

Titre: Développement d'une nouvelle méthode d'imagerie pour la mesure de la pulsatilité dans l'arbre vasculaire cérébral à l'aide de la
Title: de la pulsatilité dans l'arbre vasculaire cérébral à l'aide de la
microscopie de localisation ultrasonore dynamique

Auteur: Chloé Bourquin
Author:

Date: 2023

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Bourquin, C. (2023). Développement d'une nouvelle méthode d'imagerie pour la
Citation: mesure de la pulsatilité dans l'arbre vasculaire cérébral à l'aide de la microscopie
de localisation ultrasonore dynamique [Thèse de doctorat, Polytechnique
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/55118/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/55118/>
PolyPublie URL:

Directeurs de
recherche: Jean Provost, & Frédéric Lesage
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Développement d'une nouvelle méthode d'imagerie pour la mesure de la
pulsatilité dans l'arbre vasculaire cérébral à l'aide de la Microscopie de
Localisation Ultrasonore Dynamique**

CHLOÉ BOURQUIN

Institut de génie biomédical

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiæ Doctor*

Génie biomédical

Août 2023

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

Développement d'une nouvelle méthode d'imagerie pour la mesure de la pulsatilité dans l'arbre vasculaire cérébral à l'aide de la Microscopie de Localisation Ultrasonore Dynamique

présentée par **Chloé BOURQUIN**

en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiæ Doctor*

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Caroline BOUDOUX, présidente

Jean PROVOST, membre et directeur de recherche

Frédéric LESAGE, membre et codirecteur de recherche

Hélène GIROUARD, membre

Matthew BRUCE, membre externe

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Jean Provost. Lorsque j'ai appelé Jean un peu par hasard en octobre 2017 pour avoir un retour d'expérience sur sa propre maîtrise à Polytechnique Montréal, je ne pensais pas que quelques mois plus tard, il allait m'annoncer qu'il allait lui-même devenir professeur là-bas, et me proposer de venir y faire ma maîtrise - puis mon doctorat peu de temps après. Les expériences ont démarré sur les chapeaux de roues dès l'automne 2018, pour présenter nos premiers résultats in vivo moins d'un an plus tard à ma première conférence IEEE IUS ! Merci pour ton soutien, tes retours, tes conseils, et de m'avoir laissée faire « autre chose » que le seul travail académique que l'on attend habituellement d'une thèse - enseignement, formations, vulgarisation, stages !

Merci également à mon codirecteur, Frédéric Lesage. Tes conseils et ton soutien m'ont été très précieux tout au long de ma thèse !

Merci aux membres de mon jury d'avoir accepté de réviser mon travail : vos commentaires ont été très intéressants et m'ont permis de l'améliorer grandement.

Merci à Polytechnique Montréal de m'avoir accueillie pendant ces cinq années pour travailler sur ce projet, ainsi qu'à l'Institut de Cardiologie de Montréal et à l'École d'Optométrie de l'Université de Montréal de m'avoir invitée à réaliser en leur sein les expériences présentées dans cette thèse.

Merci au personnel administratif de Polytechnique Montréal, et en particulier à Amal Bennani pour sa patience face à mes multiples questions, qui m'ont permis de réaliser trois stages en parallèle de ce doctorat.

Merci aux microchirurgien.ne.s, aux technicien.ne.s, aux préparateur.rice.s et aux chercheur.se.s pour leur expertise précieuse lors des expériences. Merci tout particulièrement à Marc-Antoine Gillis, Éric Thorin, Irene Londono, Wyston Pierre, Cong Zhang, Marie-Eve Higgins, Géraldine Miquel, Charles-Alexandre LeBlanc de l'ICM, à Myriam Métivier-Bélisle et Diane Vallerand de l'Université de Montréal, et à Nelson Cortes, Hugo Ladret, Lamyae Ikan, Christian Casanova et Matthieu Vanni de l'École d'Optométrie.

Merci également à Labeo Technologies Inc., et en particulier à Samuel Bélanger et Maxime Abran pour leur aide.

Merci aux organismes qui ont soutenu financièrement ce projet : la Fondation canadienne pour l'innovation, le Fonds d'Excellence en recherche Apogée Canada, le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC).

En particulier, j'aimerais remercier le Réseau de Bio-Imagerie du Québec (RBIQ), l'Institut TransMedTech, le Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologie (FRQNT), ainsi que l'Institut de Valorisation des Données (IVADO) pour avoir financé cette thèse.

Merci également à l'Alliance de recherche numérique du Canada et à Calcul Québec.

Merci aux différents médias qui m'ont fait confiance pour collaborer avec eux durant les dernières années.

J'aimerais remercier les trois médias qui m'ont accueillie en leur sein pour des stages pendant ce doctorat : l'Agence Science-Press, La Presse et Le Devoir. Merci en particulier à mes maîtres de stage pour leur compréhension, lorsque je restais tard après les heures de bureau pour répondre à des questions de mes collègues du laboratoire ou pour soumettre un article.

Merci aux médias avec lesquels j'ai pu réaliser des entrevues à propos de ce projet de recherche : les émissions de radio "Moteur de Recherche" et "Pas comme d'habitude" (ICI Radio-Canada), le magazine Curium et la chaîne YouTube Scilabus.

Merci aux médias auprès desquels j'ai eu l'opportunité de publier des travaux de vulgarisation à propos de ce projet ou de ce domaine de recherche : IVADO, La Presse, La Conversation Canada et le Magazine de l'Acfas.

Merci également à l'équipe de Québec Science de m'avoir donné l'occasion de collaborer avec elle.

Merci à tou.te.s mes collègues du laboratoire, passé.e.s et présent.e.s !

Merci à Jonathan, Stephen et Vincent pour votre aide, pour les codes et lors des expériences.

Merci aux étudiants de la première heure au lab, Philippe, Erwan et Simon.

Merci à Hatim pour ton soutien - je n'oublierai jamais ton muffin à la carotte alors qu'on attendait le taxi près de la Vera sur le parking de l'ICM, la nuit, en plein hiver... le snack le plus réconfortant de la Terre !

Merci Paul, Samuel et Olivier pour votre patience face à mes râleries bien françaises...

Merci Mich et Alexis pour nos longues discussions et fignolages de nos présentations, parfois jusque tard dans la nuit !

Merci Brice pour ton écoute, et pour m'avoir motivée à me lever le matin pour monter la Côte Sainte-Catherine à vélo jusqu'à Poly !

Merci Alice de m'avoir suivie dans cette aventure au cœur de l'hiver montréalais ! Et bonne chance pour la suite du projet !

Merci Nin pour ta gentillesse, ta patience, ton écoute... Le lab est entre de bonnes mains avec toi à son bord !

Et merci Gerardo, de l'Université McGill, pour ton aide et ta bonne humeur.

Merci à tous les comités et organisations dans lesquels je me suis impliquée durant cette thèse. Vous avez été ma bouffée d'air frais entre deux expériences ou conférences !

Un immense merci à mes ami.e.s de Poly-Théâtre de m'avoir accueillie dès mes premiers jours à Montréal ! Vous avez été (et vous êtes toujours) la plus belle des familles d'adoption !

Merci également à ComSciCon-QC et à sa formidable équipe, avec qui j'ai passé de très bons moments à organiser et à participer à des événements de communication scientifique !

Merci à la communauté des vulgarisateur.rice.s scientifiques de l'Acfas et de l'Association des Communicateurs Scientifiques du Québec. Nos échanges et les formations que j'ai pu faire auprès de vous m'ont été très précieux pour la communication de ces travaux, et pour la suite de mon parcours en journalisme scientifique !

Merci à mes ami.e.s, celles et ceux d'ici avec qui j'ai pu faire de multiples sorties camping et chalets entre deux expériences, tout comme celles et ceux de France qui ont suivi les aventures à distance - et qui viennent parfois me rendre visite !

Merci à tous mes colocs pour leur soutien, que ce soit la Colocureuil ou la Kénithurlu. Et merci tout particulièrement d'avoir accueilli mon ordinateur de lab et ses "woosh" réguliers dans le salon pendant la COVID !

Merci à ma famille pour leur soutien indéfectible malgré les quelque 6000 km qui nous séparent ! Je pense qu'à force ils en savent autant que moi sur DULM... (même mes nièces de 6 et 3 ans ont suivi la soutenance à distance de leur "tata canadienne", c'est dire !)

Enfin, merci à toi, Arthur, de m'avoir soutenue durant toute cette aventure, depuis la préparation des premières expériences jusqu'à la relecture complète (!) de ce beau bébé et aux multiples répétitions de ma soutenance, en passant par tous les hauts et les bas de la thèse. Promis, cette fois, c'est la dernière "Attends je te rejoins plus tard, j'ai ma thèse à finir !"

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires peuvent occasionner des dommages au niveau du cerveau. En effet, les artères majeures proches du cœur sont riches en fibres élastiques, permettant d'adoucir au cours du cycle cardiaque les fluctuations de la pression sanguine (ou pulsatilité) plus loin dans l'arbre vasculaire cérébral. Avec l'âge et certaines maladies telles que l'athérosclérose, ces artères deviennent plus rigides, entraînant une augmentation de la pulsatilité en aval et menant à des dommages au niveau des microvaisseaux cérébraux. De ce fait, ces maladies pourraient entraîner sur le long terme des déficits cognitifs, et sont des facteurs de risque pour des maladies neurodégénératives telles que la démence.

Or, si la corrélation a été mise en évidence à plusieurs reprises dans la littérature, la cascade de causes à effet reliant l'augmentation de la pulsatilité à un déficit cognitif n'a pas été établie et est encore mal comprise aujourd'hui. Parvenir à mesurer la pulsatilité dans l'ensemble du réseau vasculaire cérébral, depuis les artères majeures jusqu'aux vaisseaux les plus fins, pourrait donc devenir un outil permettant de mieux comprendre et de mieux étudier les maladies neurodégénératives, voire d'en détecter les signes précoces.

Cependant, les différentes techniques d'imagerie utilisées habituellement pour mesurer la pulsatilité sont confrontées à d'importants compromis en termes de résolution spatiotemporelle et de profondeur de pénétration. Le Doppler Transcrânien (TCD) ultrasonore et l'Imagerie par résonance magnétique (IRM) se concentrent sur la mesure de la pulsatilité dans les artères majeures du cerveau, tandis que la microscopie optique ne permet que la mesure de la pulsatilité dans de microvaisseaux situés à la surface du cerveau.

Récemment, une nouvelle technique d'imagerie ultrasonore a été développée, appelée la Microscopie de Localisation Ultrasonore (ULM) : basée sur la localisation et le suivi de microbulles injectées comme agents de contraste, elle permet de cartographier les vaisseaux avec une résolution de l'ordre de quelques micromètres dans l'ensemble du cerveau. Cette méthode permet de produire des cartes de la vascularisation statiques, et d'en tirer des mesures comme la vitesse moyenne des microbulles dans chaque vaisseau sanguin, mais sans information quant à la dynamique des flux.

Cette thèse propose d'adapter cette méthode d'imagerie à une imagerie dynamique grâce au développement d'une nouvelle technique : la Microscopie de Localisation Ultrasonore

Dynamique (DULM). En synchronisant les séquences ultrasonores avec le cycle cardiaque, nous avons en effet pu obtenir des films de microbulles se propageant dans l'arbre vasculaire au rythme du pouls. De ces films, des mesures quantitatives de la pulsatilité ont pu être extraites pour la première fois en profondeur, dans tout le cerveau, à la fois dans des vaisseaux majeurs et dans des microvaisseaux. Cette méthode a été testée avec succès chez l'animal in vivo, en 2D et en 3D. En 2D, chez le rat avec craniotomie et chez la souris de façon non-invasive, nous avons obtenu des mesures de pulsatilité dans différents vaisseaux de l'arbre vasculaire, d'un diamètre de moins de 100 μm . Au niveau du cortex, chez les deux animaux, nous avons obtenu des mesures de pulsatilité significativement différentes entre les veines et les artères. En 3D, nous avons obtenu des mesures de pulsatilité décroissantes le long de l'arbre vasculaire chez le chat, et celles effectuées dans le cercle de Willis chez la souris ont montré que la pulsatilité était reproductible des deux côtés du cercle.

Cette méthode préclinique et son éventuel transfert en clinique pourrait faciliter à terme la compréhension du mécanisme reliant l'augmentation de la pulsatilité à un déclin cognitif, mais également le diagnostic précoce et le suivi des traitements dans le cadre de l'étude des maladies neurodégénératives.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases may damage the brain. Indeed, major arteries near the heart are rich in elastic fibers, which help to smooth out fluctuations in blood pressure (or pulsatility) further down the cerebral vascular tree during the heart cycle. With age and diseases such as atherosclerosis, these arteries may become stiffer, resulting in an increased pulsatility downstream, damages in cerebral microvessels, and, potentially, long-term cognitive deficits. Cardiovascular diseases are also a risk factor for neurodegenerative ones such as dementia.

Although the correlation has been demonstrated on several occasions in the literature, the cascade of causes and effects linking the increase in pulsatility to a cognitive decline has not been clearly established yet and is still poorly understood today. Measuring pulsatility in the entire cerebral vascular network, from the major arteries to the finest vessels, could therefore become a tool for better understanding, studying and maybe even detecting early signs of neurodegenerative diseases.

Unfortunately, the different imaging techniques typically used to measure pulsatility in the brain face important trade-offs in terms of spatiotemporal resolution and penetration depth. On the one hand, Ultrasound Transcranial Doppler (TCD) and Magnetic resonance imaging (MRI) focus on measuring pulsatility in major arteries of the brain, whereas on the other hand, light microscopy only allows the measurement of pulsatility in microvessels located near the surface of the brain.

Recently, a new ultrasound imaging technique has been developed, called Ultrasound Localization Microscopy (ULM): based on the localization and tracking of microbubbles injected as contrast agents, it enables the mapping of vessels with a resolution of a few micrometers in the whole brain. However, this method produces static maps of the vasculature measurements such as the average velocity of microbubbles in each blood vessel, but without information about the flow dynamics.

This thesis proposes to adapt this imaging method to dynamic imaging by developing a new one: Dynamic Ultrasound Localization Microscopy (DULM). By synchronizing the ultrasound sequences with the cardiac cycle, we were able to obtain cine-loops of microbubbles propagating in the vascular tree at the rhythm of the cardiac cycle. From these cine-loops, quantitative measurements of pulsatility could be extracted for the first time in depth, in the whole brain, both in major vessels and in microvessels. This method was successfully tested in animals in vivo, in 2D and 3D. In 2D, in a rat with craniotomy and a mouse non-invasively, we obtained pulsatility measurements in different vessels of the vascular tree, with a diameter smaller than 100 μm . In the

cortex, in both animals, we obtained significantly different pulsatility measurements between veins and arteries. In 3D, we obtained decreasing pulsatility measurements along the vascular tree in the cat brain, and measurements in the circle of Willis of the mouse showed that pulsatility was reproducible on both sides of the circle.

The transfer of such a method to humans could eventually facilitate the understanding of the mechanism linking increased pulsatility to cognitive decline, and the early diagnosis and monitoring of treatments in the study of neurodegenerative diseases.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	VII
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
LISTE DES FIGURES.....	XVIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 Propagation et régulation de la pulsatilité	4
2.1.1 Physiologie de la circulation sanguine	4
2.1.2 Physique de la pulsatilité et principes mécaniques	8
2.1.3 Augmentation de la pulsatilité : causes et conséquences	15
2.2 Définition de ce que l'on cherche à mesurer	18
2.2.1 Résolution spatiale	18
2.2.2 Profondeur de pénétration	18
2.2.3 Résolution temporelle	18
2.2.4 Conclusion.....	19
2.3 L'imagerie fonctionnelle cérébrale	19
2.3.1 Principe des différentes techniques d'imagerie fonctionnelle.....	20
2.3.2 Limites de ces techniques pour la mesure de la pulsatilité	22
2.4 L'IRM.....	22
2.4.1 Principe de l'IRMf et de l'ARM-CP	23

2.4.2	Limites de ces techniques pour la mesure de la pulsatilité	24
2.5	L'imagerie de la microvascularisation	25
2.5.1	Principe des techniques d'imagerie de la microvascularisation.....	25
2.5.2	Limites de ces techniques pour la mesure de la pulsatilité	27
2.6	L'imagerie ultrasonore	28
2.6.1	L'imagerie ultrasonore : principe et applications.....	28
2.6.2	Les limites du Doppler pulsé pour la mesure de la pulsatilité chez le petit animal ...	35
2.6.3	De l'imagerie conventionnelle à l'imagerie ultrarapide.....	43
2.6.4	La Microscopie de Localisation Ultrasonore	48
CHAPITRE 3 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....		58
3.1	Problématique.....	58
3.2	Question de recherche	58
3.3	Hypothèse de recherche	58
3.4	Objectifs	59
CHAPITRE 4 DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE		61
4.1	Cahier des charges.....	61
4.2	Procédures expérimentales.....	62
4.2.1	Expériences in vivo	62
4.2.2	Concentration en microbulles.....	62
4.3	Écriture des séquences ultrasonores	63
4.3.1	Temps d'acquisition	64
4.3.2	Haute cadence d'imagerie	64
4.3.3	Nombre d'angles	64
4.3.4	Synchronisation avec l'ECG	65

4.4	Traitement des données	66
4.4.1	Reconstruction et filtrage des images.....	66
4.4.2	Localisation et suivi de microbulles.....	66
4.4.3	Extraction des mesures de pulsatilité	68
4.5	Validation des résultats	69
4.6	Contributions	70
4.6.1	Écriture des séquences ultrasonores	70
4.6.2	Expériences	70
4.6.3	Analyse des données	71
4.6.4	Écriture des articles	72
CHAPITRE 5 ARTICLE 1 : IN VIVO PULSATILITY MEASUREMENT OF CEREBRAL MICROCIRCULATION IN RODENTS USING DYNAMIC ULTRASOUND LOCALIZATION MICROSCOPY 73		
5.1	Abstract	73
5.2	Introduction	74
5.3	Methods	75
5.3.1	Ethics	75
5.3.2	Rat preparation for ultrasound imaging with craniotomy	76
5.3.3	Mouse preparation for ultrasound imaging through skull and skin	76
5.3.4	Ultrafast ultrasound acquisitions	76
5.3.5	Beamforming and tissue signal cancelation	77
5.3.6	ULM processing.....	78
5.3.7	DULM processing	79
5.3.8	Dynamic density and velocity maps.....	79
5.3.9	Pulsatility measurement in a vessel.....	79

5.3.10	Pulsatility index (PI) calculation	80
5.3.11	Vessel diameter estimation.....	81
5.3.12	Flow direction, pulsatility and statistical analysis in the cortex.....	81
5.3.13	Contrast Enhanced Ultrafast Ultrasound Doppler (CEUFD).....	81
5.4	Results	82
5.4.1	DULM enables the extraction of flow variations over time and spatially resolved whole-brain pulsatility measurements in 2D in microvessels	82
5.4.2	Differentiating cortical veins from arteries with DULM	86
5.4.3	Comparison of CEUFD and DULM pulsatility measurement performances	87
5.5	Discussion	90
5.6	Conclusion.....	93
5.7	Acknowledgment	93
5.8	References	94
CHAPITRE 6	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	99
6.1	Influence de la concentration sur la mesure de la pulsatilité.....	99
6.2	Influence de la quantité de microbulles sur la mesure de la pulsatilité.....	100
6.3	Corrélation avec la PSF.....	101
6.4	Correction de mouvement	103
6.5	Conclusion.....	104
CHAPITRE 7	ARTICLE 2 : QUANTITATIVE PULSATILITY MEASUREMENTS USING 3D DYNAMIC ULTRASOUND LOCALIZATION MICROSCOPY	106
7.1	Abstract	106
7.2	Introduction	107
7.3	Methods.....	109
7.3.1	In vivo experiments	109

7.3.2	Data processing	112
7.4	Results	116
7.4.1	Resolution calculation	116
7.4.2	Qualitative pulsatility measurements	116
7.4.3	Quantitative pulsatility measurements	116
7.4.4	Pulsatility and velocity attenuations along the vascular tree.....	120
7.4.5	Intra-animal validation in the Willis circle	120
7.5	Discussion	121
7.6	Conclusion.....	125
7.7	Acknowledgements	126
7.8	References	126
CHAPITRE 8	DIFFUSION ET IMPACT DES TRAVAUX DE RECHERCHE.....	133
8.1	Diffusion et impact auprès de différents publics.....	133
8.1.1	Diffusion et impact auprès de la communauté de la recherche en imagerie ultrasonore 134	
8.1.2	Diffusion et impact dans le milieu de la recherche universitaire	134
8.1.3	Diffusion et impact auprès du grand public	135
8.1.4	Conclusion.....	136
8.2	Liste des activités de diffusion, transfert et valorisation des connaissances	137
8.2.1	Diffusion auprès de la communauté en recherche ultrasonore	137
8.2.2	Diffusion auprès de la communauté scientifique	139
8.2.3	Diffusion auprès du grand public	140
CHAPITRE 9	DISCUSSION	142
9.1	Synthèse des résultats.....	142
9.1.1	Développement de la méthode	142

9.1.2	Premier article	142
9.1.3	Résultats complémentaires	143
9.1.4	Second article	143
9.2	Limites de DULM pour la mesure de la pulsatilité	144
9.2.1	Les limites de la quantification	144
9.2.2	Les limites de la validation.....	145
9.2.3	Les limites du transfert en clinique	145
9.3	Discussion - diffusion et impact des travaux de recherche	146
CHAPITRE 10	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	148
10.1	Recommandations	148
10.1.1	Optimisation de DULM	148
10.1.2	Développement de nouveaux biomarqueurs	149
10.1.3	Application de DULM à d'autres organes	149
10.1.4	Application de la méthode à des cas pathologiques	150
10.1.5	Transfert de la méthode en clinique	151
10.2	Recommandations - diffusion et impact des travaux de recherche	151
10.3	Conclusion générale	151
RÉFÉRENCES		153

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Comparaison des incertitudes sur la mesure de la pulsatilité, mesurées par Doppler pulsé.	41
Tableau 4.1 Comparaison des concentrations utilisées en DULM avec celles utilisées dans la littérature en ULM, pour l'imagerie du cerveau. MBs : microbulles.....	63
Table 5.1 Pulsatility index measurements performed by DULM in the rat brain with craniotomy. SD: standard deviation	83
Table 5.2 Pulsatility index measurements performed by DULM in the mouse brain through skull and skin. SD: standard deviation.....	84
Table 7.1 3D ultrasound imaging sequence gated on the ECG.....	111
Table 7.2 Examples of Pulsatility Index measurements performed by 3D DULM in the cat brain. MB: microbubbles, PI: pulsatility index.	117
Table 7.3 Examples of Pulsatility Index measurements performed by 3D DULM in the mouse brain. MB: microbubbles, PI: pulsatility index.....	118

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Représentation schématique de l'arbre vasculaire.....	5
Figure 2.2 Irrigation sanguine du cerveau.....	6
Figure 2.3 Structure schématique de la paroi d'une artère.....	6
Figure 2.4 La composition des artères varie le long de l'arbre vasculaire.....	8
Figure 2.5 Variation de différents paramètres physiques le long de l'arbre vasculaire.	9
Figure 2.6 Différents paramètres peuvent être mesurés ou calculés pour caractériser un flux pulsatile.	11
Figure 2.7 Pression et vitesse du flux sanguin dans l'arbre vasculaire.	12
Figure 2.8 Principe de l'autorégulation cérébrale.	14
Figure 2.9 Impédance et onde de pouls.....	15
Figure 2.10 Mesures du CBF par SPECT chez l'humain.	20
Figure 2.11 Mesures de CBF réalisées par PET-scan chez l'humain.	21
Figure 2.12 Mesures de CBF (a), de CBV (b) et de MTT (c) réalisées par PCT chez l'humain. ..	22
Figure 2.13 Mesures fonctionnelles réalisées en IRMf chez l'humain (A,B) et la souris (C,D). ..	23
Figure 2.14 Mesures de pulsatilité réalisées en ARM-CP chez l'humain (artères majeures).	24
Figure 2.15 Mesures in vivo réalisées en imagerie deux-photons dans des vaisseaux du cortex chez une souris.....	25
Figure 2.16 Mesures réalisées in vivo en microscopie photoacoustique dans des vaisseaux du cortex en surface du cerveau chez une souris.	26
Figure 2.17 Mesures de pulsatilité in vivo en imagerie OCT dans des vaisseaux de la rétine chez l'humain.	27
Figure 2.18 Mesures de pulsatilité in vivo en imagerie OCT dans une artère à la surface d'un cerveau de souris.	27
Figure 2.19 Différents types d'ondes peuvent être envoyés par la sonde ultrasonore en appliquant des retards à chaque élément piézoélectrique.	29

Figure 2.20 Reconstruction d'une image à partir de l'onde rétrodiffusée par un réflecteur.	30
Figure 2.21 Différents modes d'imagerie Doppler conventionnelle.	31
Figure 2.22 Mesures de pulsatilité in vivo réalisées en TCD chez l'humain.	33
Figure 2.23 Mesures de pulsatilité in vivo réalisées en TCD chez le jeune rat (7 jours) avant et après une ischémie.	33
Figure 2.24 Mesures de pulsatilité in vivo réalisées en TCD chez le rat adulte.	34
Figure 2.25 Mesures de pulsatilité réalisées in vivo en UBM au niveau du cercle de Willis dans le cerveau chez le fœtus de souris.	34
Figure 2.26 Reconstruction d'une image ligne par ligne en imagerie conventionnelle (focalisée).	44
Figure 2.27 Reconstruction d'une image avec 3 ondes planes en imagerie ultrarapide.	45
Figure 2.28 L'imagerie ultrarapide 4D pour la mesure de la pulsatilité dans le cerveau chez le rat.	48
Figure 2.29 Différentes méthodes d'imagerie ultrasonore chez le rongeur. Imagerie du cerveau entier en coupe coronale chez le rat.	49
Figure 2.30 Microscopie de Localisation en imagerie PALM.	49
Figure 2.31 Un exemple de <i>pipeline</i> pour réaliser des images en ULM.	51
Figure 2.32 Différentes mesures quantitatives peuvent être extraites à partir de données générées en ULM.	53
Figure 2.33 L'ULM a démontré à plusieurs reprises sa capacité à produire des images super-résolues du cerveau de rat, en 2D et en 3D.	55
Figure 2.34 L'ULM a été testée chez l'humain pour l'imagerie de plusieurs organes comme le cerveau (A), le foie (B) et le rein (C). Figures issues de [119], [164], [167].	55
Figure 2.35 Comparaison des différentes méthodes d'imagerie du cerveau pour mesurer la pulsatilité.	57
Figure 4.1 Exemple de séquence ultrasonore permettant la synchronisation avec l'ECG pour DULM 2D.	65

Figure 4.2 Différents algorithmes de suivi de microbulles.	67
Figure 4.3 Les différentes étapes de traitement permettant de produire des mesures quantitatives de pulsatilité avec DULM.	69
Figure 4.4 Amélioration de la séquence et du traitement des images au cours du projet.	71
Figure 5.1 DULM sequence design.....	77
Figure 5.2 DULM pipeline (see Methods).	78
Figure 5.3 Pulsatility measurements performed by DULM in 14 vessels selected in the rat brain with craniotomy.....	83
Figure 5.4 Pulsatility measurements performed by DULM in 14 vessels selected in the mouse brain through skull and skin.	84
Figure 5.5 DULM-based PI could differentiate veins from arteries in the rat cortex.	86
Figure 5.6 DULM-based PI could differentiate veins from arteries in the mouse cortex.	87
Figure 5.7 Comparison of pulsatility measurements between CEUFD and DULM in the rat brain.	89
Figure 5.8 Comparison of pulsatility measurements between CEUFD and DULM in the mouse brain.....	90
Figure 6.1 Influence de la concentration sur la mesure de la pulsatilité.	99
Figure 6.2 Influence de la quantité de microbulles sur la mesure de la pulsatilité.	101
Figure 6.3 Influence de la corrélation avec la PSF sur la mesure de la pulsatilité.....	102
Figure 6.4 Influence de la correction de mouvement (MoCo) sur la résolution des cartes de densité.	103
Figure 6.5 Influence de la correction de mouvement (MoCo) sur la mesure de la pulsatilité.	104
Figure 7.1 3D DULM pipeline (see Methods).	112
Figure 7.2 Resolution measurements based on the Fourier Shell Correlation (FSC).	113
Figure 7.3 Pulsatility measurements performed in the 3D volume of the cat brain.....	117
Figure 7.4 Pulsatility measurements performed in the 3D volume of the mouse brain.	118

Figure 7.5 Pulsatility measurements performed in the cat brain.	119
Figure 7.6 Pulsatility measurements in the Willis circle.....	121
Figure 8.1 Impact des travaux de recherche sur la communauté en imagerie ultrasonore	134
Figure 8.2 Impact des travaux de recherche sur la communauté scientifique universitaire.....	135
Figure 8.3 Impact des travaux de recherche sur le grand public	136
Figure 8.4 Impact total des travaux de recherche.....	136
Figure 10.1 Mesures de variation de densité de microbulles réalisées grâce à DULM dans un cœur de rat.	150

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2D	Deux dimensions (image)
3D	Trois dimensions (volume)
4D	Quatre dimensions (volume + temps)
ABP	Pression sanguine artérielle (<i>Arterial blood pressure</i>)
ACA	Artère cérébrale antérieure (<i>Anterior cerebral artery</i>)
AD	Maladie d'Alzheimer (<i>Alzheimer's disease</i>)
AGE	Produit de glycation avancée (<i>Advanced glycation end product</i>)
AR	Résolution axiale (<i>Axial resolution</i>)
ARM	Angiographie par résonance magnétique (ou MRA pour <i>Magnetic resonance angiography</i>)
ARM-CP	Angiographie par résonance magnétique en contraste de phase (ou PC-RMI pour <i>Phase contrast magnetic resonance imaging</i>)
ASA	Acoustical Society of America
AVC	Accident vasculaire cérébral (<i>Stroke</i>)
A β	Bêta-amyloïdes (<i>Amyloid beta</i>)
BA	Artère basilaire (<i>Basilar artery</i>)
BOLD	Signal dépendant du niveau d'oxygène sanguin (<i>Blood-oxygen-level dependent</i>)
BW	Onde réfléchie (<i>Backward</i>)
CBF	Débit sanguin cérébral (<i>Cerebral blood flow</i>)
CBFV _a	Vitesse du flux sanguin artériel cérébral (<i>Cerebral arterial blood flow velocity</i>)
CBV	Volume sanguin cérébral (<i>Cerebral blood volume</i>)
CCA	Artère carotide commune (<i>Common carotid artery</i>)
CDEA	Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux

CEUFD	Imagerie de contraste Doppler Ultrarapide (<i>Contrast enhanced ultrafast ultrasound Doppler</i>)
CFF	Modèle de flux continu (<i>Continuous flow forward</i>)
CFREF	Fonds d'excellence en recherche Apogée Canada (<i>Canada first research excellence fund</i>)
CIHR	Instituts de recherche en santé du Canada (<i>Canadian institutes of health research</i>)
CT	Tomodensitométrie (<i>Computed tomography</i>)
DAS	Retard-et-somme (<i>Delay-and-sum</i>)
DULM	Microscopie de localisation ultrasonore dynamique (<i>Dynamic ultrasound localisation microscopy</i>)
ECG	Électrocardiogramme (<i>Electrocardiography</i>)
EDV	Vitesse diastolique minimale (<i>End-diastolic velocity</i>)
EEG	Électroencéphalographie (<i>Electroencephalography</i>)
FFT	Transformation de Fourier rapide (<i>Fast Fourier transform</i>)
fNIRS	Imagerie spectroscopique proche infrarouge fonctionnelle (<i>Functional near-infrared spectroscopy</i>)
FRC	Corrélation annulaire de Fourier (<i>Fourier ring correlation</i>)
FRQNT	Fonds de recherche du Québec - Nature et technologie
FSC	Corrélation des coques de Fourier (<i>Fourier shell correlation</i>)
fULM	Microscopie de localisation ultrasonore fonctionnelle (<i>Functional ultrasound localization microscopy</i>)
fUS	Imagerie fonctionnelle ultrasonore (<i>Functional ultrasound</i>)
FW	Onde incidente (<i>Forward</i>)
GPU	Processeur graphique (<i>Graphics processing unit</i>)
GRSNC	Groupe de recherche sur la signalisation neurale et la circuiterie

ICA	Artère carotide interne (<i>Internal carotid artery</i>)
ICM	Institut de cardiologie de Montréal (<i>Montreal heart institute</i>)
IEEE	Institute of Electrical and Electronics Engineers
IQ	Composantes en phase et en quadrature (<i>In-phase and quadrature components</i>)
IRM	Imagerie par résonance magnétique (ou MRI pour <i>Magnetic resonance imaging</i>)
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (ou fMRI pour <i>Functional magnetic resonance imaging</i>)
IUS	International Ultrasonics Symposium
IVADO	Institut de valorisation des données (<i>Institute for Data Valorization</i>)
LR	Résolution latérale (<i>Lateral resolution</i>)
MB	Microbulle(s) (<i>Microbubble(s)</i>)
MCA	Artère cérébrale moyenne (<i>Middle cerebral artery</i>)
MEG	Magnétoencéphalographie (<i>Magnetoencephalography</i>)
MFV	Vitesse moyenne du flux (<i>Mean flow velocity</i>)
MoCo	Correction de mouvement (<i>Motion correction</i>)
MTT	Temps de transit moyen (<i>Mean transit time</i>)
NSERC	Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (<i>Natural sciences and engineering research council of Canada</i>)
OCT	Tomographie en cohérence optique (<i>Optical coherence tomography</i>)
PALM	Microscopie de localisation photo-activée (<i>Photoactivated localization microscopy</i>)
PAM	Microscopie photoacoustique (<i>Photoacoustic microscopy</i>)
PAT	Tomographie photoacoustique (<i>Photoacoustic tomography</i>)
PCA	Artère cérébrale postérieure (<i>Posterior cerebral artery</i>)
PComA	Artère communicante postérieure (<i>Posterior communicating artery</i>)
PCT	Scanner de perfusion (<i>Perfusion computed tomography</i>)

PET	Tomographie par émission de positrons (<i>Positron emission tomography</i>)
PFF	Modèle de flux pulsatile (<i>Pulsatile flow forward</i>)
PI	Indice de pulsatilité (<i>Pulsatility Index</i>)
PRF	Fréquence de répétition des impulsions (<i>Pulse repetition frequency</i>)
PSF	Réponse impulsionnelle ou fonction d'étalement du point (<i>Point spread function</i>)
PSV	Vitesse systolique maximale (<i>Peak systolic velocity</i>)
PW	Doppler pulsé (<i>Pulsed-wave Doppler</i>)
PWV	Vitesse d'onde de pouls (<i>Pulse wave velocity</i>)
RBIQ	Réseau de bio-imagerie du Québec (<i>Quebec bio-imaging network</i>)
RCA	Sonde ligne-colonne (<i>Row-column array</i>)
RF	Radiofréquence (<i>Radio frequency</i>)
RI	Indice de résistance (<i>Resistivity index</i>)
RMN	Résonance magnétique nucléaire (ou NMR pour <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
ROI	Région d'intérêt (<i>Region of interest</i>)
SD	Déviations standard (<i>Standard deviation</i>)
SIMUS	Simulateur ultrasonore (<i>Ultrasound simulator</i>)
SNR	Rapport signal-sur-bruit (<i>Signal-to-noise ratio</i>)
SPECT	Tomographie par émission monophotonique (<i>Single-photon emission computed tomography</i>)
SVD	Décomposition en valeurs singulières (<i>Singular value decomposition</i>)
TAC	Constriction aortique transverse (<i>Transverse aortic constriction</i>)
TCD	Doppler Transcrânien (<i>Transcranial Doppler</i>)
TIRF	Microscopie à réflexion interne totale (<i>Total internal reflection fluorescence microscopy</i>)
UBM	Biomicroscopie ultrasonore (<i>Ultrasound biomicroscopy</i>)

UdeM	Université de Montréal
UFD	Imagerie ultrasonore ultrarapide (<i>Ultrafast ultrasound Doppler</i>)
ULM	Microscopie de localisation ultrasonore (<i>Ultrasound localisation microscopy</i>)
ΔC_aBV	Changements de volume sanguin artériel cérébral (<i>Changes in cerebral arterial blood volume</i>)

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires peuvent être à l'origine d'un vieillissement cérébral accéléré. En effet, les artères sont riches en fibres élastiques, permettant d'adoucir les fluctuations de la vitesse du sang (ou pulsatilité) au cours du cycle cardiaque [1]. Cette atténuation est progressive tout le long de l'arbre vasculaire : ainsi, si la pulsatilité est forte au niveau des artères majeures comme l'aorte ou les carotides, elle est plus faible - voire inexistante - au niveau des capillaires qui irriguent le cerveau [2]. Or, avec l'âge et la maladie, les artères majeures perdent de leur élasticité [3]. Elles deviennent ainsi plus rigides, entraînant une augmentation de la pulsatilité en aval et menant éventuellement à des altérations microvasculaires au niveau du cerveau [4]. De ce fait, des maladies vasculaires telles que l'athérosclérose peuvent entraîner sur le long terme des déficits cognitifs, et sont des facteurs de risque pour des maladies neurodégénératives telles que la démence [5], [6]. Cartographier la pulsatilité et son évolution dans l'ensemble du réseau vasculaire cérébral, depuis les artères majeures jusqu'aux capillaires, pourrait donc devenir un biomarqueur permettant de mieux comprendre cet effet domino, de suivre l'évolution des maladies neurodégénératives, d'en détecter les signes précoces, voire de mesurer l'efficacité de certains traitements pour ralentir le développement de ces maladies.

