

Sommaire

I.	Introduction	2
I.1.	Le cerveau en bref.....	2
I.2.	Imagerie cérébrale chez le petit animal.....	4
I.2.1.	<i>Introduction à l'imagerie cérébrale et au couplage neurovasculaire</i>	<i>4</i>
I.2.2.	<i>Quelques techniques d'imagerie cérébrale utilisées chez le petit animal.....</i>	<i>5</i>
I.2.3.	<i>Imagerie par résonance magnétique (IRM)</i>	<i>6</i>
I.2.4.	<i>Récapitulatif.....</i>	<i>9</i>
I.3.	Imagerie ultrasonore conventionnelle.....	10
I.3.1.	<i>Principe de l'imagerie ultrasonore conventionnelle focalisée.....</i>	<i>10</i>
I.3.2.	<i>Imagerie Doppler focalisée.....</i>	<i>11</i>
I.4.	Imagerie ultrasonore ultrarapide	14
I.4.1.	<i>Principe de l'imagerie ultrasonore ultrarapide par émission d'ondes planes</i>	<i>14</i>
I.4.2.	<i>Imagerie Doppler ultrarapide : application à l'imagerie fonctionnelle cérébrale du petit animal (fUS)</i>	<i>16</i>
I.5.	Objectifs de la thèse.....	20
I.5.1.	<i>Développer une nouvelle séquence d'imagerie ultrasonore ultrarapide permettant d'augmenter le rapport signal-à-bruit</i>	<i>21</i>
I.5.2.	<i>Démontrer la possibilité d'utiliser l'échographie Doppler ultrarapide pour imager de façon transcrânienne et non invasive le cerveau de la souris et du raton.....</i>	<i>21</i>
I.5.3.	<i>Transposer l'utilisation du fUS de l'animal anesthésié à l'animal éveillé et en mouvement.....</i>	<i>22</i>
I.5.4.	<i>Démontrer la possibilité d'utiliser le fUS pour étudier la connectivité fonctionnelle chez un modèle de souris et dans différentes conditions d'éveil</i>	<i>23</i>
	Références du chapitre	24
II.	Nouvelle séquence d'imagerie ultrasonore ultrarapide permettant d'augmenter le rapport signal-à-bruit sans diminuer la cadence d'imagerie : le Multiplane Wave	28
II.1.	Introduction.....	28
II.2.	Principe de base de la séquence Multiplane Wave.....	29
II.2.1.	<i>Principe du Multiplane Wave pour le cas simple de 2 ondes planes</i>	<i>29</i>
II.2.2.	<i>Zone aveugle due à la durée d'émission.....</i>	<i>32</i>
II.2.3.	<i>Principe du Multiplane Wave pour N ondes planes, avec $N > 2$</i>	<i>32</i>
II.3.	Quantification des performances du Multiplane Wave par imagerie B-mode sur un fantôme d'imagerie	34
II.3.1.	<i>Configuration permettant une grande cadence d'imagerie : utilisation d'un petit nombre d'ondes planes (N variant de 2 à 8 ondes planes)</i>	<i>36</i>
II.3.2.	<i>Configuration permettant une grande qualité d'imagerie à des cadences plus faible : utilisation d'un grand nombre d'ondes planes (N variant de 8 à 32 ondes planes).....</i>	<i>38</i>
II.4.	Application du Multiplane Wave à des modalités d'imagerie nécessitant une grande cadence d'imagerie	40

II.4.1.	Application à l'élastographie par onde de cisaillement sur un fantôme de sein.....	40
II.4.2.	Application à l'imagerie Doppler ultrarapide in vivo sur un cerveau de rat anesthésié..	44
II.5.	Discussion et conclusion	47
	Références du chapitre	52
III.	Imagerie Doppler ultrarapide transcrânienne non invasive chez la souris et le raton.....	56
III.1.	Introduction.....	56
III.2.	Protocole expérimental	57
III.2.1.	Préparation des animaux.....	57
III.2.2.	Montage expérimental.....	59
III.2.3.	Séquences d'acquisition ultrasonores	60
III.3.	Imagerie vasculaire cérébrale transcrânienne complètement non invasive chez la souris	61
III.3.1.	Tomographie et visualisation 3D du cerveau complet de la souris de manière non invasive	61
III.3.2.	Imagerie vasculaire cérébrale transcrânienne de la souris au cours de son développement	62
III.4.	Imagerie vasculaire cérébrale transcrânienne du raton au cours du développement	63
III.5.	Discussion et conclusion	64
	Références du chapitre	67
IV.	Imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide (fUS) chez le petit animal éveillé et en mouvement.....	70
IV.1.	Introduction : intérêt de développer de nouvelles techniques permettant d'imager le cerveau d'un animal éveillé et en mouvement.....	70
IV.1.1.	Limites des techniques d'imagerie actuelles	70
IV.1.2.	L'imagerie fUS chez le rat éveillé et en mouvement.....	72
IV.1.3.	Passage du modèle « rat » au modèle « souris » : enjeux et difficultés.....	73
IV.2.	Imagerie fonctionnelle transcrânienne du cerveau de la souris éveillée et libre de ses mouvements	74
IV.2.1.	Présentation du protocole expérimental et du montage expérimental associé	74
IV.2.2.	Amélioration de la séquence d'imagerie pour résoudre un problème d'artéfact lié aux mouvements de la mâchoire de la souris.	78
IV.2.3.	Imagerie fonctionnelle par stimulation des vibrisses de la souris.....	80
IV.3.	Discussion et conclusion	82
	Références du chapitre	85
V.	Etude de la connectivité fonctionnelle chez la souris par imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide (fUS).....	88
V.1.	Introduction.....	88

V.1.1.	<i>Qu'est-ce que la connectivité fonctionnelle ?</i>	88
V.1.2.	<i>Acquisition et post-traitement classiques des données acquises par rsfMRI</i>	90
V.1.3.	<i>Vers l'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris éveillée par imagerie fUS ...</i>	91
V.1.4.	<i>Légende des abréviations des structures fonctionnelles cérébrales étudiées dans ce chapitre</i>	94
V.2.	<i>Preuve de concept : étude de la connectivité fonctionnelle grâce au fUS chez la souris anesthésiée de façon non invasive</i>	95
V.2.1.	<i>Matériels et méthodes</i>	95
V.2.2.	<i>Résultats</i>	96
V.3.	<i>Etude de la connectivité fonctionnelle chez la souris dans différents états d'éveil...</i>	99
V.3.1.	<i>Montage et protocole expérimental</i>	99
V.3.2.	<i>La connectivité fonctionnelle sur souris éveillées : optimisation du post-traitement ...</i>	105
V.3.3.	<i>Modification de la connectivité fonctionnelle en fonction de l'état d'éveil</i>	113
V.3.4.	<i>Modification de la connectivité fonctionnelle post stimulation : vers l'étude du DMN</i>	116
V.1.	<i>Discussion et conclusion</i>	121
	<i>Références du chapitre</i>	128
VI.	Conclusion générale	134
VI.1.	<i>Résumé de la thèse</i>	134
VI.2.	<i>Perspectives de la thèse</i>	137
VI.3.	<i>Publications</i>	139
VI.4.	<i>Présentations orales en conférences internationales</i>	140
	<i>Références du chapitre</i>	141

CHAPITRE I :

Introduction

I. Introduction

I.1. Le cerveau en bref

Le **cerveau**, situé dans la cavité de la boîte crânienne chez les vertébrés, est le principal organe du **système nerveux central (SNC)**. Le SNC comprend l'encéphale (regroupement du cervelet, cerveau et tronc cérébral) et la moelle épinière, les autres structures anatomiques du système nerveux (nerfs crâniens et nerfs rachidiens) étant regroupées sous le terme de système nerveux périphérique (SNP).

La fonction première du cerveau est d'intégrer les informations sensorielles qui lui parviennent, de contrôler la motricité du corps et d'assurer des fonctions cognitives, mais il joue aussi un rôle au niveau de la régulation hormonale. Il possède une structure très complexe bien que le tissu cérébral ne soit composé que de deux types de cellules : les **neurones** et les **cellules gliales**. Les neurones assurent le rôle de traitement et de transmission de l'information nerveuse, tandis que les cellules gliales ont un rôle centré autour du support et de la protection des neurones et de leurs fonctions. Les neurones (**Figure I-1 (a)**) peuvent communiquer entre eux sur de longues distances par le biais de l'axone : un long bras qui s'étend depuis le corps cellulaire du neurone jusqu'à d'autres neurones (mais aussi jusqu'à d'autres cellules pouvant être non neuronales : muscles ou glandes) avec lesquels il établit des connexions appelées **synapses**. Chaque axone peut établir jusqu'à plusieurs milliers de connexions synaptiques. Les neurones possèdent également un autre type de « bras » appelé « **dendrites** », sortes de branches ramifiées qui recueillent l'information et l'acheminent vers le corps de la cellule (**Figure I-1 (a)**).

Les signaux transmis par l'axone sont des signaux électrochimiques connus sous le nom de **potentiels d'action**. Ces potentiels d'actions durent moins d'un millième de seconde et voyagent à travers l'axone à des vitesses pouvant aller jusqu'à 100 m/s. Au niveau de la synapse, l'arrivée du potentiel d'action provoque la libération de neurotransmetteurs, messagers chimiques pouvant se lier aux récepteurs membranaires de la cellule cible et pouvant provoquer son excitation ou au contraire son inhibition.

La plupart des axones sont entourés d'une gaine de myéline de couleur blanche et sont regroupés sous forme de faisceaux de fibres nerveuses. Les zones du cerveau dans lesquelles on retrouve une forte densité de ces fibres nerveuses font parties de ce qu'on nomme communément la « substance blanche », tandis que les zones cérébrales dans lesquelles on retrouve majoritairement les corps cellulaires des neurones, plutôt de couleur grise, font parties de la « substance grise ».

Au niveau macroscopique le cerveau se décompose en deux hémisphères cérébraux qui agissent de façon controlatérale : l'hémisphère droit contrôle le côté gauche du corps et inversement. En surface des deux hémisphères cérébraux se trouve la partie du cerveau appelé « cortex cérébral » (**Figure I-1 (b)**), majoritairement formé de substance grise. Le cortex cérébral se divise en de nombreuses aires fonctionnelles assurant chacune une fonction cognitive précise. On distingue les aires sensorielles (cortex auditif, cortex visuel...), les aires motrices et les aires dites d'association (regroupement des aires n'étant ni motrices ni sensorielles, soit une large gamme de fonctions très diverses). Pour de nombreuses espèces il est aujourd'hui possible de trouver des atlas cartographiant les différentes aires cérébrales de façon plus ou moins précises. Chez le rat et la souris, l'atlas de référence actuellement est l'**atlas Paxinos**, du nom d'un de ses auteurs (Paxinos and Watson 1982; Franklin and Paxinos 1997 -pour leurs premières versions- Paxinos and Watson 2007; K. B. J. Franklin and Paxinos 2008 –3^{ème} version de l'atlas souris et 6^{ème} version de l'atlas rat, utilisées actuellement au laboratoire). Les différentes aires cérébrales y sont répertoriées au sein de **coupes coronales ou sagittales (Figure I-1 (c))** et chaque coupe est repérée dans un système de coordonnées de stéréotaxie par rapport à deux sutures visibles au niveau de l'os du crâne : **Lambda et Bregma (Figure I-1 (d))**. D'autres atlas plus récents permettent également de visualiser le cerveau de la souris en 3 dimensions,

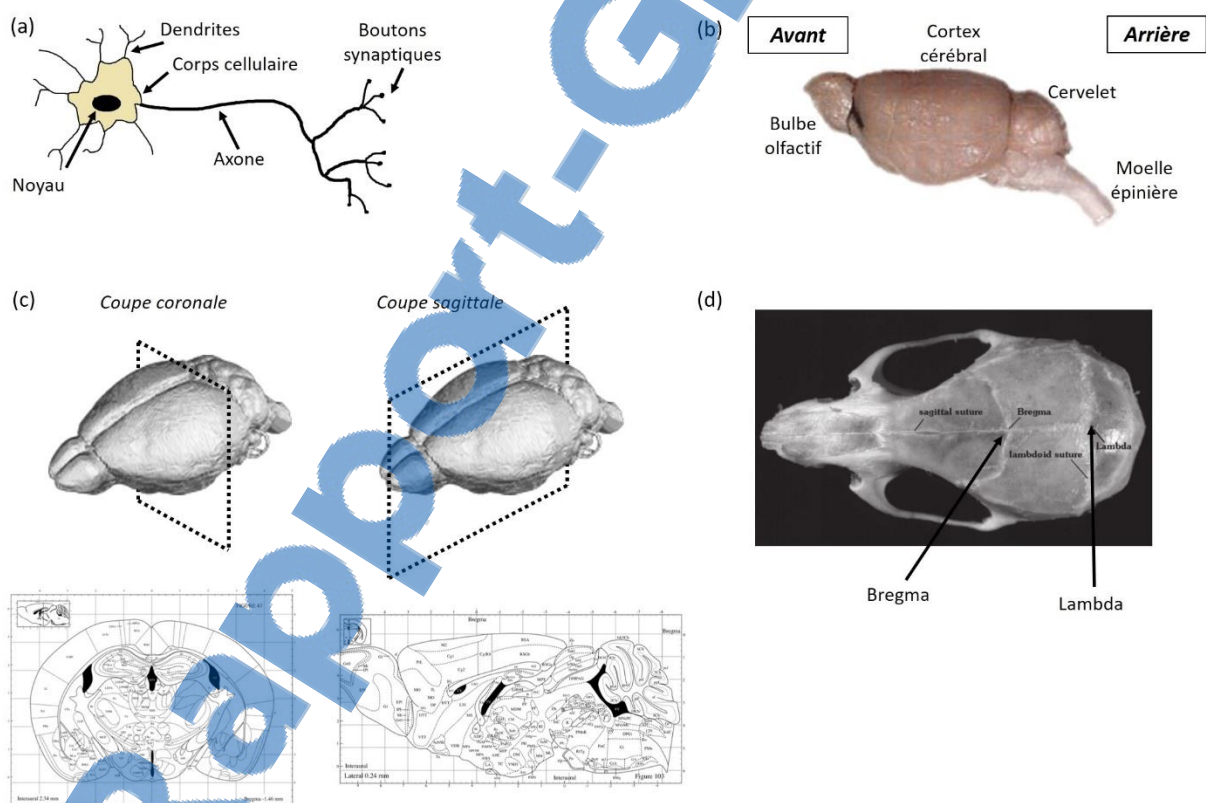


Figure I-1 : (a) Schéma d'un neurone. (b) Photographie d'un cerveau de souris. (c) Première ligne : schéma d'un cerveau de souris et visualisation de la définition d'une coupe coronale et d'une coupe sagittale. Deuxième ligne : allure d'une coupe coronale et d'une coupe sagittale extraites de l'atlas Paxinos souris. (d) Visualisation des repères Bregma et Lambda sur le crâne d'une souris.

c'est le cas du *Allen Mouse Brain volumetric atlas*, accessible depuis internet (<http://mouse.brain-map.org/>).

Aujourd'hui 1 personne sur 8 en Europe est concernée par les maladies du système nerveux, chiffre qui va encore augmenter avec le vieillissement de la population (sources : Organisation Mondiale de la Santé, European Brain Council, Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut du Cerveau et de la Moelle, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau, et Union Nationale des Associations de Familles de Traumatisés Crâniens et cérébro-lésés). Les différentes pathologies affectant le système nerveux peuvent être regroupées sous trois groupes : les **maladies neurodégénératives** (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson...), les **maladies psychiatriques** (dépression, schizophrénie, addiction, autisme...) et les **traumatismes du cerveau et de la moelle épinière** (traumatisme crânien, lésion de la moelle épinière...). Devant le nombre de personnes concernées et la diversité des pathologies existantes, la recherche médicale (clinique et préclinique) dans le domaine des neurosciences est d'un enjeu considérable aujourd'hui. La recherche préclinique sur des modèles animaux est une étape clé dans le développement de nouveaux médicaments qui ne peuvent pas être directement administrés et testés sur l'Homme sain ou malade. Dans le domaine des neurosciences, l'expérimentation animale est aussi utilisée pour des recherches plus fondamentales : en effet, le cerveau reste encore à l'heure d'aujourd'hui un organe complexe dont le fonctionnement soulève bien des questions. Cette thèse s'inscrit donc dans un besoin constant d'innover et d'améliorer les techniques d'imagerie cérébrale utilisées chez le petit animal afin d'aller encore plus loin dans la compréhension du fonctionnement du cerveau sain ou malade, mais aussi dans l'efficacité des futurs traitements thérapeutiques.

I.2. Imagerie cérébrale chez le petit animal

I.2.1. Introduction à l'imagerie cérébrale et au couplage neurovasculaire

Dans le domaine de l'imagerie cérébrale, ou neuroimagerie, on distingue généralement l'imagerie **anatomique** cérébrale de l'imagerie **fonctionnelle** cérébrale. La première concerne la mise en évidence des structures cérébrales et leurs modifications éventuelles : lésions, tumeurs, hémorragies... L'imagerie fonctionnelle étudie quant à elle le cerveau en action, son fonctionnement. Même si les deux vont de pair, l'imagerie fonctionnelle reste donc surtout utilisée dans un contexte de recherche fondamentale, visant à mieux comprendre le rôle des diverses structures cérébrales, tandis que l'imagerie anatomique est plus classiquement réalisée lors d'exams cliniques. Si l'imagerie

anatomique peut facilement être imaginée comme une photographie du cerveau à un instant t, l'imagerie fonctionnelle repose plutôt sur une vision du cerveau sous un aspect dynamique.

Lorsqu'une personne effectue une tâche cognitive particulière son activité cérébrale se traduit par une augmentation de l'activité des neurones, dans les zones cérébrales impliquées dans cette tâche. A l'échelle microscopique, au niveau des neurones concernés, il est possible de mesurer les variations chimiques mais aussi électriques qui ont lieu localement. Mais cette augmentation d'activité entraîne également une augmentation des demandes métaboliques des neurones, et par ricochet une augmentation du flux sanguin dans les zones cérébrales concernées, notamment afin d'apporter la quantité d'oxygène nécessaire. C'est ce qu'on appelle le **couplage neurovasculaire** : une augmentation de l'**activité neuronale** se traduit donc par des modifications observables à l'**échelle vasculaire**. Plusieurs paramètres sont modifiés et peuvent être mesurés au niveau vasculaire lors de l'activation neuronale : le taux d'oxygénation du sang, le volume, le débit sanguin... ces paramètres peuvent être regroupés sous le terme de « **réponse hémodynamique** ». La réponse hémodynamique (de l'ordre de la seconde) est bien plus lente que la réponse neuronale (de l'ordre de la milliseconde), à cause de la dynamique de dilatation des vaisseaux sanguins. Cependant elle est bien localisée et permet donc de mettre en évidence les zones cérébrales activées. Aujourd'hui, un très grand nombre de techniques d'imagerie cérébrale reposent sur ces signaux hémodynamiques résultant du couplage neurovasculaire.

1.2.2. Quelques techniques d'imagerie cérébrale utilisées chez le petit animal

Parmi les techniques se basant sur l'observation de modifications hémodynamiques, on peut citer notamment de nombreuses **méthodes optiques** : spectroscopie proche infrarouge (*Near Infrared Spectroscopic Imaging*, NIRS), signal optique intrinsèque (*Intrinsic Optical Signal*, IOS), *laser Doppler* ou encore l'imagerie bi-photonique (également appelée imagerie 2-photon). L'inconvénient majeur de ces méthodes est la faible profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus et donc un champ de vue souvent limité au cortex superficiel. Souvent un amincissement du crâne ou une craniotomie est nécessaire, ce qui rend la plupart de ces méthodes invasives (et non applicable en clinique). Cependant, ces méthodes optiques ont en commun une très bonne résolution temporelle (de l'ordre de la ms), une bonne sensibilité, et une bonne résolution spatiale, allant du micromètre pour le 2-photon et l'IOS au millimètre pour le laser Doppler (seul le NIRS présente une résolution spatiale moindre : du millimètre au centimètre). De plus, dans le cadre de l'expérimentation sur le petit animal la miniaturisation des systèmes optiques favorise l'expansion de systèmes permettant des acquisitions sur animaux éveillés et mobiles à l'aide d'endoscopes implantés (ou sur des animaux éveillés avec tête-fixée).

D'autres méthodes permettent des mesures directes de l'activité électrique neuronale. Parmi les techniques d'**électrophysiologie** on peut citer l'électroencéphalographie (EEG, mesurant une différence de potentiel électrique entre deux points dans le cerveau), et la magnétoencéphalographie (MEG, détectant des variations de champs magnétiques induits par les courants créés lors de l'activation des neurones). Cette dernière technique est très peu utilisée chez le petit animal car sa résolution spatiale n'est pas suffisante. L'EEG, au contraire, est largement utilisée chez le petit animal et présente l'avantage de pouvoir être utilisée sur des animaux éveillés et en mouvement. En utilisant un grand nombre d'électrodes une cartographie relativement précise de l'activité électrique du cerveau peut être obtenue, et ce avec une très bonne résolution temporelle. Cependant, l'EEG n'est pas une technique d'imagerie à proprement parlé puisqu'aucune image n'est obtenue. Souvent, il peut donc être intéressant de coupler cette technique d'électrophysiologie à une autre technique d'imagerie cérébrale afin de combiner les différentes sources d'information.

Bien que de nombreuses techniques d'imagerie cérébrale existent, le système d'imagerie cérébrale de référence depuis les années 1990 reste actuellement l'**imagerie par résonance magnétique** (IRM).

I.2.3. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Principe de l'IRM

L'imagerie par résonance magnétique est utilisée en clinique depuis les années 1980-90. Son principe repose sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire, c'est-à-dire sur le couplage entre le moment magnétique du noyau des atomes et le champ magnétique externe. Le champ magnétique externe est produit par un aimant de très grande puissance. De manière simplifiée, les noyaux d'hydrogène présents dans les tissus de l'organisme renferment des protons, qui sous l'effet du champ magnétique vibrent et se comportent comme de petits aimants. En vibrant, ils émettent des signaux qui sont captés par une antenne et transformés en image. Dans le domaine de l'imagerie médicale l'intensité du champ magnétique produit par l'aimant est comprise entre 0.1 et 7 T (sachant que 1.6 T équivaut à 30 000 fois le champ magnétique terrestre). Dans le domaine de la recherche, des études précliniques et cliniques sont réalisées sur l'Homme avec des IRM ayant une intensité jusqu'à 11.7 T, tandis que sur le petit animal les intensités peuvent être supérieures à 17 T. L'augmentation de l'intensité du champ magnétique permet d'augmenter la résolution spatiale de l'appareil, qui peut descendre en dessous du millimètre avec les champs les plus intenses.

En imagerie médicale, l'IRM est principalement utilisée pour l'étude du système nerveux central (regroupant le cerveau et la moelle épinière), les muscles (dont le cœur), et les tumeurs. Au niveau des applications cérébrales de l'IRM on peut distinguer plusieurs grands types d'acquisitions, notamment l'IRM de diffusion (aussi appelée DTI pour *Diffusion Tensor Imaging*), l'angiographie par IRM (MRA) et l'**IRM fonctionnelle (IRMf, ou fMRI en anglais pour *functional Magnetic Resonance Imaging*)**.

Le DTI repose sur l'observation des directions de diffusion des molécules d'eau. Dans le cerveau, les molécules d'eau ne peuvent pas diffuser dans n'importe quelle direction car elles sont contraintes par les tissus environnants. En observant la diffusion des molécules d'eau dans le cerveau il est donc possible d'obtenir, de manière indirecte, la position et l'orientation des faisceaux de fibres nerveuses. Le **DTI** permet donc d'observer les **connexions structurelles** qui existent entre les différentes aires du cerveau. C'est la seule technique permettant de faire cela *in vivo* de manière non invasive.

L'angiographie par IRM permet de visualiser les artères et est donc très couramment utilisée en clinique afin de détecter dans le cerveau des patients des anévrismes, des occlusions, ou encore des malformations artério-veineuses. **L'angiographie par IRM** permet donc de visualiser la **vascularisation cérébrale** et d'avoir une information structurelle.

L'IRM fonctionnelle permet, quant à elle, d'obtenir des informations sur le **fonctionnement cérébral**. C'est ce type d'acquisition qui nous intéresse plus particulièrement et que nous détaillons donc dans le paragraphe suivant.

L'IRM fonctionnelle (IRMf, fMRI en anglais)

Même s'il est également possible de mesurer localement des variations au niveau des volumes sanguins cérébraux (*Cerebral Blood Volume fMRI*) et des flux sanguins cérébraux (*Cerebral Blood Flow fMRI*), la séquence d'imagerie fonctionnelle par IRM la plus utilisée actuellement repose sur l'**effet BOLD** (*Blood Oxygenation Level Dependent*) (Ogawa et al. 1990) et sur les propriétés magnétiques de l'hémoglobine du sang (**Figure I-2**, Jonckers et al. 2015).

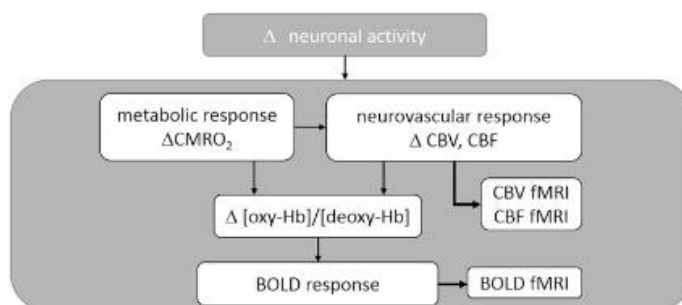


Figure I-2 : figure extraite de Jonckers et al. (2015). Légende : CMRO₂ : Cerebral Metabolic Rate of Oxygen consumption, CBV: Cerebral Blood Volume, CBF: Cerebral Blood Flow, BOLD: Blood Oxygenation Level Dependent.

L'hémoglobine existe sous deux formes : une forme oxygénée appelée oxyhémoglobine (HbO_2) et une forme désoxygénée appelée dé-oxyhémoglobine (HbR). Or, si l'oxyhémoglobine est diamagnétique comme la plupart des tissus biologiques, la forme désoxygénée est quant à elle paramagnétique. Cette molécule s'oriente donc dans le sens du champ magnétique externe et provoque une modification de la susceptibilité magnétique locale. Ainsi, quand la concentration en HbR augmente, le signal BOLD diminue (Ogawa et al. 1990; Buxton and Frank 1997). Quand une zone fonctionnelle cérébrale s'active, la consommation en oxygène augmente et donc dans un premier temps la concentration en HbR augmente. Cependant, les neurones activés ont besoin d'une quantité d'oxygène plus importante et une augmentation locale du débit sanguin est donc nécessaire. Cette augmentation locale du débit sanguin se traduit par une diminution de la concentration en HbR dans cette zone. Ainsi le signal BOLD augmente suite à l'activation neuronale (**Figure I-3**). C'est la découverte de cet effet BOLD qui a permis de réaliser dans les années 1990 les premières images du cerveau en fonctionnement (Belliveau et al. 1991; Bandettini et al. 1992; Kwong et al. 1992). L'IRM fonctionnelle permet aujourd'hui des études très poussées en neurosciences à la fois chez des sujets sains ou malades, que ce soit chez l'Homme ou chez des modèles animaux, notamment chez le petit animal (Jonckers et al. 2015).



Figure I-3 : Effet BOLD en imagerie par résonance magnétique fonctionnelle.

Avantages et inconvénients de l'IRMf dans le cadre de l'imagerie cérébrale chez le petit animal

Ces dernières années plusieurs variantes de la séquence classique d'IRMf BOLD ont été développées et ont permis d'atteindre des cadences de répétition d'imagerie allant jusqu'à 0.5 s et des résolutions spatiales inférieures au millimètre (pour plus de détails sur ces séquences d'imagerie fonctionnelle rapide ou haute résolution, consulter par exemple la revue de Feinberg and Yacoub 2012). Mais si l'on s'en tient à la séquence classique d'IRMf BOLD il convient de noter que par rapport aux techniques citées précédemment, telles que l'EEG ou la MEG notamment, l'IRMf fournit une information moins directe et avec une résolution temporelle moindre. Cependant, l'IRMf reste à l'heure actuelle la méthode d'imagerie qui fournit la meilleure résolution spatiale en 3 dimensions et à l'échelle du cerveau entier, par rapport aux techniques mentionnées précédemment. Elle possède également le grand avantage d'être une méthode complètement non invasive.

Le tableau ci-dessous (**Tableau 1**) résume les principales caractéristiques de l'IRMf BOLD et ses principaux avantages et inconvénients dans le cadre de l'imagerie cérébrale chez le petit animal.

Résolution spatiale	~ mm : limite pour l'imagerie chez le rat, insuffisante chez la souris
Résolution temporelle	~ s
Profondeur d'imagerie / champ de vue	Très bonne : Tout le volume du cerveau est accessible
Sensibilité	Mauvaise Nécessité de moyenner les signaux temporels en répétant le stimulus plusieurs fois
Portabilité	Aucune
Disponibilité de la technique pour les chercheurs	Mauvaise Peu d'appareil disponible et coût élevé
Etat de l'animal pendant l'acquisition	<ul style="list-style-type: none"> - Anesthésié le plus souvent - Eveillé possible mais avec contention
Invasivité	Non invasive

Tableau 1 : Principales caractéristiques, avantages (lignes surlignées en vert) et inconvénients (lignes surlignées en orange) de l'IRMf BOLD dans le cadre de l'expérimentation chez le petit animal.

I.2.4. Récapitulatif

Le tableau ci-dessous donne un bref récapitulatif des principaux avantages et inconvénients des différentes techniques d'imagerie cérébrale utilisées chez le petit animal dont nous avons parlé dans ce chapitre.

Technique d'imagerie cérébrale	Avantages	Inconvénients
Méthodes optiques	<ul style="list-style-type: none"> - Très bonne résolution temporelle (de l'ordre de la ms) - Bonne sensibilité - Bonne résolution spatiale (du μm au mm suivant la méthode) - Miniaturisation des systèmes optiques possible : possibilité de faire de l'imagerie sur animaux éveillés 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible profondeur de pénétration dans les tissus: champ de vue limité au cortex superficiel - Invasif : craniotomie ou amincissement du crâne
EEG	<ul style="list-style-type: none"> - Très bonne résolution temporelle (de l'ordre de la ms) - Mesure directe de l'activité électrique neuronale - Taille des électrodes : possibilité de faire de l'imagerie sur animaux éveillés 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'image, uniquement des signaux obtenus en différents points du cerveau
MEG	<ul style="list-style-type: none"> - Très bonne résolution temporelle (de l'ordre de la ms) - Mesure directe de l'activité électrique neuronale 	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution spatiale (de l'ordre du cm) insuffisante pour l'imagerie chez le petit animal
IRMf	<ul style="list-style-type: none"> - Non invasif - Très grand champ de vue : cerveau entier - Résolution spatiale et temporelle correcte (de l'ordre du mm et de la s) 	<ul style="list-style-type: none"> - Non portabilité et impossibilité de faire des acquisitions sur animaux mobiles - Coût élevé et faible disponibilité de la technique - Mauvaise sensibilité : nécessité de moyenner plusieurs fois les signaux temporels en répétant le stimulus

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des principaux avantages et inconvénients des différentes techniques d'imagerie cérébrale abordées dans ce chapitre et pouvant être utilisées chez le petit animal.

Dans le cadre de ma thèse j'ai utilisé une autre technique d'imagerie fonctionnelle très récemment développée par l'Institut Langevin, appelée **fUS**, pour « **functional ultrasound** » (Macé et al. 2011) et se positionnant comme un concurrent de l'IRMf pour l'imagerie chez le petit animal. Les deux parties suivantes vont nous permettre de comprendre le développement et le fonctionnement de cette toute nouvelle méthode d'imagerie cérébrale mais aussi de la situer par rapport à l'IRMf.

I.3. Imagerie ultrasonore conventionnelle

Le principe général de l'échographie est relativement simple. Un signal ultrasonore est envoyé dans le milieu à sonder. Cette onde ultrasonore rencontre au cours de sa propagation différents éléments du milieu qui la réfléchissent plus ou moins. Les échos rétrodiffusés sont enregistrés et permettent de reconstituer une image du milieu dans lequel l'onde s'est propagée. Les premières recherches sur les ultrasons ont tout d'abord été utilisées par Paul Langevin pour créer le SONAR et ont permis de détecter des sous-marins pendant la première guerre mondiale. Ce n'est qu'en 1942 qu'est décrit pour la première fois la possibilité d'utiliser les ondes ultrasonores dans un but médical afin de « voir » à l'intérieur du corps humain (Dussik 1942). En effet, les ultrasons permettent d'imager en profondeur dans le corps humain car les tissus biologiques sont relativement transparents dans une gamme de fréquence allant de quelques centaines de kHz à quelques MHz. En 1951, le premier échographe médical est mis au point par deux anglais. Depuis les années 60 la technique n'a cessé de se développer et différents modes d'imagerie ont peu à peu vu le jour. Le premier mode d'imagerie apparu, appelé imagerie **B-mode**, permet de cartographier l'échogénicité des tissus, propriété qui dépend de la masse volumique, du module de compressibilité et de la microstructure des tissus. L'imagerie B-mode permet donc d'obtenir une **image anatomique** des organes, des interfaces entre ceux-ci, mais aussi de détecter certaines malformations, kystes, ou encore de visualiser le fœtus dans le ventre de la mère... Peu après fut élaboré le mode **Doppler**, permettant de mesurer et visualiser les **flux sanguins**. Dans cette partie nous allons étudier l'imagerie ultrasonore conventionnelle, encore appelée imagerie focalisée ligne par ligne. Nous pourrions ainsi mieux comprendre dans la partie suivante comment le mode Doppler fut révolutionné par l'apparition de l'échographie dite « ultrarapide », ouvrant de nouvelles perspectives notamment dans le domaine des neurosciences.

I.3.1. Principe de l'imagerie ultrasonore conventionnelle focalisée

L'imagerie échographique repose sur l'effet piézo-électrique, découvert par Pierre et Jacques Curie dans les années 1880. En effet, les sondes ultrasonores classiques utilisées en clinique sont constituées d'un réseau 1D d'une centaine de transducteurs piézoélectriques (typiquement 128 ou

256 transducteurs). Les transducteurs piézoélectriques ont la propriété intéressante de pouvoir émettre une onde ultrasonore lorsqu'ils sont soumis à un courant électrique, et inversement de produire un signal électrique lorsqu'ils reçoivent une onde ultrasonore. Les sondes ultrasonores servent donc à la fois d'émetteur et de récepteur. Chacun des transducteurs de la sonde peut être soumis à la même excitation électrique mais avec un délai temporel différent permettant ainsi d'émettre différentes formes d'ondes acoustiques dans les tissus. La majorité des échographes émettent des fronts d'ondes **focalisés** (**Figure I-4 (a)**). L'énergie ultrasonore est alors concentrée le long d'une **ligne**. Lorsque l'onde rencontre sur son passage des hétérogénéités une partie de son énergie est rétrodiffusée vers la sonde ultrasonore sous la forme d'une onde sphérique (**Figure I-4 (b)**). La sonde enregistre les ondes sphériques correspondant à chaque hétérogénéité, puis une étape de « **formation des faisceaux** » (**beamforming** en anglais), ou focalisation en réception (**Figure I-4 (c)**), est nécessaire afin d'obtenir une image de l'échogénicité de la ligne qui a été sondée par l'onde ultrasonore focalisée (**Figure I-4 (d)**). Pour chaque ligne du milieu à imager deux étapes de focalisation successives sont donc nécessaires, une en émission puis une en réception. Afin d'obtenir une image complète du milieu il faut déplacer l'onde focalisée latéralement, et donc répéter une centaine de fois ces étapes d'émission/réception. L'image finale obtenue s'appelle image en mode B ou image **B-mode**.

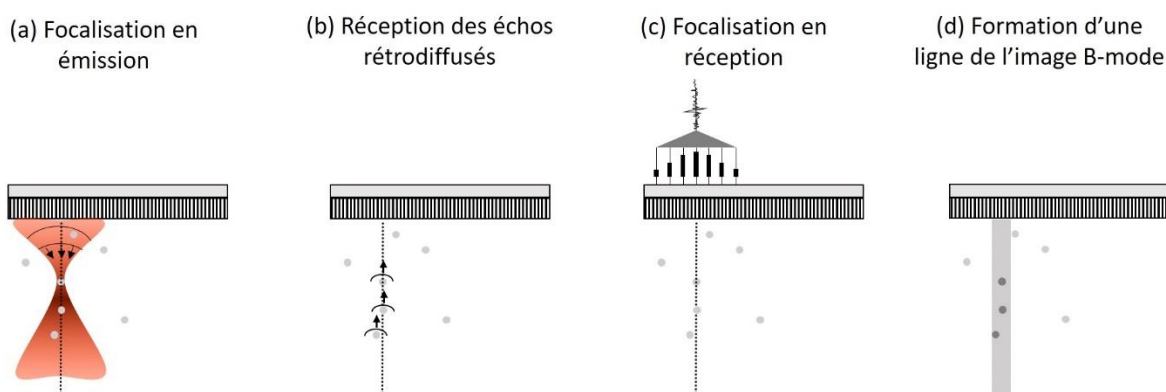


Figure I-4 : Principe de l'imagerie ultrasonore conventionnelle focalisée : (a) Focalisation du faisceau ultrasonore le long d'une ligne du milieu. (b) Réception des échos rétrodiffusés par les hétérogénéités du milieu. (c) Focalisation en réception, couramment appelée étape de « beamforming ». (d) Une ligne de l'image seulement est obtenue, il faut donc ensuite déplacer l'onde focalisée latéralement et répéter toutes les étapes précédentes une centaine de fois pour obtenir l'image entière.

I.3.2. Imagerie Doppler focalisée

Le mode Doppler permet de mesurer et visualiser les **écoulements sanguins**. Nous allons distinguer ici le **Doppler continu** (envoyant un faisceau ultrasonore focalisé de manière continue) et le **Doppler impulsionnel** (reposant sur l'envoi d'impulsions ultrasonores).

Doppler continu

Le Doppler continu est la seule modalité Doppler qui repose réellement sur l'effet Doppler comme nous l'entendons généralement et comme l'a décrit Christian Doppler en 1842, c'est-à-dire « une mesure d'un décalage de la fréquence d'émission dû au déplacement de la cible imagée ». Ce mode n'est pas à proprement parlé un mode d'imagerie car il ne permet pas d'obtenir une image des écoulements sanguins mais simplement une mesure ponctuelle de la **vitesse** de flux. Pour cela une partie de la barrette ultrasonore envoie un faisceau monochromatique (de fréquence f_0) de manière continue et focalisée en un point donné, tandis qu'en parallèle une autre partie de la barrette ultrasonore écoute les signaux rétrodiffusés par les hématies contenues dans le sang. La fréquence reçue est alors $f_0 + f_d$ avec f_d la fréquence Doppler déterminée par l'équation suivante :

$$f_d = -2 v_z f_0 / c \quad \text{Equation I-1}$$

avec v_z la vitesse axiale du sang et c la vitesse des ultrasons dans le corps humain, de l'ordre de **1540 m/s**. Ce mode permet ainsi de déterminer v_z ponctuellement, et est surtout utilisé pour les écoulements très rapides, comme les flux en sortie de l'aorte (~ 5 m/s).

Doppler impulsionnel

Les deux principaux modes d'imagerie Doppler utilisés de nos jours et permettant d'obtenir une image des écoulements sanguins sont les modes **Doppler couleur** et **Doppler pulsé**, qui peuvent être regroupés sous le terme « **Doppler impulsionnels** », par opposition au Doppler continu. En effet ces deux modalités d'imagerie utilisent des impulsions ultrasonores. La technique repose sur l'envoi répété d'impulsions ultrasonores focalisées en un même endroit : entre deux instants d'acquisition les signaux provenant des tissus ne varient pas car leur mouvement est trop lent, tandis que les signaux provenant des hématies varient à cause de leur déplacement dans les vaisseaux sanguins. C'est donc la répétition des tirs ultrasonores de manière suffisamment rapide et la comparaison des images acquises à deux instants successifs qui nous permettent d'obtenir l'information sur l'écoulement sanguin. En pratique ce que l'on mesure est une différence de phase entre les deux images dans les zones où se trouve le sang.

Le seul point délicat est le choix de la cadence d'imagerie afin d'échantillonner correctement le signal au sens du théorème de Shannon. En effet, il a été démontré que le temps de décorrélation entre deux images successives (t_{decorr}) est l'inverse de la fréquence Doppler définie dans l'Equation I-1, c'est-à-dire $t_{\text{decorr}} = 1/f_d$. D'après le théorème de Shannon, afin d'échantillonner correctement des signaux ayant pour fréquence maximale f_d , la fréquence d'acquisition (f_{acq}) doit être au moins deux fois supérieure, c'est-à-dire : $f_{\text{acq}} > 2 f_d$. Dans le cerveau d'un rat, un écoulement sanguin ayant une vitesse de l'ordre de 2 cm/s (valeur typique de vitesse de flux dans les artérioles par exemple), imagé avec une

sonde de fréquence centrale $f_0 = 15$ MHz, correspond à une fréquence Doppler f_d de l'ordre de 390 Hz. La fréquence d'acquisition ultrasonore doit donc être de l'ordre de 780 Hz minimum.

En imagerie focalisée, pour chaque ligne imagée, il faut que les ultrasons aient le temps d'insonifier le milieu sur toute sa profondeur, puis qu'ils reviennent jusqu'à la sonde après avoir été rétrodiffusés par les différentes hétérogénéités rencontrées dans le milieu de propagation. Ensuite, le faisceau focalisé est déplacé latéralement et une nouvelle ligne peut être imagée de la même façon... et ainsi de suite jusqu'à obtenir l'image complète. Pour obtenir l'image d'un cerveau de rat sur toute sa profondeur, la profondeur d'imagerie doit être d'environ $z = 15$ mm. Le temps d'un aller-retour est donc d'environ $t = 2z/c = 20 \mu s$. Une ligne peut ainsi être acquise en $20 \mu s$ mais il faut répéter cette opération une centaine de fois pour balayer tout le champ de vue de la sonde, soit attendre 2 ms pour obtenir une image entière. La fréquence d'acquisition maximale d'une telle image est donc de 500 Hz. Or, nous avons vu dans le paragraphe précédent que pour échantillonner des vitesses d'écoulement de l'ordre de 2 cm/s la fréquence d'acquisition devait être d'au moins 780 Hz. Pour obtenir une telle cadence d'imagerie en imagerie focalisée, la seule solution consiste à réduire le nombre de lignes sondées dans le milieu, c'est-à-dire réduire le champ de vue. L'imagerie focalisée est donc soumise à un compromis entre **cadence d'imagerie** et **champ de vue**. Lorsqu'une cartographie du flux est nécessaire on utilisera le mode **Doppler couleur**. Au contraire pour accéder à des paramètres quantitatifs du flux, on utilisera le mode **Doppler pulsé**.

Doppler couleur : cartographie des écoulements sanguins

Le mode Doppler couleur permet d'obtenir une **image** des écoulements sanguins en déplaçant latéralement le faisceau focalisé. Les flux dirigés vers la sonde sont généralement représentés en rouge, tandis que les flux s'éloignant de la sonde sont en bleu. Cependant comme le faisceau ultrasonore focalisé doit être déplacé latéralement suffisamment vite pour faire une image entière, chaque ligne de l'image n'est obtenue qu'avec un faible nombre d'émission/réception (une dizaine en général). La mesure de la vitesse sur chaque ligne est donc très bruitée et ne permet pas de quantification précise. Il est aussi possible de calculer l'énergie contenue dans le signal (plutôt que la vitesse) afin de gagner en sensibilité et pouvoir visualiser de petits vaisseaux. Dans ce cas on parle de Doppler de puissance (*Power Doppler*).

Doppler pulsé : quantification de flux

Lorsqu'une **quantification** précise du flux est nécessaire, la dizaine d'échantillons disponible par ligne imagée en Doppler couleur n'est plus suffisante, il faut en acquérir beaucoup plus afin de pouvoir calculer la transformée de Fourier du signal rétrodiffusé. Le balayage complet de l'image n'est alors plus possible. La sonde reste donc focalisée à la même position et un grand nombre d'émission/réception focalisées sont faites. Le Doppler pulsé permet d'obtenir un spectrogramme,

c'est-à-dire une représentation temps/fréquence du signal, et renseigne sur l'évolution des vitesses du flux au cours du temps. Ce type d'acquisition permet des études basiques d'**imagerie fonctionnelle** : la mesure des modifications des vitesses des flux sanguins dans de grosses artères irrigant le cerveau (Aaslid, Markwalder, and Nornes 1982) donne une information sur l'activation neuronale durant une tâche cognitive. Ce genre d'acquisition a notamment permis d'étudier la latéralisation droite/gauche de certaines tâches (Duschek and Schandry 2003) mais son utilisation reste cependant limitée par le fait que la mesure est localisée en un point et ne permet pas d'obtenir d'image de l'activation cérébrale.

I.4. Imagerie ultrasonore ultrarapide

Nous avons vu dans la partie précédente que l'imagerie ultrasonore conventionnelle impose un compromis entre cadence d'imagerie et champ de vue balayé, à cause de la nécessité de déplacer le faisceau focalisé latéralement un grand nombre de fois pour obtenir une image complète. Dans le cas de l'imagerie vasculaire cérébrale et notamment dans le cas de l'imagerie fonctionnelle du cerveau, l'information importante est la **variation du flux sanguin au cours du temps**. Une grande cadence d'imagerie est donc cruciale pour ce genre d'application. Nous allons à présent voir dans cette partie comment l'imagerie ultrasonore ultrarapide a permis de révolutionner le mode Doppler et ouvre de nombreuses perspectives dans le domaine des neurosciences.

I.4.1. Principe de l'imagerie ultrasonore ultrarapide par émission d'ondes planes

L'imagerie ultrasonore ultrarapide par émission d'ondes planes a été mise au point par l'Institut Langevin à la fin des années 1990/début des années 2000 (Sandrin et al. 1999). Au départ, l'idée de cette technique d'imagerie était de pouvoir imager la propagation des ondes de cisaillement dans le corps humain (Sandrin et al. 1999; Sandrin et al. 2002; M. Tanter et al. 2002) afin d'en déduire l'élasticité des tissus (Bercoff, Tanter, and Fink 2004; Mickael Tanter et al. 2008). La vitesse des ondes de cisaillement dans le corps humain étant typiquement de 1 à quelques dizaines de m/s, une cadence d'imagerie de plusieurs kHz était donc nécessaire pour pouvoir imager la propagation de ces ondes sur quelques cm. En utilisant la technique d'imagerie par ondes focalisées que nous avons décrite dans la partie précédente de telles cadences sont inatteignables.

La solution trouvée par l'Institut Langevin afin d'augmenter la cadence d'imagerie fut de remplacer l'émission d'ondes focalisées ligne par ligne par l'émission d'**ondes planes** (**Figure I-5 (a)**). Ainsi tous les points du milieu sont insonifiés lors du même tir ultrasonore. La sonde récupère alors en une seule fois les échos provenant de toute la zone insonifiée (**Figure I-5 (b)**). Les données sont

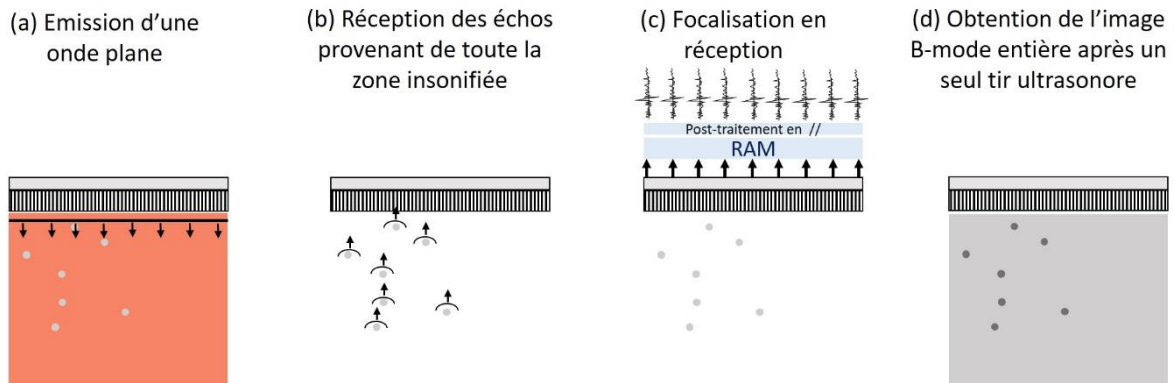


Figure I-5 : Principe de l'imagerie ultrasonore ultrarapide par émission d'ondes planes. (a) Une onde plane est émise et insonifie tout le champ de vue en un seul tir. (b) Réception des échos rétrodiffusés par les hétérogénéités du milieu présentes dans la zone insonifiée. (c) Focalisation en réception pour tous les pixels de l'image en même temps. (d) L'image B-mode entière est obtenue, après un seul tir ultrasonore.

stockées temporairement dans la mémoire de la machine (RAM) et l'étape de focalisation en réception est alors effectuée sur tous les pixels de l'image en même temps (**Figure I-5 (c)**). Ainsi une image B-mode entière est obtenue en un seul tir ultrasonore (**Figure I-5 (d)**).

Par conséquent, pour imager jusqu'à une profondeur de 15 mm (dans le cerveau d'un rat par exemple), la durée d'un aller-retour de l'onde ultrasonore étant de 20 μ s, des cadences d'imagerie de 50 kHz peuvent être atteintes.

Cependant il faut noter que puisqu'aucune focalisation en émission n'a lieu la qualité des images obtenues s'en trouve détériorée, en termes de résolution spatiale mais aussi de contraste, par rapport à l'imagerie conventionnelle focalisée. C'est dans le but d'améliorer la qualité des images acquises par émission d'ondes planes que l'Institut Langevin a alors développé la technique du « **coherent compounding** » (**recombinaison cohérente** en français) (Montaldo et al. 2009). Au lieu d'envoyer une seule et unique onde plane, plusieurs ondes planes inclinées par rapport à l'alignement des transducteurs sont envoyées dans le milieu successivement. Les images obtenues sont ensuite combinées de façon cohérente. Cette astuce permet de créer une focalisation synthétique en émission, comme cela avait été prédit et mis en évidence dans le domaine du *synthetic aperture imaging* (imagerie par ouverture synthétique) (Karaman, Li, and O'Donnell 1995; Lockwood, Talman, and Brunke 1998; Nikolov and Jensen 2003; Udesen et al. 2008). Il a été démontré qu'en utilisant 40 ondes planes inclinées la qualité de l'image reconstruite est équivalente à celle obtenue par imagerie focalisée (tout en ayant l'avantage d'être de qualité optimale sur toute la profondeur imagée alors que la qualité d'image obtenue par imagerie focalisée n'est optimale qu'à la profondeur de focalisation choisie) (Montaldo et al. 2009; Denarie et al. 2013). La cadence d'imagerie est alors divisée par le

nombre d'ondes planes inclinées utilisées pour la formation de l'image finale, mais elle reste malgré tout bien supérieure à celle de l'imagerie focalisée. L'imagerie ultrarapide par émission d'ondes planes repose donc sur un compromis à faire entre **qualité d'imagerie** (augmenter le nombre d'ondes planes inclinées pour obtenir une meilleure qualité) et la **cadence d'imagerie** (diminuer le nombre d'ondes planes inclinées pour obtenir une plus grande cadence d'imagerie).

Nous reparlerons plus longuement dans le chapitre suivant de la technique de recombinaison cohérente d'ondes planes inclinées afin d'introduire le ***Multiplane Wave imaging***, une nouvelle séquence ultrasonore ultrarapide mise au point dans le cadre de ma thèse afin d'augmenter le rapport signal-à-bruit des images sans diminuer la cadence d'imagerie ultrarapide.

I.4.2. Imagerie Doppler ultrarapide : application à l'imagerie fonctionnelle cérébrale du petit animal (fUS)

Le **Doppler ultrarapide** (*ultrafast Doppler* en anglais) a été développé par l'Institut Langevin en 2011 (Bercoff et al. 2011). Pour obtenir une image Doppler, un paquet de plusieurs centaines d'images est acquis par imagerie ultrasonore ultrarapide en utilisant la méthode de recombinaison cohérente, comme expliqué dans la partie précédente. Typiquement, en imagerie cérébrale chez le petit animal, 200 à 400 images sont acquises à une fréquence de l'ordre de 500 Hz. Ce paquet de plusieurs centaines d'images est ensuite filtré afin d'extraire le signal du sang du signal des tissus. Les hautes fréquences correspondent en effet au signal du sang dont le mouvement est bien plus rapide que celui des tissus (qui se retrouvent donc dans les basses fréquences). Un filtrage passe-haut est donc appliqué au paquet d'une centaine d'image, puis ce paquet d'images filtrées est moyenné afin d'obtenir l'image Doppler finale des vaisseaux sanguins. Les images Doppler peuvent ainsi être obtenues avec une cadence d'imagerie inférieure à la seconde, et il est alors possible de réaliser un « film » de l'évolution de la vascularisation au cours du temps.

Ici le compromis entre qualité d'imagerie et cadence d'imagerie doit être pris en compte en fonction de la vitesse des flux à imager. En effet, pour imager des flux rapides il sera préférable de n'utiliser que quelques ondes planes inclinées afin de pouvoir maximiser la cadence d'imagerie; tandis que pour imager des flux plutôt lents on pourra utiliser un grand nombre d'ondes planes et donc augmenter la qualité des images. Les flux rapides correspondent généralement à des écoulements dans des vaisseaux de grande taille tandis que les flux lents se retrouvent plutôt dans des vaisseaux de petites tailles. Ainsi, le fait d'utiliser moins d'ondes planes et donc de dégrader quelque peu la résolution dans le cas des flux rapides n'est pas réellement un problème ; tandis qu'au contraire utiliser plus d'ondes planes et augmenter la résolution dans le cas des flux lents est tout à fait avantageux. Dans le cas du Doppler le compromis cadence/qualité d'imagerie, propre à l'imagerie ultrarapide par

émission d'ondes planes, est donc moins gênant que ne l'est le compromis cadence/champ de vue propre à l'imagerie focalisée.

Le grand avantage du **Doppler ultrarapide** par rapport au Doppler conventionnel focalisé est que tous les pixels de l'image sont acquis au même instant et avec un grand nombre d'échantillons. Il a été démontré qu'en termes de quantification le Doppler ultrarapide permet des résultats comparables à ceux du Doppler pulsé mais en tout point de l'image et non plus sur une ligne de l'image (Bercoff et al. 2011). De plus, il a aussi été démontré que la cadence ultrarapide permet d'augmenter d'un facteur 30 la sensibilité des images *Power Doppler* (dans le cas de l'émission de 16 ondes planes inclinées) comparé au Doppler conventionnel focalisé (Mace et al. 2013).

