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 51:396–409. doi: 10.1109/TUFFC.2004.1295425
- Bertrand-Grenier A (2015) Technologie — L'élastographie : cartographier le corps humain. *DIRE - La recherche à votre portée* 24:
- Boulet T, Kelso ML, Othman SF (2011) Microscopic magnetic resonance elastography of traumatic brain injury model. *Journal of Neuroscience Methods* 201:296–306. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.08.019

- Boulet T, Kelso ML, Othman SF (2013) Long-term in vivo imaging of viscoelastic properties of the mouse brain after controlled cortical impact. *Journal of neurotrauma* 30:1512–1520. doi: 10.1089/neu.2012.2788
- Cassinotto C, Lapuyade B, Mouries A, et al (2014) Non-invasive assessment of liver fibrosis with impulse elastography: Comparison of Supersonic Shear Imaging with ARFI and FibroScan®. *Journal of Hepatology* 61:550–557. doi: 10.1016/j.jhep.2014.04.044
- Chan HW, Pressler R, Uff C, et al (2014) A novel technique of detecting MRI-negative lesion in focal symptomatic epilepsy: Intraoperative ShearWave Elastography. *Epilepsia* 55:e30–e33. doi: 10.1111/epi.12562
- Chatelin S, Humbert-Claude M, Garteiser P, et al (2016) Cannabinoid receptor activation in the juvenile rat brain results in rapid biomechanical alterations: Neurovascular mechanism as a putative confounding factor. *J Cereb Blood Flow Metab* 36:954–964. doi: 10.1177/0271678X15606923
- Chauvet D, Imbault M, Capelle L, et al (2015) In Vivo Measurement of Brain Tumor Elasticity Using Intraoperative Shear Wave Elastography. *Ultraschall in Med* 37:584–590. doi: 10.1055/s-0034-1399152
- Cosgrove DO, Berg WA, Doré CJ, et al (2012) Shear wave elastography for breast masses is highly reproducible. *Eur Radiol* 22:1023–1032. doi: 10.1007/s00330-011-2340-y
- Feng Y, Clayton E, Okamoto R, et al (2016) A longitudinal magnetic resonance elastography study of murine brain tumors following radiation therapy. *Physics in medicine and biology* 61:6121–6131. doi: 10.1088/0031-9155/61/16/6121
- Freimann FB, Müller S, Streitberger K-J, et al (2013) MR elastography in a murine stroke model reveals correlation of macroscopic viscoelastic properties of the brain with neuronal density. *NMR in Biomedicine* 26:1534–1539. doi: 10.1002/nbm.2987
- Hermoye L, Saint-Martin C, Cosnard G, et al (2006) Pediatric diffusion tensor imaging: normal database and observation of the white matter maturation in early childhood. *Neuroimage* 29:493–504. doi: 10.1016/j.neuroimage.2005.08.017
- Hill DK (1950) The volume change resulting from stimulation of a giant nerve fibre. *The Journal of Physiology* 111:304–327. doi: 10.1113/jphysiol.1950.sp004481

- Hiscox LV, Johnson CL, Barnhill E, et al (2016) Magnetic resonance elastography (MRE) of the human brain: technique, findings and clinical applications. *Phys Med Biol* 61:R401–R437. doi: 10.1088/0031-9155/61/24/R401
- Holthoff K, Witte O (1996) Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J Neurosci* 16:2740–2749. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-08-02740.1996
- Iwasa K, Tasaki I, Gibbons RC (1980) Swelling of nerve fibers associated with action potentials. *Science* 210:338–339. doi: 10.1126/science.7423196
- Jamin Y, Boulton JKR, Li J, et al (2015) Exploring the Biomechanical Properties of Brain Malignancies and Their Pathologic Determinants *In Vivo* with Magnetic Resonance Elastography. *Cancer Res* 75:1216–1224. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1997
- Klein C, Hain EG, Braun J, et al (2014) Enhanced Adult Neurogenesis Increases Brain Stiffness: In Vivo Magnetic Resonance Elastography in a Mouse Model of Dopamine Depletion. *PLoS One* 9:. doi: 10.1371/journal.pone.0092582
- Korkotian E, Segal M (2001) Spike-Associated Fast Contraction of Dendritic Spines in Cultured Hippocampal Neurons. *Neuron* 30:751–758. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00314-2
- Landolt H-P, Holst SC (2016) Ionic control of sleep and wakefulness. *Science* 352:517–518. doi: 10.1126/science.aaf8178
- Lim D-J, Luo S, Kim M-H, et al (2012) Interobserver Agreement and Intraobserver Reproducibility in Thyroid Ultrasound Elastography. *American Journal of Roentgenology* 198:896–901. doi: 10.2214/AJR.11.7009
- Macé E, Cohen I, Montaldo G, et al (2010) In Vivo Mapping of Brain Elasticity in Small Animals Using Shear Wave Imaging. *IEEE transactions on medical imaging* 30:550–8. doi: 10.1109/TMI.2010.2079940
- Majumdar S, Klatt D (2017) In vivo cerebral MR elastography in a mouse model of Alzheimer’s disease: preliminary results
- Millward JM, Guo J, Berndt D, et al (2015) Tissue structure and inflammatory processes shape viscoelastic properties of the mouse brain. *NMR in Biomedicine* 28:831–839. doi: 10.1002/nbm.3319
- Munder T, Pfeffer A, Schreyer S, et al (2018) MR elastography detection of early viscoelastic response of the murine hippocampus to amyloid β accumulation and