Jusqu'à récemment, suivre l'évolution de la pulsatilité dans l'ensemble du réseau vasculaire cérébral n'était pas possible. En effet, les différentes techniques utilisées habituellement pour mesurer la pulsatilité font face à des compromis en termes de résolution spatiotemporelle et de profondeur de pénétration : le Doppler transcrânien (TCD) ultrasonore [7], [8] et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) [9] se concentrent sur la mesure de la pulsatilité dans les artères majeures du cerveau, tandis que la microscopie optique ne permet que la mesure de la pulsatilité dans de microvaisseaux situés à la surface du cerveau [10], [11].

De récents développements en imagerie ultrasonore ont permis de voir l'avènement de nouvelles techniques, repoussant un peu plus les limites de l'imagerie ultrasonore en termes de résolutions spatiale et temporelle. En particulier, on peut citer l'imagerie par ondes planes dite « ultrarapide » [12], dont le nombre d'images par secondes peut atteindre plusieurs milliers. Celle-ci permet donc d'accéder à des informations sur la dynamique du flux sanguin – qui étaient jusqu'à présent inaccessibles de façon non-invasive.

Une seconde technique d'imagerie ultrasonore est également apparue au milieu des années 2010 : la Microscopie de Localisation Ultrasonore (ULM) [13]–[16]. Basée sur la localisation et le suivi de microbulles injectées comme agents de contraste, elle permet de cartographier les vaisseaux avec une résolution de l'ordre de 10 μm dans l'ensemble du cerveau. Cependant, cette méthode est pour le moment statique : elle ne permet d'obtenir, après plusieurs minutes d'acquisition, qu'une seule image de la vascularisation, et une mesure de la vitesse du flux sanguin moyennée sur plusieurs cycles cardiaques.

Cette thèse présente le développement d'une nouvelle méthode d'imagerie ultrasonore, la Microscopie de Localisation Ultrasonore Dynamique (DULM). Basée sur l'ULM, elle permet d'obtenir des informations dynamiques sur le flux sanguin, en synchronisant les acquisitions ultrasonores avec l'ECG. DULM permet finalement d'obtenir, en quelques minutes d'acquisition, non plus une unique image statique de la vascularisation, mais un film complet montrant les variations de vitesse du flux sanguin au cours d'un ou plusieurs cycles cardiaques, et d'en tirer des mesures quantitatives de pulsatilité.

L'objectif général de cette thèse est de parvenir à cartographier et à quantifier la pulsatilité dans le réseau vasculaire cérébral à l'aide de DULM.

Les trois objectifs spécifiques (détaillés dans le **Chapitre 3**) sont de :

- 1) Développer et optimiser les séquences et algorithmes de reconstruction permettant de cartographier la pulsatilité cérébrale ;
- 2) Montrer la faisabilité de la mesure de la pulsatilité cérébrale chez le petit animal en 2D à l'aide de DULM ;
- 3) Transférer et valider la technologie en 3D, pour permettre des mesures dans le volume complet du cerveau et en extraire des informations quantitatives sur la dynamique des flux sanguins.

Le **Chapitre 2** présente la revue de la littérature en lien avec le sujet. Le **Chapitre 3** résume la problématique du projet doctoral, ainsi que la question de recherche et les objectifs globaux et spécifiques de cette thèse. Le **Chapitre 4** décrit la méthodologie globale employée. Le **Chapitre 5** présente une étude in vivo de faisabilité de la mesure de la pulsatilité à l'aide de DULM, effectuée en 2D sur deux modèles de petits animaux : un rat avec craniotomie, et une souris à travers la peau et le crâne. Le **Chapitre 6** présente des résultats complémentaires quant à la mesure de la pulsatilité

développée dans le **Chapitre 5**. Le **Chapitre 7** décrit le transfert de la méthode en 3D, ainsi que sa validation intra-animale dans deux modèles : un chat avec craniotomie, et une souris à travers le crâne. Le **Chapitre 8** explique comment ces travaux de recherche ont été diffusés auprès de différents publics, afin d'aider à la sensibilisation au sujet des maladies neurodégénératives et de la recherche en imagerie médicale. Enfin, le **Chapitre 9** présente une discussion générale de ce projet doctoral et le **Chapitre 10** termine cette thèse avec une conclusion, ainsi que quelques recommandations pour des travaux futurs.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Cette revue de littérature comprend six sections, qui présentent les éléments nécessaires à la compréhension du contexte dans lequel DULM a été développée. La première (**Section 2.1**) s'intéresse à la propagation et à la régulation de la pulsatilité dans l'arbre vasculaire cérébral. La seconde (**Section 2.2**) définit les critères auxquels la technique que l'on développe doit répondre, afin de mesurer la pulsatilité dans l'arbre vasculaire cérébral. Les sections subséquentes (**Sections 2.3, Erreur ! Source du renvoi introuvable., 2.5 et 2.6**) dressent un état de l'art des différentes techniques d'imagerie existantes pour la mesure de la pulsatilité dans le cerveau, de même que les limites de chacune d'entre elles. La **Section 2.6** en particulier approfondit la technique d'imagerie ultrasonore, sur laquelle s'appuie notamment l'ULM. Cette dernière permet de cartographier le réseau vasculaire avec une résolution de l'ordre de quelques micromètres, et c'est sur cette technique que repose la méthode dynamique (DULM) développée dans ce projet de doctorat.

2.1 Propagation et régulation de la pulsatilité

2.1.1 Physiologie de la circulation sanguine

2.1.1.1 L'arbre vasculaire

À chaque battement cardiaque, le cœur envoie le sang dans le réseau d'artères et de veines qui irriguent l'organisme. Les deux artères principales qui partent du cœur sont l'artère pulmonaire et l'aorte : la première irrigue le poumon pour oxygéner le sang, et la seconde apporte le sang oxygéné à l'ensemble du corps via la circulation sanguine. Ces artères principales se divisent ensuite en des artères de plus petite taille, puis en artérioles, pour finalement parvenir aux capillaires. Le sang est ensuite réacheminé vers le cœur via des veinules qui se rassemblent en veines. L'ensemble du réseau vasculaire, composé des artères, artérioles, capillaires, veinules et veines, est appelé l'arbre vasculaire (voir **Figure 2.1**).

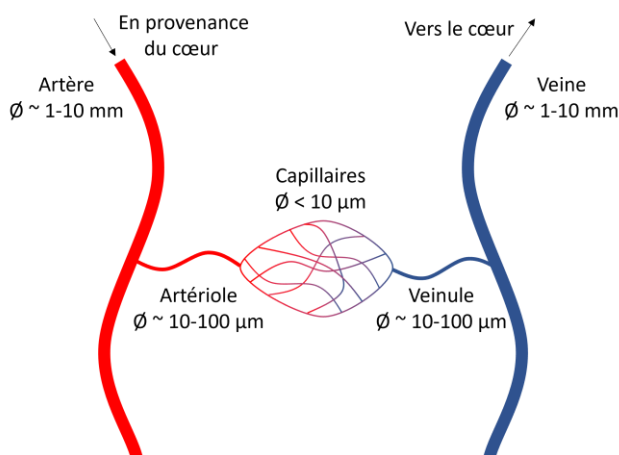


Figure 2.1 Représentation schématique de l'arbre vasculaire.

L'arbre vasculaire est composé de l'ensemble des vaisseaux sanguins qui permettent la circulation du sang depuis le cœur jusqu'aux organes et aux tissus.

La vascularisation joue un rôle important dans la régulation du flux sanguin dans tout le corps : elle permet à la fois d'acheminer le sang jusqu'aux organes et aux tissus, mais également d'atténuer les fluctuations de pression et de vitesse du sang. Ainsi, tout le long de l'arbre vasculaire, le diamètre et l'épaisseur des vaisseaux sanguins varient pour permettre une irrigation optimale des tissus et des organes en aval. Dans la suite de ce projet, nous allons nous intéresser plus précisément à l'arbre vasculaire cérébral, c'est-à-dire l'ensemble des vaisseaux sanguins permettant d'irriguer le cerveau, depuis les artères majeures jusqu'aux capillaires.

2.1.1.2 La circulation cérébrale

Le flux sanguin est acheminé jusqu'au cerveau via les artères carotidiennes et vertébrales internes (voir **Figure 2.2**). À partir des artères vertébrales naît l'artère basilaire qui s'unit à la carotide interne et aux artères communicantes pour former le cercle de Willis. Ce dernier se subdivise ensuite en artères cérébrales antérieure, moyenne et postérieure, qui continuent à se ramifier en artères et artérioles plus petites, pour fournir du sang aux différentes régions du cerveau. Notamment, les artérioles piales entourent la surface du cerveau, puis pénètrent dans celui-ci en tant qu'artérioles pénétrantes, qui se ramifient en capillaires pour fournir de l'oxygène et des nutriments aux cellules cérébrales.

Afin de bien comprendre les mécanismes à l'œuvre dans la régulation de la pulsatilité, revenons plus précisément sur la structure de la paroi des vaisseaux, et en particulier des artères.

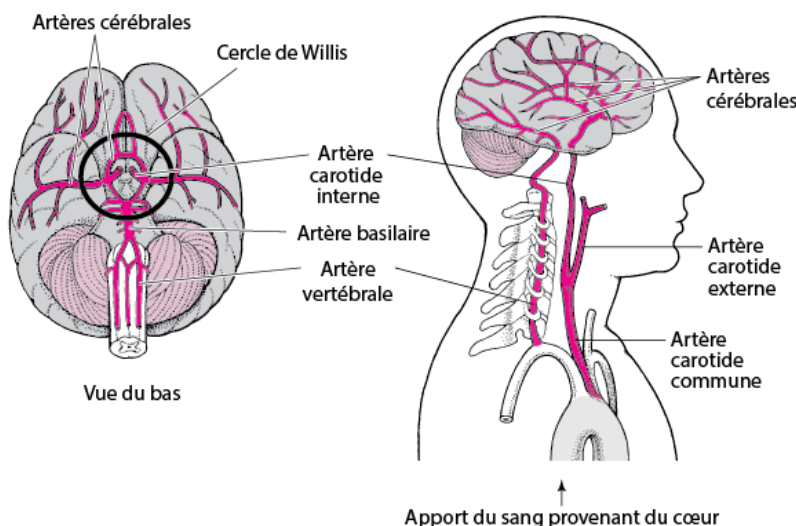


Figure 2.2 Irrigation sanguine du cerveau.

Figure issue de [17].

2.1.1.3 Structure de la paroi des artères

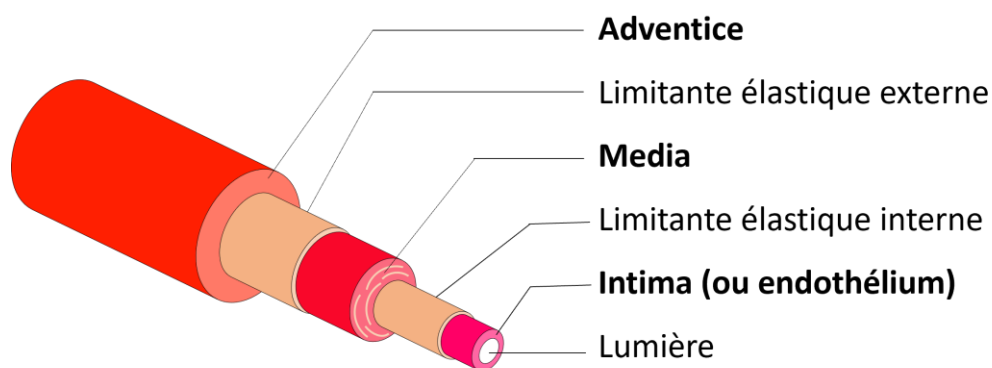


Figure 2.3 Structure schématique de la paroi d'une artère.

La paroi d'une artère est constituée de trois couches successives : l'adventice, la media et l'intima (voir **Figure 2.3**).

L'adventice est la couche la plus externe : elle contient principalement des fibres de collagène qui protègent l'artère.

La media est la couche la plus épaisse. Elle est subdivisée en plusieurs sous-couches, séparées les unes des autres par des parois constituées de fibres élastiques. Chacune de ces sous-couches est composée de cellules musculaires lisses, de fibres élastiques (élastine), de collagène et de

glycoprotéines (protéoglycanes). Le nombre de sous-couches présentes dans la media diminue le long de l'arbre vasculaire : l'aorte par exemple en contient une soixantaine, tandis que les artères en périphérie n'en contiennent que trois ou moins [18]. La media est séparée de l'intima et de l'adventice par deux couches dites limitantes élastiques (une interne et une externe), à l'exception des plus petites artères, qui ne contiennent pas de limitante élastique externe.

Enfin, la couche la plus interne du vaisseau est l'intima : aussi appelée endothélium, il s'agit d'une monocouche cellulaire directement en contact avec le sang, qui circule au niveau de la lumière du vaisseau sanguin.

Ainsi, chaque couche de la paroi vasculaire a une composition distincte, qui lui confère des propriétés mécaniques spécifiques. L'intima a peu d'influence sur les propriétés mécaniques du vaisseau, mais elle joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie vasculaire [19]. La media est responsable de la résistance aux tensions et aux forces hémodynamiques exercées sur la paroi vasculaire par le flux sanguin. En particulier, ses cellules musculaires lisses répondent aux variations de la pression sanguine et permettent au vaisseau de se dilater, ce qui assure le maintien de son tonus et de sa résistance [20], [21]. La force de la media repose quant à elle sur le collagène qui la constitue, tandis que son élasticité lui est conférée par ses fibres élastiques. Enfin, l'adventice offre une grande résistance à la distension, ce qui contribue à la fonctionnalité globale et à la stabilité de la paroi du vaisseau.

2.1.1.4 Composition des artères le long de l'arbre vasculaire

La composition des artères et de leurs différentes couches (adventice, media, intima) varie le long de l'arbre vasculaire (voir **Figure 2.4**).

Les artères les plus proches du cœur sont également celles qui ont le plus important diamètre, la plus grande épaisseur et la plus grande compliance.

Viennent ensuite les artères dites musculaires, dont la media contient moins de fibres élastiques et plus de fibres musculaires : elles se contractent et se détendent pour réguler le flux sanguin vers des parties spécifiques du corps.

Les plus petites artères, appelées artérioles, contiennent principalement des fibres musculaires [22]. Elles ont la capacité de changer la taille de leur lumière en réponse à des changements de débit et de pression sanguine : elles se contractent en présence d'une forte pression sanguine, et se dilatent

en cas de fort débit sanguin. Leur rôle principal est d'assurer ainsi une pression basse et constante aux capillaires en aval.

Ces derniers, enfin, sont constitués d'une unique couche de cellules, qui permettent l'échange de nutriments, de gaz et de déchets avec les organes et les tissus.

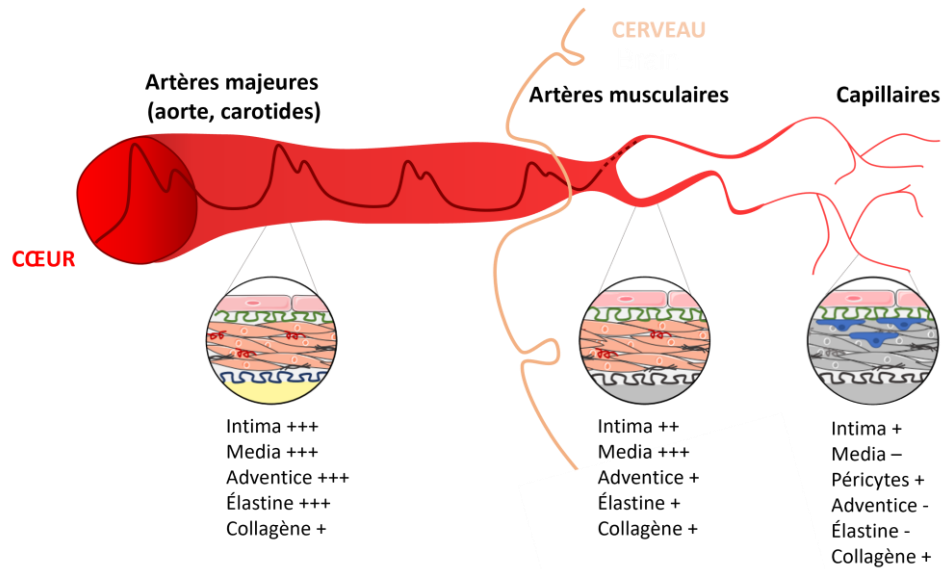


Figure 2.4 La composition des artères varie le long de l'arbre vasculaire.

Figure adaptée de [23]

Ainsi, les artères et artérioles assurent aux organes un apport sanguin à une pression assez uniforme, de sorte que l'effet pulsatile des battements du cœur est moins prononcé dans les microvaisseaux en aval. Nous expliquerons plus précisément les différents paramètres physiques qui permettent la régulation de la pulsatilité à la section suivante (**Section 2.1.2**).

2.1.2 Physique de la pulsatilité et principes mécaniques

2.1.2.1 Compliance des artères

La capacité d'un vaisseau à voir son diamètre se dilater lorsqu'il est soumis à une augmentation de la pression sanguine s'appelle la compliance, qui correspond à l'inverse de la rigidité. Plus un vaisseau sera souple et élastique, plus sa compliance sera grande. Plus précisément, la compliance C d'un vaisseau sanguin se calcule comme :

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P} \quad (2-1)$$

avec ΔV le changement de volume de ce vaisseau (en mL) et ΔP le changement de pression (en mmHg). La compliance d'un vaisseau dépend majoritairement de l'élasticité de sa paroi [24], qui est déterminée par la quantité de fibres élastiques que contient la media [18].

2.1.2.2 Résistance, pression sanguine et vitesse moyenne du sang

Lorsque le sang circule dans les vaisseaux sanguins, il rencontre une résistance qui entrave son écoulement. Cette résistance vasculaire est déterminée par plusieurs facteurs, tels que la viscosité du sang, la longueur et le diamètre des vaisseaux sanguins. Ainsi, au fur et à mesure que le sang progresse des artères jusqu'aux capillaires, sa pression moyenne diminue, en raison de la diminution du diamètre des vaisseaux – qui entraîne une augmentation de leur résistance [25]. La pression moyenne reste ensuite faible au niveau des veinules et des veines (voir **Figure 2.5 (a, c)**).

De plus, la somme totale de la surface des sections des vaisseaux étant plus élevée au niveau des capillaires, la vitesse du sang est plus faible dans ceux-ci qu'au niveau des veines ou des artères [25] (voir **Figure 2.5 (b, d)**).

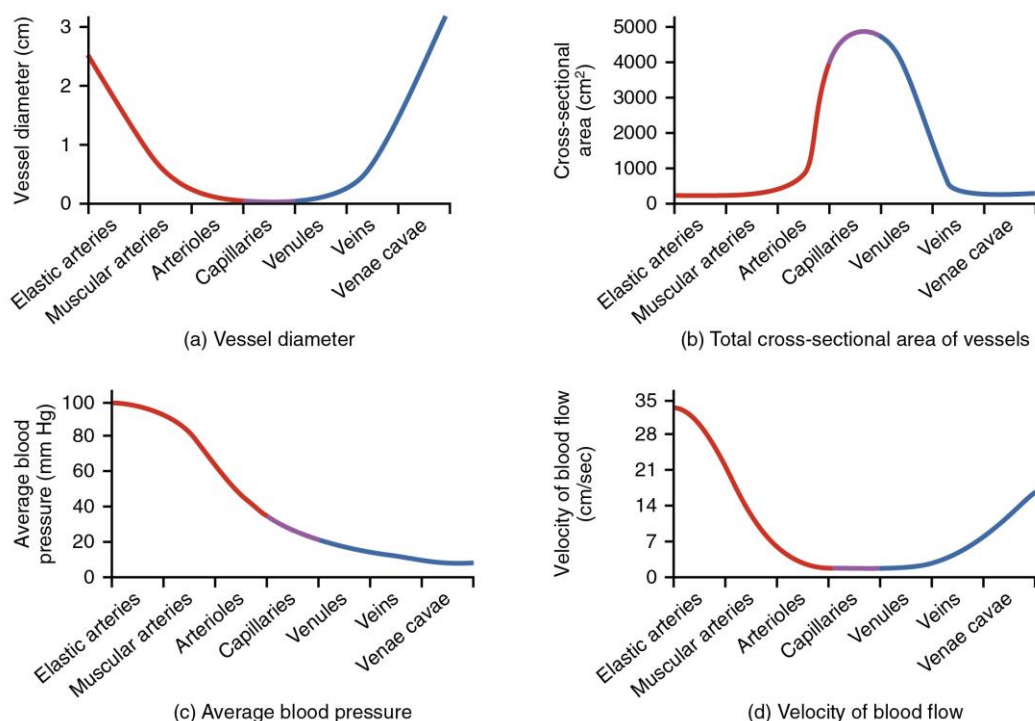


Figure 2.5 Variation de différents paramètres physiques le long de l'arbre vasculaire.

- (a) Diamètre des vaisseaux ; (b) Somme totale de la surface des sections des vaisseaux ;
(c) Pression sanguine moyenne ; (d) Vitesse moyenne du sang. Figure issue de [26].

Outre la vitesse et la pression moyenne sanguine, le sang est également soumis à des variations périodiques de vitesse et de pression dues à l'action du cœur.

2.1.2.3 Onde de pouls et pulsatilité

À chaque battement cardiaque, le cœur se contracte : il agit comme une pompe et induit une variation de pression dans les artères principales qui partent du cœur. Cette variation de pression générée à chaque battement cardiaque se traduit ensuite en onde de pression, dite « onde de pouls », qui se propage le long de l'arbre vasculaire. L'amplitude de l'onde de pouls décroît le long de ce dernier, jusqu'à atteindre les capillaires, où la pression est relativement constante [27].

Cette onde de pouls entraîne elle-même une variation de la vitesse du flux sanguin, que l'on appelle la pulsatilité. La pulsatilité peut être quantifiée grâce à l'indice de pulsatilité [28], que l'on définit par :

$$PI = \frac{V_{max} - V_{min}}{V_{moy}} \quad (2-2)$$

avec V_{max} la vitesse maximale du flux sanguin atteint pendant la systole, V_{min} la vitesse minimale atteinte en fin de diastole, et V_{moy} la vitesse moyenne du sang. On peut également quantifier la résistance d'un vaisseau grâce à l'indice de résistance (RI) [29], défini par :

$$RI = \frac{V_{max} - V_{min}}{V_{max}} \quad (2-3)$$

Dans certains domaines de la littérature, on définit cependant la pulsatilité par les variations induites par les contractions cardiaques – qu'il s'agisse des variations de volume, de pression ou de vitesse du sang. Selon la méthode d'imagerie employée, ces variations peuvent être mesurées ou déduites par calcul ; il existe notamment différents modèles (plus ou moins complexes) permettant de relier ces trois paramètres, qui caractérisent le flux au niveau d'un vaisseau sanguin (voir **Figure 2.6**).

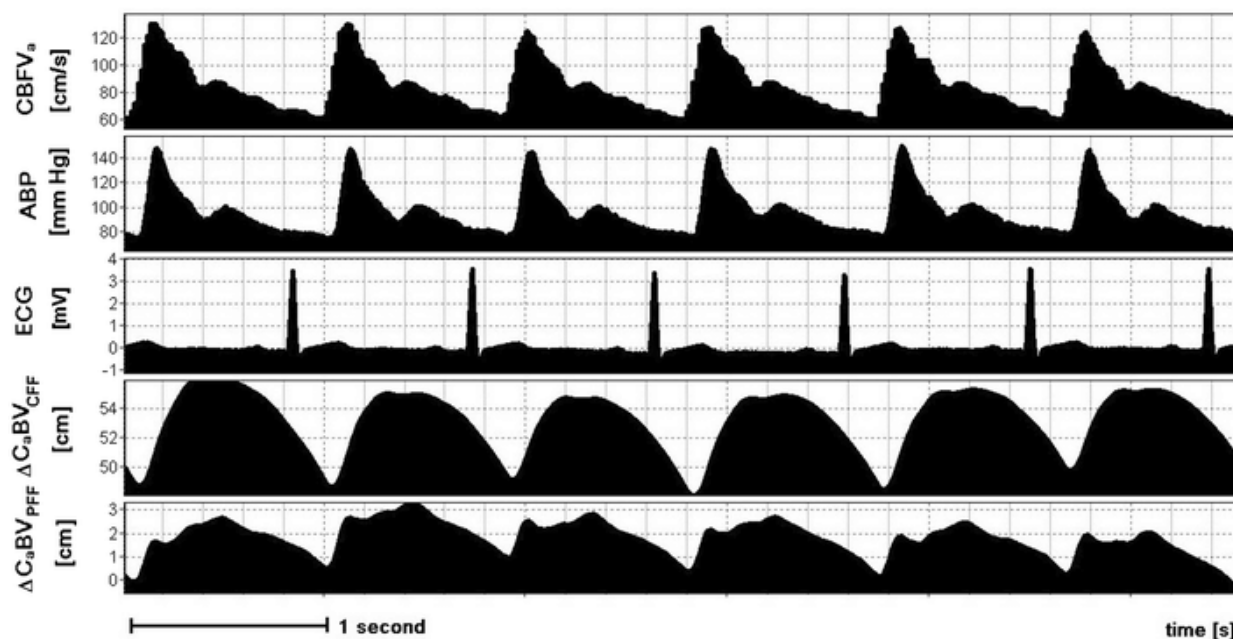


Figure 2.6 Différents paramètres peuvent être mesurés ou calculés pour caractériser un flux pulsatile.

Différentes mesures physiologiques peuvent être réalisées (vitesse, pression), afin d'en déduire les variations de volume sanguin suivant différents modèles hémodynamiques. De haut en bas : mesure de la vitesse du flux sanguin artériel cérébral ($CBFV_a$), de la pression sanguine artérielle (ABP), de l'ECG, et des changements de volume sanguin artériel cérébral (ΔC_aBV) calculés selon deux modèles différents (flux continu CFF ou flux pulsatile PFF).

Figure issue de [30].

Par souci de simplicité cependant, on se limitera dans la suite de cette thèse à la définition de la pulsatilité comme de la variation de la vitesse du flux sanguin au cours du cycle cardiaque.

La pulsatilité se mesure de façon locale au niveau d'un vaisseau sanguin. Comme l'onde de pouls, son amplitude décroît lorsque l'on progresse dans l'arbre vasculaire, depuis les plus grosses artères jusqu'aux capillaires. Il en est de même pour la pression moyenne et la vitesse moyenne du flux sanguin, qui chutent au fur et à mesure que l'on passe des artères aux artéioles, puis aux capillaires. La pulsatilité est globalement nulle ou négligeable dans les capillaires et les veinules, de même que dans les veines. Au niveau de ces dernières cependant, la vitesse moyenne du sang augmente de nouveau, mais la pression reste faible (voir **Figure 2.7**).

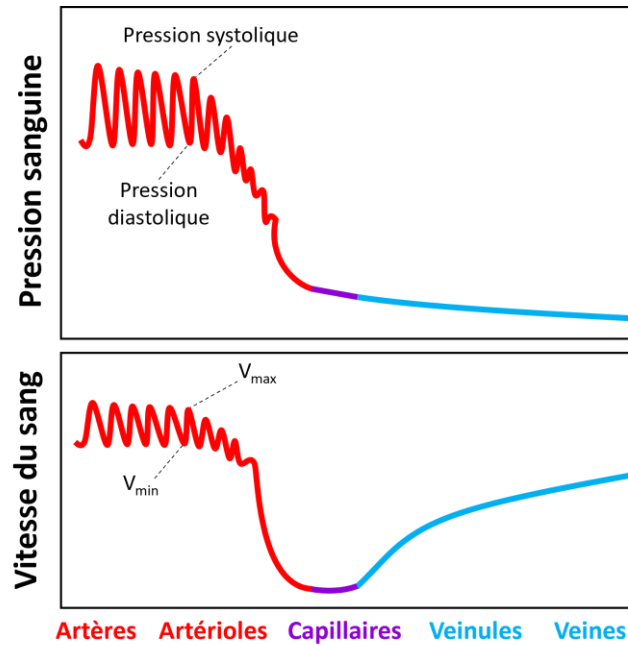


Figure 2.7 Pression et vitesse du flux sanguin dans l'arbre vasculaire.

Les variations de vitesse (en bas) et de pression (en haut) sont particulièrement intenses dans les artères, encore détectables dans les artérioles, mais elles sont faibles voire nulles dans les capillaires, les veinules et les veines. Figure adaptée de [31].

2.1.2.4 Principes mécaniques

2.1.2.4.1 Vitesse de l'onde de pouls

La vitesse à laquelle se propage l'onde de pouls le long de l'arbre vasculaire est appelée la *Pulse Wave Velocity* (PWV) en anglais. On la calcule comme la distance Δx parcourue par l'onde de pouls divisée par son temps de parcours Δt :

$$PWV = \frac{\Delta x}{\Delta t} \quad (2-4)$$

La PWV varie d'un vaisseau sanguin à l'autre en fonction de plusieurs paramètres comme l'élasticité de la paroi vasculaire, mais également son épaisseur et son diamètre. Notamment, plus la paroi est rigide, plus l'onde est rapide donc plus la PWV est grande. Habituellement, on mesure la PWV entre la carotide et l'artère fémorale : il s'agit donc d'une vitesse moyenne du parcours de l'onde de pouls à travers plusieurs vaisseaux sanguins différents. Un jeune adulte en bonne santé a

typiquement une pression sanguine moyenne de 30 ou 40 mmHg et une PWV inférieure à 10 m/s [32].

2.1.2.4.2 Impédance

La vitesse à laquelle se propage le sang dépend à la fois de la pression sanguine et de la résistance hydraulique des vaisseaux sanguins, appelée l'impédance. Cette dernière correspond à la force qui doit être exercée pour que le sang puisse s'écouler dans un vaisseau.

En faisant l'hypothèse que le sang est un fluide incompressible et Newtonien, s'écoulant de façon laminaire dans un vaisseau de diamètre constant, l'impédance Z_c du vaisseau peut s'écrire comme la différence de pression ΔP entre l'entrée et la sortie du vaisseau, divisée par le flux sanguin Q traversant ce dernier [33] :

$$Z_c = \frac{\Delta P}{Q} \quad (2-5)$$

Il s'agit de l'équivalent, en dynamique des fluides, de la loi d'Ohm électrique. Cette équation (2.5), basée sur la loi de Poiseuille, est cependant valable uniquement pour des vaisseaux de faible diamètre, où l'écoulement est de faible vitesse. Elle ne peut donc pas être utilisée pour des flux de forte pulsativité ou plus complexes, avec des vaisseaux de différents calibres, des bifurcations, etc.

Il est possible de changer la résistance du vaisseau en jouant sur son diamètre, pour réguler la pression à sa sortie. Par exemple, lorsqu'un vaisseau sanguin se contracte (vasoconstriction), son diamètre diminue et sa résistance augmente. À l'inverse, lorsqu'un vaisseau se dilate (vasodilatation), son diamètre augmente et sa résistance diminue. Pour un débit Q constant, dans le premier cas, le vaisseau contribuera à diminuer fortement la pression sanguine en sortie ; dans le second cas en revanche, la pression sanguine ne sera que faiblement changée en sortie.

2.1.2.5 Propagation et régulation de la pulsativité

La pulsativité décroît le long de l'arbre vasculaire grâce à de nombreux facteurs. Nous en présentons quelques-uns dans cette section, de façon non-exhaustive : la dilatation des artères principales proches du cœur, l'autorégulation du sang assuré par les artères plus petites et les artérioles au niveau du cerveau, la fonction endothéliale, et enfin l'impédance, qui varie d'un vaisseau à l'autre tout le long de l'arbre vasculaire.

2.1.2.5.1 Dilatation des artères principales

La media épaisse et très élastique des artères principales leur confère une grande compliance, ce qui leur permet de se dilater lorsqu'elles sont soumises à de grandes variations de pression, et d'atténuer ainsi ces dernières [34]. Cette capacité des artères principales à se dilater, afin de convertir un flux pulsatile en un flux continu, a été décrite pour la première fois en 1899 par Frank Otto, et est connue sous le nom d'« effet Windkessel » [35].

2.1.2.5.2 Autorégulation des artères musculaires

Lorsque la pression artérielle diminue, les artères cérébrales se dilatent pour permettre un débit sanguin suffisant vers le cerveau. À l'inverse, lorsque la pression artérielle augmente, les artères cérébrales se contractent pour éviter un flux sanguin excessif. Cela permet de maintenir un débit sanguin cérébral relativement stable sur une certaine plage de pression artérielle (entre 50 et 150 mmHg chez l'humain, voir **Figure 2.8**), appelée plateau d'autorégulation [36].

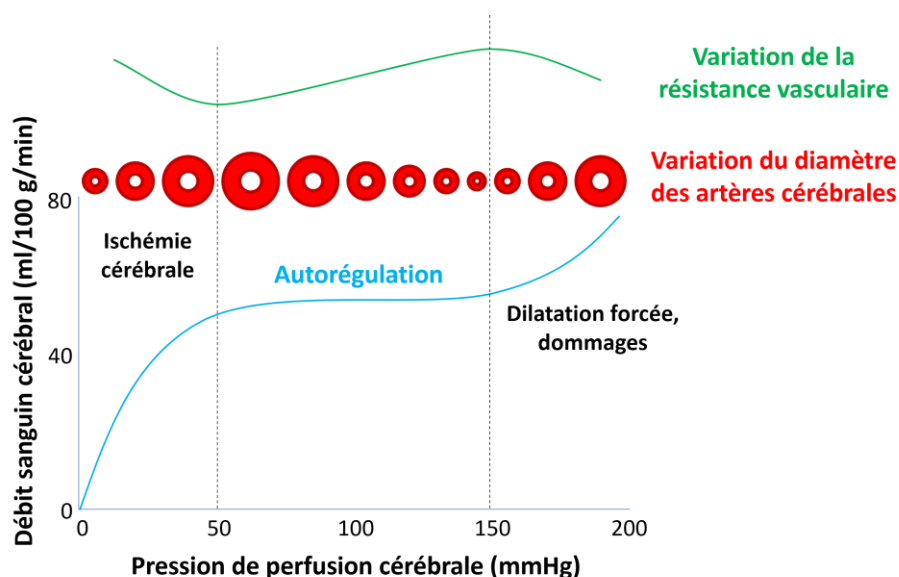


Figure 2.8 Principe de l'autorégulation cérébrale.

Le diamètre des artères s'adapte en fonction des variations modérées de pression. Au-delà d'un certain seuil de pression en revanche, la résistance vasculaire diminue, et les dommages surviennent. Figure adaptée de [23] et [36].

2.1.2.5.3 Réponse endothéliale

L'écoulement du sang exerce une force mécanique sur les cellules qui tapissent les vaisseaux sanguins, dites cellules endothéliales. Selon la force exercée par l'écoulement, ces dernières peuvent générer des substances vasoactives qui vont agir entre autres sur les cellules musculaires, et ainsi entraîner au besoin la dilatation ou la constriction du vaisseau [37].

2.1.2.5.4 Différence d'impédance le long de l'arbre vasculaire

Lorsque l'onde de pouls rencontre une différence d'impédance entre deux vaisseaux, une partie de l'onde de pouls incidente (FW) est réfléchie à l'interface entre ceux-ci et forme une onde réfléchie (BW), qui n'est donc pas transmise aux vaisseaux en aval (voir **Figure 2.9**). C'est notamment le cas lorsque l'onde de pression se propage des plus grosses artères très souples (à faible impédance) jusqu'aux artères plus petites et plus résistantes (à forte impédance) [38]. Ces réflexions induisent une perte d'énergie pour l'onde de pouls, de même qu'une diminution de son amplitude (et donc, en conséquence, une diminution de la pulsatilité).