C'est cette très grande sensibilité du Doppler ultrarapide qui a permis à l'Institut Langevin de développer la technique d'imagerie fonctionnelle cérébrale par ultrasons, nommée *fUltrasound* ou plus généralement ***fUS imaging*** pour ***functional ultrasound imaging***. La preuve de concept a été faite chez le rat anesthésié en 2011 (Macé et al. 2011) en montrant que le Doppler ultrarapide permettait de détecter des variations du flux sanguin dans certaines zones spécifiques du cerveau du rat suite à la stimulation de ses vibrisses (appelées « moustaches » dans le langage courant) ou encore au cours d'une crise d'épilepsie (**Figure I-6**).

Ici non plus (comme pour l'IRMf et les autres techniques reposant sur la réponse hémodynamique), l'activité fonctionnelle du cerveau n'est pas directement mesurée par l'activité électrique des neurones (contrairement à l'EEG), mais indirectement par le biais du **couplage neurovasculaire**. Comme nous l'avons vu précédemment, l'augmentation de l'activité d'une zone cérébrale induit une augmentation de la consommation d'oxygène, ce qui nécessite une augmentation du flux sanguin afin de réaliser l'approvisionnement nécessaire en oxygène. C'est ainsi qu'en visualisant de manière précise les variations des flux sanguins au cours du temps, le Doppler ultrarapide permet d'accéder à l'activité cérébrale. Le fUS est basé sur le calcul du Doppler de puissance (*Power Doppler*), c'est-à-dire sur la mesure de l'énergie contenue dans le signal ultrasonore plutôt que sur la vitesse des écoulements, le niveau de *Power Doppler* étant relié au volume sanguin cérébral (Rubin et al. 1995; Rubin et al. 1997).

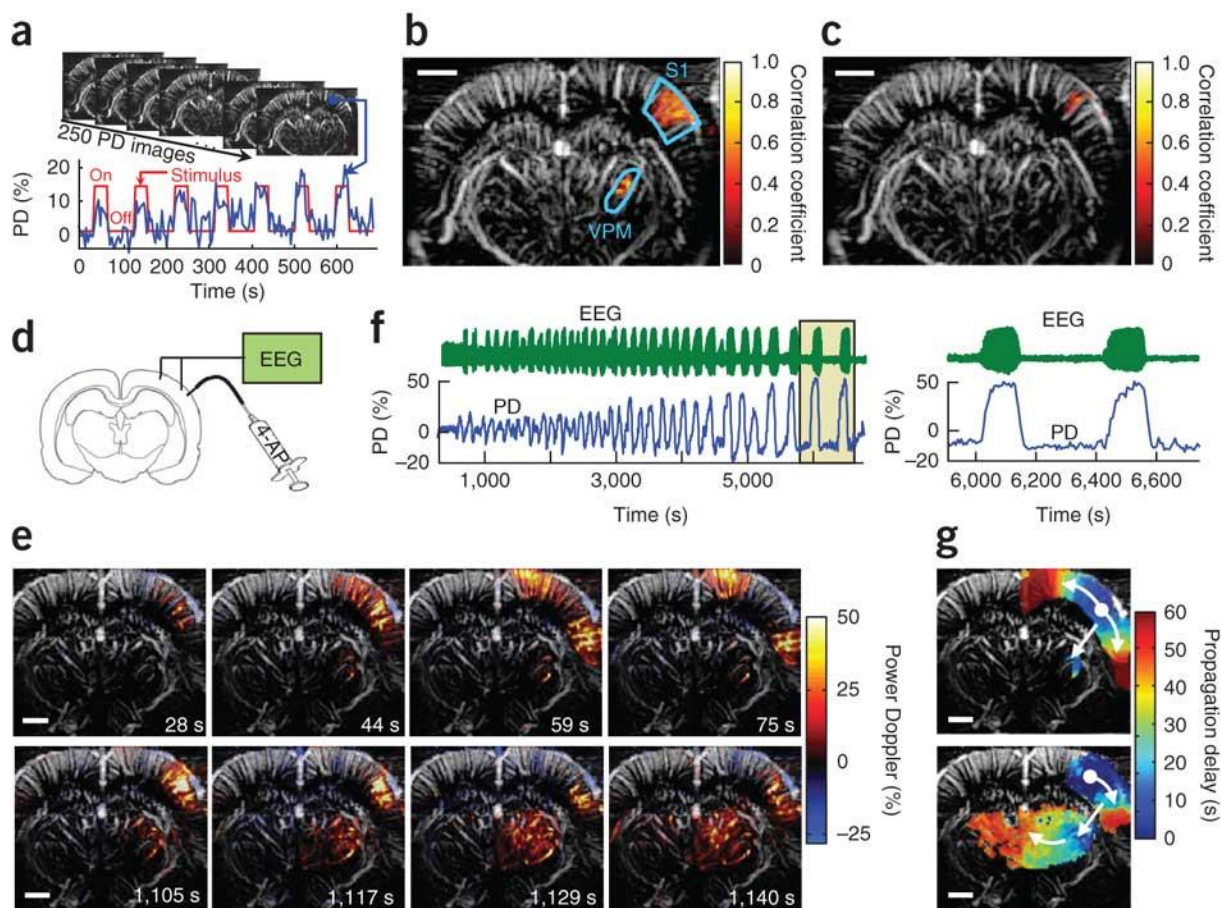


Figure I-6 : Première preuve de concept de l'imagerie fonctionnelle cérébrale par ultrasons (fUS) chez un rat anesthésié (figure extraite de l'article Macé et al. (2011)). (a) Durant la stimulation des vibrisses du rat le niveau du Power Doppler, et donc le volume sanguin, augmente dans certaines zones cérébrales, notamment dans le cortex sensoriel primaire (S1). Au niveau de cette zone fonctionnelle corticale on remarque que la stimulation de l'ensemble des vibrisses (b) active une aire plus large que la stimulation d'une seule vibrisse (c). (d) Une crise d'épilepsie peut être induite chez le rat par injection de 4-AP (4-aminopyridine) dans le cortex : on remarque alors qu'une augmentation du volume sanguin cérébral se produit au moment des crises épileptiques visibles sur le tracé EEG (f). (e) Un film des variations du signal Power Doppler au cours du temps permet de mettre en évidence la propagation de la crise épileptique dans le cortex puis dans le thalamus (g).

Avant cette première preuve de concept, seules des études fonctionnelles par Doppler focalisé avaient été faites. Comme nous l'avons vu précédemment cela avait permis de mesurer des vitesses d'écoulement dans de grosses artères et de mettre ainsi en évidence la latéralisation gauche/droite de certaines tâches motrices par exemple, mais aucune image ne pouvait être faite. Le fUS est donc la première méthode d'imagerie fonctionnelle par ultrasons. Ses principales caractéristiques, avantages et inconvénients, dans le cadre de l'imagerie sur le petit animal, sont présentés dans le **Tableau 3**.

Résolution spatiale	Très bonne : 100 x 100 x 200 μm
Résolution temporelle	Très bonne : 200 – 400 ms
Profondeur d'imagerie / champ de vue	Tout le cerveau du rat est accessible en profondeur mais acquisitions limitées au 2D pour l'instant
Sensibilité	Bonne
Portabilité	Très bonne : Appareil compact, sur roues, déplaçable d'une salle d'expérimentation à l'autre
Disponibilité de la technique pour les chercheurs	Encore peu répandue car technique récente <u>mais</u> son faible coût et sa facilité d'utilisation par rapport à l'IRMf sont deux points forts pour sa dissémination, en plus des nombreux avantages listés dans ce tableau
Etat de l'animal pendant l'acquisition	Anesthésié / éveillé possible (et sans contention) (chapitre IV)
Invasivité	Invasif chez le rat / peu à non invasif chez la souris et le raton (chapitre III)

Tableau 3 : Principales caractéristiques, avantages (lignes surlignées en vert) et inconvénients (lignes surlignées en orange) du fUS dans le cadre de l'expérimentation chez le petit animal.

Suite à cette première preuve de concept en 2011, d'autres études fonctionnelles ont été faites au laboratoire chez des rats anesthésiés, notamment dans le cadre de la thèse de Bruno-Félix Osmanski : observation de la réponse évoquée par des stimuli olfactifs dans le bulbe olfactif principal et dans le cortex piriforme antérieur (B. F. Osmanski et al. 2014), mais aussi observation de la connectivité fonctionnelle dont nous reparlerons plus longuement dans le **chapitre V (Figure I-7)** (B.-F. Osmanski et al. 2014). Ma thèse, dont les principaux objectifs sont décrits dans la partie suivante, s'inscrit dans la continuité de ce travail.

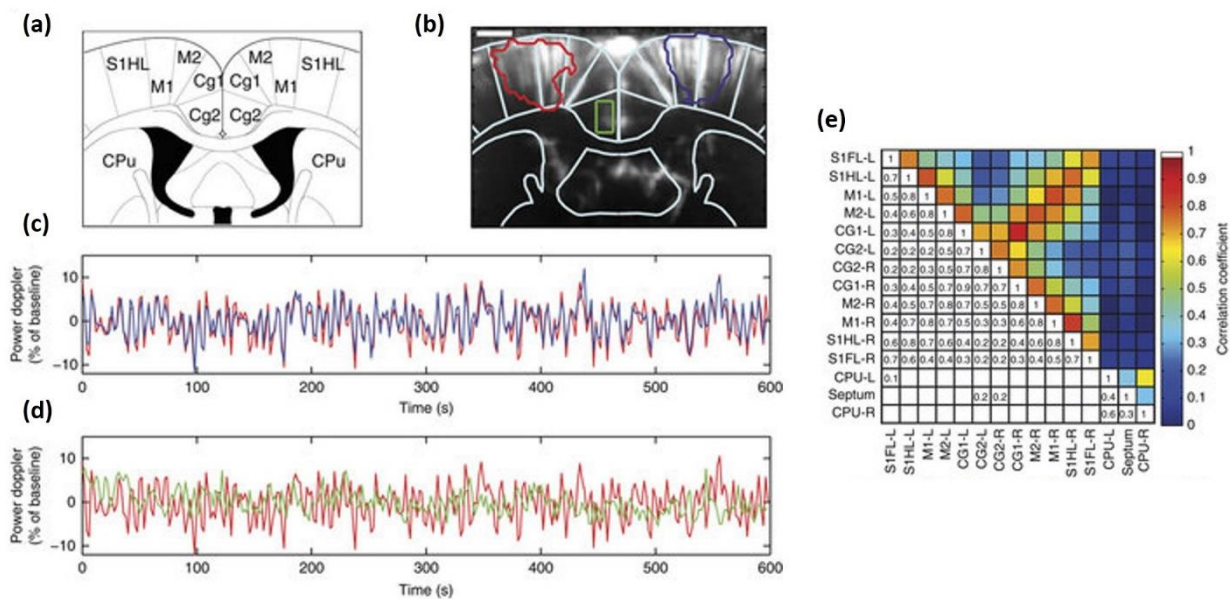


Figure I-7 : Utilisation du fUS pour étudier la connectivité fonctionnelle chez le rat anesthésié. Figure adaptée de l'article Osmanski et al (2014). (a) Schéma des régions fonctionnelles présentes dans le plan coronal de coordonnées bregma -0.6 mm chez le rat. (b) Sélection de deux régions d'intérêt partageant la même fonction (en rouge et bleu) pour la partie gauche et la partie droite du corps, et d'une région fonctionnelle sans lien fonctionnel avec les deux précédentes (en vert). (c-d) Variations spontanées du Power Doppler dans les zones précédemment choisie : les deux zones symétriques ayant un lien fonctionnel présentent des signaux fortement corrélés au cours du temps, tandis que deux zones ne partageant pas de lien fonctionnel ont des signaux très faiblement corrélés au repos. (e) Les niveaux de corrélations entre chaque paire de régions fonctionnelles peuvent être représentés sous la forme d'une matrice de corrélation : les plus fortes corrélations se retrouvent sur l'anti-diagonale de la matrice, ce qui correspond à toutes les corrélations gauche-droite entre des zones symétriques partageant la même fonction.

I.5. Objectifs de la thèse

L'idée générale suivie au cours de ce travail de thèse fut de transformer le fUS, technique d'imagerie cérébrale récente, en un véritable **outil de quantification de l'état cérébral**, le moins invasif possible, permettant en particulier d'imager des modèles de souris génétiques ou pharmacologiques, sans utiliser d'anesthésie. Mon travail a tout d'abord porté sur une méthode d'amélioration de la **qualité des images**, puis sur la validation de la possibilité d'utiliser l'échographie ultrasonore ultrarapide de manière **transcrânienne** chez la souris, la transposition de l'utilisation de la technique fUS du modèle « rat éveillé » au modèle « **souris éveillée** », et enfin la mise au point de l'étude de la **connectivité fonctionnelle** sur des souris dans différents états d'éveil.

I.5.1. Développer une nouvelle séquence d'imagerie ultrasonore ultrarapide permettant d'augmenter le rapport signal-à-bruit

Nous avons vu dans cette introduction générale comment l'utilisation d'ondes planes au lieu d'ondes focalisées permet d'augmenter considérablement la cadence d'imagerie et a permis le développement de l'imagerie Doppler ultrarapide rendant possible l'imagerie fonctionnelle par ultrasons (fUS). Même si l'imagerie ultrarapide rencontre déjà un grand succès en imagerie clinique, (notamment grâce au mode d'élastographie permettant de mesurer l'élasticité des tissus), il pourrait être intéressant pour différentes applications d'augmenter encore sa profondeur de pénétration et son rapport signal-à-bruit, tout en conservant la cadence ultrarapide. Une première partie de mon travail de thèse fut de développer une nouvelle séquence d'imagerie ultrarapide permettant de tels résultats. Nous avons nommé cette nouvelle séquence : **Multiplane Wave imaging**. Le rapport signal-à-bruit est augmenté grâce à l'augmentation **virtuelle** de l'amplitude du signal émis. Le principe de base du Multiplane Wave est très proche de celui du *coherent compounding* (recombinaison cohérente) que nous avons introduit dans ce chapitre, mais une astuce simple nous permet d'envoyer N ondes planes dans le même tir ultrasonore et d'en retirer au final une image similaire à celle qui aurait été obtenue si les ondes planes avaient été envoyées séparément les unes des autres avec une amplitude N fois plus grande. La séquence d'imagerie ainsi conçue a été validée expérimentalement pour différents modes d'imagerie : B-mode, élastographie et Doppler ultrarapide, sur des fantômes d'imagerie mais également *in vivo* chez un rat anesthésié.

I.5.2. Démontrer la possibilité d'utiliser l'échographie Doppler ultrarapide pour imager de façon transcrânienne et non invasive le cerveau de la souris et du raton

Comme nous l'avons vu dans le Tableau 3, la principale limitation de l'échographie Doppler ultrarapide (notamment par rapport à l'IRM) lorsqu'elle est utilisée dans le cadre de l'imagerie cérébrale est son caractère invasif. Ceci est dû à la difficulté des ultrasons à traverser la barrière du crâne. Comme pour les nombreuses techniques optiques que nous avons évoqué dans ce chapitre, il est souvent nécessaire de pratiquer un volet crânien, d'amincir le crâne, ou encore d'injecter des agents de contraste au rat afin de pouvoir visualiser correctement son cerveau. Jusqu'à présent, aucune étude n'avait été faite, à notre connaissance, concernant la possibilité d'utiliser l'échographie Doppler ultrarapide pour réaliser de l'imagerie vasculaire cérébrale chez la souris, qui est pourtant un modèle d'étude de choix dans le domaine des neurosciences. La souris étant un animal plus petit que le rat, nous avons pensé qu'il devait être possible d'imager son cerveau directement à travers l'os de

son crâne, voire même directement à travers son crâne et sa peau, de manière complètement non invasive. Puis, partant du constat que les ratons, de taille inférieure ou similaire à celle de la souris, devaient posséder un crâne d'une épaisseur similaire nous avons étendu notre étude à l'imagerie vasculaire cérébrale du raton au cours de son développement. Le chapitre III expose donc nos résultats concernant la possibilité d'imager par échographie Doppler ultrarapide le cerveau de la souris et du jeune rat de manière **transcrânienne** et complètement **non invasive**, sans chirurgie ni injection d'agents de contraste. Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec l'équipe du Dr Zsolt Lenkei du laboratoire Plasticité du Cerveau à l'ESPCI.

I.5.3. Transposer l'utilisation du fUS de l'animal anesthésié à l'animal éveillé et en mouvement

Lorsque je suis arrivée en thèse en 2014, la technique fUS avait été appliquée et commençait à faire ses preuves dans le cadre de l'imagerie fonctionnelle chez le rat anesthésié (Macé et al. 2011; B.-F. Osmanski et al. 2014; B. F. Osmanski et al. 2014). L'Institut Langevin collaborait alors avec l'équipe du Dr Ivan Cohen de l'Institut de Biologie Paris Seine à l'UPMC, afin de transposer l'utilisation du fUS du rat anesthésié au rat éveillé et en mouvement, dans le cadre de l'étude des crises d'épilepsie. Mon rôle dans ce travail, qui était déjà fort bien avancé lorsque je suis arrivée et sur lequel l'équipe d'Ivan Cohen travaillait de façon très autonome, se situa surtout au niveau de la mise à jour des séquences ultrasonores qu'ils utilisaient afin de leur permettre de réaliser leurs acquisitions avec les paramètres les plus adaptés à leurs besoins (échantillonnage, *beamforming*...). Ce travail donna lieu à la première preuve de concept d'utilisation du fUS chez le rat éveillé et en mouvement (Sieu et al. 2015).

J'ai beaucoup appris grâce à cette première collaboration et j'ai ensuite pu travailler de mon côté (cette fois-ci en collaboration avec l'équipe du Dr Zsolt Lenkei du laboratoire Plasticité du Cerveau à l'ESPCI) au développement de l'imagerie fUS chez la **souris éveillée** et en **mouvement**. En effet, après avoir démontré la possibilité d'utiliser l'imagerie Doppler ultrarapide de manière complètement non invasive chez ce modèle animal (chapitre III), nous avons mis au point un montage expérimental, une séquence ultrasonore et un protocole expérimental afin de démontrer la possibilité de réaliser de l'imagerie fonctionnelle cérébrale de manière minimalement invasive, chez des souris éveillées et libres de leurs mouvements.

I.5.4. Démontrer la possibilité d'utiliser le fUS pour étudier la connectivité fonctionnelle chez un modèle de souris et dans différentes conditions d'éveil

Peut-être plus encore que l'imagerie fonctionnelle étudiée suite à l'application d'un stimulus (visuel, auditif, sensoriel), un autre enjeu majeur en neurosciences actuellement est l'étude de la **connectivité fonctionnelle** du cerveau au repos, appelée **étude du « *resting state* »** en anglais. C'est-à-dire l'étude des connexions fonctionnelles présentes dans le cerveau en l'absence de stimulus particulier. L'étude de la connectivité fonctionnelle est un outil puissant puisqu'elle permet d'obtenir des informations chez des sujets pour lesquels la stimulation est difficile voire impossible (nouveau-nés, patients dans le coma, sujets endormis, patients présentant de graves troubles psychiatriques ou neurologiques...).

Jusqu'à présent, l'étude de la connectivité fonctionnelle chez le petit animal est surtout réalisée par IRMf, chez des rats anesthésiés. Il a été démontré que le fUS permettait également d'étudier la connectivité fonctionnelle chez des rats anesthésiés, avec une résolution spatiale et temporelle de meilleure qualité (B.-F. Osmanski et al. 2014).

Toutefois, deux barrières majeures subsistaient au début de ma thèse. D'une part la nécessité de travailler sous anesthésie introduit un biais important dans toute expérimentation de neuroimagerie, d'autre part l'immense majorité des modèles animaux de pathologies cérébrales est disponible uniquement chez la souris en raison d'une ingénierie génétique particulièrement développée. Dans le cadre de cette thèse et dans la suite logique des résultats obtenus dans les chapitres III et IV, nous avons donc démontré la possibilité d'utiliser le fUS afin d'étudier la connectivité fonctionnelle chez des souris, **éveillées** et **en mouvement** et de manière **transcrânienne**. Nous avons également étudié l'influence du niveau d'éveil sur les motifs de connectivité fonctionnelle. Ces résultats ont également été obtenus en collaboration avec l'équipe du Dr Zolt Lenkei du laboratoire Plasticité du Cerveau à l'ESPCI.

Références du chapitre

- Bandettini, Peter A., Eric C. Wong, R. Scott Hinks, Ronald S. Tikofsky, and James S. Hyde. 1992. "Time Course EPI of Human Brain Function during Task Activation." *Magnetic Resonance in Medicine* 25 (2): 390–97. doi:10.1002/mrm.1910250220.
- Belliveau, J., D. Kennedy, R. McKinstry, B. Buchbinder, R. Weisskoff, M. Cohen, J. Vevea, T. Brady, and B. Rosen. 1991. "Functional Mapping of the Human Visual Cortex by Magnetic Resonance Imaging." *Science* 254 (5032): 716–19. doi:10.1126/science.1948051.
- Bercoff, J., G. Montaldo, T. Loupas, D. Savary, F. Meziere, M. Fink, and M. Tanter. 2011. "Ultrafast Compound Doppler Imaging: Providing Full Blood Flow Characterization." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 58 (1): 134–47.
- Bercoff, J., M. Tanter, and M. Fink. 2004. "Supersonic Shear Imaging: A New Technique for Soft Tissue Elasticity Mapping." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 51 (4): 396–409.
- Buxton, Richard B., and Lawrence R. Frank. 1997. "A Model for the Coupling Between Cerebral Blood Flow and Oxygen Metabolism During Neural Stimulation." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, January, 64–72. doi:10.1097/00004647-199701000-00009.
- Denarie, B., T.A. Tangen, I.K. Ekroll, N. Rolim, H. Torp, T. Bjastad, and L. Lovstakken. 2013. "Coherent Plane Wave Compounding for Very High Frame Rate Ultrasonography of Rapidly Moving Targets." *IEEE Transactions on Medical Imaging* 32 (7): 1265–76.
- Duschek, Stefan, and Rainer Schandry. 2003. "Functional Transcranial Doppler Sonography as a Tool in Psychophysiological Research." *Psychophysiology* 40 (3): 436–54. doi:10.1111/1469-8986.00046.
- Dussik, Karl Theo. 1942. "Über die Möglichkeit, hochfrequente mechanische Schwingungen als diagnostisches Hilfsmittel zu verwerten (On the possibility of using ultrasound waves as a diagnostic aid)." *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 174 (1): 153–68. doi:10.1007/BF02877929.
- Feinberg, David A., and Essa Yacoub. 2012. "The Rapid Development of High Speed, Resolution and Precision in fMRI." *NeuroImage* 62 (2): 720–25. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.01.049.
- Franklin, KBJ, and G. Paxinos. 1997. "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates." *San Diego: Academic Press*.
https://books.google.fr/books/about/The_Mouse_Brain_in_Stereotaxic_Coordinat.html?id=EHy1QN1xv0gC.
- Franklin, Keith B. J., and George Paxinos. 2008. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Jonckers, Elisabeth, Disha Shah, Julie Hamaide, Marleen Verhoye, and Annemie Van der Linden. 2015. "The Power of Using Functional fMRI on Small Rodents to Study Brain Pharmacology and Disease." *Frontiers in Pharmacology* 6 (October). doi:10.3389/fphar.2015.00231.
- Karaman, Mustafa, Pai-Chi Li, and M. O'Donnell. 1995. "Synthetic Aperture Imaging for Small Scale Systems." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 42 (3): 429–42.
- Kwong, K. K., J. W. Belliveau, D. A. Chesler, I. E. Goldberg, R. M. Weisskoff, B. P. Poncelet, D. N. Kennedy, B. E. Hoppel, M. S. Cohen, and R. Turner. 1992. "Dynamic Magnetic Resonance Imaging of Human Brain Activity during Primary Sensory Stimulation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (12): 5675–79. doi:10.1073/pnas.89.12.5675.
- Lockwood, G.R., J.R. Talman, and S.S. Brunke. 1998. "Real-Time 3-D Ultrasound Imaging Using Sparse Synthetic Aperture Beamforming." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 45 (4): 980–88.

- Mace, E., G. Montaldo, B. Osmanski, I. Cohen, M. Fink, and M. Tanter. 2013. "Functional Ultrasound Imaging of the Brain: Theory and Basic Principles." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 60 (3): 492–506.
- Macé, Emilie, Gabriel Montaldo, Ivan Cohen, Michel Baulac, Mathias Fink, and Mickael Tanter. 2011. "Functional Ultrasound Imaging of the Brain." *Nature Methods* 8 (8): 662–64.
- Montaldo, G., M. Tanter, J. Bercoff, N. Benech, and M. Fink. 2009. "Coherent Plane-Wave Compounding for Very High Frame Rate Ultrasonography and Transient Elastography." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 56 (3): 489–506.
- Nikolov, S.I., and J.A. Jensen. 2003. "In-Vivo Synthetic Aperture Flow Imaging in Medical Ultrasound." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 50 (7): 848–56.
- Ogawa, S., T. M. Lee, A. R. Kay, and D. W. Tank. 1990. "Brain Magnetic Resonance Imaging with Contrast Dependent on Blood Oxygenation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (24): 9868–72. doi:10.1073/pnas.87.24.9868.
- Osmanski, B. F., C. Martin, G. Montaldo, P. Lanièce, F. Pain, M. Tanter, and H. Gurden. 2014. "Functional Ultrasound Imaging Reveals Different Odor-Evoked Patterns of Vascular Activity in the Main Olfactory Bulb and the Anterior Piriform Cortex." *NeuroImage* 95 (July): 176–84.
- Osmanski, Bruno-Félix, Sophie Pezet, Ana Ricobaraza, Zsolt Lenkei, and Mickael Tanter. 2014. "Functional Ultrasound Imaging of Intrinsic Connectivity in the Living Rat Brain with High Spatiotemporal Resolution." *Nature Communications* 5 (October): 5023. doi:10.1038/ncomms6023.
- Paxinos, George, and Charles Watson. 1982. "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates." *Academic Press*.
- . 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Rubin, J M, R S Adler, J B Fowlkes, S Spratt, J E Pallister, J F Chen, and P L Carson. 1995. "Fractional Moving Blood Volume: Estimation with Power Doppler US." *Radiology* 197 (1): 183–90. doi:10.1148/radiology.197.1.7568820.
- Rubin, J M, R O Bude, J B Fowlkes, R S Spratt, P L Carson, and R S Adler. 1997. "Normalizing Fractional Moving Blood Volume Estimates with Power Doppler US: Defining a Stable Intravascular Point with the Cumulative Power Distribution Function." *Radiology* 205 (3): 757–65. doi:10.1148/radiology.205.3.9393532.
- Sandrin, L., S. Catheline, M. Tanter, X. Hennequin, and M. Fink. 1999. "Time-Resolved Pulsed Elastography with Ultrafast." *Ultrasonic Imaging* 21 (4): 259–72.
- Sandrin, L., M. Tanter, S. Catheline, and M. Fink. 2002. "Shear Modulus Imaging with 2-D Transient Elastography." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 49 (4): 426–35. doi:10.1109/58.996560.
- Sieu, Lim-Anna, Antoine Bergel, Elodie Tiran, Thomas Deffieux, Mathieu Pernot, Jean-Luc Gennisson, Mickaël Tanter, and Ivan Cohen. 2015. "EEG and Functional Ultrasound Imaging in Mobile Rats." *Nature Methods* 12 (9): 831–34. doi:10.1038/nmeth.3506.
- Tanter, M., J. Bercoff, L. Sandrin, and M. Fink. 2002. "Ultrafast Compound Imaging for 2-D Motion Vector Estimation: Application to Transient Elastography." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 49 (10): 1363–74. doi:10.1109/TUFFC.2002.1041078.
- Tanter, Mickael, Jeremy Bercoff, Alexandra Athanasiou, Thomas Deffieux, Jean-Luc Gennisson, Gabriel Montaldo, Marie Muller, Anne Tardivon, and Mathias Fink. 2008. "Quantitative Assessment of Breast Lesion Viscoelasticity: Initial Clinical Results Using Supersonic Shear Imaging." *Ultrasound in Medicine & Biology* 34 (9): 1373–86.
- Udesen, J., F. Gran, K.L. Hansen, J.A. Jensen, C. Thomsen, and M.B. Nielsen. 2008. "High Frame-Rate Blood Vector Velocity Imaging Using Plane Waves: Simulations and Preliminary Experiments." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 55 (8): 1729–43.

CHAPITRE II :

Nouvelle séquence d'imagerie ultrasonore ultrarapide permettant d'augmenter le rapport signal-à-bruit sans diminuer la cadence d'imagerie : le Multiplane Wave

II. Nouvelle séquence d'imagerie ultrasonore ultrarapide permettant d'augmenter le rapport signal-à-bruit sans diminuer la cadence d'imagerie : le Multiplane Wave

II.1. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, l'imagerie ultrasonore ultrarapide par émission d'ondes planes a été mise au point par notre laboratoire au cours des 15 dernières années avec comme principal objectif de maximiser la cadence d'imagerie ultrasonore. Le but initial était de pouvoir suivre la propagation des ondes de cisaillement à travers le corps humain (Mickael Tanter et al. 2008). Pour atteindre une grande cadence d'imagerie l'astuce consiste à envoyer une seule onde plane au lieu de transmettre des faisceaux focalisés ligne par ligne. Cela permet d'atteindre des cadences allant jusqu'à 10 000 images par seconde, et cette cadence ne dépend que de la profondeur d'imagerie choisie. L'absence de focalisation lors de l'émission induit inévitablement une diminution de la qualité d'imagerie par rapport à l'imagerie focalisée, notamment en termes de contraste. Malgré tout, l'imagerie ultrarapide par émission d'ondes planes est apparue comme une solution innovante pour visualiser les phénomènes rapides et transitoires.

Quelques années plus tard, notre laboratoire a amélioré la technique d'imagerie ultrarapide par émission d'ondes planes en utilisant non plus une seule et unique onde plane mais une combinaison cohérente de plusieurs ondes planes inclinées avec des angles différents (Bercoff et al. 2011; Montaldo et al. 2009). Ainsi, en utilisant des délais temporels appropriés, la focalisation lors de l'émission peut être recrée synthétiquement dans chaque pixel de l'image simplement en sommant de façon cohérente les échos rétrodiffusés provenant de quelques ondes planes transmises avec des inclinaisons différentes. On appelle couramment cette technique le « **coherent compounding** » ou « **recombinaison cohérente** » en français. Une telle recombinaison avait été proposée dans la même idée que l'imagerie synthétique pour améliorer la qualité d'imagerie (Karaman, Li, and O'Donnell 1995; Lockwood, Talman, and Brunke 1998; Nikolov and Jensen 2003; Udesen et al. 2008).

Il a été démontré que la recombinaison cohérente permet de produire des images B-mode de qualité équivalente à celles obtenues par imagerie conventionnelle focalisée, en utilisant seulement un tiers du nombre d'émissions (Montaldo et al. 2009). Par conséquent, la recombinaison cohérente permet d'obtenir à la fois une **grande qualité** et une **grande cadence d'imagerie**, et ce même dans le cas de cibles bougeant rapidement (Denarie et al. 2013). Cependant, un compromis sur le nombre d'ondes planes inclinées est à trouver : en effet, utiliser plus d'ondes planes permet d'augmenter la qualité d'imagerie mais diminue la cadence, et vis-versa.

Le concept d'imagerie par recombinaison cohérente a tout d'abord été appliqué à la technique d'élastographie par ondes de cisaillement, puis plus tard à l'imagerie Doppler (Bercoff et al. 2011) et enfin à l'imagerie ultrarapide par émission d'ondes divergentes (Papadacci et al. 2014). Le grand nombre d'applications actuelles, mais aussi toutes les futures potentielles applications que pourrait permettre l'imagerie ultrasonore ultrarapide (M. Tanter and Fink 2014) encouragent le développement de nouvelles séquences ultrasonores optimisées permettant d'améliorer le contraste, le rapport signal-à-bruit ou encore la résolution des images ultrarapides. C'est dans cette optique d'amélioration du rapport signal-à-bruit, sans dégradation de la cadence d'imagerie et de la résolution, que la séquence « **Multiplane Wave** » a été imaginée.

Dans ce chapitre je décris tout d'abord le principe de la séquence Multiplane Wave. Puis, je compare les performances de cette séquence d'imagerie aux performances de l'imagerie par recombinaison cohérente classique en réalisant des acquisitions B-mode sur un fantôme d'imagerie. Enfin, la séquence Multiplane Wave est utilisée pour deux applications nécessitant une grande cadence d'imagerie : l'élastographie et le Doppler ultrarapide. Là encore, les performances de l'imagerie Multiplane Wave sont comparées avec celles de l'imagerie par recombinaison cohérente. Nous démontrons comment cette nouvelle approche d'imagerie permet d'améliorer le rapport signal-à-bruit (SNR, *Signal-to-noise ratio*) et le contraste des images B-mode, comment elle permet l'obtention de cartes d'élasticité plus précises dans le cadre de l'élastographie, et comment elle permet la détection de vaisseaux sanguins plus profonds lors de l'utilisation en mode Doppler. En résumé, nous démontrons dans ce chapitre que l'imagerie Multiplane Wave pourrait être d'un grand intérêt pour toutes les observations en profondeur dans les tissus, là où l'atténuation diminue grandement le signal.

II.2. Principe de base de la séquence Multiplane Wave

II.2.1. Principe du Multiplane Wave pour le cas simple de 2 ondes planes

La **Figure II-1 (a)** (partie gauche) représente schématiquement le principe de l'imagerie ultrarapide classique par *coherent compounding* (recombinaison cohérente) pour le cas simple de **N=2 ondes planes**. Au temps T_0 le milieu est insonifié avec une première onde plane inclinée avec un angle α_1 et les échos rétrodiffusés sont enregistrés. Puis, au temps T_1 , le milieu est à nouveau insonifié, cette fois-ci avec une seconde onde plane inclinée avec un angle α_2 . Les échos rétrodiffusés sont à nouveau enregistrés. Après l'étape de *beamforming* (formation des faisceaux) des données reçues, deux images radio fréquence (RF) de faible qualité sont obtenues. C'est l'addition cohérente de ces deux images qui permet de générer une image de haute qualité, comme décrit dans Montaldo et al. (2009). Chaque

onde plane est transmise à une fréquence fixée, appelée « fréquence de répétition des pulses » ou « *pulse repetition frequency* » en anglais (PRF), qui n'est limitée que par la durée de propagation dans le milieu, autrement dit par la profondeur d'imagerie. Ici dans le cas de $N=2$ ondes planes, deux images résultant de l'insonification par deux ondes planes différentes sont nécessaires pour créer l'image finale de haute qualité ; par conséquent la cadence d'imagerie finale correspond à la PRF divisée par deux. D'une façon générale la cadence d'imagerie finale est égale à la PRF divisée par le nombre d'ondes planes utilisées lors de l'étape de sommation cohérente. Ainsi, plus on utilise un grand nombre d'ondes planes pour former l'image finale meilleure est sa qualité mais aussi plus faible est la cadence d'imagerie. Cela illustre bien le compromis classique entre la qualité d'imagerie et la cadence d'imagerie auquel est confrontée la technique de recombinaison cohérente.

L'imagerie Multiplane Wave nous permet d'augmenter le rapport signal-à-bruit des images pour une cadence d'imagerie donnée, en utilisant une implémentation très simple. C'est une augmentation **artificielle** de l'amplitude du signal transmis qui permet d'augmenter la qualité des images finales, sans compromettre la cadence d'imagerie. En effet, souvent l'amplitude du front d'onde émis est limité par divers facteurs : les caractéristiques du circuit électronique des transducteurs ultrasonores, la

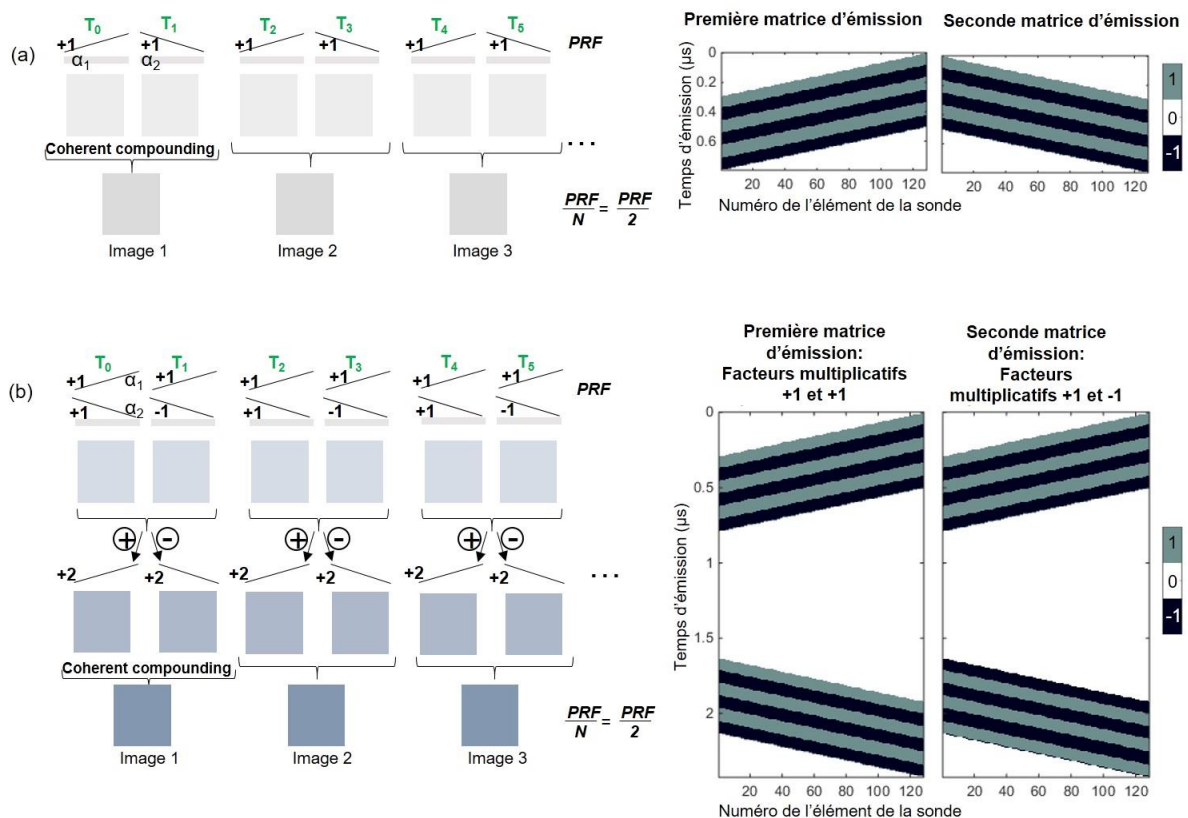


Figure II-1 : (a) Recombinaison cohérente pour $N=2$ ondes planes. (b) Multiplane Wave pour $N=2$ ondes planes. Pour chacune des deux méthodes, à gauche se trouve une représentation schématique de la séquence d'acquisition et à droite une représentation des formes d'ondes envoyées.

conception de la sonde, ou encore par des considérations liées à la sécurité telles que les limites sur l'indice mécanique (MI). Ainsi, l'amplitude est souvent déjà proche de sa valeur maximale et augmenter directement l'amplitude du signal transmis n'est pas possible. Voilà pourquoi une augmentation « artificielle » de l'amplitude du signal transmis apparaît comme une solution intéressante.

La solution proposée est présentée schématiquement dans la **Figure II-1 (b)** (partie gauche) pour le cas simple de **N=2 ondes planes**. Au temps T_0 , deux ondes planes inclinées avec des angles α_1 et α_2 sont envoyées **quasi-simultanément** dans le milieu : les deux ondes ne se chevauchent pas mais sont séparées temporellement par un très petit délai dt . Lors de cette première émission un facteur multiplicatif $+1$ est appliqué sur les deux fronts d'ondes. Les échos rétrodiffusés sont reçus et stockés dans la mémoire de la machine. Au temps T_1 , les deux mêmes ondes planes inclinées avec des angles α_1 et α_2 sont à nouveau envoyées dans le milieu, à la différence près cette fois-ci qu'un facteur multiplicatif $+1$ est appliqué sur l'amplitude du premier front d'onde, tandis qu'un facteur multiplicatif -1 est appliqué sur l'amplitude du deuxième front d'onde. Les échos rétrodiffusés sont à nouveau reçus et stockés dans la mémoire de la machine. Deux images RF sont donc obtenues, une pour chaque émission aux temps T_0 et T_1 . Ces deux images sont ensuite sommées de façon cohérente. On peut alors remarquer que la sommation des deux images fait disparaître la contribution de l'angle α_2 , dans un régime linéaire de propagation, à cause des facteurs multiplicatifs qui ont été appliqués sur cet angle (en effet $(+1) + (-1) = 0$), tandis que les contributions de l'angle α_1 s'ajoutent $((+1) + (+1) = 2)$. Ainsi, on remarque que la sommation des deux images RF permet d'obtenir la même image que si une onde plane unique, transmise avec une inclinaison α_1 , avait été envoyée avec une **amplitude deux fois plus grande**. Dans une seconde combinaison la soustraction des deux images permet de faire disparaître la contribution de l'angle α_1 $((+1) - (+1) = 0)$, tandis que les contributions de l'angle α_2 s'ajoutent $((+1) - (-1) = 2)$. Cette fois on remarque donc que la soustraction permet d'obtenir la même image que si une onde plane unique, transmise avec une inclinaison α_2 , avait été envoyée avec une amplitude deux fois plus grande. Enfin, le délai dt entre les deux ondes planes est compensé et les deux images résultantes sont sommées de façon cohérente afin d'obtenir l'image finale. Il est important de noter que cette dernière étape de sommation cohérente (notée « *coherent compounding* » sur le schéma) est rigoureusement la même que celle présente dans la méthode de recombinaison cohérente (**Figure II-1 (a)** partie gauche).

Le temps séparant deux images consécutives est limité seulement par la durée de propagation des ultrasons dans le milieu. Par conséquent si le jeu d'ondes planes est envoyé avec la même PRF que celle de la méthode classique par recombinaison cohérente, la **cadence d'imagerie finale** est ici aussi égale à la **PRF/N** (avec N le nombre d'ondes planes), soit ici $PRF/2$. En conclusion, le Multiplane Wave

conduit bien à une augmentation virtuelle de l'amplitude du signal transmis sans aucune modification de la cadence finale ultrarapide.

II.2.2. Zone aveugle due à la durée d'émission

Dans cet exemple utilisant 2 ondes planes on peut noter que la matrice d'émission est logiquement au minimum deux fois plus grande que dans le cas d'une seule onde plane (**Figure II-1 (a) et (b)** partie droite). Dans notre cas un délai Δt est introduit entre les deux ondes planes. Ce délai est choisi de façon à être approximativement de la même durée que la durée d'une de nos ondes planes, de manière à laisser le temps aux transducteurs de revenir à zéro et d'éviter d'éventuels artéfacts. L'échographe ne peut pas recevoir les échos rétrodiffusés tant que l'émission n'est pas terminée. Par conséquent, comme la matrice d'émission est plus longue dans le cas du Multiplane Wave que dans le cas classique d'ondes planes envoyées séparément, la **zone aveugle** à la surface de l'image due à la durée de l'émission est plus grande. Cette zone aveugle peut se calculer approximativement par la formule suivante :

$$d_{\text{aveugle}} \approx c * \frac{t_{\text{em}}}{2} \quad \text{Équation II-1}$$

où c représente la célérité des ultrasons et t_{em} la durée des émissions. Dans le cas de la méthode par recombinaison cohérente classique, et pour $\alpha = \pm 1^\circ$, d_{aveugle} vaut :

$$d_{\text{aveugle}} \approx 1540 * \frac{0.8 * 10^{-6}}{2} = 0.6 \text{ mm} .$$

Tandis que le cas Multiplane Wave avec la même inclinaison ($\alpha = \pm 1^\circ$) donne :

$$d_{\text{aveugle}} \approx 1540 * \frac{2.4 * 10^{-6}}{2} = 1.8 \text{ mm} .$$

La zone aveugle reste de taille négligeable pour un petit nombre d'ondes planes et pour de faibles inclinaisons mais elle doit être prise en compte dans le cas d'un nombre important d'ondes planes ou lorsque les ondes sont fortement inclinées. Il est cependant intéressant de remarquer qu'un grand nombre d'ondes planes est justement plutôt utilisé pour imager des structures profondes c'est-à-dire relativement loin de la sonde et de la zone aveugle décrite ici.

II.2.3. Principe du Multiplane Wave pour N ondes planes, avec $N > 2$

Pour plus de clarté le principe du Multiplane Wave a été introduit dans ce chapitre pour le cas simple de $N=2$ ondes planes, mais il peut être généralisé pour un nombre quelconque d'ondes planes. Il faut simplement trouver les combinaisons appropriées de facteurs multiplicatifs +1 et -1 à appliquer à chaque jeu d'ondes planes de manière à ce que chaque onde plane du jeu puisse être retrouvée comme si elle avait été envoyée séparément des autres avec une amplitude N fois plus grande. Dans

le cadre de cette thèse nous avons choisi d'utiliser des **matrices d'Hadamard** afin de trouver ces facteurs multiplicatifs, car elles permettent de créer des vecteurs indépendants ne contenant que des coefficients +1 et -1. Ces matrices ont déjà de multiples applications en traitement du signal, codage ou cryptographie (Horadam 2007) et ont déjà été appliquées dans le cadre des ultrasons à l'imagerie par ouverture synthétique (Chiao, Thomas, and Silverstein 1997; Mosca et al. 2008). Une matrice de Hadamard est une matrice carrée ne contenant que des valeurs +1 ou -1 et dont les lignes sont mutuellement orthogonales. Une des propriétés intéressantes de ces matrices est que la multiplication de H_N (matrice de Hadamard d'ordre N) par sa transposée H_N^t est égale à N fois la matrice identité :

$$H_N \cdot H_N^t = N \cdot I \quad \text{Équation II-2}$$

C'est cette propriété qui est utilisée dans le cas du Multiplane Wave et qui permet de retrouver chaque onde plane séparément des autres.

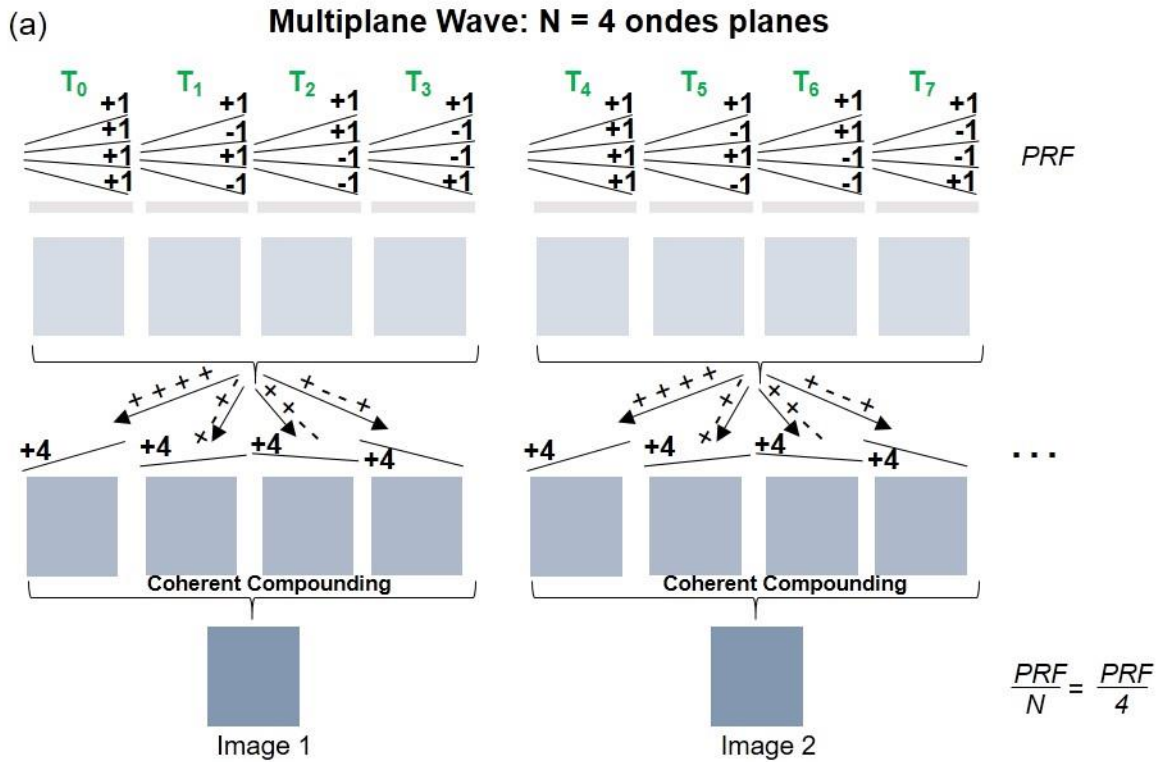
L'ordre d'une matrice d'Hadamard doit être 1, 2 ou un multiple de 4. La plus petite matrice d'Hadamard est $H_1 = [1]$. Les suivantes, d'ordre 2^k (avec $2 \leq k \in \mathbb{N}$), peuvent être calculées en utilisant la construction de Sylvester (Sylvester 1867) :

$$H_2^k = \begin{bmatrix} H_2^{k-1} & H_2^{k-1} \\ H_2^{k-1} & -H_2^{k-1} \end{bmatrix}, \quad \text{Équation II-3}$$

où H_2 est la matrice de Hadamard d'ordre 2 telle que $H_2 = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{bmatrix}$.

La **Figure II-2** représente le cas de $N=4$ ondes planes. Les coefficients contenus dans les colonnes de la matrice d'Hadamard peuvent être vus comme les facteurs multiplicatifs à appliquer aux différentes émissions, tandis que les coefficients sur les lignes peuvent être vus comme les combinaisons d'addition et de soustraction nécessaires afin de retrouver chaque onde plane individuellement et avec une amplitude N fois plus grande. Dans le cadre de cette thèse nous avons utilisé le Multiplane Wave avec N allant de **2 à 32 ondes planes**, nous avons donc utilisé des matrices d'Hadamard d'ordre 2 à 32.

Dans la partie suivante nous quantifions les performances du Multiplane Wave en comparant cette méthode d'imagerie à la méthode classique par recombinaison cohérente. Nous nous attendons à ce que l'augmentation virtuelle de l'amplitude du signal émis résulte en une augmentation globale du rapport signal-à-bruit des images.



(b) **Utilisation de coefficients d'Hadamard**

Colonnes = Amplitudes des ondes planes

$$H_4 = \begin{bmatrix} +1 & +1 & +1 & +1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & -1 & +1 \end{bmatrix}$$

Lignes = opérations d'addition ou de soustraction

Figure II-2 : (a) Représentation schématique de la séquence du Multiplane Wave pour N=4 ondes planes. (b) Exemple de matrice de Hadamard pour N=4.

II.3. Quantification des performances du Multiplane Wave par imagerie B-mode sur un fantôme d'imagerie

Description du setup :

La séquence Multiplane Wave a été implémentée sur un système échographique multivoies de recherche (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) permettant d'utiliser Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). Nous avons testé les performances du Multiplane Wave à la fois en termes de rapport signal-à-bruit et en termes de contraste, sur un fantôme d'imagerie (model 551, ATS laboratories, Bridgeport, USA) présentant des inclusions anéchoïques de 3 mm de diamètre

entourées d'un environnement de *speckle* homogène. Nous avons utilisé les 128 premiers éléments d'une sonde de 160 éléments ayant une fréquence centrale de 6 MHz et un pas de 0.2 mm (Vernon, Tours, France). Un filtre à réponse impulsionnelle finie a été utilisé en réception pour limiter la bande passante en réception à 90%. Cent images ont été acquises dans ces conditions, en utilisant tout d'abord la séquence classique de recombinaison cohérente, puis en utilisant l'imagerie par Multiplane Wave afin de comparer les performances des deux séquences d'imagerie.

Calcul du rapport signal-à-bruit :

Nous avons tracé le rapport signal-à-bruit en fonction de la profondeur d'imagerie pour les deux méthodes. Le **rapport signal-à-bruit** (SNR) est défini, comme le rapport du signal sur le bruit dans une zone d'intérêt de l'image. Nous avons défini une zone d'intérêt de 10 pixels de large, contenant les inclusions. Pour chaque pixel de la zone d'intérêt le signal ultrasonore a été calculé comme la moyenne du signal sur les 100 images, tandis que le bruit a été calculé comme l'écart-type du signal. Pour chaque profondeur le SNR a été moyenné dans la direction de la sonde sur les 10 pixels.

Calcul du contraste :

Le **contraste** représente la capacité de détecter un objet anéchoïque incorporé dans un milieu homogène diffusant, autrement dit de détecter l'inclusion par rapport au fond de l'image (le *background*). Le contraste a été calculé de la façon suivante :

$$\text{Contraste} = 10 \cdot \log_{10} \frac{\int_{x,z \in D_{\text{ext}}} |h(x,z)|^2 dx dz}{\int_{x,z \in D_{\text{int}}} |h(x,z)|^2 dx dz}, \quad \text{Équation II-4}$$

Le numérateur représente le signal du *background* de l'image. Il se calcule comme la moyenne du signal sur les cent images acquises pris dans une région d'intérêt proche de l'inclusion mais ne contenant pas d'inclusion : D_{ext} (D_{ext} , 10x10 pixels = 2 x 2.4 mm). Le dénominateur représente le signal dans l'inclusion anéchoïque et se calcule comme la moyenne du signal sur les cent images acquises, pris dans une région d'intérêt contenant l'inclusion : D_{in} (de la même taille que D_{ext}).

Le SNR et le contraste ont été calculés pour un nombre d'ondes planes allant de 2 à 32. Dans le cas d'un **petit nombre d'ondes planes** il est intéressant d'utiliser un écart angulaire $\Delta\theta$ **assez grand** entre deux ondes planes successives. Dans notre cas nous avons choisi $\Delta\theta=2^\circ$. Ceci permet d'assurer une bonne décorrélation des signaux reçus lors de l'étape de sommation cohérente, même si le nombre d'ondes planes est petit. Un petit nombre d'ondes planes permet d'atteindre des cadences d'imagerie très grande. Par conséquence cette stratégie (« petit nombre d'ondes planes avec un grand écart angulaire entre chaque onde plane ») est typiquement employée pour des modalités

d'imagerie ultrarapide. Parfois, il est cependant préférable d'utiliser un **grand nombre d'ondes planes** pour obtenir des images de meilleure qualité, même si cela conduit à une cadence d'imagerie plus faible. Dans ce cas, si l'on conserve un écart angulaire grand entre chaque onde plane, les inclinaisons des ondes planes envoyées peuvent vite dépasser la directivité de la sonde. On préfère donc dans ce cas utiliser une stratégie alternative : on fixe l'ouverture angulaire maximale θ_{\max} en fonction de la directivité de la sonde, et on en déduit ensuite l'écart angulaire $\Delta\theta$ en fonction du nombre d'ondes planes utilisées. Avec une telle configuration la cadence d'imagerie décroît avec le nombre d'ondes planes mais la qualité augmente. Nous avons mesuré les performances de notre séquence Multiplane Wave dans ces deux configurations.