- neuronal cell loss due to Alzheimer's disease. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 47:105–114. doi: 10.1002/jmri.25741
- Muthupillai R, Lomas DJ, Rossman PJ, et al (1995) Magnetic resonance elastography by direct visualization of propagating acoustic strain waves. *Science* 269:1854–1857. doi: 10.1126/science.7569924
- Nicholson C, Hrabětová S (2017) Brain Extracellular Space: The Final Frontier of Neuroscience. *Biophysical Journal* 113:2133–2142. doi: 10.1016/j.bpj.2017.06.052
- Patz S, Fovargue D, Schregel K, et al (2019) Imaging localized neuronal activity at fast time scales through biomechanics. *Science Advances* 5:eaav3816. doi: 10.1126/sciadv.aav3816
- Paxinos G, Watson C (1982) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier
- Pfefferbaum A, Sullivan EV (2003) Increased brain white matter diffusivity in normal adult aging: Relationship to anisotropy and partial voluming. *Magnetic Resonance in Medicine* 49:953–961. doi: 10.1002/mrm.10452
- Riek K, Millward J, Hamann I, et al (2012) Magnetic resonance elastography reveals altered brain viscoelasticity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *NeuroImage : clinical* 1:81–90. doi: 10.1016/j.nicl.2012.09.003
- Rusakov DA, Fine A (2003) Extracellular Ca²⁺ Depletion Contributes to Fast Activity-Dependent Modulation of Synaptic Transmission in the Brain. *Neuron* 37:287–297
- Sang L, Wang X, Xu D, Cai Y (2017) Accuracy of shear wave elastography for the diagnosis of prostate cancer: A meta-analysis. *Sci Rep* 7:1–8. doi: 10.1038/s41598-017-02187-0
- Schregel K, Nazari N, Nowicki MO, et al (2018) Characterization of glioblastoma in an orthotopic mouse model with magnetic resonance elastography. *NMR in Biomedicine* 31:e3840. doi: 10.1002/nbm.3840
- Schregel K, Wuerfel née Tysiak E, Garteiser P, et al (2012) Demyelination reduces brain parenchymal stiffness quantified in vivo by magnetic resonance elastography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:6650–6655. doi: 10.1073/pnas.1200151109
- Svoboda J, Syková E (1991) Extracellular space volume changes in the rat spinal cord produced by nerve stimulation and peripheral injury. *Brain Research* 560:216–224. doi: 10.1016/0006-8993(91)91235-S

- Tanter M, Bercoff J, Athanasiou A, et al (2008) Quantitative Assessment of Breast Lesion Viscoelasticity: Initial Clinical Results Using Supersonic Shear Imaging. *Ultrasound in Medicine & Biology* 34:1373–1386. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2008.02.002
- Tasaki I, Byrne PM (1983) Swelling of frog dorsal root ganglion and spinal cord produced by afferent volley of impulses. *Brain Research* 272:360–363. doi: 10.1016/0006-8993(83)90584-X
- Tsurugizawa T, Ciobanu L, Le Bihan D (2013) Water diffusion in brain cortex closely tracks underlying neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:.. doi: 10.1073/pnas.1303178110
- Vappou J, Breton E, Choquet P, et al (2008) Assessment of in vivo and post-mortem mechanical behavior of brain tissue using magnetic resonance elastography. *J Biomech* 41:2954–2959. doi: 10.1016/j.jbiomech.2008.07.034
- Walker WF, Friemel BH, Bohs LN, Trahey GE (1993) Real-time imaging of tissue vibration using a two-dimensional speckle tracking system. In: 1993 Proceedings IEEE Ultrasonics Symposium. pp 873–877 vol.2

Conclusion générale

Ces travaux de recherche ont permis d'étendre sur différents aspects les capacités de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) pour la recherche préclinique en neurosciences chez le petit animal. L'exploration de la connectivité et de la dynamique fonctionnelle chez le rongeur a été le fil conducteur de ce travail, qui s'est basé sur la modalité d'imagerie doppler ultra-rapide développée dans notre laboratoire il y a une dizaine d'années.