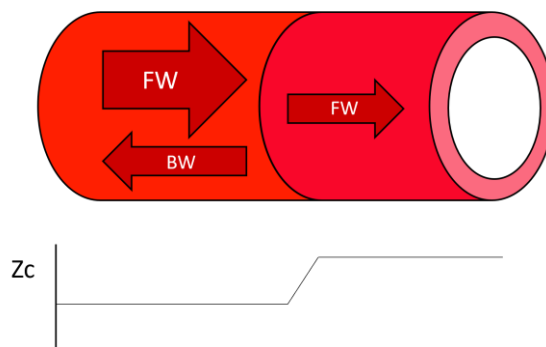


Figure 2.9 Impédance et onde de pouls.

À l'interface entre deux vaisseaux sanguins d'impédance différente, une partie de l'onde de pouls incidente (FW) est réfléchie (BW).

2.1.3 Augmentation de la pulsatilité : causes et conséquences

Ces différents facteurs permettant de réguler la pulsatilité sont cependant perturbés par le vieillissement et/ou par l'athérosclérose, qui entraînent une rigidification des artères. Nous allons détailler dans cette section la cascade de causes à effets qui entraîne cette rigidification artérielle, de même que ses conséquences sur la régulation de la pulsatilité.

2.1.3.1 La rigidification artérielle

2.1.3.1.1 Vieillessement des artères

Le vieillissement est le facteur de risque principal des maladies cardiovasculaires [39]. En effet, lorsque la paroi d'une artère majeure vieillit, elle subit un remodelage progressif qui entraîne une dilatation et une rigidification [40]. Ces changements structurels sont causés par la fragmentation progressive de l'élastine avec l'âge, qui entraîne un transfert des contraintes mécaniques de l'élastine vers le collagène. En conséquence, la production de collagène augmente. Les fibres de collagène étant 100 à 1000 fois plus rigides que les fibres élastiques [41], cela induit une rigidification de la paroi de l'artère.

À cette fragmentation de l'élastine s'ajoutent la présence de dépôts calciques, l'accumulation produits de glycation avancée (AGE), et un environnement inflammatoire. Ces facteurs exacerbent cette rigidité artérielle et conduisent à une dysfonction endothéliale. Ainsi, l'endothélium perd sa fonction de barrière et sa capacité à se dilater [42].

De plus, avec le vieillissement, les artères cérébrales perdent peu à peu leur capacité à se contracter et se dilater selon les variations de pression [43].

2.1.3.1.2 Athérosclérose

Avec l'âge, l'endothélium devient plus vulnérable, ce qui augmente la prédisposition aux lésions athérosclérotiques. L'athérosclérose [44] est une maladie caractérisée par la formation progressive de plaques d'athérome dans les artères. Elle débute par une inflammation de l'endothélium, suivie d'un dépôt de lipides (graisses) et de cholestérol au niveau de cette zone inflammatoire.

Au fil du temps, ces dépôts se durcissent, se calcifient et forment des plaques qui rétrécissent et durcissent les artères. Si ces plaques se rompent, elles peuvent causer des caillots sanguins et bloquer l'artère en aval, pouvant entraîner une crise cardiaque ou un accident vasculaire cérébral.

2.1.3.1.3 Une différence d'impédance diminuée

Avec cette rigidification des artères majeures induite par le vieillissement et/ou l'athérosclérose, celles-ci voient leur impédance augmenter. Ainsi, la différence d'impédance qu'il y avait entre artères majeures et artères secondaires en aval diminue, et l'onde de pouls est moins réfléchiée à l'interface des deux. Une plus grande énergie est donc transmise en aval [45], [46].

2.1.3.2 L'hypothèse biomécanique

Avec l'âge donc, couplé au développement de maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose et à des facteurs de risque (génétiques, environnementaux, mode de vie), la pulsatilité finit par augmenter en aval des artères principales, jusqu'à atteindre la microcirculation. Il a été proposé que ces changements pourraient être à l'origine de lésions cérébrales conduisant à un déclin cognitif et au développement de maladies neurodégénératives comme la démence [27], selon une hypothèse dite « biomécanique ». Notamment, une revue systématique de 23 études portant sur un total de 15 666 patients soutient cette hypothèse : cette revue a par exemple montré qu'une rigidification artérielle était associée à des biomarqueurs de maladies au niveau des microvaisseaux cérébraux [47]. Quelques études ont également rapporté un lien entre une augmentation de la pression pulsée et des dommages vasculaires. On sait par exemple qu'une augmentation de la pression pulsée est associée à une hypertrophie de la paroi artérielle cérébrale vasculaire [48], et que ce remodelage vasculaire pourrait contribuer à la perturbation du couplage neurovasculaire [4].

Cependant, la cascade de causes à effets allant de l'augmentation de la pulsatilité à l'altération de la microcirculation cérébrale et des fonctions cérébrales, observées avec l'âge et les facteurs de risque vasculaires, n'a jamais été clairement démontrée [27]. En particulier, il n'existe à ce jour que des preuves indirectes soutenant que, dans un contexte de rigidification artérielle, la pression pulsée pénètre plus loin dans l'arbre vasculaire, notamment au niveau des microvaisseaux cérébraux [2].

Ainsi, bien que plusieurs études le suggèrent fortement, il n'existe pas, à ce jour, de preuve directe que la rigidification artérielle induit une augmentation de la pulsatilité dans les artères principales qui se propage jusque dans les microvaisseaux en aval, pour finalement induire des dommages vasculaires et un déclin cognitif.

2.2 Définition de ce que l'on cherche à mesurer

Pour mieux comprendre l'impact de la pulsatilité sur le cerveau, il faudrait utiliser une technique d'imagerie permettant d'avoir à la fois une résolution spatiale suffisante pour voir l'ensemble de l'arbre vasculaire dans tout le cerveau (depuis les artères majeures jusqu'aux microvaisseaux cérébraux), mais aussi une résolution temporelle suffisante pour mesurer le signal de pulsatilité, tout en conservant une profondeur de pénétration permettant de visualiser l'ensemble du cerveau.

2.2.1 Résolution spatiale

Idéalement, la résolution spatiale minimale permettant d'étudier l'ensemble de l'arbre vasculaire serait de l'ordre de 5 μm , ce qui permettrait de visualiser à la fois les vaisseaux majeurs et les capillaires.

2.2.2 Profondeur de pénétration

La profondeur de pénétration qu'il faudrait pour pouvoir imager et mesurer de façon quantitative la pulsatilité dans tout l'arbre vasculaire est de l'ordre de 1 cm chez le petit animal (rat ou souris), et de l'ordre de 15 cm chez l'humain.

2.2.3 Résolution temporelle

Pour échantillonner correctement le signal de pulsatilité, il faut définir une résolution fréquentielle df suffisante. Dans le cas particulier de l'humain, le rythme cardiaque est d'environ 60 à 100 battements par minute (bpm), soit 1.3 battements par seconde environ. L'onde de pouls est cependant plus complexe qu'une sinusoïde de 1.3 Hz.

Quelle résolution temporelle est nécessaire pour mesurer un signal de pulsatilité ? Certains échographes cliniques réalisent par exemple des mesures avec un échantillonnage de 500 Hz, pour non seulement mesurer la pulsatilité mais aussi repérer diverses anomalies du flux sanguin, et ce, pour une vaste gamme de rythmes cardiaques. À l'inverse, dans certains articles, on montre que l'on peut mesurer la pulsatilité chez l'humain comme les changements de pression au cours du temps avec un échantillonnage de seulement 16.75 Hz [49]. Un faible échantillonnage permettra ainsi de distinguer les maxima et les minima des variations de la pression sanguine, mais il ne permettra plus de distinguer des détails caractéristiques comme l'onde dicrotique (en anglais,

« dicrotic notch »). Pour la suite de la démonstration, comme nous nous intéressons essentiellement à la mesure de la pulsatilité (et donc aux maxima et aux minima de la vitesse), nous prendrons un échantillonnage de 16.75 Hz chez l'humain.

Le rythme cardiaque d'une souris est d'environ 500 bpm [50], soit 8.3 Hz ; et pour un rat, 264 bpm [51], soit 4.4 Hz. Suivant la logique exposée précédemment, qui donnait pour l'humain une fréquence d'échantillonnage de 16.75 Hz pour un signal de 1.3 Hz, la fréquence d'échantillonnage de la pulsatilité chez le petit animal doit donc être de l'ordre de 105 Hz pour la souris et 55 Hz chez le rat.

La résolution temporelle nécessaire ($dT = 1/df$) pour observer et quantifier la pulsatilité chez un humain est donc de 60 ms environ, 10 ms pour une souris et 18 ms chez un rat.

2.2.4 Conclusion

La technique d'imagerie idéale pour répondre à notre problème aurait donc une profondeur de pénétration de l'ordre de 1 à 15 cm, une résolution spatiale d'environ 5 μ m et une résolution temporelle de 10 à 60 ms.

Brossons maintenant un portrait de l'état de l'art des différentes techniques d'imagerie cérébrale permettant de mesurer la dynamique du flux sanguin, et vérifions si elles répondent ou non à ces trois critères.

Nous allons tour à tour étudier les techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale, d'IRM, d'imagerie de la microvascularisation, avant de terminer avec les différentes méthodes d'imagerie ultrasonore.

2.3 L'imagerie fonctionnelle cérébrale

L'imagerie fonctionnelle cérébrale est une technique permettant d'étudier l'activité du cerveau : elle vise à cartographier les zones cérébrales qui sont impliquées dans des processus cognitifs, émotionnels, sensoriels ou moteurs. Elle permet également de comprendre comment différentes régions du cerveau interagissent et fonctionnent ensemble pour réaliser des tâches.

Certaines techniques d'imagerie fonctionnelle peuvent mesurer directement l'activité électrique du cerveau, comme la magnétoencéphalographie (MEG) ou l'électroencéphalographie (EEG). D'autres, dites indirectes, imagent plutôt les changements du flux sanguin au niveau de certaines

régions du cerveau, et en déduisent l'activité cérébrale grâce au principe de la réponse hémodynamique - selon lequel l'activité neuronale entraîne une augmentation du flux sanguin local dans les régions cérébrales actives. Cela peut se faire au niveau du cortex (comme en imagerie spectroscopique proche infrarouge fonctionnelle (fNIRS)), ou dans tout le cerveau.

Nous allons détailler ci-dessous quelques-unes de ces méthodes, en nous attardant surtout sur celles permettant de produire une image du cerveau entier (ou d'une tranche du cerveau), afin de voir si elles pourraient s'utiliser pour mesurer la pulsatilité dans l'ensemble de l'arbre vasculaire cérébral. Nous laisserons pour le moment de côté l'IRM fonctionnelle (IRMf), qui sera détaillée dans la section d'après (**Section** Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

2.3.1 Principe des différentes techniques d'imagerie fonctionnelle

2.3.1.1 L'imagerie SPECT

La tomographie par émission monophotonique (ou imagerie SPECT) est une technique 3D utilisée pour visualiser la distribution de traceurs radioactifs dans le corps humain. Ces traceurs émettent des photons gamma lors de leur désintégration radioactive, qui sont localisés par le système d'imagerie. Avec cette technique, on peut mesurer certains paramètres hémodynamiques comme le débit sanguin cérébral (ou *cerebral blood flow* (CBF) en anglais), qui correspond à la quantité du sang qui arrive au niveau du cerveau par unité de temps (voir **Figure 2.10**).

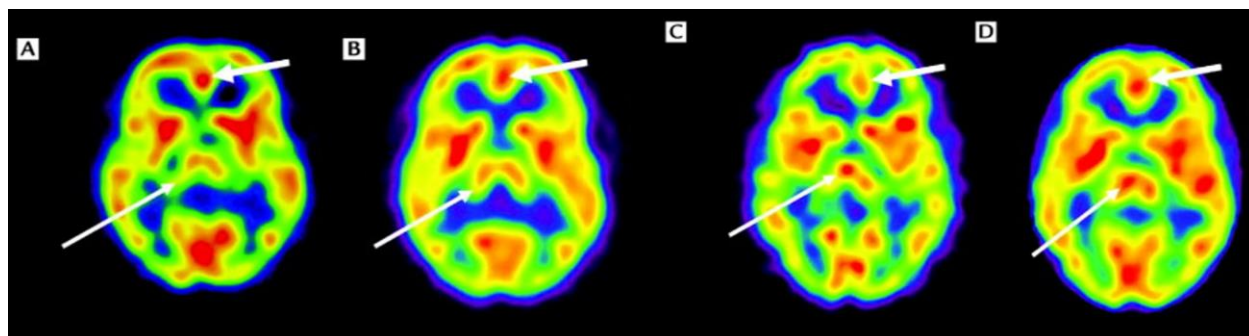


Figure 2.10 Mesures du CBF par SPECT chez l'humain.

Par exemple, on peut voir ici l'efficacité d'un traitement (le kétorolac) pour soulager la douleur, en évaluant le CBF avant (A) et après (B) avoir reçu le traitement, en comparaison avec avant (C) et après (D) avoir reçu un placebo. Figure adaptée de [52].

2.3.1.2 Le PET-scan

La tomographie par émission de positons (ou le PET-scan) est une technique d'imagerie fonctionnelle qui permet de visualiser en 3D l'activité métabolique des tissus. Tout comme l'imagerie SPECT, cette méthode est basée sur l'utilisation de traceurs radioactifs. Ces derniers sont injectés dans le sang et se lient à des tissus particulièrement gourmands en énergie. Leur activité radioactive peut ainsi être détectée afin de quantifier le métabolisme de certaines zones spécifiques, pour finalement reconstruire une image 3D du cerveau par exemple. À l'instar de l'imagerie SPECT, le PET-scan peut permettre d'obtenir des mesures de CBF (voir **Figure 2.11**).

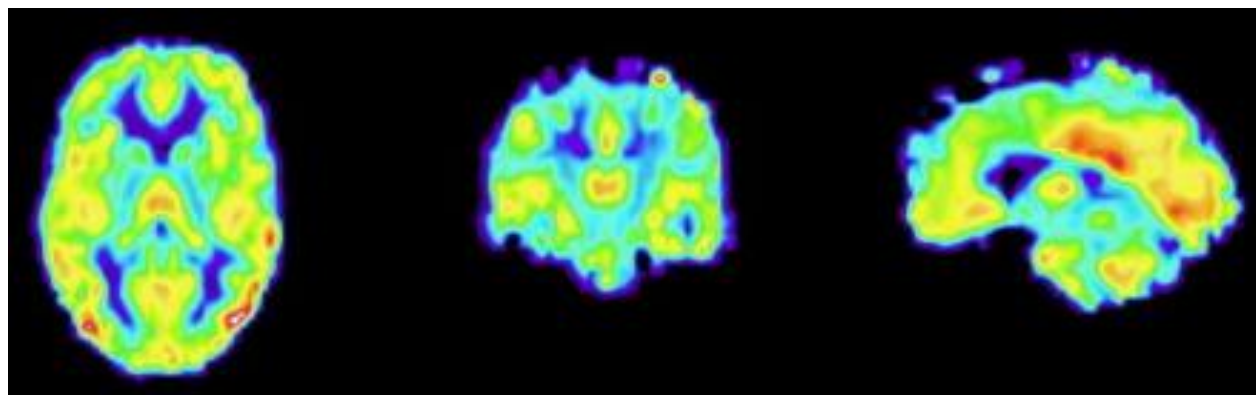


Figure 2.11 Mesures de CBF réalisées par PET-scan chez l'humain.

De gauche à droite : coupe transversale, coupe coronale, coupe sagittale. Figure issue de [53].

2.3.1.3 Le CT-scan

La tomodensitométrie, ou CT-scan, permet de réaliser des images en 2D ou en 3D des organes internes, des os, des vaisseaux sanguins et des tissus mous du corps. Elle repose sur l'utilisation de rayons X ionisants : l'image générée reflète l'absorption des rayons X lorsqu'ils traversent les différentes couches du corps (os, tissus, gras, etc).

En particulier, le scanner de perfusion (PCT) est une méthode qui permet de quantifier la perfusion cérébrale en cartographiant le CBF, le volume sanguin cérébral (CBV) et le temps de transit moyen (MTT) – voir **Figure 2.12**. Cette méthode est cependant ionisante et nécessite l'injection d'un agent de contraste iodé.

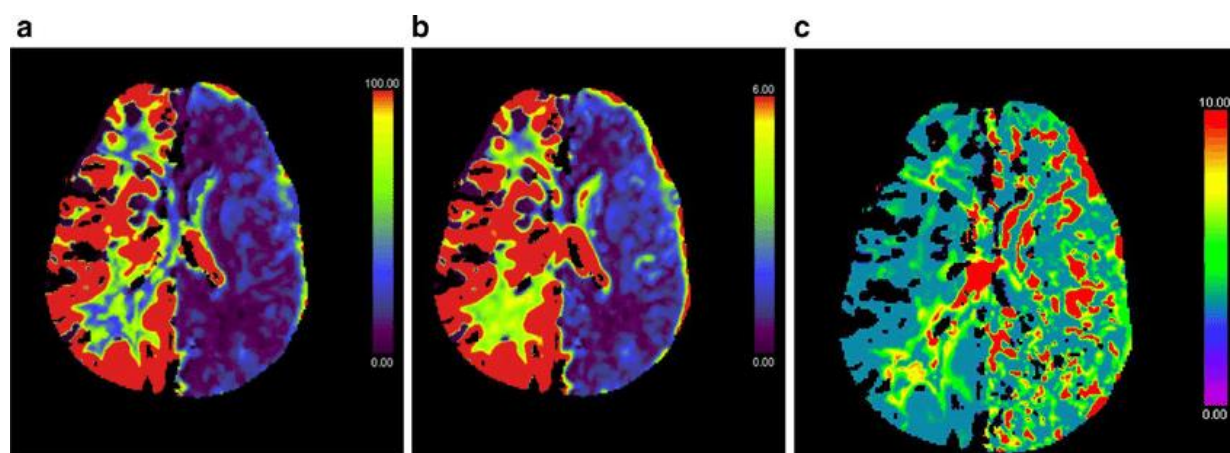


Figure 2.12 Mesures de CBF (a), de CBV (b) et de MTT (c) réalisées par PCT chez l'humain.

Figure issue de [54].

2.3.2 Limites de ces techniques pour la mesure de la pulsatilité

L'imagerie SPECT et le PET-scan présentent respectivement des résolutions spatiales de l'ordre de 10 mm et 5 mm, pour une résolution temporelle d'environ 10 min et 5 min. Chez le petit animal, la résolution spatiale peut atteindre 0.62 mm pour l'imagerie SPECT et 1.4-1.6 mm pour le PET-scan [55].

Le PCT a quant à lui une meilleure résolution temporelle (d'environ 100 ms), mais une résolution spatiale de l'ordre de 1 mm.

Ces techniques permettent donc de mesurer les variations de débit sanguin dans certaines régions du cerveau, mais elles ne permettent pas de mesurer la pulsatilité dans tout l'arbre vasculaire (et notamment dans les vaisseaux de moins d'un millimètre de diamètre). De plus, dans les deux premiers cas, ces méthodes nécessitent l'injection de traceurs radioactifs ; et dans le troisième, il s'agit d'un examen ionisant.

2.4 L'IRM

L'IRM repose sur la résonance magnétique nucléaire (RMN). Le sujet est plongé dans un champ magnétique très élevé (entre 1 et 7 Tesla), afin d'induire une magnétisation des tissus et d'aligner les moments magnétiques de spin selon l'axe du champ magnétique. On produit ensuite des champs

magnétiques oscillants plus faibles, dits « radiofréquences », qui font basculer les moments magnétiques en-dehors de cet axe.

L'IRM permet ainsi de produire, de façon non-invasive, des images en 2D ou en 3D de l'intérieur du corps (tissus mous, organes, flux sanguin). Parmi les différentes techniques qui s'appuient sur l'IRM, nous pouvons citer notamment l'IRMf et l'angiographie par résonance magnétique (ARM).

2.4.1 Principe de l'IRMf et de l'ARM-CP

En IRMf, on mesure le signal BOLD, qui reflète les variations locales de la quantité d'oxygène dans le sang qui se produisent en réponse à l'activité cérébrale (voir **Figure 2.13**). L'ARM, quant à elle, sert à visualiser les vaisseaux sanguins. En particulier, l'ARM par contraste de phase (ou ARM-CP) permet de mesurer la vitesse du flux sanguin en soustrayant deux images dont les gradients bipolaires sont de polarité inverse (voir **Figure 2.14**).

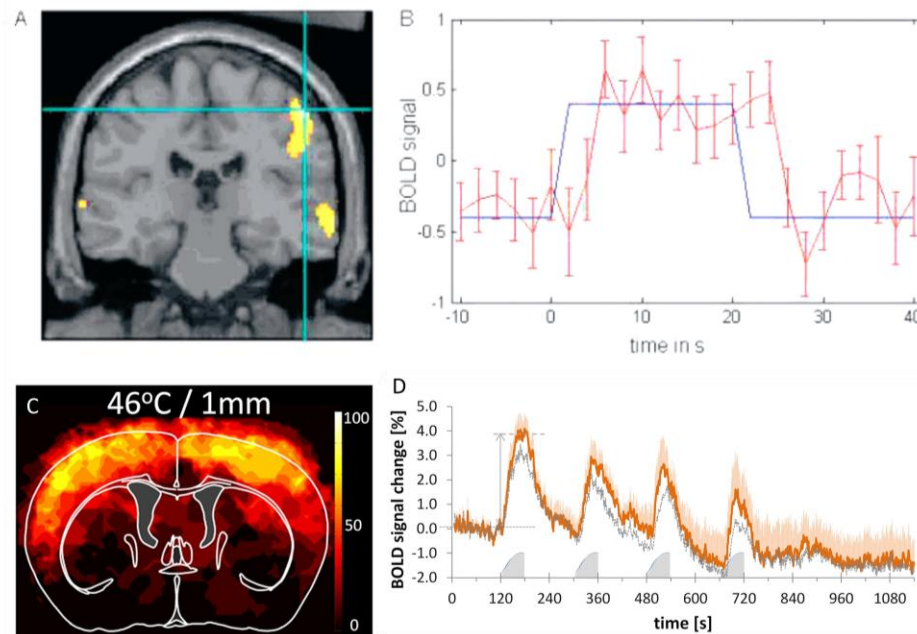


Figure 2.13 Mesures fonctionnelles réalisées en IRMf chez l'humain (A,B) et la souris (C,D).

A/C. Images du cerveau produites par IRMf ; B/D. Mesures du signal BOLD.

Figures issues de [56], [57].

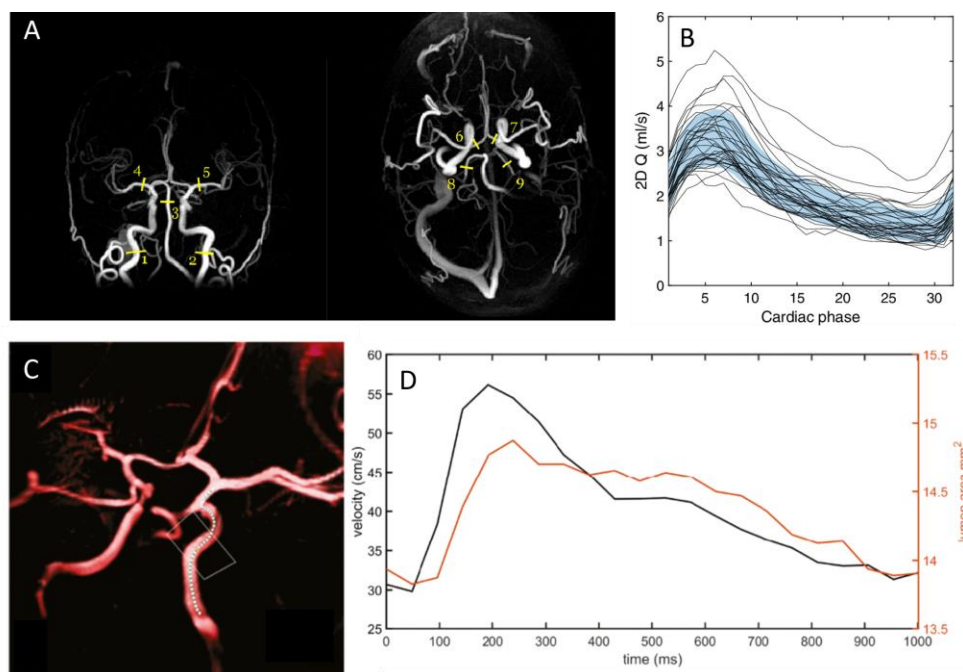


Figure 2.14 Mesures de pulsatilité réalisées en ARM-CP chez l'humain (artères majeures).

A. Images de la vascularisation produites par ARM-CP 2D (vaisseaux principaux : ICA droite et gauche (1,2), BA (3), MCA droite et gauche (4,5), ACA droite et gauche (6,7), PCA droite et gauche (8,9)) ; B. Mesures de la pulsatilité au niveau de la MCA droite réalisées chez 35 patients par ARM-CP 2D (variation du débit) ; C. Image du cercle de Willis produite par ARM-CP 4D ; D. Mesure de la pulsatilité réalisée dans la section d'une artère du cercle de Willis par ARM-CP 4D (variation de vitesse du sang et de diamètre du vaisseau). Figures issues de [9], [59].

2.4.2 Limites de ces techniques pour la mesure de la pulsatilité

L'IRMf a une résolution temporelle d'environ 100 ms, mais une résolution spatiale de l'ordre de 1 mm. Cette technique permet donc de mesurer des variations de débit sanguin dans certaines régions du cerveau, mais elle ne permet pas de mesurer la pulsatilité dans tout l'arbre vasculaire.

L'ARM-CP, quant à elle, est une technique prometteuse dans le contexte de la mesure de la pulsatilité. Au niveau de l'aorte, elle a par exemple permis de mesurer la dynamique du flux sanguin avec une résolution temporelle de l'ordre de 35.2 ms et une résolution spatiale de l'ordre de 2.4 mm [58]. De récentes études rapportent également que cette technique a permis d'atteindre une résolution spatiale inférieure à 1 mm pour mesurer la pulsatilité au niveau du cercle de Willis (0.19 mm en 2D et 0.78 mm en 4D) [59], et pour caractériser les flux sanguins au niveau

d'anévrismes (0.5 mm en 4D pour une résolution temporelle de ~ 30 ms) [60]. À notre connaissance, cette technique s'est cependant limitée pour le moment à la mesure de la pulsatilité dans les vaisseaux majeurs du cerveau ou de l'aorte.

2.5 L'imagerie de la microvascularisation

Intéressons-nous maintenant aux différentes techniques d'imagerie permettant de mesurer la pulsatilité au niveau de la microvascularisation.

2.5.1 Principe des techniques d'imagerie de la microvascularisation

2.5.1.1 L'imagerie deux-photons

La microscopie par excitation à deux photons (ou imagerie deux-photons) est une technique d'imagerie optique en 2D et en 3D. Cette technique repose sur un phénomène de non-linéarité optique, dans lequel deux photons de longueurs d'ondes proches sont absorbés simultanément par un fluorophore, qui émet alors un photon à une longueur d'onde différente correspondant à une énergie plus élevée. Cette émission de fluorescence a lieu uniquement dans un petit volume localisé à l'endroit où les deux photons ont été absorbés, ce qui permet d'atteindre une résolution spatiale micrométrique (voir **Figure 2.15**).

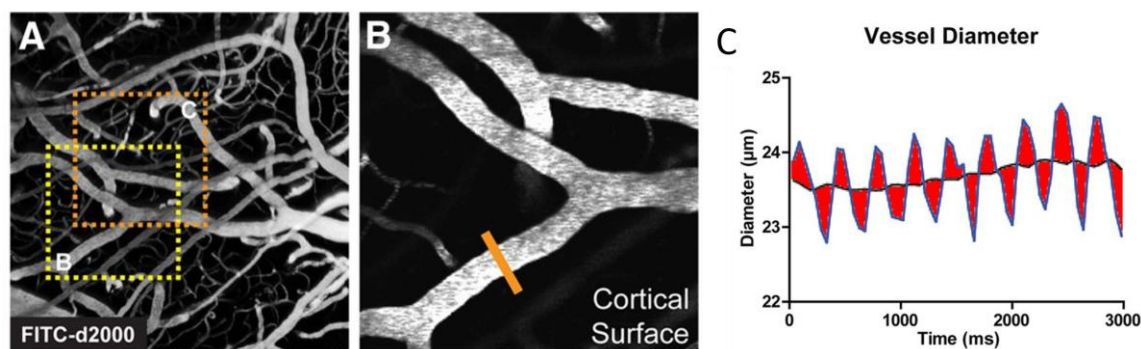


Figure 2.15 Mesures in vivo réalisées en imagerie deux-photons dans des vaisseaux du cortex chez une souris.

A/B. Images de la vascularisation produites en deux-photons ; C. Mesure de la variation du diamètre du vaisseau en fonction du temps, induite par la pulsatilité. Figures issues de [61].

2.5.1.2 L'imagerie PAM

La microscopie photoacoustique (ou PAM) est une modalité d'imagerie basée sur l'effet photoacoustique. Elle permet en particulier d'obtenir des images avec une excellente résolution spatiale et à faible profondeur (voir **Figure 2.16**).

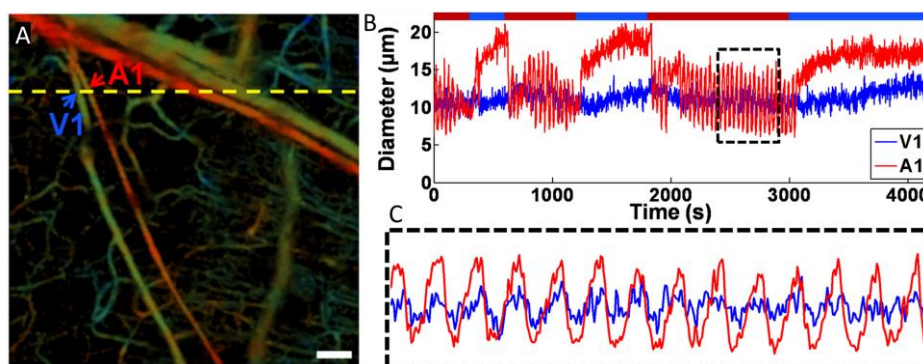


Figure 2.16 Mesures réalisées in vivo en microscopie photoacoustique dans des vaisseaux du cortex en surface du cerveau chez une souris.

A. Image de la vascularisation produite en imagerie photoacoustique ; B. Variation de diamètre de deux vaisseaux corticaux (veine et artère) au cours du temps ; C. Zoom sur la variation de diamètre des deux vaisseaux. Figures issues de [62].

2.5.1.3 L'OCT

La tomographie en cohérence optique (ou OCT) est une technique d'imagerie principalement utilisée en clinique pour obtenir des images détaillées de la rétine et du nerf optique [63] (voir **Figure 2.17**), mais elle peut également être utilisée en imagerie pré-clinique pour étudier la microvascularisation à la surface du cerveau [64] (voir **Figure 2.18**).

Elle repose sur le principe de l'interférométrie, qui se produit lorsque deux faisceaux lumineux se rencontrent et se superposent. L'OCT envoie un faisceau de lumière dans le tissu biologique, qui est partiellement réfléchi par les différentes structures tissulaires. Le faisceau réfléchi est ensuite combiné avec un faisceau de référence, qui est maintenu à une distance fixe de la surface du tissu. En mesurant les différences de temps entre le faisceau de référence et le faisceau réfléchi, l'OCT permet ainsi de cartographier la structure des tissus avec une résolution micrométrique. Cette technique peut également être utilisée pour mesurer certaines propriétés physiologiques des tissus,

telles que la pulsativité des vaisseaux sanguins, en enregistrant les variations de la lumière réfléchie en fonction du temps.

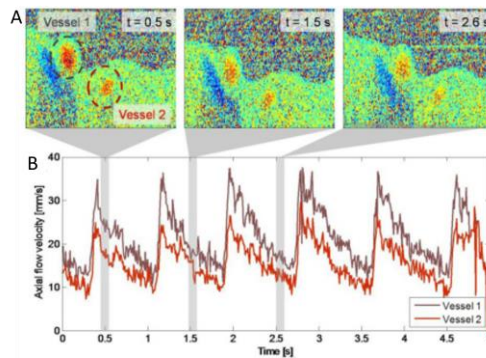


Figure 2.17 Mesures de pulsativité in vivo en imagerie OCT dans des vaisseaux de la rétine chez l'humain.

A. Image de la vascularisation produite en imagerie OCT ; B. Variations de vitesse du sang dans deux vaisseaux au cours du temps. Figure issue de [63].

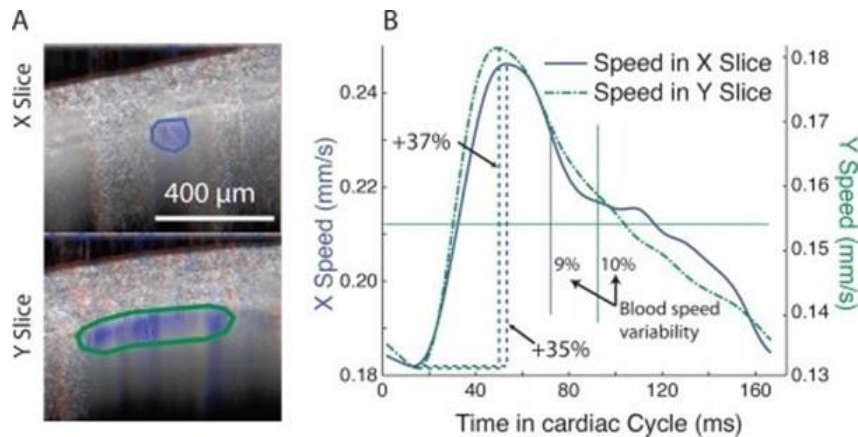


Figure 2.18 Mesures de pulsativité in vivo en imagerie OCT dans une artère à la surface d'un cerveau de souris.

A. Image de la vascularisation produite en imagerie OCT ; B. Variations de vitesse du sang dans un vaisseau au cours d'un cycle cardiaque. Figure issue de [64].

2.5.2 Limites de ces techniques pour la mesure de la pulsativité

Toutes ces techniques d'imagerie de la microvascularisation présentent une profondeur de pénétration de l'ordre d'un ou deux millimètres, pour une résolution spatiale micrométrique et une excellente résolution temporelle. Pour certaines d'entre elles, on peut parvenir à mesurer la

variation du diamètre des vaisseaux corticaux ; pour d'autres, on peut directement mesurer des variations de vitesse du sang dans ces vaisseaux au cours du cycle cardiaque. Elles permettent donc de mesurer la pulsatilité dans des microvaisseaux à la surface du cerveau (à 1 mm de profondeur), mais elles ne permettent pas de mesurer celle-ci dans des vaisseaux situés plus en profondeur.

2.6 L'imagerie ultrasonore

Nous avons constaté dans les sections précédentes (**Sections 2.3-2.5**) que, si plusieurs techniques d'imagerie du cerveau pouvaient permettre de mesurer la pulsatilité ou le débit sanguin dans certains vaisseaux de l'arbre vasculaire (en profondeur ou en surface), aucune d'entre elles ne permet d'imager la pulsatilité *in vivo*, en profondeur, à la fois dans les petits vaisseaux et dans les vaisseaux majeurs du cerveau.

Nous avons cependant, pour le moment, omis une technique : l'imagerie ultrasonore, et plus particulièrement, le TCD. Il s'agit de la technique principale utilisée aujourd'hui en clinique pour mesurer la pulsatilité dans le cadre de l'étude de maladies telles que la démence.

Dans cette section, nous allons étudier de plus près le principe de l'imagerie ultrasonore, de même que ses applications et leurs limites dans le cadre de la mesure de la pulsatilité. Nous nous intéresserons ensuite aux innovations qui ont permis le développement de l'ULM [13]–[16], de même qu'aux limites de celle-ci.

2.6.1 L'imagerie ultrasonore : principe et applications

L'imagerie ultrasonore est utilisée dans le domaine de l'imagerie médicale depuis les années 1970. Elle repose sur l'utilisation d'une sonde ultrasonore reliée à un échographe. La sonde ultrasonore est constituée d'éléments piézoélectriques capables de convertir un signal électrique en une onde mécanique (ici, une onde ultrasonore), et inversement. Une sonde ultrasonore dite linéaire (1D) comprend typiquement 128 ou 256 éléments disposés en ligne, et est capable de produire ainsi une image en deux dimensions. Une sonde ultrasonore dite matricielle (2D) possède quant à elle un plus grand nombre d'éléments (typiquement 1024 pour une sonde à 32 x 32 éléments), ce qui lui permet de produire une image en trois dimensions.

L'imagerie ultrasonore se décompose en plusieurs étapes : l'acquisition des données, la reconstruction des images (ou *beamforming* en anglais), l'analyse des données, et enfin l'affichage.

2.6.1.1 Acquisition des données

Une sonde ultrasonore reçoit, dans un premier temps, un signal électrique provenant de l'échographe, et ses éléments piézoélectriques génèrent en conséquence une onde ultrasonore dans le milieu que l'on souhaite imager. En appliquant des retards aux différents éléments, les ondes ultrasonores sphériques envoyées par chaque élément se somment pour former un front d'onde, qui peut être une onde plane (en imagerie ultrarapide) ou une onde focalisée (en imagerie conventionnelle) – voir **Figure 2.19**. Certains modes d'imagerie utilisent également des ondes divergentes.