II.3.1. Configuration permettant une grande cadence d'imagerie : utilisation d'un petit nombre d'ondes planes (N variant de 2 à 8 ondes planes)

La **Figure II-3 (a)** contient les graphiques de SNR en fonction de la profondeur d'imagerie, calculés pour **N=2, 4 et 8 ondes planes**. Nous avons fixé l'écart angulaire entre deux ondes planes à $\Delta\theta=2^\circ$. Les courbes bleues correspondent aux acquisitions faites avec la méthode de *coherent compounding* (recombinaison cohérente), les courbes rouges correspondent aux acquisitions faites avec la séquence Multiplane Wave. Quelle que soit la méthode d'imagerie on remarque que le SNR décroît exponentiellement avec la profondeur. En effet, à cause de l'atténuation des ultrasons avec la profondeur, l'amplitude des signaux rétrodiffusés, et par conséquent l'amplitude des signaux reçus, décroît exponentiellement avec la profondeur. Au contraire, le bruit qui est principalement d'origine électronique, peut être supposé uniforme dans l'image, quelle que soit la profondeur. Cela explique pourquoi le SNR, défini comme le rapport entre le signal et le bruit, décroît de manière exponentielle avec la profondeur (**Figure II-3 (a)**). Le SNR diminue également dans les inclusions anéchoïques, ce qui est normal puisque le signal est plus faible dans ces régions-là que dans le *background* environnant. Quel que soit le nombre d'ondes planes utilisé, l'imagerie par Multiplane Wave donne un meilleur SNR que la méthode de recombinaison cohérente. Cela s'explique par le fait que lorsque N=2, 4 ou 8 ondes planes sont envoyées en même temps par la méthode Multiplane Wave, seulement une onde plane est envoyée par émission en utilisant la méthode de recombinaison cohérente. On s'attend donc à un signal reconstruit N fois plus fort avec le Multiplane Wave qu'avec la recombinaison cohérente, tout en gardant un bruit électronique équivalent. Le gain théorique est donc :

$$G_{\text{th}} = 10 \log_{10}(N_{\text{émissionMP}}), \quad \text{Équation II-5}$$

avec $N_{\text{émissionMP}}$ le nombre d'ondes planes envoyées à chaque émission avec le Multiplane Wave. Expérimentalement on mesure les gains suivants : $G_{\text{exp}}(2)=2.8 \pm 0.4$ dB, $G_{\text{exp}}(4)=5.8 \pm 0.5$ dB, et

$G_{\text{exp}}(8)=8.3 \pm 0.6$ dB, en accord avec les gains théoriques $G_{\text{th}}(2)=3$ dB, $G_{\text{th}}(4)=6$ dB and $G_{\text{th}}(8)=9$ dB. Le bénéfice du Multiplane Wave par rapport à la recombinaison cohérente est surtout visible **en profondeur**. En effet, on peut remarquer que les courbes bleues, correspondant à la recombinaison cohérente, sont presque complètement plates et égales à zéro là où se trouve la 5^{ème} inclusion (autour de 60 mm de profondeur), tandis que les deux dernières courbes rouges, correspondant au Multiplane Wave pour $N=4$ et 8 ondes planes, mettent clairement en évidence la présence de l'inclusion.

Sur la **Figure II-3 (b)** sont présentées côte-à-côte les images B-mode du fantôme imagé pour un même nombre d'ondes planes, par la méthode de recombinaison cohérente (encadrées en bleue) ou par Multiplane Wave (encadrées en rouge). Cette figure met bien en évidence l'amélioration de la qualité d'imagerie en utilisant le Multiplane Wave. L'inclusion la plus profonde (autour de 60 mm) commence à être visible en utilisant $N=4$ ondes planes et est clairement visible dans l'image réalisée avec $N=8$ ondes planes avec la méthode Multiplane Wave, tandis qu'elle reste complètement invisible avec la méthode de recombinaison cohérente, même dans le cas de 8 ondes planes.

Pour les deux méthodes, proche de la surface on peut remarquer que le contraste s'améliore quand le nombre d'ondes planes utilisées augmente. Pour un nombre d'ondes planes fixé, le Multiplane Wave n'améliore que faiblement le contraste des images proche de la surface. Ces observations faites à l'œil nu sont confirmées par les courbes tracées dans la **Figure II-3 (c)**. Afin de réaliser ces graphes deux inclusions ont été sélectionnées : une proche de la surface du fantôme (autour de 30 mm de profondeur, encadrée par une ligne continue dans la **Figure II-3 (b)**), et une autre plus profonde dans le fantôme (autour de 60 mm, encadrée par une ligne pointillée dans la **Figure II-3 (b)**). On remarque sur cette figure que le contraste de l'inclusion proche de la surface (courbes en ligne continue) est clairement amélioré, quelle que soit la méthode d'imagerie utilisée, lorsque que le nombre d'ondes planes augmente. Et on remarque également que le Multiplane Wave n'améliore que faiblement le contraste. Au contraire, dans la région plus profonde, on remarque que le principal facteur pour améliorer le contraste est l'utilisation du Multiplane Wave (courbes en ligne pointillée). Avec $N=8$ ondes planes, le gain apporté par le Multiplane Wave par rapport à la recombinaison cohérente est de 4 dB, tandis que passer de 4 à 8 ondes planes pour la méthode de recombinaison cohérente n'améliore quasiment pas le contraste.

Petit nombre d'ondes planes, $\Delta\theta = 2^\circ$

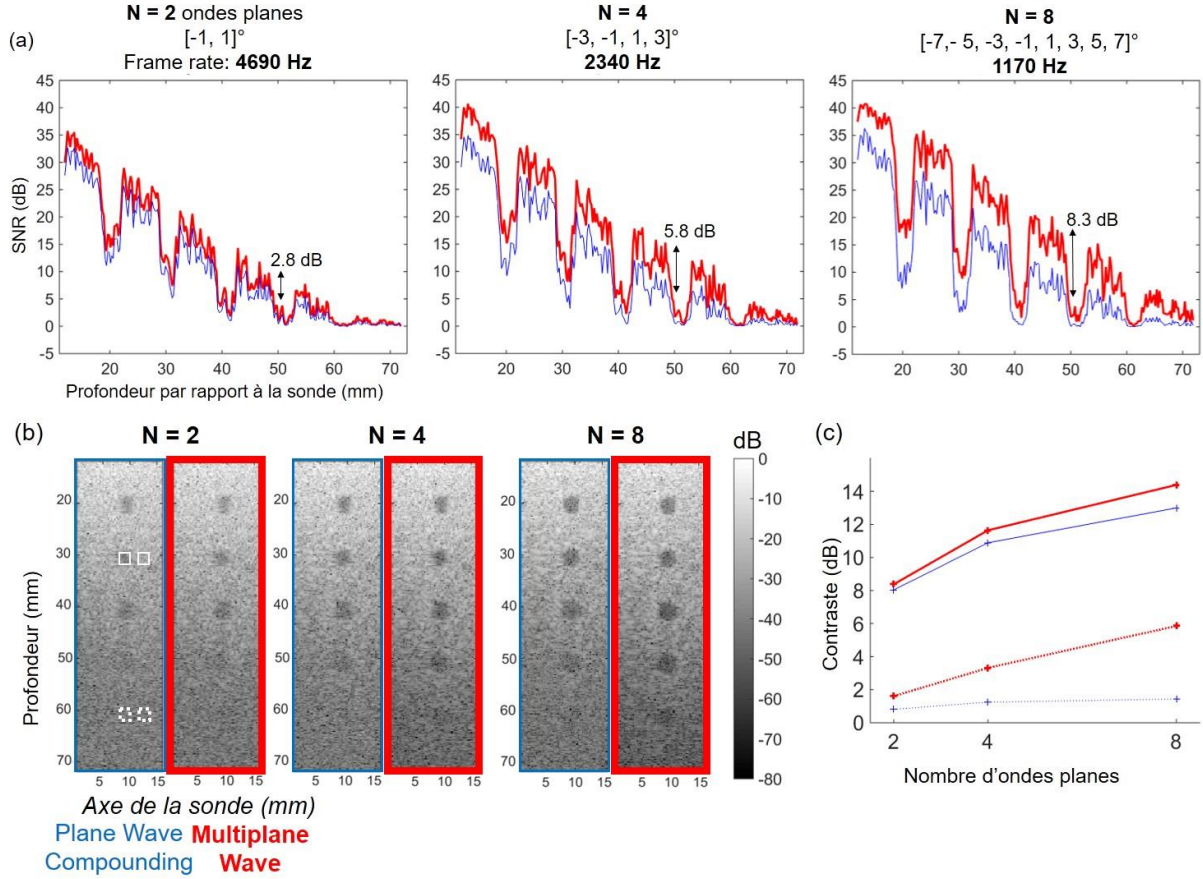


Figure II-3 : Quantification en termes de SNR et de contraste dans le cas d'un petit nombre d'ondes planes : comparaison entre le coherent compounding (recombinaison cohérente) (lignes bleues fines) et le Multiplane Wave (lignes rouges épaisses), en utilisant $N=2, 4$, ou 8 ondes planes inclinées séparées par $\Delta\theta = 2^\circ$. (a) Rapport signal-à-bruit en fonction de la profondeur d'imagerie, calculé sur une zone contenant les inclusions. On note une réelle augmentation du SNR pour les dernières inclusions grâce à l'utilisation du Multiplane Wave. Les gains mesurés expérimentalement ($G_{exp}(2)=2.8 \pm 0.4$ dB, $G_{exp}(4)=5.8 \pm 0.5$ dB, and $G_{exp}(8)=8.3 \pm 0.6$ dB) sont en accord avec les gains théoriques : $G_{th}=10 \cdot \log_{10}(N)$, correspondant respectivement à 3 dB, 6 dB et 9 dB. (b) Images B-mode correspondantes. (c) Contraste en fonction du nombre d'ondes planes utilisées, calculé pour une inclusion proche de la surface du fantôme (30 mm, lignes continues) et une inclusion plus profonde dans le fantôme (60 mm, lignes pointillées).

II.3.2. Configuration permettant une grande qualité d'imagerie à des cadences plus faible : utilisation d'un grand nombre d'ondes planes (N variant de 8 à 32 ondes planes)

Dans la **Figure II-4** les performances du Multiplane Wave sont comparées à celles de la méthode par *coherent compounding* (recombinaison cohérente) pour des configurations utilisant un grand nombre d'ondes planes (jusqu'à $N=32$ ondes planes) avec une ouverture angulaire fixée. θ_{max} a

été fixée à 9° afin d'assurer $\Delta\theta \geq 0.6^\circ$ (plus petite valeur utile d'après l'équation 12 de l'article de Montaldo et al. (2009) pour cette sonde), même dans le cas de 32 ondes planes. Les courbes bleues représentent la méthode par recombinaison cohérente, les courbes rouges la méthode Multiplane Wave. Là encore les gains de SNR mesurés expérimentalement ($G_{\text{exp}}(8)=8.3 \pm 0.7$ dB, $G_{\text{exp}}(16)=11.4 \pm 0.7$ dB, et $G_{\text{exp}}(32)=13.5 \pm 0.6$ dB) sont en accord avec ceux calculés théoriquement ($G_{\text{th}}(8)=9$ dB, $G_{\text{th}}(16)=12$ dB, and $G_{\text{th}}(32)=15$ dB) à l'aide de l'Équation II-5 (**Figure II-4 (a)**). Les images B-mode mettent bien en évidence l'apport du Multiplane Wave par rapport à la recombinaison cohérente surtout pour imager en profondeur (**Figure II-4 (b)**) : l'inclusion autour de la profondeur 60 mm reste invisible avec la recombinaison cohérente, même pour $N=32$ ondes planes, alors qu'elle est visible avec le Multiplane Wave à partir de $N=8$ ondes planes.

Sur la **Figure II-4 (c)** on remarque que pour un très grand nombre d'ondes planes, quand l'écart angulaire $\Delta\theta$ devient petit, les ondes planes sont moins décorrélées entre elles et le contraste tend à converger vers une valeur limite.

Enfin, que ce soit avec un petit ou grand nombre d'ondes planes, la **cadence d'imagerie maximale** atteignable a été calculée par la formule suivante :

$$F_{\text{rate}} = \frac{1}{N * t_{A/R}} \quad \text{Équation II-6}$$

avec $t_{A/R}$ le temps pour l'onde ultrasonore pour faire un aller-retour jusqu'à la profondeur d'imagerie maximale d_{max} ($d_{\text{max}} = 80$ mm dans ces acquisitions B-mode) et N le nombre d'ondes planes utilisées. Ces cadences d'imageries calculées pour $N=2, 4, 8$ et $N=8, 16, 32$ ondes planes sont respectivement reportées dans les **Figure II-3** et **Figure II-4**. L'imagerie Multiplane Wave, précédemment introduite comme un moyen pour augmenter le SNR sans compromettre la cadence d'imagerie peut également être vue comme une méthode d'imagerie permettant d'atteindre des cadences plus élevée, à qualité d'imagerie équivalente à celle de la recombinaison cohérente.

En conclusion, dans cette troisième partie du chapitre II, nous avons confirmé de manière expérimentale que le Multiplane Wave donnait de meilleurs résultats en termes de SNR et de contraste que la méthode classique de *coherent compounding* (recombinaison cohérente), et ce plus particulièrement en profondeur, où le bruit électronique est le principal facteur de perte de contraste. L'utilisation du Multiplane Wave est donc d'une grande aide dès lors qu'il s'agit d'améliorer la qualité des images en termes de SNR ou de contraste dans des zones profondes, sans diminuer la cadence d'imagerie. Dans les deux parties suivantes de ce chapitre II nous avons appliqué le Multiplane Wave à deux modalités qui nécessitent de très grande cadence d'imagerie : **l'élastographie par ondes de**

cisaillement et le **Doppler ultrarapide**. Les avantages du Multiplane Wave par rapport à la recombinaison cohérente classique sont présentés pour ces deux applications.

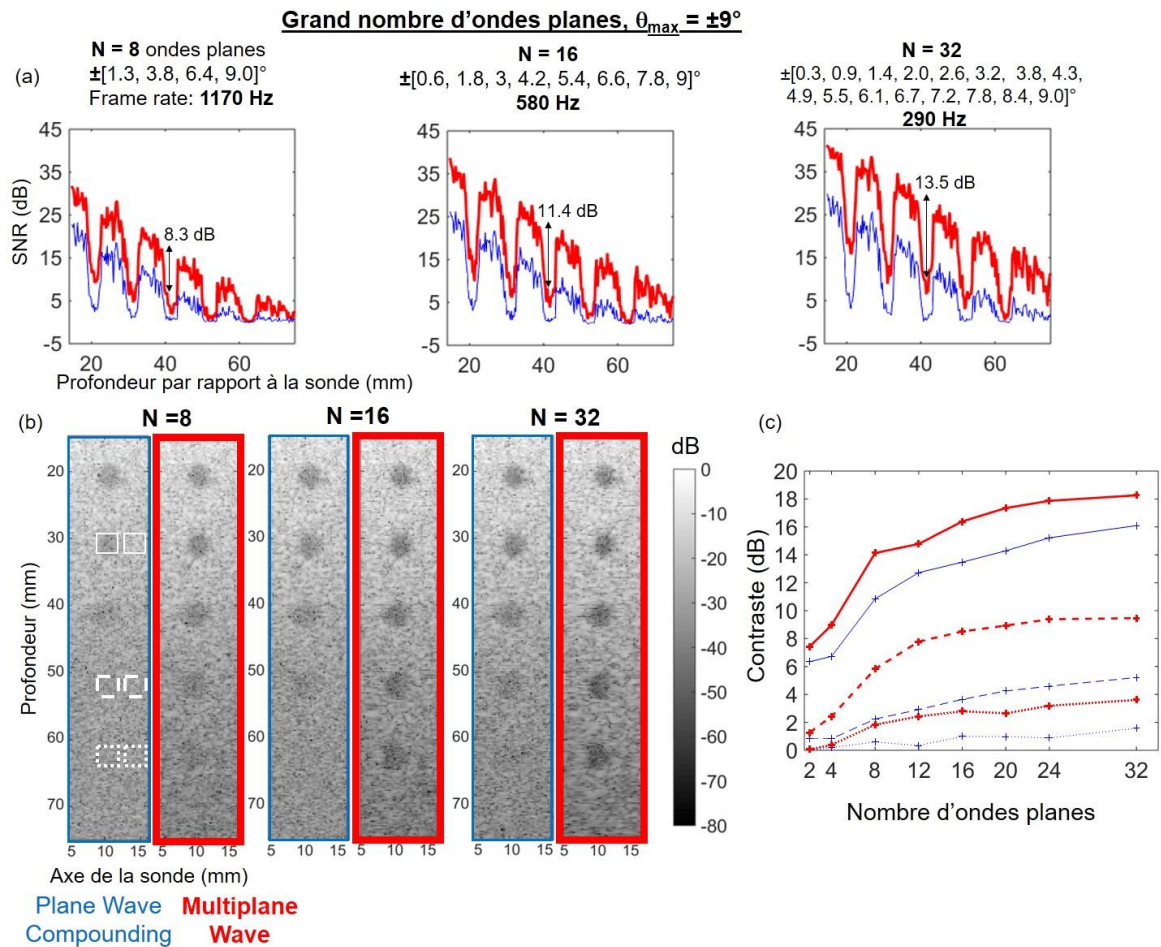


Figure II-4 : Quantification en termes de SNR et de contraste dans le cas d'un grand nombre d'ondes planes : comparaison entre le coherent compounding (recombinaison cohérente) (lignes bleues fines) et le Multiplane Wave (lignes rouges épaisses). (a) SNR en fonction de la profondeur, calculé sur une zone contenant les inclusions. (b) Images B-mode obtenues pour N=8, 16 et 32 ondes planes inclinées avec un angle maximal $\theta_{max} = 9^\circ$. Les carrés représentent la position des inclusions utilisées pour la quantification du contraste dans la **Figure II-4** (c). (c) Contraste en fonction du nombre d'ondes planes utilisées, calculé pour une inclusion proche de la surface du fantôme (30 mm, lignes continues) et deux inclusions plus profondes dans le fantôme (50 mm, lignes de tirets et 60 mm, lignes en pointillés).

II.4. Application du Multiplane Wave à des modalités d'imagerie nécessitant une grande cadence d'imagerie

II.4.1. Application à l'élastographie par onde de cisaillement sur un fantôme de sein

Courte introduction à l'élastographie par onde de cisaillement

Dans les tissus mous humains, les ondes de cisaillement basses fréquences, de l'ordre de 50 à 500 Hz, se propagent à des vitesses très faibles (~ 1 à 10 m/s). L'élastographie par onde de cisaillement consiste à imager le **déplacement des tissus**, induit par des **ondes de cisaillement** (Mickael Tanter et al. 2008). Ces ondes de cisaillement sont créées en utilisant des ondes de compression se propageant à de très grandes vitesses, autour de 1500 m/s. Pour observer la propagation de l'onde de cisaillement, la cadence d'imagerie doit atteindre des valeurs supérieures à 1000 Hz.

Description du setup

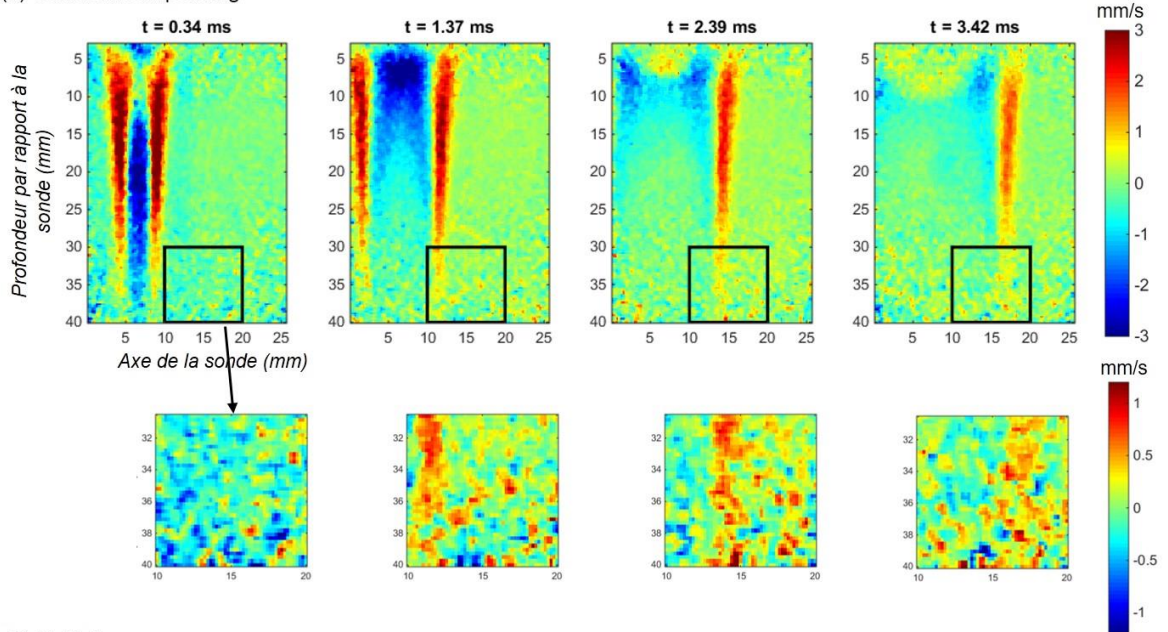
Dans cette étude, les ondes de cisaillement sont générées par la force de radiation acoustique créée par un faisceau ultrasonore focalisé de 150 μ s (appelé généralement un « *push* » ultrasonore), en utilisant la technique *Supersonic Shear Imaging* (Mickael Tanter et al. 2008). La séquence a été implémentée sur un système échographique multivoies de recherche du laboratoire (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) à l'aide de Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). Nous avons utilisé les 128 premiers éléments d'une sonde de 160 éléments fonctionnant à la fréquence centrale de 6 MHz et ayant un pas de 0.2 mm. Un filtre à réponse impulsionnelle finie a été utilisé en réception pour limiter la bande passante en réception à 90%.

La propagation de l'onde de cisaillement induite dans un fantôme de sein (modèle 059, CIRS, Norfolk, USA) a été imagée en utilisant 4 ondes planes (inclinées avec des angles de -3, -1, 1 et 3°), soit avec la méthode classique de recombinaison cohérente (**Figure II-5 (a)**), soit avec le Multiplane Wave (**Figure II-5 (b)**). Dans les deux configurations, la PRF a été fixée à 11.7 kHz. Après l'étape de sommation cohérente les images échographiques finales sont donc obtenues avec une cadence d'imagerie de 2.9 kHz.

Résultats

Pour les deux séquences d'imagerie, nous avons calculé l'écart-type temporel de la **vitesse particulière**, longtemps après le passage de l'onde de cisaillement, sur 10 images. La valeur a été moyennée sur la région d'intérêt carrée dessinée dans la **Figure II-5**. Les mesures faites donnent les valeurs d'écart-type suivantes, estimées sur 10 acquisitions différentes : $\sigma_{\text{CoherentCompounding}} = 0.329 \pm 0.004$ mm/s et $\sigma_{\text{MultiplaneWave}} = 0.159 \pm 0.002$ mm/s. Comme attendu, la séquence Multiplane Wave utilisant N=4 ondes planes induit une réduction de moitié de l'écart-type temporel de la vitesse particulière ($\sigma_{\text{PlaneWave}} / \sigma_{\text{MultiplaneWave}} = 2.07 \pm 0.05$). Cette valeur est en accord avec la théorie pour l'émission de N = 4 ondes planes. Cette réduction du bruit permise grâce au Multiplane Wave, peut être vue dans les images de vitesse de déplacement des tissus, présentées dans la **Figure II-5**, notamment en profondeur, comme le montre le zoom fait sur la région d'intérêt pour les deux méthodes.

(a) Coherent compounding



(b) Multiplane wave

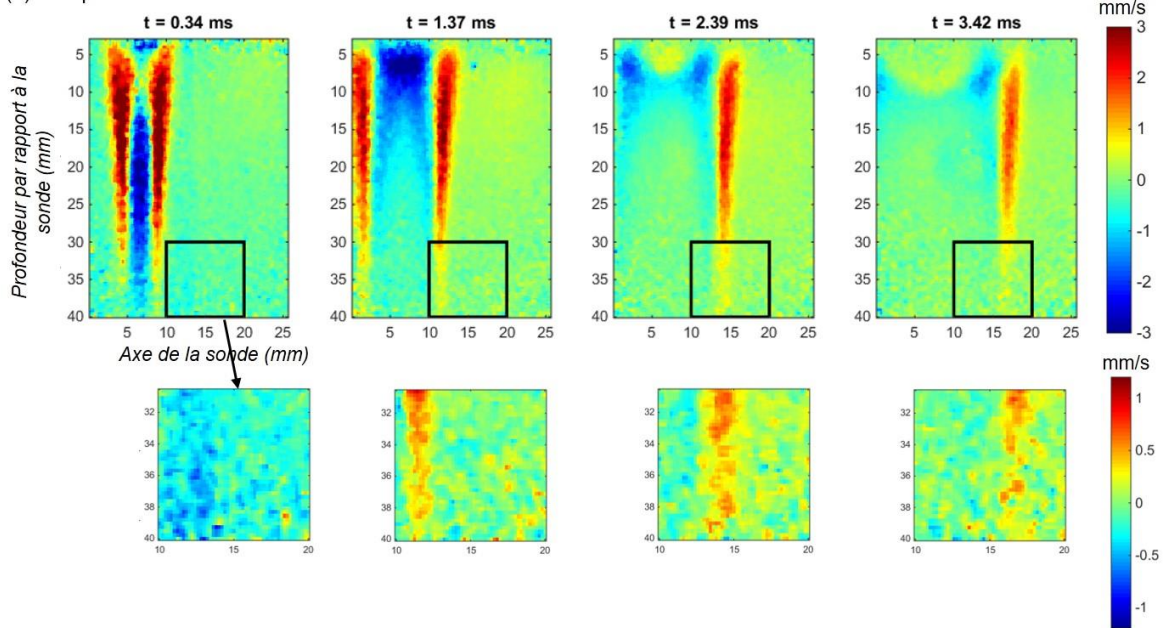


Figure II-5 : Elastographie par onde de cisaillement sur un fantôme de sein en utilisant 4 ondes planes (-3, -1, 1 et 3°). (a) Imagerie par recombinaison cohérente. (b) Imagerie par Multiplane Wave.

L'estimation de la vitesse de déplacement des tissus a un impact direct sur le calcul de la carte de **vitesse de l'onde de cisaillement**, comme cela a récemment été démontré dans Deffieux et al. (2012). Les bénéfices du Multiplane Wave sur la carte de vitesse de l'onde de cisaillement ont été quantifié en termes d'écart-type sur plusieurs acquisitions. Nous nous sommes aussi intéressés à l'étendue de la zone reconstruite dans la carte des vitesses. L'estimation locale de la vitesse de l'onde de cisaillement est faite en utilisant un simple algorithme de temps de vol (Mickael Tanter et al. 2008). Le temps de vol Δt est estimé par corrélation croisée entre les profils temporels de déplacement au point x et au

point $x + \Delta x$. Dans cette expérience, Δx a été fixé à 1.2 mm et la même acquisition a été répétée 10 fois, avec les deux méthodes d'imagerie. Les cartes moyennes de vitesse de l'onde de cisaillement obtenues sur le fantôme de sein en utilisant cet algorithme sont représentées dans la **Figure II-6**. Pour chaque pixel de l'image, l'écart-type sur les 10 acquisitions a été estimé. Puis, le pixel contenant la valeur de la vitesse de l'onde de cisaillement a été affiché seulement quand l'écart-type correspondant était inférieur à 20% de la vitesse de cisaillement moyenne, soit 0.4 m/s dans cette expérience. On appelle « zone reconstruite » la zone qui contient les pixels qui sont inférieurs à ce seuil. L'image de fond est l'image B-mode. En utilisant la recombinaison cohérente classique 42% de l'image dans le rectangle noir (**Figure II-6**) est reconstruite, tandis qu'en utilisant l'imagerie par Multiplane Wave la zone reconstruite atteint 59% du rectangle noir. On observe une fois encore que le Multiplane Wave permet d'imager **plus en profondeur** que la recombinaison cohérente classique. Cela résulte directement de l'amélioration du SNR dans l'estimation de la vitesse de l'onde de cisaillement (Deffieux et al. 2012).

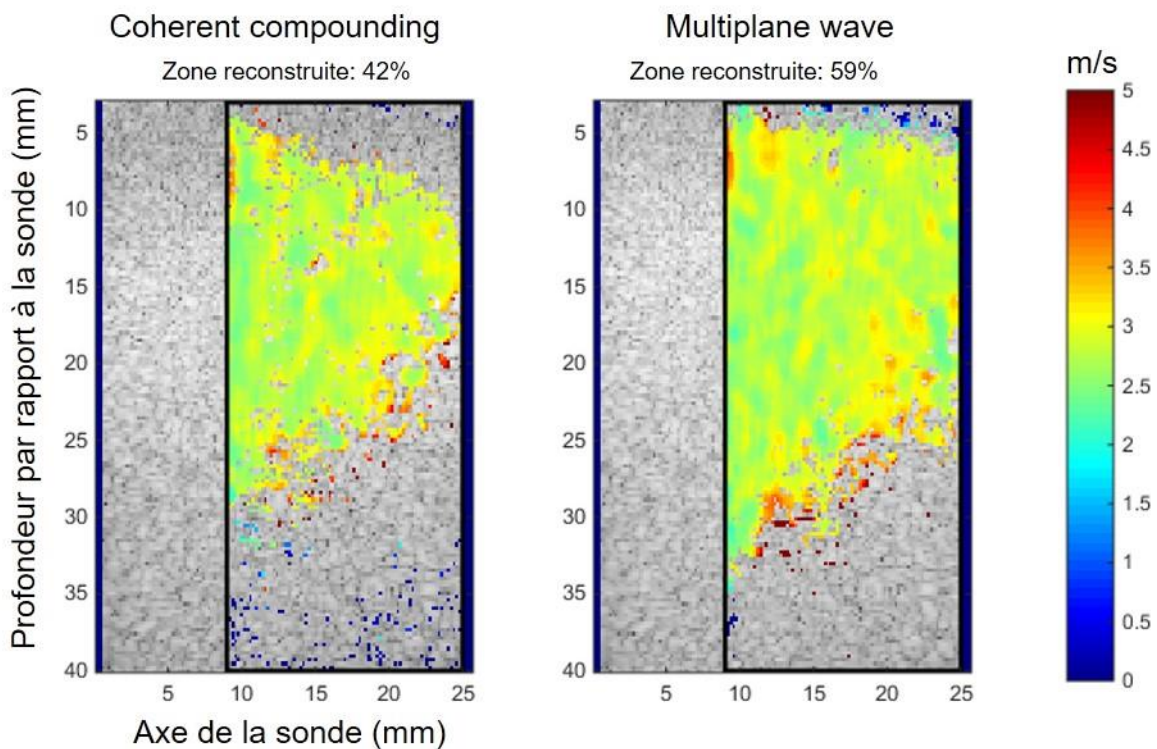


Figure II-6 : Elastographie par onde de cisaillement sur un fantôme de sein en utilisant 4 ondes planes (-3, -1, 1 et 3°). Comparaison entre le coherent compounding (recombinaison cohérente) (à gauche) et le Multiplane wave (à droite) : carte moyenne de la vitesse de l'onde de cisaillement (moyenne sur $N=10$ acquisitions) superposée à l'image B-mode. Un seuil sur l'écart-type a été utilisé, seuls les pixels pour lesquels l'écart-type sur la vitesse de cisaillement était inférieur à 0.4 m/s ont été dessinés dans l'image. En utilisant la recombinaison cohérente classique seul 42% de l'image contenue dans le rectangle noir est reconstruite, tandis qu'avec le multiplane wave la zone reconstruite atteint 59%.

L'écart-type dans les cartes des vitesses moyennes de l'onde de cisaillement obtenues pour les deux séquences a été estimé sur 10 acquisitions. On trouve un écart-type $\sigma_{\text{CohrentCompounding}} = 0.15 \pm 0.09$ m/s pour la recombinaison cohérente et un écart-type $\sigma_{\text{MultiplaneWave}} = 0.07 \pm 0.05$ m/s pour le Multiplane Wave. Comme attendu, le Multiplane Wave avec l'émission de N=4 ondes planes permet une réduction de moitié de l'écart-type de la vitesse de l'onde de cisaillement dans la zone reconstruite. Là-encore cette valeur est en accord avec la théorie pour l'émission de N=4 ondes planes. En effet une diminution de l'écart-type dans l'estimation de la vitesse particulaire a pour conséquence une diminution de l'écart-type pour l'estimation de la vitesse de l'onde de cisaillement (Deffieux et al. 2012).

En conclusion de cette partie, le Multiplane Wave permet une nette amélioration de la précision de l'imagerie de l'onde de cisaillement : une réduction du bruit dans le film de propagation de l'onde de cisaillement induit une plus grande zone reconstruite dans les cartes de vitesse de l'onde de cisaillement, et une plus grande précision pour l'estimation de la vitesse locale de l'onde.

II.4.2. Application à l'imagerie Doppler ultrarapide *in vivo* sur un cerveau de rat anesthésié

Description du setup

Pour cette expérience, afin de permettre la propagation des ultrasons jusqu'au cerveau du rat, le crâne du rat a été affiné, sous anesthésie générale (Kétamine/Xylazine). Le rat a ensuite été placé dans un cadre de stéréotaxie et maintenu sous anesthésie (Kétamine/Médétomidine) durant l'acquisition. L'acquisition a été réalisée avec une sonde de fréquence 15 MHz (128 éléments, pas de 0.08 mm, Vermon, Tours, France) et un système échographique multivoies de recherche du laboratoire (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) permettant d'utiliser Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). La bande passante du scanner en réception a été fixée à 90% en utilisant un filtre à réponse impulsionnelle finie. Le positionnement de la sonde a été fait grâce à un système de moteurs contrôlés par Matlab. Les deux méthodes d'imagerie (recombinaison cohérente classique et Multiplane Wave) ont été comparées pour **N = 2, 4 et 8 ondes planes** inclinées avec des angles séparés de 2°, ce qui correspond plus précisément aux valeurs suivantes [-1 1]°, [-3, -1, 1, 3]° et [-7, -5, -3, -1, 1, 3, 5, 7]°. La PRF a été fixée à 1600 Hz, 3200 Hz et 6400 Hz respectivement, ce qui correspond à une cadence d'imagerie Doppler finale (après l'étape de sommation cohérente) de 800 Hz. Cette cadence est suffisante pour échantillonner correctement des flux sanguins aux vitesses allant jusqu'à 4.1 cm/s, sans repliement de spectre. 200 images sont acquises en 0.25 s ce qui permet d'enregistrer un cycle

cardiaque complet. Les images Doppler finales, obtenues après filtrage et moyenne des 200 images sont présentées dans la **Figure II-7 (a) et (b)**.

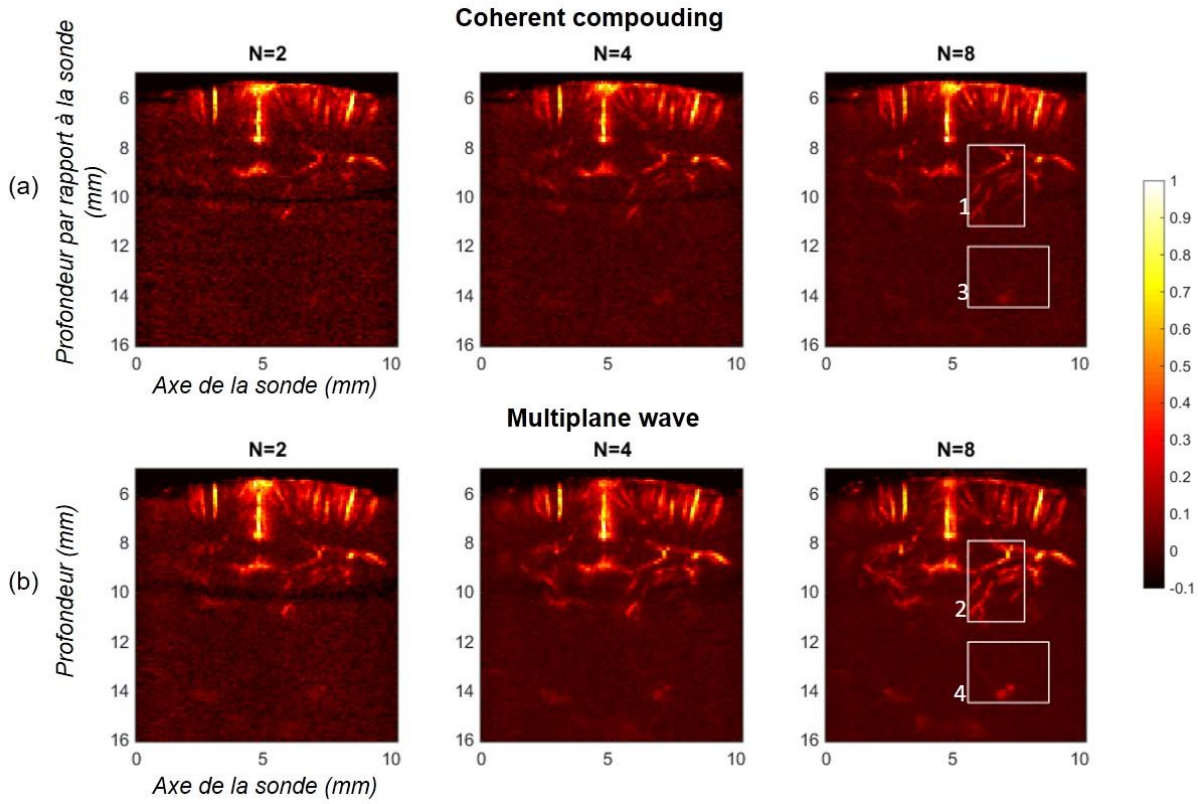


Figure II-7 : Imagerie Doppler ultrarapide in vivo d'un cerveau de rat : comparaison entre (a) une acquisition par coherent compounding (recombinaison cohérente) classique et (b) une acquisition avec le Multiplane Wave. Pour chaque type d'acquisition 3 configurations ont été testées : N=2, 4, ou 8 ondes planes inclinées respectivement avec les valeurs suivantes : $[-1 \ 1]^\circ$, $[-3 \ -1 \ 1 \ 3]^\circ$ et $[-7 \ -5 \ -3 \ -1 \ 1 \ 3 \ 5 \ 7]^\circ$. Chaque image a été normalisée entre sa valeur maximale et la valeur médiane de son bruit de fond $[0 \ 1]$ et l'échelle de couleur a ensuite été réglée entre -0.1 et 1 afin de pouvoir mieux visualiser la dynamique du bruit de fond. Les 4 rectangles blancs sont les zones agrandies dans la **Figure II-8**.

Résultats

Pour chaque configuration d'ondes planes, le Multiplane Wave présente toujours une amélioration de l'image comparé à la méthode par recombinaison cohérente : plus de vaisseaux sont visibles, et ce principalement **en profondeur**. Le *contrast-to-noise ratio* (CNR) a été calculé pour des vaisseaux dans des zones profondes de l'image (**Figure II-8**) en utilisant la formule suivante :

$$\text{CNR} = (\overline{\text{PW}}_{\text{vaisseau}} - \overline{\text{PW}}_{\text{tissu}}) / \text{std}(\text{PW}_{\text{tissu}}) \quad \text{Équation II-7}$$

avec $\overline{\text{PW}}_{\text{vaisseau/tissu}}$ la valeur moyenne du *Power Doppler* calculée dans une zone contenant un vaisseau ou du tissu et std l'écart-type. On trouve alors -1.8 dB, 5.5 dB et 8.2 dB pour les acquisitions faites par

recombinaison cohérente classique et 3.9 dB, 8.5 dB et 14.0 dB pour les acquisitions faites par Multiplane Wave, respectivement pour N=2, 4 et 8 ondes planes. La séquence Multiplane Wave permet jusqu'à 6 dB d'augmentation du contraste et donc une meilleure détection des vaisseaux dans des zones profondes (à une distance d'environ 14 mm de la sonde), en utilisant N=8 ondes planes.

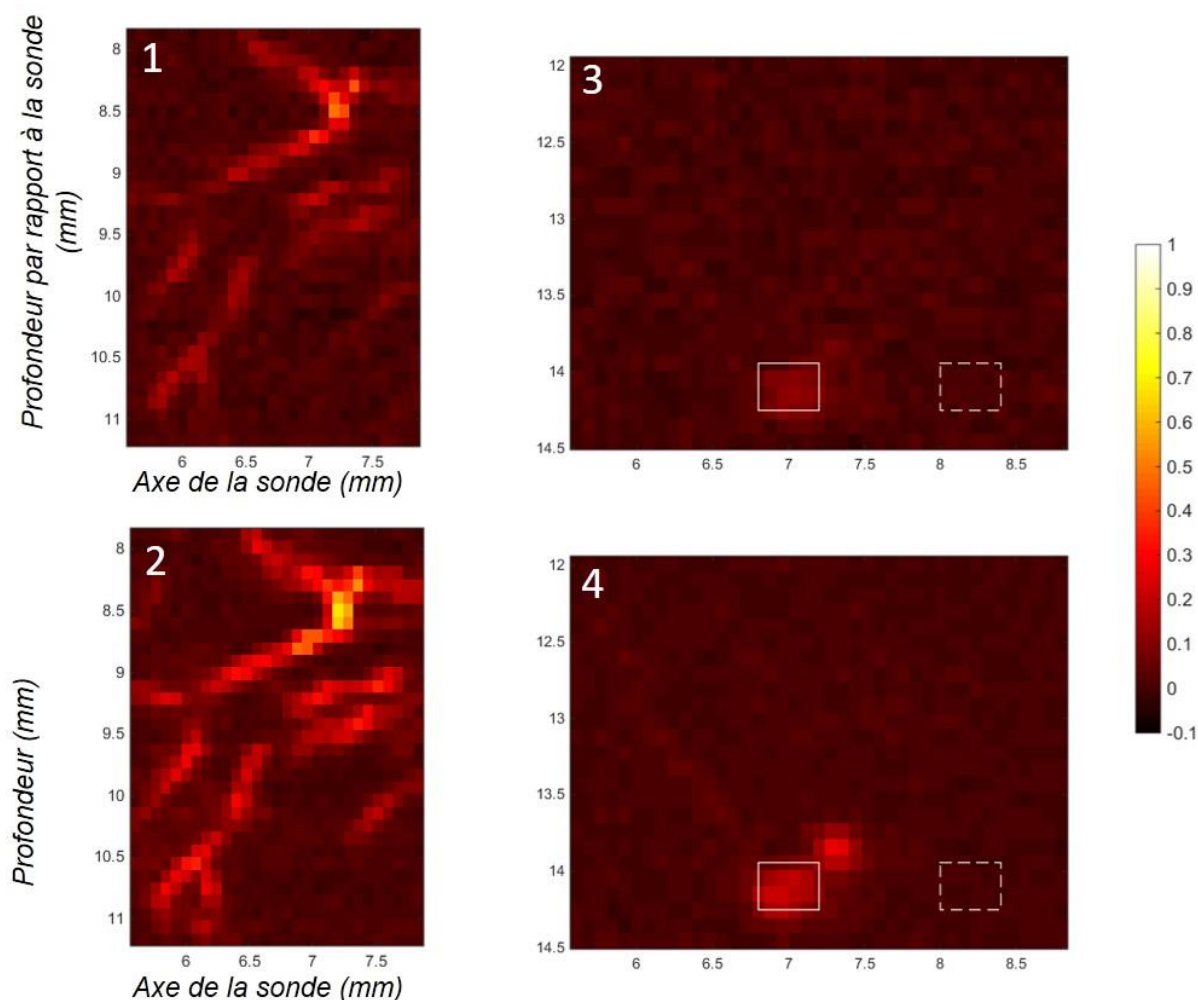


Figure II-8 : Agrandissement des 4 zones encadrées en blanc dans la **Figure II-7** (a) et (b). Comparaison entre la méthode de recombinaison cohérente (en haut) et le Multiplane Wave (en bas), pour N=8 ondes planes. Les rectangles blancs représentent les zones utilisées pour le calcul du CNR : la zone contenant un vaisseau est encadrée en lignes continues, la zone contenant du tissu est encadrée en lignes pointillées.

En conclusion, l'imagerie Multiplane Wave dans le cas des acquisitions Doppler ultrarapides pourrait être d'un grand intérêt pour l'imagerie des organes profonds, tel que le rein. Le Multiplane Wave pourrait aussi être très utile pour les acquisitions d'imagerie fonctionnelle par ultrasons afin d'accéder aux structures cérébrales profondes dans le cerveau, ou encore pour améliorer le SNR dans le cas de l'imagerie transcrânienne. Par exemple, certaines zones fonctionnelles dans le cerveau du

rat, telles que la substance noire, l'amygdale ou l'hypothalamus, sont souvent très difficiles à détecter à cause de leur profondeur dans le cerveau. Ces zones cérébrales chez le rat se trouvent à des profondeurs similaires à celle de la région d'intérêt dans laquelle nous avons trouvé un gain de 6 dB en CNR grâce au Multiplane Wave utilisant $N=8$ ondes planes, on peut donc espérer un meilleur SNR dans la détection de l'activité fonctionnelle de ces zones grâce aux Multiplane Wave.

II.5. Discussion et conclusion

Principe du Multiplane Wave

Dans ce chapitre nous avons introduit une nouvelle séquence ultrasonore pour l'imagerie ultrarapide permettant d'augmenter le rapport signal-à-bruit et le contraste comparé à la méthode de *coherent compounding* (recombinaison cohérente) classique. La séquence est basée sur l'émission de plusieurs ondes planes, dans un même tir ultrasonore, envoyées avec des inclinaisons différentes et des amplitudes codées différemment à l'aide de facteurs multiplicatifs +1 et -1. Des matrices de Hadamard ont été utilisées afin de choisir les coefficients +1 et -1 à appliquer lors de l'émission et lors de la réception. En appliquant les coefficients appropriés, on obtient des images identiques à celles qui auraient été obtenues si des ondes planes uniques avaient été envoyées avec une **amplitude N fois plus grande**, c'est-à-dire comme si des ondes planes uniques avaient été émises avec moins de bruit. L'avantage d'utiliser des matrices de Hadamard est double : tout d'abord cela assure un niveau d'amplitude maximal à chaque transmission. Deuxièmement, la recombinaison synthétique des données, pour retrouver les échos rétrodiffusés correspondant à chaque onde plane, est faite de façon très simple et très robuste, en utilisant uniquement des opérations d'addition et de soustraction. Ces opérations extrêmement simples permettent d'éviter les techniques de déconvolution de signaux codés complexes proposées habituellement, techniques qui ont toutes montré leur limite en raison des modifications du signal ultrasonore lors de sa propagation dans le milieu.

Quantification des performances sur les acquisitions B-mode

Cette séquence permet une augmentation du SNR par un facteur N . Elle a été testée pour $N=2, 4, 8, 16$, et 32 ondes planes. L'**augmentation du SNR** se traduit par un meilleur contraste dans les images, plus particulièrement dans les zones profondes des images où la perte de contraste est principalement gouvernée par le bruit électronique. Cela est particulièrement intéressant pour les applications perturbées par un fort bruit, telles que les acquisitions dans les organes profonds, les milieux fortement atténuants ou les tissus hypoéchogènes.

Application à l'élastographie

Cette augmentation de SNR est intéressante non seulement pour l'amélioration du contraste des images B-mode mais aussi pour les acquisitions d'élastographie, puisque la qualité de l'estimation de la vitesse de déplacement des tissus est directement liée au SNR des acquisitions (Deffieux et al. 2012). Pour $N=4$ ondes planes émises dans la même transmission, une division par deux de l'écart-type de la vitesse de déplacement des tissus est observée. Une conséquence directe de cette augmentation du SNR dans l'estimation de la vitesse de déplacement des tissus est une **meilleure estimation** dans les cartes de vitesse de l'onde de cisaillement. Pour $N=4$ ondes planes, une division par deux de l'écart-type dans les cartes de vitesse des ondes de cisaillement a été observée, en accord avec la théorie (Deffieux et al. 2012). Cela est particulièrement intéressant pour l'imagerie par élastographie des organes en profondeur, notamment pour évaluer le stade d'une fibrose du foie ou d'un cancer du foie, deux cas pour lesquelles la précision est critique et pour lesquelles le SNR peut être faible à cause de la profondeur des régions d'intérêt. Augmenter le SNR diminue à la fois l'écart-type sur la vitesse de l'onde cisaillement et son biais.

Application au Doppler ultrarapide et au fUS

L'acquisition d'un grand nombre d'images grâce au Doppler ultrarapide par émission d'ondes planes augmente la sensibilité globale des images Doppler (Mace et al. 2013). Augmenter le SNR en utilisant le Multiplane Wave apporte une sensibilité supplémentaire aux images Doppler et permet donc de détecter des vaisseaux jusqu'alors peu ou non visibles dans le cerveau. La combinaison de l'utilisation d'un filtrage par décomposition en valeurs singulières (SVD, *singular value decomposition*) introduit par Demene et al. (2015) et de l'acquisition par Multiplane Wave permet d'augmenter encore la sensibilité du Doppler ultrarapide. Cette amélioration pourrait permettre une meilleure détection des variations des petits flux sanguins dans le cadre de l'imagerie fonctionnelle par ultrasons (fUS) (Mace et al. 2013) dans les zones profondes du cerveau chez le rat adulte ou permettre dans un futur plus ou moins proche d'accéder à des zones profondes dans le cerveau humain.

Pour rendre le « **fUS Multiplane Wave** » possible il a été nécessaire d'optimiser les temps de calculs et notamment l'étape de *beamforming* afin de permettre de répéter l'acquisition des images Doppler suffisamment rapidement. Les acquisitions fUS nécessitent en effet de pouvoir obtenir une image vasculaire Doppler (faite classiquement à partir du filtrage et de la moyenne de 200 images acquises à 500 Hz) toutes les 1 ou 2 secondes maximum. Entre la mise au point de la séquence Multiplane Wave et la fin de ma thèse, l'étape de *beamforming* a été optimisée sur GPU (*Graphics Processing unit*) sur des scanners ultrasonores Verasonics® (Kirkland, USA). Actuellement, l'étape de *beamforming* de 200 images, sur un scanner Verasonics®, sur une profondeur de 10 mm et en utilisant une sonde de fréquence centrale 15 MHz, est réalisée avec les performances suivantes :

N = 4 tirs ultrasonores
Recombinaison cohérente (4 ondes planes envoyées au total) : 61.3 ± 2 ms
Multiplane Wave imaging (16 ondes planes envoyées au total) : 66.8 ± 1 ms
N = 8 tirs ultrasonores
Recombinaison cohérente (8 ondes planes envoyées au total) : 111.0 ± 6.9 ms
Multiplane Wave imaging (64 ondes planes envoyées au total) : 159.1 ± 2.2 ms

Les temps de calculs obtenus pour la séquence Multiplane Wave sont donc comparables à ceux de la séquence classique par recombinaison cohérente. Il est donc maintenant techniquement possible d'utiliser la séquence Multiplane Wave pour réaliser des acquisitions fUS.

Cadence d'imagerie

La séquence Multiplane Wave avec N émissions est équivalente, d'un point de vue du SNR, à moyenner N fois les données reçues, ce qu'on appelle aussi parfois « accumulation de N buffers ». Cependant, pour le même SNR, l'avantage du Multiplane Wave est de ne pas diminuer la cadence d'imagerie finale. Cela est important pour imager des organes bougeant rapidement, tel que le cœur, ou pour quantifier des flux rapides par Doppler ultrarapide, ou encore pour faire des mesures d'élastographie dans des tissus durs où les ondes de cisaillement se propagent très rapidement. Pour une cadence d'imagerie donnée et un SNR donné, la séquence Multiplane Wave nécessite moins de buffers en réceptions et par conséquent réduit la quantité de données à transférer et à traiter.

Augmentation de l'amplitude d'émission

La séquence Multiplane Wave est aussi équivalente en termes de SNR à une augmentation par un facteur \sqrt{N} de l'amplitude d'émission de chaque onde plane. Cependant, augmenter l'amplitude d'émission n'est pas toujours possible, notamment à cause des limitations des pulsers, du voltage de la sonde, mais aussi de l'indice mécanique (MI) dans certains cas. Pour cette raison, cette séquence d'imagerie est prometteuse pour beaucoup d'applications pour lesquelles une grande cadence d'imagerie est nécessaire alors que le SNR est limité. On peut citer notamment l'exemple de l'élastographie du foie, ou encore l'établissement du stade de la fibrose pour laquelle une grande cadence d'imagerie est nécessaire afin d'éviter les perturbations liées aux artefacts de respiration. Pour ces applications la séquence devra être adaptée à l'utilisation de sondes courbes pour permettre l'imagerie abdominale. Une autre application nécessitant à la fois une grande cadence d'imagerie et un grand SNR est l'élastographie cardiaque (Papadacci et al. 2014). Pour cela, la séquence Multiplane Wave devra être adaptée à l'utilisation d'ondes divergentes au lieu d'ondes planes.

Multiplane Wave et indice mécanique (MI)

Pour un SNR donné, la séquence Multiplane Wave permet d'utiliser des pressions plus faibles. Par conséquent, le Multiplane Wave pourrait être utile pour des applications pour lesquelles le MI est limité et une grande cadence d'imagerie est nécessaire. C'est le cas des techniques d'imagerie de contraste ultrarapide, qui reposent sur l'imagerie des échos produits par des micro-bulles dans le mode fondamental (Couture et al. 2009). Le Multiplane Wave pourrait aussi être utile pour l'imagerie Doppler de la cornée ou de la rétine, ou pour l'élastographie par onde de cisaillement pour laquelle les règles de la FDA (*Food and Drug Administration*) limitent l'indice mécanique à 0.23.