En premier lieu, nous avons étendu les capacités de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore à la détection d'altérations de la connectivité fonctionnelle induite pharmacologiquement chez la souris éveillée. Cette preuve de concept redéfinit les ultrasons fonctionnels comme nouvelle modalité d'imagerie pertinente pour l'étude de la connectomique et de ses altérations chez le petit animal éveillé pour la recherche fondamentale en neurosciences. Les connexions cérébrales étant intrinsèquement volumiques, une nouvelle méthode d'imagerie fonctionnelle 4D pour le suivi de l'activité cérébrale volumique chez le rongeur a également été développée durant ce projet de thèse. Cette extension de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore vers la troisième dimension étend considérablement les capacités d'explorations par ultrasons de la connectivité fonctionnelle pour la recherche préclinique fondamentale.

Enfin, parce que l'imagerie fUS mesure une expression indirecte de l'activité cérébrale via le couplage neurovasculaire, le dernier projet de ce travail de thèse s'est porté sur la possibilité de détecter une manifestation directe de l'activité neuronale avec les ultrasons. Nos premières observations seront à compléter avec plus de données, mais cette nouvelle modalité d'imagerie ultrasonore élastographique pourrait s'avérer devenir un nouvel outil préclinique pour l'étude des manifestations directes de la dynamique cérébrale.

Finalement, en implémentant de nouvelles séquences basées sur la physique acoustique, et en exploitant les données ultrasonores pour en extraire les informations sur l'activité cérébrale fonctionnelle, ces trois ans de thèse ont permis de proposer de nouvelles perspectives pour l'imagerie fonctionnelle ultrasonore afin d'étendre les capacités de l'exploration cérébrale fondamentale. Les études fondamentales et précliniques en neurosciences sont en effet essentielles pour la compréhension physiologique et le développement expérimental chez l'animal afin d'impacter finalement la pratique médicale.

Pour conclure ce manuscrit de façon plus personnelle, je souhaite exprimer combien ces trois années de thèse ont été extrêmement stimulantes et enrichissantes. Humainement,

j'ai eu la chance de travailler au sein d'une équipe formidable, brillante et dynamique et de bénéficier d'un encadrement stimulant et bienveillant. Initialement formée en physique plus fondamentale, j'ai pu approcher durant cette thèse des problématiques de neurosciences, et je nourris maintenant un réel intérêt pour la recherche à l'interface entre ces deux domaines.

Publications et Congrès

Publication dans des revues internationales à comité de lecture

Rabut C., Correia M., Finel V., Pezet S., Pernot M., Deffieux T., Tanter M. (2019) **4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents.** *Nat Methods*, *In press*

Publication dans des revues de proceedings sans comité de lecture

Sauvage J., Porée J., **Rabut C.**, Férin G., Flesch M., Rosinski B., Nguyen-Dinh A., Tanter M., Pernot M., Deffieux T., **Ultrafast 4D Doppler Imaging of the Rat Brain with a Large Aperture Row Column Addressed Probe**, 2018 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), Kobe, Japon

Heiles B., Hingot V., Rahal L., Lopez P., **Rabut C.**, Bergel A., Pernot M., Tanter M., Couture O., **Volumetric ultrafast Ultrasound Localisation Microscopy in vivo**, The 24th European symposium on Ultrasound Contrast Imaging (2019), Rotterdam, Hollande.

Présentations orales et posters en conférences internationales

ESMI's Imaging Technology Meeting (Topim Tech 2019) –Chania- Grèce

- 4D functional ultrasound imaging of the whole brain activity: first evidence in rodents (présentation orale)

Society for Neuroscience Meeting, 2018 San Diego, USA

- 4D functional ultrasound imaging of the whole brain activity: first evidence in rodents (poster)
- Demonstration of reproducible Pharmacological functional Ultrasound (PhfUS) imaging in a non anesthetized preclinical rodent model during scopolamine drug injection and reversal (poster)

IEEE IUS Meeting, 2018 Kobe, Japan

- 3D Multiplane Wave imaging in ultrafast ultrasound allowing 4D NeuroFunctional Ultrasound imaging (présentation orale)

European Molecular Imaging Meeting, EMIM 2018, San Sebastian, Spain

- Matrix Array technology for whole brain neurofunctional ultrasound imaging in rodents (présentation orale)