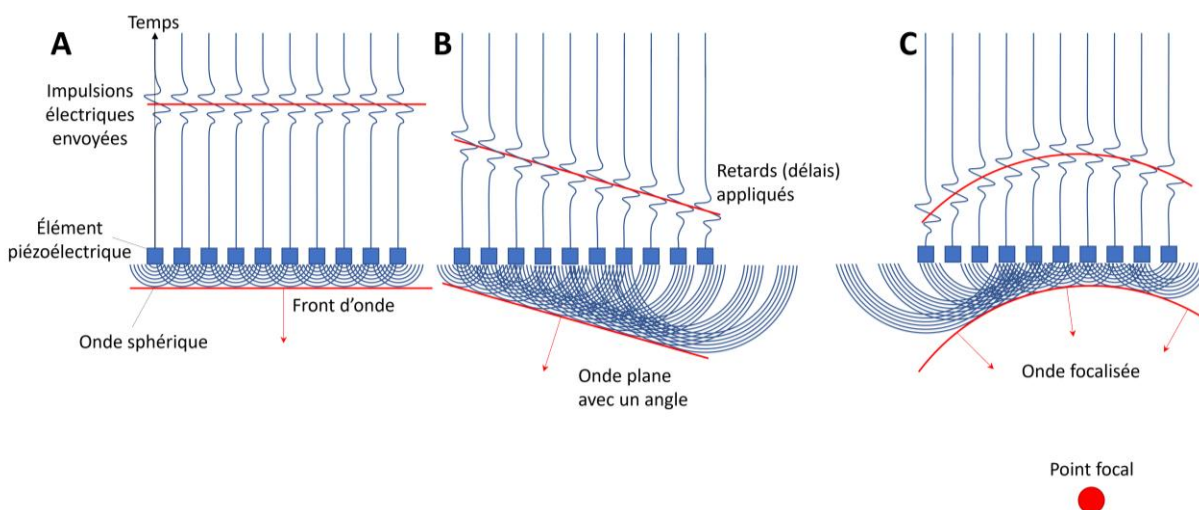


Figure 2.19 Différents types d'ondes peuvent être envoyés par la sonde ultrasonore en appliquant des retards à chaque élément piézoélectrique.

A. Chaque élément piézoélectrique reçoit un signal électrique et émet une onde sphérique, pour former un front d'onde. Selon les retards appliqués, on peut former par exemple une onde plane (B) ou focalisée (C).

L'onde est ensuite réfléchi par les réflecteurs dispersés dans le milieu, puis son écho est reçu par chaque élément de la sonde. Les éléments piézoélectriques ainsi excités génèrent à leur tour des signaux électriques, qui sont reçus par l'échographe. Ces signaux électriques, dits radiofréquences (RF), contiennent des informations sur l'amplitude et la phase des ondes réfléchies : ils peuvent ainsi être traités pour extraire les informations nécessaires à la formation de l'image finale.

2.6.1.2 Formation des images et analyse des données

Les données RF peuvent être traitées, et éventuellement filtrées, avant d'être sommées en utilisant une technique appelée mise en forme du faisceau, ou *beamforming*, pour former une image (voir **Figure 2.20**).

Avant cette étape de *beamforming*, il est également possible de convertir les données RF en données complexes IQ (composantes en phase et en quadrature) via une étape de démodulation, pour extraire des informations supplémentaires sur la phase des signaux. Les données IQ peuvent ensuite être éventuellement filtrées (notamment à l'aide d'un filtre passe-haut, voir **Section 2.6.3.3.1**), pour discriminer par exemple les signaux provenant des tissus et ceux provenant du sang, avant d'être analysées pour détecter les variations d'amplitude et de phase des signaux. L'amplitude des signaux représente l'échogénicité des réflecteurs en mouvement (c'est-à-dire leur capacité à rétrodiffuser les ondes ultrasonores), tandis que la phase représente le décalage temporel entre l'émission de l'onde ultrasonore et la réception du signal réfléchi.

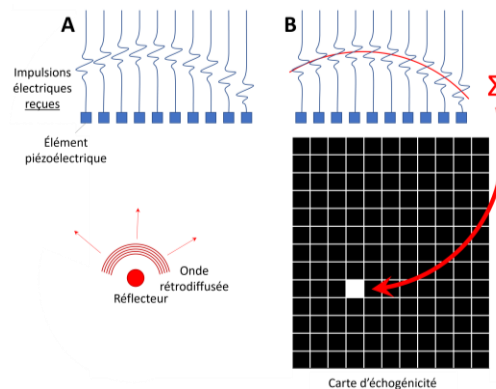


Figure 2.20 Reconstruction d'une image à partir de l'onde rétrodiffusée par un réflecteur.

A. L'écho produit par le réflecteur est reçu par les éléments piézoélectriques et converti en signaux électriques ; B. Chaque pixel de l'image finale est reconstruit en calculant sa loi de retard théorique pour chaque élément, et on additionne les signaux correspondant à ce retard théorique dans les données mesurées. La carte finale représente l'échogénicité de chaque pixel de l'image en nuances de gris.

2.6.1.3 Modes d'imagerie

À partir des données acquises grâce à l'imagerie ultrasonore, il est possible de les traiter de différentes façons afin d'en tirer des informations sur le milieu qui a été traversé et ses différentes

couches, ou encore des informations dynamiques sur le flux sanguin. Dans le premier cas, on peut afficher une image B-mode ; dans le second cas, on parle plutôt d'imagerie Doppler (Doppler couleur, Doppler puissance ou Doppler pulsé) – voir **Figure 2.21**. Il est à noter que selon le type d'information que l'on recherche et l'organe que l'on image, les séquences ultrasonores (c'est-à-dire la façon dont les ondes ultrasonores sont envoyées et reçues – longueur du pulse ultrasonore, fréquence, cadence d'imagerie, etc) ne seront pas nécessairement programmées de la même façon.

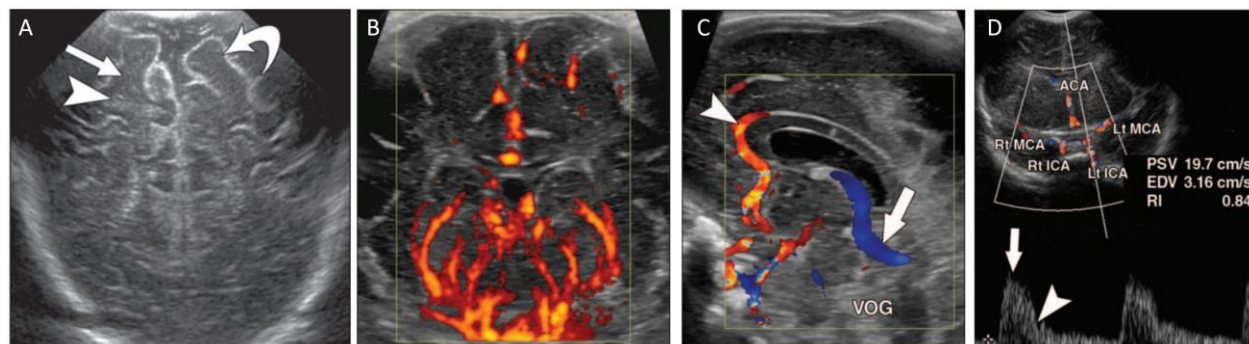


Figure 2.21 Différents modes d'imagerie Doppler conventionnelle.

A. B-mode ; B. B-mode et Doppler puissance ; C. B-mode et Doppler couleur ; D. B-mode, Doppler couleur et Doppler pulsé (mode triplex). Figures issues de [65].

2.6.1.3.1 B-mode

En imagerie B-mode, chaque pixel code pour l'échogénicité des diffuseurs qu'il contient : ainsi, plus l'amplitude des signaux cumulés est élevée, plus le pixel final sera lumineux (donc blanc). À l'inverse, plus l'amplitude des signaux cumulés est faible, plus le pixel final sera sombre (donc noir). La résolution de l'image obtenue (soit la taille de chaque pixel) dépend de la fréquence de l'onde ultrasonore envoyée par la sonde. En imagerie in vivo, une image B-mode permet ainsi de visualiser les différents milieux qui ont été traversés (gras, muscles, sang, etc) - voir **Figure 2.21A**.

2.6.1.3.2 Doppler couleur et Doppler puissance

Paradoxalement, les modes Doppler couleur et Doppler puissance ne se basent pas sur l'effet Doppler. En Doppler puissance, l'analyse se fait sur l'intensité du signal : on intègre l'aire sous l'enveloppe du signal reçu sur une période de temps plus ou moins étendue, pour fournir une mesure indirecte de la densité de globules rouges présents dans la région d'intérêt analysée. Le Doppler couleur, quant à lui, consiste à mesurer le temps Δt écoulé entre deux échos successifs

reçus (voir **Section 2.6.2.2** pour les détails des calculs), pour en déduire directement la vitesse v des hématies en mouvement :

$$\Delta t = 2 \frac{T_{PRF} v}{c_0} \cos(\theta) \quad (2-6)$$

Les informations de flux et de vitesse sont ensuite utilisées pour attribuer des couleurs aux pixels de l'image. En Doppler puissance, on utilise ces informations pour discriminer le signal provenant du tissu du signal provenant du sang ; la couleur finale que l'on attribue à un pixel est proportionnelle au nombre de globules rouges présents dans ce pixel (voir **Figure 2.21B**). À l'inverse, en Doppler couleur, c'est directement l'information sur la vitesse des globules rouges qui est affichée dans l'image finale (voir **Figure 2.21C**). Le Doppler puissance est donc souvent considéré comme plus sensible que le Doppler couleur ; mais bien qu'il soit plus sensible au bruit et aux repliements de spectre, le Doppler couleur permet d'accéder à plus d'informations quantitatives (vitesse, direction) concernant le flux sanguin.

Dans un mode d'imagerie dit Doppler couleur, le flux s'écoulant vers la sonde est généralement représenté en rouge, tandis que le flux s'éloignant de celle-ci est souvent représenté en bleu. Dans un mode d'imagerie dit Doppler puissance, les zones avec un flux sanguin plus fort apparaissent en général avec des couleurs plus claires (jaune-orangé), tandis que les zones avec un flux sanguin plus faible apparaissent avec des couleurs plus foncées (rouge). Le Doppler puissance est souvent utilisé pour évaluer la vascularisation des tissus, tandis que le Doppler couleur permet de visualiser facilement la direction et la vitesse du flux dans les vaisseaux sanguins.

2.6.1.3.3 *Doppler pulsé (ou Doppler spectral)*

Les données IQ peuvent aussi être transformées en un spectre de fréquences à l'aide d'une transformation de Fourier rapide (FFT). Cette dernière permet de représenter les variations de fréquence Doppler et donc les changements de vitesse du flux sanguin au cours du temps. On affiche souvent le Doppler pulsé avec un Doppler couleur et un B-mode, selon un mode d'imagerie dit triplex (voir **Figure 2.21D**).

Ces modes d'imagerie ultrasonore peuvent être utilisées dans le cadre de l'étude de différents organes et tissus. En particulier pour l'étude du cerveau, on peut citer deux méthodes principales : le Doppler transcrânien (TCD) et la biomicroscopie ultrasonore (UBM).

2.6.1.4 Applications pour l'étude du cerveau

2.6.1.4.1 Le Doppler transcrânien

Le TCD permet d'évaluer la vitesse du flux sanguin dans les artères principales au niveau du cerveau. Il peut être utilisé en clinique (voir **Figure 2.22**) ou chez le petit animal (voir **Figure 2.23** et **Figure 2.24**)

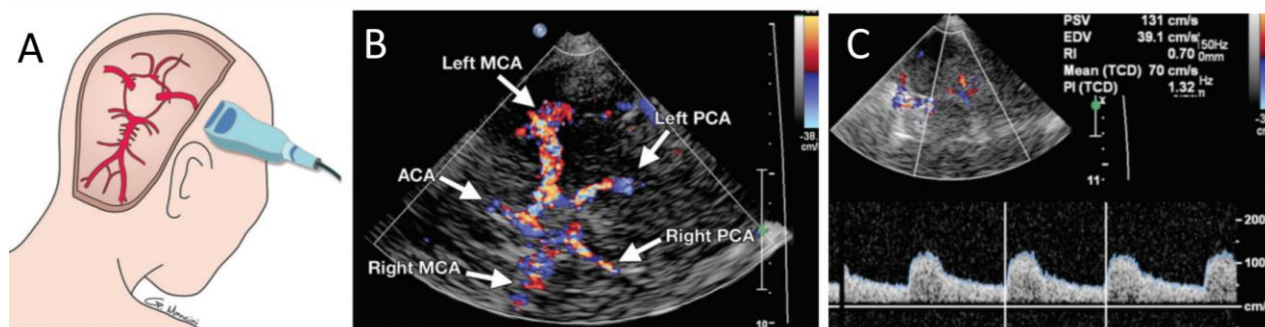


Figure 2.22 Mesures de pulsatilité in vivo réalisées en TCD chez l'humain.

- A. Positionnement de la sonde au niveau de la tempe pour visualiser le cercle de Willis ;
 B. Image du cercle de Willis obtenue en TCD (B-mode et Doppler couleur) ; C. Mesures de pulsatilité réalisées dans la PCA en TCD (B-mode, Doppler couleur et Doppler pulsé).

Figures issues de [66].

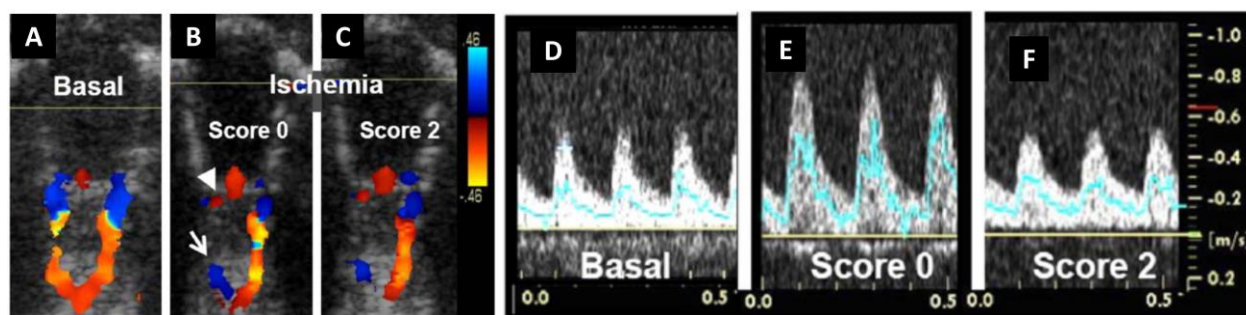


Figure 2.23 Mesures de pulsatilité in vivo réalisées en TCD chez le jeune rat (7 jours) avant et après une ischémie.

Images du cercle de Willis obtenues en TCD (B-mode et Doppler couleur) avant (A) et après ischémie (B/C) ; Mesures de pulsatilité réalisées dans l'ICA droite en TCD (Doppler pulsé) avant (D) et après ischémie (E/F).

Figures issues de [67].

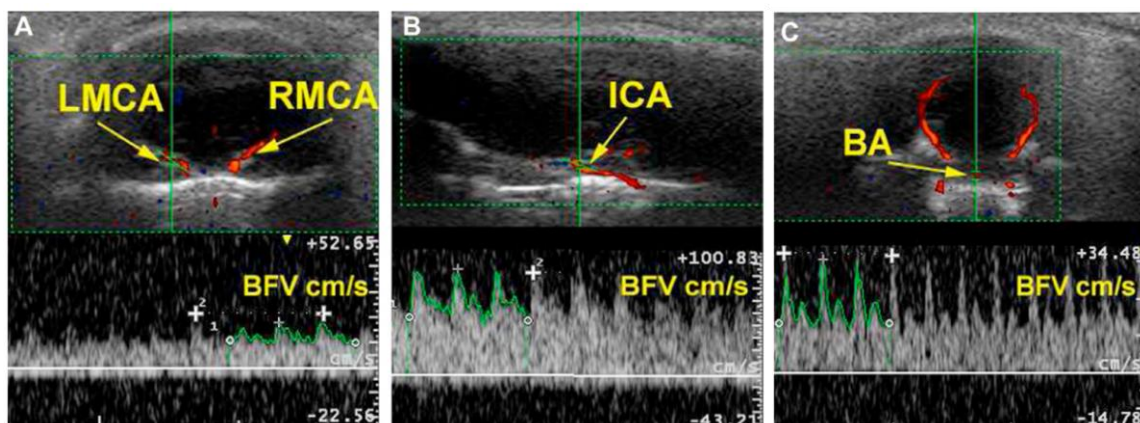


Figure 2.24 Mesures de pulsatilité in vivo réalisées en TCD chez le rat adulte.

Mesures de pulsatilité réalisées au niveau du cercle de Willis dans la MCA gauche (A), l'ICA (B) et la BA (C). Figures issues de [68].

2.6.1.4.2 La biomicroscopie ultrasonore

L'UBM est une méthode qui utilise de très hautes fréquences (20 à 60 MHz, en comparaison avec les 3 à 15 MHz utilisés en TCD par les échographes cliniques conventionnels) pour imager de manière non invasive de petits animaux (voir **Figure 2.25**).

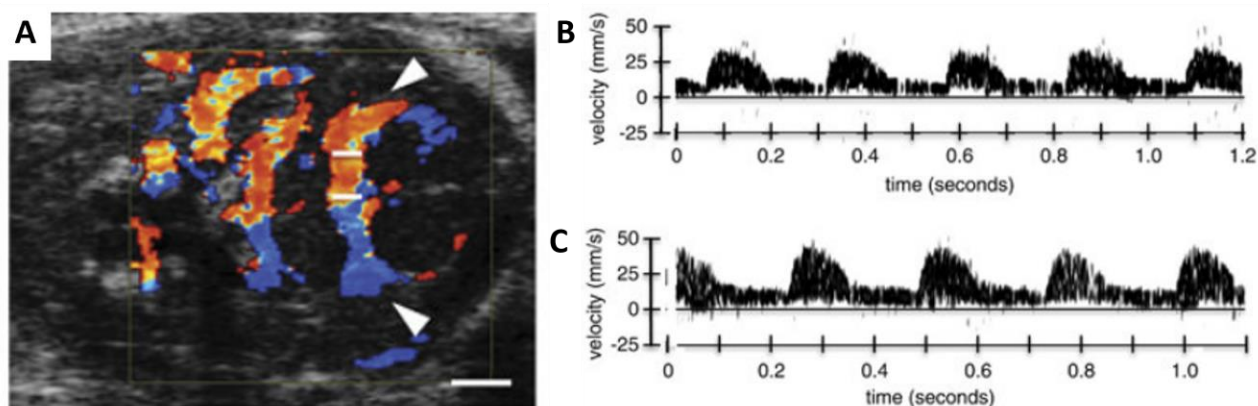


Figure 2.25 Mesures de pulsatilité réalisées in vivo en UBM au niveau du cercle de Willis dans le cerveau chez le fœtus de souris.

A. Image du cerveau du fœtus de souris obtenue en UBM (B-mode et Doppler couleur) ; Mesures de pulsatilité réalisées dans la PCA (B) et dans la MCA (C).

Figures issues de [69].

2.6.1.5 Limites du TCD et de l'UBM pour la mesure de la pulsatilité

Le TCD est l'outil diagnostique le plus couramment utilisé pour mesurer la pulsatilité et en tirer des mesures quantitatives, comme l'indice de pulsatilité. Comme on le verra à la section suivante (**Section 2.6.2**), cette méthode est cependant limitée à la mesure de la pulsatilité dans les vaisseaux majeurs du cerveau chez l'humain et l'animal (notamment au niveau du cercle de Willis), et elle ne permet pas de visualiser la pulsatilité dans les microvaisseaux.

La résolution spatiale d'une image en 2D réalisée en UBM est d'environ 50 μm , avec une profondeur de pénétration d'environ 20 mm. Cette technique peut être utilisée pour mesurer la pulsatilité au niveau des vaisseaux majeurs, par exemple dans le cerveau chez le fœtus de souris [69], dans la carotide chez la souris adulte [70], ou dans le cœur chez l'embryon de souris [71]. Mais cette méthode ne peut pas être utilisée pour de l'imagerie transcrânienne et non-invasive chez le petit animal adulte en raison des très hautes fréquences qu'elle utilise, qui ne peuvent donc pas passer la barrière du crâne. Cette méthode n'a pas non plus une résolution spatiale suffisante pour imager les microvaisseaux de moins de 50 μm de diamètre.

2.6.2 Les limites du Doppler pulsé pour la mesure de la pulsatilité chez le petit animal

Parmi les différents modes Doppler présentés précédemment (**Section 2.6.1.3**), le mode utilisé généralement pour mesurer la pulsatilité est le Doppler pulsé. C'est en effet celui qui présente la meilleure résolution temporelle, et dont on peut tirer des mesures quantitatives telles que le PI ou le RI (voir **Section 2.1.2.3**).

Le but de cette section est d'explorer les limites du Doppler pulsé concernant la mesure de la pulsatilité, en particulier chez le petit animal. Nous allons commencer par calculer les résolutions spatiale et temporelle de cette modalité, de même que sa résolution en vitesse, avant de l'appliquer au cas de la mesure de la pulsatilité dans plusieurs types de vaisseaux chez le petit animal.

2.6.2.1 Résolution en imagerie ultrasonore

2.6.2.1.1 Résolution spatiale (axiale, latérale et en élévation)

La résolution axiale correspond à la distance minimale nécessaire entre deux réflecteurs pour que l'on puisse les distinguer – ces réflecteurs étant alignés dans la direction de la propagation de l'onde

(soit en profondeur). La résolution axiale AR est environ égale la moitié de la longueur spatiale du pulse ultrasonore [72]. Elle dépend donc à la fois de la longueur d'onde λ et du nombre de cycles ultrasonores n que l'on envoie :

$$AR = \frac{n\lambda}{2} \quad (2-7)$$

La résolution latérale LR, quant à elle, correspond à la distance minimale nécessaire pour que l'on puisse distinguer deux réflecteurs alignés, cette fois, perpendiculairement à la direction de propagation de l'onde. Elle est définie par :

$$LR = \frac{\lambda f}{d} \quad (2-8)$$

avec λ la longueur d'onde, f la distance focale (donc la profondeur) et d l'ouverture de la sonde [73].

Enfin, la résolution en élévation correspond à la résolution spatiale qui est définie par l'épaisseur du faisceau ultrasonore. Elle est de l'ordre de 1.6 mm dans le cas d'une sonde linéaire à haute fréquence (15 MHz) [74], comme celle utilisée dans le premier article de cette thèse (voir **Chapitre 5**).

2.6.2.1.2 Résolution temporelle

En imagerie ultrasonore, la résolution temporelle est définie par la cadence d'imagerie, qui correspond à l'inverse du temps nécessaire à la formation d'une image. L'imagerie ultrasonore nécessite généralement l'envoi de plusieurs ondes ultrasonores afin de former une image ; et pour chaque tir, il faut laisser à l'onde ultrasonore le temps de se propager dans le milieu, d'être réfléchi et de revenir jusqu'à la sonde. On définit la PRF (pour *Pulse repetition frequency* en anglais) comme l'inverse du temps écoulé entre chaque tir : la cadence d'imagerie est donc égale à PRF/N , avec N le nombre de tirs réalisés pour former une image. Or, plus N augmente, plus la résolution et le contraste de l'image finale sont améliorés. La résolution temporelle est donc liée à la profondeur d'imagerie du milieu que l'on souhaite imager, et il existe un compromis intrinsèque entre résolution temporelle et résolution spatiale.

2.6.2.2 Mesure de la vitesse

Il existe, en imagerie ultrasonore, deux techniques permettant de mesurer la vitesse du flux sanguin en affichant un Doppler pulsé : il s'agit du Doppler continu et du Doppler impulsionnel. En Doppler continu, la sonde émet et reçoit en permanence des ondes ultrasonores, et analyse le décalage de fréquence induit par tous les réflecteurs en mouvement étant passés à travers le faisceau ultrasonore. Cette technique permet de mesurer de très grandes vitesses puisqu'elle n'est pas limitée par la PRF, mais elle ne permet pas de localiser avec précision les réflecteurs (sa résolution spatiale est donc limitée). En Doppler impulsionnel, la sonde émet et reçoit par intermittence des ondes ultrasonores, afin d'analyser le flux sanguin au niveau d'un volume défini, à une profondeur donnée. Cela permet de cartographier plus précisément le flux sanguin, mais cette technique est limitée par la PRF et souffre donc d'*aliasing* lorsqu'il s'agit d'analyser des flux sanguins avec une grande vitesse.

Le Doppler impulsionnel est la méthode qui est la plus couramment utilisée, puisqu'elle permet d'intercaler des tirs ultrasonores Doppler destinés à la mesure de la vitesse et des tirs ultrasonores B-mode permettant de voir la structure des tissus et des vaisseaux d'intérêt.

2.6.2.2.1 Doppler continu

En Doppler continu, la vitesse des globules rouges est mesurée directement à partir du décalage de fréquence grâce à l'effet Doppler. Soit f_R la fréquence des ondes ultrasonores reçues, f_T la fréquence des ondes ultrasonores transmises, v la vitesse des globules rouges, c_0 la vitesse du son dans le milieu et θ l'angle entre la sonde et le vaisseau sanguin. Le décalage de fréquence Δf perçu par la sonde peut être écrit comme :

$$\Delta f = f_R - f_T = 2f_T \frac{v}{c_0} \cos(\theta) \quad (2-9)$$

De cette équation, on déduit directement la vitesse des globules rouges :

$$v = \frac{\Delta f \times c_0}{2f_T \cos(\theta)} \quad (2-10)$$

2.6.2.2.2 Doppler impulsionnel

2.6.2.2.2.1 Vitesse et fréquence

En Doppler impulsionnel, on note t_i le temps mesuré entre l'émission de l'onde ultrasonore i et la réception de son écho, appelé en anglais *time-of-flight*. La différence de temps Δt entre deux t_i consécutifs se note donc $\Delta t = t_{i+1} - t_i$ et est proportionnel à la variation de distance Δd entre la sonde et le réflecteur tel que :

$$c_0 = \frac{2 \times \Delta d}{\Delta t} \quad (2-11)$$

avec c_0 la vitesse du son dans le milieu.

Soit T_{PRF} le temps écoulé entre deux tirs. De l'équation précédente **(2-11)**, on déduit :

$$\frac{\Delta t}{T_{PRF}} = \frac{2}{c_0} \frac{\Delta d}{T_{PRF}} \quad (2-12)$$

Or, $\Delta d/T_{PRF}$ est également égal à la vitesse des globules rouges dans l'axe du faisceau ultrasonore, $v \cos(\theta)$. On a donc :

$$\frac{\Delta t}{T_{PRF}} = 2 \frac{v}{c_0} \cos(\theta) \quad (2-13)$$

La différence de phase mesurée entre l'onde transmise et l'onde reçue, notée φ_n , s'exprime comme $\varphi_n = f_T t_n$ avec f_T la fréquence centrale. Donc la différence de phase entre deux échos successifs s'écrit $\Delta \varphi = f_T \Delta t$. De la dernière équation **(2-13)**, on déduit :

$$\frac{\Delta \varphi}{T_{PRF}} = 2 f_T \frac{v}{c_0} \cos(\theta) \quad (2-14)$$

En notant Δf la différence de fréquence discrète mesurée entre deux tirs consécutifs, soit $\Delta f = \Delta \varphi / T_{PRF}$, on obtient la même équation qu'en Doppler continu **(2-9)** :

$$\Delta f = 2 f_T \frac{v}{c_0} \cos(\theta) \quad (2-15)$$

De même qu'en Doppler continu, de cette équation, on déduit la vitesse des globules rouges :

$$v = \frac{\Delta f \times c_0}{2 f_T \cos(\theta)} \quad (2-16)$$

En Doppler impulsionnel, le décalage maximum de fréquence pouvant être mesuré est limité par la fréquence de Nyquist $f_{Nyquist}$, qui est égale à la moitié de la PRF. La vitesse maximale pouvant être mesurée s'exprime ainsi comme :

$$v_{max} = \frac{f_{Nyquist} \times c_0}{2f_T} = \frac{PRF \times c_0}{4f_T} = \frac{\lambda}{4} \times PRF \quad (2-17)$$

2.6.2.2.2 Résolution en vitesse et en fréquence

En Doppler impulsionnel, la plus petite différence de vitesses dv que l'on peut mesurer est la résolution en vitesse. Cette dernière est liée à la plus petite différence de fréquences mesurable (ou la résolution fréquentielle), df , qui s'écrit comme :

$$df = \frac{PRF}{N} \quad (2-18)$$

avec N le nombre d'échantillons utilisés dans la FFT du Doppler impulsionnel.

La résolution en vitesse, quant à elle, s'écrit (en repartant de l'équation (2-16)) :

$$dv = \frac{df \times c_0}{2f_T} = \frac{c_0}{2f_T dT} = \frac{\lambda}{2dT} \quad (2-19)$$

Ainsi, la fréquence centrale de la sonde détermine la résolution en vitesse obtenue.

2.6.2.3 Application à la mesure de la pulsatilité chez le petit animal

Comme on l'a vu à la **Section 2.2.3**, la résolution temporelle idéale pour observer et quantifier la pulsatilité dans tout l'arbre vasculaire est de 60 ms chez l'humain, 10 ms pour une souris et de 18 ms chez un rat, pour une résolution spatiale de l'ordre de 5 μm , et une profondeur de pénétration d'environ 1 cm chez le petit animal (rat ou souris) et 15 cm chez l'humain.

Chez l'humain, on utilise généralement des sondes à assez basse fréquence (de l'ordre de 2 MHz), qui permettent de passer plus facilement la barrière du crâne et de conserver une grande profondeur de pénétration. La résolution spatiale qui en découle est de l'ordre de 770 μm , ce qui est suffisant pour observer les artères majeures du cerveau (de l'ordre de 4 mm [75]), mais pas les artérioles (qui ont un diamètre de l'ordre de 30 μm [75]).

Si l'on souhaite imager un cerveau de petit animal en revanche, il est préférable de choisir une sonde à assez haute fréquence (15 MHz) [15], afin de garder une bonne résolution

spatiale (100 μm) et une profondeur de pénétration suffisante (de l'ordre de 300 longueurs d'ondes [76], soit 30 mm). Comme on l'a vu à la **Section 2.6.1.4.2**, certaines techniques, comme l'UBM, vont même jusqu'à utiliser des sondes à très hautes fréquences (20 à 60 MHz).

On remarque de prime abord que, même avec une sonde à 15 MHz, la mesure de la pulsatilité au niveau des capillaires ou des artérioles (qui ont un diamètre d'environ 4 μm et 18 μm chez la souris, respectivement [75]) est inaccessible en Doppler pulsé. Mais qu'en est-il de la mesure de la pulsatilité au niveau de vaisseaux de plus gros diamètre (~ 100 μm), voire au niveau du cercle de Willis par exemple ?

Pour maintenir une résolution temporelle de $dT = 10$ ms pour la souris et $dT = 18$ ms pour le rat, avec une sonde à 15 MHz, l'équation (2.19) nous donne une résolution en vitesse de $dv = 5.1$ mm/s chez la souris et $dv = 2.9$ mm/s chez le rat. **Est-ce suffisant pour mesurer la pulsatilité de façon quantitative ?**

Comme on l'a vu précédemment (voir **Section 2.1.2.3**), l'outil couramment utilisé pour quantifier la pulsatilité est l'indice de pulsatilité PI [28], défini par :

$$PI = \frac{V_{max} - V_{min}}{V_{moy}} \quad (2-20)$$

avec V_{max} la vitesse maximale du flux sanguin atteint pendant la systole, V_{min} la vitesse minimale du flux sanguin atteinte en fin de diastole, et V_{moy} la vitesse moyenne du sang.

L'incertitude de mesure sur l'indice de pulsatilité est donc de :

$$\frac{\Delta PI}{PI} = \frac{\Delta V_{max} + \Delta V_{min}}{V_{max} - V_{min}} + \frac{\Delta V_{moy}}{V_{moy}} \quad (2-21)$$

Or, la variation de la vitesse du sang $V_{max} - V_{min}$ est de l'ordre de :

$$V_{max} - V_{min} \sim 2V_{moy} \quad (2-22)$$

Alors, l'incertitude de mesure sur l'indice de pulsatilité (équation (2-21)) devient :

$$\frac{\Delta PI}{PI} \sim \frac{\Delta V_{max} + \Delta V_{min}}{2V_{moy}} + \frac{\Delta V_{moy}}{V_{moy}} \sim \frac{2dv}{V_{moy}} \quad (2-23)$$

Or, d'après [77], le rapport entre diamètre du vaisseau D (en μm) et vitesse moyenne V_{moy} (en $\mu\text{m/s}$), pour des artères, artérioles et capillaires de 5 à 900 μm de diamètre, s'écrit :

$$\log(V_{\text{moy}}) = (1.101 \pm 0.044)\log(D) + (2.136 \pm 0.080) \quad (2-24)$$

Donc la vitesse moyenne s'exprime en fonction du diamètre come :

$$V_{\text{moy}} = 138 \times D^{1.01} \sim 138 \times D \quad (2-25)$$

Alors, l'incertitude de mesure sur l'indice de pulsatilité (équation (2-23)) devient :

$$\frac{\Delta PI}{PI} \sim \frac{\Delta V_{\text{max}} + \Delta V_{\text{min}}}{2V_{\text{moy}}} + \frac{\Delta V_{\text{moy}}}{V_{\text{moy}}} \sim \frac{2dv}{V_{\text{moy}}} \sim \frac{2dv}{138 \times D} \sim \frac{1}{138 \frac{D}{\lambda} dT} \quad (2-26)$$

Les plus petits vaisseaux possibles que l'on peut visualiser par ultrasons sont ceux dont le diamètre est de l'ordre de la longueur d'onde, soit $D \sim \lambda$. Donc pour ces vaisseaux, on a :

$$\frac{\Delta PI}{PI} \sim \frac{1}{138dT} \quad (2-27)$$

Application numérique :

Le **Tableau 2.1** résume les applications numériques pour les trois modèles (humain, rat et souris).

Tableau 2.1 Comparaison des incertitudes sur la mesure de la pulsatilité, mesurées par Doppler pulsé.

Modèle	Fréquence centrale utilisée (MHz)	Longueur d'onde, ou diamètre du plus petit vaisseau visualisable (μm)	Profondeur du cerveau (cm)	Taille de l'image 2D obtenue (en λ)	Résolution temporelle (s)	Incetitude de mesure sur l'indice de pulsatilité du plus petit vaisseau visualisable
Humain	2	770	15	195	0.060	12 %
Rat	15	103	2	194	0.018	40 %
Souris	15	103	1	97	0.010	72 %
Souris	30	51	1	194	0.010	36 % pour un vaisseau de 103 μm 72 % pour un vaisseau de 51 μm

On voit qu'avec une sonde de 2 MHz chez l'humain, 15 MHz chez le rat et 30 MHz chez la souris, on obtient des images du cerveau d'une taille équivalente en termes de nombre de longueurs d'ondes. Mais, alors que le nombre de pixels permettant d'imager un cerveau demeure environ constant d'une espèce à l'autre, la résolution temporelle ne permet pas d'avoir un nombre d'échantillons constant dans un cycle cardiaque, ce qui mène à une incertitude croissante de la pulsatilité à mesure que la taille de l'espèce diminue.

On voit aussi que, bien qu'une sonde à haute fréquence (15 MHz) permette de visualiser des vaisseaux de l'ordre de 100 μm chez le petit animal, la mesure de la pulsatilité pour ces vaisseaux est très peu précise en Doppler pulsé (40 % chez le rat et 72 % chez la souris).

De plus, même si l'on utilise une sonde à très haute fréquence, comme à 30 MHz chez la souris, la mesure de la pulsatilité pour des vaisseaux de l'ordre de 100 μm reste élevée (36 %), et elle est encore plus imprécise pour des vaisseaux d'environ 50 μm de diamètre (72 %).

2.6.2.4 Autres limitations du Doppler pour mesurer la pulsatilité

Trois autres limitations ont également été soulevées dans la littérature pour la mesure de la pulsatilité dans les microvaisseaux en imagerie conventionnelle [78], que ce soit en Doppler impulsionnel (pulsé [79] ou couleur [80]), ou en Doppler continu [81].

Tout d'abord, la quantité de sang présente dans les microvaisseaux est très faible, ce qui induit un signal d'une faible puissance lorsqu'il s'agit d'en mesurer le décalage de fréquence. Cette première limitation peut être palliée en injectant des microbulles, ce qui a pour effet d'augmenter le contraste dans l'image et la puissance du signal en Doppler pulsé.