Multiplane Wave et ISPTA

Pour un indice mécanique (MI) équivalent, la séquence Multiplane Wave donne un plus grand ISPTA (*spatial peak temporal average Intensity*) que la séquence par recombinaison cohérente classique. Cependant, cette augmentation de l'ISPTA n'est pas un facteur limitant quand la cadence ultrarapide est requise sur des périodes limitées et non continument. C'est le cas de l'élastographie par ondes de cisaillement pour laquelle l'acquisition ultrarapide n'est utilisée que sur des durées de quelques dizaines de millisecondes pour produire une carte d'élasticité quantitative. Pour de telles applications, la FDA définit les limites pour l'ISPTA en termes de nombre de tirs ultrarapides réalisés en 1 seconde. Quand l'ISPTA est le facteur limitant, le seul avantage de la séquence Multiplane Wave est alors sa plus grande cadence d'imagerie.

Comparaison aux émissions codées de type « chirps » et codes de Golay

Comparé aux émissions codées telles que les « chirps » ou les codes de Golay (Chiao and Thomas 2000; Misaridis and Jensen 2005a; Misaridis and Jensen 2005b; Misaridis and Jensen 2005c), la séquence Multiplane Wave permet des cadences d'imagerie plus grandes avec une moins grande complexité. Ici le codage est fait à la fois dans l'espace et le temps et l'opération de décodage est fait avec des opérations extrêmement simples. Au contraire, les excitations « chirps » demandent un processus de déconvolution plus complexe et dont l'efficacité peut être altérée par l'atténuation du milieu.

Limitations principales de la technique : non-linéarité et mouvements trop importants

Contrairement aux excitations « chirps », aucun *a priori* n'est nécessaire sur le milieu insonifié lorsqu'on utilise le Multiplane Wave, même s'il faut s'assurer de la **linéarité de la propagation**. En effet, dans ce travail nous avons fait l'hypothèse que l'annulation $(+1) + (-1) = 0$ est parfaite. Cependant il faut noter qu'une propagation non linéaire générerait des signaux harmoniques, qui, s'ils n'étaient pas filtrés ne s'annuleraient pas lors de l'étape de combinaison et créeraient alors des lobes

secondaires, ce qui aurait finalement pour conséquence une réduction du contraste de l'image. Dans notre implémentation plusieurs étapes ont été prévues pour ne pas avoir de signaux harmoniques dans les données reçues : l'émission a été faite à la fréquence centrale des sondes (respectivement 6 et 15 MHz), et un filtre à réponse impulsionnelle finie (FIR) de bande passante 90% a été appliqué à la réception. Dans une telle configuration le Multiplane Wave est censé marcher, même en présence de non-linéarité.

Une autre limitation possible de la technique Multiplane Wave est le **mouvement rapide**, comme dans le cas par exemple de l'imagerie cardiaque B-mode. En effet dans le cas de mouvement rapide l'annulation $(+1) + (-1) = 0$ pourrait ne pas être parfaite à cause de pertes de cohérence dans la phase (Denarie et al. 2013). Dans ce cas il ne serait pas possible d'utiliser un grand nombre d'ondes planes sans ajouter des étapes de correction du mouvement. Pour un nombre donné d'ondes planes et pour une vitesse des tissus donnée, la part de diminution du contraste due au mouvement rapide et la part d'amélioration du contraste due à la diminution du bruit n'ont pas encore été étudiées.

Superposition des ondes planes à l'émission

La séquence Multiplane Wave repose sur l'encodage de l'amplitude des ondes planes et non pas sur l'encodage des éléments individuels comme cela est fait en imagerie synthétique (*synthetic aperture imaging*). Dans ce travail, une matrice d'Hadamard a été choisie et les différentes ondes planes ont été encodées en amplitude (+1 ou -1) avec une petite pause entre elles pour éviter leur superposition dans la matrice d'émission. La superposition des ondes planes pourrait permettre une matrice d'émission plus courte et donc une réduction de la zone aveugle au début de l'image. Cependant, les amplitudes individuelles devraient alors être réduites pour s'assurer que l'amplitude après superposition reste en dessous de l'amplitude maximale de sortie de l'échographe. De plus, comme l'imagerie par Multiplane Wave est principalement utile pour améliorer l'imagerie en profondeur, une plus grande zone aveugle en début d'image n'est pas réellement un problème. Cependant, il pourrait être intéressant de réduire la zone aveugle en utilisant des matrices d'émission plus compactes et des superpositions d'ondes appropriées dans le cas particulier de l'imagerie à haute fréquence où l'atténuation peut diminuer le SNR et pour laquelle les sondes sont généralement utilisées à des voltages bien plus faibles que le maximum permis par le scanner.

Références du chapitre

- Bercoff, J., G. Montaldo, T. Loupas, D. Savery, F. Meziere, M. Fink, and M. Tanter. 2011. "Ultrafast Compound Doppler Imaging: Providing Full Blood Flow Characterization." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 58 (1): 134–47.
- Chiao, R.Y., and L.J. Thomas. 2000. "Synthetic Transmit Aperture Imaging Using Orthogonal Golay Coded Excitation." In *2000 IEEE Ultrasonics Symposium*, 2:1677–80 vol.2.
- Chiao, R.Y., L.J. Thomas, and S.D. Silverstein. 1997. "Sparse Array Imaging with Spatially-Encoded Transmits." In *1997 IEEE Ultrasonics Symposium, 1997. Proceedings*, 2:1679–82 vol.2.
- Couture, Olivier, Souad Bannouf, Gabriel Montaldo, Jean-François Aubry, Mathias Fink, and Mickael Tanter. 2009. "Ultrafast Imaging of Ultrasound Contrast Agents." *Ultrasound in Medicine & Biology* 35 (11): 1908–16.
- Deffieux, T., J.-L. Gennisson, B. Larrat, M. Fink, and M. Tanter. 2012. "The Variance of Quantitative Estimates in Shear Wave Imaging: Theory and Experiments." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 59 (11).
- Demene, C., T. Deffieux, M. Pernot, B.F. Osmanski, V. Biran, J.-C. Gennisson, L.-A. Sieu, et al. 2015. "Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity." *IEEE Transactions on Medical Imaging* PP (99): 1–1.
- Denarie, B., T.A. Tangen, I.K. Ekroll, N. Rolim, H. Torp, T. Bjastad, and L. Lovstakken. 2013. "Coherent Plane Wave Compounding for Very High Frame Rate Ultrasonography of Rapidly Moving Targets." *IEEE Transactions on Medical Imaging* 32 (7): 1265–76.
- Horadam, K. J. 2007. *Hadamard Matrices and Their Applications*. Princeton University Press.
- Karaman, Mustafa, Pai-Chi Li, and M. O'Donnell. 1995. "Synthetic Aperture Imaging for Small Scale Systems." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 42 (3): 429–42.
- Lockwood, G.R., J.R. Talman, and S.S. Brunke. 1998. "Real-Time 3-D Ultrasound Imaging Using Sparse Synthetic Aperture Beamforming." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 45 (4): 980–88.
- Mace, E., G. Montaldo, B. Osmanski, I. Cohen, M. Fink, and M. Tanter. 2013. "Functional Ultrasound Imaging of the Brain: Theory and Basic Principles." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 60 (3): 492–506.
- Misaridis, T., and J.A. Jensen. 2005a. "Use of Modulated Excitation Signals in Medical Ultrasound. Part I: Basic Concepts and Expected Benefits." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 52 (2): 177–91.
- . 2005b. "Use of Modulated Excitation Signals in Medical Ultrasound. Part II: Design and Performance for Medical Imaging Applications." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 52 (2): 192–207.
- . 2005c. "Use of Modulated Excitation Signals in Medical Ultrasound. Part III: High Frame Rate Imaging." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 52 (2): 208–19.
- Montaldo, G., M. Tanter, J. Bercoff, N. Benech, and M. Fink. 2009. "Coherent Plane-Wave Compounding for Very High Frame Rate Ultrasonography and Transient Elastography." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 56 (3): 489–506.
- Mosca, Frédéric, Jean-Marie Nicolas, Laurent Kopp, and Mathieu Couade. 2008. "Temporal Approach of the Synthetic Aperture Imaging Using Hadamard Matrix." *The Journal of the Acoustical Society of America* 123 (5): 3083–3083. doi:10.1121/1.2932899.
- Nikolov, S.I., and J.A. Jensen. 2003. "In-Vivo Synthetic Aperture Flow Imaging in Medical Ultrasound." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 50 (7): 848–56.
- Osmanski, Bruno-Félix, Sophie Pezet, Ana Ricobaraza, Zsolt Lenkei, and Mickael Tanter. 2014. "Functional Ultrasound Imaging of Intrinsic Connectivity in the Living Rat Brain with High Spatiotemporal Resolution." *Nature Communications* 5 (October).

http://www.nature.com/ncomms/2014/141003/ncomms6023/full/ncomms6023.html?WT.ec_id=NCOMMS-20141008.

- Papadacci, C., M. Pernot, M. Couade, M. Fink, and M. Tanter. 2014. "High-Contrast Ultrafast Imaging of the Heart." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 61 (2): 288–301.
- Sylvester, J. J. 1867. "LX. Thoughts on Inverse Orthogonal Matrices, Simultaneous Signsuccessions, and Tessellated Pavements in Two or More Colours, with Applications to Newton's Rule, Ornamental Tile-Work, and the Theory of Numbers." *Philosophical Magazine Series 4* 34 (232): 461–75.
- Tanter, M., and M. Fink. 2014. "Ultrafast Imaging in Biomedical Ultrasound." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 61 (1): 102–19.
- Tanter, Mickael, Jeremy Bercoff, Alexandra Athanasiou, Thomas Deffieux, Jean-Luc Gennisson, Gabriel Montaldo, Marie Muller, Anne Tardivon, and Mathias Fink. 2008. "Quantitative Assessment of Breast Lesion Viscoelasticity: Initial Clinical Results Using Supersonic Shear Imaging." *Ultrasound in Medicine & Biology* 34 (9): 1373–86.
- Udesen, J., F. Gran, K.L. Hansen, J.A. Jensen, C. Thomsen, and M.B. Nielsen. 2008. "High Frame-Rate Blood Vector Velocity Imaging Using Plane Waves: Simulations and Preliminary Experiments." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 55 (8): 1729–43.

CHAPITRE III :

Imagerie Doppler ultrarapide transcrânienne non invasive chez la souris et le raton

III. Imagerie Doppler ultrarapide transcrânienne non invasive chez la souris et le raton

III.1. Introduction

L'échographie ultrasonore a des applications médicales extrêmement variées allant du diagnostic de pathologies digestives, à celles urinaires, gynéco-obstétricales ou encore cardiaques... D'une façon très simplifiée on peut dire que l'échographie permet d'imager l'ensemble du corps humain mis à part les os et les poumons. Dans les domaines de la neurologie et des neurosciences l'échographie se heurte donc à un problème de taille : la boîte crânienne. En effet, de précédentes études (Fry and Barger 1978; Goss, Frizzell, and Dunn 1979; Larrat et al. 2010; Pinton et al. 2012) ont permis de démontrer que des acquisitions ultrasonores faites à la fréquence de 15 MHz souffraient d'une atténuation de 6.9 dB/cm due à la présence du crâne, ce qui rend les petites variations de flux sanguins cérébraux très difficilement distinguables du bruit environnant.

En clinique, il existe actuellement deux champs d'application pour lesquels une « fenêtre d'imagerie » au niveau du crâne existe et pour lesquels l'imagerie fUS est alors possible: chez le nouveau-né (Demené et al. 2014) et en peropératoire (Imbault et al. 2016). En effet chez le nouveau-né les os de la boîte crânienne ne sont pas encore soudés et entre les os se trouvent plusieurs espaces membraneux appelés « fontanelles » permettant le passage des ultrasons dans le cerveau. En peropératoire lorsqu'une tumeur cérébrale doit être retirée une ouverture est pratiquée dans la boîte crânienne du patient, la sonde ultrasonore peut alors être directement mise au contact du cerveau.

Chez des rats anesthésiés, notre laboratoire a tout d'abord démontré la possibilité de faire des acquisitions d'imagerie fonctionnelle cérébrale par ultrasons (fUS) en réalisant des **craniotomies** (Mace et al. 2013), puis en pratiquant des fenêtres de **crâne aminci** (Bruno-Félix Osmanski et al. 2014). La procédure d'amincissement du crâne est moins invasive et moins complexe qu'une craniotomie complète. Elle permet de faire des études longitudinales pendant quelques jours mais la qualité d'image se dégrade rapidement (Urban et al. 2014) à cause de la régénération de l'os. Afin de permettre des études longitudinales sur des périodes plus longues (jusqu'à 1 à 2 mois) une prothèse de polymère transparente aux ultrasons peut être mise à la place du crâne pour protéger les tissus (Sieu et al. 2015). Enfin, plus récemment l'injection d'**agents de contraste** (Errico et al. 2016) a permis de réaliser des acquisitions fUS de manière transcrânienne chez des rats anesthésiés.

Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'avait été faite à ce jour concernant la possibilité de réaliser des acquisitions ultrasonores ultrarapides dans le cerveau des plus petits rongeurs tels que la souris et les très jeunes rats, que ce soit de manière peu ou complètement non invasive. En effet, la

petite taille de ces animaux, et donc la faible épaisseur de leur crâne, laisse pourtant suggérer que les ultrasons pourraient passer directement à travers l'os du crâne avec une atténuation négligeable. Or, les souris et les rats sont deux modèles de grand intérêt pour les neurosciences : la souris de par la large gamme de modèles génétiques existants permettant de reproduire des conditions pathologiques, et les rats pour les études liées au développement cérébral.

Dans ce chapitre de ma thèse nous allons voir qu'il est possible de réaliser des acquisitions Doppler de très bonne qualité, de manière **complètement non invasive**, directement à travers le crâne et la peau de souris anesthésiées de tout âge, sans avoir besoin de recourir à des procédures chirurgicales invasives ou des injections d'agents de contraste. Nous verrons que l'ensemble du cerveau peut être visualisé et qu'une reconstitution en 3D de la vasculature cérébrale est possible grâce à des acquisitions tomographiques. Nous avons ensuite cherché à déterminer jusqu'à quel âge de tels résultats pouvaient également être obtenus chez de jeunes rats, puisque nous savons que les acquisitions transcrâniennes sans chirurgie ou agents de contraste ne sont pas directement possibles chez les rats adultes.

III.2. Protocole expérimental

III.2.1. Préparation des animaux

Respect de la réglementation

Les animaux ont été hébergés 4 par cage, dans un environnement contrôlé ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 50% d'humidité relative, cycle d'obscurité-lumière de 12h/12h) avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Pour minimiser le stress au cours de la procédure expérimentale, ils ont bénéficié d'une période d'acclimatation de 7 jours après leur arrivée dans l'animalerie. Tous les animaux ont reçu des soins humains 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 (n°59, C2EA -59, « Paris Centre et Sud ») et a reçu le numéro de protocole APAFIS#3323-2015122411279178_v3-3.

Protocole animal

L'acquisition tomographique par Doppler ultrarapide dans un cerveau de souris a été faite sur une souris mâle C57Bl/6 âgée de 8 semaines (laboratoire Janvier, France). L'étude portant sur la qualité d'imagerie transcrânienne en fonction de l'âge des animaux (souris puis rat) a été faite sur 5 souris de type C57Bl/6 et 5 rats de type Sprague-Dawley de sexe indéterminé, respectivement de la même portée (laboratoire Janvier, France). Au cours des acquisitions échographiques, les animaux ont été placés dans un appareil de stéréotaxie et maintenus sous anesthésie. Les souris ont été anesthésiées

en utilisant 1.5% d'isoflurane. Les rats ont été anesthésiés par injection d'un mélange de kétamine (50 mg/kg/h) et de médétomidine (0.75 mg/kg/h) en voie intrapéritonéale. Les images Doppler ont été acquises à travers le **crâne** et la **peau intacts** (après avoir préalablement retiré les poils à l'aide d'une crème dépilatoire commerciale, Netline®, laboratoire BIOES), sans injection de produits de contraste ni chirurgie préalable. Dans ces conditions on peut alors parler d'acquisition transcrânienne totalement **non invasive**. Chez les rats, cette configuration complètement non invasive a été comparée à une configuration peu invasive, en retirant la peau du crâne et en plaçant la sonde directement au-dessus du crâne intact. Dans ce cas on parle d'acquisition transcrânienne **peu invasive**.

Positionnement de la sonde échographique

L'atlas de référence pour les cerveaux de rongeurs est un atlas des **structures cérébrales** (atlas appelé couramment « Paxinos », du nom de son auteur), tandis que les images obtenues avec la technique d'imagerie Doppler ultrarapide sont des **images vasculaires** du cerveau. Il n'est donc pas toujours évident de faire le lien entre l'image Doppler obtenue et l'atlas structurel ; par conséquent le positionnement correct de la sonde par rapport au repère Bregma de référence n'est pas direct. Afin de positionner correctement la sonde, pour les rats nous avons utilisé un point de repère vasculaire classique et facile à reconnaître : les artères choroïdiennes antérieures. Ces artères ont déjà été identifiées comme appartenant au plan de coordonnées Bregma -3.8 mm dans le cerveau d'un rat adulte (Scremin 2004). Pour résoudre le problème de positionnement de la sonde chez les souris, nous avons effectué des scans coronaux sur plusieurs souris auxquelles nous avons retiré la peau de crâne afin de pouvoir visualiser clairement l'os du crâne et ses points de repère (Bregma et Lambda). Un repère physique (un fil) a été positionné sur le repère Bregma. L'image contenant l'écho du fil a été identifiée comme correspondant à la coordonnée Bregma. Ainsi, chaque image du scan coronal peut ensuite être identifiée par rapport à Bregma. Les artères choroïdiennes antérieures du cerveau de la souris ont été identifiées dans le plan coronal de coordonnée ~Bregma -2.3 mm. Comme chez les rats nous avons ensuite pu repérer cette empreinte vasculaire dans d'autres acquisitions chez d'autres souris, ce qui nous a permis de positionner la sonde dans le plan coronal voulu, même lorsque la peau des souris avait été préservée intacte et que le crâne n'était pas visible. Des acquisitions de types imagerie fonctionnelle (fUS), par stimulation des vibrisses (moustaches) par exemple, nous ont également permis de vérifier que notre recalage scan Doppler/atlas structurel de référence était correct.

Lorsqu'il s'agit de jeunes rats ou jeunes souris aucun atlas de référence n'existe. Nous avons donc effectué une étude préliminaire en scannant les cerveaux de jeunes rats et de jeunes souris au cours de leur développement, et nous avons observé que les principales veines et artères existant dans le cerveau adulte sont déjà présentes chez les nouveau-nés. Nous avons donc défini des repères

vasculaires présents à la fois chez les adultes et chez ces jeunes rats/souris en développement. Alors que la taille et la forme du cerveau change au cours du développement, ces repères ne changent pas. Pour définir leurs coordonnées nous avons choisi de les définir par rapport à leurs équivalents « Bregma \pm xx mm chez l'adulte ».

III.2.2. Montage expérimental

Deux sondes de haute fréquence différentes ont été utilisées avec un système échographique multivoies de recherche (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) permettant d'utiliser Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). Les acquisitions chez les rats ont été faites à l'aide d'une sonde ultrasonore de fréquence centrale 15 MHz (128 éléments, pas de 0.08 mm, Vermon, Tours, France). Les acquisitions chez les souris ont été faites avec un nouveau prototype de sonde ultra légère de fréquence centrale 15 MHz (128 éléments, pas de 0.110 mm, Vermon, Tours, France). Cette sonde ultra légère nous a permis de réaliser ensuite des acquisitions sur des souris éveillées et en mouvement (voir chapitre IV). Elle est présentée plus en détail dans le chapitre suivant. Les animaux ont été anesthésiés avant d'être placés dans un cadre de stéréotaxie. Le positionnement de la sonde au-dessus de la tête de l'animal a été réalisé grâce à un système de plusieurs moteurs connectés les uns aux autres et permettant 3 degrés de translation (3 moteurs de translation VT-80, Physik Instrumente (PI)) et un degré de rotation (1 moteur de rotation DT-80, PI) (**Figure III-1**). Le mouvement de ces moteurs est contrôlé par Matlab. Ce système motorisé permet de positionner précisément la sonde au-dessus du plan coronal d'intérêt mais permet également de réaliser des acquisitions tomographiques. La combinaison des rotations et translations permet d'améliorer la résolution des images vasculaires et de représenter l'ensemble du cerveau en 3 dimensions (Demené et al. 2016). Nous avons utilisé cette méthode d'acquisition pour visualiser le cerveau complet d'une souris anesthésiée de manière complètement non invasive (III.3.1). Pour une orientation θ donnée de la sonde, un volume du cerveau de la souris a été acquis en translatant la sonde par pas de 100 μ m. Pour acquérir le cerveau entier de la souris, 18 orientations θ différentes ont été utilisées, incrémentées par rotation de 10°. Pour chaque orientation θ , 70 translations ont été effectuées. Dans chaque position de la sonde une image Doppler ultrarapide a été acquise.

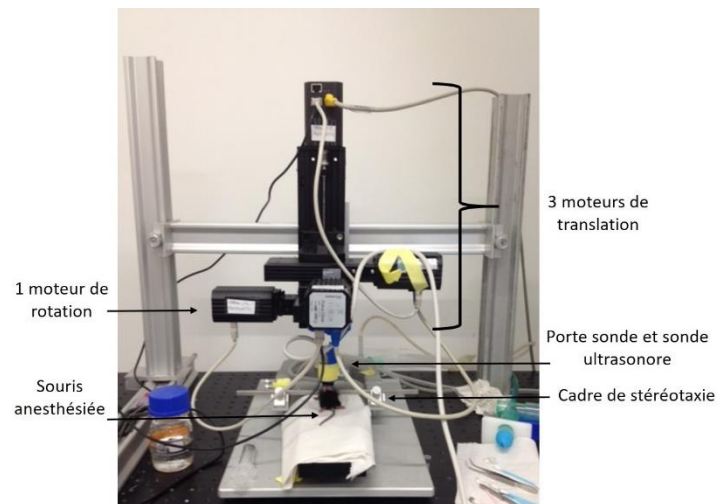


Figure III-1 : Photographie du montage expérimental utilisé pour les acquisitions sur animaux anesthésiés, permettant des acquisitions tomographiques. La sonde est montée dans un porte-sonde fixé à un moteur rotatif, lui-même monté sur 3 axes de translation. L'animal (ici une souris) anesthésié a la tête maintenue dans un cadre de stéréotaxie.

III.2.3. Séquences d'acquisition ultrasonores

Les images vasculaires ont été obtenues en utilisant la technique d'imagerie Doppler ultrarapide par *coherent compounding* (recombinaison cohérente en français) (Bercoff et al. 2011). Typiquement 11 ondes planes inclinées, séparées de 2° , ont été utilisées pour former une image recombinaisonnée (G. Montaldo et al. 2009). Un paquet de plusieurs centaines d'images recombinaisonnées ont été acquises avec une cadence d'imagerie très élevée (typiquement 200 à 400 images acquises à 500 Hz, ce qui permet d'enregistrer plusieurs cycles cardiaques). Ce paquet de plusieurs centaines d'images a ensuite été filtré à l'aide d'un filtre spatio-temporel utilisant la décomposition en valeurs singulières (SVD) (Demene et al. 2015) : cette étape de filtrage permet de **séparer le signal de flux sanguin du signal des tissus**. Pour l'acquisition tomographique transcrânienne 3D, chaque image Doppler résulte de l'acquisition de 200 images recombinaisonnées acquises à 500 Hz. Les ondes planes étaient inclinées des valeurs suivantes : $[-10, -8, -6, -4, -2, 0, 2, 4, 6, 8, 10]^\circ$. Pour les acquisitions Doppler au cours du développement des souris et des jeunes rats, chaque image Doppler résulte de l'acquisition de 400 images recombinaisonnées acquises à 500 Hz. Les ondes planes étaient inclinées de la même façon que précédemment $[-10, -8, -6, -4, -2, 0, 2, 4, 6, 8, 10]^\circ$.

III.3. Imagerie vasculaire cérébrale transcrânienne complètement non invasive chez la souris

III.3.1. Tomographie et visualisation 3D du cerveau complet de la souris de manière non invasive

Nous avons tout d'abord étudié la possibilité d'utiliser l'imagerie Doppler ultrarapide de manière **complètement non invasive** afin de visualiser et représenter en 3 dimensions l'ensemble du système vasculaire cérébral du cerveau d'une **souris adulte** de 8 semaines. Ce genre d'acquisition tomographique permettant la visualisation 3D du cerveau a été mise au point par Charlie Demené à l'Institut Langevin. De nombreuses acquisitions avaient alors été faites sur des cerveaux de rats adultes ayant subi une craniotomie afin que les ultrasons puissent passer la barrière du crâne (Demené et al. 2016). Nous avons cherché à reproduire cette expérience de manière complètement non invasive chez la souris adulte. Des scans tomographiques Doppler ultrarapides de la tête de la souris anesthésiée ont été réalisés à travers le **crâne** et la **peau** laissés **intacts** (seuls les poils ont été préalablement épilés à l'aide d'une crème dépilatoire), en utilisant le montage expérimental motorisé présenté précédemment. La **Figure III-2 (a)** donne une représentation schématique des repères du crâne de la souris (Bregma et Lambda) et de l'étendue du balayage dans la direction coronale : d'environ Bregma -5mm à Bregma +1mm. La **Figure III-2 (b)** présente quelques-unes des images Doppler obtenues de manière entièrement non invasive à travers le crâne et la peau de la souris suivant un scan coronal. Les images sont de bonne qualité et permettent de mettre en évidence quelques **repères vasculaires classiques** tels que les artères striées antérieures (astr), l'artère choroïdienne antérieure (ach), l'artère cérébrale moyenne (mcer), l'artère choroïdienne postérieure médiale (pmch) et le réseau artériel supra colliculaire (scol) (Scremin 2004) (Demené et al. 2016). La base du cercle de Willis peut également être vue dans les deux premières images de la **Figure III-2 (b)**. La **Figure III-2 (c)** illustre la reconstruction 3D complète du cerveau de souris.

En conclusion, nous avons montré qu'il était possible d'imager la vascularisation du cerveau entier (i.e sur toute sa profondeur et toute sa largeur) d'une souris adulte en utilisant l'imagerie Doppler ultrarapide de manière complètement non invasive. Ce résultat ouvre la possibilité d'études longitudinales, vasculaires ou fonctionnelles, dans le cerveau de la souris.

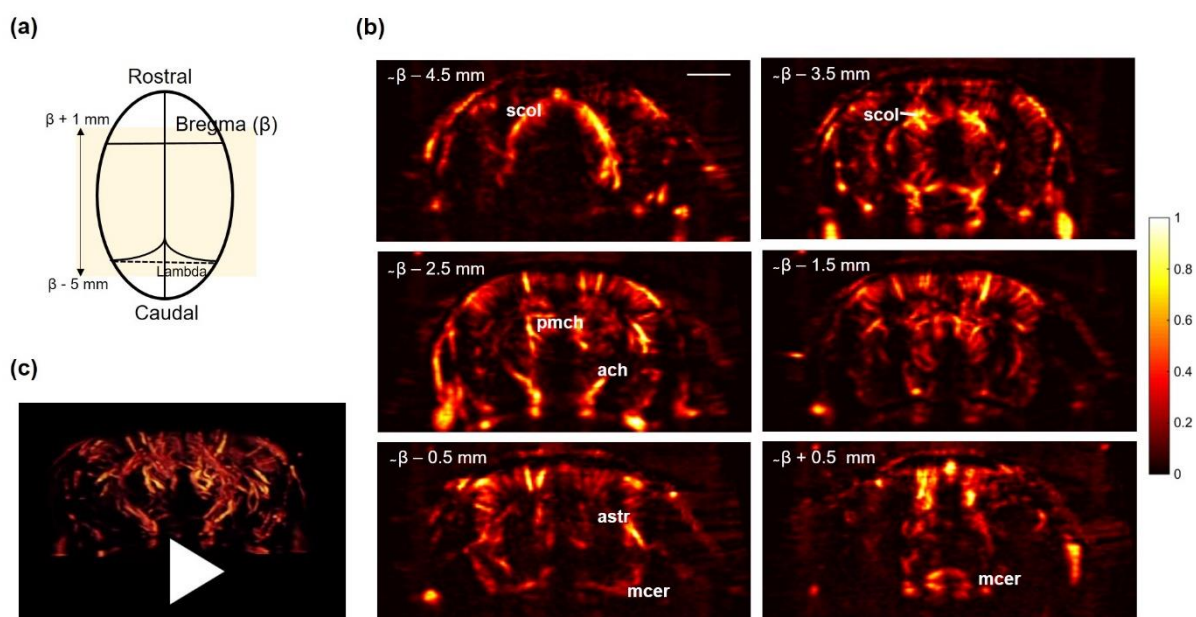


Figure III-2 : La totalité du cerveau d'une souris âgée de 8 semaines peut être imagée de manière complètement non invasive à travers son crâne et sa peau intacts. (a) Représentation schématique du crâne de la souris et de la position des points de repères usuels Bregma et Lambda. Le rectangle coloré représente l'étendue du scan effectué dans la direction caudo-rostrale. (b) 6 images coronales du cerveau de la souris scannée dans la direction caudo-rostrale, obtenues par acquisitions Doppler ultrarapide. Echelle : la barre blanche représente 2 mm. Signification des abréviations : astr : artères striées antérieures / ach : artère choroïdienne antérieure / mcer : artère cérébrale moyenne / pmch : artère choroïdienne postérieure médiale / scol : réseau artériel supra colliculaire. (c) Image sélectionnée dans une vidéo représentant la reconstruction 3D du cerveau de la souris obtenue par tomographie Doppler ultrarapide.

III.3.2. Imagerie vasculaire cérébrale transcrânienne de la souris au cours de son développement

Nous avons ensuite étudié la possibilité de réaliser des **études longitudinales** de la vascularisation du cerveau de la souris de son plus jeune âge à un âge adulte avancé. Les cerveaux de souris anesthésiées, âgées d'une semaine à plus d'un an, ont été imagés de manière complètement non invasive à travers leur crâne et leur peau intacts (**Figure III-3**). Le même plan coronal a été acquis (environ Bregma -2.3 mm) afin de comparer la qualité des images au cours du développement de la souris. On observe des images de bonne qualité, permettant de visualiser les vaisseaux depuis le cortex jusqu'à la base du cerveau, quel que soit l'âge testé.

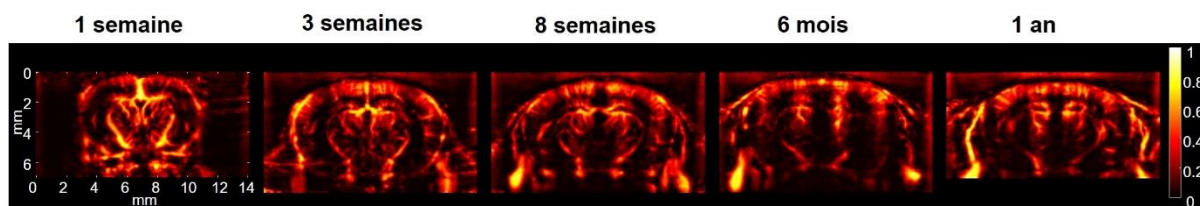


Figure III-3 : Images représentant le volume sanguin cérébral (CBV, Cerebral Blood Volume) de souris âgées de quelques jours seulement à plus d'un an. Le même plan coronal (correspondant environ à Bregma -2.3 mm dans l'atlas d'une souris adulte) a été imagé à différents âges. Toutes ces acquisitions ont été faites de manière complètement non invasive, à travers le crâne et la peau intacts.

Ces résultats montrent que la relative transparence du crâne de la souris aux ultrasons permet de réaliser de l'imagerie Doppler ultrarapide de manière complètement non invasive pour un large éventail d'âges dans cette espèce.

III.4. Imagerie vasculaire cérébrale transcrânienne du raton au cours du développement

En comparaison à celui des souris, le crâne des rats adultes est beaucoup plus épais et provoque l'atténuation des ultrasons. Il est donc nécessaire pour faire de l'imagerie Doppler chez le rat adulte de réaliser une craniotomie, une fenêtre de crâne aminci (Sieu et al. 2015) (Bruno-Félix Osmanski et al. 2014), ou d'injecter de manière intraveineuse des produits de contraste (Errico et al. 2016). Cependant, chez le jeune rat, juste après sa naissance, le crâne est encore relativement mince et donc semblable à celui des souris adultes. L'idée nous est alors venue d'étudier la faisabilité d'imager de manière **transcrânienne et totalement non invasive** la vascularisation des cerveaux de jeunes rats au cours de leur développement. Des images Doppler ultrarapides ont été acquises chez 5 jeunes rats de la même portée, dans le même plan coronal (environ Bregma -3.8 mm) à différents âges, afin de comparer la qualité des images transcrâniennes au cours du développement. Deux conditions ont été testées pour chaque jeune rat : une première acquisition a été faite à travers le crâne intact et la peau intacte (**Figure III-4 première ligne**), une deuxième acquisition a ensuite été réalisée après le retrait de la peau du crâne (**Figure III-4 deuxième ligne**). Nous avons alors constaté que l'imagerie Doppler est possible de manière totalement non invasive (à travers crâne et peau intacts) chez des jeunes rats jusqu'à l'âge d'environ 35 jours (**Figure III-4 première ligne**). Jusqu'à cet âge la qualité d'imagerie est acceptable pour visualiser les vaisseaux à la fois dans le cortex et jusqu'à la base du cerveau (8 mm de profondeur). Cependant, on observe ensuite que la qualité des images à travers la peau et le crâne intacts diminue progressivement avec l'âge des jeunes rats en raison de l'épaississement du crâne au

cours du développement : en effet, l'image Doppler acquise de manière totalement non invasive dans le cerveau du rat âgé de 45 jours ne permet de visualiser quasiment aucun vaisseau sanguin, même dans le cortex. Le retrait de la peau améliore légèrement la qualité de l'image, en particulier pour le rat âgé de 45 jours : plusieurs grands vaisseaux dans le cortex, mais aussi plus profonds dans le cerveau, invisibles à travers le crâne et la peau, deviennent visibles après le retrait de la peau (**Figure III-4 deuxième ligne**).

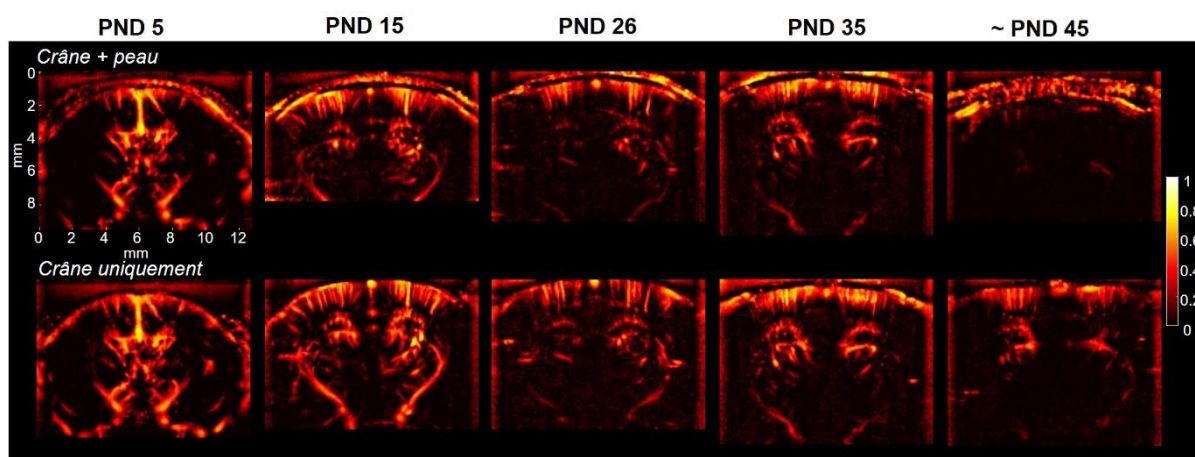


Figure III-4 : CBV (cerebral blood volume) imagé dans le cerveau de jeunes rats âgés de 5 à 45 jours. Le même plan coronal (correspondant environ à Bregma -3.8 mm dans un atlas de rat adulte) a été acquis à différents âges sur 5 jeunes rats différents. Pour chaque âge, l'image sur la première ligne correspond à la première acquisition faite de manière complètement non invasive à travers la peau et le crâne intacts. L'image sur la deuxième ligne correspond à l'acquisition faite après retrait de la peau du crâne. Des images transcrâniennes de bonne qualité peuvent être obtenues chez le jeune rat jusqu'à environ l'âge de 1 mois, sans agent de contraste ni chirurgie invasive.

Ces résultats montrent la possibilité de réaliser des **études longitudinales**, vasculaires ou fonctionnelles, dans le cerveau de jeunes rats en développement jusqu'à l'âge d'environ 1 mois.

III.5. Discussion et conclusion

Dans ce chapitre nous avons montré pour la première fois qu'il était possible de réaliser de l'imagerie Doppler ultrarapide de la vascularisation cérébrale de la souris et du jeune rat, de manière transcrânienne et complètement non invasive.

Tomographie et visualisation du cerveau de la souris en 3D de manière complètement non invasive

Dans un premier temps nous avons montré que chez la souris adulte, le système vasculaire du cerveau entier peut être imagé à travers le crâne et la peau intacts, de manière complètement non invasive et visualisé en 3 dimensions. Nous avons identifié dans ces images quelques points de repères

vasculaires. Dans la continuité de ce travail et sur la base de cette approche tomographique complètement non invasive il pourrait être intéressant de réaliser un atlas vasculaire complet et en 3 dimensions du cerveau de la souris.

Imagerie vasculaire au cours du développement chez le raton et la souris

Nous montrons également dans ce chapitre que les vaisseaux du cerveau de la souris peuvent être imagés de manière complètement non invasive jusqu'à l'âge d'un an minimum (dernier âge étudié), tandis que chez le jeune rat cela reste possible uniquement jusqu'à l'âge de 35 jours, après quoi la qualité des images diminue progressivement. Après cet âge, il faut alors choisir entre une opération d'amincissement du crâne (Bruno-Félix Osmanski et al. 2014), une craniotomie (Sieu et al. 2015), ou augmenter le rapport signal-à-bruit des images en injectant des agents de contraste ultrasonores (Errico et al. 2016) ou en utilisant une séquence ultrasonore adaptée telle que la séquence Multiplane Wave présentée dans le chapitre précédent (Tiran et al. 2015). Bien que le crâne soit le principal obstacle au passage des ultrasons pour atteindre le cerveau, nous pouvons cependant remarquer que l'influence de la couche de peau n'est pas négligeable chez les jeunes rats que nous avons imagés, notamment lorsqu'ils sont âgés de plus de 30 jours. Cette atténuation du signal observée lorsque la peau n'est pas retirée pourrait s'expliquer par l'épaisseur de la peau elle-même qui augmente d'un facteur 3 entre un raton de 5 jours et un autre de 45 jours (0.5 mm contre 1.6 mm). La présence d'un tissu conjonctif sous la peau est aussi un facteur d'atténuation possible. En effet, nous savons de par nos expériences chez le rat que lorsque le tissu conjonctif n'est pas correctement nettoyé après l'amincissement du crâne le signal est perturbé d'une manière non homogène.

Qualité des images transcrâniennes chez la souris et le raton

Dans les plans coronaux représentés dans la **Figure III-2 (b)**, un artéfact connu, appelé « *stripe artifact* » (artéfact de bandes) peut être observé (Vignon et al. 2010). Cet artéfact est dû à des aberrations provoquées par l'os du crâne. Cet effet pourrait être corrigé dans des travaux futurs en utilisant des approches de focalisations adaptatives, telles que la focalisation par retournement temporel en utilisant le bruit de *speckle* ou en utilisant le flux sanguin, deux méthodes développées au laboratoire par Montaldo et al. (Gabriel Montaldo, Tanter, and Fink 2011) et Osmanski et al. (Bruno-Felix Osmanski et al. 2012).

D'une manière générale, outre ces artéfacts de bandes visibles dans la **Figure III-2 (b)**, la qualité des images présentées dans ce chapitre peut paraître légèrement inférieure par rapport à nos études antérieures. Il faut rappeler que dans les études précédentes les images avaient été réalisées dans des configurations plus avantageuses pour le signal Doppler puisqu'une craniotomie ou une fenêtre de crâne amincie avaient été réalisées sur des rats adultes (Macé et al. 2011; Bruno-Félix Osmanski et al.

2014; Sieu et al. 2015; Demené et al. 2016). Ici les modèles animaux utilisés (et donc leurs cerveaux) sont plus petits, et la propagation ultrasonore se fait directement à travers l'os du crâne, tandis que la fréquence ultrasonore des sondes utilisées dans ces expériences est la même que celle utilisée habituellement chez les rats adultes. Nous pourrions à l'avenir développer une sonde dédiée à l'imagerie chez la souris et le jeune rat pour laquelle la fréquence serait modifiée en conséquence. Cependant le choix de la fréquence résulterait forcément d'un compromis à faire entre la résolution à atteindre et l'atténuation du signal : en effet, une fréquence plus élevée permettrait une meilleure résolution (et donc une meilleure visualisation de certains vaisseaux très petits dans le cerveau de la souris et du très jeune rat), mais aurait aussi pour conséquence une plus grande atténuation du signal due à la présence du crâne.

En conclusion de ce chapitre, nos résultats ouvrent la voie à des **études longitudinales**, complètement **non invasives** chez les **souris** et les **jeunes rats anesthésiés**, deux modèles animaux d'un grand intérêt préclinique car bien adaptés pour les études du développement cérébral ou des études impliquant des modèles génétiques. Dans ce chapitre, seule de l'imagerie vasculaire a été présentée, mais de l'imagerie fonctionnelle par ultrasons (fUS) est également possible de manière complètement non invasive chez ces deux modèles. Chez le jeune rat, des travaux supplémentaires seront nécessaires afin d'optimiser le protocole anesthésique de manière à pouvoir observer les variations hémodynamiques suites à des stimulations dans ce modèle. Chez la souris de tels résultats d'imagerie fonctionnelle sont présentés dans les chapitres suivants, à la fois chez des animaux anesthésiés et éveillés.

Références du chapitre

- Bercoff, J., G. Montaldo, T. Loupas, D. Savery, F. Meziere, M. Fink, and M. Tanter. 2011. "Ultrafast Compound Doppler Imaging: Providing Full Blood Flow Characterization." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 58 (1): 134–47.
- Demene, C., T. Deffieux, M. Pernot, B.F. Osmanski, V. Biran, J.-C. Gennisson, L.-A. Sieu, et al. 2015. "Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity." *IEEE Transactions on Medical Imaging* PP (99): 1–1.
- Demené, Charlie, Mathieu Pernot, Valérie Biran, Marianne Alison, Mathias Fink, Olivier Baud, and Mickaël Tanter. 2014. "Ultrafast Doppler Reveals the Mapping of Cerebral Vascular Resistivity in Neonates." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 34 (6): 1009–17. doi:10.1038/jcbfm.2014.49.
- Demené, Charlie, Elodie Tiran, Lim-Anna Sieu, Antoine Bergel, Jean Luc Gennisson, Mathieu Pernot, Thomas Deffieux, Ivan Cohen, and Mickael Tanter. 2016. "4D Microvascular Imaging Based on Ultrafast Doppler Tomography." *NeuroImage* 127 (February): 472–83. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.11.014.
- Errico, Claudia, Bruno-Félix Osmanski, Sophie Pezet, Olivier Couture, Zsolt Lenkei, and Mickael Tanter. 2016. "Transcranial Functional Ultrasound Imaging of the Brain Using Microbubble-Enhanced Ultrasensitive Doppler." *Neuroimage* 124 (Pt A): 752–61. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.09.037.
- Fry, F. J., and J. E. Barger. 1978. "Acoustical Properties of the Human Skull." *The Journal of the Acoustical Society of America* 63 (5): 1576–90.
- Goss, S.A., L.A. Frizzell, and F. Dunn. 1979. "Ultrasonic Absorption and Attenuation in Mammalian Tissues." *Ultrasound in Medicine & Biology* 5 (2): 181–86. doi:10.1016/0301-5629(79)90086-3.
- Imbault, M., H. Serroune, JI. Gennisson, M. Tanter, D. Chauvet, L. Capelle, and S. Lehericy. 2016. "Functional Ultrasound Imaging of the Human Brain Activity: An Intraoperative Pilot Study for Cortical Functional Mapping." In , 1–4. IEEE. doi:10.1109/ULTSYM.2016.7728505.
- Larrat, B, M Pernot, J-F Aubry, E Dervishi, R Sinkus, D Seilhean, Y Marie, A-L Boch, M Fink, and M Tanter. 2010. "MR-Guided Transcranial Brain HIFU in Small Animal Models." *Physics in Medicine and Biology* 55 (2): 365–88. doi:10.1088/0031-9155/55/2/003.
- Mace, E., G. Montaldo, B. Osmanski, I. Cohen, M. Fink, and M. Tanter. 2013. "Functional Ultrasound Imaging of the Brain: Theory and Basic Principles." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 60 (3): 492–506.
- Macé, Emilie, Gabriel Montaldo, Ivan Cohen, Michel Baulac, Mathias Fink, and Mickael Tanter. 2011. "Functional Ultrasound Imaging of the Brain." *Nature Methods* 8 (8): 662–64.
- Montaldo, Gabriel, Mickael Tanter, and Mathias Fink. 2011. "Time Reversal of Speckle Noise." *Physical Review Letters* 106 (5). doi:10.1103/PhysRevLett.106.054301.
- Montaldo, G., M. Tanter, J. Bercoff, N. Benech, and M. Fink. 2009. "Coherent Plane-Wave Compounding for Very High Frame Rate Ultrasonography and Transient Elastography." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 56 (3): 489–506.
- Osmanski, Bruno-Felix, Gabriel Montaldo, Mickaël Tanter, and Mathias Fink. 2012. "Aberration Correction by Time Reversal of Moving Speckle Noise." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 59 (7): 1575–83. doi:10.1109/TUFFC.2012.2357.
- Osmanski, Bruno-Félix, Sophie Pezet, Ana Ricobaraza, Zsolt Lenkei, and Mickael Tanter. 2014. "Functional Ultrasound Imaging of Intrinsic Connectivity in the Living Rat Brain with High Spatiotemporal Resolution." *Nature Communications* 5 (October). http://www.nature.com/ncomms/2014/141003/ncomms6023/full/ncomms6023.html?WT.e_c_id=NCOMMS-20141008.

- Pinton, Gianmarco, Jean-Francois Aubry, Mathias Fink, and Mickael Tanter. 2012. "Numerical Prediction of Frequency Dependent 3D Maps of Mechanical Index Thresholds in Ultrasonic Brain Therapy." *Medical Physics* 39 (1): 455. doi:10.1118/1.3670376.
- Scremin, Oscar U. 2004. *Chapter 37. Cerebral Vascular System*.
https://www.researchgate.net/publication/279971998_Chapter_37_Cerebral_Vascular_System.
- Sieu, Lim-Anna, Antoine Bergel, Elodie Tiran, Thomas Deffieux, Mathieu Pernot, Jean-Luc Gennisson, Mickaël Tanter, and Ivan Cohen. 2015. "EEG and Functional Ultrasound Imaging in Mobile Rats." *Nature Methods* 12 (9): 831–34. doi:10.1038/nmeth.3506.
- Tiran, Elodie, Thomas Deffieux, Mafalda Correia, David Maresca, Bruno-Felix Osmanski, Lim-Anna Sieu, Antoine Bergel, Ivan Cohen, Mathieu Pernot, and Mickael Tanter. 2015. "Multiplane Wave Imaging Increases Signal-to-Noise Ratio in Ultrafast Ultrasound Imaging." *Physics in Medicine and Biology* 60 (21): 8549. doi:10.1088/0031-9155/60/21/8549.
- Urban, Alan, Emilie Mace, Clément Brunner, Marc Heidmann, Jean Rossier, and Gabriel Montaldo. 2014. "Chronic Assessment of Cerebral Hemodynamics during Rat Forepaw Electrical Stimulation Using Functional Ultrasound Imaging." *NeuroImage* 101 (November): 138–49. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.06.063.
- Vignon, Francois, William T. Shi, Xiangtao Yin, Thilo Hoelscher, and Jeffry E. Powers. 2010. "The Stripe Artifact in Transcranial Ultrasound Imaging." *Journal of Ultrasound in Medicine* 29 (12): 1779–86.

CHAPITRE IV :

Imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide (fUS) chez le petit animal éveillé et en mouvement

IV. Imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide (fUS) chez le petit animal éveillé et en mouvement

IV.1. Introduction : intérêt de développer de nouvelles techniques permettant d'imager le cerveau d'un animal éveillé et en mouvement

IV.1.1. Limites des techniques d'imagerie actuelles

Une des limitations de l'IRMf (imagerie par résonance magnétique fonctionnelle) dans le cadre de l'imagerie cérébrale chez le petit animal est qu'il est souvent nécessaire d'utiliser une **anesthésie générale**, afin d'éviter les mouvements des animaux pour pouvoir acquérir des images de bonne qualité. L'utilisation d'anesthésiques exclut la possibilité de réaliser des expériences comportementales et cognitives et soulève de nombreuses questions telles que la modification du métabolisme neuronal et du débit sanguin cérébral au cours de l'anesthésie (Lahti et al. 1999; Gao et al. 2016). Plusieurs protocoles ont donc été proposés afin d'adapter les expériences en IRMf à l'imagerie de rongeurs éveillés. Une première solution utilisée chez le rat afin d'éviter ses mouvements au cours des acquisitions d'imagerie cérébrale est la contention combinée avec des procédures d'habituation spécifiques pour minimiser le stress (King et al. 2005; Lahti et al. 1998). Cette technique est rarement appliquée aux acquisitions en IRMf chez la souris éveillée car plus difficile à mettre en place (Desai et al. 2011). Une autre approche permettant de garder l'animal conscient tout en évitant ses mouvements est d'utiliser des relaxants musculaires afin de paralyser son corps durant l'expérience (Peeters et al. 2001). Par conséquent, bien que l'IRMf soit une méthode d'imagerie non

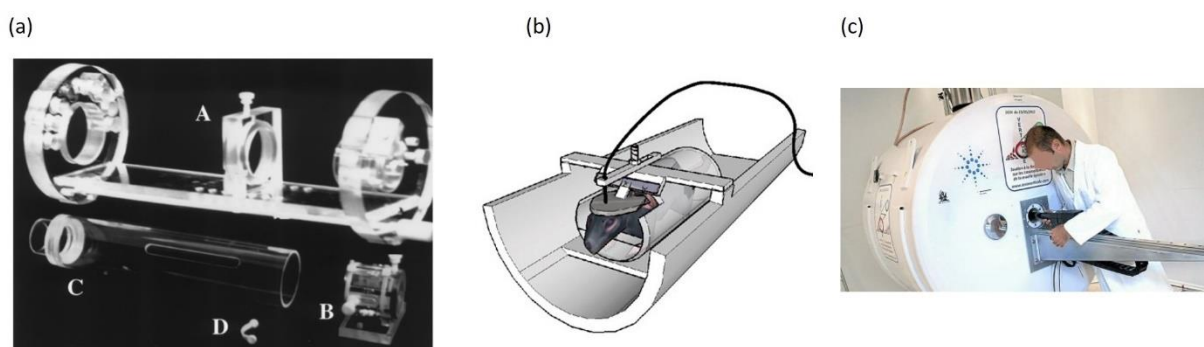


Figure IV-1 : (a) Photographie représentant un montage expérimental de contention pour réaliser des acquisitions sur rats éveillés dans un appareil IRM (image extraite de l'article de Lahti et al. (1998)). Le montage est composé d'une structure en plexiglas (A) dans laquelle viennent s'insérer les supports de tête (B) et de corps (C), ainsi que de petites barres en plastique flexibles permettant de tenir la tête de l'animal de manière fixe dans le support de tête (D). (b) Schéma d'un montage expérimental de contention permettant de mesurer l'activation neuronale chez la souris éveillée par une technique d'opto-fMRI (image extraite de l'article de Desai et al. (2011)). (c) Photographie d'un appareil IRM dédié aux expérimentations sur rongeurs.

invasive puissante, possédant à la fois une bonne résolution spatiale et temporelle, la nécessité d'immobiliser les animaux durant les acquisitions limite fortement la possibilité d'expériences sur animaux éveillés (**Figure IV-1**).

D'autres techniques d'imagerie (électrophysiologie, optique, imagerie photo-acoustique...) permettent l'enregistrement de l'activité neuronale électrique (Fan et al. 2011) ou d'une réponse hémodynamique (Packer et al. 2015; Yu et al. 2015; Sigal et al. 2016) chez des animaux mobiles (**Figure IV-2**), mais dans ce cas le **champ de vue** est souvent limité à quelques mm en surface du cortex (Tang, Dai, and Jiang 2016) et des procédures chirurgicales invasives sont souvent nécessaires.

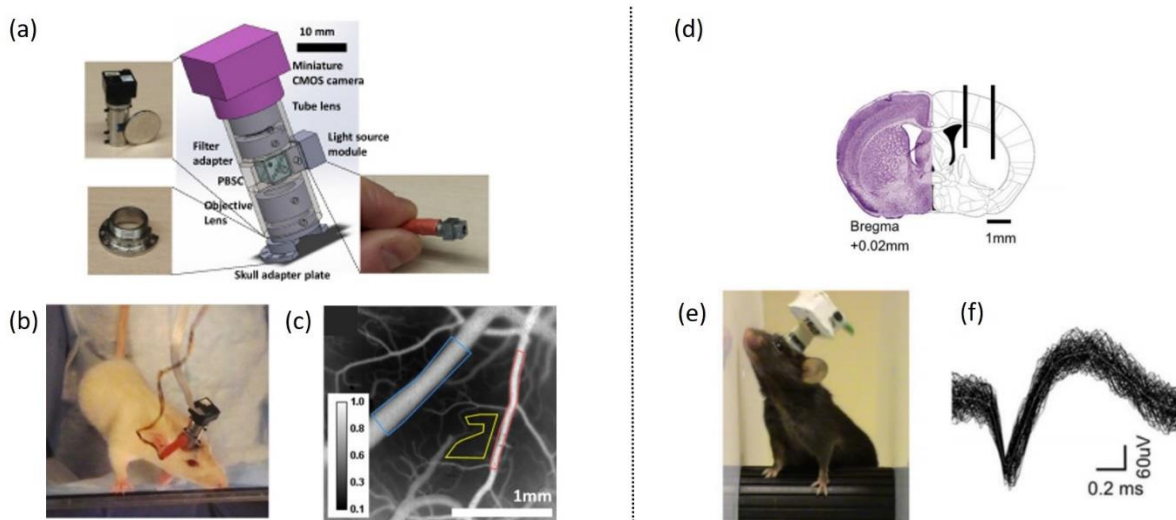


Figure IV-2 : (a ; b ; c) Images extraites de l'article de Sigal et al. (2016) : montage expérimental d'imagerie optique (a) permettant d'imager les flux sanguins chez un rat éveillé et en mouvement (b) sur un champ de vue de 2x2 mm avec une résolution latérale de 4.4 μm (c) et un échantillonnage temporel de 1 à 8 Hz. (d ; e ; f) Images extraites de l'article de Fan et al. (2011) présentant un montage expérimental d'électrophysiologie permettant d'enregistrer l'activité neuronale en plusieurs endroits du cerveau à l'aide d'électrodes implantées (d) dans le cerveau de rats ou de souris éveillés et complètement libres de leurs mouvements grâce à un système de télémétrie sans fil (e). Ce type de montage permet d'enregistrer les potentiels d'action des neurones (f) avec une grande résolution temporelle (30 kHz), mais ne permet pas d'obtenir d'image.