World Molecular Imaging Congress, 2017, Philadelphia, USA

- Functional Ultrasound imaging of brain connectivity in awake freely-moving mice (presentation orale)

IEEE IUS Meeting, 2017 Washington, USA

- Full 4D Functional Ultrasound Neuro-Imaging in rodents using a matrix array (presentation orale)

Acoustical Society of America Meeting, 2017 Boston, USA

- Full 3D dynamic functional ultrasound imaging of neuronal activity in rodent (presentation orale)

TOPIM Winter Conference of the ESMI –Les Houches- France

Toward full 3D functional ultrasound imaging of neuronal activity in rodents (presentation orale)

Distinctions

Best Student Paper Award of the IEEE IUS Society

2017 IEEE International Ultrasonics Symposium (> 1500 participants)

Septembre 2017, Washington, D.C. USA

Second Best Student Paper Award of the Acoustical Society of America

ASA Acoustics' 17 Boston meeting (>3000 participants)

Juin 2017, Boston, USA

Annexe

ROI's n°	Labels	ROI's n°	Labels	ROI's n°	Labels
1	'Cg1 R'	35	'RSD L'	69	'thalamus L'
2	'Cg2 R'	36	'PtPD L'	70	'subthalamic nucleus L'
3	'LPtA R'	37	'MPtA L'	71	'cingulate cortex, area 2 R'
4	'M1 R'	38	'M2 L'	72	'striatum R'
5	'M2 R'	39	'M1 L'	73	'globus pallidus R'
6	'MPtA R'	40	'LPtA L'	74	'entopeduncular nucleus R'
7	'PtPD R'	41	'Cg2 L'	75	'anterior commissure, anterior part R'
8	'RSD R'	42	'Cg1 L'	76	'anterior commissure, posterior part R'
9	'RSGb R'	43	'substantia nigra R'	77	'fornix R'
10	'RSGc R'	44	'commissure of the superior colliculus R'	78	'fimbria of the hippocampus R'
11	'S1BF R'	45	'superficial gray layer of the superior colliculus R'	79	'stria terminalis R'
12	'S1DZ R'	46	'periaqueductal gray R'	80	'corpus callosum and associated subcortical white matter R'
13	'S1FL R'	47	'deeper layers of the superior colliculus '	81	'cornu ammonis 3 R'
14	'S1HL R'	48	'posterior commissure R'	82	'dentate gyrus R'
15	'S1Sh R'	49	'brachium of the superior colliculus R'	83	'cornu ammonis 2 R'
16	'S1Tr R'	50	'pretectal region R'	84	'cornu ammonis 1 R'
17	'V1 R'	51	'pretectal region L'	85	'fasciola cinereum R'
18	'V1B R'	52	'brachium of the superior colliculus L'	86	'subiculum R'
19	'V1M R'	53	'posterior commissure L'	87	'subiculum L'
20	'V2ML R'	54	'deeper layers of the superior colliculus L'	88	'fasciola cinereum L'
21	'V2MM R'	55	'periaqueductal gray L'	89	'cornu ammonis 1 L'
22	'V2MM L'	56	'superficial gray layer of the superior colliculus L'	90	'cornu ammonis 2 L'
23	'V2ML L'	57	'commissure of the superior colliculus L'	91	'dentate gyrus L'
24	'V1M L'	58	'substantia nigra L'	92	'cornu ammonis 3 L'
25	'V1B L'	59	'subthalamic nucleus R'	93	'corpus callosum and associated subcortical white matter L'
26	'V1 L'	60	'thalamus R'	94	'stria terminalis L'
27	'S1Tr L'	61	'optic tract and optic chiasm R'	95	'fimbria of the hippocampus L'

28	'S1Sh L'	62	'hypothalamic region R'	96	'fornix L'
29	'S1HL L'	63	'stria medullaris of the thalamus R'	97	'anterior commissure, posterior part L'
30	'S1FL L'	64	'habenular commissure R'	98	'anterior commissure, anterior part L'
31	'S1DZ L'	65	'habenular commissure L'	99	'entopeduncular nucleus L'
32	'S1BF L'	66	'stria medullaris of the thalamus L'	100	'globus pallidus L'
33	'RSGc L'	67	'hypothalamic region L'	101	'striatum L'
34	'RSGb L'	68	'optic tract and optic chiasm L'	102	'cingulate cortex, area 2 L'
				103	'alveus of the hippocampus L'

Tableau: Régions d'intérêts pour l'étude de la connectivité 3D et numérotations utilisées pour les matrices de connectivité de l'étude fonctionnelle tridimensionnelle du Chapitre 2