Ensuite, la vitesse du sang dans les microvaisseaux est comparable à celle des tissus. Par conséquent, il peut s'avérer difficile de séparer les signaux provenant des microvaisseaux de ceux provenant des tissus (ou « clutter » en anglais). Cette seconde limitation peut être partiellement contournée en utilisant un filtre de décomposition en valeurs singulières spatiotemporelles (SVD) plutôt qu'un filtre passe-haut (voir **Section 2.6.3.3.1** pour plus de détails concernant le filtrage des tissus).

Enfin, le Doppler pulsé se calcule au niveau d'une fenêtre spatiale située généralement au milieu d'un vaisseau. Cette fenêtre est typiquement de l'ordre de 1 mm x 1 mm en imagerie conventionnelle à 5 MHz. Pour des vaisseaux de quelques microns en revanche, une telle fenêtre

intercepterait un ensemble de vaisseaux plutôt qu'un seul, qui pourraient éventuellement ne pas avoir la même vitesse, la même pulsatilité (les veinules et les artérioles sont souvent proches les unes des autres au niveau du cortex par exemple), ou la même orientation par rapport à la sonde.

Ces limitations peuvent être résolues en utilisant des sondes à très haute fréquence (20-60 MHz), comme en UBM, mais au détriment de la profondeur de pénétration. De plus, à de telles fréquences, il n'est plus possible de passer la barrière du crâne, ce qui limite les applications à la mesure de la pulsatilité dans le cerveau et de façon non-invasive aux fœtus de petits animaux par exemple.

2.6.2.5 Conclusion

En conclusion, les mesures de pulsatilité réalisées en Doppler pulsé dans les microvaisseaux sont peu précises, que ce soit chez l'humain ou chez le petit animal, et ce, même à haute fréquence (15 MHz).

Nous allons maintenant nous intéresser aux différentes améliorations qui ont eu lieu ces dernières années en imagerie ultrasonore (imagerie ultrarapide, ULM), et à leurs limites pour la mesure de la pulsatilité.

2.6.3 De l'imagerie conventionnelle à l'imagerie ultrarapide

2.6.3.1 L'imagerie conventionnelle (ou focalisée)

L'imagerie ultrasonore dite conventionnelle, utilisée habituellement en clinique, repose sur l'envoi d'ondes ultrasonores focalisées dans le milieu à imager (typiquement devant chaque élément piézoélectrique de la sonde, comme à la **Figure 2.19C**). Pour chaque tir ultrasonore, des délais (ou retards) sont appliqués à chacun des éléments de la sonde. Après avoir envoyé une onde focalisée dans le milieu, les signaux rétrodiffusés par les réflecteurs sont reçus par la sonde et enregistrés par l'échographe. Comme décrit précédemment (voir **Section 2.6.1.2**), ces signaux électriques sont ensuite traités pour obtenir des données IQ puis sommés, tout en tenant compte des délais éventuels appliqués à chaque élément, en transmission et en réception. Puis, à l'issue du processus de *beamforming*, on est en mesure de reconstruire une ligne unique de l'image du milieu.

Après avoir acquis la ligne devant un élément i , le processus d'émission/réception est répété devant l'élément $i+1$, et ainsi de suite pour reconstruire toute l'image ligne par ligne, en changeant à chaque fois la focalisation de l'onde que l'on génère (voir **Figure 2.26**). Dans cette technique d'acquisition

en ligne unique, le nombre d'images par seconde que l'on peut acquérir dépend principalement de la densité des lignes de l'image : plus la densité de lignes est élevée, plus le nombre d'images par seconde obtenu sera faible, mais meilleure sera la résolution spatiale (latérale). Ainsi, le compromis entre la résolution spatiale et la résolution temporelle est très important en imagerie ultrasonore conventionnelle : typiquement, on peut atteindre de 30 à 80 images par seconde avec cette méthode, en effectuant entre 100 et 200 tirs ultrasonores.

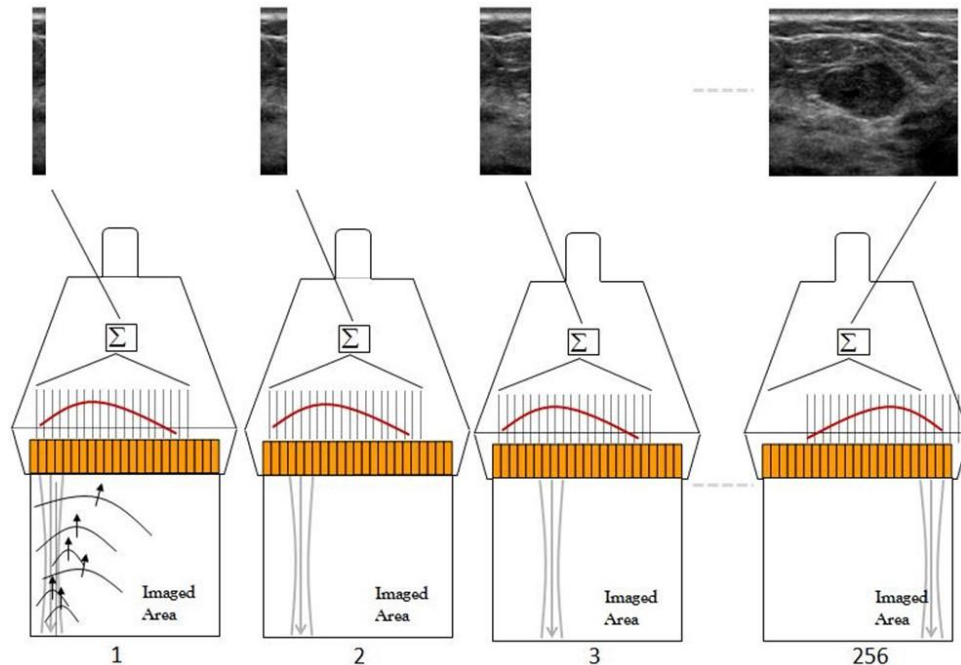


Figure 2.26 Reconstruction d'une image ligne par ligne en imagerie conventionnelle (focalisée).

Figure issue de [12].

2.6.3.2 L'imagerie ultrarapide

Pour atteindre un nombre d'images par seconde plus élevé et une meilleure sensibilité, une technique d'imagerie dite ultrarapide [82]–[85] a été développée au début des années 2000. Cette technique consiste à envoyer une onde plane avec l'ensemble des éléments de la sonde ultrasonore plutôt qu'une onde focalisée, pour insonifier tout le milieu à imager en un seul tir ultrasonore : on agit alors comme si la focalisation était fixée à une distance infinie (comme à la **Figure 2.19B**). L'onde est rétropropagée par les diffuseurs présents dans le milieu, et le signal est reçu et enregistré par l'ensemble des éléments. Ensuite, les données sont traitées en parallèle en ajoutant de manière cohérente les échos en provenance d'un point spécifique dans l'espace. Ainsi, la focalisation est

réalisée uniquement en réception. Enfin, une image complète est produite, le tout en n'envoyant qu'une seule onde plane (au lieu de 128 ondes focalisées pour la précédente technique). Le nombre d'images par seconde que l'on peut atteindre en imagerie ultrasonore ultrarapide peut être d'environ 10 000 images par seconde [86], mais l'image finale peut souffrir d'une faible résolution spatiale et d'un contraste diminué.

Ce problème peut être résolu en envoyant plusieurs ondes planes inclinées au lieu d'une seule. En effet, en appliquant des délais aux différents éléments de la sonde, il est possible de donner un angle à cette onde plane. On peut ensuite additionner de manière cohérente les signaux obtenus pour chaque onde plane inclinée lors de l'opération de *beamforming* pour obtenir une image (voir **Figure 2.27**). Si l'on fait cette opération avec un nombre suffisant d'ondes planes inclinées (typiquement moins d'une dizaine), on peut obtenir une image dont le SNR, le contraste et la résolution sont équivalents à l'imagerie focalisée [82].

Ainsi, entre l'imagerie conventionnelle et l'imagerie ultrarapide, la cadence d'imagerie a pu passer de quelques dizaines d'images par seconde à plusieurs milliers, permettant le développement de nouveaux biomarqueurs [84], [87].

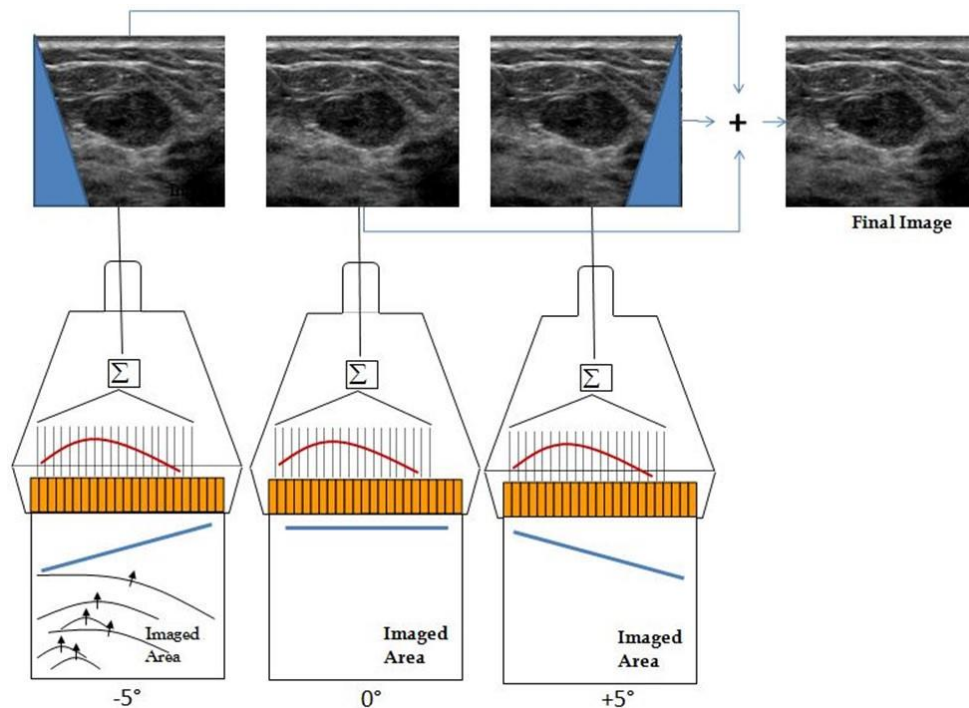


Figure 2.27 Reconstruction d'une image avec 3 ondes planes en imagerie ultrarapide.

Figure issue de [12].

2.6.3.3 Améliorations de l'imagerie ultrarapide

Au fil des années, plusieurs méthodes ont été proposées pour améliorer l'imagerie ultrarapide. Nous en citons ici trois en particulier : le filtrage par SVD pour la suppression des tissus, la correction de mouvement et la correction d'aberrations.

2.6.3.3.1 Filtrage des tissus

En échographie Doppler, il est courant de chercher à éliminer les signaux provenant des tissus, pour ne conserver que les signaux provenant du flux sanguin. Pour ce faire, en imagerie conventionnelle, on utilise souvent des filtres passe-haut, qui peuvent être plus ou moins abrupts en fonction de l'ordre du filtre et de la fréquence de coupure choisie.

Mais dans certaines situations, mieux discriminer le flux et les tissus peut s'avérer complexe, car les échos des tissus et du sang ont tendance à être similaires, surtout lorsque le débit est faible (dans les petits vaisseaux) ou lorsque le mouvement des tissus est important (dans les applications cardiaques, par exemple). Les filtres passe-haut, qui supposent un déplacement lent des tissus et un écoulement rapide du flux sanguin, échouent donc souvent à distinguer le flux et les tissus dans ces cas particuliers.

Pour mieux filtrer les tissus dans les petits vaisseaux ou en présence d'un fort mouvement des tissus, le filtrage par SVD a été proposé [88]. Les tissus et le flux n'ont pas la même cohérence spatiotemporelle : le signal des tissus a une plus grande cohérence spatiotemporelle que le signal du sang. Lorsque l'acquisition ultrarapide est décomposée par la SVD en vecteurs spatiotemporels, le signal des tissus est censé être concentré dans les premières valeurs singulières, tandis que les informations sur le flux sanguin et le bruit sont concentrées dans de plus hautes valeurs singulières. Ainsi, en rejetant suffisamment de premières valeurs singulières, le signal des tissus peut être fortement atténué.

2.6.3.3.2 Correction de mouvements

Lors de l'acquisition des images ultrasonores, il peut arriver que l'organe bouge entre deux images successives (à cause de la respiration ou des battements cardiaques notamment), induisant des artefacts dans les images. Afin de résoudre ce problème, différents algorithmes de correction de mouvements ont également été proposés dans la littérature : il est par exemple possible de changer la séquence ultrasonore elle-même pour limiter l'effet des mouvements en amont [89], [90].

2.6.3.3.3 *Correction d'aberrations*

Lorsque les ondes ultrasonores traversent plusieurs couches de tissus, comme le gras, le muscle ou l'os, elles subissent des déformations : on parle d'« aberrations ». Cela peut dégrader la qualité des images et empêcher l'obtention de mesures quantitatives. Pour l'imagerie du cerveau en particulier, le crâne entraîne aussi une atténuation rapide du signal ultrasonore, rendant difficile la visualisation précise des structures en profondeur. Plusieurs approches pour corriger ces aberrations ont été proposées dans la littérature, que ce soit en imagerie conventionnelle [91] ou en imagerie ultrarapide [92], [93].

2.6.3.4 **Applications de l'imagerie ultrarapide**

L'imagerie ultrarapide a notamment été appliquée chez l'humain pour évaluer la pulsatilité au niveau du placenta [94]. Dans le système cardiovasculaire, elle a entre autres été utilisée pour évaluer l'activité électromécanique du cœur [95], le flux sanguin au niveau des coronaires [96] et du myocarde [97], et la rigidité artérielle au niveau de l'aorte [98]. Pour le cerveau, la méthode a été appliquée en imagerie fonctionnelle (fUS) [99] chez le petit animal [100], [101], le primate [102], l'humain avec craniotomie [103], [104] et le nouveau-né à travers la fontanelle [105], [106].

Enfin, l'imagerie ultrarapide a pu être transférée en 3D et testée avec succès chez l'humain pour la visualisation des flux sanguins au niveau du cœur et de la carotide [107], et au niveau des coronaires [108], de même que pour l'évaluation de l'activité électromécanique du cœur [109]. La méthode en 3D a également été appliquée à l'imagerie du cerveau chez le petit animal, permettant de visualiser l'ensemble des vaisseaux sanguins du cerveau et la vitesse moyenne du flux au sein de chacun d'entre eux [110], voire d'en mesurer certains paramètres hémodynamiques (voir **Figure 2.28**) [110] et l'activité fonctionnelle en 4D [111], [112].

Cependant, comme on l'a vu précédemment (voir **Section 2.6.2**), le mode Doppler pulsé de l'imagerie ultrarapide (comme celui de l'imagerie conventionnelle) n'a pas une résolution en vitesse suffisante pour mesurer la pulsatilité dans les microvaisseaux. On peut par exemple noter à la **Figure 2.28D** que l'on peut distinguer les maxima de vitesse au cours du cycle cardiaque dans un vaisseau chez le rat, sur un spectre de Doppler pulsé, mais on ne peut en tirer une mesure quantitative de la pulsatilité.

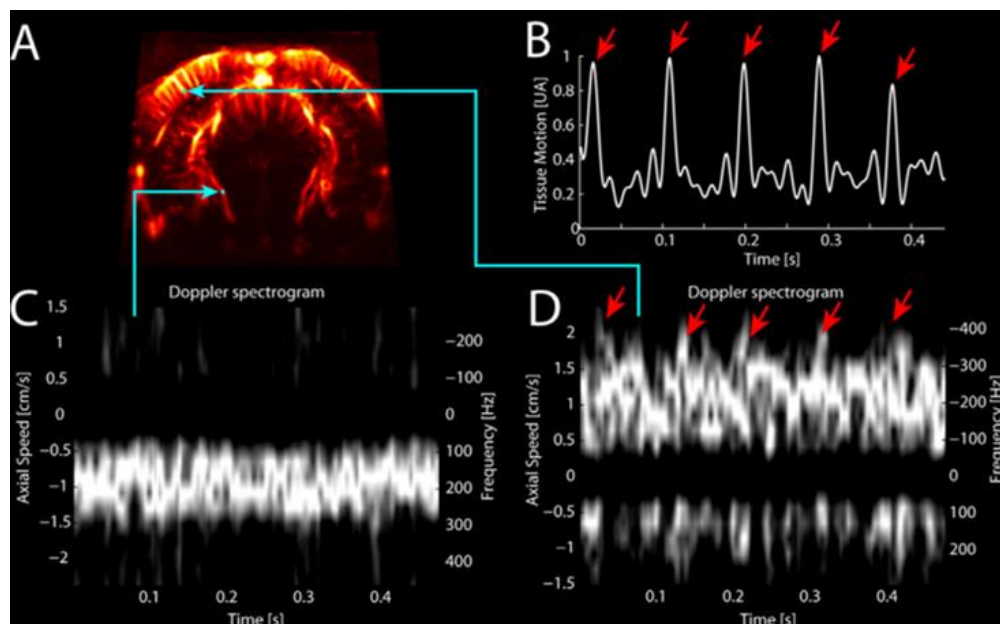


Figure 2.28 L'imagerie ultrarapide 4D pour la mesure de la pulsatilité dans le cerveau chez le rat.

A. Doppler puissance d'une section 2D du volume 3D d'un cerveau de rat ; B. Mouvement des tissus, où l'on retrouve le cycle cardiaque de l'animal. Certains vaisseaux présentent une pulsatilité faible (C), mais elle peut être reconnaissable dans d'autres (D). Figure issue de [110].

2.6.4 La Microscopie de Localisation Ultrasonore

L'imagerie ultrasonore, qu'elle soit focalisée ou ultrarapide, est restreinte en résolution par la limite de diffraction, souvent décrite par le critère de Rayleigh [113]. En effet, les ondes ultrasonores envoyées dans le milieu sont caractérisées par leur fréquence centrale, qui est elle-même reliée à la longueur d'onde (qui est de l'ordre de $100\ \mu\text{m}$ pour $15\ \text{MHz}$). Or, la résolution spatiale (axiale et latérale) des images que l'on peut obtenir est directement proportionnelle à la longueur d'onde. Ainsi, comme on l'a vu précédemment (**Section 2.6.2.3**), avec l'imagerie ultrasonore standard, on ne peut pas visualiser d'objet plus fins que $100\ \mu\text{m}$ typiquement (donc cette méthode ne permet pas d'accéder aux veinules, ni aux artérioles, et encore moins aux capillaires).

L'emploi de microbulles a été proposé en 2010 [13] afin d'améliorer nettement la résolution spatiale atteinte par l'imagerie ultrasonore ultrarapide à l'aide de la technique de l'ULM (voir **Figure 2.29**) [14]–[16], [114]. Nous allons détailler dans les sections suivantes l'intérêt d'utiliser de telles microbulles, et comment elles peuvent améliorer la résolution atteinte habituellement par l'imagerie ultrasonore.

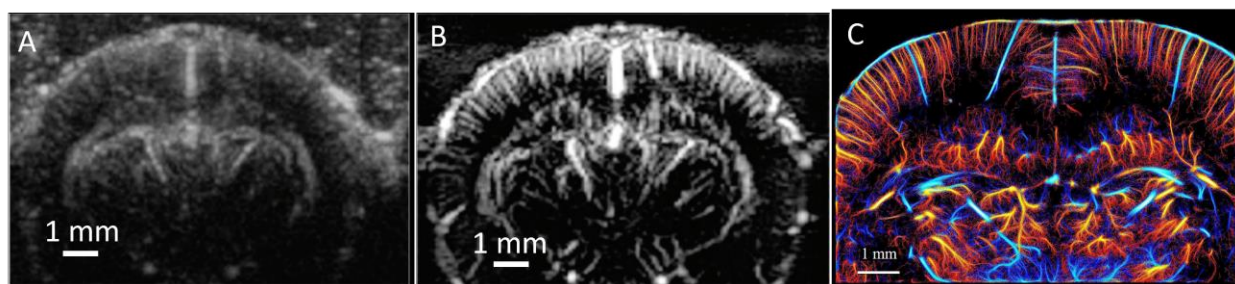


Figure 2.29 Différentes méthodes d'imagerie ultrasonore chez le rongeur. Imagerie du cerveau entier en coupe coronale chez le rat.

A. Imagerie conventionnelle ; B. Imagerie ultrarapide ; C. ULM.

Figures issues de [84] et [15].

2.6.4.1 Origines de l'ULM

La méthode de localisation des microbulles en ULM s'inspire d'une technique de microscopie en fluorescence à haute résolution, appelée la microscopie de localisation photo-activée (PALM). Cette technique a été développée au début des années 2000 par Eric Betzig, Stefan W. Hell et William E. Moerner. Ces derniers ont été récompensés pour leurs travaux par le prix Nobel de chimie, en 2014.

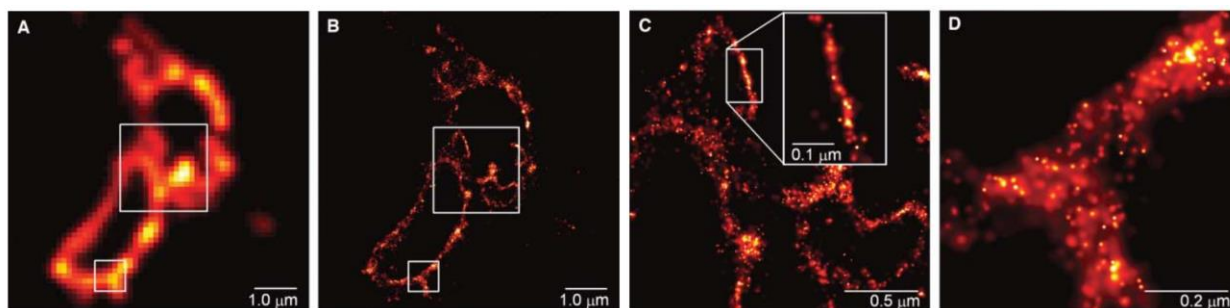


Figure 2.30 Microscopie de Localisation en imagerie PALM.

A. Image réalisée par microscope de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) ; B. Image réalisée par microscopie de localisation photo-activée (PALM) ; C/D. Zooms effectués sur l'image B. Figures issues de [115].

Cette technique consiste à prendre un très grand nombre d'images de quelques fluorophores isolés, tout en contrôlant la fluorescence de ces derniers en envoyant de courtes stimulations. Ce faisant, on parvient à séparer les photons provenant de chaque molécule. En raison de la diffraction,

chacune d'entre elles donne une image non pas d'un point lumineux ponctuel, mais d'une tache d'Airy. La position de chaque molécule dans chaque image est ensuite calculée de façon très précise, grâce à un ajustement gaussien réalisé sur leurs taches d'Airy. Lorsqu'on somme toutes les positions obtenues, on obtient une image mieux résolue (voir **Figure 2.30**).

Cette méthode a ensuite été transférée à l'imagerie ultrasonore, sous le nom de l'ULM [13]–[16], puis appliquée à l'imagerie du cerveau du petit animal *in vivo* pour la première fois en 2015 [14].

2.6.4.2 Principe de l'ULM

Il existe plusieurs particularités en ULM, qui distingue cette méthode des autres techniques ultrasonores décrites dans les sections précédentes (imagerie ultrarapide et conventionnelle notamment).

2.6.4.2.1 L'utilisation de microbulles

L'ULM repose sur la détection et le suivi de microbulles à travers l'ensemble du réseau vasculaire. Ces microbulles sont composées d'un cœur constitué d'un gaz inerte (perfluorocarbène pour celles de la marque Definity) et d'une enveloppe lipidique qui les stabilisent. D'une taille d'environ 1 à 6 μm de diamètre, elles se propagent dans l'ensemble de l'organisme après injection dans le réseau vasculaire. Elles sont ensuite éliminées, principalement par la respiration, quelques minutes après l'injection. Ces microbulles sont couramment utilisées en imagerie de contraste ultrasonore. La différence d'impédance induite entre le gaz que contient la microbulle et les tissus environnants permet à celle-ci de jouer le rôle d'agent de contraste. Pour une certaine gamme de fréquences, il est aussi possible de faire entrer la microbulle en résonance afin d'augmenter son contraste [16].

Les microbulles sont injectées dans la circulation sanguine, à des concentrations relativement faibles, de telle sorte que leurs signaux puissent par la suite être isolés individuellement. Cette injection peut se faire sous forme de bolus administré au début de l'acquisition ultrasonore, ou sous forme d'injection en continu.

2.6.4.2.2 Acquisition et traitement des données

Lorsque les microbulles se propagent dans la circulation, il est possible d'imager leurs déplacements dans la vascularisation d'un organe d'intérêt à l'aide de l'imagerie conventionnelle

ou ultrarapide. La première est cependant limitée à l'imagerie de microbulles très lentes (de l'ordre de 1.5 mm/s typiquement) [116]. À l'inverse, la résolution temporelle de l'imagerie ultrarapide est suffisante pour observer les microbulles se propager dans le réseau vasculaire, pour des vitesses de flux sanguin variant entre 1 mm/s et quelques cm/s [105] : c'est pourquoi c'est aujourd'hui principalement l'imagerie ultrarapide qui est utilisée dans la littérature en ULM.

La reconstruction des images se fait ensuite lors du processus de *beamforming* comme nous l'avons vu précédemment (voir **Section 2.6.1**). Les images obtenues sont filtrées afin d'isoler le signal provenant des microbulles individuelles. Plusieurs méthodes ont été proposées pour ce faire, comme de s'appuyer sur l'imagerie harmonique [117], [118]. L'emploi d'un filtre SVD [88], couramment utilisé en imagerie ultrarapide comme on l'a vu à la **Section 2.6.3.3.1**, s'est également généralisé dans la littérature en ULM : celui-ci permet d'isoler et de supprimer le signal provenant des tissus, qui présente une forte cohérence spatiotemporelle, pour ne garder que les signaux provenant des microbulles. De même, les autres améliorations de l'imagerie ultrarapide évoquées à la **Section 2.6.3.3** ont été au fur et à mesure intégrées aux séquences et aux algorithmes d'ULM, comme la correction d'aberrations pour l'imagerie transcrânienne [119] ou la correction de mouvement pour l'imagerie du cœur [120].

Un exemple de traitement des images en ULM est donné à la **Figure 2.31**.

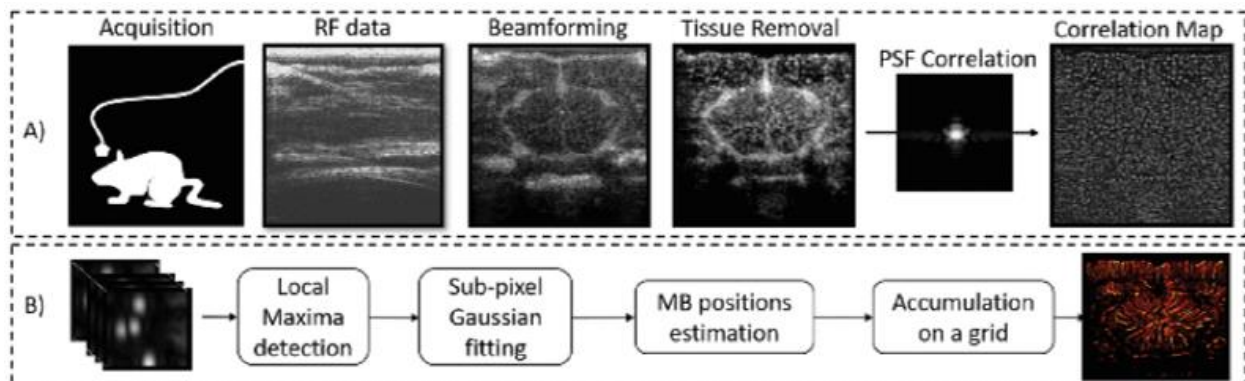


Figure 2.31 Un exemple de *pipeline* pour réaliser des images en ULM.

A. Après l'acquisition des données, les images sont reconstruites et le tissu est filtré ; B. On détecte les maxima locaux correspondant aux microbulles, et l'on applique une fonction gaussienne pour retrouver la position de chaque microbulle.

Figures issues de [121].

2.6.4.2.3 *La localisation des microbulles*

Sur chaque image obtenue, les microbulles sont ensuite localisées, c'est-à-dire que l'on calcule le centre de chacune d'entre elles pour retrouver leur position exacte. Cette localisation peut être faite sur les données avant ou après l'étape de *beamforming*. Plusieurs algorithmes de localisation ont été proposés dans la littérature pour effectuer cette étape de localisation, et d'après [122] et [123], ceux qui performant le mieux sont celui basé sur la symétrie radiale et celui basé sur un ajustement (ou *fitting* en anglais) gaussien. Le premier exploite les propriétés de symétrie de la PSF pour en retrouver le centre [124], tandis que dans le second, on calcule le centre de chaque microbulle en l'ajustant à l'aide d'une fonction gaussienne [125]. À l'issue de ce processus, le centre de chaque microbulle est estimé avec une précision inférieure à la longueur d'onde : on parle ainsi de « super-résolution ».

2.6.4.2.4 *Le suivi des microbulles*

Les microbulles sont ensuite suivies d'une image à l'autre, afin de reconstruire le chemin qu'elles ont parcouru à travers le réseau vasculaire. Il existe à nouveau plusieurs algorithmes en ULM pour cette étape de suivi, dont l'appariement selon le plus proche voisin [126], l'algorithme hongrois [127], ou encore le filtre de Kalman [128]. Dans le premier cas, il s'agit d'apparier une microbulle avec la plus proche trouvée dans l'image suivante. Dans le second cas, on cherche à minimiser la somme totale de toutes les distances calculées entre les microbulles trouvées dans deux images consécutives [129], [130]. Dans le troisième, la position et la vitesse de chaque microbulle est prédite pour l'image suivante en fonction de ses positions et vitesses calculées dans les images précédentes, puis l'appariement se fait entre les prédictions et les positions réelles trouvées dans l'image suivante [131].

À l'issue de cette étape de suivi, on obtient les trajectoires empruntées par les microbulles dans tout le réseau vasculaire.

2.6.4.2.5 *Interpolation des trajectoires*

Les trajectoires des microbulles trouvées à l'étape précédente sont ensuite interpolées, afin d'ajouter des positions entre chaque microbulle réellement trouvée et de lisser les trajectoires, pour réduire les erreurs de localisation éventuelles [122]. Cette interpolation peut se faire de différentes façons. On peut fixer le nombre de positions interpolées à ajouter entre chaque position réelle,

quelle que soit la distance qui les sépare (on parle alors d'interpolation linéaire) [132], [133]. On peut également faire une interpolation cubique, qui permet d'obtenir des trajectoires plus lissées et d'assurer une continuité au niveau de la vitesse et de l'accélération d'une microbulle au sein d'une même trajectoire [134]. Enfin, on peut fixer la distance maximale entre deux microbulles [135] : on parle alors d'interpolation adaptative, qui permet d'ajouter plus de positions entre deux microbulles particulièrement rapides par exemple, sans pour autant ajouter beaucoup de positions entre deux microbulles très lentes.

2.6.4.2.6 Affichage des images

Les trajectoires interpolées sont finalement projetées sur une image dont la résolution est plus fine que la grille de *beamforming* initiale. Des informations telles que la vitesse moyenne des microbulles, leur nombre, leur profil de vitesse ou leur direction peuvent être affichées pour chaque pixel [14], pour en tirer des informations quantitatives et d'éventuels biomarqueurs (voir **Figure 2.32**).

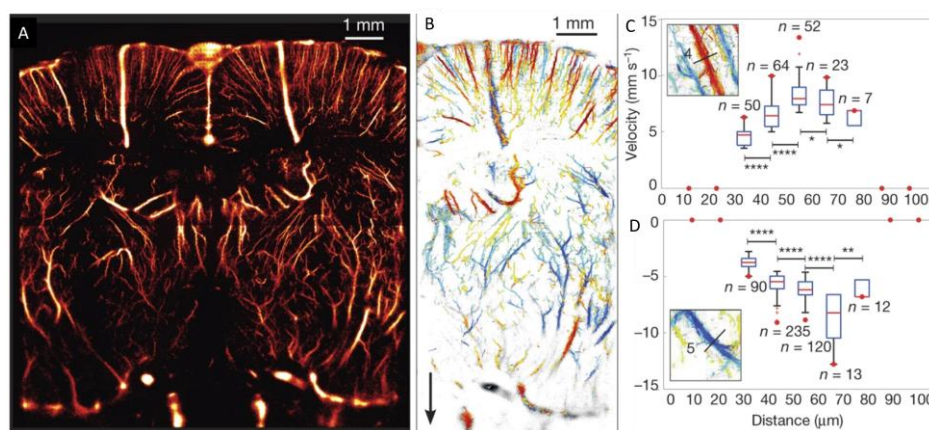


Figure 2.32 Différentes mesures quantitatives peuvent être extraites à partir de données générées en ULM.

A. Angiographie du cerveau de rat réalisée par ULM (densité de microbulles) ; B. Carte des vitesses des microbulles. C/D. Profils de vitesses dans deux vaisseaux différents.

Figures issues de [14].

2.6.4.3 Limites de l'ULM

Pour que l'image puisse être reconstruite cependant, il est nécessaire que chaque vaisseau ait été parcouru par un nombre suffisant de microbulles [136]. En effet, plus un vaisseau aura été parcouru

par un nombre important de microbulles, plus l'on pourra en tirer des mesures quantitatives (densité de microbulles, profil de vitesse au sein du vaisseau, vitesse maximale et minimale, etc). Pour augmenter le nombre de microbulles détectées dans un vaisseau, il existe deux solutions : augmenter le temps d'acquisition des images, ou augmenter la concentration en microbulles.

Cependant, dans le premier cas, le temps d'acquisition est limité par le temps de persistance des microbulles dans le système vasculaire en cas de bolus. En cas d'infusion continue de microbulles, on est limité cette fois par la quantité de microbulles qui peuvent être injectées de façon sécuritaire au cours du temps. Un long temps d'acquisition peut également s'avérer pénible pour le clinicien et pour le patient, qui doivent conserver une position fixe tout au long de l'examen.

De plus, la résolution des images en ULM est intrinsèquement liée à la faible concentration en microbulles dans l'image : si la concentration augmente drastiquement, les microbulles ne pourront plus être détectées individuellement. Elles seront donc soit éliminées par la SVD, soit détectées avec d'importantes erreurs de localisation.

L'ULM fait donc face à un compromis entre temps d'acquisition, concentration en microbulles et résolution souhaitée [136], [137]. Certaines méthodes en apprentissage profond peuvent néanmoins aider la reconstruction de vaisseaux en cas de concentration élevée [121]. Il est également possible de réaliser une corrélation des images *beamformées* avec la PSF du système, avant la localisation des microbulles, pour permettre d'éliminer le signal provenant de microbulles trop proches [138].

2.6.4.4 Applications de l'ULM

2.6.4.4.1 Imagerie préclinique et clinique

L'ULM a, dans un premier temps, été testée *in vitro* [139] et *in vivo* en 2D chez la souris pour imager une tumeur [140]. Elle a par la suite été appliquée chez le petit animal sur différents organes et tissus. En particulier, elle a été utilisée *in vivo* chez le rat pour réaliser des angiographies du cerveau [14], de même que chez la souris [141], [142]. La méthode a aussi été testée chez le rat au niveau du rein [126], [143], [144] et de tumeurs [145], chez le lapin au niveau de l'artère fémorale [146], de même que chez la souris au niveau de tumeurs [147], des muscles squelettiques [148], de l'oreille [116] et du foie [149]. L'ULM est, aujourd'hui encore, principalement utilisée en imagerie préclinique sur petits animaux, afin de réaliser des angiographies (voir **Figure 2.33**).

La méthode a ensuite été transférée en 3D [118], [150] et été testée in vivo pour imager une tumeur chez le rat [145]. Elle a ensuite été utilisée entre autres sur le cerveau de rat [16], [151], [152] et de souris [153], le cœur de rat isolé [154], le ganglion lymphatique de lapin [155], ainsi que le rein de rat [156], [157] et de lapin [158]. Des modèles ex ovo [159], [160], in vitro [161] et in silico [122], [162] ont également été proposés, pour permettre de valider la méthode en la confrontant à d'autres ou à un modèle simulé.