Ces limitations démontrent l'intérêt de développer de nouvelles techniques d'imagerie cérébrale permettant d'imager le cerveau du petit animal éveillé et en mouvement. Afin de dépasser les limitations actuelles précédemment citées, ces nouvelles techniques doivent fournir à la fois une bonne résolution spatiale, temporelle, un champ de vue le plus grand possible, tout en étant les moins invasives possibles.

IV.1.2. L'imagerie fUS chez le rat éveillé et en mouvement

Au tout début de ma thèse j'ai participé, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Ivan Cohen de l'Institut de Biologie Paris Seine à l'UPMC, à démontrer que l'imagerie fonctionnelle par ultrasons (fUS) (Macé et al. 2011) était possible chez des **rats éveillés et libres de leurs mouvements** en utilisant une petite sonde ultrasonore fixée sur leur tête (Sieu et al. 2015, voir également la thèse de Lim-Anna Sieu soutenue en 2016). La possibilité d'imager le cerveau de rats en mouvement confère un énorme avantage au fUS par rapport à l'IRMf, en plus des avantages existants tels que la résolution spatiale et temporelle élevée, le faible coût de la technique, la portabilité de l'appareil ou encore sa facilité d'entretien comparé à l'IRMf. Cependant contrairement à l'IRMf, nous avons vu dans le chapitre précédent que le crâne du rat adulte reste un obstacle pour l'imagerie fUS. Par conséquent pour réaliser ces expériences d'imagerie fonctionnelle chez les rats éveillés et en mouvement une opération chirurgicale fut nécessaire : après **craniotomie** une prothèse de polymère transparente aux ultrasons a été mise à la place du crâne pour protéger les tissus. La craniotomie permet un large champ de vue dans le cerveau et la prothèse de polymère permet des études longitudinales avec des conditions d'imagerie stables pendant 1 à 2 mois (**Figure IV-3**).

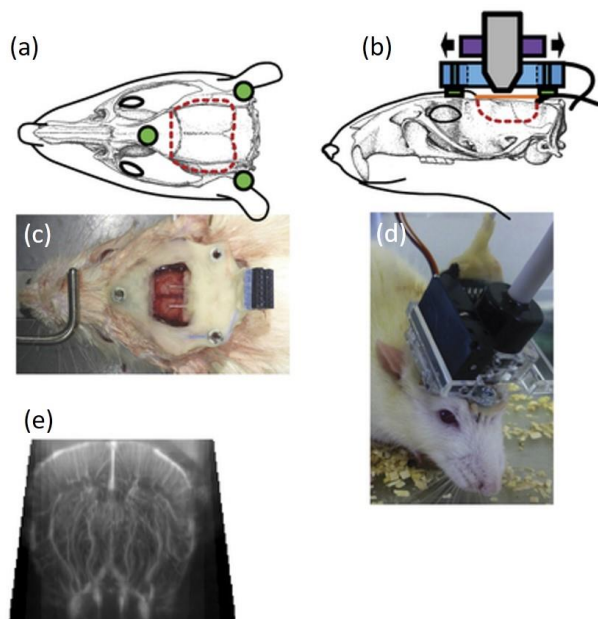


Figure IV-3 : (a) Représentation schématique des limites de la craniotomie (rouge) et de la position des écrous de fixation (vert). (b) représentation schématique de la prothèse en polymère remplaçant le crâne (orange), du porte-sonde (bleu), du moteur (violet) et de la sonde (gris). (c) Résultat de la chirurgie. (d) Rat équipé de l'ensemble du montage expérimental. (e) Image Doppler d'un plan coronal obtenu dans le cerveau d'un rat à travers la prothèse en polymère.

IV.1.3. Passage du modèle « rat » au modèle « souris » : enjeux et difficultés

Dans le cadre de ma thèse nous avons cherché à étendre ces résultats démontrés chez le rat (Sieu et al. 2015) au **modèle souris**. En effet, l'existence d'une large gamme de modèles génétiques disponibles chez la souris fait de cet animal le modèle le plus important pour les études précliniques en neurosciences. Cependant, à ce jour, les modalités de neuroimagerie permettant d'étudier l'ensemble du cerveau, telle que l'IRMf, sont limitées chez cette espèce. Cela se remarque lorsque l'on compare le nombre d'articles rapportant des études faites par IRMf chez la souris et chez le rat. Une simple analyse de la bibliographie sur Pubmed en utilisant les mots-clés « fMRI AND mice » ou « fMRI AND rats » retourne 31 articles pour le modèle souris contre 158 pour le modèle rat, soit 5 fois plus d'articles concernant les rats que les souris. Cette disparité peut être principalement expliquée par le fait qu'il est plus difficile d'obtenir des images de haute qualité en IRMf chez les souris, notamment à cause de leur taille réduite, de distorsions dans les images et de pertes de signal par rapport aux rats (Nasrallah, Tay, and Chuang 2014), même si de récents progrès sont en cours grâce au développement de bobines refroidies cryogéniquement (*cryo-coils*) (Ratering et al. 2008). La **Figure IV-4** présente deux cartes d'activation fonctionnelle obtenues en IRMf suite à la stimulation de la patte avant gauche chez des rats (**Figure IV-4 (a)**, Pawela et al. 2009) ou chez des souris (**Figure IV-4 (b)**, Nasrallah, Tay, and Chuang 2014) anesthésiés : on remarque une nette perte de qualité d'imagerie chez le modèle souris. Devant les limitations de l'IRMf pour imager ce modèle animal extrêmement important en recherche préclinique nous avons trouvé intéressant de démontrer que le fUS pouvait être une méthode d'imagerie cérébrale tout à fait applicable au modèle souris.

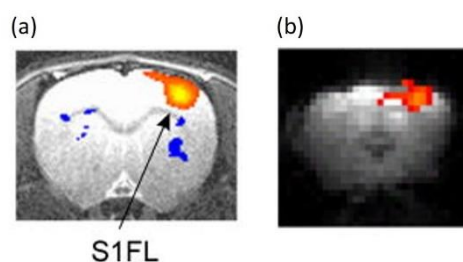


Figure IV-4 : Cartes d'activation fonctionnelle obtenues par IRMf chez le rat (a) et la souris (b) anesthésiés, suite à une stimulation de la patte avant gauche. Dans les deux cas le cortex primaire sensoriel lié à la patte avant gauche (S1FL) s'active dans l'hémisphère droit, mais on peut remarquer une nette différence en termes de qualité d'imagerie entre l'acquisition chez le rat et chez la souris. L'image (a) est extraite de Pawela et al. (2009), l'image (b) de Nasrallah et al. (2014).

Dans le chapitre précédent nous avons déjà démontré que l'imagerie par ultrasons était possible de manière complètement non invasive (à travers la peau et l'os du crâne) chez des souris de tout âge sous anesthésie. Dans ce nouveau chapitre nous présentons comment la mise au point d'un

nouveau montage expérimental (IV.2.1) et l'optimisation des séquences d'acquisition ultrasonores (IV.2.2) nous ont permis de réaliser des acquisitions d'imagerie cérébrale fonctionnelle (fUS) chez des souris éveillées et libres de leurs mouvements, de manière transcrânienne et peu invasive (IV.2.3).

IV.2. Imagerie fonctionnelle transcrânienne du cerveau de la souris éveillée et libre de ses mouvements

IV.2.1. Présentation du protocole expérimental et du montage expérimental associé

Respect de la réglementation

Les souris ont été hébergées 4 par cage, dans un environnement contrôlé ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 50% d'humidité relative, cycle d'obscurité-lumière de 12h/12h) avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Pour minimiser le stress au cours de la procédure expérimentale, elles ont bénéficié d'une période d'acclimatation de 7 jours après leur arrivée dans l'animalerie. Toutes les souris ont reçu des soins humains 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 (n°59, C2EA -59, « Paris Centre et Sud ») et a reçu le numéro de protocole APAFIS#3323-2015122411279178_v3-3.

Préparation des animaux

Les expériences dont les résultats sont présentés dans ce chapitre ont été réalisées chez des souris C57BL/6 mâles (Janvier Labs, Le Genest St Isle, France), âgées de 8 semaines au début des expériences.

Afin de permettre une fixation simple et rapide, par simple aimantation, entre la sonde ultrasonore et la tête des animaux, un cadre métallique magnétique et plat a été fixé sur le crâne des souris (Urban et al. 2015) (voir le paragraphe suivant et la **Figure IV-5** pour une description complète et détaillée du montage expérimental). Pour réaliser l'implantation chirurgicale du cadre métallique, les souris ont été anesthésiées par un mélange de kétamine (100 mg/kg, injection intrapéritonéale) et de médétomidine (1 mg/kg, Domitor®, injection intrapéritonéale) et placées dans un cadre de stéréotaxie. Après vérification de la perte du réflexe de retrait de la patte suite à un pincement, la peau du crâne et le périoste ont été retirés afin d'accéder au crâne. Le cadre métallique a été fixé sur le crâne à l'aide de deux vis chirurgicales et de Super-bond C&B (Phymep, France). La stabilité de la fixation a été également renforcée à l'aide de ciment dentaire (Henry Schein, France) (**Figure IV-5 (c1)**). La fenêtre d'imagerie permise par le cadre métallique (allant grossièrement de Bregma à Lambda) a ensuite été couverte de Kwik-Cast™ (Phymep, France) entre chaque session d'imagerie afin de protéger et maintenir l'intégrité de l'os (**Figure IV-5 (c2)**). Une fois l'opération d'implantation du cadre métallique

terminée, l'anesthésie a été « annulée » par une injection sous-cutanée d'atipamézole (1 mg/kg, Antisedan®). Toutes les souris ont également reçu une administration prophylactique de pénicilline (Extencillin®, 100.000 UI/kg, injection intramusculaire) et meloxicam (Metacam® 5 mg/kg/jour, injection sous-cutanée) pour éviter la douleur postopératoire. Les souris ont ensuite eu une semaine de récupération pour se remettre de cette procédure chirurgicale avant de commencer les expérimentations.

Juste avant les acquisitions d'imagerie fonctionnelle ultrasonore les souris ont été légèrement anesthésiées par inhalation d'isoflurane. Durant cette brève période d'anesthésie la protection de Kwik-Cast™ a été enlevée, le crâne a été nettoyé avec une solution saline, puis un gel échographique a été appliqué dans la fenêtre d'imagerie. La sonde, préalablement fixée dans le porte-sonde magnétique a ensuite été fixée sur le cadre métallique et alignée avec le bord du cadre (**Figure IV-5 (d)**). Les souris ont été placées dans une cage vide (sans sciure) afin d'avoir un accès plus facile à leurs vibrisses (moustaches) lors des stimulations.

Description du montage expérimental conçu pour les acquisitions d'imagerie fonctionnelle sur les souris éveillées et librement mobiles

Le principal défi pour réaliser des expériences d'imagerie sur des souris éveillées et librement mobiles est leur petite taille comparée à celle des rats. Notre montage expérimental se compose d'une **sonde à ultrasons** montée dans un **porte-sonde magnétique** et d'un **cadre métallique** fixé sur la tête des souris (**Figure IV-5 (a-b)**). Tous les éléments du montage ont été conçus de manière à minimiser leur taille et leur poids. La sonde est connectée à un scanner de recherche ultrasonore ultrarapide (Aixplorer™, SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) permettant d'utiliser Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA).

La **sonde ultrasonore** utilisée dans ces expériences est une nouvelle sonde ultralégère spécifiquement conçue pour les expériences d'imagerie sur rongeurs éveillés et en mouvement (fréquence centrale de 15MHz, 128 éléments, pas de 0.110 mm, 8 mm de distance focale et 400 µm de largeur focale). Par rapport au précédent modèle de sonde utilisé pour les expériences de rats mobiles (Sieu et al. 2015) (IV.1.2), l'épaisseur de la sonde a été réduite par un facteur 5 (passant ainsi de 1.85 cm à 0.4 cm), son poids par un facteur 3 (passant de 12 g à 4 g), et son câble a été rendu plus flexible (**Figure IV-5 (a)**). La sonde a été conçue en interne au laboratoire et fabriquée par Vernon (Tours, France) selon nos spécifications.

Le **cadre métallique** (**Figure IV-5 (c1)**) a été conçu pour être fixé directement sur le crâne intact de la souris (aucun amincissement du crâne n'est nécessaire (chapitre III) contrairement aux expériences réalisées sur des rats adultes) suivant la procédure d'implantation décrite ci-dessus. Ce

cadre métallique est un rectangle de 12 mm par 23 mm permettant une fenêtre d'imagerie de 6 mm par 21 mm. Il a été découpé dans une tôle d'acier galvanisé, matériau choisi pour ses propriétés magnétiques, afin de permettre une fixation rapide avec le porte-sonde. A cet effet, 4 aimants petits mais puissants (Supermagnete, Q-05-1.5-01-N, 1 x 1,5 x 5 mm, NdFeB, force adhésive 140 g) ont été collés à la base du porte-sonde (**Figure IV-5 (a-b)**). Le **porte-sonde** a été dessiné par nos soins dans le logiciel Autodesk Inventor et fabriqué à l'aide d'une imprimante 3D (MakerBot).

Entre les sessions d'expérience les souris portaient donc uniquement ce cadre métallique et 2 vis, correspondant à un poids total de 1.4 g (**Figure IV-5 (c1-c2)**). Aucune perturbation de l'activité normale des souris portant ce cadre métallique n'a été observée (**Figure IV-5 (c2)**). Lors des expériences d'imagerie fonctionnelle, les souris portaient la configuration totale (cadre métallique + sonde + porte-sonde) correspondant à un poids total d'environ 8 g (**Figure IV-5 (d)**). Dans cette version actuelle du montage expérimental, correspondant à une preuve de concept, l'expérimentateur doit

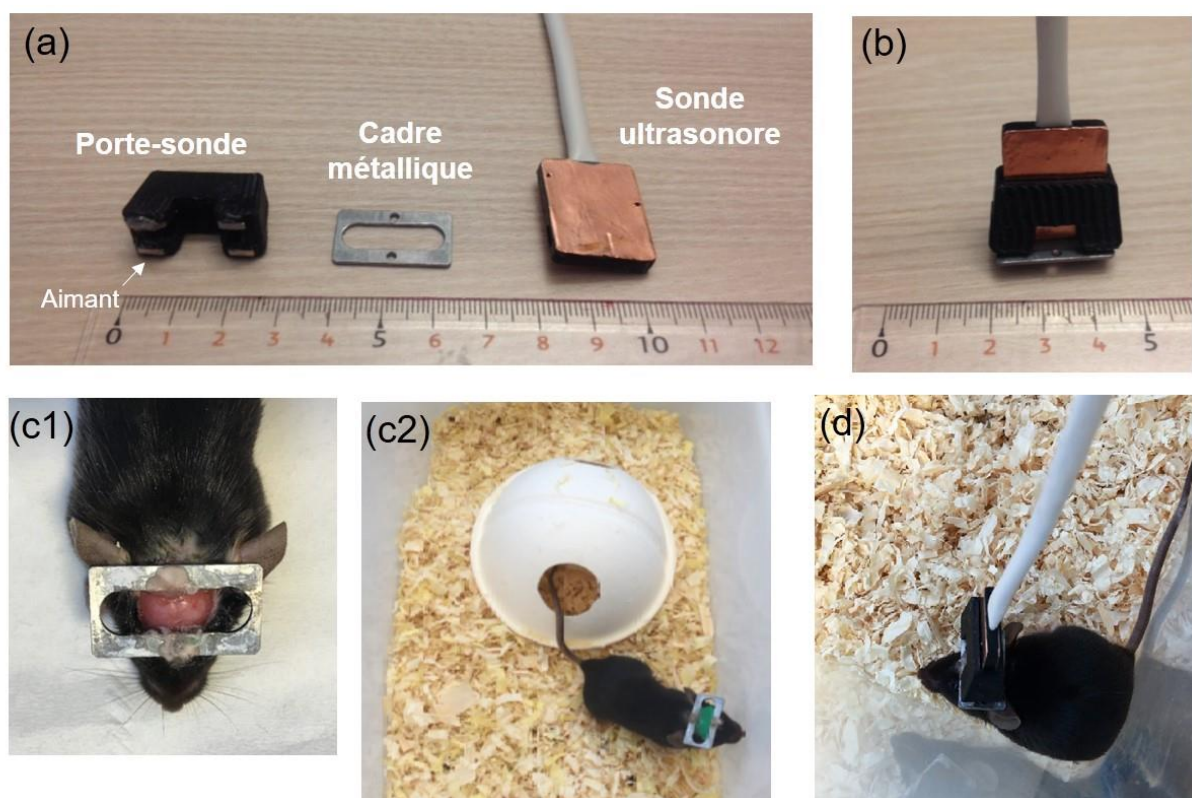


Figure IV-5 : Montage expérimental pour les acquisitions fUS sur souris éveillées et en mouvement libre. (a) Le montage, conçu pour permettre une fixation rapide et simple de la sonde lors des expériences sur souris éveillées et en mouvement, se compose de 3 parties : la sonde, le porte-sonde magnétique, et un cadre métallique léger fixé sur le crâne intact de la souris. (b) Photo du montage une fois les 3 parties assemblées. (c1)-(c2) Une souris équipée du cadre métallique. Le cadre métallique est la seule partie du montage que la souris garde sur la tête en permanence entre deux sessions expérimentales. Le crâne intact (pas d'amincissement dans la fenêtre d'imagerie) (c1) de la souris est protégé par une couche de plastique Kwik-Cast™ entre deux sessions expérimentales (partie verte visible dans (c2)). (d) La même souris équipée du montage complet durant une session expérimentale.

alléger manuellement le poids du montage expérimental en tenant le câble de la sonde et en suivant les mouvements de la souris pour limiter les efforts de torsion du câble notamment.

Une fois les souris équipées du système d'imagerie et après une habitude de 30 min, leurs vibrisses ont été stimulées manuellement à l'aide d'un coton-tige afin d'étudier la possibilité de réaliser de l'imagerie fUS sur des souris dans des conditions d'éveil. Le schéma de stimulation consistait en 3 stimulations de 30 secondes chacune (5-7 Hz, 1 cm d'amplitude) des vibrisses droites ou gauches de la souris, séparées par 60 secondes de non stimulation, sur une durée totale d'acquisition de 5 minutes.

Séquences d'acquisition ultrasonore

Comme dans le chapitre précédent, les images vasculaires ont été obtenues en utilisant la technique d'imagerie Doppler ultrarapide par *coherent compounding* (recombinaison cohérente) (Bercoff et al. 2011). Typiquement 11 ondes planes inclinées, séparées de 2°, ont été utilisées pour former une image recombinaisonnée (Montaldo et al. 2009). Un paquet de plusieurs centaines d'images recombinaisonnées a été acquis avec une cadence d'imagerie très élevée (typiquement 200 à 400 images acquises à 500 Hz, ce qui permet d'enregistrer plusieurs cycles cardiaques). Ce paquet de plusieurs centaines d'images a ensuite été filtré à l'aide d'un filtre spatio-temporel utilisant la décomposition en valeurs singulières (SVD) (Demene et al. 2015) : cette étape de filtrage permet de séparer le signal de flux sanguin du signal des tissus.

Les images de vascularisation Doppler présentées dans ce chapitre proviennent de l'acquisition de 400 images recombinaisonnées acquises à 500 Hz. Les ondes planes étaient inclinées avec les valeurs suivantes : [-10, -8, -6, -4, -2, 0, 2, 4, 6, 8, 10] °.

Pour les acquisitions d'imagerie fonctionnelle, une image Doppler a été acquise chaque seconde durant 5 minutes (chaque image Doppler étant obtenue à partir de 200 images recombinaisonnées acquises à 500 Hz grâce à l'insonification de 5 ondes planes inclinées avec les angles [-4, -2, 0, 2, 4]°).

Une **optimisation de la séquence d'acquisition** ultrasonore a cependant été nécessaire afin de pouvoir l'utiliser sur des souris éveillées. En effet, nous avons observé lors des premiers tests d'imagerie fUS sur des souris éveillées que de forts signaux Doppler provenant des **muscles temporaux** induisaient des artéfacts dans l'image, notamment dans la partie centrale de l'image correspondant au cerveau. La solution pour réduire ces artéfacts provenant des muscles consiste à appliquer une **apodisation** (Cobbold 2006) lors de l'émission et de la réception sur les bords de la sonde, afin de minimiser la part d'ondes ultrasonores reçues et rétrodiffusées par les muscles. Cet artéfact et la solution utilisée sont présentés plus en détail dans la partie suivante.

IV.2.2. Amélioration de la séquence d'imagerie pour résoudre un problème d'artéfact lié aux mouvements de la mâchoire de la souris.

Nous avons démontré dans le chapitre précédent (chapitre III) qu'il était possible d'imager de manière transcrânienne et complètement non invasive, le cerveau de souris anesthésiées, quel que soit leur âge, à travers leur crâne et leur peau intacts, en utilisant des séquences d'imagerie Doppler ultrarapide classiques. Dans ce chapitre nous nous intéressons à la possibilité de faire de l'imagerie vasculaire cérébrale Doppler ultrarapide ainsi que de l'imagerie fonctionnelle cérébrale chez la souris éveillée et libre de ses mouvements. Théoriquement, et aux vues des résultats du chapitre précédent, ce genre d'imagerie pourraient donc se faire de manière complètement non invasive chez la souris éveillée, comme nous l'avons démontré chez la souris anesthésiée. Cependant, comme la peau du crâne n'est pas rigidement liée au crâne mais au contraire peut bouger par rapport à celui-ci, une fixation entièrement non invasive sur la peau (à l'aide de colle par exemple) a été tentée mais n'a pas fonctionné. En effet, afin d'éviter les artéfacts lorsque la souris est libre de ses mouvements, une stabilisation solide de la sonde est nécessaire. C'est pour cela que le cadre métallique magnétique a été fixé directement sur le crâne des souris à l'aide de vis de fixation (**Figure IV-5**) et que la peau du crâne a été retirée dans la fenêtre d'imagerie. De plus, le fait de retirer la peau du crâne nous permet de fixer le cadre métallique de manière précise en se servant des repères visible sur l'os (Bregma et Lambda). En utilisant ce montage, des images Doppler ultrarapides de haute qualité ont été obtenues pour la première fois sur une **souris éveillée et libre de ses mouvements (Figure IV-6)** : on observe sur ces images coronales la vascularisation du cerveau ainsi que des tissus environnants. Plusieurs coupes coronales différentes ont pu être acquises entre Bregma et Lambda en bougeant manuellement la sonde par rapport au cadre métallique. Notre montage expérimental nous permet donc d'accéder à différentes aires cérébrales.

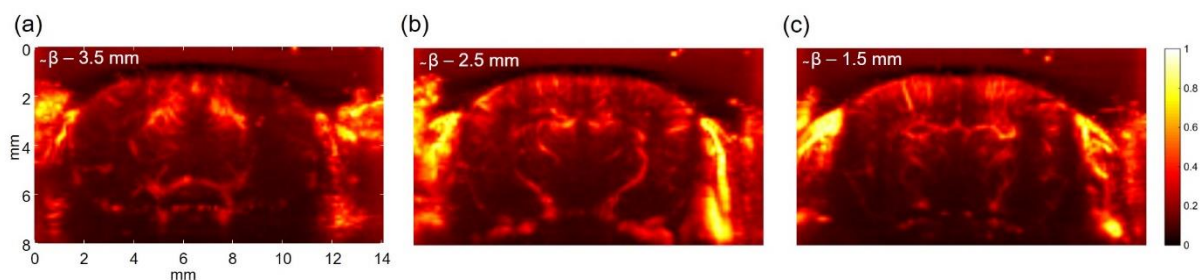


Figure IV-6 : Images vasculaires du cerveau d'une souris éveillée et pouvant se déplacer librement, obtenues par acquisition Doppler ultrarapide classique. Plusieurs plans coronaux ont pu être imagés entre Bregma et Lambda en bougeant manuellement la sonde par rapport au cadre métallique fixé sur la tête de la souris. Ces plans coronaux ont été identifiés comme correspondant aux plans de coordonnées Bregma -3.5 mm (a), -2.5 mm (b), -1.5 mm (c).

Ces images vasculaires ont été obtenues avec une séquence d'imagerie ultrasonore classique, identique à celles utilisées chez les souris anesthésiées. Cependant, afin d'étudier l'activité cérébrale **au cours du temps** une optimisation de la séquence d'acquisition a été nécessaire. En effet, sur ces images vasculaires faites à un instant t , et notamment sur la coupe coronale correspondant à la **Figure IV-6 (b)**, on peut observer sur les bords du cerveau la présence de deux muscles temporaux (muscles de la mâchoire) présentant un signal Doppler fort. A cet instant t , les muscles ne sont pas activés et leur signal ne vient pas perturber le reste de l'image. Cependant, dès les premières

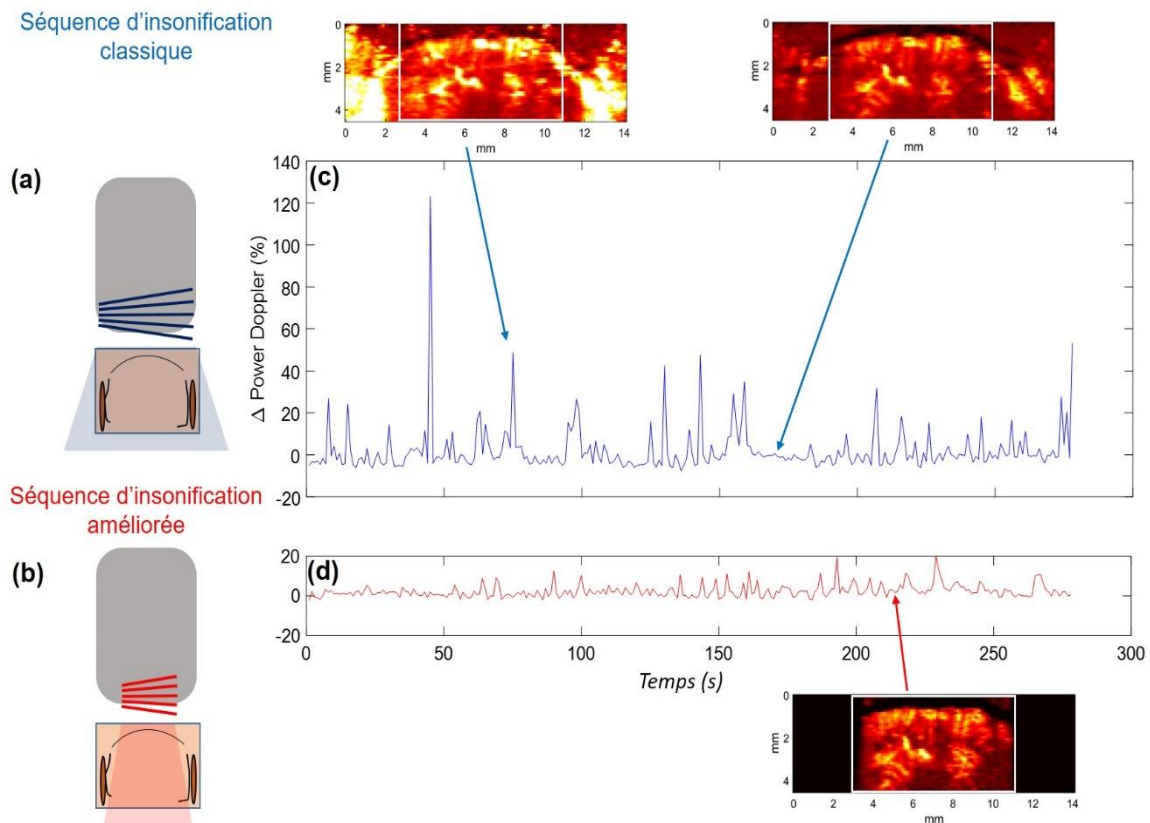


Figure IV-7 : Optimisation de la séquence ultrasonore permettant de cibler l'énergie sur la zone contenant uniquement le cerveau afin de réduire un artefact provenant des muscles temporaux de part et d'autre du cerveau de la souris. Une image Doppler a été acquise toutes les secondes pendant 5 minutes en utilisant (a) une séquence ultrasonore classique utilisant les 128 éléments de la sonde, ou bien (b) la séquence ultrasonore optimisée avec apodisation des éléments extrêmes de la sonde par une fenêtre de Hamming, à la fois à l'émission et à la réception. (c) Le signal Doppler provenant des muscles temporaux induit un artefact dans la région centrale de l'image (encadrée en blanc) contenant le cerveau, et conduit à une forte augmentation de l'amplitude du signal Doppler moyennée dans cette zone centrale d'intérêt (jusqu'à +120%). Deux images Doppler ont été affichées : une correspondant à un de ces pics d'amplitude (image de gauche) et une autre lors d'une phase stable où les muscles ne sont pas activés (image de droite). (d) La séquence optimisée, apodisant le signal des éléments latéraux sur 3.5 mm à la fois en émission et réception, conduit à un signal Doppler au cours du temps bien plus stable. Les amplitudes des variations du volume sanguin cérébral dans la zone d'intérêt encadrée en blanc sont <20%, ce qui est compatible avec des variations induites par une activité cérébrale.

expériences sur les souris éveillées nous nous sommes rendu compte que de nombreuses images acquises étaient perturbées par un artéfact rendant nos acquisitions fonctionnelles inexploitable. En effet, lorsque la souris utilise ses muscles temporaux (ce que nous avons identifié comme étant lié à un phénomène de mastication de la souris), le signal Doppler provenant des muscles devient très fort et perturbe l'image, non seulement sur les bords où se trouvent les muscles, mais également dans la zone centrale de l'image où se trouve le cerveau. Cet artéfact résulte en une augmentation allant parfois jusqu'à +120% du signal Doppler de base (**Figure IV-7 (c)**). Cet artéfact n'est pas gênant dans le cas où seule une image vasculaire à un instant t quelconque doit être acquise : si les muscles sont activés à cet instant t il suffit de refaire l'acquisition quelques secondes plus tard et de garder l'image sans artéfact. Dans le cas des acquisitions d'imagerie **fonctionnelle** le problème est plus délicat car l'information clé dont nous avons besoin correspond justement à la **variation** du signal Doppler au cours du temps, provoquée par l'activité fonctionnelle du cerveau, et non provoquée par des perturbations extérieures du signal de type artéfact. Dans ce type d'acquisition une image Doppler ultrarapide est acquise chaque seconde durant 5 minutes et chaque image au cours du temps est importante. Il nous a donc été nécessaire de modifier la séquence ultrasonore afin de supprimer ces artéfacts musculaires. Pour cela, nous avons fait en sorte de « masquer » les muscles temporaux, à la fois lors de l'émission et de la réception à l'aide d'une apodisation du signal par une fenêtre de pondération de type Hamming (**Figure IV-7**). Cette amélioration de la séquence d'acquisition conduit bien à une suppression significative de l'artéfact et à une image Doppler au cours du temps plus stable et de bien meilleure qualité, dont les variations d'amplitude sont compatibles avec une activité cérébrale (<20%) chez la souris éveillée (**Figure IV-7 (d)**).

IV.2.3. Imagerie fonctionnelle par stimulation des vibrisses de la souris

Nous avons ensuite réalisé des expériences d'**imagerie fonctionnelle** par **stimulation** des vibrisses chez la souris éveillée. La sonde a été placée de façon à visualiser le plan coronal correspondant à la coordonnée antéropostérieure Bregma -1.5 mm, c'est-à-dire le plan coronal contenant le cortex sensoriel S1BF. La **Figure IV-8 (a)** est une carte d'activation représentant la répartition spatiale de la réponse hémodynamique suite à la stimulation manuelle des vibrisses gauches de la souris. L'image de fond en niveaux de gris est l'image vasculaire de la coupe coronale imagée. Le niveau de corrélation superposé à cette image correspond à la corrélation temporelle entre le schéma de stimulation (60 s de non stimulation suivies de 30 s de stimulation, répété durant 5 min ; représenté en rosé dans le graphique de la **Figure IV-8 (b)**) et la réponse hémodynamique. Seuls les pixels ayant un niveau de corrélation supérieur à 3 fois le niveau de bruit ont été considérés comme significativement activés par le stimulus et sont représentés dans l'image (**Figure IV-8 (a)**). La stimulation des vibrisses conduit

à une activation controlatérale de la zone fonctionnelle S1BF : en effet, la stimulation des vibrisses gauches est fortement corrélée avec une augmentation du volume sanguin cérébral dans la zone S1BF de l'hémisphère droit (**Figure IV-8 (b)**). La valeur de corrélation moyenne dans la zone activée est de 0.56. La même expérience a été réalisée sur N=3 souris, le coefficient de corrélation moyen est de 0.55 ± 0.15 .

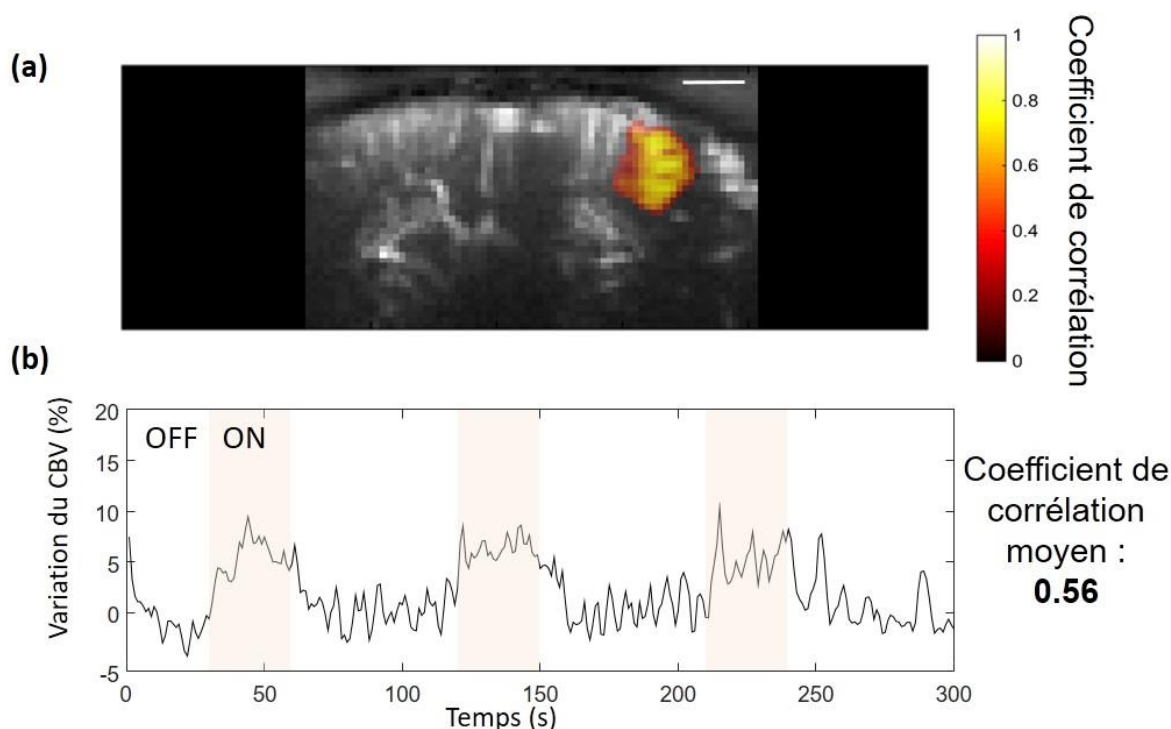


Figure IV-8 : Imagerie fonctionnelle fUS du cerveau d'une souris éveillée et librement mobile à travers son crâne intact : observation des variations du flux sanguin dans le cortex sensoriel S1BF en réponse à une stimulation des vibrisses. (a) L'image de fond en niveaux de gris est une image des vaisseaux sanguins dans le plan coronal choisi (Bregma -1.5 mm). Echelle : 1 mm. Le niveau de corrélation représente la corrélation temporelle entre le stimulus et la réponse hémodynamique dont le déroulement temporel est présenté en (b).

En conclusion, grâce à notre nouvelle sonde ultra légère, à notre montage expérimental permettant une fixation simple et rapide de la sonde sur la tête des souris, et grâce à notre optimisation de la séquence ultrasonore classique, nous avons démontré dans cette partie que l'imagerie fonctionnelle par ultrasons (fUS) permet de visualiser de manière fiable les changements hémodynamiques induits par une tâche chez des **souris éveillées et librement mobiles**. Le tout a été obtenu à travers un **crâne intact**, sans nécessiter de chirurgie invasive ou d'injection d'agents de contraste.

IV.3. Discussion et conclusion

Dans ce chapitre nous avons démontré la possibilité de faire de l'imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide (fUS) chez le petit animal **éveillé** et en **mouvement**, et notamment de manière **transcrânienne** et **peu invasive** chez la souris. Pour cela nous avons utilisé une nouvelle sonde ultrasonore ultra légère spécialement conçue pour l'imagerie chez le petit animal éveillé et nous avons mis au point un système de fixation de la sonde à la fois léger, peu encombrant et très simple à utiliser. De plus nous avons identifié que le mouvement rapide et le fort signal Doppler provenant des muscles de la mâchoire de la souris, de part et d'autre du cerveau, étaient à l'origine d'artéfacts rendant nos expériences d'imagerie fonctionnelle impossibles. Pour résoudre ce problème nous avons optimisé notre séquence d'acquisition ultrasonore ultrarapide classique en y ajoutant une apodisation des bords de l'image, afin de ne pas envoyer d'ultrason sur ces muscles latéraux et de ne pas recevoir de signal parasite de leur part.

Imagerie fUS minimalement invasive sur souris éveillées

Bien qu'il soit possible d'obtenir des images vasculaires cérébrales de très bonne qualité de manière complètement non invasive chez la souris anesthésiée, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les expériences sur souris éveillées nécessitent une fixation solide entre le crâne et la sonde. Pour cela nous avons vissé et cimenté un cadre métallique très léger sur le crâne des souris. Cette approche est **minimalement invasive**, la cavité crâniale et la zone d'imagerie étant laissée intacte, réduisant ainsi le risque d'infection. Le cerveau est donc préservé dans un état plus physiologique comparé aux craniotomies (notre précédente approche utilisée chez les rats éveillés (Sieu et al. 2015)) pouvant provoquer des changements importants d'un point de vue biochimique, morphologique et vasculaire dans le cerveau du rat, mais également au niveau comportemental (Cole et al. 2010; Lagraoui et al. 2012; Forcelli, Kalikhman, and Gale 2013). Une alternative à la chirurgie pour réaliser des images cérébrales de manière transcrânienne est l'injection d'agents de contraste (Errico et al. 2016). Injecter des agents de contraste dans des animaux éveillés et en mouvement serait théoriquement possible mais compliqué à mettre en œuvre, car cela nécessiterait de placer un cathéter dans une veine de la souris de telle façon que cela ne la gêne pas dans ses mouvements. Une telle procédure augmenterait le risque d'infections et/ou de douleur. La possibilité d'imager le cerveau des souris directement à travers leur crâne intact est donc d'un réel intérêt pour les études longitudinales et comportementales en condition d'éveil.

Perspective d'amélioration du montage expérimental

Un des principaux défauts du montage expérimental dans sa version présentée ici est la nécessité de soutenir manuellement le câble de la sonde et de suivre les mouvements de la souris, afin d'éviter des problèmes de torsion du câble notamment. Une amélioration du montage est en cours de test au laboratoire afin de ne plus avoir besoin que l'expérimentateur tienne le câble. Pour cela, au lieu de placer la souris dans une cage classique nous avons placé la souris dans une cage ultra légère en fibre de carbone, flottant sur un coussin d'air. Nous avons détourné l'utilisation « normale » d'un système expérimental permettant de faire des expérimentations sur souris éveillées avec tête fixée, en utilisant uniquement la cage et le support propulsant l'air comprimé, sans utiliser la partie « fixation de la tête » (voir le chapitre V et le système Mobile HomeCage™ dans sa configuration normale « tête fixée »). Ainsi le câble est simplement fixé au-dessus de la cage à l'aide d'une pince de fixation (afin de limiter le poids supporté par la souris), mais les mouvements de torsion du câble sont largement réduits. En effet, la cage étant sur coussin d'air, lorsque la souris essaie de tourner sur elle-même son mouvement est compensé par le mouvement de la cage sous ses pieds et le câble ne se tord pas.

La perspective de sondes toujours plus petites, plus légères, et permettant des acquisitions 3D...

La nouvelle sonde ultrasonore ultra légère utilisée chez la souris pourrait être encore améliorée de plusieurs façons. Tout d'abord, comme nous l'avons déjà discuté dans le chapitre précédent, un ajustement de la fréquence ultrasonore pourrait être envisagé, tout en faisant un compromis entre la résolution à atteindre et l'atténuation du signal : en effet, une fréquence plus élevée permettrait une meilleure résolution (et donc une meilleure visualisation de certains vaisseaux très petits dans le cerveau de la souris), mais aurait aussi pour conséquence une plus grande atténuation du signal due à la présence du crâne. La sonde pourrait également être miniaturisée d'avantage en réduisant le nombre d'éléments puisque finalement l'apodisation des bords de l'image revient à n'utiliser qu'environ 64 éléments sur les 128 lors des expériences d'imagerie fonctionnelle. Enfin, dans un futur plus lointain les technologies de type cMUT (*capacitive micromachined ultrasonic transducers*) fourniront certainement des solutions très attractives pour l'imagerie chez le petit animal éveillé, puisqu'elles pourraient permettre de réduire encore d'avantage la taille et le poids des sondes, mais également de réaliser des matrices 2D. En effet, une des principales limitations restante, face au concurrent qu'est l'IRM fonctionnel, reste la possibilité restreinte de faire de l'imagerie fonctionnelle 3D chez le petit animal. En l'absence de sonde 2D suffisamment haute fréquence pour obtenir une bonne résolution d'imagerie chez le petit animal, des stratégies à l'aide de sondes linéaires montées sur des moteurs sont possibles et ont déjà été utilisées chez l'animal anesthésié (Gesnik et al. 2017). Cependant, ces solutions restent peu envisageables chez les souris éveillées et librement mobiles à cause du poids supplémentaire que cela induirait.

Vers l'étude de la connectivité fonctionnelle sur souris éveillées...

Plus généralement encore que l'imagerie fonctionnelle induite par une tâche, nos précédents résultats ouvrent également la voie à l'étude de la **connectivité fonctionnelle** du cerveau de la souris éveillée. La souris est un modèle de choix pour de nombreuses maladies en recherche préclinique, et notamment au niveau psychiatriques et neurologiques. L'utilisation d'anesthésiques peut poser problème dans ce domaine de recherche puisqu'ils induisent inévitablement des modifications du fonctionnement du cerveau. Par conséquent, le fait de pouvoir étudier la connectivité fonctionnelle dans ce modèle animal en condition d'éveil permettrait des avancées conséquentes dans les études précliniques en neurosciences. L'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris est le sujet abordé dans le chapitre suivant.

Références du chapitre

- Bercoff, J., G. Montaldo, T. Loupas, D. Savery, F. Meziere, M. Fink, and M. Tanter. 2011. "Ultrafast Compound Doppler Imaging: Providing Full Blood Flow Characterization." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 58 (1): 134–47.
- Cobbold, Richard S. C. 2006. *Foundations of Biomedical Ultrasound*. 1 edition. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Cole, Jeffrey T., Angela Yarnell, William S. Kean, Eric Gold, Bobbi Lewis, Ming Ren, David C. McMullen, et al. 2010. "Craniotomy: True Sham for Traumatic Brain Injury, or a Sham of a Sham?" *Journal of Neurotrauma* 28 (3): 359–69. doi:10.1089/neu.2010.1427.
- Demene, C., T. Deffieux, M. Pernot, B.F. Osmanski, V. Biran, J.-C. Gennisson, L.-A. Sieu, et al. 2015. "Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity." *IEEE Transactions on Medical Imaging* PP (99): 1–1.
- Desai, M., I. Kahn, U. Knoblich, J. Bernstein, H. Atallah, A. Yang, N. Kopell, et al. 2011. "Mapping Brain Networks in Awake Mice Using Combined Optical Neural Control and fMRI." *Journal of Neurophysiology* 105 (3): 1393–1405. doi:10.1152/jn.00828.2010.
- Errico, Claudia, Bruno-Félix Osmanski, Sophie Pezet, Olivier Couture, Zsolt Lenkei, and Mickael Tanter. 2016. "Transcranial Functional Ultrasound Imaging of the Brain Using Microbubble-Enhanced Ultrasensitive Doppler." *Neuroimage* 124 (Pt A): 752–61. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.09.037.
- Fan, David, Dylan Rich, Tahl Holtzman, Patrick Ruther, Jeffrey W. Dalley, Alberto Lopez, Mark A. Rossi, et al. 2011. "A Wireless Multi-Channel Recording System for Freely Behaving Mice and Rats." *PLOS ONE* 6 (7): e22033. doi:10.1371/journal.pone.0022033.
- Forcelli, Patrick A., David Kalikhman, and Karen Gale. 2013. "Delayed Effect of Craniotomy on Experimental Seizures in Rats: e81401." *PLoS One* 8 (12): e81401. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081401.
- Gao, Yu-Rong, Yuncong Ma, Qingguang Zhang, Aaron T. Winder, Zhifeng Liang, Lilith Antinori, Patrick J. Drew, and Nanyin Zhang. 2016. "Time to Wake up: Studying Neurovascular Coupling and Brain-Wide Circuit Function in the Un-Anesthetized Animal." *NeuroImage*, November. doi:10.1016/j.neuroimage.2016.11.069.
- Gesnik, Marc, Kevin Blaize, Thomas Deffieux, Jean-Luc Gennisson, José-Alain Sahel, Mathias Fink, Serge Picaud, and Mickaël Tanter. 2017. "3D Functional Ultrasound Imaging of the Cerebral Visual System in Rodents." *NeuroImage*, February. doi:10.1016/j.neuroimage.2017.01.071.
- King, Jean A., Timothy S. Garelick, Mathew E. Brevard, Wei Chen, Tara L. Messenger, Timothy Q. Duong, and Craig F. Ferris. 2005. "Procedure for Minimizing Stress for fMRI Studies in Conscious Rats." *Journal of Neuroscience Methods* 148 (2): 154–60. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.04.011.
- Lagraoui, Mouna, Joseph R. Latoche, Natalia G. Cartwright, Gauthaman Sukumar, Clifton L. Dalgard, and Brian C. Schaefer. 2012. "Controlled Cortical Impact and Craniotomy Induce Strikingly Similar Profiles of Inflammatory Gene Expression, but with Distinct Kinetics." *Frontiers in Neurology* 3. doi:10.3389/fneur.2012.00155.
- Lahti, Katariina M, Craig F Ferris, Fuhai Li, Christopher H Sotak, and Jean A King. 1998. "Imaging Brain Activity in Conscious Animals Using Functional MRI." *Journal of Neuroscience Methods* 82 (1): 75–83. doi:10.1016/S0165-0270(98)00037-5.
- Lahti, Katariina M., Craig F. Ferris, Fuhai Li, Christopher H. Sotak, and Jean A. King. 1999. "Comparison of Evoked Cortical Activity in Conscious and Propofol-Anesthetized Rats Using Functional MRI." *Magnetic Resonance in Medicine* 41 (2): 412–16. doi:10.1002/(SICI)1522-2594(199902)41:2<412::AID-MRM28>3.0.CO;2-3.
- Macé, Emilie, Gabriel Montaldo, Ivan Cohen, Michel Baulac, Mathias Fink, and Mickael Tanter. 2011. "Functional Ultrasound Imaging of the Brain." *Nature Methods* 8 (8): 662–64.

- Montaldo, G., M. Tanter, J. Bercoff, N. Benech, and M. Fink. 2009. "Coherent Plane-Wave Compounding for Very High Frame Rate Ultrasonography and Transient Elastography." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 56 (3): 489–506.
- Nasrallah, Fatima A., Hui-Chien Tay, and Kai-Hsiang Chuang. 2014. "Detection of Functional Connectivity in the Resting Mouse Brain." *NeuroImage* 86 (February): 417–24. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.10.025.
- Packer, Adam M., Lloyd E. Russell, Henry W. P. Dagleish, and Michael Häusser. 2015. "Simultaneous All-Optical Manipulation and Recording of Neural Circuit Activity with Cellular Resolution in Vivo." *Nature Methods* 12 (2): 140–46. doi:10.1038/nmeth.3217.
- Pawela, Christopher P., Bharat B. Biswal, Anthony G. Hudetz, Marie L. Schulte, Rupeng Li, Seth R. Jones, Younghoon R. Cho, Hani S. Matloub, and James S. Hyde. 2009. "A Protocol for Use of Medetomidine Anesthesia in Rats for Extended Studies Using Task-Induced BOLD Contrast and Resting-State Functional Connectivity." *NeuroImage* 46 (4): 1137–47. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.03.004.
- Peeters, R. R., I. Tindemans, E. De Schutter, and A. Van der Linden. 2001. "Comparing BOLD fMRI Signal Changes in the Awake and Anesthetized Rat during Electrical Forepaw Stimulation." *Magnetic Resonance Imaging* 19 (6): 821–26. doi:10.1016/S0730-725X(01)00391-5.
- Ratering, David, Christof Baltes, Jurek Nordmeyer-Massner, Daniel Marek, and Markus Rudin. 2008. "Performance of a 200-MHz Cryogenic RF Probe Designed for MRI and MRS of the Murine Brain." *Magnetic Resonance in Medicine* 59 (6): 1440–47. doi:10.1002/mrm.21629.
- Sieu, Lim-Anna, Antoine Bergel, Elodie Tiran, Thomas Deffieux, Mathieu Pernot, Jean-Luc Gennisson, Mickaël Tanter, and Ivan Cohen. 2015. "EEG and Functional Ultrasound Imaging in Mobile Rats." *Nature Methods* 12 (9): 831–34. doi:10.1038/nmeth.3506.
- Sigal, Iliya, Margaret M. Koletar, Dene Ringuette, Raanan Gad, Melanie Jeffrey, Peter L. Carlen, Bojana Stefanovic, and Ofer Levi. 2016. "Imaging Brain Activity during Seizures in Freely Behaving Rats Using a Miniature Multi-Modal Imaging System." *Biomedical Optics Express* 7 (9): 3596. doi:10.1364/BOE.7.003596.
- Tang, Jianbo, Xianjin Dai, and Huabei Jiang. 2016. "Wearable Scanning Photoacoustic Brain Imaging in Behaving Rats." *Journal of Biophotonics*, March, n/a-n/a. doi:10.1002/jbio.201500311.
- Urban, Alan, Clara Dussaux, Guillaume Martel, Clément Brunner, Emilie Mace, and Gabriel Montaldo. 2015. "Real-Time Imaging of Brain Activity in Freely Moving Rats Using Functional Ultrasound." *Nature Methods* 12 (9): 873–78. doi:10.1038/nmeth.3482.
- Yu, Hang, Janaka Senarathna, Betty M. Tyler, Nitish V. Thakor, and Arvind P. Pathak. 2015. "Miniaturized Optical Neuroimaging in Unrestrained Animals." *NeuroImage* 113 (June): 397–406. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.02.070.

CHAPITRE V :

Etude de la connectivité fonctionnelle chez la souris par imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide (fUS)

V. Etude de la connectivité fonctionnelle chez la souris par imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide (fUS)

V.1. Introduction

V.1.1. Qu'est-ce que la connectivité fonctionnelle ?

La localisation des différentes aires cérébrales et de leurs fonctions associées (aires motrices, visuelles, auditives...) est désormais relativement bien connue et cartographiée sous forme d'Atlas pour de nombreuses espèces. Cependant, la manière dont ces différentes régions **interagissent** entre elles et forment ce qu'on appelle des « **réseaux fonctionnels** » fait encore office de très nombreuses investigations.

Lorsque le cerveau est en état de repos, c'est-à-dire lorsqu'il n'est pas engagé dans la réalisation d'une tâche précise, (état dit de « **resting state** », *rest* signifiant repos en anglais) il a été observé, grâce à l'IRMf, des fluctuations spontanées au cours du temps dans les signaux BOLD (Biswal et al. 1995). Il a alors été démontré que certaines régions, bien distinctes spatialement mais ayant des fonctions reliées, présentaient des fluctuations spontanées basse fréquence (0.01 à 0.1 Hz) ayant une forte corrélation temporelle entre elles (Biswal et al. 1995; Michael D. Fox and Raichle 2007). C'est cette **corrélation temporelle** des fluctuations des signaux BOLD à basse fréquence **entre des régions du cerveau spatialement distinctes** que l'on appelle « **connectivité fonctionnelle** » (Lowe et al. 2000). L'observation des fluctuations spontanées basses fréquences et l'étude des corrélations entre ces signaux dans les différentes zones du cerveau permettent de visualiser l'architecture fonctionnelle du cerveau.

Actuellement la connectivité fonctionnelle est principalement étudiée par IRM fonctionnelle : on parle de **rsfMRI**, pour *resting state fMRI*. Cependant, d'autres méthodes d'imagerie mesurant directement l'activité neuronale (et non pas seulement la réponse hémodynamique) sont également utiles afin de de s'assurer de l'origine neuronale, et non purement vasculaire, des fluctuations et des corrélations. Récemment, c'est l'imagerie optique calcique, imageant en parallèle les flux et les changements de concentration calcique dans les cellules, et notamment dans les neurones suite à leurs activations, qui a permis d'apporter une preuve supplémentaire de l'origine neuronale de la connectivité fonctionnelle (Ma et al. 2016).

L'étude de la connectivité fonctionnelle consiste à étudier les corrélations entre les fluctuations spontanées et basse fréquence (≈ 0.01 à 0.1 Hz) de l'activité cérébrale des différentes zones du cerveau au repos.

De nombreuses études en rsfMRI ont montré que le cerveau est organisé sous forme de « réseaux fonctionnels » (*resting state networks*). Chez les sujets sains, ces réseaux se retrouvent d'un individu à un autre de manière cohérente (Damoiseaux et al. 2006; Moussa et al. 2012) (**Figure V-1**). Au contraire, il a été montré que certains de ces réseaux fonctionnels sont perturbés chez des sujets présentant des maladies d'ordre neurologique comme la schizophrénie, la dépression ou la maladie d'Alzheimer par exemple (M. Greicius 2008). L'étude de la connectivité fonctionnelle est donc source de grands espoirs dans le domaine du diagnostic et du traitement de nombreuses maladies neuropsychiatriques. Il est alors intéressant de noter que cette organisation sous forme de réseaux fonctionnels a été retrouvée de manière assez similaire chez de nombreuses espèces, notamment chez le primate (Hutchison et al. 2011) et le rongeur (Jonckers et al. 2011; Lu et al. 2012; Sierakowiak et al. 2015), qui constituent des modèles de choix pour réaliser des études précliniques.

L'un des réseaux fonctionnels les plus étudiés actuellement en rsfMRI, notamment dans le cadre du diagnostic de pathologies neurologiques, est le **Default-Mode Network (DMN, ou réseau par défaut** en français) (M. D. Fox et al. 2005; Buckner, Andrews-Hanna, and Schacter 2008). Chez le sujet sain ce réseau est activé lorsque le cerveau est au repos et se désactive lorsque celui-ci s'engage dans la réalisation d'un comportement dirigé vers un but. Chez des sujets atteints d'autisme, il a été observé une non-diminution de l'activité du DMN lors d'une tâche cognitive (Kennedy, Redcay, and Courchesne 2006), tandis qu'une hyperactivité du DMN a été observée chez des sujets atteints de schizophrénie (Whitfield-Gabrieli et al. 2009). Ce réseau se compose de nombreuses régions cérébrales dont certaines parties du cortex préfrontal médian, du cortex cingulaire postérieur, du précuneus, ou encore des parties du lobe temporal médian... des régions déjà connues pour être plus actives lors de l'évocation de souvenirs personnels, de projection dans des situations futures ou encore lors de la compréhension du point de vue des autres.

Un réseau homologue au DMN, d'un point de vue anatomique, a été détecté par IRMf chez les rongeurs, notamment chez le rat anesthésié mais aussi chez des rats éveillés et restreints (Upadhyay et al. 2011; Lu et al. 2012; Sierakowiak et al. 2015) et plus récemment chez la souris anesthésiée (Sforazzini et al. 2014; Stafford et al. 2014). Cependant, à notre connaissance, ce réseau n'a pas encore été étudié chez la souris éveillée et la désactivation du DMN suite à la réalisation d'une tâche n'a pas été démontrée formellement chez les rongeurs.

Le cerveau au repos est organisé sous forme de réseaux fonctionnels. L'étude de ces réseaux et en particulier du mode par défaut (DMN), peut apporter de précieuses informations sur certaines pathologies neurologiques ou psychiatriques.

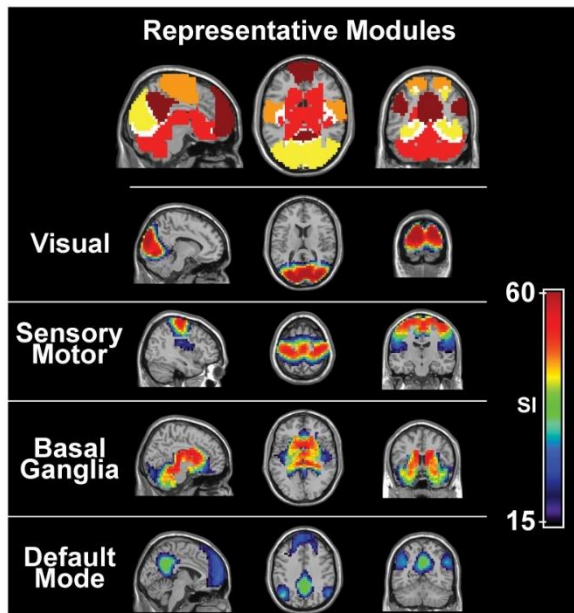


Figure V-1 : Figure extraite de Moussa et al. (2012). Quatre réseaux fonctionnels retrouvés de façon systématique chez les sujets testés (étude réalisée sur 194 sujets).

V.1.2. Acquisition et post-traitement classiques des données acquises par rsfMRI

Une acquisition classique de type *resting state* consiste donc à acquérir les signaux émis spontanément par les différentes zones du cerveau au cours du temps lorsque le sujet ne fait rien de particulier (aucune tâche cognitive, aucun stimulus...). Il est assez simple lors d'études réalisées sur l'être humain de demander aux sujets de ne pas bouger et de ne rien faire de particulier, cependant cela est plus compliqué dans le cadre d'expérimentations animales, notamment chez les rongeurs. Les fluctuations spontanées restant présentes durant le sommeil et sous anesthésie générale, la plupart des études de connectivité fonctionnelle faites chez le rongeur en IRMf sont donc réalisées sur des animaux anesthésiés. En pratique l'acquisition est donc relativement simple : typiquement **une image cérébrale** est enregistrée **toutes les 2 secondes maximum** sur une durée de **5 à 12 minutes**, ceci afin d'échantillonner correctement les signaux basse fréquence d'intérêt (0.01 – 0.1 Hz).

Le post-traitement de ces données peut se faire de nombreuses façons (D. S. Margulies et al. 2010; Jonckers et al. 2015) mais on peut distinguer deux grands groupes de méthodes :

- Les méthodes ne faisant aucun *a priori* sur la position des différentes régions fonctionnelles : décomposition par ICA par exemple (*Independent Component Analysis*, décomposition en composantes indépendantes) (**Figure V-2 (a)**)
- Les méthodes nécessitant *a priori* une connaissance spatiale des différentes zones cérébrales : méthodes par « *seed-based* », « *voxel-based* » ou par **ROI** (*Region Of Interest*)... (**Figure V-2 (b)-(c)**)

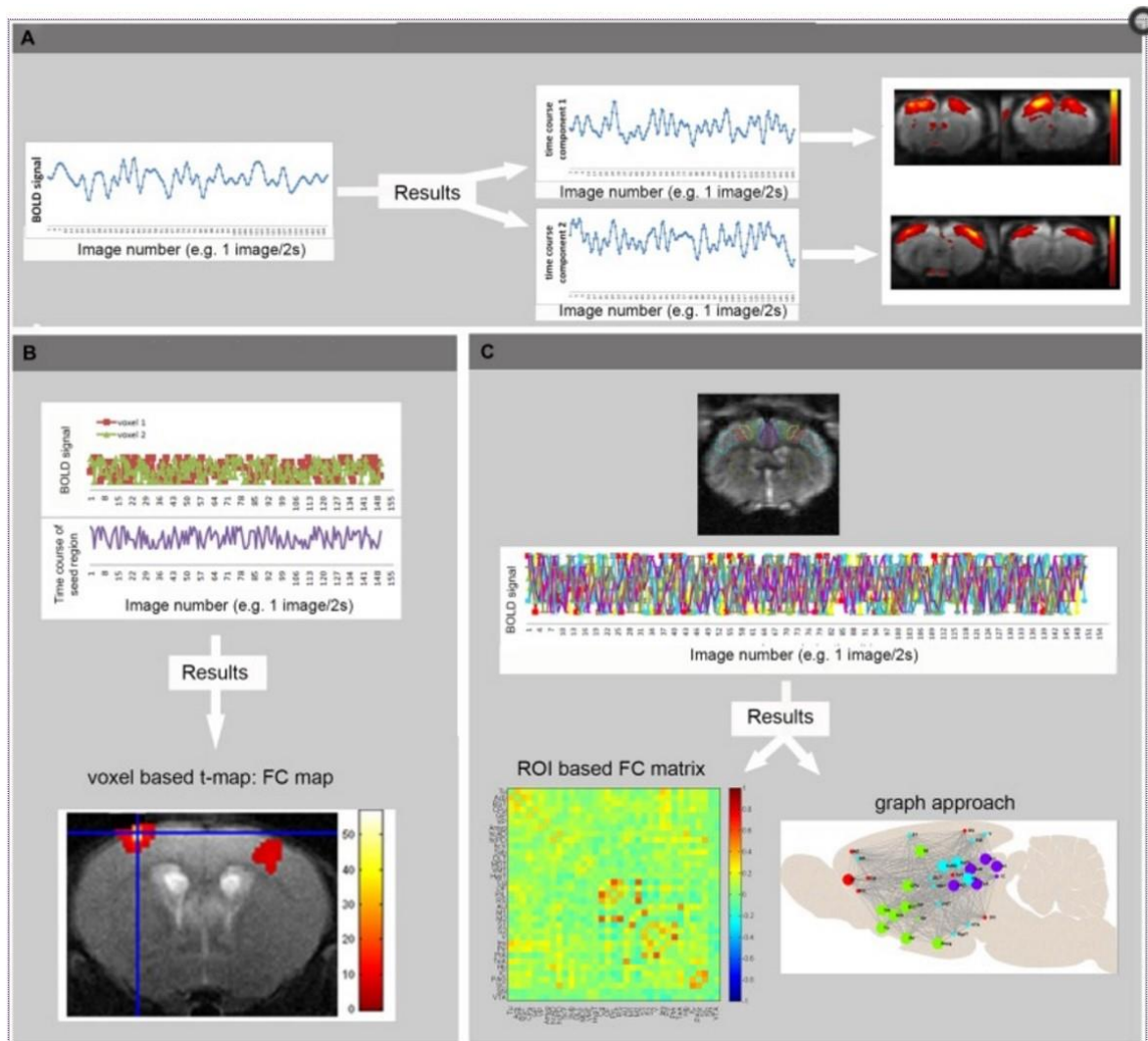


Figure V-2 : Figure extraite de Jonckers et al. (2015). (a) Analyse par ICA : chaque composante ICA contient les régions du cerveau qui ont des signaux BOLD temporellement corrélés, c'est-à-dire que les voxels regroupés ensemble dans une des composantes représentent des régions connectées fonctionnellement. (b) « Voxel-based analysis » : le signal temporel est extrait et moyenné dans une zone spécifique de l'image, puis il est comparé au signal temporel de chaque autre voxel de l'image. Le résultat est présenté sous forme de carte de connectivité fonctionnelle. (c) Analyse par ROI : le signal temporel moyen est calculé dans différentes régions d'intérêt (ROIs) définies à l'aide d'un Atlas, puis tous les signaux obtenus sont comparés entre eux. Le niveau de corrélation entre les différentes paires de ROIs est représenté sous forme d'une matrice de connectivité (ici les couleurs chaudes représentent les corrélations les plus fortes, les couleurs froides des anti-corrélations).

V.1.3. Vers l'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris éveillée par imagerie fUS

Jusqu'à présent, l'étude de la connectivité fonctionnelle chez le petit animal est surtout réalisée par IRMf, chez des rats anesthésiés. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre

précédent (IV.1), malgré un véritable enjeu, les acquisitions par IRMf sur animaux éveillés, et d'autant plus sur des souris éveillées, sont difficiles à mettre en œuvre. De plus, l'IRMf souffre d'autres limites telles qu'une cadence d'imagerie limitée, un coût élevé, une non-portabilité, la nécessité d'un fort champ magnétique pour obtenir une résolution spatiale pertinente pour la souris, mais aussi la nécessité d'utiliser des appareils et des matériaux compatibles avec ce champ magnétique.

Devant l'intérêt grandissant que portent les neurobiologistes à l'étude de la connectivité fonctionnelle, il est important de continuer de développer d'autres méthodes d'imagerie cérébrale comblant les faiblesses actuelles de l'IRMf et pouvant se positionner comme de véritables alternatives à celle-ci.

En 2014, l'Institut Langevin a démontré que le fUS permettait d'étudier la connectivité fonctionnelle chez des **rats anesthésiés**, après une procédure chirurgicale permettant d'**amincir l'os du crâne**, avec une résolution spatiale et temporelle de meilleure qualité que l'IRMf (Osmanski et al. 2014). Pour cela, les rats (dont le crâne avait été préalablement aminci sur une fenêtre de quelques millimètres de largeur) ont été anesthésiés par un mélange de Kétamine et de Médétomidine et imagés 2h après l'induction de l'anesthésie afin d'observer des réseaux de connectivité fonctionnelle stables et reproductibles. Deux types de séquences ultrasonores ont été utilisés pour ces acquisitions. Une première séquence permettait d'acquérir des images Doppler sur toute la profondeur du cerveau du rat mais en atteignant seulement une cadence d'imagerie d'une image Doppler toutes les 2 secondes. Une seconde séquence, dite « continue », permettait d'acquérir des images en continu mais seulement sur quelques millimètres de profondeur en surface (dans le néocortex). Ces limitations étaient dues aux performances de calcul, et en particulier des durées de *beamforming* des échographes à ce moment-là. La première séquence a permis de mettre en évidence des réseaux de connectivité fonctionnelle entre différentes aires cérébrales corticales et sous corticales, la deuxième séquence a permis quant à elle de démontrer que les matrices de connectivité fonctionnelle acquises grâce au fUS n'étaient pas perturbées par le bruit physiologique haute fréquence, notamment par la pulsativité cardiaque (autour de 7 Hz). Deux types de post-traitements ont été utilisés. Le premier post-traitement de type « *seed-based* », consistait à délimiter des **ROIs** dans le plan d'acquisition (en s'aidant de l'Atlas Paxinos) (**Figure V-3 (a)**) et regarder les corrélations temporelles des fluctuations spontanées entre ces différentes zones (**Figure V-3 (b)-(c)-(d)**). Les résultats sont alors présentés soit sous forme de **matrices de corrélation** (**Figure V-3 (e)**), soit sous forme de schémas de l'atlas dont les différentes ROIs sont colorées en fonction du niveau de corrélation avec une ROI donnée (**Figure V-3 (f)**). Le deuxième post-traitement utilisé se rapproche plus d'une méthode par ICA (*Indépendant*

Composant Analysis) et consiste à utiliser la **SVD** (*Singular Value Decomposition*, ou décomposition en valeurs singulières en français). La SVD sépare les données fUS en variables spatiales et temporelles séparables. Les différents « modes » obtenus par la décomposition sont classés par énergie décroissante et l'ensemble des pixels d'un mode spatial donné varie selon le même signal temporel (**Figure V-3 (g)**). Cette technique a l'avantage de retrouver des zones cérébrales dont les fluctuations sont corrélées sans faire d'*a priori* spatial puisqu'aucune ROI n'est préalablement délimitée. Cependant, l'interprétation des résultats en termes de niveau de corrélation reste complexe. En effet on peut remarquer que certaines ROIs qui apparaissent anti-corrélées dans un mode peuvent

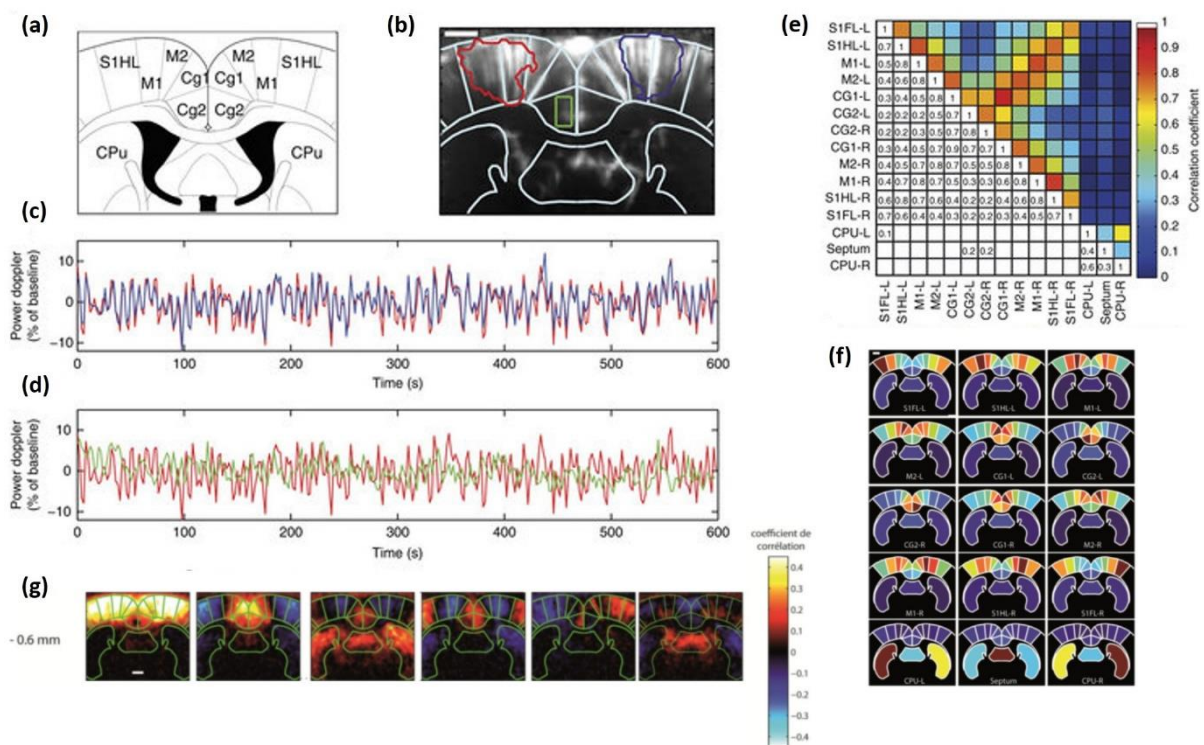


Figure V-3 : Utilisation du fUS pour étudier la connectivité fonctionnelle chez le rat anesthésié. Figure adaptée de l'article Osmanski et al (2014). (a) Schéma des régions fonctionnelles présentes dans le plan coronal de coordonnées bregma -0.6 mm chez le rat. (b) Sélection de deux régions d'intérêt partageant la même fonction (en rouge et bleu) pour la partie gauche et la partie droite du corps, et d'une région fonctionnelle sans lien fonctionnel avec les deux précédentes (en vert). (c-d) Variations spontanées du Power Doppler dans les zones précédemment choisies : les deux zones symétriques ayant un lien fonctionnel présentent des signaux fortement corrélés au cours du temps, tandis que deux zones ne partageant pas de lien fonctionnel ont des signaux très faiblement corrélés au repos. (e) Les niveaux de corrélations entre chaque paire de régions fonctionnelles peuvent être représentés sous la forme d'une matrice de corrélation : les plus fortes corrélations se retrouvent sur l'anti-diagonale de la matrice, ce qui correspond à toutes les corrélations gauche-droite entre des zones symétriques partageant la même fonction. (f) Autre façon de représenter les corrélations de la matrice de corrélation : chaque sous-figure correspond à une ligne de la matrice de corrélation. (g) Modes spatiaux extraits grâce à l'utilisation de la SVD dans le même plan coronal. L'article parle de « modes globaux » car ils ont été obtenus à partir de l'analyse des données de 6 rats différents afin d'extraire des modes reproductibles inter-animaux.

apparaître corrélées dans un autre. Le lien avec les niveaux de corrélation apparaissant dans la matrice de corrélation n'est donc pas direct.

Le fUS a déjà permis d'étudier la connectivité fonctionnelle chez des rats anesthésiés dont le crâne avait été préalablement aminci (Osmanski et al. 2014). Peut-on transposer cette technique d'imagerie à l'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris, qu'elle soit anesthésiée ou éveillée, et de manière non invasive?

Dans les chapitres précédents de cette thèse, nous avons démontré la possibilité d'utiliser le fUS, de manière peu ou non invasive, pour imager le cerveau de la souris (un modèle animal de choix pour les études précliniques en neurosciences), mais aussi la possibilité de pouvoir s'affranchir de l'anesthésie grâce à la mise en place d'un montage expérimental et de séquences d'acquisitions spécifiques. Dans la suite logique de ces investigations, nous avons donc ensuite cherché à démontrer que l'imagerie fUS pouvait permettre également d'étudier la connectivité fonctionnelle chez des souris, qu'elles soient anesthésiées ou éveillées.

Notre recherche s'est décomposée en plusieurs problématiques. Dans un premier temps nous avons cherché à vérifier qu'il était possible, en nous appuyant sur le travail réalisé par Bruno Osmanski chez le rat anesthésié, d'étudier la connectivité fonctionnelle dans des conditions similaires chez le modèle souris de façon non invasive (**V.2**). Dans un deuxième temps, nous avons mis en place un montage et un protocole expérimental permettant d'imager la connectivité fonctionnelle dans le cerveau de la souris en condition d'éveil (**V.3**). Nous nous sommes ensuite interrogés sur la variation de la connectivité fonctionnelle chez la souris en fonction de l'état d'éveil de celle-ci. Enfin, quelques expériences préliminaires nous ont permis de faire un premier pas vers l'étude du réseau par défaut (*Default Mode Network*) en imagerie fUS chez la souris éveillée.

V.1.4. Légende des abréviations des structures fonctionnelles cérébrales étudiées dans ce chapitre

Amyg : *Amygdala* / Amygdale

Cpu : *Caudate Putamen* / Putamen et Noyau caudé

Hip : *Hippocampus* / Hippocampe

Hyp : *Hypothalamus*

Ins : *Insular cortex* / Cortex insulaire

LPtA/MPtA : *Lateral parietal and medial parietal association cortex* / Cortex associatif pariétal, latéral et médian

M1/M2 : *Primary and secondary cortex motor* / Cortex moteur primaire et secondaire

RSA/RSG : *Retrosplenial agranular and granular cortex* / Cortex rétrosplénial agranulaire et granulaire

S1BF : *Primary sensory cortex barrel field* / Cortex sensoriel primaire, zone des vibrisses

S1HL : *Primary sensory cortex hind limb* / Cortex sensoriel primaire, membres postérieurs

S1Tr : *Primary sensory cortex trunk region* / Cortex sensoriel primaire, tronc

S2 : *Secondary sensory cortex* / Cortex sensoriel secondaire

Thal : *Thalamus*

V.2. Preuve de concept : étude de la connectivité fonctionnelle grâce au fUS chez la souris anesthésiée de façon non invasive

V.2.1. Matériels et méthodes

Montage et protocole expérimental

Les résultats montrés dans cette sous-partie ont été obtenus sur une souris mâle C57Bl/6 âgée de 8 semaines (laboratoire Janvier, France). Au cours des acquisitions échographiques, la souris a été placée dans un appareil de stéréotaxie et maintenue sous anesthésie (1% d'isoflurane). Les images Doppler ont été acquises de manière transcrânienne, à travers le crâne intact de la souris, sans injection de produits de contraste ni chirurgie préalable (voir le chapitre III).

Les images ont été acquises à l'aide d'un scanner échographique ultrarapide de recherche (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) permettant d'utiliser Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA), et d'une sonde ultrasonore de fréquence centrale 15 MHz (128 éléments, pas de 0.110 mm, Vermon, Tours, France). Le montage expérimental est le même que celui présenté dans le chapitre III (**Figure III-1**). Ce système motorisé nous a permis de sélectionner le plan coronal d'intérêt de coordonnée antéropostérieure \approx Bregma -1 mm.

Les images de vascularisation Doppler présentées dans ce chapitre résultent de l'acquisition par recombinaison cohérente d'ondes planes, de 400 images recombinaisonnées acquises à 500 Hz et filtrées par SVD (Demene et al. 2015). Les ondes planes étaient inclinées avec les valeurs suivantes : [-10, -8, -6, -4, -2, 0, 2, 4, 6, 8, 10] °.

Pour les acquisitions fUS, une image Doppler a été acquise chaque seconde durant 10 minutes (chaque image Doppler étant obtenue à partir de 200 images recombinaisonnées acquises à 500 Hz grâce à l'insonification de 5 ondes planes inclinées avec les angles [-4, -2, 0, 2, 4]°). Ici, il n'a pas été nécessaire d'apodiser les bords de l'image en émission et en réception comme dans le chapitre précédent (chapitre IV) car les artéfacts musculaires qui nous gênent pour les acquisitions fUS sur souris éveillées ne sont pas présents lorsque la souris est anesthésiée.

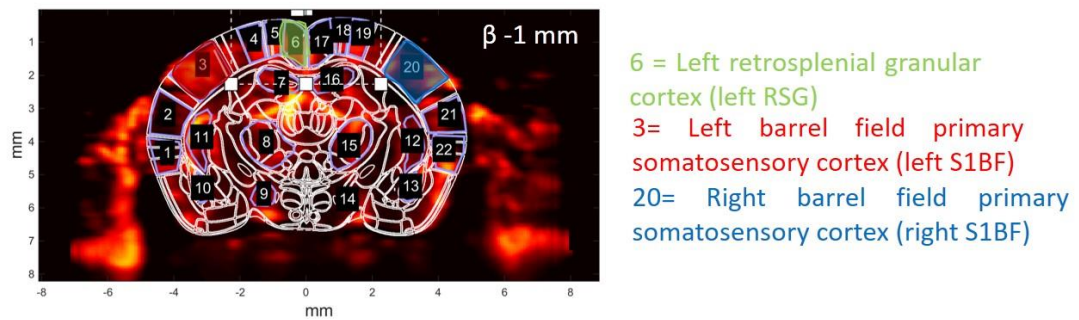
Post-traitement des données : analyse par ROIs et obtention de matrices de connectivité

Nous avons sélectionné plusieurs ROIs, numérotée de 1 à 22, dans le plan coronal de coordonnée antéropostérieure Bregma ≈ -1 mm, de manière symétrique dans les hémisphères gauche et droit (**Figure V-4 (a)**). Dans chaque ROI_(i) nous avons calculé le décours temporel du signal $\alpha_{ROI(i)}(t)$, moyenné spatialement sur les différents pixels contenus dans la ROI_(i) considérée (**Figure V-4 (b)**). Le signal ainsi obtenu a ensuite été filtré temporellement sur la bande de fréquence de fréquence [0.05 – 0.2] Hz, en suivant le post-traitement qui avait été utilisé dans notre laboratoire chez le rat anesthésié (Osmanski et al. 2014). Nous avons ensuite calculé le coefficient de corrélation r de ce signal temporel avec le signal temporel de chacune des autres ROIs contenues dans notre plan d'imagerie. Le niveau de corrélation calculé pour chaque paire de ROIs a ensuite été représenté dans une matrice de connectivité (**Figure V-5**). Dans une telle matrice, chaque ligne et chaque colonne est associée à une ROI donnée et chaque pixel représente donc un niveau de corrélation entre deux ROIs données.

V.2.2. Résultats

Nous avons enregistré pendant 10 minutes l'activité spontanée dans le plan coronal de coordonnée \approx Bregma -1 mm. La **Figure V-4 (b)** compare les variations temporelles d'activité de trois ROIs. Les ROIs numérotées 3 et 20 correspondent à la zone fonctionnelle S1BF, c'est-à-dire deux régions du cortex qui sont activées lorsque les vibrisses (les moustaches) de la souris sont stimulées. La zone 3, située dans l'hémisphère gauche, correspond aux vibrisses droites de la souris, tandis que la zone 20, située dans l'hémisphère droit, correspond aux vibrisses gauches. Ces deux régions controlatérales sont interconnectées anatomiquement par des projections axonales passant par le corps calleux. Elles sont donc connectées à la fois fonctionnellement et anatomiquement. La **Figure V-4 (b)** (courbes bleue et rouge) montre que les fluctuations temporelles spontanées de leur activité vasculaire sont fortement corrélées ($r = 0.88$). Cependant, toutes les régions imagées ne présentent pas des fluctuations vasculaires spontanées aussi bien corrélées. Les fluctuations observées dans la ROI n°6 correspondant au cortex rétrospécial (**Figure V-4 (b)**, courbe verte) ne sont pas corrélées avec celle du cortex S1BF (**Figure V-4 (b)**, courbe bleue).

(a)



(b)

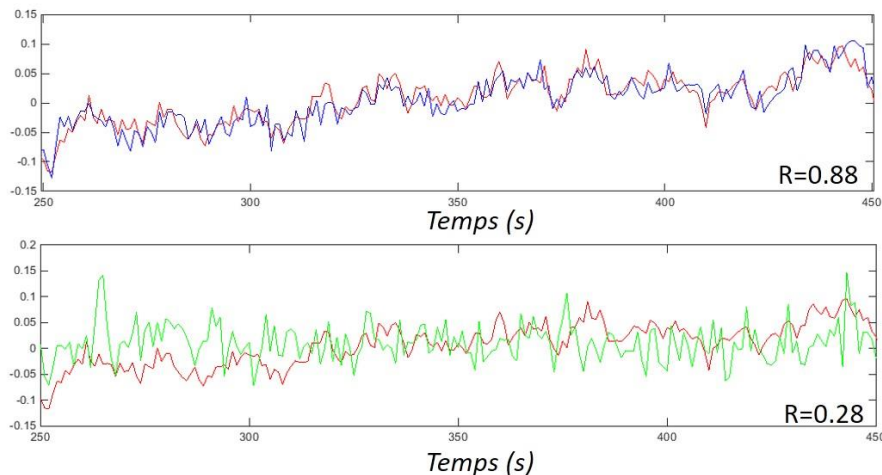
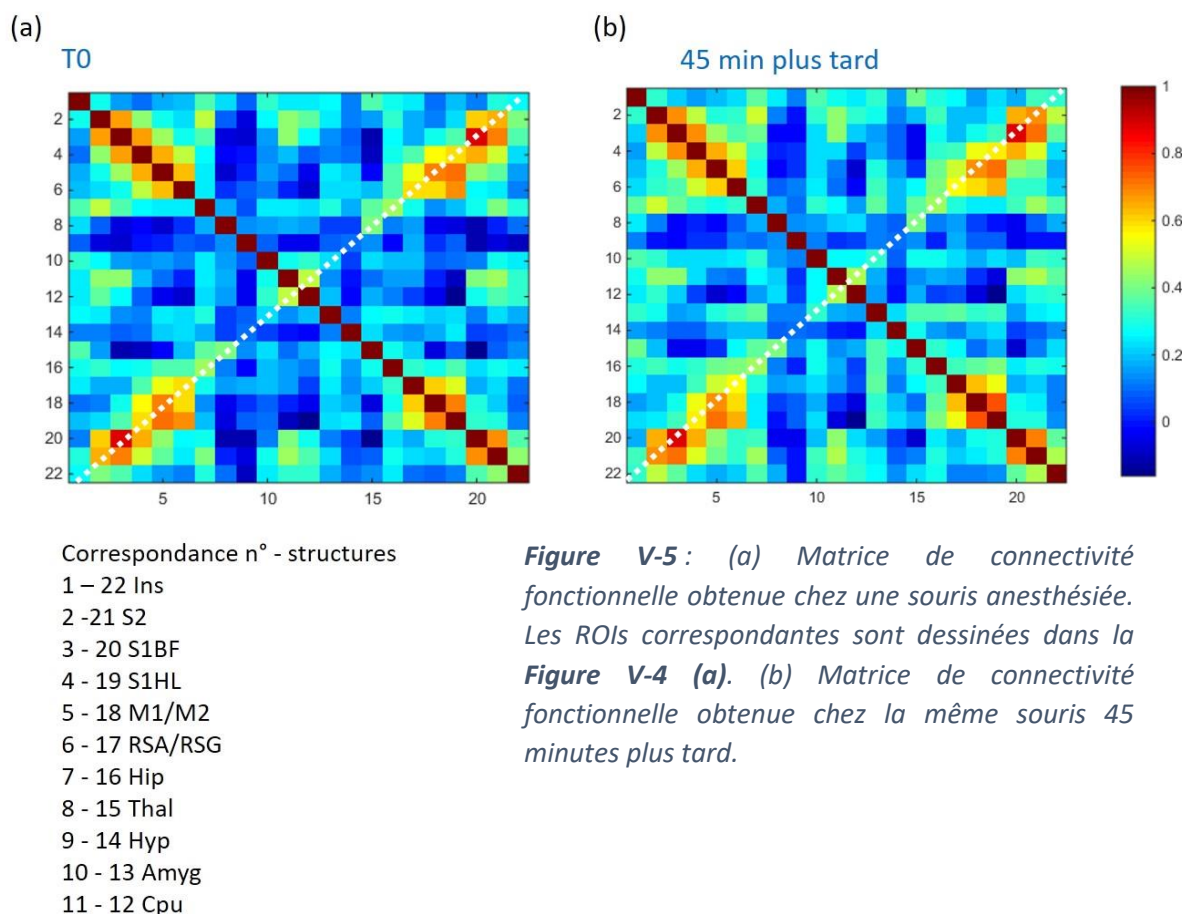


Figure V-4 : (a) Définition de 11 ROIs dans l'hémisphère gauche et de leurs symétriques dans l'hémisphère droit. La sélection est faite grâce à l'Atlas Paxinos : figure du plan coronal de coordonnée \approx Bregma -1 mm superposée à l'image Doppler correspondante. (b) Sélection de deux régions d'intérêt partageant la même fonction (ROI n°3 en rouge et ROI n°20 en bleu) pour la partie gauche et la partie droite du corps, et d'une région fonctionnelle sans lien fonctionnel avec les deux précédentes (ROI n°6, en vert) et affichage des variations spontanées du Power Doppler dans ces 3 ROIs. Les deux zones symétriques ayant un lien fonctionnel présentent des signaux fortement corrélés au cours du temps ($R=0.88$), tandis que deux zones ne partageant pas de lien fonctionnel ont des signaux très faiblement corrélés au repos ($R=0.28$).

Les valeurs de corrélations obtenues pour chaque paire de ROIs ont ensuite été reportées dans une matrice de connectivité fonctionnelle (**Figure V-5 (a)**). Les corrélations situées sur la première diagonale de la matrice sont tous égaux à 1 car ces corrélations correspondent à l'autocorrélation d'une ROI donnée avec elle-même. Les corrélations situées sur la deuxième diagonale correspondent à des zones fonctionnelles symétriques agissant de manière contralatérale (même fonction mais pour la partie gauche ou la partie droite du corps de la souris). On peut remarquer que ces corrélations gauche-droite dans la partie corticale du cerveau sont fortes. Dans le cortex on remarque aussi que les corrélations des fluctuations spontanées entre des ROIs proches spatialement et ayant un lien fonctionnel (par exemple ROI 2 et ROI 3 qui appartiennent toutes les deux au cortex sensoriel) sont fortes. Au contraire, d'autres ROIs proches spatialement mais ne partageant *a priori* pas de fonction commune (par exemple les ROIs 2 et 11, cortex sensoriel et putamen caudé), ne sont pas corrélées.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés grâce au fUS chez le rat anesthésié (Osmanski et al. 2014).

On peut remarquer la reproductibilité de la matrice de connectivité fonctionnelle obtenue chez la même souris 45 min plus tard (**Figure V-5 (b)**).



En conclusion, dans un premier temps nous avons vérifié qu'il était possible de répliquer de façon **non invasive** chez des **souris anesthésiées** les résultats qui avaient été obtenus précédemment au laboratoire grâce au fUS chez des rats anesthésiés avec crâne aminci. En effet, il a été possible d'obtenir des matrices de connectivité fonctionnelle présentant des motifs de corrélation (corrélations corticales gauche-droite notamment) en accord avec la théorie.

Dans la partie suivante, nous avons cherché à montrer qu'il était possible d'étudier la connectivité fonctionnelle grâce au fUS chez des souris éveillées. Nous avons cherché également à voir si le fUS nous permettait de mettre en évidence des variations de cette connectivité fonctionnelle en fonction de l'état de conscience des souris : pour cela nous avons fait varier le niveau d'éveil des souris par injection de différentes doses de Domitor® (Médétomidine). Enfin, nous présentons également quelques résultats préliminaires portant sur l'étude de la désactivation de zones fonctionnelles appartenant au DMN lors d'une tâche.

Le fUS permet d'étudier la connectivité fonctionnelle chez des souris anesthésiées, de manière non invasive. Qu'en est-il de l'utilisation du fUS pour l'étude de la connectivité chez des souris éveillées ? Peut-on mesurer des variations de cette connectivité fonctionnelle ?

V.3. Etude de la connectivité fonctionnelle chez la souris dans différents états d'éveil

V.3.1. Montage et protocole expérimental

Choix du montage expérimental : souris éveillées librement mobiles ou avec tête fixée ?

Nous avons démontré dans le chapitre précédent (chapitre IV) qu'il était possible de faire de l'imagerie fUS sur souris éveillée et librement mobile. Nous avons en effet mis en évidence l'activation de la zone corticale S1BF suite à des stimulations des vibrisses des souris. Pour cela le post-traitement consiste à corrélérer un schéma de stimulation connu (une succession de « ON » et de « OFF ») avec le signal Doppler du plan coronal imagé au cours du temps et à regarder les zones de l'image pour lesquelles la corrélation est supérieure à N fois le niveau du bruit (typiquement $N=2$ ou 3). Dans le cas de l'étude de la connectivité fonctionnelle, l'animal est laissé dans un état dit de « *resting state* » qui correspond à un état de « non-stimulation ». Il n'y a donc pas de profil de stimulation à corrélérer avec le signal Doppler au cours du temps. On recherche ici des corrélations au niveau des fluctuations temporelles présentes dans le signal Doppler au niveau de différentes zones de l'image. Ces fluctuations sont plus faibles que l'augmentation observée lors de l'activation de la zone fonctionnelle après stimulation, et elles sont inconnues *a priori* (pas de profil de fluctuation type ON/OFF attendu comme dans le cas des stimulations). C'est pourquoi l'étude de la connectivité fonctionnelle est plus sensible au bruit que l'étude de l'activation d'une zone fonctionnelle suite à un stimulus. Dans le but de nous mettre dans des conditions expérimentales les plus favorables possibles, limitant les artéfacts de mouvement, nous avons opté pour un montage expérimental dans lequel les souris pouvaient être éveillées, tout en ayant la tête fixée. Ce genre de montage expérimental, très utilisé en imagerie optique et notamment en imagerie bi-photonique, permet aux souris de bouger en déplaçant une plateforme mobile, sans toutefois avancer et sans porter le poids de la sonde. La sonde est en effet fixée à l'aide de moteurs de translations directement au-dessus de la tête de la souris, sans la toucher, comme dans les expériences sur souris anesthésiées placées dans un cadre de stéréotaxie (**Figure V-6 (a)-b)**).

Un montage expérimental « tête fixée » permet de se placer dans les conditions expérimentales les plus favorables possibles pour limiter les artéfacts de mouvement et observer les faibles fluctuations vasculaires spontanées dans le cerveau des souris éveillées en ayant le moins de bruit possible.

Description du système expérimental choisi

Nous avons choisi le **système Mobile HomeCage™** mis au point et commercialisé très récemment (2014) par Neurotar (Helsinki, Finlande) (**Figure V-6 (a)-(b)**). Dans ce système la souris a la tête fixée à l'aide d'une **pince de fixation métallique** rigide permettant de tenir fermement une petite pièce métallique préalablement fixée sur son crâne. La hauteur de la pince de fixation est réglable et permet de l'ajuster de telle façon à ce que les pattes de la souris reposent normalement dans la cage. La **cage** dans laquelle se trouve la souris est une cage ronde de 180 mm de diamètre faite en fibres de carbone, matière très légère, lui permettant de flotter sur un coussin d'air. Ainsi, lorsque la souris bouge, la cage se déplace en conséquence, donnant à la souris l'impression de pouvoir explorer les différentes zones de la cage. Ce montage expérimental est plus particulièrement vendu pour faire de l'imagerie optique. Les petites pièces de fixation à fixer sur le crâne des souris sont donc adaptées pour ce genre d'imagerie par microscope et comportent une fenêtre d'imagerie circulaire et trop petite (typiquement entre 4 et 8 mm de diamètre). Nous avons donc dû recréer cette partie du montage expérimental afin que la pièce de fixation métallique à fixer sur la tête de la souris comporte une fenêtre d'imagerie en adéquation avec la taille de notre sonde ultrasonore et puisse rentrer parfaitement dans la pince de fixation métallique. C'est en respectant ces contraintes de taille que nous avons choisi la forme et les dimensions du **cadre métallique**. Ce cadre métallique est identique à celui présenté dans le **chapitre IV (Figure IV-5 (c1))**, permettant de réaliser également des expériences sur souris librement mobiles (rectangle de 12 mm par 23 mm, fenêtre d'imagerie de 6 mm par 21 mm). Cela nous a permis d'avoir une seule procédure d'implantation du cadre métallique sur le crâne des souris et d'imager ensuite les souris soit de manière librement mobile, soit dans le Mobile HomeCage™, en fonction de l'expérience à réaliser. Le design de la pièce a donc été choisi pour répondre aux contraintes du Mobile HomeCage™, tandis que son matériau (tôle d'acier galvanisé) a été choisi afin de permettre une fixation magnétique rapide avec le porte-sonde aimanté pour les expériences sur souris librement mobiles (**IV.2.1**). Ici encore, entre deux sessions d'expérience, le crâne de la souris est recouvert de Kwik-Cast™ (Phymep, France) afin de le protéger.

Le poids de la sonde n'étant plus une contrainte pour ce genre d'expérience puisque celle-ci n'est plus portée par la souris, nous avons utilisé une **sonde ultrasonore** ayant les mêmes paramètres physiques que celle utilisée pour les expériences sur souris librement mobiles mais dans une version

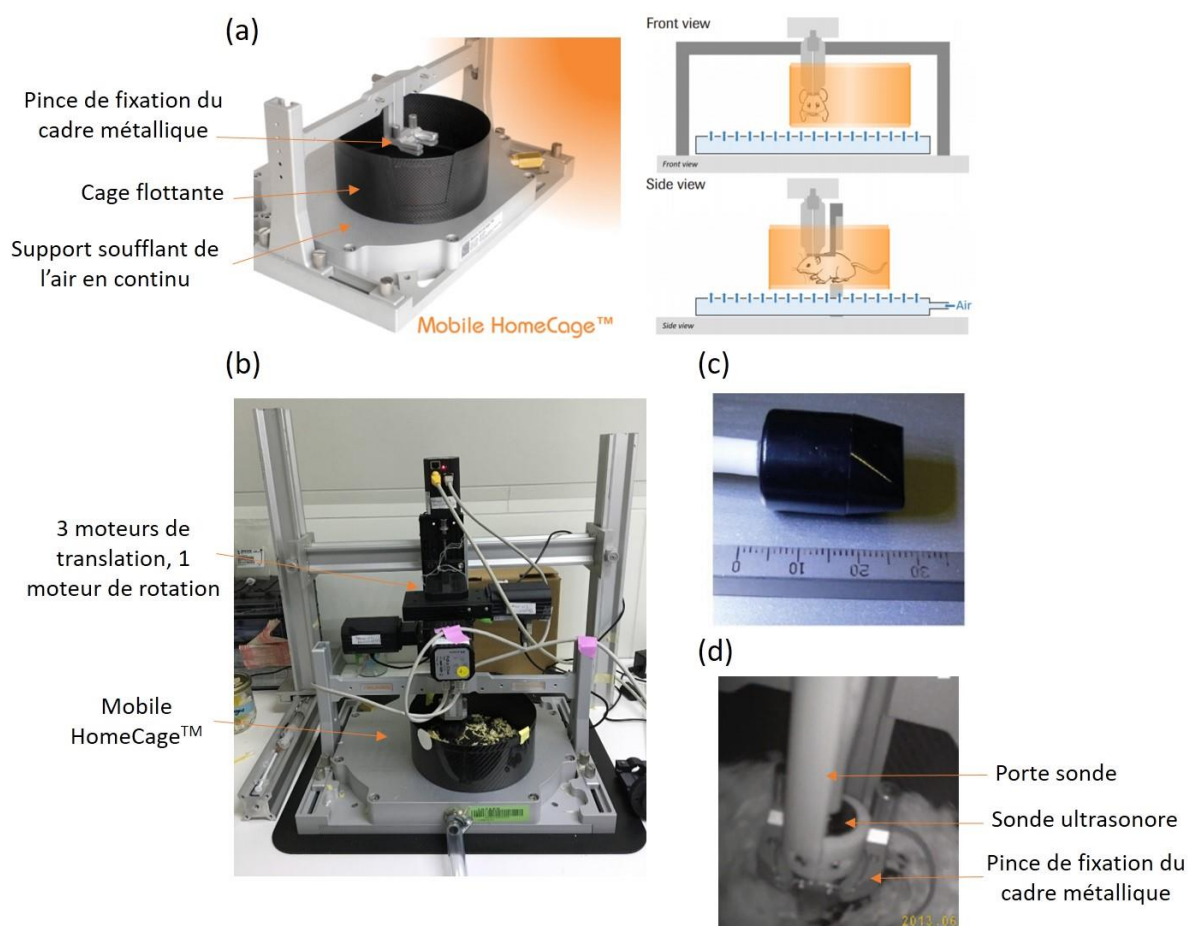


Figure V-6 : Montage expérimental utilisé pour l'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris dans différents états d'éveil. (a) Photographie et représentation schématique du Mobile HomeCage™, système permettant de réaliser des expériences sur souris éveillée avec tête fixée mais corps mobile. La tête de la souris est fixée à l'aide de la pince de fixation métallique, la cage flotte sur un coussin d'air. (Images extraites de la documentation sur le Mobile HomeCage disponible sur le site internet de Neurotar) (b) Montage expérimental complet : le Mobile HomeCage™ est surmontée d'un bloc moteur constitué de 3 moteurs de translation et un moteur de rotation. Ce bloc moteur supporte le porte-sonde et la sonde. (c) sonde ultrasonore utilisée pour ces expériences. (d) souris dans le Mobile HomeCage lors d'une acquisition.

moins légère (fréquence centrale de 15MHz, 128 éléments, pas de 0.110 mm, 8 mm de distance focale et 400 μm de largeur focale) (**Figure V-6 (c)**). Cette sonde est la même que celle utilisée pour les expériences sur rats éveillés (Sieu et al. 2015). Le **porte-sonde** a été dessiné par nos soins dans le logiciel Autodesk Inventor et fabriqué à l'aide d'une imprimante 3D (MakerBot) (**Figure V-6 (d)**). Enfin, une caméra à vision infrarouge (Mini Camera HD 1920x1080P) nous a permis de filmer la souris durant les expériences (**Figure V-6 (d)** : image obtenue grâce à la caméra durant une session expérimentale).

Nous nous sommes intéressés dans cette étude à trois problématiques principales :

- (1) Démontrer qu'il est possible d'étudier la connectivité fonctionnelle chez des souris éveillées par imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS).
- (2) Démontrer que l'imagerie fUS est un outil permettant de détecter des variations de connectivité fonctionnelle (ceci afin d'aller vers l'étude de modèles pharmacologiques notamment...).
- (3) Tenter de mettre en évidence la désactivation de certaines zones appartenant au *Default Mode Network* (DMN) lors d'un stimulus, notamment sur souris éveillée.

Notre problématique première était donc de démontrer qu'il était possible d'étudier la connectivité fonctionnelle chez des souris éveillées par imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) mais nous cherchions également un moyen de faire varier cette connectivité fonctionnelle afin de montrer que le fUS nous permettait de détecter ces variations. Nous avons donc décidé d'étudier la connectivité fonctionnelle en comparant « **éveil** vs **sédation** ». L'ajout d'un état intermédiaire dit de « **faible sédation** » (ou état « sub-anesthésique ») nous a permis d'étudier un état cérébral dans lequel les souris seraient proches de l'état d'éveil mais tout en étant immobiles, c'est-à-dire un état dans lequel les artéfacts de mouvement seraient de fait fortement réduits voire inexistant. Les souris ont été séditées par injection de Domitor® (Médétomidine) (Scheinin et al. 1987). L'avantage de ce sédatif est que son effet peut être inversé par injection d'Antisédan® (Atipamézole). Nous avons ainsi pu introduire dans notre protocole un 4^{ème} état : l'état dit de « **réveil** », suite à l'injection d'Antisédan®. Le schéma du protocole expérimental suivi est présenté dans la **Figure V-7 (a)**. Les doses de Domitor® à injecter ont été choisies après une étude bibliographique de ce qui avait été fait en IRMf dans le cadre de l'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris (Jonckers et al. 2011, Shah et al. 2013, Nasrallah, Tay, and Chuang 2014, Grandjean et al. 2014).

Dans chaque état, deux types d'acquisitions ont été faites : des acquisitions de type « *resting state* » (RS, 10 minutes) durant lesquelles les souris ne sont pas stimulées (**Figure V-7 (b)**) et des acquisitions de type « stimulation » (STIM, 10 minutes) durant lesquelles les vibrisses droites des souris ont été stimulées manuellement avec un coton-tige (5-7 Hz, 1 cm d'amplitude) (**Figure V-7 (c)**). Cet enchaînement d'acquisitions (RS + STIM, 20 minutes) a été répété 2 ou 3 fois suivant l'état de la souris afin de récolter suffisamment de données exploitables. Les acquisitions de type STIM ont été faites pour répondre à la troisième problématique.

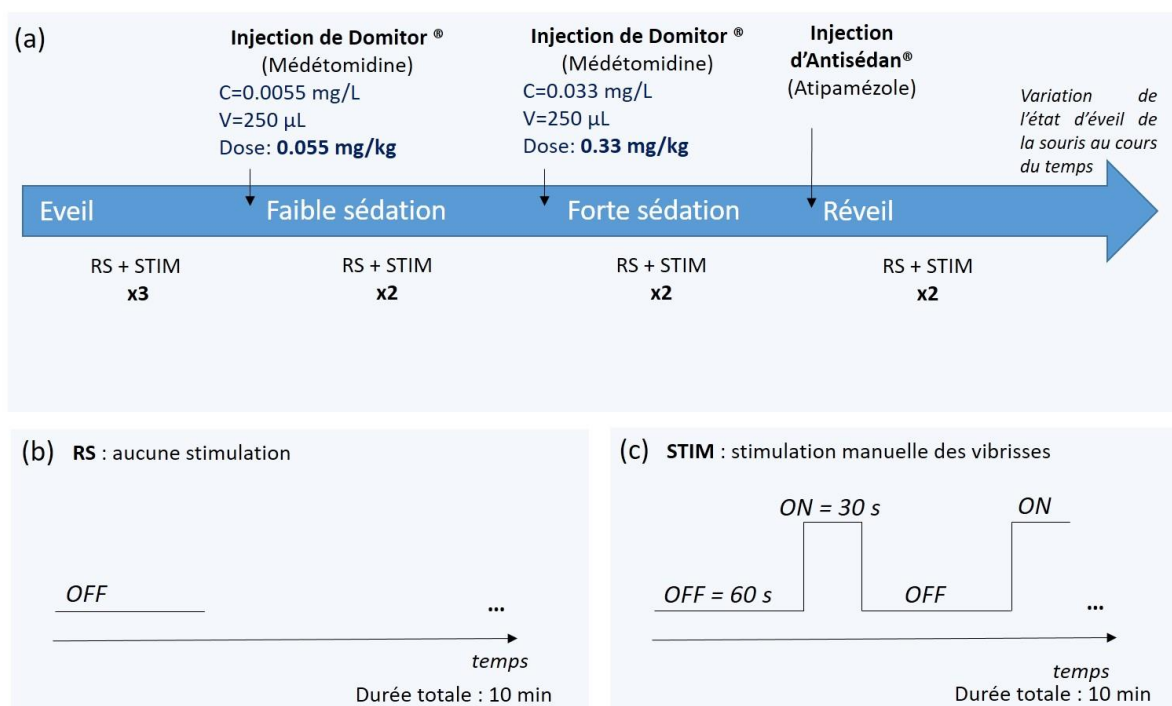


Figure V-7 : Protocole expérimental suivi pour étudier la connectivité fonctionnelle chez la souris dans différents états d'éveil. (a) La souris passe d'un état d'éveil à un état de « faible sédation » après injection d'une faible dose de Domitor® (0.055 mg/kg). Puis une plus forte dose de Domitor® (6 fois plus grande, 0.33 mg/kg) est injectée pour mettre la souris dans un état de « forte sédation ». Enfin l'Antisédan® est injecté à la souris pour annuler l'effet du Domitor® et la réveiller. Dans chaque état, une acquisition de type Resting State (RS) (b) est tout de suite suivie d'une acquisition de type Stimulation (STIM) (c) et cet enchaînement d'acquisition est répété 2 ou 3 fois suivant l'état d'éveil afin d'acquérir suffisamment de données exploitables.

Respect de la réglementation

Les souris ont été hébergées 4 par cage, dans un environnement contrôlé (22°C ± 2°C; 50% d'humidité relative, cycle d'obscurité-lumière de 12h/12h) avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Pour minimiser le stress au cours de la procédure expérimentale, elles ont bénéficié d'une période d'acclimatation de 7 jours après leur arrivée dans l'animalerie. Toutes les souris ont reçu des soins humains 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 (n°59, C2EA -59, « Paris Centre et Sud ») et a reçu le numéro de protocole APAFIS#3323-2015122411279178_v3-3.

Préparation des souris et procédure d'habituation

Les expériences dont les résultats sont présentés dans ce chapitre ont été réalisées sur N=9 souris C57BL/6 mâles (Janvier Labs, Le Genest St Isle, France), âgées de 8 semaines au début des expériences. Quelques jours avant la chirurgie d'implantation du cadre métallique sur le crâne, les souris ont été habituées à la préhension par l'expérimentateur ainsi qu'à la salle d'imagerie.

L'implantation du cadre métallique sur le crâne des souris a été réalisée en suivant exactement la même procédure expérimentale que celle présentée dans le chapitre IV (IV.2.1 *Préparation des animaux*). Contrairement aux expériences sur souris librement mobiles, une **procédure d'habituation de plusieurs jours** a dû être suivie pour habituer les souris au système du Mobile HomeCage™ et limiter leur stress dans l'appareil. Trois jours après la chirurgie, les souris ont été progressivement habituées aux conditions d'expérimentation, selon le protocole suivant (Kislin et al. 2014)) : le premier jour, les souris sont uniquement habituées à la préhension ainsi qu'à la contention dans un morceau de tissu (le tissu est enroulé fermement autour du corps de la souris, laissant la tête et le cadre métallique dépasser du tissu). Cette étape est répétée plusieurs fois jusqu'à ce que les souris soient calmes et ne manifestent aucun comportement aversif pendant la contention. Le lendemain, les souris sont entraînées dans le Mobile HomeCage™. Une fois le dispositif connecté au flux d'air permettant la flottaison de la cage (environ 5 bar et 300 L/min), les souris sont enroulées dans le tissu, le cadre métallique est inséré dans la pince de fixation du Mobile HomeCage™ et sécurisé à l'aide des vis. L'animal est ensuite libéré du morceau de tissu et laissé dans le Mobile HomeCage™ pendant 10 min. Cette opération est répétée 2 à 3 fois par jour, en augmentant progressivement le temps passé dans le Mobile HomeCage™ (par pas de 10 min) jusqu'à atteindre une durée totale d'une heure. Cette période d'entraînement dure généralement 4 jours. Les cadres métalliques ont ainsi été implantés sur le crâne des souris au jour J0 et les acquisitions ont été faites à J+8 ou J+9.