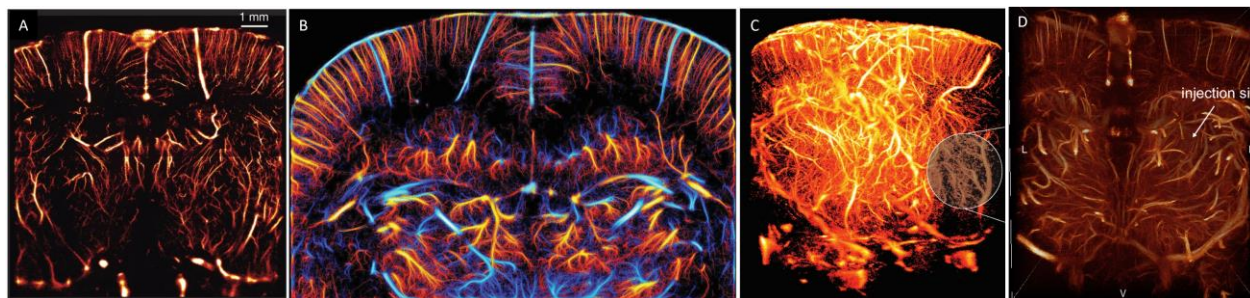


Figure 2.33 L'ULM a démontré à plusieurs reprises sa capacité à produire des images super-résolues du cerveau de rat, en 2D et en 3D.

A/B. Angiographies d'un cerveau de rat réalisées par ULM en 2D. C/D. Angiographies d'un cerveau de rat réalisées par ULM en 3D. Figures issues de [14], [15], [151], [152].

Plus récemment, plusieurs groupes ont démontré la faisabilité de transférer l'ULM chez l'humain [147], [163]. La méthode a notamment été utilisée pour l'imagerie 2D du cerveau [119] et de différents organes et tissus tels que le foie [164], la prostate [165], [166] et le rein [164], [167], le muscle du tibia [163], ainsi que des tumeurs du pancréas [164] et du sein [147], [164], [168] (voir **Figure 2.34**).

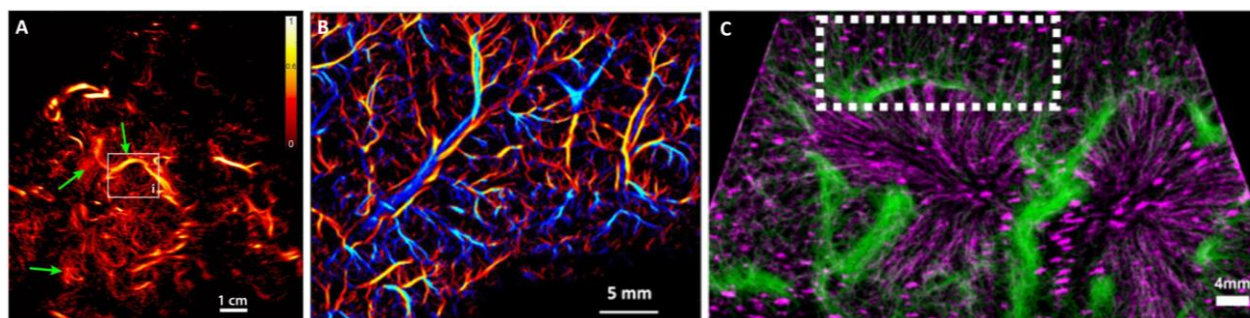


Figure 2.34 L'ULM a été testée chez l'humain pour l'imagerie de plusieurs organes comme le cerveau (A), le foie (B) et le rein (C). Figures issues de [119], [164], [167].

2.6.4.4.2 *Vers de nouveaux biomarqueurs avec l'ULM*

Plusieurs études récentes ont d'ores et déjà montré, lors de preuves de concepts réalisées sur quelques patients ou animaux, que l'ULM pouvait être utilisée pour quantifier certains paramètres hémodynamiques et étudier des pathologies liées à des perturbations du flux sanguin. Au niveau du cerveau en particulier, chez le petit animal, la méthode a été utilisée pour étudier des régions dont la perfusion a été diminuée à la suite d'un accident vasculaire cérébral (AVC) en 2D chez la souris [169], et pour distinguer un AVC ischémique d'un AVC hémorragique en 3D chez le rat [152]. L'ULM a également permis de mesurer des paramètres globaux tels que le volume global et la vitesse moyenne du sang, la vascularité et la tortuosité des vaisseaux dans un modèle de souris Alzheimer en 2D [141]. Chez le rat, en 2D, l'ULM a permis d'observer des phénomènes dynamiques de l'ordre de la seconde pour observer l'activité fonctionnelle du cerveau au niveau du cortex (fULM) [132]. Chez l'humain, l'ULM a été utilisée en 2D pour réaliser des mesures quantitatives telles que les profils de vitesse en systole et en diastole, et caractériser des vortex observés au niveau d'un anévrisme [119].

Des études de plus grande ampleur seraient cependant nécessaires pour valider les résultats énoncés ci-dessus, et notamment pour les confronter à d'autres méthodes d'imagerie.

2.6.4.5 **Limites de l'ULM pour la mesure de la pulsatilité**

L'ULM permet ainsi de cartographier le réseau vasculaire d'un organe (et notamment du cerveau) en quelques minutes, en profondeur et avec une résolution de l'ordre de quelques micromètres, et d'en tirer des mesures quantitatives dans le cadre d'étude de pathologies comme l'AVC ou Alzheimer.

Cependant, cette nette amélioration de la résolution spatiale que l'on a pu atteindre en passant de l'imagerie ultrarapide à l'ULM s'est faite au détriment de sa résolution temporelle : chaque microbulle doit être suivie au cours du temps, et il faut que suffisamment de chemins de microbulles soient accumulés afin d'obtenir une carte de vascularisation complète [136]. On passe ainsi d'une cadence d'imagerie de l'ordre de 10 000 images par seconde pour l'imagerie ultrarapide à une seule image obtenue après 10 minutes d'acquisition pour l'ULM.

Comme on vient de le voir dans la section précédente, les mesures obtenues par ULM ont donc permis jusqu'ici de retranscrire des phénomènes statiques (densité totale de microbulles, tortuosité

des vaisseaux, volume global du flux sanguin), ou moyens (vitesse moyenne du flux sanguin dans chacun des vaisseaux, profils de vitesse), mais pas encore de phénomènes dynamiques tels que la pulsatilité – donc les variations de la vitesse du flux sanguin au cours du temps, dans chacun des vaisseaux.

L'objectif de cette thèse est donc de développer l'ULM dynamique et de l'utiliser pour extraire les variations de vitesses du flux sanguins au cours du cycle cardiaque, et ainsi quantifier la pulsatilité dans l'ensemble de l'arbre vasculaire cérébral, y compris au niveau des microvaisseaux.

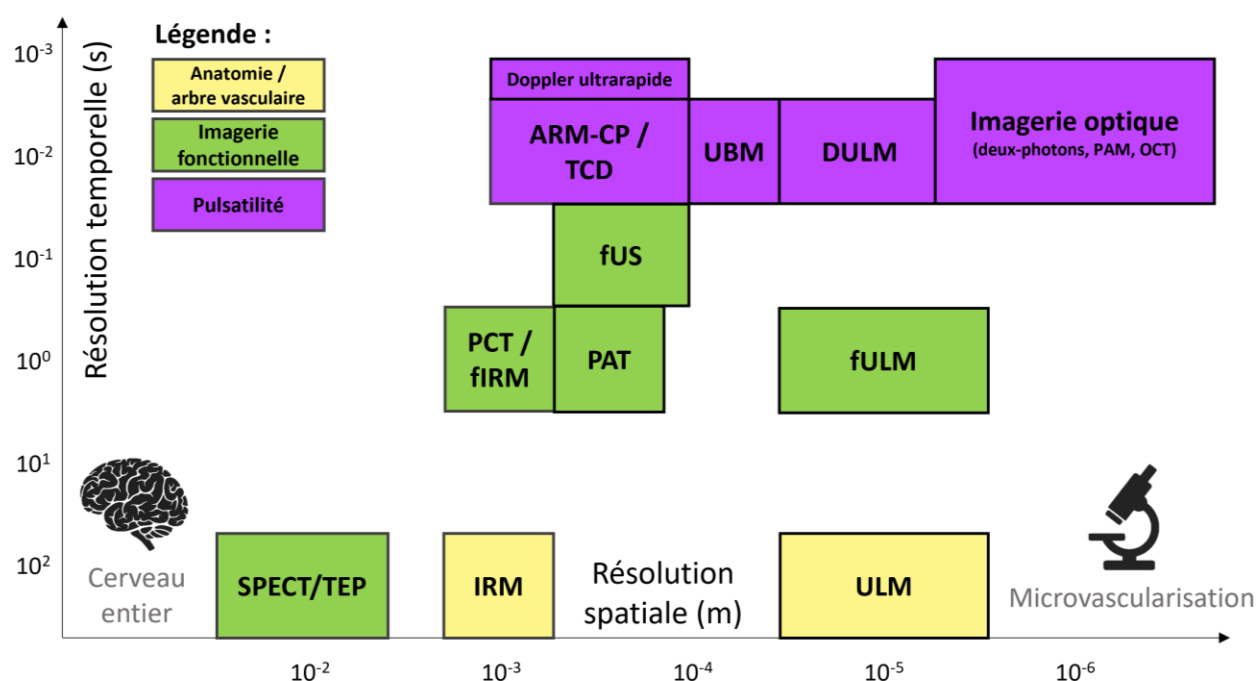


Figure 2.35 Comparaison des différentes méthodes d'imagerie du cerveau pour mesurer la pulsatilité

CHAPITRE 3 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

3.1 Problématique

La revue de littérature développée précédemment a permis de mettre en évidence plusieurs aspects :

- L'âge et certaines maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose peuvent entraîner une rigidification des artères principales, telles que l'aorte ou les carotides.
- Selon une hypothèse dite « biomécanique », cette rigidification peut causer une augmentation de la pulsatilité dans les microvaisseaux en aval, les endommager et entraîner un déclin cognitif. À terme, des maladies neurodégénératives comme la démence peuvent se déclarer. Cependant, la cascade de causes à effets d'une augmentation de la pulsatilité sur un potentiel déclin cognitif n'est pas encore démontrée.
- Or, il n'existe pas à ce jour de méthode d'imagerie capable de visualiser et d'étudier cette augmentation de la pulsatilité dans tout l'arbre vasculaire cérébral, depuis les artères principales jusqu'aux microvaisseaux. En particulier, même le Doppler pulsé (conventionnel ou ultrarapide) ne permet pas de mesurer la pulsatilité dans les microvaisseaux, que ce soit chez l'humain ou chez le petit animal.
- L'ULM peut cartographier le réseau vasculaire en profondeur et avec une résolution suffisante pour visualiser les microvaisseaux, mais cette méthode d'imagerie n'est pas adaptée à la mesure de phénomènes dynamiques comme la pulsatilité.

3.2 Question de recherche

La question de recherche de cette thèse est : **Peut-on mesurer la pulsatilité dans l'ensemble de l'arbre vasculaire cérébral ?**

3.3 Hypothèse de recherche

Nous posons l'hypothèse que DULM possède à la fois une résolution temporelle, une résolution spatiale et une profondeur de pénétration suffisantes pour mesurer et quantifier la pulsatilité dans l'arbre vasculaire cérébral.

3.4 Objectifs

Un objectif général et trois objectifs spécifiques découlent de cette question de recherche.

Objectif général : Cartographier et quantifier la pulsatilité dans le réseau vasculaire cérébral à l'aide de DULM.

Objectifs spécifiques :

1) Développer et optimiser les séquences et algorithmes de reconstruction permettant de cartographier la pulsatilité cérébrale

Hypothèse : L'ULM peut être adaptée à la mesure de la pulsatilité dans l'arbre vasculaire cérébral

Défi : Il s'agit ici d'adapter la séquence, la concentration en microbulles, de même que le traitement des images afin de rendre la méthode dynamique.

Approche : La méthode développée s'appuie sur la synchronisation des séquences ultrasonores avec le cycle cardiaque, permettant de sommer de façon cohérente les images obtenues. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur une nouvelle plateforme développée par Labeo Technologies Inc., qui peut être synchronisée avec le système ultrasonore.

Impact : Ces séquences et algorithmes permettent de mesurer la pulsatilité dans tout vaisseau de l'arbre vasculaire visible sur les images obtenues.

2) Montrer la faisabilité de la mesure de la pulsatilité cérébrale chez le petit animal en 2D à l'aide de DULM

Hypothèse : La méthode développée à l'objectif 1 permet de mesurer la pulsatilité chez le petit animal en 2D.

Défi : Parvenir à mesurer et à valider les mesures de pulsatilité in vivo chez le petit animal, et notamment de façon non-invasive chez la souris.

Approche : La méthode a été testée chez le rat avec craniotomie et chez la souris de façon non-invasive. Les mesures ont été obtenues dans l'ensemble du cerveau, à la fois dans des vaisseaux majeurs mais également dans des microvaisseaux. Les performances de DULM ont pu être comparées avec l'imagerie ultrarapide (CEUFD), et la méthode a été validée

dans le cortex, où les artères (descendantes) ont montré un plus fort indice de pulsatilité que les veines (ascendantes).

Impact : Pour la première fois, la méthode a été testée avec succès chez le petit animal en 2D, et des mesures de pulsatilité ont été obtenues et validées.

3) Transférer et valider la technologie en 3D, pour permettre des mesures dans le volume complet du cerveau et en extraire des informations quantitatives sur la dynamique des flux sanguins.

Hypothèse : La méthode développée à l'objectif 1 peut être adaptée à l'imagerie en 3D pour mesurer la pulsatilité dans l'ensemble du cerveau et obtenir des mesures de vitesses sans projection.

Défi : Transférer la méthode en 3D et l'adapter pour imager le cerveau d'un plus gros animal (chat), ainsi qu'à travers le crâne chez la souris.

Approche : La méthode en 3D a été développée sur chat avec craniotomie, et sur souris sans la peau et à travers le crâne. Une diminution de la pulsatilité et de la vitesse moyenne le long de l'arbre vasculaire a été mise en évidence chez le chat. Chez la souris, la méthode a été validée de façon intra-animale : les deux côtés du cercle de Willis ont montré une pulsatilité et une vitesse équivalentes, ce qui est cohérent avec la littérature scientifique.

Impact : La méthode a montré pour la première fois des mesures de pulsatilité dans l'ensemble du cerveau, et son potentiel pour l'avènement de nouveaux biomarqueurs dans l'étude de maladies neurodégénératives.

CHAPITRE 4 DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE

Ce Chapitre détaille les compromis et les choix effectués pour réaliser des mesures quantitatives de pulsatilité avec DULM dans les deux articles présentés dans les chapitres suivants (Chapitres 5 et 7). **Il répond à l'objectif 1 de cette thèse, à savoir le développement et l'optimisation des séquences et algorithmes de reconstruction permettant de cartographier la pulsatilité cérébrale.**

4.1 Cahier des charges

L'objectif de DULM est d'obtenir non pas une seule image comme en ULM, mais plutôt un film d'au moins un cycle cardiaque permettant d'observer les variations de vitesse des microbulles (et donc du flux sanguin) au cours du temps.

Idéalement, en DULM, il faudrait que l'on ait, pour chaque image, une résolution spatiale équivalente à celle que l'on peut avoir en ULM. Par exemple pour observer un cycle cardiaque chez le rat à 264 bpm, avec une résolution temporelle de $dT = 18$ ms (voir **Section 2.2.3**), il faudrait alors que le film d'un cycle cardiaque obtenu, de 227 ms, comprenne au moins 13 images.

Pour avoir une résolution spatiale équivalente à celle obtenue en ULM, il faudrait donc injecter 13 fois plus de microbulles qu'en ULM, ou allonger les temps d'acquisition. Or, injecter plus de microbulles dégrade ultimement la résolution spatiale obtenue, et allonger les temps d'acquisition est une tâche délicate pour les mêmes raisons qu'en ULM (évoquées à la **Section 2.6.4.3**). En DULM en particulier, le cycle cardiaque pourrait changer au cours de l'expérience, donc un temps d'acquisition court est toujours préférable pour que la mesure finale de pulsatilité soit exploitable.

En DULM comme en ULM [136], [137], on est donc confrontés à un compromis entre la concentration de microbulles que l'on injecte et la résolution spatiale que l'on souhaite obtenir. À ce compromis s'en ajoute un second : celui entre la concentration en microbulles et la résolution en vitesse. En effet, nous souhaitons obtenir *in fine* des mesures quantitatives de la pulsatilité : il s'agit donc d'observer et de conserver dans le traitement des images le maximum de microbulles, afin d'avoir une idée précise de la dynamique des flux sanguins. Une unique microbulle circulant dans un vaisseau pourrait par exemple nous indiquer la présence de ce vaisseau, mais il faut que suffisamment de microbulles aient circulé dans celui-ci pour en connaître précisément la vitesse moyenne, et encore plus pour mesurer les variations de vitesse au cours du temps.

Ces compromis entre concentration de microbulles, temps d'acquisition, résolution spatiale et résolution en vitesse ont été pris en compte lors des procédures expérimentales, de l'écriture des séquences ultrasonores et des algorithmes de reconstruction de plusieurs façons, que nous allons détailler ici.

4.2 Procédures expérimentales

4.2.1 Expériences in vivo

Les expériences ont été réalisées en 2D chez le petit animal (rat avec craniotomie et souris à travers la peau et le crâne) à l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM), et en 3D chez le chat avec craniotomie et chez la souris à travers le crâne (sans la peau) à l'École d'Optométrie de l'Université de Montréal (UdeM). Une craniotomie a été effectuée chez le rat en 2D et chez le chat en 3D afin d'éviter les aberrations dues au crâne.

Ces études ont été réalisées conformément aux normes du Conseil canadien de protection des animaux. Toutes les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique de l'ICM (2019-2464, 2018-32-03) pour l'étude en 2D, et par le comité d'éthique de l'UdeM (19-008 et 19-064) pour l'étude en 3D.

4.2.2 Concentration en microbulles

La concentration en microbulles a été choisie pour chaque espèce en fonction du poids de l'animal, afin d'avoir à la fois suffisamment de microbulles par image pour pouvoir mesurer la pulsatilité dans les vaisseaux (y compris dans les microvaisseaux inaccessibles en imagerie ultrasonore), sans pour autant augmenter le temps total d'acquisition.

Nous avons ainsi fait le choix d'injecter de l'ordre de 3 à 10 fois plus de microbulles que ce qui est fait habituellement dans la littérature en ULM en 2D [136], et 3 à 30 fois plus de microbulles en 3D [170], [153] (voir **Tableau 4.1** ci-dessous). Une telle concentration a pu être atteinte en utilisant des microbulles de la marque Definity, qui sont 24 fois plus concentrées que celles de la marque Sonovue – et qui donc permettent d'injecter beaucoup de microbulles tout en restant en-deçà des recommandations de volume à injecter chez le petit animal, à savoir 160 μ L de microbulles pour une souris d'après les directives du centre de recherche de l'ICM. D'autres groupes [141] ont également proposé l'utilisation de microbulles de cette marque, permettant

d'effectuer des images ULM à haute concentration en microbulles chez le petit animal, et notamment chez la souris.

Tableau 4.1 Comparaison des concentrations utilisées en DULM avec celles utilisées dans la littérature en ULM, pour l'imagerie du cerveau. MBs : microbulles.

Méthode	Fréquence centrale (MHz)	Animal	Poids (g)	Méthode d'injection	Volume de MBs injectées (µL)	Marque des MBs	Millions de MBs injectées par kg
DULM 2D [138]	15	Rat	~ 500	Bolus de 100 µL d'une solution diluée (1:1) en début d'acquisition	50	Definity	1 200
DULM 2D [138]	15	Souris	25	Bolus de 50 µL d'une solution diluée (1:1) en début d'acquisition	25	Definity	12 000
DULM 3D [171]	6	Chat	3 640	Bolus de 2 mL d'une solution diluée (1:1) en début d'acquisition	1000	Definity	3 300
DULM 3D [171]	6	Souris	24	Bolus de 50 µL d'une solution diluée (1:1) en début d'acquisition	25	Definity	12 500
ULM 2D [136]	15	Rat	500	Infusion constante (80 µL/mn pendant 5 min)	400	Sonovue	200
ULM 3D [170]	7.8	Rat	290	14 bolus de 50 µL en 7 min	700	Sonovue	1 200
ULM 3D [153]	10	Souris	~ 24	Infusion continue (1.5 mL/h pendant 15 min)	375	Sonovue	7 812.5
ULM 2D, à haute concentration [141]	20	Souris	~ 30	8 bolus de 50 µL d'une solution diluée (1.3 : 8.7) en 128 secondes	260	Definity	104 000

4.3 Écriture des séquences ultrasonores

Les séquences ultrasonores ont été écrites à l'aide d'un échographe programmable (Vantage 256, Verasonics, WA, USA). Elles ont été développées pour des sondes à 15 MHz en 2D (Vernon, Tours, France) et à 8 MHz en 3D (Verasonics, WA, USA), afin d'obtenir une PSF de petite taille pour éviter que les signaux des microbulles ne se superposent [114].

4.3.1 Temps d'acquisition

Nous avons choisi de garder les temps d'acquisition de moins de 10 min en 2D (8 min pour le rat et 9 min pour la souris) et de moins de 20 min en 3D (15 min pour le chat et 17 min pour la souris). Ce temps est comparable à ceux retrouvés dans la littérature, sachant que le temps de demi-vie des microbulles dans la circulation sanguine chez le petit animal est plus long pour les microbulles de la marque Definity que pour la marque Sonovue (respectivement 7 min et 1 min) [172].

4.3.2 Haute cadence d'imagerie

La cadence d'imagerie a été choisie de telle sorte que nous puissions suivre les microbulles dans l'ensemble de l'arbre vasculaire cérébral, qu'elles soient lentes ou rapides. Une haute cadence d'imagerie est en effet nécessaire pour assurer un suivi optimal des microbulles, surtout en présence d'une forte concentration comme c'est le cas en DULM. Comme on l'a vu précédemment (voir **Section 2.6.2.1.2**), la cadence d'imagerie dépend cependant de deux facteurs : de la PRF d'une part, qui elle-même dépend de la profondeur d'imagerie souhaitée, et du nombre d'angles que l'on souhaite effectuer d'autre part. Or, plus le nombre d'angles est élevé, meilleur sera le contraste et la résolution des images obtenues après *beamforming*, et donc meilleure sera la localisation des microbulles. La cadence d'imagerie a ainsi été fixée à 1000 Hz en 2D, et à 1000 Hz en 3D chez le chat et 2000 Hz en 3D chez la souris, permettant ainsi de suivre des microbulles dont la vitesse varie entre 1 mm/s et quelques cm/s [14].

4.3.3 Nombre d'angles

Le nombre d'ondes planes angulées utilisées pour former une image (couramment appelé « nombre d'angles », voir **Figure 2.19**) a été fixé à 3 en 2D (-1° , 0° , 1°). En 3D, il est courant d'effectuer un plus grand nombre d'angles (typiquement 4 [134] ou 5 [170]). Cependant, chez un gros animal comme le chat, la profondeur d'imagerie permettant de visualiser le cerveau est plus grande que chez le rat ou la souris. De plus, une image en 3D générée avec un seul échographe Verasonics Vantage nécessite d'effectuer 4 tirs d'ondes ultrasonores pour former une image. Il a donc été nécessaire, pour garder une cadence d'imagerie de 1000 Hz, de réduire le nombre d'angles à un seul (angle 0°). La séquence d'imagerie ayant dans un premier temps été développée pour le chat, nous avons conservé la même chez la souris (donc un seul angle à 0°), mais avec une cadence d'imagerie de 2000 Hz.

4.3.4 Synchronisation avec l'ECG

Afin d'obtenir des films (et non une image statique), nous avons opté pour une séquence ultrasonore synchronisée avec le cycle cardiaque (voir **Figure 4.1**). Cette synchronisation s'est faite grâce à une plateforme pour petits animaux de Labeo Technologies Inc.

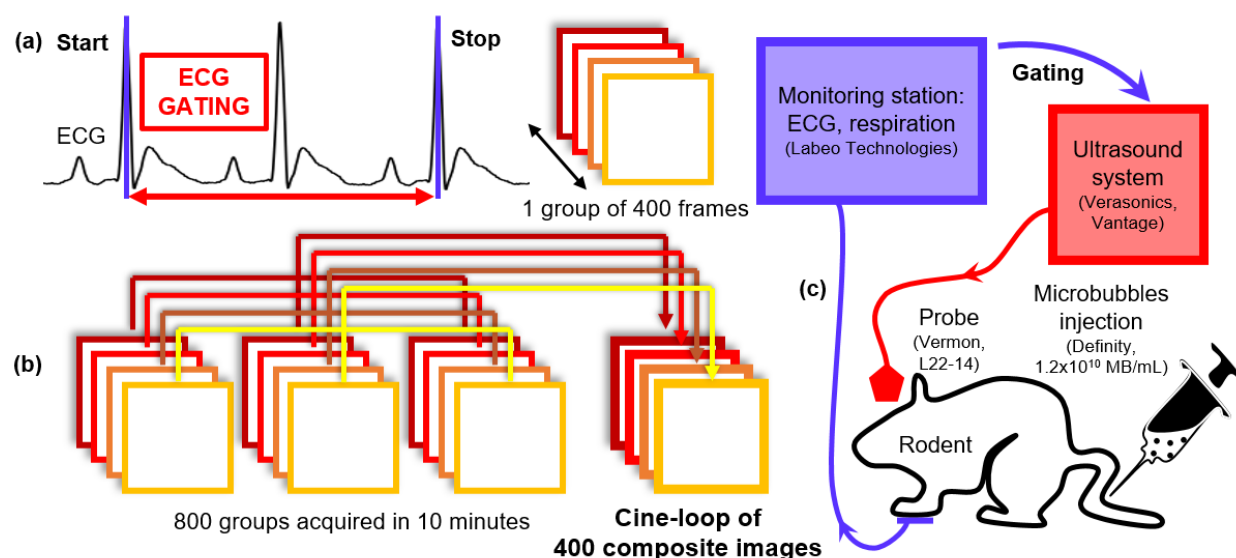


Figure 4.1 Exemple de séquence ultrasonore permettant la synchronisation avec l'ECG pour DULM 2D.

Après l'injection de microbulles, des groupes de 400 images ont été acquis sur une période de 10 minutes, à une cadence de 1000 images par seconde. Chaque groupe a été déclenché sur l'onde R de l'ECG (a) grâce à la synchronisation de l'échographe avec la plateforme pour petits animaux (c). Les groupes ont ensuite été combinés ensemble (b) pour obtenir un film de 400 images, soit 0.4 seconde. Figure tirée de [138]

Les acquisitions ultrasonores ont été écrites sous forme de blocs de quelques centaines d'images d'une durée fixe (moins d'une seconde). Ces blocs sont de 400 images à 1000 Hz chez le rat et la souris en 2D, 600 images à 1000 Hz chez le chat en 3D et 400 images à 2000 Hz chez la souris en 3D. Entre chaque bloc, les tirs ultrasonores sont mis en pause pour permettre le transfert et l'écriture des données sur disque. À la reprise du bloc suivant, le système ultrasonore attend le signal provenant de la plateforme Labeo Technologies Inc., correspondant à une onde R mesurée dans l'ECG, avant de débiter un nouveau bloc de tirs ultrasonores. Ce faisant, la toute première image de chaque bloc enregistré au cours d'une acquisition est synchronisée sur l'onde R du cycle

cardiaque. Cela assure ainsi une cohérence temporelle entre les blocs. La densité et la vitesse des microbulles détectées ensuite dans chaque bloc peuvent être ainsi sommées à l'issue du traitement des images, que l'on détaillera par la suite.

Le temps de chaque bloc a été calculé de telle sorte que l'on acquiert au moins un cycle cardiaque par bloc, pour chaque espèce. Plus exactement, en 2D, il a été choisi de mesurer 2 cycles cardiaques chez le rat, et environ 4 chez la souris. En 3D, nous avons opté pour un peu moins de 2 cycles cardiaques chez les deux espèces. En 2D en particulier, nous avons ainsi pu estimer la stabilité et la reproductibilité de la mesure de la pulsativité d'un cycle cardiaque à l'autre.

4.4 Traitement des données

Le traitement des données se fait en trois étapes successives : la reconstruction des images et leur filtrage, la localisation et le suivi de microbulles, et enfin l'extraction des mesures de pulsativité.

4.4.1 Reconstruction et filtrage des images

La reconstruction des images a été effectuée à l'aide d'un algorithme de *beamforming delay and sum* (DAS) [173]. Les images obtenues ont ensuite été filtrées à l'aide d'un filtre SVD [88]. Pour conserver à la fois les microbulles lentes et rapides et obtenir ainsi une mesure quantitative et non biaisée de la pulsativité, nous avons choisi un seuil de SVD de 10 valeurs propres en 2D et 20 valeurs propres en 3D (voir **Section 2.6.3.3.1**).

Afin de suivre les microbulles malgré leur concentration importante dans la circulation, nous avons corrélé les données IQ avec la PSF du système. Cette opération nous a permis de faire ressortir les signaux des microbulles, d'éliminer les signaux des microbulles trop proches les unes des autres (dont la localisation serait alors faussée), et d'éliminer les signaux résiduels des tissus après SVD.

4.4.2 Localisation et suivi de microbulles

Les microbulles ont été localisées à l'aide d'un ajustement gaussien qui, comme on l'a vu au **Chapitre 2 (Section 2.6.4.2.3)**, est un algorithme robuste pour la localisation des microbulles et qui est déjà utilisé dans la littérature en ULM. Cette localisation permet d'obtenir une mesure précise de la position de chaque microbulle, indépendamment de la taille de la grille de reconstruction choisie précédemment pendant l'étape de *beamforming*.

Les microbulles ont été suivies à l'aide d'un algorithme de plus proche voisin en 2D, et d'un filtre de Kalman en 3D (voir **Section 2.6.4.2.4** pour les détails sur les différents algorithmes de suivi de microbulles en ULM).

L'algorithme du plus proche voisin consiste à appairer une microbulle avec la plus proche trouvée dans l'image suivante. Cette méthode est la plus simple à implémenter et la plus intuitive, mais elle ne tient pas compte du fait qu'en 2D en particulier, les vaisseaux sanguins peuvent se croiser dans un même plan d'imagerie – la sonde que nous utilisons en particulier, à haute fréquence, a une résolution en élévation de l'ordre de 1.6 mm, donc on peut retrouver sur l'image 2D finale de nombreux vaisseaux qui se superposent. L'appariement d'une microbulle avec son plus proche voisin n'est pas toujours le plus pertinent, surtout dans le cas d'une haute concentration en microbulles comme en DULM.

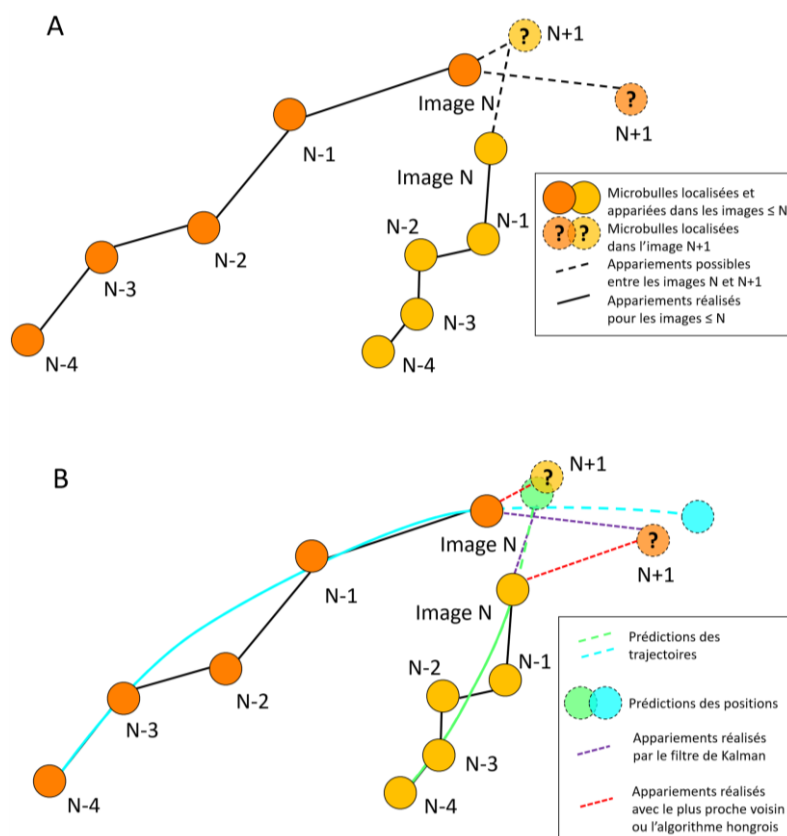


Figure 4.2 Différents algorithmes de suivi de microbulles.

- A. Situation où deux vaisseaux se croisent dans le plan d'imagerie, et possibilités d'appariement ;
- B. Appariements réalisés par l'algorithme hongrois ou l'algorithme du plus proche voisin, et l'algorithme de Kalman.

Pour la méthode de suivi reposant sur l'algorithme de Kalman utilisée dans l'article 2, la position et la vitesse de chaque microbulle est prédite pour l'image suivante en fonction de ses positions et vitesses calculées dans les images précédentes, puis l'appariement se fait entre les prédictions et les positions réelles trouvées dans l'image suivante (voir **Figure 4.2**) [131]. Cette méthode présente l'avantage de s'adapter à la dynamique de chaque microbulle ; mais elle présuppose cependant qu'une microbulle a une trajectoire relativement rectiligne, ce qui n'est pas toujours le cas pour des flux complexes comme dans les capillaires par exemple. En 3D, nous avons également utilisé une interpolation adaptative des trajectoires des microbulles, permettant de conserver une distance maximale entre les microbulles interpolées de 2 μm pour la souris et de 5 μm pour le chat.

4.4.3 Extraction des mesures de pulsatilité

4.4.3.1 Mesures qualitatives

L'ensemble des trajectoires empruntées par les microbulles ont ensuite été projetées, pour chaque bloc, sur N grilles de reconstruction (avec N le nombre d'images acquises dans chaque bloc), pour former des cartes de densité et de vitesse. Ces dernières ont été respectivement sommées et moyennées sur l'ensemble des blocs, pour former une carte dynamique de densité et une carte dynamique de vitesse des microbulles constituées chacune de N images.

Ces cartes dynamiques ont finalement été lissés temporellement puis affichés sur Matlab en 2D et sur Amira en 3D, afin d'évaluer qualitativement la variation de la vitesse et de la densité des microbulles au cours des cycles cardiaques.

4.4.3.2 Mesures quantitatives

Afin d'extraire des mesures quantitatives de pulsatilité, chaque vaisseau a été segmenté avant d'afficher la pulsatilité sur l'ensemble du vaisseau. Cette segmentation a été nécessaire afin d'obtenir suffisamment de microbulles pour en évaluer la pulsatilité ; en effet, tout comme c'est le cas en TCD, la mesure de la pulsatilité en DULM doit se faire en moyennant les mesures obtenues sur une région de plusieurs pixels, voire de tout un vaisseau, pour obtenir un SNR satisfaisant. Ces mesures ont pu être effectuées dans l'ensemble du cerveau, dans chacun des vaisseaux sanguins visibles sur l'image (voir **Figure 4.3**).

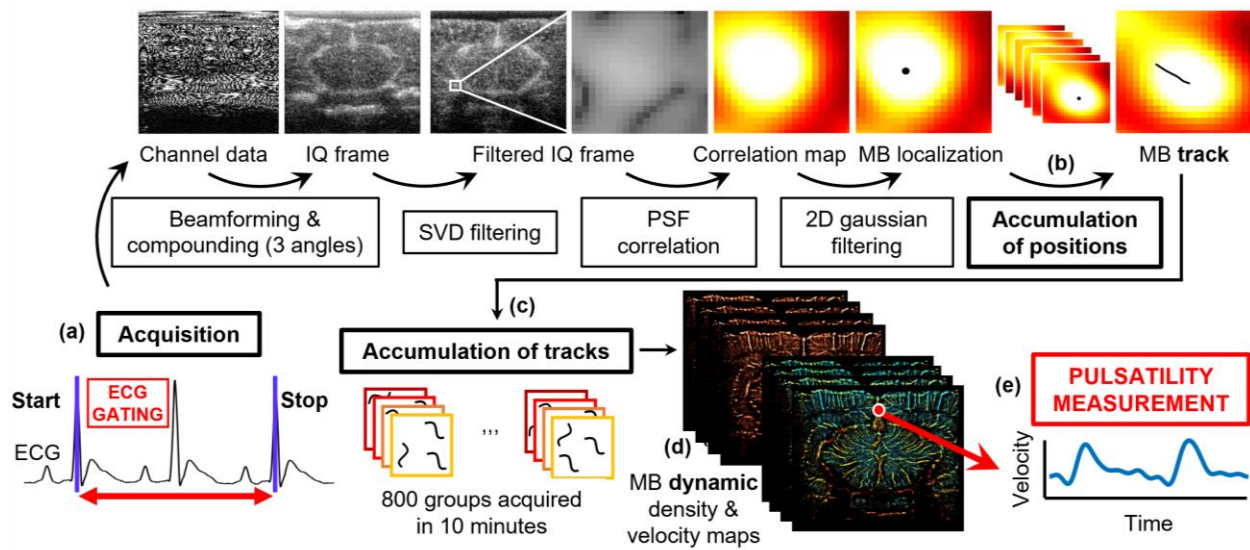


Figure 4.3 Les différentes étapes de traitement permettant de produire des mesures quantitatives de pulsatilité avec DULM.