Le jour des acquisitions les souris ont été légèrement anesthésiées par inhalation d'isoflurane, la protection de Kwik-Cast™ a été retirée et le crâne a été nettoyé avec une solution saline. Un gel échographique a été appliqué dans la fenêtre d'imagerie. Les souris ont été placées dans le système Mobile HomeCage™ de la même façon que lors des procédures d'habituation. La sonde ultrasonore a été positionnée à l'aide du système de moteur au-dessus du plan coronal choisi.

Séquences d'acquisition ultrasonore

Nous avons utilisé les mêmes séquences d'acquisition ultrasonores que celles présentées dans le chapitre IV. Les images vasculaires ont donc été obtenues en utilisant la technique d'imagerie Doppler ultrarapide par recombinaison cohérente (Bercoff et al. 2011) et un filtrage spatio-temporel par décomposition en valeurs singulières (SVD) (Demene et al. 2015). Les images vasculaires Doppler résultent de l'acquisition de 400 images recombinaison acquises à 500 Hz, avec une insonification par 11 ondes planes inclinées selon les angles suivants : [-10, -8, -6, -4, -2, 0, 2, 4, 6, 8, 10] °. Les acquisitions d'imagerie fonctionnelle (RS ou STIM) consistent en l'acquisition d'une image Doppler chaque seconde pendant une durée totale de 10 minutes. Chaque image Doppler est formée à partir de 200 images recombinaison acquises à 500 Hz grâce à l'insonification par 5 ondes planes inclinées selon les angles [-

4, -2, 0, 2, 4]°. Ici aussi, comme dans le chapitre IV, afin de supprimer l'artéfact provenant des mouvements des muscles temporaux chez les souris éveillées, nous avons utilisé la séquence d'insonification améliorée par **apodisation en transmission et réception**, présentée dans la partie IV.2.2. Nous avons utilisé exactement les mêmes séquences d'acquisitions quel que soit l'état d'éveil des souris.

V.3.2. La connectivité fonctionnelle sur souris éveillées : optimisation du post-traitement

Dans cette partie nous allons revenir sur les difficultés rencontrées lors de la mise en place des acquisitions de connectivité fonctionnelle sur souris éveillées et les solutions trouvées pour les surmonter. Cela nous permettra d'expliquer clairement le post-traitement final qui a été choisi et utilisé pour obtenir les résultats présentés dans ce chapitre.

Une optimisation du post-traitement classique est nécessaire pour les acquisitions sur souris éveillées car des contraintes supplémentaires sont à prendre en compte (comportement imprévisible, artéfacts de mouvement...)

Optimisation et sélection des plages temporelles de données exploitables

Les souris en état d'éveil placées dans le Mobile HomeCage™ ne sont pas contraintes comme le sont généralement les rongeurs éveillés dans les études d'IRMf. Elles n'ont en effet que leur tête fixée et peuvent bouger leurs pattes afin de déplacer la cage qui se trouve sous elles et avoir ainsi l'impression de se déplacer dans l'environnement qui les entoure. Par conséquent, durant les 10 minutes que dure une acquisition fUS de connectivité fonctionnelle, une partie des données est acquise lorsque l'animal est immobile, mais une part non négligeable des données (variable d'une souris à l'autre) est acquise alors que la souris se déplace. Les données qui nous intéressent dans le cadre de l'étude de la connectivité fonctionnelle sont celles correspondant à des plages où la souris est « **calme et immobile** » pour se rapprocher le plus possible de ce qui est fait en IRMf chez l'humain, à qui l'on demande de ne pas bouger et de rester calme, dans un état dit de « *resting state* ». De plus la sélection de plages d'acquisition où la souris est immobile nous permet de garder les signaux risquant le moins de présenter des artéfacts de mouvement, ce qui est aussi un avantage non négligeable pour l'observation des faibles fluctuations spontanées que l'on cherche à observer.

La première question a donc été de savoir si l'on pouvait ou non construire une matrice de connectivité fonctionnelle, non plus à partir de 10 minutes d'acquisition consécutives de « pur *resting*

state » (comme chez l'animal anesthésié par exemple), mais à partir de morceaux d'acquisition plus ou moins longs, correspondant aux plages où la souris est « calme et immobile ». Pour répondre à cette question nous nous sommes appuyés sur la littérature et sur quelques expériences préliminaires.

Nous avons tout d'abord utilisé des acquisitions de connectivité fonctionnelle obtenues chez la souris anesthésiée (résultats présentés dans la partie **V.2**) ou chez le rat anesthésié (Osmanski et al. 2014) et nous avons calculé la matrice de connectivité fonctionnelle qui aurait été obtenue si la durée d'acquisition avait été inférieure à 10 minutes. La **Figure V-8 (a)** met bien en évidence que plus la durée d'acquisition se rapproche de 600 s (10 minutes) plus la matrice ressemble à la matrice finale, ce qui est normal. On remarque cependant qu'à partir d'environ 200 s (soit environ 3 min) d'acquisition seulement le motif de connectivité de la matrice se stabilise. Ce résultat est aussi visible sur le graphique de la figure **Figure V-8 (b)** dans lequel nous avons affiché la différence moyenne entre la matrice obtenue à partir de x secondes d'acquisition et la matrice obtenue pour 600 s d'acquisition. Nous avons obtenu le même genre de résultat sur les données correspondant aux rats anesthésiés.

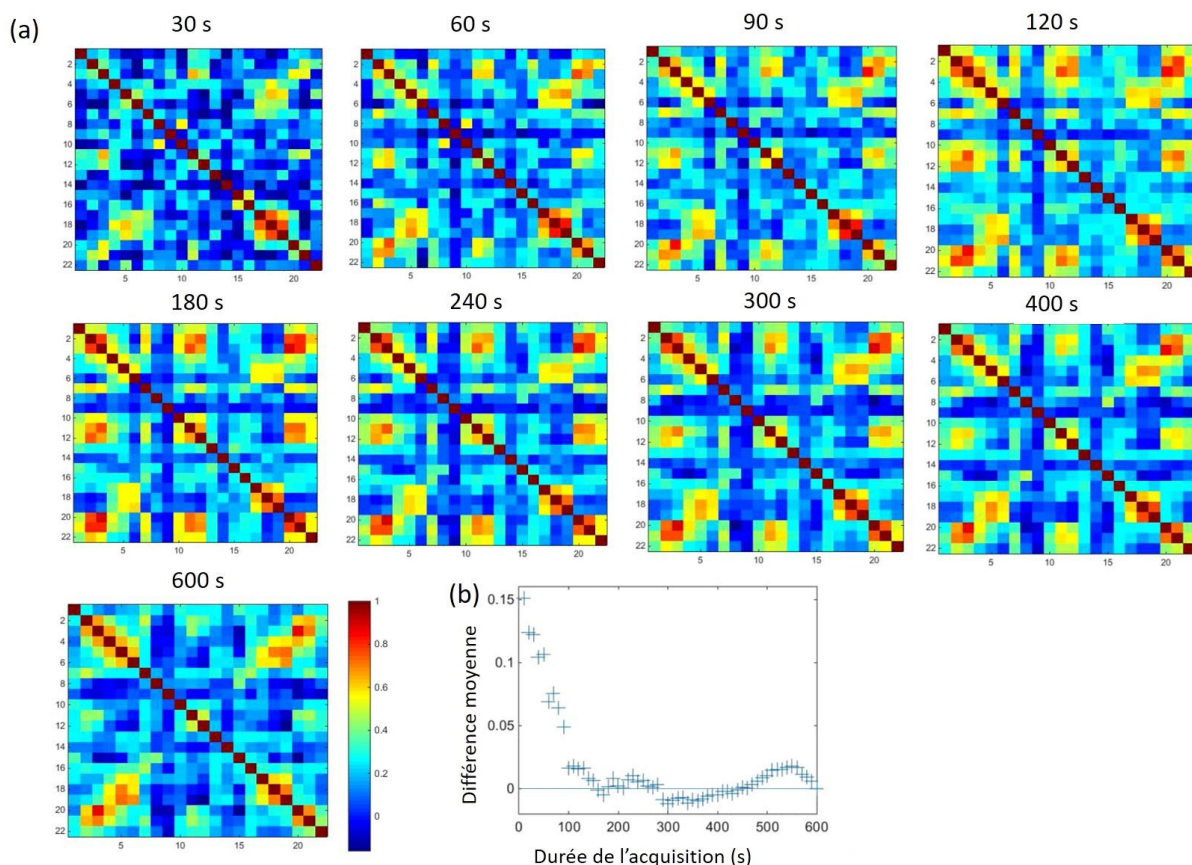


Figure V-8 : (a) Diminution de la durée d'acquisition et observation de la matrice de corrélation correspondante. (b) Graphique représentant la différence moyenne entre une matrice de corrélation obtenue pour une durée d'acquisition de x secondes et la matrice obtenue avec l'acquisition complète (600 s). Lorsque la durée d'acquisition atteint environ 200 s, soit environ 3 min, la matrice d'acquisition est stable.

Nous avons conclu qu'une plage d'acquisition fUS d'environ **3 minutes seulement** est suffisante pour évaluer la matrice de connectivité fonctionnelle. Dans la littérature, en IRMf, on trouve des valeurs très légèrement supérieures à 3 minutes : Van Dijk et al. (2010) démontre en effet que des corrélations robustes peuvent être obtenues pour des durées d'acquisition de l'ordre de 4-5 minutes. Cependant il faut noter que ces résultats ont été obtenus chez l'humain et non chez le rongeur, et avec un système d'imagerie et des fréquences d'échantillonnage (>2.5 s) différents.

3 minutes d'acquisition sont nécessaires et suffisantes pour obtenir une matrice de connectivité fonctionnelle fiable. Il est donc possible de récupérer, parmi les 10 minutes que dure l'acquisition totale, uniquement les plages de données où les souris sont restées « calmes et immobiles » (état qui se rapproche le plus de l'état de *resting state* étudié chez l'Homme).

Les périodes de déplacement et d'immobilité entre lesquelles les souris alternent durent parfois moins de 3 min. Nous nous sommes alors interrogés sur la possibilité de **concaténer de plus petites plages de données** (durée de l'ordre de la minute par exemple), afin d'obtenir un signal bout à bout d'une durée supérieure à 3 minutes. La question avait été bien étudiée en IRMf sur des acquisitions durant lesquelles les sujets alternaient entre des périodes de tâche et des périodes de *resting state* (Fair et al. 2007). Les auteurs montrent dans cette étude que les motifs de corrélation ne sont pas affectés lorsque les périodes de *resting state* (de durée pouvant descendre jusqu'à 17 s) sont remises bout à bout par concaténation pour former un signal d'une durée totale de 10 minutes. Cette alternance entre période de **tâche** et période de ***resting state*** chez l'Homme peut être comparée dans notre expérience à l'alternance entre **période de déplacement/activité** et **période d'immobilité/calme** des souris. Nous en avons conclu que nous pouvions concaténer les unes à la suite des autres les courtes périodes d'acquisitions prises lorsque la souris est immobile, bien qu'elles soient entrecoupées de périodes d'activité.

Il est possible de concaténer les petites plages de données durant lesquelles la souris est restée « calme et immobile » les unes à la suite des autres afin d'obtenir un signal final de 3 minutes minimum, bien que ces plages aient été entrecoupées de périodes d'activité et de déplacement.

Les plages d'acquisition durant lesquelles les souris se déplacent dans la cage sont généralement visibles sur le graphique du signal Doppler moyen calculé dans chaque image au cours du temps (**Figure V-9 (a)**). On remarque en effet une augmentation du signal Doppler moyen sur les dernières minutes d'acquisitions durant lesquelles il a été justement observé que la souris se déplaçait.

L'augmentation du signal Doppler moyen dans l'image au moment du déplacement de la souris peut avoir deux origines : une **augmentation du signal dû à un afflux sanguin** dans certaines zones du cerveau (notamment dans les zones fonctionnelles en lien avec la motricité) ou une **augmentation du signal dû à un artéfact de mouvement**.

Nous avons cherché à quantifier les artéfacts de mouvement présents dans les données. Pour cela nous sommes repartis des données « brutes », c'est-à-dire avant l'étape de filtrage qui permet de dissocier le signal des tissus du signal du sang et d'obtenir l'image Doppler vasculaire. Pour rappel, chaque acquisition de 10 minutes consiste en l'acquisition de 600 « blocs » (un par seconde) de 200 images IQ chacun. Après filtrage (permettant d'extraire le signal du sang) et moyenne, chaque bloc de 200 images IQ donne **une** image vasculaire Doppler.

Dans chaque bloc de 200 images, nous avons calculé le déplacement moyen grâce au **calcul du déphasage**. Le déphasage est calculé dans chaque pixel par corrélation entre une des images du bloc et la suivante. Le **déplacement** correspondant est ensuite calculé par :

$$d = -\frac{\varphi}{2\pi} * \frac{\lambda}{2} \quad \text{Équation V-1}$$

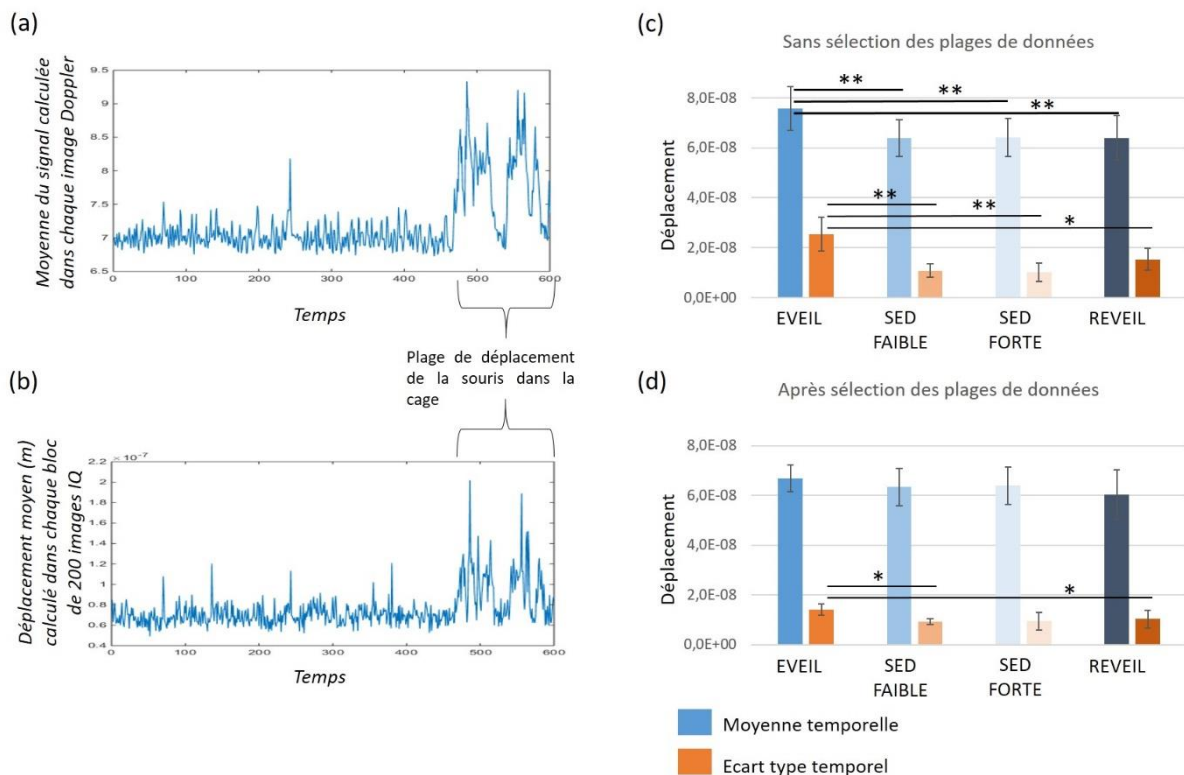


Figure V-9 : (a) Signal Doppler moyen calculé dans chaque image au cours du temps. L'acquisition a été faite sur une souris éveillée. (b) Déplacement moyen (m) calculé grâce au déphasage dans chaque bloc de 200 images IQ, sur la même acquisition que celle utilisée en (a). (c) et (d) Déplacement moyen et écart-type moyen calculés sur N=6 souris dans différents états d'éveil avant et après sélection des plages de données.

où ϕ est le déphasage et λ la longueur d'onde du signal ultrasonore. On représente ensuite le déplacement moyen (moyenné sur tous les pixels et sur les 200 images contenues dans chaque bloc) au cours du temps (**Figure V-9 (b)**). On remarque une augmentation du déplacement moyen dans les dernières minutes d'acquisitions, tout comme dans le précédent graphique. Le déplacement de la souris dans la cage a donc provoqué des artéfacts de mouvements visibles dans les données IQ.

Nous avons alors cherché à quantifier les artéfacts de mouvements dans les données avant et après avoir fait notre sélection des plages où les souris sont « immobiles et calmes ». Pour cela, pour chaque acquisition nous avons tracé un graphique similaire à celui de la **Figure V-9 (b)** et nous avons calculé la moyenne temporelle et l'écart type temporel du signal ainsi obtenu. Ces calculs ont été faits pour chaque acquisition et chaque souris dans chaque état d'éveil, puis les valeurs ont été moyennées sur N=6 souris et reportées dans le graphique visible dans la **Figure V-9 (c)**. La **Figure V-9 (d)** a été faite de la même façon mais sur les données épurées après sélection des plages où les souris ne sont pas en train de se déplacer dans le Mobile HomeCage®. Avant sélection des données, on remarque que les artéfacts de déplacements moyens dans les données IQ, en termes de moyenne et d'écart-type, sont significativement supérieurs dans l'état d'éveil que dans les autres états (test de Student bilatéral, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Après sélection des données, en ne gardant que les plages d'acquisitions durant lesquelles les souris sont immobiles, on remarque que la moyenne des artéfacts de déplacements visibles dans les données IQ est similaire quel que soit l'état d'éveil des souris : il n'y a pas plus d'artéfacts de déplacement chez les souris éveillées que chez les souris fortement sédattées par exemple. L'écart-type reste cependant légèrement supérieur dans l'état d'éveil que dans l'état de faible sédation et de réveil.

La sélection des plages de données, qui a été faite dans un premier temps afin de pouvoir se rapprocher d'un cas d'étude comparable à celui dit de « *resting state* » chez l'Homme, permet donc également de garder les plages contenant un minimum d'artéfacts de mouvement en se plaçant dans des conditions où les niveaux d'artéfact sont comparables à ceux observés sur les souris anesthésiées. La première étape de notre post-traitement consiste donc à analyser chaque acquisition de 10 min, récupérer uniquement les plages d'intérêt (souris immobile), les concaténer, et vérifier que le signal total est d'une durée supérieure à 3 minutes. Dans le cas contraire l'acquisition est considérée comme inexploitable.

Ici la mesure du déplacement sur les données IQ ou l'étude de la variation du signal Doppler au cours du temps est utilisée uniquement pour sélectionner les plages de repos présentant le moins d'artéfacts possible. Une autre possibilité, bien que plus contraignante, serait d'utiliser la mesure du déplacement afin de recalibrer chaque image IQ par rapport aux autres au sein d'un bloc de 200 images et récupérer ainsi un signal stable même en présence d'un petit mouvement de l'animal.

La sélection des plages de données durant lesquelles la souris est « calme et immobile » permet à la fois d'étudier ce qui se rapproche le plus de l'état de *resting state* chez l'Homme, mais aussi de garder des signaux présentant un niveau d'artéfact comparable à celui obtenu chez des souris anesthésiées.

Filtrage temporel

Les fluctuations spontanées sur lesquelles repose l'étude de la connectivité fonctionnelle sont de très basse fréquence, dans une bande de fréquence typiquement appelée « bande de *resting state* » qui s'étend de 0.01 Hz à 0.1 Hz (Biswal et al. 1995; Michael D. Fox and Raichle 2007). Ces fluctuations, bien que d'**origine neuronale**, induisent indirectement des **fluctuations au niveau vasculaire** (c'est la réponse hémodynamique), nous permettant de les observer par imagerie Doppler ultrarapide (ou dans le signal BOLD par IRMf). Cependant, il est important de noter que d'autres phénomènes physiologiques (autres que l'activité neuronale) peuvent induire des fluctuations de basse fréquence au niveau vasculaire (ondes de Mayer (Julien 2006), vasomotricité...). L'imagerie par bioluminescence d'une protéine sensible au calcium et émettant de la lumière lorsqu'il y a un changement de concentration calcique dans la cellule (suite à l'activation d'un neurone notamment) a récemment apporté une preuve supplémentaire de l'origine neuronale de la connectivité fonctionnelle (Ma et al. 2016). Cependant, plusieurs groupes de chercheurs se sont posés la question de l'influence de ces autres phénomènes, non neuronaux, sur les résultats présentés dans le cadre de l'étude de la connectivité fonctionnelle par des méthodes d'imagerie reposant uniquement sur la réponse hémodynamique (Birn 2012; Tong et al. 2013; Tong et al. 2015). Les auteurs soulignent la forte probabilité d'une coexistence de réseaux à la fois neuronaux et vasculaires et insistent sur l'importance de pouvoir les distinguer.

Un article récent a justement étudié la question de l'influence des **ondes de Mayer** et de la vasomotricité dans le cadre de l'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris (Bumstead et al. 2016) : un filtrage passe-bande de fréquences de coupure **0.01-0.08 Hz** permet de cibler les fluctuations d'origine neuronale. Il est important de noter que ce filtrage pourrait être espèce-dépendant puisque les phénomènes vasculaires ne se produisent pas exactement dans les mêmes plages de fréquence d'une espèce à l'autre.

Notre post-traitement des acquisitions faites chez la souris inclut donc une étape de filtrage temporel des signaux, par filtrage passe-bande sur la plage [0.01-0.08] Hz.

Le filtrage temporel passe-bande ([0.01-0.08] Hz) a été modifié par rapport à celui utilisé précédemment au laboratoire chez le rat anesthésié ([0.05-0.2] Hz dans Osmanski et al. (2014)) afin de cibler au mieux les fluctuations vasculaires cérébrales d'origine neuronale chez la souris.

Suppression de la moyenne globale ou « régression du mode 1 »

Le post-traitement classique en IRMf comprend une étape de prétraitement appelée communément « **global signal regression** » (régression du signal global). Cette étape permet de supprimer des fluctuations globales, à l'échelle du cerveau entier, qui peuvent masquer les plus petites fluctuations de connectivité fonctionnelle. Cela permet également de supprimer des artéfacts globaux d'origine physiologique et améliore ainsi la fiabilité des résultats expérimentaux (M. D. Fox et al. 2009; Jonckers et al. 2015). Sur nos données acquises sur des souris éveillées et en mouvement la suppression de ce « signal global » apparaît comme d'autant plus nécessaire puisqu'il contient également des artéfacts globaux liés aux mouvements de l'animal. La régression du signal global peut se faire de différente manière et s'apparente à une suppression d'une « moyenne globale » au cours du temps calculée sur l'ensemble du cerveau.

La **Figure V-10 (a)** donne une représentation des premiers modes spatiaux obtenus par *Singular Value Decomposition* (SVD, décomposition en valeurs singulières) d'une acquisition faite sur une souris éveillée. Ce type de représentation avait été utilisée sur les données de rats anesthésiés (Osmanski et al. 2014) pour montrer la possibilité d'observer les corrélations entre différentes aires du cerveau sans *a priori* spatial (ce qui s'apparente à une analyse par ICA (*Independent Component Analysis*) faite classiquement en IRMf). L'affichage des premiers modes spatiaux obtenus par SVD, affichés par ordre d'énergie décroissante, nous renseigne sur la présence ou non de fluctuations spontanées corrélées entre différentes zones du cerveau. Cependant, l'interprétation précise des différents modes et le lien entre « mode » et « niveau de corrélation » reste encore mal compris. Sans entrer dans une analyse poussée des différents modes spatiaux, on peut remarquer tout de même que le tout premier mode spatial (mode concentrant le maximum de l'énergie du signal) correspond à un signal « global », réparti sur l'ensemble du cerveau. La SVD nous permet également de visualiser les décours temporels associés à chaque mode spatiaux. La **Figure V-10 (b)** présente le signal temporel associé au mode spatial numéro 1. La **Figure V-10 (c)** présente le signal Doppler au cours du temps moyenné sur l'ensemble du cerveau. On observe que les graphiques **(b)** et **(c)** sont très similaires : le décours temporel associé au premier mode spatial, représentant une sorte de signal global présent dans l'ensemble du cerveau, ressemble donc très fortement au signal temporel moyen calculé sur l'ensemble de l'image. La **Figure V-10 (d)** présente la matrice de connectivité fonctionnelle obtenue sans post-traitement particulier, la **Figure V-10 (e)** la même matrice de connectivité fonctionnelle

obtenue après suppression du premier mode SVD et la **Figure V-10 (f)** la matrice obtenue après suppression de la moyenne globale. Les deux méthodes donnent des résultats équivalents : avant post-traitement toutes les ROIs sont fortement corrélées entre elles, après post-traitement les niveaux de corrélation sont plus contrastés avec une nette apparition des corrélations bilatérales entre les aires fonctionnelles homologues et symétriques.

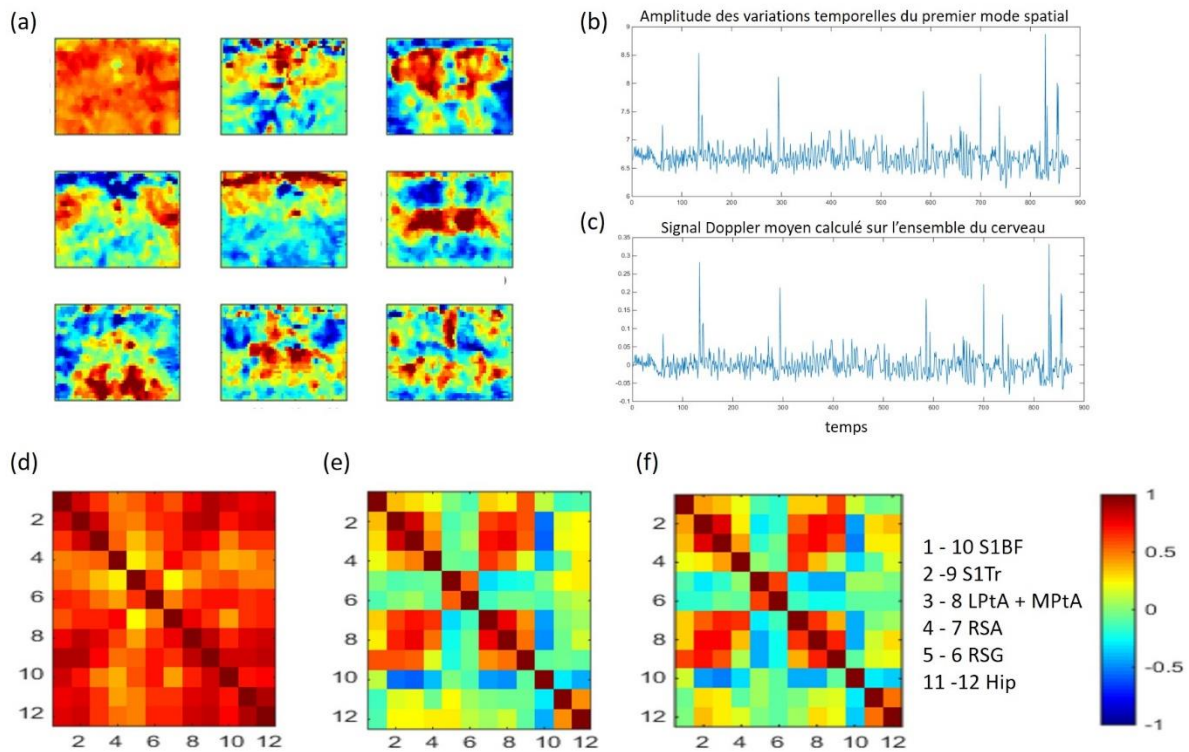


Figure V-10 : Les données utilisées dans cette figure ont été acquises sur une souris éveillée. (a) 9 premiers modes spatiaux obtenus par SVD et affichés par énergie décroissante. (b) Décours temporel associé au premier mode spatial. (c) Signal Doppler moyenné sur l'ensemble du cerveau au cours du temps. (d) Matrice de connectivité fonctionnelle calculée sur les données brutes, sans suppression du « signal global ». (e) Matrice de connectivité fonctionnelle calculée après mise à zéro du premier mode spatial calculé par SVD. (f) Matrice de connectivité fonctionnelle calculée après suppression de la moyenne globale.

Il a donc été nécessaire d'inclure dans notre post-traitement une étape de « suppression du signal global », indispensable chez les souris éveillées, réalisée par la **mise à zéro du premier mode spatial obtenu par SVD**. Ceci permet de visualiser correctement les petites fluctuations de connectivité fonctionnelle en s'affranchissant au mieux des artéfacts liés aux mouvements ou à la physiologie.

L'étape de suppression du signal global permet de supprimer des fluctuations globales, à l'échelle du cerveau entier, pouvant masquer les plus petites fluctuations de connectivité fonctionnelle. Cette

étape est d'autant plus nécessaire chez les souris éveillées puisqu'elle permet également de s'affranchir d'éventuels artéfacts liés aux mouvements des souris.

Récapitulatif du post-traitement

Notre **post-traitement** suit donc les différentes étapes suivantes :

- 1) Superposition de l'atlas Paxinos à notre image vasculaire Doppler afin de définir les ROIs qui seront étudiées dans la matrice de connectivité fonctionnelle (Figure V-11),
- 2) Sélection des plages de données exploitables,
- 3) Suppression du « signal global » par la mise à zéro du premier mode SVD,
- 4) Filtrage passe bande [0.01 0.08 Hz],
- 5) Calcul de la matrice de corrélation entre toutes les paires de ROIs sélectionnées,
- 6) Moyenne des différentes souris afin d'obtenir, au final, une matrice de connectivité fonctionnelle par état d'éveil.

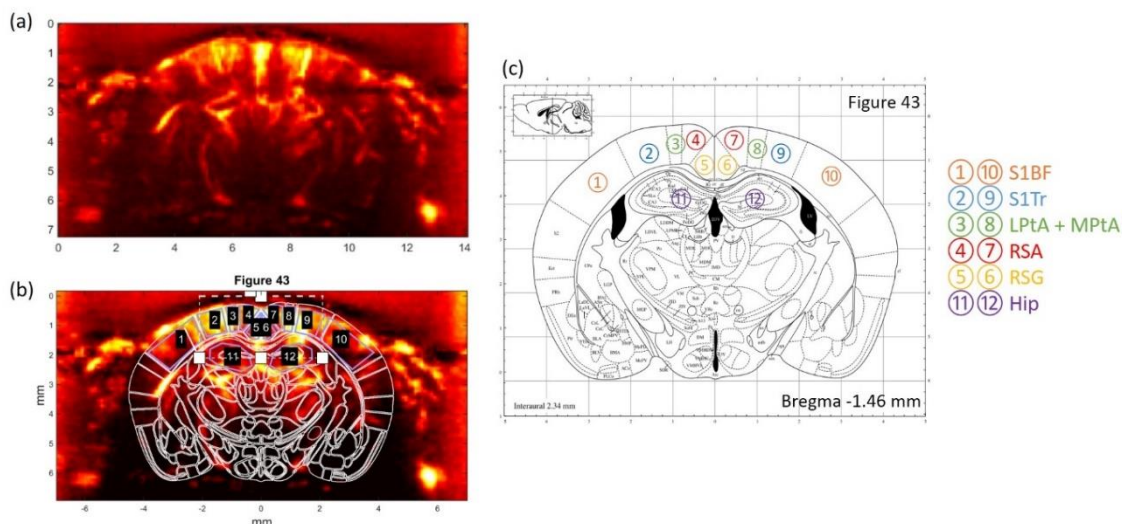


Figure V-11 : Sélection du plan d'acquisition et définition des régions d'intérêt (ROI). (a) Image Doppler coronale du plan choisi : ≈ Bregma -1.5 mm. (b) Recalage entre l'image Doppler et l'atlas Paxinos souris grâce à une interface Matlab créée par l'Institut Langevin (NeuroShop). (c) Plan Paxinos correspondant et légende des structures d'intérêt.

V.3.3. Modification de la connectivité fonctionnelle en fonction de l'état d'éveil

Le même post-traitement a été utilisé pour traiter toutes les acquisitions de type « RS » quel que soit l'état d'éveil des souris afin de pouvoir les comparer. La **Figure V-12** présente les 4 matrices de connectivité ainsi obtenues. On remarque que l'état d'éveil et l'état de faible sédation donnent des matrices de connectivité très similaires. Cependant, lorsque la sédation augmente la connectivité

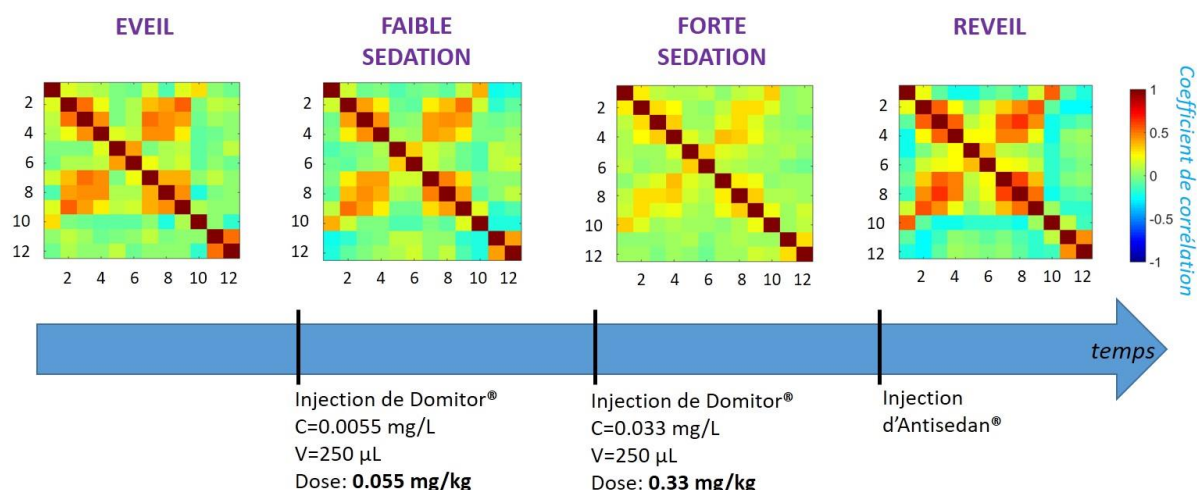


Figure V-12 : Variation du niveau de connectivité fonctionnelle en fonction de l'état dans lequel se trouvent les souris, dans le plan coronal de coordonnées Bregma – 1.5 mm. Etude réalisée sur N=6 souris. La correspondance entre numéro de ROI et structures fonctionnelles est visible dans la Figure V-11 (c).

fonctionnelle sur la diagonale de corrélation entre les zones symétriques diminue, puis ré-augmente au réveil des souris. D'autres corrélations à plus courte distance (corrélation entre les paires 2 et 3, 3 et 4 par exemple) semblent également diminuer avec la sédation, mais reviennent une fois la sédation « annulée » par l'injection d'Antisedan®. Ces résultats sont en accord avec d'autres études ayant démontré que la connectivité fonctionnelle est affaiblie par l'anesthésie (Lu et al. 2007; Liu et al. 2011).

L'imagerie fUS permet d'observer les modulations de la connectivité fonctionnelle induite par la sédation.

Il est aussi intéressant de noter la disparition des corrélations négatives dans l'état de forte sédation, par rapport aux autres conditions d'éveil. Cette observation est en accord avec des résultats obtenus chez le singe (Barttfeld et al. 2015). En effet, pour Stanislas Dehaene et son équipe les patterns de connectivité obtenus chez les singes anesthésiés seraient d'origine anatomique, tandis qu'en état d'éveil les patterns seraient une superposition d'origine anatomique et d'origine fonctionnelle. Il ne peut pas exister de corrélations anatomiques négatives, celles-ci seraient donc forcément d'origine fonctionnelle. Nos résultats chez la souris seraient donc également en accord avec une hypothèse d'une superposition de connectivité d'origine anatomique et fonctionnelle lorsque l'animal est éveillé ou très faiblement anesthésié, contre une connectivité plutôt d'origine anatomique pour l'état de sédation forte.

La **Figure V-13** reprend les valeurs de corrélations entre les paires de ROIs symétriques ainsi que la valeur moyenne de ces corrélations, pour les différents états d'éveil. Pour la plupart des ROIs ainsi que pour la moyenne des corrélations bilatérales, les corrélations diminuent quand la sédation augmente puis ré-augmentent après injection d'Antisédan® et réveil des souris. Le symbole « * » marque les différences significatives (test de Student bilatéral apparié, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). On remarque qu'aucune différence significative n'apparaît entre l'état d'éveil et l'état de faible sédation. Cet état intermédiaire est donc fortement intéressant puisqu'il nous permet d'étudier un **état de conscience très proche de l'état d'éveil** sur des souris **parfaitement immobiles** et donc sans les éventuels biais que pourraient introduire des artefacts de mouvement.

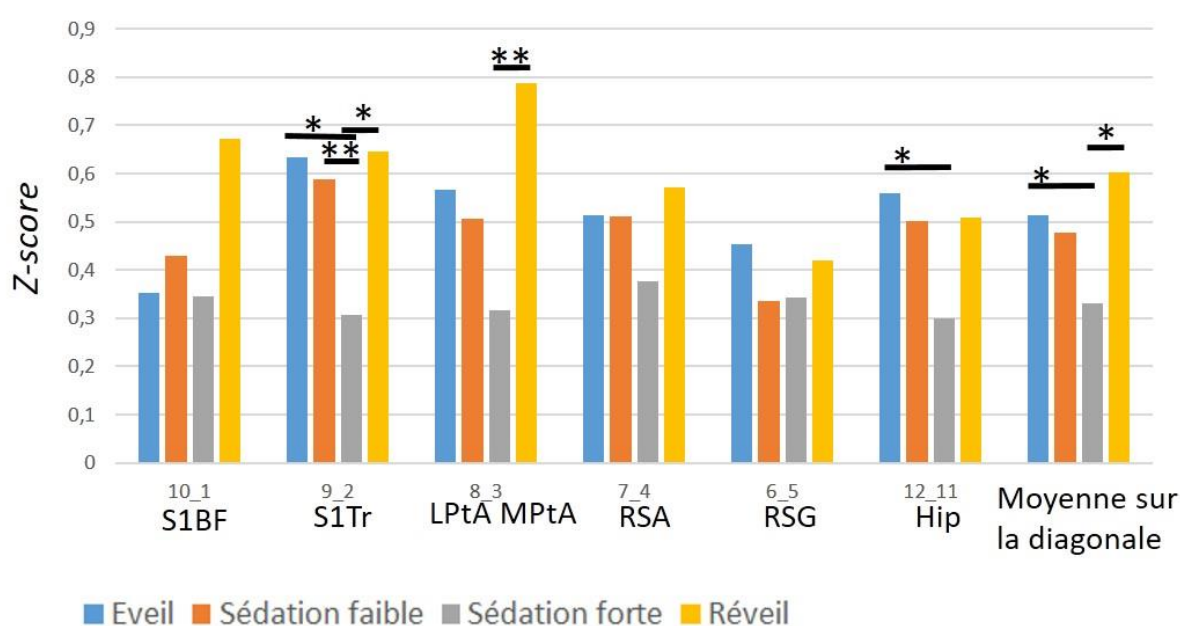


Figure V-13 : Valeurs de corrélations entre les paires de ROIs symétriques, en fonction de l'état d'éveil. Un test de Student bilatéral apparié a été appliqué pour mettre en évidence les différences significatives (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **Aucune différence significative n'apparaît entre l'état d'éveil et l'état de faible sédation pour les paires de ROIs testées.**

Aucune différence significative n'apparaît entre l'état d'éveil et l'état de faible sédation. L'état de faible sédation nous permet d'étudier un état cérébral proche de l'état d'éveil mais sur des souris parfaitement immobiles, ce qui permet de confirmer que notre matrice obtenue sur les souris éveillées ne reflète pas des corrélations induites par d'éventuels artefacts de mouvement.

Dans cette partie nous avons donc démontré pour la première fois la possibilité d'utiliser le fUS pour étudier la **connectivité fonctionnelle chez des souris éveillées**. Le pattern de connectivité fonctionnelle observé chez les souris éveillées est identique à celui observé chez les souris faiblement

sédation et immobiles ; Ce résultat permet d'appuyer le fait que la matrice de connectivité fonctionnelle obtenue sur les souris éveillées repose sur un signal physiologique et ne reflète pas seulement des corrélations introduites par des artefacts de mouvement par exemple. Le fUS nous permet également d'observer les **variations de la connectivité fonctionnelle induite par la sédation** après injection d'une forte dose de Domitor®. Cette diminution de connectivité est réversible, le réveil des souris provoqué par l'injection d'Antisédan® est suivi d'une ré-augmentation de cette connectivité.

Nous avons ensuite analysé les données acquises lors des stimulations des vibrisses des souris et nous les avons comparées aux résultats précédents, obtenus durant des périodes de calme et d'immobilité des souris sans stimulation.

V.3.4. Modification de la connectivité fonctionnelle post stimulation : vers l'étude du DMN

Un des réseaux fonctionnels les plus étudiés actuellement en rsfMRI est le **Default-Mode Network (DMN)** : chez l'Homme, il a été montré que ce réseau est **activé** lorsque le cerveau est **au repos** et **désactivé** lorsque le cerveau est engagé dans la réalisation d'un but précis, d'une **tâche** (M. D. Fox et al. 2005; Buckner, Andrews-Hanna, and Schacter 2008). Si ce mode par défaut intéresse tellement les neurobiologistes, c'est parce que des dysfonctionnements de connectivité dans ce réseau ont été observés dans de nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques (autisme, schizophrénie...). Il serait donc très intéressant de pouvoir étudier ce réseau fonctionnel chez le petit animal, et notamment chez le modèle souris, pour le grand nombre de modèles génétiques de pathologies neurologiques que ce modèle permettrait d'étudier. Cependant, au niveau du petit animal, si un réseau similaire au DMN **d'un point de vue anatomique** a été mis en évidence par IRMf, plusieurs points n'ont pas encore été bien étudiés. En effet, pour des raisons déjà évoquées plusieurs fois dans cette thèse, la méthode d'imagerie de choix actuelle qu'est l'IRMf ne permet pas d'étudier correctement le DMN chez des **souris éveillées**. Or, ce point est crucial si l'on veut pouvoir élaborer des expériences au cours desquelles les souris passent d'un état dit de *resting state* à un état d'action durant lequel leur cerveau est « engagé vers un but précis », vers une « tâche », ceci afin d'espérer voir la désactivation du DMN déjà mise en évidence chez l'Humain.

Le fUS nous a permis d'observer des modifications de la connectivité fonctionnelle induite par différents niveaux d'éveil chez la souris, nous nous sommes ensuite demandé s'il pouvait également nous permettre d'étudier ce mode par défaut et de pallier les inconvénients de l'IRMf.

Pour cela, nous avons choisi de comparer les matrices de connectivité obtenues dans l'état dit de « *resting state* » (qui correspond ici aux périodes de calme et d'immobilité des souris) et dans un

état de « tâche ». La tâche choisie est une simple **stimulation des vibrisses droites** de la souris ; stimulus qui peut être introduit quel que soit l'état d'éveil de la souris. Dans le plan d'acquisition de coordonnées antéro-postérieures \approx Bregma -1.5 mm contenant la zone fonctionnelle des vibrisses S1BF, certaines zones fonctionnelles ont été décrites comme appartenant au DMN, notamment la zone **RSG**. Nous cherchons donc à voir, dans les matrices, des modifications de la connectivité fonctionnelle causée par la stimulation, en particulier dans cette zone là.

Le fUS peut-il permettre d'observer une diminution de la connectivité fonctionnelle dans les zones appartenant au mode par défaut (DMN) lorsque l'état de « *resting state* » est perturbé par une stimulation sensorielle, chez des souris éveillées ou sédattées ?

Acquisitions sur les souris fortement sédattées :

La **Figure V-14** présente les matrices de connectivité fonctionnelle obtenues lorsque les souris sont fortement sédattées (dose forte de Domitor®), en absence de stimulation (**Figure V-14 (a)**) et en présence d'un profil de stimulation des vibrisses droites (**Figure V-14 (b)**). Pour mettre en évidence les différences entre ces deux matrices nous avons également affiché la matrice de différence obtenue en soustrayant la seconde matrice à la première (« matrice sans stimulation » – « matrice avec stimulation », **Figure V-14 (c)**). La stimulation des vibrisses droites des souris active la zone controlatérale S1BF gauche, c'est-à-dire la ROI numéro 1 (**Figure V-14 (d)**), tandis que la zone symétrique (S1BF droite, numéro 10) n'est pas activée. Par conséquent, la corrélation bilatérale gauche-droite existant en l'absence de stimulation (**Figure V-14 (a)** ROI 1 et 10) est perturbée par la stimulation et disparaît dans la matrice de connectivité (**Figure V-14 (b)**). Cette différence est bien significative (**Figure V-14 (c)**, test de Student bilatéral apparié, $p < 0,05$). Ceci constitue un premier **contrôle positif** : le fUS nous permet de mettre en évidence des modifications de la connectivité fonctionnelle induites par stimulation dans les zones directement concernées par la stimulation.

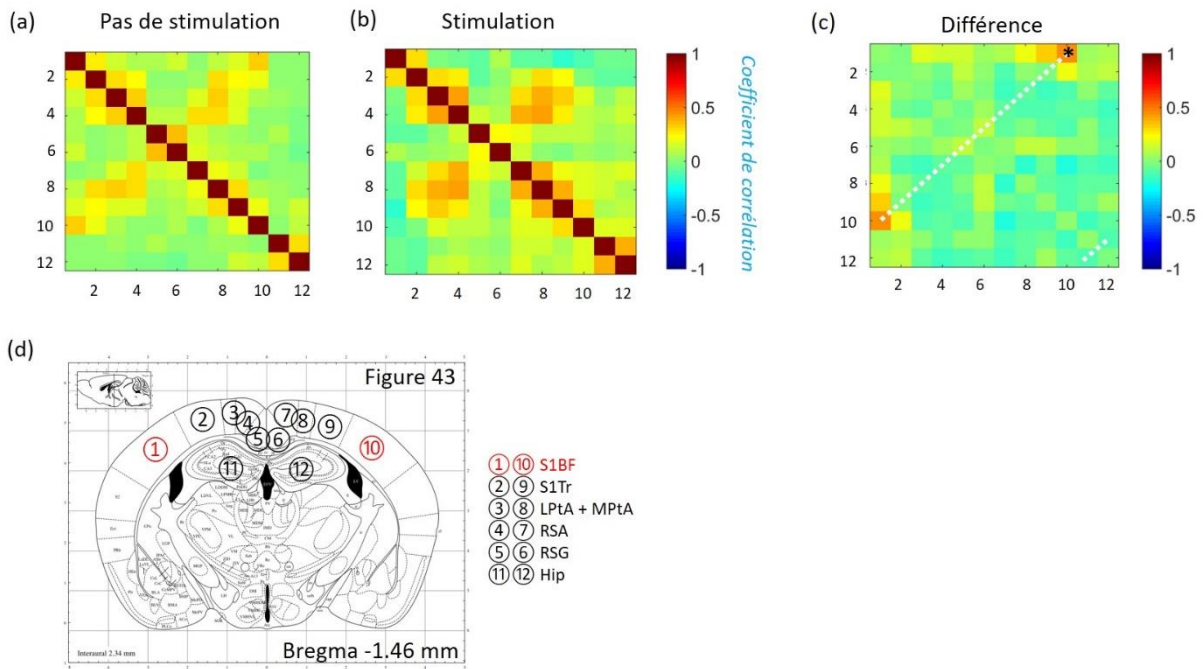


Figure V-14 : Variation de la connectivité fonctionnelle lors de stimulation des vibrisses droites des souris fortement sédattées. (a) Matrice de connectivité en absence de stimulation. (b) Matrice de connectivité lors de stimulations des vibrisses. Le schéma de stimulation est visible dans la figure **Figure V-7**. (c) Différence entre la matrice sans stimulation et la matrice avec stimulation (matrice (a) – matrice (b)). Test de Student bilatéral apparié : * $p < 0.05$. (d) Légende des ROIs utilisées dans les matrices de connectivité.

Par comparaison visuelle entre les matrices (a) et (b) nous remarquons également une **baisse du niveau de corrélation** entre les ROIs 5 et 6 (zone fonctionnelle RSG gauche et droite, une des zones du DMN *a priori*) lorsque les souris sont stimulées. Un test de Student unilatéral (moins restrictif que le test de Student bilatéral précédemment utilisé pour les ROIs 1 et 10) en faisant l'hypothèse que la corrélation est plus faible avec stimulation que sans stimulation, permet de mettre en évidence cette différence de manière significative. La stimulation des vibrisses induit donc une diminution de la connectivité fonctionnelle entre les zones **RSG** gauche et droite. Ce résultat va dans le sens d'une **désactivation de la connectivité** des zones incluses dans le **Default Mode Network** lors d'une tâche.

Chez les souris fortement sédattées, le fUS permet de mettre en évidence la modification de la connectivité fonctionnelle induite par une stimulation des vibrisses, dans deux zones d'intérêt : la zone stimulée (S1BF) et une zone faisant *a priori* partie du DMN.

Acquisitions sur souris faiblement séditées

La **Figure V-15** présente les matrices de connectivité fonctionnelle obtenues lorsque les souris sont très faiblement séditées, en absence de stimulation (**Figure V-15 (a)**) et en présence d'un profil de stimulation des vibrisses droites (**Figure V-15 (b)**). Là encore, pour mettre en évidence les différences entre ces deux matrices nous avons également affiché la matrice des différences obtenue en soustrayant la seconde matrice à la première (« matrice sans stimulation » – « matrice avec stimulation », **Figure V-15 (c)**). Comme précédemment sur les souris plus fortement séditées, nous pouvons remarquer tout d'abord que la corrélation bilatérale gauche-droite entre les zones fonctionnelles dédiées aux vibrisses (S1BF, ROI 1 et 10) s'annule lorsque les vibrisses droites des souris sont stimulées. Cette disparition de la corrélation, qui constitue là encore un premier **contrôle positif**, est bien significative (**Figure V-15 (c)**, test de Student bilatéral apparié, $p < 0,05$). Mais on remarque également que la connectivité fonctionnelle **diminue de manière significative** (**Figure V-15 (c)**, test de Student bilatéral apparié) entre les ROIs 5 et 6 (RSG gauche et droite, zones fonctionnelles appartenant *a priori* au DMN ; $p < 0,01$), tandis qu'elle **augmente de manière significative** entre les ROIs 11 et 12 (hippocampe gauche et droite ; $p < 0,05$). Si l'augmentation de la connectivité entre les ROIs 11 et 12 est difficile à interpréter, la diminution de la connectivité fonctionnelle entre les aires fonctionnelles **RSG** du cortex gauche et du cortex droit lorsque les souris sont stimulées est, quant à elle, en accord avec la théorie.

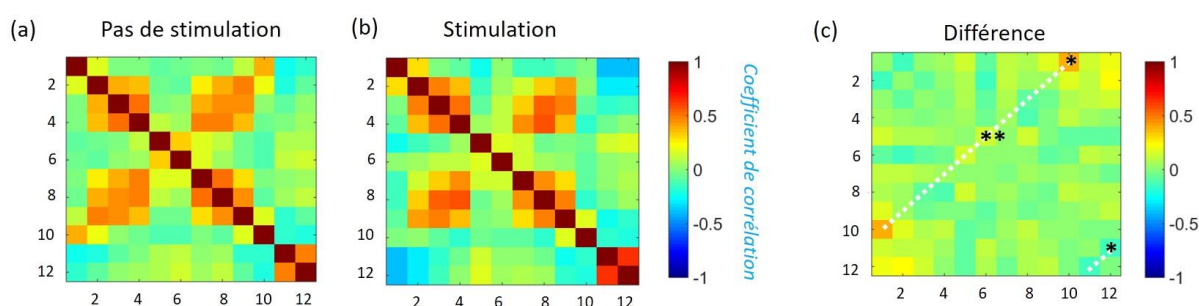


Figure V-15 : Variation de la connectivité fonctionnelle lors de stimulation des vibrisses des souris faiblement séditées. (a) Matrice de connectivité en absence de stimulation. (b) Matrice de connectivité lors de stimulations des vibrisses. Le schéma de stimulation est visible dans la figure **Figure V-7**. (c) Différence entre la matrice sans stimulation et la matrice avec stimulation (matrice (a) – matrice (b)). Test de Student bilatéral apparié : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Même légende de ROIs que celle visible dans la **Figure V-14 (d)**.

Chez les souris faiblement séditées, le FUS permet également de mettre en évidence la modification de la connectivité fonctionnelle induite par une stimulation des vibrisses, dans deux zones d'intérêt : la zone stimulée (S1BF) et une zone faisant *a priori* partie du DMN (RSG).

Acquisitions sur souris éveillées :

Enfin, la **Figure V-16** présente les résultats obtenus chez les souris en état d'éveil. Il est important de noter ici que notre post-traitement initial a dû être légèrement adapté.

La stimulation des vibrisses sur souris peu ou fortement sédatisées n'introduisait pas de problème particulier, puisque mis à part de petits mouvements résiduels de la queue par moment, les souris restaient immobiles au cours des stimulations, comme elles l'étaient également au cours des acquisitions dites de « *resting state* », grâce à la dose de sédatif qui leur avait été injectée. La comparaison entre les deux types d'acquisition était donc simple. Cependant, les stimulations des vibrisses sur les souris éveillées provoquent fréquemment chez les souris des mouvements de recul, des déplacements pour tenter d'éviter la stimulation, ou bien des gestes réalisés à l'aide de leurs pattes avant pour tenter de repousser le coton-tige utilisé pour la stimulation des vibrisses. Les acquisitions de type « **stimulation** » sur les souris éveillées contiennent donc de nombreuses plages où les souris ne sont **pas immobiles** mais en mouvement. La comparaison avec la matrice de connectivité fonctionnelle de type « *resting state* » obtenue chez les souris éveillées (présentée dans la **Figure V-12**) est donc délicate puisque celle-ci a été obtenue après sélection des plages de données où les souris sont « immobiles et calmes ». Or nous avons vu que cette sélection des données permettait de réduire les artefacts de mouvement. Une telle comparaison ne serait donc pas faite « à bruit égal ». Nous avons donc décidé, afin de comparer des matrices de connectivité « **à bruit égal** », de calculer les matrices de connectivité fonctionnelle, en l'absence de stimulation et en présence de stimulation, **sans sélection particulière des plages de données**. Les matrices résultantes sont présentées dans la figure **Figure V-16 (a) et (b)**. La matrice des différences (« matrice sans stimulation » - « matrice avec stimulation ») est également visible dans la **Figure V-16 (c)**.