Après l'acquisition des images (a), celles-ci ont été reconstruites et filtrées, pour finalement obtenir les positions de chaque microbulles (b). Celles-ci ont ensuite été suivies d'une image à l'autre pour obtenir des trajectoires (c), qui ont été accumulées pour produire des cartes dynamiques de densité et de vitesse (d), d'où l'on peut extraire des mesures quantitatives de pulsatilité (e). MB : microbulles. Figure tirée de [138]

4.5 Validation des résultats

Les résultats ont été validés de différentes façons en 2D et en 3D.

En 2D, les mesures de pulsatilité obtenues par DULM ont été comparées à celles obtenues sur des spectres d'imagerie de contraste en Doppler ultrarapide générés à partir des mêmes données, sans l'application des algorithmes de super-résolution. Bien que, comme on l'a vu au **Chapitre 2**, les mesures réalisées en Doppler sont sujettes à d'importantes incertitudes sur la vitesse et sur le PI, nous avons pu retrouver des courbes de pulsatilité similaires en DULM et en CEUFD au niveau des vaisseaux principaux. De plus, nous avons pu séparer les microbulles selon leur direction de propagation grâce à une FFT [97] ; puis au niveau du cortex après segmentation des vaisseaux, nous avons pu mesurer une pulsatilité plus élevée dans les vaisseaux descendants (artères) qu'ascendants (veines).

En 3D, les mesures de pulsatilité obtenues par DULM ont été validées de deux façons. D’une part, grâce à la 3D, nous avons pu suivre dans le cerveau du chat le trajet de vaisseaux principaux alimentant de plus petits vaisseaux, et constater que la pulsatilité et la vitesse moyenne du flux en amont étaient significativement plus élevées qu’en aval. De plus, au niveau du cercle de Willis chez la souris, nous avons pu comparer des vaisseaux situés de chaque côté du cercle et constater que leur pulsatilité et leur vitesse moyenne étaient similaires.

4.6 Contributions

Le Laboratoire d’Ultrasons de Jean Provost ayant vu le jour en juin 2018, l’auteurice de cette thèse a été la première étudiante à réaliser un projet de recherche sous la direction de Jean Provost. Elle a donc à la fois mis en place les premiers codes (séquences ultrasonores et analyses de données), premiers montages expérimentaux et premières expériences in vitro et in vivo au sein du laboratoire à l’aide de son directeur de recherche durant l’automne 2018.

4.6.1 Écriture des séquences ultrasonores

Les séquences (2D et 3D) présentées dans cette thèse ont été rédigées par son autrice, d’abord avec l’aide de Jean Provost, puis optimisées par la suite par Jonathan Porée, associé de recherche au sein du laboratoire.

4.6.2 Expériences

Les expériences en 2D ont été mises en place et effectuées à l’ICM par l’auteurice de cette thèse. Les premières ont été réalisées en octobre 2018 avec l’aide de Jean Provost, directeur de recherche, et de Frédéric Lesage, co-directeur de recherche. Une partie du montage expérimental a été réalisé grâce à des prêts de matériel de ce dernier. Les expériences se sont ensuite poursuivies en 2019 avec l’aide de Jonathan Porée. Les procédures chirurgicales et anesthésiques sur le rat et la souris en 2D ont été réalisées par Marc-Antoine Gillis, de l’ICM.

Les expériences en 3D ont été mises en place et effectuées fin 2019 et début 2020 par l’auteurice de cette thèse à l’École d’Optométrie de l’UdeM, avec l’aide de Jonathan Porée et d’Hatim Belgharbi, alors étudiant à la maîtrise au sein du laboratoire. Les procédures chirurgicales et anesthésiques sur le chat et la souris en 3D ont été effectuées par Nelson Cortes, Hugo Ladret et Lamyae Ikan, de l’École d’Optométrie de l’UdeM.

Maxime Abran et Samuel Bélanger, de Labeo Technologies Inc., ont tous deux aidé à améliorer la plateforme pour petit animal pour qu'elle réponde à nos besoins pour la synchronisation avec l'ECG, notamment pour l'adaptation de la plateforme à la mesure de l'ECG chez un plus gros animal (chat).

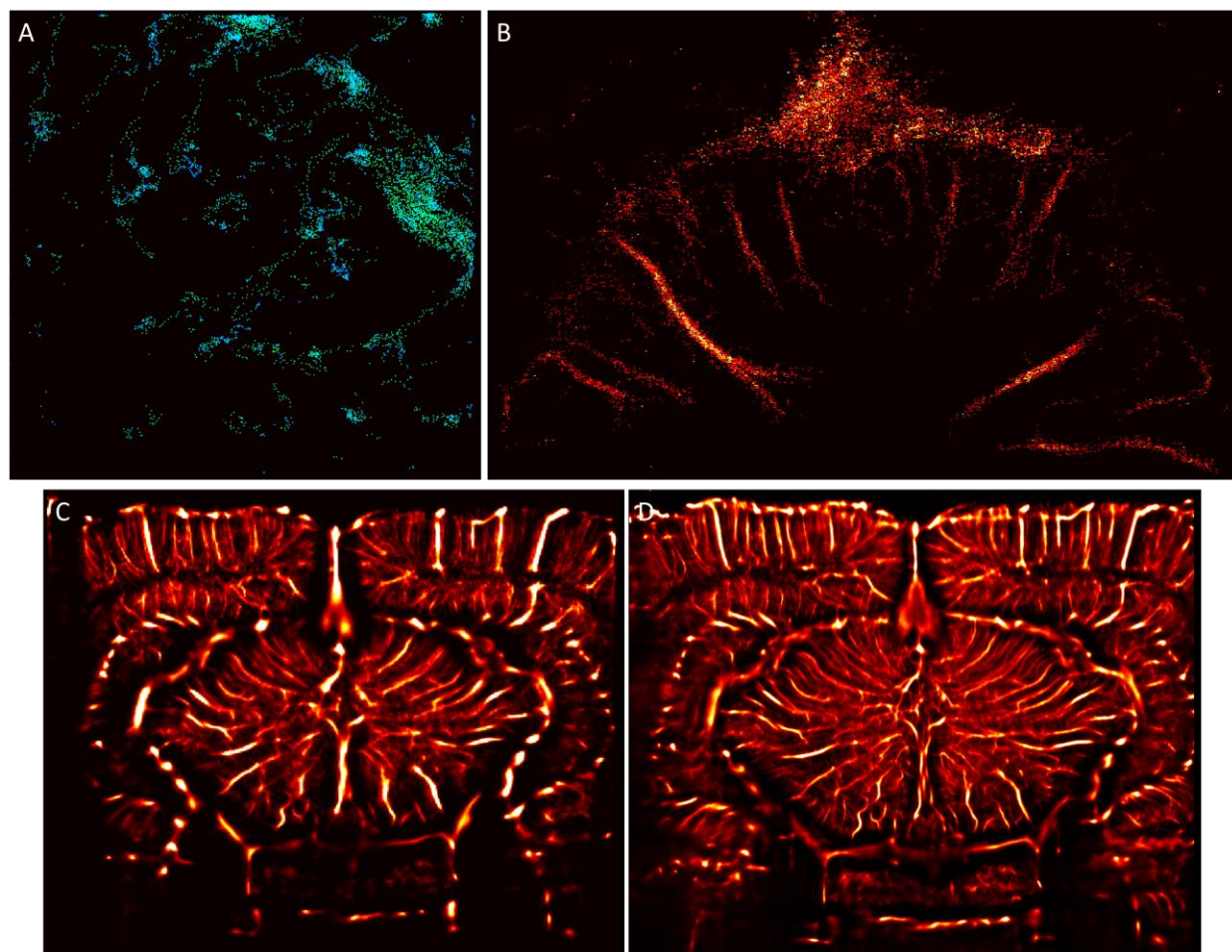


Figure 4.4 Amélioration de la séquence et du traitement des images au cours du projet.

A. Premières images acquises le 30 novembre 2018 avec une Verasonics V1 ; B. Première image acquise le 15 mars 2019 avec une Vantage 256, où l'on peut reconnaître des vaisseaux au niveau du cerveau ; C. Première image du cerveau entier, acquise le 10 juin 2019 ; D. Amélioration du traitement des images acquises le 10 juin 2019. Figure (D) tirée de [138]

4.6.3 Analyse des données

L'ensemble des algorithmes de reconstruction des images ont, dans un premier temps, été effectués en 2D par l'autrice de cette thèse à partir de codes rédigés par Jean Provost. L'autrice a également

rédigé des codes permettant de filtrer les images, puis de localiser et de suivre des microbulles. Jonathan Porée a ensuite aidé à améliorer et à optimiser ces algorithmes (voir **Figure 4.4**).

Les séquences et algorithmes initialement rédigés par l’auteurice de cette thèse en 2D ont ensuite été améliorés et transférés en 3D avec l’aide de Jonathan Porée. Le code de beamforming en 3D a été rédigé par Vincent Perrot, alors post-doctorant au sein du laboratoire. L’ensemble des codes a été transféré sous un format plus générique grâce à l’aide de Brice Rauby et de Nin Ghigo, respectivement doctorant et post-doctorant, afin qu’ils puissent être utilisés par toutes et tous au sein du laboratoire.

Les codes de suivi des microbulles, en 2D et en 3D (algorithme de plus proche voisin et filtre de Kalman), de même que ceux de génération des cartes et des mesures de pulsatilité, ont été entièrement rédigés par l’auteurice de cette thèse.

Enfin, l’identification des vaisseaux sanguins chez la souris en 3D a été validée par Gerardo Ramos-Palacios, médecin et doctorant à l’Université McGill.

4.6.4 Écriture des articles

Les articles ont été rédigés par l’auteurice de cette thèse, et revus par l’ensemble des co-auteurs.

CHAPITRE 5 ARTICLE 1 : IN VIVO PULSATILITY MEASUREMENT OF CEREBRAL MICROCIRCULATION IN RODENTS USING DYNAMIC ULTRASOUND LOCALIZATION MICROSCOPY

Chloé Bourquin¹, Jonathan Porée¹, Frédéric Lesage^{2,3}, Jean Provost^{1,3}

1. Engineering Physics Department, Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada

2. Electrical Engineering Department, Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada

3. Montreal Heart Institute, Montréal, QC, Canada

Ce chapitre correspond au premier article de cette thèse, soumis auprès de *IEEE Transactions on Medical Imaging* en février 2021, révisé en juillet puis en septembre 2021, publié en ligne en octobre 2021 et finalement publié en avril 2022 (vol. 41, no. 4, pp. 782-792, April 2022, doi: 10.1109/TMI.2021.3123912). **Il répond à l'objectif 2 de cette thèse, à savoir démontrer la faisabilité de la mesure de la pulsatilité cérébrale chez le petit animal en 2D à l'aide de DULM.**

Les contributions des différents co-auteurs sont détaillées à la **Section 4.6**.

5.1 Abstract

An increased pulse pressure, due to arteries stiffening with age and cardiovascular disease, may lead to downstream brain damage in microvessels and cognitive decline. Brain-wide imaging of the pulsatility propagation from main feeding arteries to capillaries in small animals could improve our understanding of the link between pulsatility and cognitive decline. However, it requires higher spatiotemporal resolution and penetration depth than currently available with existing brain imaging techniques. Herein, we show the feasibility of performing Dynamic Ultrasound Localization Microscopy (DULM), a novel imaging approach to capture hemodynamics with a subwavelength resolution. By producing cine-loops of flowing microbubbles in 2D in the whole rodent brain lasting several cardiac cycles, DULM performed pulsatility measurements in microvessels in-depth, in vivo, with and without craniotomy. Cortical veins and arteries were shown to have a significantly different pulsatility index and the method was compared against Contrast Enhanced Ultrafast Ultrasound Doppler (CEUFD) pulsatility measurements.

Index Terms — Non-invasive in-depth transcranial brain imaging, cerebral microvascular pulsatile flow, pulsatility index, microbubbles, dynamic ultrasound localization microscopy.

This work was supported in part by the Institute for Data Valorization (IVADO), in part by the Canada Foundation for Innovation under Grant 38095, and in part by the New Frontiers in Research Fund under Grant NFRFE-2018-01312. The work of Chloé Bourquin and Jonathan Porée was supported in part by IVADO, in part by the TransMedTech Institute, in part by the Fonds de recherche du Québec—Nature et technologies, in part by the Quebec Bio-Imaging Network, and in part by the Canada First Research Excellence Fund (Apogée/CFREF)

5.2 Introduction

Large arteries, such as the aorta and the carotids, are rich in elastic fibers at a young age, which dampens the downstream pulsatility, i.e., the fluctuations in blood velocity within the cardiac cycle. Their elasticity ensures a constant tissue perfusion in smaller arteries and arterioles [1]. Arterial stiffening develops with age [2], resulting in an excessive energy transmitted by the pulsatile flow [3] and the propagation of pulse pressure deeper into the brain [4], [5]. This excessive pulsatility impacts microvessels downstream, leading to an impaired regulation of the local blood flow [6], damage in capillaries and tissue, and finally cognitive decline [7], [8]. Studying this domino effect of the increase in pulsatility in the vascular tree could improve our understanding of its propagation, its evolution, and its role in neurodegenerative diseases. It would require however a measure of pulsatility in the whole brain, from large vessels to capillaries.

Brain pulsatility measurements are commonly performed at single locations of the vascular tree as an indirect measure of the whole brain pulsatility: upstream in large arteries with Transcranial Doppler ultrasonography (TCD) [9], [10] and Magnetic Resonance Imaging (MRI) [11], or downstream in capillaries at the brain surface with optical microscopy [12], [13]. Pulsatility of blood flow can be quantified with a pulsatility index (PI) [14], which reflects the variations of the blood flow velocity compared to its mean velocity; but it can also be characterized by the velocity waveform itself, which presents a pulsatile pattern synchronized with the cardiac rhythm for a high pulsatility [15].

To perform a whole-brain measurement, Ultrafast Ultrasound Doppler (UFD) [16] imaging can be used to measure rapid blood flow fluctuations in large vessels [17]. The smaller vessels anatomy can also be mapped [18], [19], but typically at the cost of a reduced temporal resolution. Moreover, the velocity resolution of its Pulsed-Wave (PW) Doppler spectra is bound to the wavelength and the pulse repetition frequency, leading to an incontrovertible trade-off [20] between temporal,

spatial and velocity resolutions. This trade-off prevents the measure of pulsatility in microvessels throughout the small animal brain.

Recently, a novel technique called Ultrasound Localization Microscopy (ULM) [21], [22] has been developed to map microvessels in entire brain cross-sections in rats with a $\sim 10\text{-}\mu\text{m}$ resolution using a 15 MHz linear array [23]. Based on the subwavelength localization and tracking of microbubbles, it requires several minutes [24] to reconstruct a map of the entire vascular tree and its averaged velocity. It has been used recently to measure velocity maxima and minima to provide hemodynamic parameters in the human brain [25], but this technique has never been used to measure the pulsatility, which requires to sample the velocity fluctuations within at least one cardiac cycle.

Herein, we introduce Dynamic Ultrasound Localization Microscopy (DULM), which enables pulsatility measurements in 2D in the rodent brain in vivo, with and without craniotomy. More specifically, we measured the pulsatility with DULM in microvessels (i.e., smaller than $100\text{ }\mu\text{m}$ in diameter) in a rat brain with craniotomy and in a mouse brain through skull and skin. We compared DULM against Contrast Enhanced Ultrafast Ultrasound Doppler (CEUFD) spectra. We finally separated veins and arteries in the cortex using microbubbles flow direction and verified that cortical veins and arteries had a significantly different pulsatility index (PI). These results indicate that DULM can produce highly resolved dynamic maps of the blood flow and provides a novel method to better understand the pulsatility propagation at-depth, by performing for the first time non-invasive pulsatility measurements deep in the brain.

5.3 Methods

5.3.1 Ethics

This study was carried out in accordance with the recommendations of the guide for the care and use of laboratory animals of the Canadian Council for Animal Care. All procedures were approved by the Animal Care Ethics Committee of the Montreal Heart Institute (Permit Number: 2019-2464, 2018-32-03).

5.3.2 Rat preparation for ultrasound imaging with craniotomy

The surgery and ultrasound acquisitions in a female adult rat were performed under 2 % isoflurane anesthesia while body temperature was maintained at 35°C with a small animal monitoring platform (Labeo Technologies Inc., QC, Canada). The head of the animal was placed in a stereotaxic frame to limit motion, and the skull was removed following craniotomy to limit aberrations using a surgical micro drill, yielding a $\sim 15 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ window over the brain. The ultrasound acquisitions were started after an intravenous bolus injection in the jugular vein, lasting 30-60 seconds, of a 50- μL microbubble solution (1.2×10^{10} microbubbles per milliliter, Definity, Lantheus Medical Imaging, MA, USA) diluted in 50 μL of saline, followed by a saline flush, with a 27G needle.

5.3.3 Mouse preparation for ultrasound imaging through skull and skin

The preparation and ultrasound acquisitions in a male adult mouse were performed under 2 % isoflurane anesthesia while body temperature was maintained at 35°C with a small animal monitoring platform (Labeo Technologies Inc., QC, Canada). Excess hair on the mouse's skin was removed with hair removal cream Veet (Reckitt Benckiser, Poland). The head of the animal was placed in a stereotaxic frame to limit motion. The ultrasound acquisitions were launched after an intravenous bolus injection in the tail vein, lasting 30-60 seconds, of a 25- μL microbubble solution (1.2×10^{10} microbubbles per milliliter, Definity, Lantheus Medical Imaging, MA, USA) diluted in 25 μL of saline, followed by a saline flush, with a 30G needle.

5.3.4 Ultrafast ultrasound acquisitions

Vital parameters (electrocardiogram (ECG), breathing frequency, temperature) were recorded simultaneously by the monitoring platform during the acquisitions. Acoustic coupling was ensured by centrifuged ultrasound gel. In vivo rodent brains were imaged at 15 MHz with a 128-element linear array probe with a pitch of 100 μm (Vermon, Tours, France). The probe was connected to a programmable ultrafast ultrasound system (Vantage 256, Verasonics, WA, USA). 800 groups of 400 frames were acquired during 10 minutes at a 1000-Hz frame rate (**Figure 5.1**), using 3 tilted plane waves (-1° , 0° , 1°) at a depth of 12 mm. Each group was gated on the R-wave of the ECG recorded using the monitoring platform.

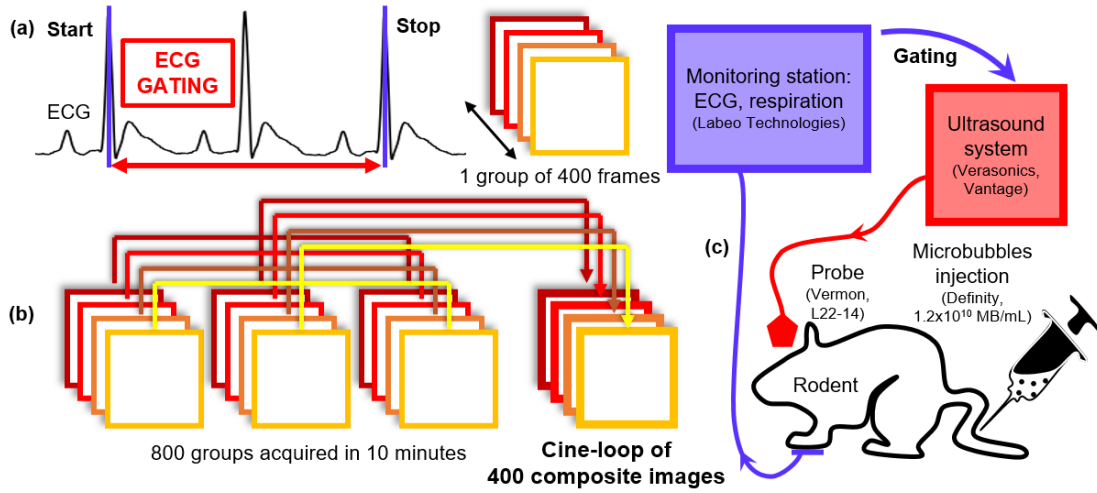


Figure 5.1 DULM sequence design.

After a single bolus injection of a microbubbles solution, 800 groups of 400 frames @1000 Hz were acquired, over a period of 10 minutes. Each group was gated on the R-wave of the ECG (a) using a synchronization trigger between the monitoring station and the ultrasound system (c). The groups were then post-processed and combined together (b) to obtain a cine-loop of 400 composite images of the whole brain cross-section.

5.3.5 Beamforming and tissue signal cancelation

Algorithms were implemented using MATLAB (R2019a, The MathWorks, Inc., Natick, MA). First, beamforming was performed on channel data (**Figure 5.2**) and compounded (3 angles), to reconstruct 800 groups of 400 IQ frames on a $23.5 \mu\text{m} \times 23.5 \mu\text{m}$ cartesian grid using an in-house GPU implementation of the delay-and-sum beamformer. The IQ frames were then normalized by the square root of the number of channel contributions per pixel [26]. Then, tissue signal removal was performed by applying a Singular Value Decomposition (SVD) [27] filter and setting the first 10 singular values to zero. This cutoff corresponds to a compromise between suppressing tissue and keeping both fast and slow microbubbles.

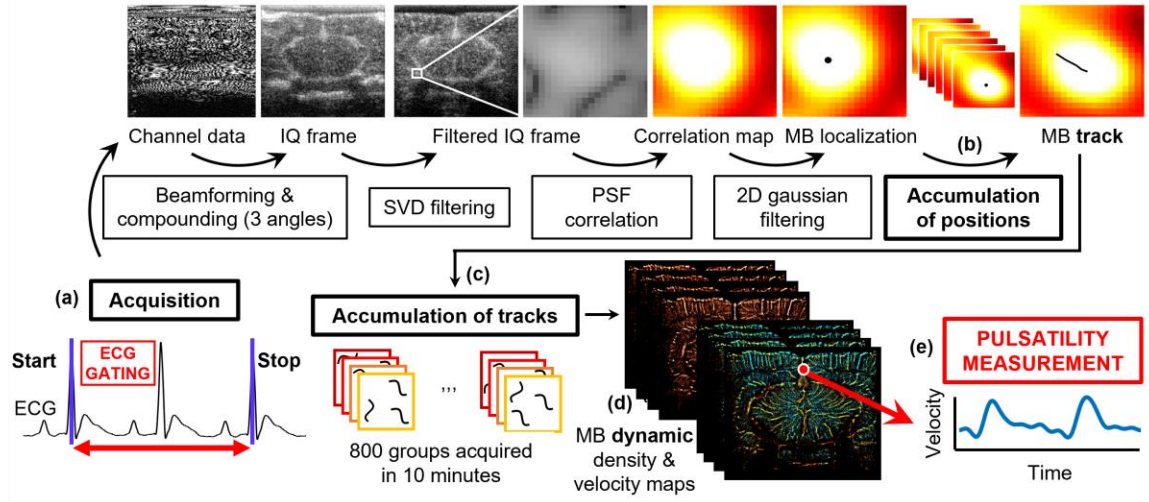


Figure 5.2 DULM pipeline (see Methods).

The post-processing pipeline was applied as follows: after beamforming and compounding (3 angles), the In-Phase & Quadrature (IQ) frames were filtered using a Singular Value Decomposition (SVD) filter to remove the tissue while keeping the MB signal. A Point Spread Function (PSF) correlation was then applied to generate a correlation map, on which MB could be localized using a 2D Gaussian filter. (b) The accumulation of the MB positions in successive frames over time led to an ensemble of tracks. (c) After generating all the tracks, the sum of microbubbles positions and their averaged velocity allowed to generate (d) MB dynamic density and velocity maps. (e) From these maps, the pulsatility could be measured in any vessel in the whole brain cross-section. MB: microbubbles.

5.3.6 ULM processing

To prevent false detection of diffuse scattering arising from the interaction of multiple microbubbles, filtered IQ frames were first correlated with the spatial impulse response (or Point Spread Function, PSF) of the imaging system (**Figure 5.2**). To simulate the PSF, we used an in-house GPU implementation of the SIMUS simulation software described in [28], using the probe parameters and the acquisition sequence. After correlation, local maxima were detected in the resulting correlation map and identified as unique microbubbles, and their subpixel positions were calculated using a 2D Gaussian least square fitting using a 7-pixels neighborhood. Due to the bolus injection performed at the beginning of the acquisition, the microbubbles concentration decreased through time: to prevent false microbubbles detection, bright local maxima with a correlation

coefficient lower than 0.4 were rejected. Microbubbles were then paired as tracks with the nearest neighbor method in the following frame (**Figure 5.2 (b)**).

5.3.7 DULM processing

After tracking, the velocity of hundreds of thousands of microbubbles over the hundreds of cardiac cycles that occurred during the 10-minutes acquisition was computed. Since each group of 400 frames at 1000 Hz was gated on the R-wave of the ECG signal, corresponding to a recording of 400 ms (**Figure 5.1**), these velocities were then averaged (**Figure 5.2 (c)**) to retrieve a mean velocity variation through time, lasting 400 ms (**Figure 5.2 (d)**). This method provides measurements that are calculated on a blood velocity waveform retrieved from the accumulation of hundreds of cardiac cycles.

This 400-ms sequence corresponds to the duration of about 2 cardiac cycles in the rat brain (its heart rate was approximately 300 bpm), and 3.6 in the mouse brain (its heart rate was approximately 550 bpm). Microbubbles positions were summed and their velocities were averaged on a finer cartesian grid ($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) according to their timing within the 400-ms recording. By doing so, we obtained both microbubbles density and velocity dynamic maps lasting 2 and 3.6 cardiac cycles, in the rat and the mouse brains, respectively.

5.3.8 Dynamic density and velocity maps

Dynamic density and velocity maps were further processed as videos (e.g., Supplementary videos 1 and 2). For a better visualization, a 4-frame sliding temporal window was applied and a representative ECG signal was added to indicate the elapsed time after gating. Static maps were displayed next to the dynamic ones, as a reference.

5.3.9 Pulsatility measurement in a vessel

In each $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ pixel, all the microbubbles (positions and velocities) extracted from the 800 groups were accumulated over a common 400-ms temporal axis, to extract the evolution of the microbubbles velocity over time within this pixel (**Figure 5.2 (e)**). Vessels were manually segmented to accumulate several pixels and average the evolution of thousands of microbubble velocities. Missing values were replaced by the median value of the signal. High frequencies in the velocity signal were filtered out (butter 3rd order, 25-Hz cutoff), which was sufficient to sample

the cardiac cycles of both species and observe the velocity fluctuations over 400 ms (**Figure 5.3 (b-c)** and **Figure 5.4 (b-c)**).

5.3.10 Pulsatility index (PI) calculation

The PI is usually calculated from the envelope of a Pulsed-Wave Doppler spectrum: it is defined in (1) as the difference between the peak systolic velocity (PSV) and the end diastolic velocity (EDV), divided by the mean flow velocity (MFV):

$$PI = \frac{PSV - EDV}{MFV} \quad (5-1)$$

A mean PI is usually calculated over several complete velocity waveforms (typically between 4 and 6), to avoid biased measurements due to irregularities in the spectrum.

Similarly, to assess the repeatability of DULM, we divided our datasets to perform a PI measurement based on several velocity waveforms. After calculating velocity variations in each vessel (**Figure 5.3 (b-c)** and **Figure 5.4 (b-c)**), we kept portions of velocity waveforms that were part of a complete heart cycle to compute an average velocity waveform (**Figure 5.3 (d-e)** and **Figure 5.4 (d-e)**). Since the sequence we used allowed to record only 1 or 2 complete velocity waveforms in the rat brain (and 3 in the mouse brain), we divided our dataset into 4×200 frames for the rat and 2×400 frames for the mouse, to ensure an accurate measurement of the PI and assess its reproducibility. Thus, each PI measurement was performed on at least 4 velocity waveforms, and a maximum of 8.

After measuring the maximum (PSV_i), minimum (EDV_i) and mean velocity (MFV_i) and calculating a PI_i for each velocity waveform i ($i = 1, \dots, N$ with $4 \leq N \leq 8$), we computed the average PI and standard deviation σ_{PI} :

$$PI = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N PI_i = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{PSV_i - EDV_i}{MFV_i} \quad (5-2)$$

$$\sigma_{PI} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N |PI_i - PI|^2} \quad (5-3)$$

This standard deviation calculation could be used to assess the reproducibility of the PI measurements from one velocity waveforms to the other.

5.3.11 Vessel diameter estimation

The vessel diameters were estimated from the microbubbles mean density maps generated by DULM: by evaluating the number of microbubbles across the section of the selected vessel, the full width at half maximum was considered as the vessel diameter.

5.3.12 Flow direction, pulsatility and statistical analysis in the cortex

A Fast Fourier Transform filter [29] was applied on the channel data, to separate the microbubbles according to their flowing direction (upwards and downwards) (**Figure 5.5 (a)** and **Figure 5.6 (a)**). After the DULM post-processing pipeline, we manually segmented the cortex (**Figure 5.5 (b)** and **Figure 5.6 (b)**): there, veins flow upwards and arteries flow downwards. A vessel segmentation was then performed by applying a Hessian filter on the mean density map (**Figure 5.5 (c-d)** and **5.6 (c-d)**). For each pixel found within a segmented vessel, we extracted the average velocity variations and calculated the PI as described above. We considered that the more microbubbles had been flowing through this pixel, the more accurate this PI measurement would be. This is why we attributed a weight to each pixel, corresponding to the microbubble density of this pixel. The statistical comparison between veins and arteries was then performed using a weighted Student's t-test, which takes the pixels weights into account to determine whether the two groups of pixels (veins and arteries) have equal means. The weights were also considered to calculate the weighted median, 25th and 75th percentile of each group, to display the weighted boxplots (**Figure 5.5 (e)** and **Figure 5.6 (e)**).

5.3.13 Contrast Enhanced Ultrafast Ultrasound Doppler (CEUFD)

A CEUFD pipeline was implemented by summing the channel data of all the groups of the acquisition, to enhance the signal-to-noise ratio. By doing so, we could get a 400-frames dataset with a very high composite concentration of microbubbles (**Figure 5.7 (a)** and **Figure 5.8 (a)**), to compute CEUFD spectra and perform measurements similar to CEUS (Contrast Enhanced Ultrasound) acquisitions [30], [31]. With the parameters we used in the ultrasound sequences (a

transmitted frequency of 15.625 MHz and a PRF of 1000 Hz), the maximum velocity that could be measured with CEUFD is 24.64 mm/s.

Beamforming was performed on the summed channel data, with a $23.5 \mu\text{m} \times 23.5 \mu\text{m}$ cartesian grid using an in-house, GPU-based, delay-and-sum beamformer. SVD filtering was then applied, with the first 10 singular values set to zero.

In selected vessels, the spectrum was computed within regions of interest (ROI) of $3 \text{ pixels} \times 3 \text{ pixels}$ ($70 \mu\text{m} \times 70 \mu\text{m}$) (**Figure 5.7 (c)** and **Figure 5.8 (c)**): a spectrum was estimated by performing the average of the 9 individual spectra. Thus, for each temporal sample, we calculated the power spectral estimation by a Fast Fourier Transform over a temporal window of 27 ms, to obtain a gray-scaled column in the spectrogram [19]. The size of the temporal window was chosen to be short compared to the time scale of the cardiac cycle (~ 200 ms for the rat, ~ 110 ms for the mouse), but long enough to enable a velocity estimation and draw a velocity waveform. By sliding the temporal window and iterating the calculation for each temporal sample, we finally obtained the spectrum of microbubbles velocity variations over time in each ROI (**Figure 5.7 (e)** and **Figure 5.8 (e)**). The envelope of the signal was computed from the binarization of the spectrum performed with the Otsu method [32], and frequencies higher than 25 Hz were filtered out. From this envelope, velocity minima and maxima were extracted, as well as the times they were reached.

5.4 Results

5.4.1 DULM enables the extraction of flow variations over time and spatially resolved whole-brain pulsatility measurements in 2D in microvessels

The dynamic maps generated by DULM (Supplementary videos 1 and 2) show microbubbles flowing in the bloodstream in the whole brain cross-section. The pulsatility can be observed on the video in some vessels shown by the arrows.

Vessels with different diameters and mean velocities were selected in both species (**Figure 5.3 (a)** and **Figure 5.4 (a)**) to obtain an overview of the performances of the method applied to different flow patterns: large and small vessels, fast and slow flow.

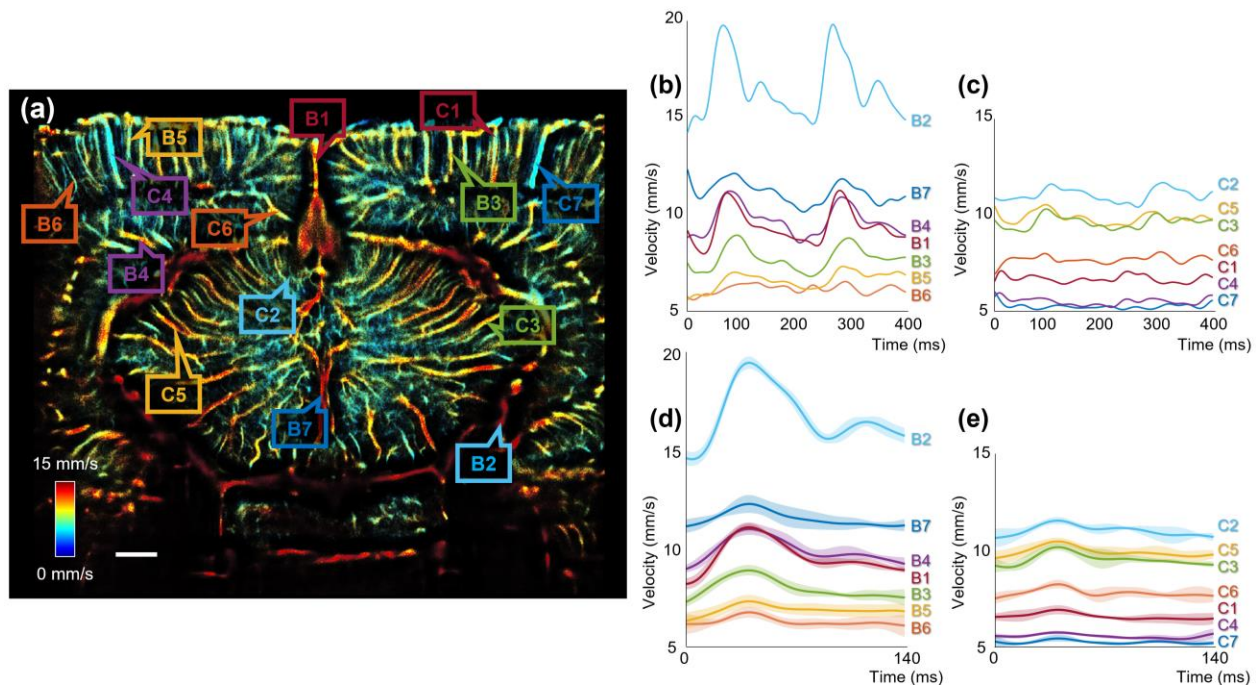


Figure 5.3 Pulsatility measurements performed by DULM in 14 vessels selected in the rat brain with craniotomy.

(a) Mean velocity map. (b-c) Velocity variations over time (400 ms) of vessels with a high (B1-B7) and a low (C1-C7) pulsatility. (d-e) Average velocity waveform over time for vessels with a high (B1-B7) and a low (C1-C7) pulsatility after dividing the dataset into 4 sets of 200 groups of frames. Shaded regions: mean $\pm$ standard deviation ($4 \leq N \leq 8$ velocity waveforms). Grid resolution for the maps: $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. Scale bars, 1 mm.