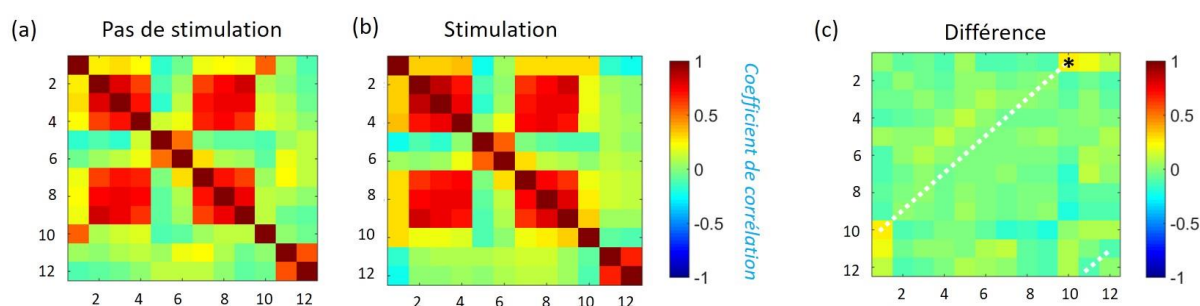


Figure V-16 : Variation de la connectivité fonctionnelle lors de stimulation des vibrisses des souris éveillées. (a) Matrice de connectivité en absence de stimulation : les souris sont laissées libres, sans intervention de la part de l'expérimentateur. (b) Matrice de connectivité lors de stimulations des vibrisses. Le schéma de stimulation est visible dans la figure **Figure V-7**. (c) Différence entre la matrice sans stimulation et la matrice avec stimulation (matrice (a) – matrice (b)). Test de Student unilatéral apparié : * $p < 0.05$. Même légende de ROIs que celle visible dans la **Figure V-14 (d)**.

L'étape de sélection des plages de « calme et immobilité » des souris n'a pas été faite ici afin de comparer les deux matrices (avec et sans stimulation) à « bruit égal ».

Le contrôle consistant à vérifier que la corrélation entre les zones S1BF gauche et droite diminue lors des stimulations des vibrisses droites est bien visible lorsque l'on compare les matrices (a) et (b). Cependant, cette différence n'est significative qu'avec un test de Student unilatéral (contrairement aux cas précédents où cette même différence était significative avec un test de Student bilatéral, plus restrictif). De plus, on ne remarque **aucune diminution** de la corrélation entre les ROIs 5 et 6, contrairement au deux cas étudiés précédemment. Plusieurs hypothèses peuvent être faites : nombre de souris étudiées trop petit (N=6 ici) ? Bruit dû aux artefacts de mouvement trop important ? Comparaison « *resting state*/tâche » mal adaptée (le cas « *resting state* » ne correspondant plus à un cas où les souris sont uniquement immobiles et calmes puisqu'on a gardé également les plages où les souris étaient en mouvement afin de permettre une comparaison à « bruit égal » avec les acquisitions de type stimulation)... ?

Chez les souris éveillées, le fUS permet de mettre en évidence la modification de la connectivité fonctionnelle induite par une stimulation des vibrisses, dans la zone contrôlée stimulée (S1BF), mais la diminution de la corrélation entre les zones RSG gauche et droite (zones du DMN) lors des stimulations n'a pas pu être observée.

En conclusion, la stimulation des vibrisses des souris dans différents états d'éveil a induit une **modification de la connectivité fonctionnelle mesurable grâce au fUS**, dans une zone fonctionnelle directement reliée aux vibrisses des souris (expérimentation contrôle) mais également, dans certaines conditions, au niveau d'une paire de ROIs appartenant *a priori* au réseau du DMN. Une diminution de la corrélation entre les zones RSG gauche et droite a notamment été observée chez des souris très faiblement séditées, une condition expérimentale de choix puisque les souris sont en effet dans un état cérébral proche de celui de l'état d'éveil (V.3.3), tout en permettant des acquisitions sans artefacts de mouvement puisque les souris sont immobilisées par la sédation. Ces résultats constituent un premier pas vers l'étude du DMN par imagerie fUS sur des souris saines.

V.1. Discussion et conclusion

Dans ce chapitre nous avons démontré la possibilité d'utiliser l'imagerie fonctionnelle ultrasonore ultrarapide (fUS) afin d'étudier la connectivité fonctionnelle dans le cerveau de souris anesthésiées,

mais aussi éveillées, de manière transcrânienne et peu invasive. Le fUS nous a permis de mettre en évidence des variations de connectivité fonctionnelle induites par différents états d'éveil et de sédation, mais aussi des variations de connectivité induites par des stimulations. Nous avons notamment pu observer une diminution de la connectivité entre deux aires corticales appartenant *a priori* au *Default Mode Network* au cours d'acquisitions de stimulation des vibrisses.

Les résultats que nous avons présentés constituent un premier pas vers d'autres applications plus générales de grand intérêt en neuroscience actuellement : l'étude de la variation de la connectivité fonctionnelle dans le cadre de l'utilisation de modèles souris de pathologies neuropsychiatriques et d'études pharmacologiques.

Modification de la connectivité fonctionnelle en fonction de l'état d'éveil

Diminution de la corrélation avec la sédation : quelques vérifications

La diminution de la corrélation avec l'augmentation de la sédation n'est *a priori* pas due à une simple diminution du **couplage neurovasculaire** qui aurait pu être provoquée notamment par la diminution de la température corporelle des souris. Deux arguments nous permettent d'écarter cette hypothèse : (1) la température corporelle des souris était contrôlée et stabilisée grâce à un tapis chauffant tout au long des acquisitions sous forte sédation ; (2) Nous avons bien observé l'activation de la zone S1BF après stimulation des vibrisses des souris tout au long des expériences, et ce même dans le cas de la plus forte dose de Domitor®, ce qui prouve que le couplage neurovasculaire n'était pas perturbé.

Nous avons également vérifié que les différences observées entre les niveaux de corrélation n'étaient *a priori* pas dues à un simple **effet vasoconstricteur** du Domitor®. Pour cela nous avons vérifié que l'amplitude de l'augmentation du CBV (*Cerebral Blood Volume*) dans la zone S1BF au moment des stimulations était similaire dans les états de sédation faible, forte et en l'absence de sédation.

Augmentation des corrélations au réveil des souris après injection d'Antisédan®

Sur la **Figure V-12** on observe une légère augmentation des corrélations dans la matrice de connectivité fonctionnelle dans l'état de « réveil », après injection de l'Antisédan® qui permet « d'annuler » l'effet du Domitor®, par rapport à l'état d'éveil « normal » de départ. Nous nous sommes demandé si cette augmentation des corrélations pouvait être un effet directement lié à l'Antisédan®. Nous avons donc fait une expérience de contrôle (N=3 souris) consistant à injecter l'Antisédan® sur des souris déjà éveillées, afin de voir si l'injection du produit lui-seul semblait renforcer les niveaux de connectivité. Nous n'avons pas vu d'effet significatif sur les niveaux de corrélations bilatérales au niveau des matrices de connectivité.

Le choix délicat de l'anesthésique dans le cadre de l'étude de la connectivité fonctionnelle

Le **Domitor**[®] est le produit le plus utilisé pour l'étude de la connectivité fonctionnelle chez le rat en IRMf car il permet d'obtenir des résultats plus fiables et plus spécifiques spatialement que les anesthésies générales (Kalthoff et al. 2013). De plus son effet peut être « annulé » rapidement par injection d'Antisédan[®]. Cependant, chez la souris, des études précédentes en IRMf avaient montré que le Domitor[®] provoquait une diminution de la connectivité inter-hémisphérique (Jonckers et al. 2011). En effet, dans cet article on remarque que l'analyse par ICA fait ressortir le cortex gauche et le cortex droit dans deux modes distincts chez la souris, tandis que chez le rat, également sous Domitor[®], ceux-ci apparaissent bien corrélés et dans le même mode. Nos résultats vont également dans le sens d'une **diminution de la connectivité inter-hémisphérique** après injection de la plus forte dose de Domitor[®] chez la souris. Ce même groupe d'auteur a aussi testé d'autres protocoles d'anesthésie chez la souris afin de déterminer s'il existait des conditions d'anesthésie permettant une meilleure visualisation de la connectivité inter-hémisphérique en IRMf (Jonckers et al. 2014). Leur étude révèle par exemple une diminution de la connectivité inter-hémisphérique au niveau du cortex pour les souris anesthésiées par administration de α -chloralose et uréthane, par comparaison avec celles anesthésiées par isoflurane ou éveillées.

Outre le choix du modèle animal (rat ou souris) et de l'anesthésique, de nombreux autres facteurs entrent en jeu dans la mesure de la connectivité fonctionnelle sur des animaux anesthésiés : la dose injectée, la voie d'administration, l'environnement et le niveau de stress que celui provoque chez l'animal par exemple... Tout ceci est à prendre en compte au moment du choix du protocole expérimental, et rend les comparaisons entre différentes études faites dans différents laboratoires parfois difficiles et hasardeuses. Le passage à l'expérimentation sur animaux éveillés paraît donc plus que nécessaire même s'il implique d'autres contraintes et la possibilité d'introduire d'autres biais. Les contraintes en imagerie de la connectivité fonctionnelle sur des animaux éveillés sont effectivement multiples : effet des **artéfacts de mouvement** qui peuvent perturber les petites fluctuations que l'on cherche à observer, difficulté de s'assurer de l'**état cérébral** dans lequel se trouve l'animal et de sa répétabilité inter ou intra-animal, nécessité de mettre en place des **protocoles d'habituation** parfois lourds et complexes...

Modification de la connectivité fonctionnelle par stimulation : vers l'étude du DMN...

Nous avons pu mettre en évidence la diminution de la corrélation entre les zones **RSG** gauche et droite lors d'une stimulation des vibrisses de la souris. Ce résultat est fortement intéressant puisque la zone RSG est une des structures cérébrales faisant *a priori* partie du **DMN** chez la souris (Sforazzini et al. 2014; Stafford et al. 2014), réseau dont la principale propriété démontrée notamment chez l'Homme est d'être activé (corrélé) au repos et désactivé (décorrélé) lors d'une tâche. La diminution

de cette corrélation, consécutivement aux stimulations des vibrisses des souris, est plus particulièrement visible chez les souris **faiblement sédattées** que dans les autres conditions d'éveil. Sous forte sédation, le niveau de corrélation « de base » entre les deux ROIs appartenant au DMN est plus faible que chez les souris légèrement sédattées (résultat qui avait déjà été observé chez la souris en IRMf (Shah et al. 2016)). Cela pourrait expliquer qu'une diminution de cette corrélation - déjà faible - soit plus difficile à mettre en évidence de manière significative. Chez les souris éveillées cependant, l'absence de mise en évidence de la décorrélation entre RSG gauche et droite consécutivement aux stimulations semble à première vue plus étonnante. Cependant, plusieurs paramètres peuvent entrer en jeu et expliquer cette absence de résultat, notamment la présence d'artéfacts de mouvement que nous avons volontairement conservés dans cette analyse afin de comparer les acquisitions « sans et avec stimulation » avec des niveaux de bruit égaux. En effet, comme les souris se déplacent et introduisent donc des artéfacts de mouvement dans les acquisitions réalisées « avec stimulation », nous avons considéré qu'il était alors plus judicieux de comparer la matrice obtenues dans ces conditions à une matrice « sans stimulation » pour laquelle nous aurions également gardé les plages de déplacement des souris. On ne compare donc pas réellement une matrice dite de « **resting state** » (correspondant à des plages où la souris est calme et immobile) vs une matrice dite de « **tâche** », mais plutôt une matrice que l'on pourrait qualifier de « **comportement libre des souris** » vs une matrice dite de « **comportement libre perturbé par les stimulations** ». En plus d'introduire des artéfacts de mouvement qui peuvent perturber les petites fluctuations liées à la connectivité fonctionnelle, ce protocole s'éloigne donc un peu de ce qui est fait de manière plus rigoureuse chez l'Homme en IRMf où l'on compare une réelle « tâche cognitive » vs un état dans le lequel le sujet reste « immobile sans rien faire ».

La question des artéfacts de mouvement dans les matrices de connectivité fonctionnelle

Dans la première partie de notre étude, nous nous sommes intéressés à des matrices de connectivité fonctionnelle obtenues chez des souris « calmes et immobiles », en supprimant les plages d'acquisition durant lesquelles les souris se déplaçaient dans leur cage (**V.3.2**). Ceci a été fait afin de se rapprocher des conditions dans lesquelles la connectivité fonctionnelle est étudiée habituellement, c'est-à-dire durant un état appelé « état de *resting state* » : Humain éveillé mais au repos, animal anesthésié, ou animal éveillé mais contraint à rester immobile dans l'appareil. Cette nécessité de supprimer les plages de déplacement des souris nous a également permis de réduire les artéfacts de mouvement (**Figure V-9**). Les résultats présentés dans la **Figure V-12** confirment que la matrice de connectivité ainsi obtenue chez les souris éveillées n'est pas perturbée par des artéfacts de mouvement puisqu'elle ressemble fortement à la matrice obtenues sur des souris très faiblement

séditées, complètement immobiles (pas de différence significative visible dans la **Figure V-13** entre ces deux conditions).

Dans la seconde partie de notre étude, la **Figure V-16 (a)** présente la matrice de connectivité fonctionnelle obtenue sur les souris éveillées, mais cette fois sans avoir fait la pré-sélection des plages de données correspondant aux passages de calme et d'immobilité des souris (nous avons déjà discuté du choix de ce post-traitement précédemment). On remarque dans ce cas que les niveaux de corrélation apparaissent plus forts que dans la matrice obtenue avec sélection des plages de données (**Figure V-12** première matrice). Ce résultat semble contre-intuitif. En effet, puisque les fluctuations spontanées basses fréquences corrélées spatialement dans le cerveau sont une caractéristique de l'état de *resting state* et donc du cerveau au repos (**V.1.1**), les plages durant lesquelles les souris se déplacent devraient au contraire introduire des décorrélation des signaux. Nous nous attendions donc à observer une diagonale de connectivité bilatérale moins forte que dans la matrice de la **Figure V-12**. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées sur l'origine de cette augmentation du niveau de corrélation. La première étant que les artéfacts de mouvement, se répercutant dans toutes les ROIs de l'image plus ou moins de la même façon, introduisent des corrélations supplémentaires. Cependant il est intéressant de noter ici que toutes les paires de ROIs ne voient pas leur corrélation augmenter de la même façon (certaines ont sensiblement les mêmes niveaux de corrélation dans la **Figure V-12** et dans la figure **Figure V-16 (a)** : ROIs 5, 6, 11, 12...), ce qui semble donc ne pas aller dans le sens d'un artéfact de mouvement venant perturber l'ensemble de l'image. Une autre hypothèse pourrait être que les ROIs concernées par l'augmentation de la corrélation soient des zones fonctionnelles très proches spatialement de zones corticales motrices: M1 et M2, cortex moteur primaire et secondaire se trouvent en effet à quelques dixièmes de millimètre en avant du plan coronal dans lequel nous estimons avoir placé la sonde échographique et au même niveau latéralement que les ROIs 3 et 8. Lors des déplacements des souris, l'activation puis la désactivation de ses zones fonctionnelles motrices pourraient entraîner une corrélation supplémentaire entre elles, s'ajoutant aux petites fluctuations spontanées de connectivité fonctionnelle dans l'état de repos. Il pourrait alors être intéressant de reproduire cette expérience en plaçant la sonde échographique de manière plus postérieure, afin de s'éloigner du cortex moteur et voir l'effet produit sur les niveaux de corrélation lorsque les plages de mouvements des souris sont conservées dans l'analyse.

Positionnement du fUS par rapport aux autres techniques d'imagerie dans le cadre de l'étude de la connectivité fonctionnelle

Dans le cadre de l'étude de la connectivité fonctionnelle, le fUS présente l'avantage de pouvoir être utilisé sur des **animaux vigiles**, en s'affranchissant donc de l'effet perturbateur que peuvent avoir les anesthésiques sur le fonctionnement du cerveau et permet ainsi de se rapprocher des conditions

d'études pratiquées chez l'Homme en IMRf. Il est ainsi possible d'envisager des expériences comportementales poussées sur le petit animal : apprentissage de tâches spécifiques, utilisation de labyrinthes, tests de mémorisation... non réalisables en IRMf. Les deux principaux avantages restant à l'IRMf sont donc son aspect non invasif et la possibilité d'acquérir des volumes en 3 dimensions. Nous avons vu que, chez la souris, le fUS peut être utilisé de manière **complètement non invasive** chez des souris anesthésiées (**chapitre III**). Chez la souris éveillée, le besoin d'une fixation rigide et solide entre la sonde ultrasonore et la tête de la souris nécessite l'implantation de vis de fixation mais laisse le cerveau intact, dans sa cavité crânienne, limitant considérablement le risque d'infection et permettant des acquisitions longitudinales (**chapitre IV**). L'accès à la **connectivité fonctionnelle en 3D** peut être envisagé par l'utilisation de sondes matricielles 3D qui permettent d'acquérir un volume directement et à des cadences d'imagerie ultrarapides (Provost et al. 2014). En effet, un avantage du système Mobile HomeCage™ utilisé dans ce chapitre est le fait que la sonde ultrasonore n'est pas supportée directement par la souris mais est solidaire du système de moteurs. De plus, le cadre métallique implanté sur la tête de la souris laisse une fenêtre d'acquisition de plusieurs millimètres. Il est donc envisageable d'acquérir, avec une telle sonde matricielle, un volume Doppler complet afin d'étudier la connectivité fonctionnelle entre des aires cérébrales appartenant à des régions éloignées. Ce travail pourrait être réalisé sans grande modification du côté du montage expérimental, mais nécessite tout de même une optimisation des séquences ultrasonores 3D afin de pouvoir atteindre des cadences d'imagerie Doppler qui permettent de suivre la réponse hémodynamique, soit environ un volume Doppler toutes les 1 ou 2 secondes.

Par rapport aux systèmes optiques d'imagerie fonctionnelle existants et permettant, eux aussi, d'acquérir des données sur des souris éveillées avec une bonne résolution spatiale et temporelle et un niveau d'invasivité comparable au fUS, le fUS présente l'avantage d'obtenir des **informations en profondeur dans le cerveau**. En effet, les méthodes optiques sont actuellement limitées aux premiers millimètres du cortex cérébral, tandis que l'imagerie échographique permet d'accéder à la totalité du cerveau de la souris ou du rat, sur toute sa profondeur. Si l'étude de la connectivité fonctionnelle au niveau du cortex apporte déjà de nombreuses informations intéressantes, certaines structures plus en profondeur jouent des rôles clés dans de nombreuses maladies psychiatriques et il est donc primordial de pouvoir y accéder. L'**hippocampe** par exemple (**Figure V-11**, ROIs 11 et 12) est une structure très étudiée dans les modèles précliniques de schizophrénie, et plus généralement dans l'étude de nombreuses maladies psychotiques (Li, Long, and Yang 2015) puisqu'il a en effet été démontré que la connectivité fonctionnelle entre l'hippocampe dorsal et le cortex préfrontal était altérée dans le cas de ces maladies. Ce type de connectivité ne peut pas être étudié par imagerie optique se limitant à la surface du cortex. Le **striatum** est un autre exemple de structure à laquelle il est important de pouvoir accéder dans le cadre de l'étude de la connectivité fonctionnelle sur des modèles pathologiques. En

effet, un défaut de connectivité entre le striatum et le cortex préfrontal a été observé dans le cas de la maladie de Parkinson, de la schizophrénie ou de l'autisme (Shepherd 2013). Le fUS pourra donc certainement apporter des réponses que ne peut pas fournir actuellement l'imagerie optique qui se limite aux structures cérébrales superficielles.

Références du chapitre

- Barttfeld, Pablo, Lynn Uhrig, Jacobo D. Sitt, Mariano Sigman, Béchir Jarraya, and Stanislas Dehaene. 2015. "Signature of Consciousness in the Dynamics of Resting-State Brain Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (3): 887–92. doi:10.1073/pnas.1418031112.
- Bercoff, J., G. Montaldo, T. Loupas, D. Savary, F. Meziere, M. Fink, and M. Tanter. 2011. "Ultrafast Compound Doppler Imaging: Providing Full Blood Flow Characterization." *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 58 (1): 134–47.
- Birn, Rasmus M. 2012. "The Role of Physiological Noise in Resting-State Functional Connectivity." *NeuroImage* 62 (2): 864–70. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.01.016.
- Biswal, Bharat, F. Zerrin Yetkin, Victor M. Haughton, and James S. Hyde. 1995. "Functional Connectivity in the Motor Cortex of Resting Human Brain Using Echo-Planar Mri." *Magnetic Resonance in Medicine* 34 (4): 537–41. doi:10.1002/mrm.1910340409.
- Brier, M. R., J. B. Thomas, A. Z. Snyder, T. L. Benzinger, D. Zhang, M. E. Raichle, D. M. Holtzman, J. C. Morris, and B. M. Ances. 2012. "Loss of Intranetwork and Internetwork Resting State Functional Connections with Alzheimer's Disease Progression." *Journal of Neuroscience* 32 (26): 8890–99. doi:10.1523/JNEUROSCI.5698-11.2012.
- Buckner, R. L., J. R. Andrews-Hanna, and D. L. Schacter. 2008. "The Brain's Default Network: Anatomy, Function, and Relevance to Disease." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1124 (1): 1–38. doi:10.1196/annals.1440.011.
- Bumstead, J. R., A. Q. Bauer, P. W. Wright, and J. P. Culver. 2016. "Cerebral Functional Connectivity and Mayer Waves in Mice: Phenomena and Separability." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, February. doi:10.1177/0271678X16629977.
- Damoiseaux, J. S., S. A. R. B. Rombouts, F. Barkhof, P. Scheltens, C. J. Stam, S. M. Smith, and C. F. Beckmann. 2006. "Consistent Resting-State Networks across Healthy Subjects." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (37): 13848–53. doi:10.1073/pnas.0601417103.
- Demene, C., T. Deffieux, M. Pernot, B.F. Osmanski, V. Biran, J.-C. Gennisson, L.-A. Sieu, et al. 2015. "Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity." *IEEE Transactions on Medical Imaging* PP (99): 1–1.
- Fair, Damien A., Bradley L. Schlaggar, Alexander L. Cohen, Francis M. Miezin, Nico U.F. Dosenbach, Kristin K. Wenger, Michael D. Fox, Abraham Z. Snyder, Marcus E. Raichle, and Steven E. Petersen. 2007. "A Method for Using Blocked and Event-Related fMRI Data to Study 'resting State' Functional Connectivity." *NeuroImage* 35 (1): 396–405. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.11.051.
- Fox, M. D., A. Z. Snyder, J. L. Vincent, M. Corbetta, D. C. Van Essen, and M. E. Raichle. 2005. "From The Cover: The Human Brain Is Intrinsically Organized into Dynamic, Anticorrelated Functional Networks." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (27): 9673–78. doi:10.1073/pnas.0504136102.
- Fox, M. D., D. Zhang, A. Z. Snyder, and M. E. Raichle. 2009. "The Global Signal and Observed Anticorrelated Resting State Brain Networks." *Journal of Neurophysiology* 101 (6): 3270–83. doi:10.1152/jn.90777.2008.
- Fox, Michael D., and Marcus E. Raichle. 2007. "Spontaneous Fluctuations in Brain Activity Observed with Functional Magnetic Resonance Imaging." *Nature Reviews Neuroscience* 8 (9): 700–711. doi:10.1038/nrn2201.
- Grandjean, Joanes, Aileen Schroeter, Imene Batata, and Markus Rudin. 2014. "Optimization of Anesthesia Protocol for Resting-State fMRI in Mice Based on Differential Effects of Anesthetics on Functional Connectivity Patterns." *NeuroImage* 102 (November): 838–47. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.08.043.
- Greicius, M. D., G. Srivastava, A. L. Reiss, and V. Menon. 2004. "Default-Mode Network Activity Distinguishes Alzheimer's Disease from Healthy Aging: Evidence from Functional MRI."

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (13): 4637–42. doi:10.1073/pnas.0308627101.
- Greicius, Michael. 2008. “Resting-State Functional Connectivity in Neuropsychiatric Disorders.” *Current Opinion in Neurology* 24 (4): 424–30. doi:10.1097/WCO.0b013e328306f2c5.
- Hutchison, R. Matthew, L. Stan Leung, Seyed M. Mirsattari, Joseph S. Gati, Ravi S. Menon, and Stefan Everling. 2011. “Resting-State Networks in the Macaque at 7T.” *NeuroImage* 56 (3): 1546–55. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.02.063.
- Jonckers, Elisabeth, Rafael Delgado y Palacios, Disha Shah, Caroline Guglielmetti, Marleen Verhoye, and Annemie Van der Linden. 2014. “Different Anesthesia Regimes Modulate the Functional Connectivity Outcome in Mice: Anesthesia and Functional Connectivity Outcome in Mice.” *Magnetic Resonance in Medicine* 72 (4): 1103–12. doi:10.1002/mrm.24990.
- Jonckers, Elisabeth, Disha Shah, Julie Hamaide, Marleen Verhoye, and Annemie Van der Linden. 2015. “The Power of Using Functional fMRI on Small Rodents to Study Brain Pharmacology and Disease.” *Frontiers in Pharmacology* 6 (October). doi:10.3389/fphar.2015.00231.
- Jonckers, Elisabeth, Johan Van Audekerke, Geofrey De Visscher, Annemie Van der Linden, and Marleen Verhoye. 2011. “Functional Connectivity fMRI of the Rodent Brain: Comparison of Functional Connectivity Networks in Rat and Mouse.” Edited by Izumi Sugihara. *PLoS ONE* 6 (4): e18876. doi:10.1371/journal.pone.0018876.
- Julien, C. 2006. “The Enigma of Mayer Waves: Facts and Models.” *Cardiovascular Research* 70 (1): 12–21. doi:10.1016/j.cardiores.2005.11.008.
- Kalthoff, Daniel, Chrystelle Po, Dirk Wiedermann, and Mathias Hoehn. 2013. “Reliability and Spatial Specificity of Rat Brain Sensorimotor Functional Connectivity Networks Are Superior under Sedation Compared with General Anesthesia: RSfMRI UNDER SEDATION AND ANESTHESIA.” *NMR in Biomedicine*, January, n/a-n/a. doi:10.1002/nbm.2908.
- Kennedy, D. P., E. Redcay, and E. Courchesne. 2006. “Failing to Deactivate: Resting Functional Abnormalities in Autism.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (21): 8275–80. doi:10.1073/pnas.0600674103.
- Kislin, Mikhail, Ekaterina Mugantseva, Dmitry Molotkov, Natalia Kuleskaya, Stanislav Khirug, Ilya Kirilkin, Evgeny Pryazhnikov, et al. 2014. “Flat-Floored Air-Lifted Platform: A New Method for Combining Behavior with Microscopy or Electrophysiology on Awake Freely Moving Rodents.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 88(June). doi:10.3791/51869.
- Li, Ming, Cheng Long, and Li Yang. 2015. “Hippocampal-Prefrontal Circuit and Disrupted Functional Connectivity in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders.” *BioMed Research International* 2015: 1–10. doi:10.1155/2015/810548.
- Liu, X., X.-H. Zhu, Y. Zhang, and W. Chen. 2011. “Neural Origin of Spontaneous Hemodynamic Fluctuations in Rats under Burst-Suppression Anesthesia Condition.” *Cerebral Cortex* 21 (2): 374–84. doi:10.1093/cercor/bhq105.
- Lowe, Mark J., Mario Dzemidzic, Joseph T. Lurito, Vincent P. Mathews, and Micheal D. Phillips. 2000. “Correlations in Low-Frequency BOLD Fluctuations Reflect Cortico-Cortical Connections.” *NeuroImage* 12 (5): 582–87. doi:10.1006/nimg.2000.0654.
- Lu, H., Q. Zou, H. Gu, M. E. Raichle, E. A. Stein, and Y. Yang. 2012. “Rat Brains Also Have a Default Mode Network.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (10): 3979–84. doi:10.1073/pnas.1200506109.
- Lu, H., Y. Zuo, H. Gu, J. A. Waltz, W. Zhan, C. A. Scholl, W. Rea, Y. Yang, and E. A. Stein. 2007. “Synchronized Delta Oscillations Correlate with the Resting-State Functional MRI Signal.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (46): 18265–69. doi:10.1073/pnas.0705791104.
- Ma, Ying, Mohammed A. Shaik, Mariel G. Kozberg, Sharon H. Kim, Jacob P. Portes, Dmitriy Timerman, and Elizabeth M. C. Hillman. 2016. “Resting-State Hemodynamics Are Spatiotemporally Coupled to Synchronized and Symmetric Neural Activity in Excitatory Neurons.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (52): E8463–71. doi:10.1073/pnas.1525369113.

- Margulies, Daniel S., Joachim Böttger, Xiangyu Long, Yating Lv, Clare Kelly, Alexander Schäfer, Dirk Goldhahn, et al. 2010. "Resting Developments: A Review of fMRI Post-Processing Methodologies for Spontaneous Brain Activity." *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 23 (5–6): 289–307. doi:10.1007/s10334-010-0228-5.
- Moussa, Malaak N., Matthew R. Steen, Paul J. Laurienti, and Satoru Hayasaka. 2012. "Consistency of Network Modules in Resting-State fMRI Connectome Data." Edited by Yu-Feng Zang. *PLoS ONE* 7 (8): e44428. doi:10.1371/journal.pone.0044428.
- Nasrallah, Fatima A., Hui-Chien Tay, and Kai-Hsiang Chuang. 2014. "Detection of Functional Connectivity in the Resting Mouse Brain." *NeuroImage* 86 (February): 417–24. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.10.025.
- Osmanski, Bruno-Félix, Sophie Pezet, Ana Ricobaraza, Zsolt Lenkei, and Mickael Tanter. 2014. "Functional Ultrasound Imaging of Intrinsic Connectivity in the Living Rat Brain with High Spatiotemporal Resolution." *Nature Communications* 5 (October): 5023. doi:10.1038/ncomms6023.
- Provost, Jean, Clement Papadacci, Juan Esteban Arango, Marion Imbault, Mathias Fink, Jean-Luc Gennisson, Mickael Tanter, and Mathieu Pernot. 2014. "3D Ultrafast Ultrasound Imaging *in Vivo*." *Physics in Medicine and Biology* 59 (19): L1–13.
- Scheinin, M, A Kallio, M Koulu, J Viikari, and H Scheinin. 1987. "Sedative and Cardiovascular Effects of Medetomidine, a Novel Selective Alpha 2-Adrenoceptor Agonist, in Healthy Volunteers." *British Journal of Clinical Pharmacology* 24 (4): 443–51. doi:10.1111/j.1365-2125.1987.tb03196.x.
- Sforazzini, Francesco, Adam J. Schwarz, Alberto Galbusera, Angelo Bifone, and Alessandro Gozzi. 2014. "Distributed BOLD and CBV-Weighted Resting-State Networks in the Mouse Brain." *NeuroImage* 87 (February): 403–15. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.09.050.
- Shah, Disha, Ines Blockx, Georgios A. Keliris, Firat Kara, Elisabeth Jonckers, Marleen Verhoye, and Annemie Van der Linden. 2016. "Cholinergic and Serotonergic Modulations Differentially Affect Large-Scale Functional Networks in the Mouse Brain." *Brain Structure and Function* 221 (6): 3067–79. doi:10.1007/s00429-015-1087-7.
- Shah, Disha, Elisabeth Jonckers, Jelle Praet, Greetje Vanhoutte, Rafael Delgado y Palacios, Christian Bigot, Dany V. D'Souza, Marleen Verhoye, and Annemie Van der Linden. 2013. "Resting State fMRI Reveals Diminished Functional Connectivity in a Mouse Model of Amyloidosis." Edited by Daniel Margulies. *PLoS ONE* 8 (12): e84241. doi:10.1371/journal.pone.0084241.
- Shepherd, Gordon M. G. 2013. "Corticostriatal Connectivity and Its Role in Disease." *Nature Reviews Neuroscience* 14 (4): 278–91. doi:10.1038/nrn3469.
- Sierakowiak, Adam, Cyril Monnot, Sahar Nikkhou Aski, Martin Uppman, Tie-Qiang Li, Peter Damberg, and Stefan Brené. 2015. "Default Mode Network, Motor Network, Dorsal and Ventral Basal Ganglia Networks in the Rat Brain: Comparison to Human Networks Using Resting State-fMRI." Edited by Alessandro Gozzi. *PLOS ONE* 10 (3): e0120345. doi:10.1371/journal.pone.0120345.
- Sieu, Lim-Anna, Antoine Bergel, Elodie Tiran, Thomas Deffieux, Mathieu Pernot, Jean-Luc Gennisson, Mickaël Tanter, and Ivan Cohen. 2015. "EEG and Functional Ultrasound Imaging in Mobile Rats." *Nature Methods* 12 (9): 831–34. doi:10.1038/nmeth.3506.
- Stafford, James M., Benjamin R. Jarrett, Oscar Miranda-Dominguez, Brian D. Mills, Nicholas Cain, Stefan Mihalas, Garet P. Lahvis, et al. 2014. "Large-Scale Topology and the Default Mode Network in the Mouse Connectome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (52): 18745–50. doi:10.1073/pnas.1404346111.
- Tong, Yunjie, Lia M. Hocke, Xiaoying Fan, Amy C. Janes, and Blaise deB Frederick. 2015. "Can Apparent Resting State Connectivity Arise from Systemic Fluctuations?" *Frontiers in Human Neuroscience* 9 (May). doi:10.3389/fnhum.2015.00285.
- Tong, Yunjie, Lia M. Hocke, Lisa D. Nickerson, Stephanie C. Licata, Kimberly P. Lindsey, and Blaise deB. Frederick. 2013. "Evaluating the Effects of Systemic Low Frequency Oscillations Measured in

- the Periphery on the Independent Component Analysis Results of Resting State Networks.” *NeuroImage* 76 (August): 202–15. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.03.019.
- Upadhyay, Jaymin, Scott J. Baker, Prasant Chandran, Loan Miller, Younglim Lee, Gerard J. Marek, Unal Sakoglu, et al. 2011. “Default-Mode-Like Network Activation in Awake Rodents.” Edited by Pedro Antonio Valdes-Sosa. *PLoS ONE* 6 (11): e27839. doi:10.1371/journal.pone.0027839.
- Van Dijk, K. R. A., T. Hedden, A. Venkataraman, K. C. Evans, S. W. Lazar, and R. L. Buckner. 2010. “Intrinsic Functional Connectivity As a Tool For Human Connectomics: Theory, Properties, and Optimization.” *Journal of Neurophysiology* 103 (1): 297–321. doi:10.1152/jn.00783.2009.
- Whitfield-Gabrieli, S., H. W. Thermenos, S. Milanovic, M. T. Tsuang, S. V. Faraone, R. W. McCarley, M. E. Shenton, et al. 2009. “Hyperactivity and Hyperconnectivity of the Default Network in Schizophrenia and in First-Degree Relatives of Persons with Schizophrenia.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (4): 1279–84. doi:10.1073/pnas.0809141106.

CHAPITRE VI :

Conclusion générale

VI. Conclusion générale

VI.1. Résumé de la thèse

Ce travail de thèse, débuté en mai 2014, s'est inscrit dans la continuité d'un travail réalisé à l'Institut Langevin depuis les années 2010 : la technique d'imagerie fonctionnelle du cerveau par ultrason ultrarapide, plus connue sous le nom d'imagerie fUS (*functional ultrasound imaging*) a en effet été publiée pour la première fois en 2011 (Macé et al. 2011). L'imagerie fUS a ensuite été rapidement utilisée au laboratoire en collaboration avec des neurobiologistes pour plusieurs applications à la fois chez le rat anesthésié (Osmanski et al. 2014a; Osmanski et al. 2014b) mais aussi chez le nouveau-né (Demené et al. 2014).

Mon travail de thèse repose sur l'application du fUS dans le domaine de l'imagerie cérébrale préclinique chez le petit animal. Dans ce domaine plusieurs perspectives restaient encore à explorer ou étaient en cours d'investigation à mon arrivée au laboratoire. Les deux objectifs principaux étaient de démontrer la *faisabilité de l'imagerie fUS chez le petit animal non anesthésié* mais aussi de *passer du modèle rat au modèle souris*, tout en essayant d'aller vers l'imagerie la moins invasive possible.

Dans le premier chapitre d'introduction nous avons rappelé le principe de l'imagerie Doppler ultrarapide, son apport par rapport à l'imagerie Doppler conventionnelle par focalisation, et notamment comment la cadence ultrarapide de cette technique a permis de développer l'imagerie fUS. Nous avons également situé le fUS par rapport à quelques autres techniques d'imagerie cérébrales existantes, afin de montrer son fort potentiel, et notamment sa capacité à concurrencer l'IRMf qui est actuellement encore la technique de référence dans le domaine de l'imagerie fonctionnelle cérébrale.

Dans le deuxième chapitre, nous avons montré comment la technique classique de recombinaison cohérente d'ondes planes inclinées (*coherent compounding*) pouvait être modifiée afin d'améliorer encore le rapport signal-à-bruit des images acquises par imagerie Doppler ultrarapide. Nous avons en effet mis au point une toute nouvelle séquence d'imagerie par émission d'ondes planes que nous avons appelée *Multiplane Wave imaging*. Cette technique repose sur l'envoi simultané de N ondes planes au sein d'un même tir ultrasonore. Un habile jeu de coefficients +1 et -1 appliqué aux amplitudes des ondes planes à l'émission et une simple étape d'additions et de soustractions des images après réception, permet d'augmenter virtuellement l'amplitude des ondes planes émises. Finalement, le bruit étant inchangé mais le signal augmenté, le rapport signal-à-bruit de l'image finale

est amélioré, tout en conservant une cadence d'imagerie ultrarapide inchangée. Le *Multiplane Wave imaging* a donc de nombreuses applications potentielles, tant sur le plan de l'imagerie préclinique que clinique, puisque cette séquence ultrasonore pourra en effet s'avérer utile chaque fois qu'une grande cadence d'imagerie est nécessaire et que la profondeur de pénétration des ultrasons a besoin d'être améliorée. Dans le domaine de l'imagerie cérébrale préclinique chez le petit animal nous avons démontré *in vivo* chez le rat anesthésié que le Multiplane Wave permettait en effet de visualiser des vaisseaux sanguins plus en profondeur.

Cette nouvelle séquence ultrasonore a suscité un fort intérêt lors de notre présentation au congrès IEEE 2016 à Tours, au cours duquel elle m'a permis de remporter le prix *Student Award* de l'*International Ultrasonics Symposium*. Très récemment, l'idée du Multiplane Wave a également été déjà reprise par d'autres équipes de chercheurs afin d'améliorer l'imagerie harmonique (Gong et al. 2016).

Après ce premier chapitre de résultat plutôt technique nous avons abordé dans les trois chapitres suivants des questions plus en rapport avec les neurosciences. Dans le **chapitre III** nous avons démontré la possibilité d'utiliser l'imagerie Doppler ultrarapide de manière complètement non invasive chez la souris anesthésiée quel que soit son âge, et chez le jeune rat jusqu'à l'âge d'environ 1 mois. La possibilité d'imager le cerveau d'un modèle animal tel que la souris de manière complètement non invasive grâce aux ultrasons est un résultat important puisque ceci ouvre la porte à des études longitudinales, sans aucun risque d'infection et/ou de douleur, contrairement à ce qui peut actuellement être fait grâce au fUS chez le rat adulte (pour lequel une craniotomie, une fenêtre de crâne aminci ou l'injection d'agents de contraste reste nécessaire). Ce résultat est important puisqu'il permet ainsi de se rapprocher d'un niveau d'invasivité comparable à celui de l'IRMf.

Dans le chapitre suivant nous avons montré la possibilité de transposer l'utilisation de l'imagerie fUS de l'animal anesthésié vers l'animal éveillé et en mouvement. Une collaboration avec l'équipe du Dr Ivan Cohen de l'Institut de Biologie Paris Seine à l'UPMC, a permis de faire la première preuve de concept de l'utilisation du fUS chez le rat éveillé et en mouvement. Puis avec l'équipe du Dr Zsolt Lenkei du laboratoire Plasticité du Cerveau à l'ESPCI, nous avons mis au point un montage expérimental, une séquence ultrasonore et un protocole expérimental, adaptés cette fois au modèle souris. En utilisant les résultats du chapitre précédent nous avons pu montrer la possibilité de réaliser des études d'imagerie fonctionnelle cérébrale de manière minimalement invasive, chez des souris éveillées et libres de leurs mouvements. L'aspect « *freely-moving* » est très important puisqu'il pourra permettre dans le futur des études comportementales actuellement impossibles en IRMf par exemple.

Dans le cinquième et dernier chapitre de résultats nous avons appliqué le fUS à l'étude la connectivité fonctionnelle chez la souris. Dans la suite de ce qui avait déjà été fait au laboratoire chez le rat anesthésié et dans la continuité des chapitres précédents de cette thèse, nous avons démontré qu'il était possible d'utiliser le fUS pour étudier des réseaux de connectivité fonctionnelle chez la souris, de manière transcrânienne, dans différents état d'éveil et de sédation. Pour cela nous avons utilisé un nouveau système expérimental, permettant à la souris de rester mobile tout en ayant la tête fixée, que nous avons adapté à l'imagerie fUS. Nous avons pu mettre en évidence des variations de la connectivité fonctionnelle en fonction de l'état d'éveil mais aussi suite à des stimulations des vibrisses. Nous avons présenté quelques résultats encourageants concernant l'étude du célèbre « *Default Mode Network* », réseau de connectivité fonctionnelle largement étudié actuellement car impliqué dans de nombreuses maladies psychiatriques et neurologiques. Nous avons notamment pu mettre en évidence, pour la première fois chez la souris, une baisse de la corrélation de certaines zones du *Default Mode Network* lors du passage de l'état de repos (*resting state*) à une activité stimulée. Ces résultats ouvrent la voie à l'utilisation du fUS pour l'étude de la variation de la connectivité fonctionnelle sur des modèles pathologiques et pharmacologiques chez la souris. En termes d'étude de connectivité fonctionnelle chez l'animal éveillé et notamment chez la souris, le fUS présente l'avantage, par rapport aux autres techniques concurrentes d'imagerie fonctionnelle optiques, de pouvoir accéder à des zones sous-corticales (hippocampe, striatum...) dont l'importance dans les maladies psychiatriques et neurologiques a déjà été démontrée en IRMf chez l'Homme.

En conclusion, le travail que j'ai accompli durant cette thèse, en poursuivant les travaux réalisés au laboratoire précédemment sur le modèle du rat anesthésié, a permis d'obtenir des résultats clés ouvrant des perspectives nouvelles et prometteuses pour la recherche en neurosciences précliniques. En effet, l'utilisation du fUS et de la combinaison « modèle souris » + « minimalement invasif » + « animal éveillé » + « connectivité fonctionnelle » font de cette technique ultrasonore un outil précieux pour la communauté des neuroscientifiques. Combiné à son plus faible coût, sa capacité à pouvoir être associé à d'autres techniques d'électrophysiologie, à sa plus grande portabilité que l'IRMf, ainsi qu'à sa grande résolution spatiale et temporelle, le fUS pourra facilement et rapidement trouver sa place dans de nombreux laboratoires de neuroscience travaillant sur des modèles animaux pathologiques ou de nouvelles molécules pharmacologiques et a donc de nombreuses perspectives devant lui.

VI.2. Perspectives de la thèse

Plusieurs perspectives à court et plus long termes se dégagent de ce travail de thèse. Voici quelques-unes des directions dans lesquelles il me semblerait intéressant de poursuivre les recherches.

Multiplane Wave Imaging

Concernant le Multiplane Wave, nouvelle séquence d'imagerie mise au point et présentée dans le **chapitre II**, il serait intéressant de tirer parti de la plus grande profondeur de pénétration permise par cette séquence ultrasonore afin de réaliser des études d'imagerie fonctionnelle cérébrales dans des zones profondes du cerveau du rat (amygdales, substances noires...). En effet, dans le cadre de ma thèse j'ai surtout travaillé sur le modèle souris, chez qui le cerveau est moins grand et donc pour lequel il n'était pas absolument nécessaire d'augmenter la profondeur de pénétration. De plus, la séquence Multiplane Wave n'était alors pas encore suffisamment optimisée pour permettre l'imagerie fUS à des cadences d'imagerie de l'ordre de 1 image Doppler par seconde. Nous avons donc utilisé des séquences plus classiques que le Multiplane Wave dans nos expérimentations fUS chez la souris. Aujourd'hui cependant, les optimisations récentes de la séquence Multiplane Wave, permettant de réduire les temps de calculs de *beamforming* notamment, rendent la combinaison « fUS + Multiplane Wave » possible et ce type d'expérimentation pourrait donc être testé très prochainement chez des rats adultes afin de mesurer tout l'intérêt de notre nouvelle séquence pour l'imagerie fonctionnelle.

Il serait également utile de poursuivre ce que nous avons démontré dans le **chapitre III** concernant l'imagerie transcrânienne chez le jeune rat et chez la souris en utilisant le Multiplane Wave. Il pourrait en effet être intéressant de regarder si l'augmentation du SNR qu'apporte cette nouvelle séquence permettrait par exemple de rallonger la période durant laquelle le cerveau des jeunes rats peut être imagé de façon transcrânienne.

Le Multiplane Wave pourrait également avoir de nombreuses applications cliniques : amélioration de l'imagerie des organes profonds tels que le rein en imagerie Doppler, ou le foie en imagerie par élastographie. Des études cliniques sur la fibrose du foie ou le cancer du foie pourraient être réalisées afin de démontrer l'impact du gain en SNR et en profondeur de pénétration du Multiplane Wave dans le diagnostic de ces pathologies.

Connectivité fonctionnelle et étude du développement chez le jeune rat

Il pourrait être intéressant de tirer parti des résultats présentés dans le **chapitres III** (imagerie transcrânienne chez le raton) et le **chapitre V** (connectivité fonctionnelle), et d'imager la connectivité fonctionnelle au cours du développement du jeune rat, de façon longitudinale, en suivant le même

groupe de rats au cours du temps. Ce travail avait été amorcé durant ma thèse mais nécessitait encore de l'optimisation au niveau des protocoles expérimentaux, notamment au niveau du choix de l'anesthésique afin de pouvoir obtenir des résultats fiables et répétables d'un animal à l'autre et d'un âge à l'autre. En effet, il nous était difficile de stabiliser les anesthésies chez les rats les plus jeunes, âgés seulement de quelques jours.

Imagerie cérébrale du petit animal et monitoring : combinaison fUS + EEG

Chez le rat éveillé (Sieu et al. 2015), il a été possible de combiner fUS et EEG afin de pouvoir étudier de manière précise les crises d'épilepsie. La combinaison de l'EEG au fUS devrait également être faite dans les futures études de connectivité fonctionnelle réalisées chez la souris éveillée afin de pouvoir mieux évaluer l'état cérébral dans lequel se trouve l'animal à chaque instant et raffiner le processus de sélection des données. Pour cela, de nouveaux dispositifs, ultra légers et ultra fins, permettant l'enregistrement EEG de manière transcrânienne et non invasive chez la souris, pourraient être adaptés à notre système expérimental de fixation de la sonde ultrasonore. Cette amélioration de notre système expérimental est actuellement en cours. Dans la même perspective d'améliorer l'analyse *a posteriori* des données acquises, il serait intéressant de monitorer de façon systématique d'autres paramètres tels que la pulsativité cardiaque ou encore la respiration. L'extraction de la pulsativité dans les données acquises par ultrasons est une des perspectives sur lesquelles des travaux sont déjà en cours à l'Institut Langevin.

Connectivité fonctionnelle et 3D

Afin de pouvoir rivaliser avec l'IRMf sur tous les points, le fUS devra se doter d'une troisième dimension. En effet les acquisitions fUS sont actuellement faites uniquement dans un plan en 2D à l'aide de sondes linéaires. Le fUS 3D et l'étude de la connectivité fonctionnelle en 3D pourront être réalisés grâce à l'utilisation de sondes matricielles qui permettent d'acquérir un volume directement. Pour le moment ce genre de sonde n'envoie pas d'onde ultrasonore de suffisamment haute fréquence pour l'imagerie du cerveau du petit animal. De plus, ces sondes sont bien plus grosses que celles que nous avons utilisées dans cette thèse et ne pourraient donc pas être utilisées chez des animaux éveillés et libres de leurs mouvements. Il faudra attendre une miniaturisation de celles-ci ou utiliser un système « tête-fixée » comme nous l'avons fait dans le chapitre V afin de ne pas faire porter à la souris le poids de la sonde 3D.

Connectivité fonctionnelle et modèles pathologiques

Enfin, une des perspectives les plus importantes de cette thèse est l'application de tous les résultats présentés à l'étude de modèles pharmacologiques ou pathologiques existants chez la souris.

Il est notamment envisagé dans un futur proche d'utiliser le fUS afin de comparer la connectivité fonctionnelle entre un groupe de souris saines et un groupe de souris « autistes » par exemple.

Dans un futur plus lointain il pourrait également être imaginé d'étudier « le cerveau social » : plusieurs souris éveillées, saines ou appartenant à un groupe modèle de l'autisme, pourraient être imagées simultanément afin de comparer ce qu'il se passe respectivement dans leur cerveau lors de leur mise en contact...

Bien d'autres perspectives de l'utilisation du fUS dans le champ des neurosciences précliniques pourraient être encore imaginées. N'oublions pas non plus que cette technique est également utilisée en parallèle dans le domaine clinique, chez le nouveau-né, et en peropératoire chez l'Homme adulte. En effet, chez le nouveau-né les os du crâne n'étant pas encore complètement soudés, il est possible d'imager le cerveau par ultrasons à travers la fenêtre d'imagerie naturelle qu'est la fontanelle. Chez l'Homme adulte, les opérations à crâne ouvert pour retirer des tumeurs cérébrales notamment, permettent de placer la sonde ultrasonore directement au contact du cerveau. Chez le nouveau-né l'imagerie ultrasonore ultrarapide peut permettre une nouvelle forme de monitoring non invasif et temps réel de différents paramètres tels que la résistivité cérébrale (Demené et al. 2014). L'étude de la connectivité fonctionnelle chez le nouveau-né grâce au fUS pourrait également apporter de précieuses informations sur l'état cérébral des enfants nés prématurément, le tout sans avoir besoin de les stimuler puisqu'il suffit d'étudier l'état de « *resting state* ». Chez l'Homme adulte, le fUS peut aider lors des résections de tumeurs cérébrales à délimiter très précisément et préserver les zones fonctionnelles vitales entourant la tumeur (Imbault et al. 2016). La translation des méthodes d'imagerie et des marqueurs de diagnostic développés en préclinique vers ces deux autres champs d'application ouvre donc encore de très nombreuses et très intéressantes perspectives.

VI.3. Publications

L-A. Sieu, A. Bergel, **E. Tiran**, T. Deffieux, M. Pernot, J-L. Gennisson, M. Tanter, I. Cohen

« EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats »

Nature Methods 12, 831-834, doi:10.1038/nmeth.3506 **(2015)**

E. Tiran, T. Deffieux, M. Correia, D. Maresca, B-F. Osmanski, L-A. Sieu, A. Bergel, I. Cohen, M. Pernot, M. Tanter

« Multiplane Wave imaging increases signal-to-noise ratio in ultrafast ultrasound imaging »

Physics in Medicine and Biology 60, 8549-8666, doi:10.1088/0031-9155/60/21/8549 **(2015)**

C. Demené, **E. Tiran**, L-A. Sieu, A. Bergel, J-L. Gennisson, M. Pernot, T. Deffieux, I. Cohen, M. Tanter,
« 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography »
NeuroImage 127, 472–483, doi:10.1016/j.neuroimage.2015.11.014 **(2016)**

E. Tiran, J. Ferrier, T. Deffieux, J-L. Gennisson, S. Pezet, Z. Lenkei, M. Tanter
« Transcranial functional ultrasound imaging in freely-moving awake mice and anesthetized young rats
without contrast agent »
(soumis à Ultrasound in Medicine and Biology) **(2017)**

VI.4. Présentations orales en conférences internationales

(* : orateur)

E. Tiran*, J. Ferrier, B-F. Osmanski, T. Deffieux, S. Pezet, Z. Lenkei, M. Tanter
« Functional connectivity of the mouse brain using transcranial functional ultrasound (fUS) »
IEEE International Ultrasonics Symposium (Taipei, Taiwan), **2015**

E. Tiran*, T. Deffieux, M. Correia, D. Maresca, B-F. Osmanski, L-A. Sieu, A. Bergel, I. Cohen, M. Pernot,
M. Tanter
« Multiplane Wave imaging for ultrafast ultrasound imaging at higher signal-to-noise ratio »
IEEE International Ultrasonics Symposium (Tours, France), **2016, Student Award**

E. Cohen*, T. Deffieux, **E. Tiran**, C. Demené, L. Cohen, M. Tanter
« Ultrasensitive Doppler based neuronavigation system for preclinical brain imaging applications »
IEEE International Ultrasonics Symposium (Tours, France), **2016**

Références du chapitre

- Demené C, Pernot M, Biran V, Alison M, Fink M, Baud O, Tanter M. Ultrafast Doppler reveals the mapping of cerebral vascular resistivity in neonates. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34:1009–1017.
- Gong P, Song P, Chen S. Delay-encoded Harmonic Imaging (DE-HI) in Multiplane-wave Compounding. *IEEE Trans Med Imaging* 2016;1–1.
- Imbault M, Serroune H, Gennisson J, Tanter M, Chauvet D, Capelle L, Lehericy S. Functional ultrasound imaging of the human brain activity: An intraoperative pilot study for cortical functional mapping. *IEEE*, 2016 [cited 2017 Jan 25]. pp. 1–4. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7728505/>
- Macé E, Montaldo G, Cohen I, Baulac M, Fink M, Tanter M. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat Methods* 2011;8:662–664.
- Osmanski BF, Martin C, Montaldo G, Lanièce P, Pain F, Tanter M, Gurden H. Functional ultrasound imaging reveals different odor-evoked patterns of vascular activity in the main olfactory bulb and the anterior piriform cortex. *NeuroImage* 2014a;95:176–184.
- Osmanski B-F, Pezet S, Ricobaraza A, Lenkei Z, Tanter M. Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nat Commun* 2014b;5:5023.
- Sieu L-A, Bergel A, Tiran E, Deffieux T, Pernot M, Gennisson J-L, Tanter M, Cohen I. EEG and functional ultrasound imaging in mobile rats. *Nat Methods* 2015;12:831–834.