Table 5.1 Pulsatility index measurements performed by DULM in the rat brain with craniotomy. SD: standard deviation

Vessel	Diameter $\pm$ SD (μm)	Mean velocity $\pm$ SD (mm/s)	Pulsatility index $\pm$ SD
B1	36 ± 6	9.4 ± 0.03	0.33 ± 0.03
B2	122 ± 4	16.7 ± 0.04	0.30 ± 0.06
B3	64 ± 7	7.7 ± 0.10	0.28 ± 0.04
B4	72 ± 8	9.7 ± 0.12	0.24 ± 0.04
B5	45 ± 7	6.6 ± 0.20	0.21 ± 0.03
B6	27 ± 6	6.1 ± 0.29	0.18 ± 0.03
B7	47 ± 9	11.5 ± 0.12	0.13 ± 0.05
C1	46 ± 7	6.5 ± 0.07	0.13 ± 0.03
C2	72 ± 5	11.0 ± 0.11	0.13 ± 0.09
C3	78 ± 11	9.5 ± 0.14	0.12 ± 0.06

C4	69 ± 12	5.4 ± 0.05	0.10 ± 0.03
C5	73 ± 9	9.8 ± 0.13	0.11 ± 0.04
C6	97 ± 9	7.7 ± 0.14	0.11 ± 0.02
C7	64 ± 7	5.1 ± 0.02	0.09 ± 0.03

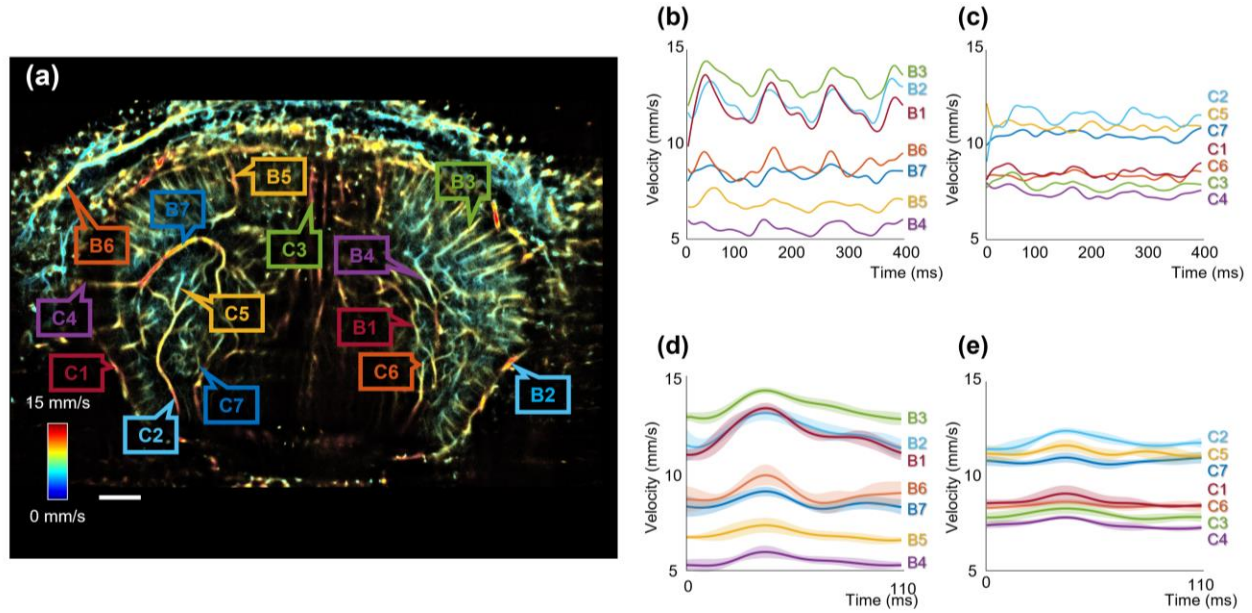


Figure 5.4 Pulsatility measurements performed by DULM in 14 vessels selected in the mouse brain through skull and skin.

(a) Mean velocity map. (b-c) Velocity variations over time (400 ms) of vessels with a high (B1-B7) and a low (C1-C7) pulsatility. (d-e) Average velocity waveform over time for vessels with a high (B1-B7) and a low (C1-C7) pulsatility, after dividing the dataset into 2 sets of 400 groups of frames. Shaded regions: mean $\pm$ standard deviation ($4 \leq N \leq 8$ velocity waveforms). Grid resolution for the maps: $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. Scale bars, 1 mm.

Table 5.2 Pulsatility index measurements performed by DULM in the mouse brain through skull and skin. SD: standard deviation

Vessel	Diameter $\pm$ SD (μm)	Mean velocity $\pm$ SD (mm/s)	Pulsatility index $\pm$ SD
B1	70 ± 6	12.3 ± 0.05	0.22 ± 0.02
B2	56 ± 7	12.5 ± 0.005	0.17 ± 0.02
B3	72 ± 5	13.7 ± 0.06	0.12 ± 0.02
B4	26 ± 2	5.6 ± 0.07	0.12 ± 0.04
B5	63 ± 11	6.9 ± 0.17	0.13 ± 0.02
B6	48 ± 6	9.1 ± 0.10	0.19 ± 0.04
B7	55 ± 6	8.6 ± 0.13	0.13 ± 0.02

C1	50 ± 7	8.7 ± 0.10	0.08 ± 0.06
C2	66 ± 9	11.8 ± 0.05	0.09 ± 0.06
C3	98 ± 10	8.0 ± 0.05	0.08 ± 0.04
C4	60 ± 11	7.5 ± 0.13	0.07 ± 0.08
C5	75 ± 13	11.3 ± 0.12	0.08 ± 0.03
C6	71 ± 12	8.5 ± 0.07	0.06 ± 0.07
C7	65 ± 9	10.8 ± 0.12	0.04 ± 0.03

Blood flow pulsatility was quantified by calculating the pulsatility index, or PI [14] (Methods), which reflects the variations of the blood flow velocity compared to its mean velocity.

The pulsatility can also be qualitatively characterized by the velocity waveform itself, which presents a pulsatile pattern synchronized with the cardiac rhythm for a high pulsatility [15]. We arbitrarily separated the vessels into two groups according to their PI with a threshold of $PI = 0.13$ in the rat brain and $PI = 0.12$ in the mouse brain, to better visualize the velocity waveform for a high (**Figure 5.3 (b)** and **Figure 5.4 (b)**) pulsatility, and for a low (**Figure 5.3 (c)** and **Figure 5.4 (c)**) pulsatility. The corresponding mean velocities, PI and vessel widths are listed in **Table 5.1** and **Table 5.2**.

In both animals, we observed that the pulsatile pattern is more visible in the variations of velocity over time for a high pulsatility, i.e. for a $PI > 0.13$ in the rat brain and $PI > 0.12$ in the mouse brain (**Figure 5.3 (b)**, B1: $PI = 0.33 \pm 0.03$ in the rat; **Figure 5.4 (b)**, B1: $PI = 0.22 \pm 0.02$ in the mouse); for a low pulsatility ($PI < 0.13$ in the rat brain and $PI < 0.12$ in the mouse brain), the variations of velocity though time present a flatter pulse and a less discernable pulsatile pattern (**Figure 5.3 (c)**, C7: $PI = 0.09 \pm 0.03$ in the rat; **Figure 5.4 (c)**, C7: $PI = 0.04 \pm 0.03$ in the mouse). The pulsatile pattern was observed even in presence of low velocities (**Figure 5.3 (b)**, B3: 7.7 ± 0.10 mm/s in the rat; **Figure 5.4 (b)**, B4: 5.6 ± 0.07 mm/s in the mouse) and in small vessels (**Figure 5.3 (b)**, B6: 27 ± 6 μ m in the rat; **Figure 5.4 (b)**, B4: 26 ± 2 μ m in the mouse).

In **Figure 5.4 (d-e)** and **Figure 5.5 (d-e)**, we noticed a high repeatability in the average velocity waveform, with a small standard deviation calculated from N independent measurements ($4 \leq N \leq 8$). Especially, for a high pulsatility (B1 and B2 in both animals), after the systolic peak, velocity waveforms present a local minimum before another increase in velocity. This minimum corresponds to a dicrotic notch, which can be seen usually in arteries: it is due to the sudden decrease in arterial pressure that occurs immediately after the closure of the aortic valves. This local velocity minimum is less or not visible in vessels with a smaller PI, in both animals.

5.4.2 Differentiating cortical veins from arteries with DULM

Oriented microbubble density maps along with the segmented cortical veins (flowing upwards) and cortical arteries (flowing downwards) are shown in **Figure 5.5** and in **Figure 5.6**. In each segmented vessel, the PI was calculated. After weighting by the microbubbles density, a significantly higher pulsatility was observed in cortical arteries compared to cortical veins ($P < 0.001$), in both animals (**Figure 5.5 (e)** and **Figure 5.6 (e)**).

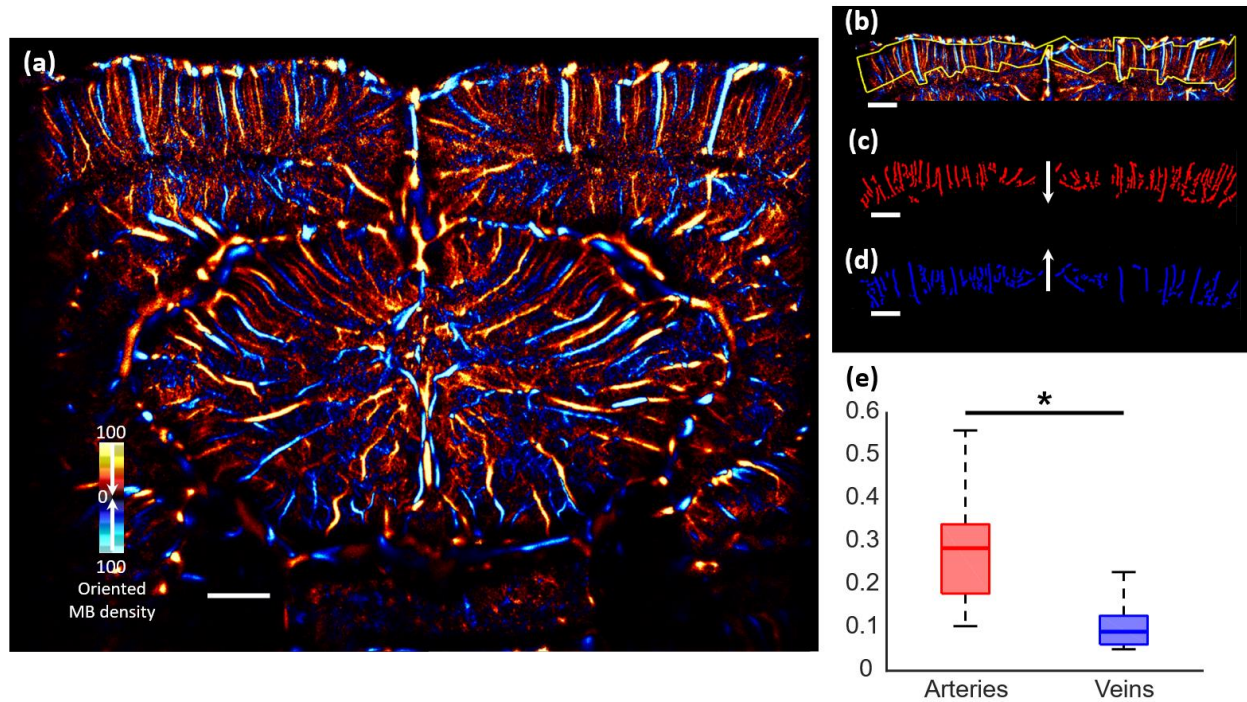


Figure 5.5 DULM-based PI could differentiate veins from arteries in the rat cortex.

(a) Oriented microbubbles (MB) density (hot: MB flowing downwards, cold: MB flowing upwards). (b) Manual segmentation of the cortex (yellow). (c-d) 69 veins (blue) and 82 arteries (red) were differentiated from their flow direction (veins flowing upwards, arteries flowing downwards). (e) Pulsatility indexes (PI) calculated in all the pixels contained in the segmented arteries (red box) and veins (blue box), weighted by their MB density: 23,737 PI values were extracted in the rat arteries, 18,125 in the rat veins. Weighted boxplot: thick line, weighted median; box, 25th to 75th weighted percentile; whiskers extend to the most extreme data points that are not considered outliers; outliers (0 for the rat arteries, 1,149 for the rat veins) are not represented. * $P < 0.001$. Scale bars, 1 mm.

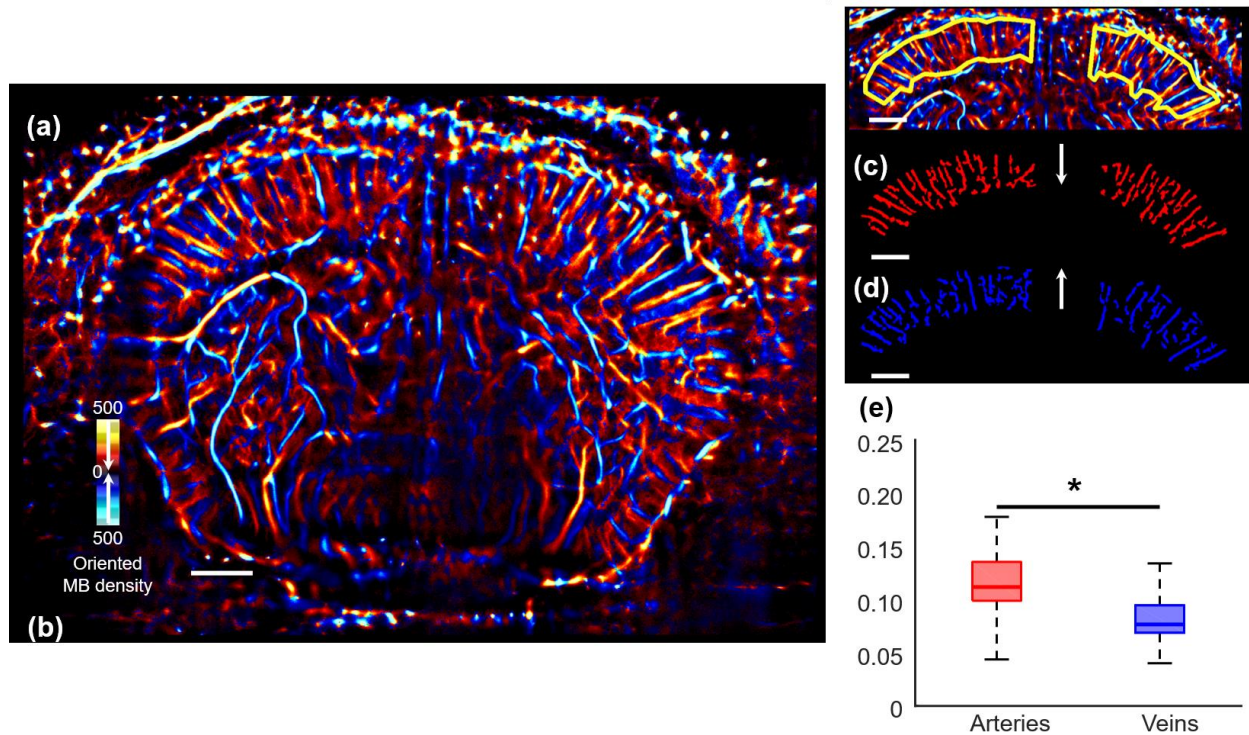


Figure 5.6 DULM-based PI could differentiate veins from arteries in the mouse cortex.

(a) Oriented microbubbles (MB) density (hot: MB flowing downwards, cold: MB flowing upwards). (b) Manual segmentation of the cortex (yellow). (c-d) 62 veins (blue) and 57 arteries (red) were differentiated from their flow direction (veins flowing upwards, arteries flowing downwards). (e) Pulsatility indexes (PI) calculated in all the pixels contained in the segmented arteries (red box) and veins (blue box), weighted by their MB density: 19,160 PI values were extracted in the mouse arteries, 18,394 in the mouse veins. Weighted boxplot: thick line, weighted median; box, 25th to 75th weighted percentile; whiskers extend to the most extreme data points that are not considered outliers; outliers (1,390 for the mouse arteries, 2,379 for the mouse veins) are not represented. * $P < 0.001$. Scale bars, 1 mm.

5.4.3 Comparison of CEUFD and DULM pulsatility measurement performances

A comparison with another ultrasound method was performed as follows, in order to compare their performances in terms of extracting a pulsatility pattern in microvessels. Two different processing pipelines were applied on the same data of the rat and the mouse brains: the DULM pipeline on the one hand, and a CEUFD pipeline on the other hand (Methods). Indeed, like UFD [19], [33],

CEUFD imaging can be used to image the microvascularisation of the small animal brain, with an enhanced contrast in the PW Doppler spectra due to the microbubbles signal. Different vessels were selected in the entire brain to compare the pulsatility measurements obtained with CEUFD (**Figure 5.7 (a)** and **Figure 5.8 (a)**) and DULM (**Figure 5.7 (b)** and **Figure 5.8 (b)**).

In both animals, a difference in the mean velocities between the two methods can be seen. This bias can be explained by the fact that CEUFD images are less resolved than DULM images: consequently, CEUFD measurements were performed in a $70\ \mu\text{m} \times 70\ \mu\text{m}$ region, whereas DULM measurements were performed in a $30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$ region. Also, as a Doppler imaging technique, CEUFD is an angle-dependent method: the measured velocity depends on the angle between the ultrasound beam and the vessel. On the contrary, DULM velocity measurements are angle-independent and performed on the average velocity variations of thousands of microbubbles. Moreover, due to low contrast, it was difficult to extract velocity measurements in CEUFD. For these reasons, we qualitatively compared the two methods and focused on the velocity waveform instead of the velocity and PI measurements.

Also, it should be noted that DULM measures absolute velocity variations, whereas CEUFD measurements depends on flow direction: this is why the pattern is reversed in CEUFD for vessels 1 and 2 in the rat brain (**Figure 5.7 (e2-3)**), and vessel 1 in the mouse brain (**Figure 5.8 (e1)**).

In both animals, we found main vessels (labelled 1 in both figures) in which the pulsatility could be measured with CEUFD (**Figure 5.7 (e1)** and **Figure 5.8 (e1)**) and DULM (**Figure 5.7 (f1)** and **Figure 5.8 (f1)**): a pulsatile pattern synchronized with the cardiac rhythm was extracted from the velocity waveforms with both methods, in the rat brain and the mouse brain. Moreover, the times at which the velocity reached its maxima were found to be within an error of 17 ± 14 ms. In these vessels, nearly 10,000 microbubble events were detected in the $30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$ DULM ROI: 8,756 in the mouse brain (**Figure 5.8 (d1)**) and 11,632 in the rat brain (**Figure 5.7 (d1)**).

In vessel 2 in **Figure 5.7**, fewer microbubble events (7,894, see **Figure 5.7 (d2)**) were detected in the DULM ROI: we observed a non-reproducible pulse in CEUFD (**Figure 5.7 (e2)**), but again a pulsatile pattern in DULM (**Figure 5.7 (f2)**).

In vessels 3 in **Figure 5.7**, and 2 and 3 in **Figure 5.8**, it was found that the pulsatile pattern remained visible in DULM (**Figure 5.7 (f3)**, **Figure 5.8 (f2-3)**), but could not be detected with CEUFD in the spectra (**Figure 5.7 (e3)**, **Figure 5.8 (e2-3)**). In these vessels, even fewer microbubble events

were detected in the DULM ROI: 3,381 in vessel 3 in the rat brain (**Figure 5.7 (d3)**), and 6,109 in vessel 2 (**Figure 5.8 (d2)**) and 4,053 in vessel 3 (**Figure 5.8 (d3)**) in the mouse brain.

Finally, a non-pulsatile flow was observed using DULM in vessel 4 in **Figure 5.7 (f4)**, but could not be detected using CEUFD (**Figure 5.7 (e4)**). In this vessel, 4,211 microbubble events were detected in the DULM ROI.

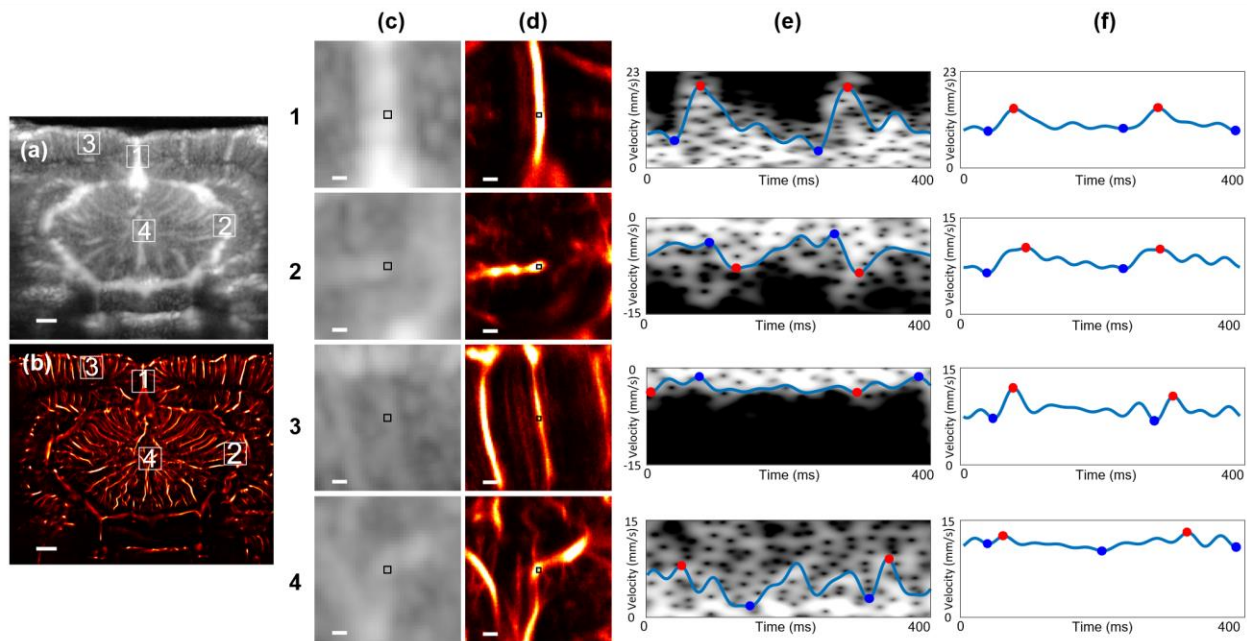


Figure 5.7 Comparison of pulsatility measurements between CEUFD and DULM in the rat brain.

Several vessels were selected in the whole brain to measure the pulsatility with both (a) CEUFD and (b) DULM. (c1-4) Closer view of each vessel with CEUFD. Regions where the pulsatility was measured within each vessel are $70\ \mu\text{m} \times 70\ \mu\text{m}$ with CEUFD (black squares). (d1-4) Closer view of each selected vessel with DULM. Regions where the pulsatility was measured within each vessel are $30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$ with DULM (black squares). (e1-4) The CEUFD spectra envelopes show the velocity variations over time. (f1-4) Velocity variations though time obtained with DULM. For both methods, the velocity minima (blue spots) and maxima (red spots) were extracted. Grid resolution for the maps: $23.5\ \mu\text{m} \times 23.5\ \mu\text{m}$ in CEUFD, $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ in DULM. Scale bars, (a&b) 1 mm, (c&d, 1-4) $100\ \mu\text{m}$.

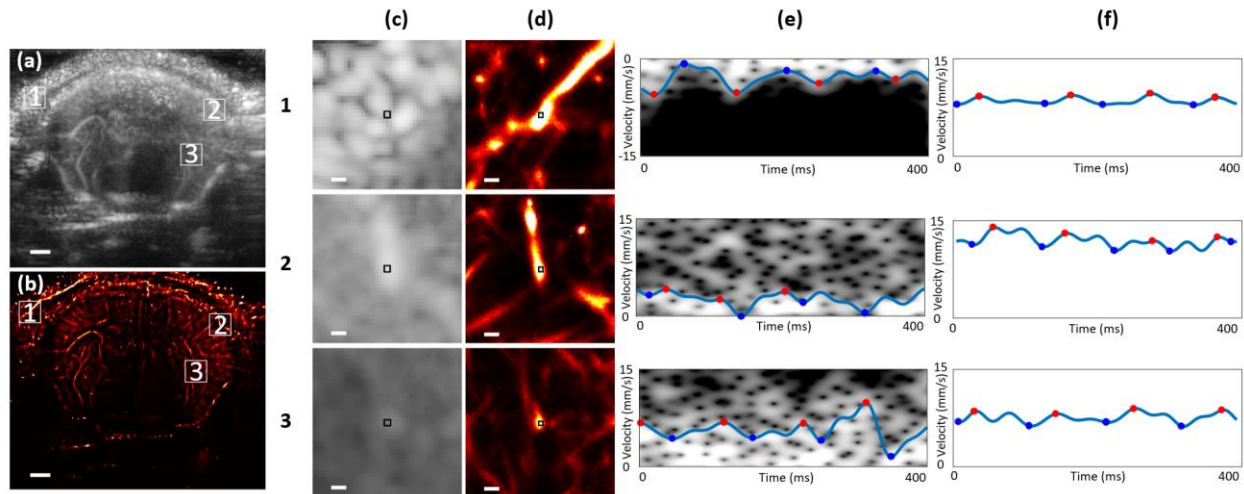


Figure 5.8 Comparison of pulsatility measurements between CEUFD and DULM in the mouse brain.

Several vessels were selected in the whole brain to measure the pulsatility with both (a) CEUFD and (b) DULM. (c1-3) Closer view of each vessel with CEUFD. Regions where the pulsatility was measured within each vessel are $70 \mu\text{m} \times 70 \mu\text{m}$ with CEUFD (black squares). (d1-3) Closer view of each selected vessel with DULM. Regions where the pulsatility was measured within each vessel are $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ with DULM (black squares). (e1-3) The CEUFD spectra envelopes show the velocity variations over time. (f1-3) Velocity variations though time obtained with DULM. For both methods, the velocity minima (blue spots) and maxima (red spots) were extracted. Grid resolution for the maps: $23.5 \mu\text{m} \times 23.5 \mu\text{m}$ in CEUFD, $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ in DULM. Scale bars, (a&b) 1 mm, (c&d, 1-3) $100 \mu\text{m}$.

5.5 Discussion

In this study, Dynamic Ultrasound Localization Microscopy (DULM) was used to image the blood velocity as a function of time and measure pulsatility indices in rat and mouse brains, with and without craniotomy (through skull and skin), respectively. More specifically, DULM was used to produce cine-loops of flowing microbubbles in the entire brain and lasting several cardiac cycles. From these cine-loops, density and velocity dynamic maps of flowing microbubbles were extracted, as well as the evolution of the velocity over time in vessels smaller than $100 \mu\text{m}$ in diameter, from which the pulsatility index (PI) was calculated. The velocity over time obtained

with DULM was compared against CEUFD. DULM detected a significantly higher PI in the cortical arteries than in the cortical veins.

Supplementary videos 1 and 2 illustrate that DULM can be used to generate density and velocity dynamic maps of flowing microbubbles in the entire rodent brain. In **Figure 5.3** and **Figure 5.4**, velocity variations over time and PI calculations were extracted for 14 different vessels in the whole rodent brain cross-section, and a pulsatile pattern synchronized with the cardiac rhythm of the animal could be recognized in the velocity waveforms for a high pulsatility, even for slow flow and small vessels. To assess reproducibility, a mean PI and an average velocity waveform were calculated from $4 \leq N \leq 8$ independent measurements performed in each vessel, with a small standard deviation.

As expected [34], **Figure 5.5** and **Figure 5.6** showed that after identification based on flow direction in the cortex, arteries (flowing downwards) had a significantly higher PI than the veins (flowing upwards). **Figure 5.7** and **Figure 5.8** illustrated that using the same datasets to compare the two modalities, velocity waveforms based on DULM were better defined and allowed for the probing of more microvessels than CEUFD, which could measure the pulsatility only in main vessels where many microbubbles had flown.

DULM could potentially impact current pre-clinical practices. Indeed, a DULM acquisition could provide 1) microbubbles density and velocity dynamic maps in the whole rodent brain cross-section; 2) the velocity variations over time in microvessels; 3) the calculation of the PI within this vessel. Until now, the PI was calculated within larger regions of interest, in large arteries such as the carotid or main vessels in the brain. With DULM, we achieved a high spatiotemporal resolution, and extracted the pulsatility in both large and small vessels, at-depth, in the whole brain vasculature in 2D. This technique provides dynamic measurements in a new range of vessels that was inaccessible for non-invasive techniques before: it could be used to study the propagation of the pulsatility along the vascular tree the case of aging arteries, to better enhance its impact deep in the brain.

The study presented herein is however not without limitations. In this work, we limited our measurement to the average pulsatility in entire cross-sections of blood vessels. In principle, different pulsatility values could be obtained within one vessel.

Since no method has been able to perform 2D whole brain measurements of the pulsatility in small animals in vivo before, it is difficult to compare these results with the literature. However, in vivo measurements performed in the cortex are common in small animals. Average velocity measurements performed in the mouse cortical vessels with a diameter of $72 \pm 5 \mu\text{m}$ (**Figure 5.4 (b)**, B3: $13.7 \pm 0.06 \text{ mm/s}$) and a diameter of $63 \pm 11 \mu\text{m}$ (**Figure 5.4 (b)**, B5: $6.9 \pm 0.17 \text{ mm/s}$) agree with two-photon excited fluorescence microscopy measurements [35], which report a mean velocity of 13 mm/s in arterioles with a $60\text{-}\mu\text{m}$ diameter. Similarly, velocity variations observed in the rat cortex for a $64 \pm 7 \mu\text{m}$ diameter (**Figure 5.3 (b)**, B3: $7.7 \pm 0.10 \text{ mm/s}$) between 6.9 mm/s and 8.9 mm/s agree with velocity variations observed in pial arterioles ($6\text{-}12 \text{ mm/s}$) with optical coherence tomography [36] for a vessel with a $62.4\text{-}\mu\text{m}$ diameter.

It is also difficult to quantitatively establish the smallest vessel diameter in which pulsatility can be measured as PI measurements depend on both the resolution of ULM at high concentration and the value of the PI itself. Indeed, while a clear pulsatility pattern was extracted in many microvessels from the velocity waveforms, for some vessels the velocity modulation with the cardiac cycle was less visible. In veins for example, the pulsatility may be very low and undetectable with our method.

This study was based on the use of bolus injections rather than a constant infusion because bolus injections are simpler to perform, potentially minimize microbubbles destruction [37] and limit issues linked to dead volumes in catheters. However, bolus injections lead to a varying microbubble concentration during the acquisition, which may affect the variability of the velocity measurements. In order to partially lift this limitation, we used a 0.4 correlation threshold to reduce measurements with very high variability.

To sample the velocity variations over time, a large number of microbubbles have to be detected and tracked during the acquisition. To increase the number of microbubbles, a few solutions exist: increasing the acquisition time, and/or increasing the concentration of injected microbubbles. Here, about 6 times more microbubbles were injected, compared to other ULM studies in the rat brain [24] (see Methods), and the acquisition times reached approximately 10 minutes. However, the number of injected microbubbles remains low compared to Contrast Enhanced Ultrasound [31], where the microbubbles are not detected individually. The drawback of injecting more

microbubbles is that the localization of the microbubbles is more difficult due to multiple microbubble interactions, and can lead to a degraded resolution. A complete study of the influence of microbubbles concentration on the reconstructed vessels is the object of on-going work [38], [39].

The comparison between CEUFD and DULM was provided as an illustrative example and based on an acquisition sequence designed for DULM, which means that better CEUFD images could probably be obtained by optimizing imaging parameters such as frame rate and the number of compounding angles. It is however unlikely it would change the general results obtained in this work, i.e., that DULM provides improved velocity measurements in the microvasculature at the cost of a longer acquisition time.

Another limitation of DULM is that just like ULM, it cannot yet be converted into a real-time technique: it requires an acquisition of a few minutes in order to detect enough microbubbles to reconstruct vessels and measure their pulsatility. Additionally, it should be noted that here we did not correct for the aberrations due to the skull in the mouse, inducing a duplication of some vessels in-depth, and we did not perform any motion correction, which could affect the pulsatility measurements. Corrections for aberration [25] and motion [40] are the subject of on-going research [41] and could in principle be applied for DULM at the cost of increased computational time.

5.6 Conclusion

In conclusion, Dynamic Ultrasound Localization Microscopy is a novel approach for obtaining dynamic information about small vessels in-depth in the whole brain. Such a technology allows for the mapping of microbubbles flow in entire 2D fields of view. It also promises to overcome the current limitations of brain imaging techniques, and to generate a host of novel 2D applications ranging from brain vascularization dynamic mapping (with or without craniotomy) to the measurement of novel biomarkers.

5.7 Acknowledgment

The authors would like to thank M.-A. Gillis for the surgery, and M. Abran and S. Belanger for technical help with the monitoring platform.

5.8 References

- [1] D. Baric', "Why pulsatility still matters: A review of current knowledge," *Croatian Med. J.*, vol. 55, no. 6, pp. 609–620, Dec. 2014, doi: 10.3325/cmj.2014.55.609.
- [2] E. G. Lakatta, M. Wang, and S. S. Najjar, "Arterial aging and subclinical arterial disease are fundamentally intertwined at macroscopic and molecular levels," *Med. Clinics North Amer.*, vol. 93, no. 3, pp. 583–604, May 2009, doi: 10.1016/j.mcna.2009.02.008.
- [3] N. Thorin-Trescases and E. Thorin, "Lifelong cyclic mechanical strain promotes large elastic artery stiffening: Increased pulse pressure and old age-related organ failure," *Can. J. Cardiol.*, vol. 32, no. 5, pp. 624–633, May 2016, doi: 10.1016/j.cjca.2015.12.022.
- [4] P. Maillard et al., "Aortic stiffness, increased white matter free water, and altered microstructural integrity: A continuum of injury," *Stroke*, vol. 48, no. 6, pp. 1567–1573, Jun. 2017, doi: 10.1161/STROKEAHA.116.016321.
- [5] M. F. O'Rourke and J. Hashimoto, "Mechanical factors in arterial aging: A clinical perspective," *J. Amer. College Cardiol.*, vol. 50, no. 1, pp. 1–13, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.jacc.2006.12.050.
- [6] G. F. Mitchell, "Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: Implications for end-organ damage," *J. Appl. Physiol.*, vol. 105, no. 5, pp. 1652–1660, 2008, doi: 10.1152/jappphysiol.90549.2008.
- [7] G. F. Mitchell, "Aortic stiffness, pressure and flow pulsatility, and target organ damage," *J. Appl. Physiol.*, vol. 125, no. 6, pp. 1871–1880, Dec. 2018, doi: 10.1152/jappphysiol.00108.2018.
- [8] M. P. Pase, A. Herbert, N. A. Grima, A. Pipingas, and M. F. O'Rourke, "Arterial stiffness as a cause of cognitive decline and dementia: A systematic review and meta-analysis," *Internal Med. J.*, vol. 42, no. 7, pp. 808–815, Jul. 2012, doi: 10.1111/j.1445-5994.2011.02645.x.

- [9] E.-Y. Lim, D.-W. Yang, A.-H. Cho, and Y. S. Shim, “Cerebrovascular hemodynamics on transcranial Doppler ultrasonography and cognitive decline in mild cognitive impairment,” *J. Alzheimer’s Disease*, vol. 65, no. 2, pp. 651–657, Jan. 2018, doi: 10.3233/JAD-180026.
- [10] R. Aaslid, T.-M. Markwalder, and H. Nornes, “Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries,” *J. Neurosurgery*, vol. 57, no. 6, pp. 769–774, Dec. 1982, doi: 10.3171/jns.1982.57.6.0769.
- [11] M. Holmgren, A. Wåhlin, T. Dunås, J. Malm, and A. Eklund, “Assessment of cerebral blood flow pulsatility and cerebral arterial compliance with 4D flow MRI,” *J. Magn. Reson. Imag.*, vol. 51, no. 5, pp. 1516–1525, May 2020, doi: 10.1002/jmri.26978.
- [12] E. Guevara, N. Sadekova, H. Girouard, and F. Lesage, “Optical imaging of resting-state functional connectivity in a novel arterial stiffness model,” *Biomed. Opt. Exp.*, vol. 4, no. 11, pp. 2332–2346, Oct. 2013, doi: 10.1364/BOE.4.002332.
- [13] O. De Montgolfier et al., “High systolic blood pressure induces cerebral microvascular endothelial dysfunction, neurovascular unit damage, and cognitive decline in mice,” *Hypertension*, vol. 73, no. 1, pp. 217–228, Jan. 2019, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12048.
- [14] R. G. Gosling and D. H. King, “Arterial assessment by Doppler-shift ultrasound,” *Proc. Roy. Soc. Med.*, vol. 67, no. 6 Pt 1, pp. 447–449, Jun. 1974.
- [15] W. I. Rosenblum, “Erythrocyte velocity and a velocity pulse in minute blood vessels on the surface of the mouse brain,” *Circulat. Res.*, vol. 24, no. 6, pp. 887–892, Jun. 1969, doi: 10.1161/01.res.24.6.887.
- [16] M. Tanter and M. Fink, “Ultrafast imaging in biomedical ultrasound,” *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelectr., Freq. Control*, vol. 61, no. 1, pp. 102–119, Jan. 2014, doi: 10.1109/TUFFC.2014.6689779.
- [17] J. Bercoff et al., “Ultrafast compound Doppler imaging: Providing full blood flow characterization,” *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelectr., Freq. Control*, vol. 58, no. 1, pp. 134–147, Jan. 2011, doi: 10.1109/TUFFC.2011.1780.
- [18] E. Macé, G. Montaldo, I. Cohen, M. Baulac, M. Fink, and M. Tanter, “Functional ultrasound imaging of the brain,” *Nature Methods*, vol. 8, no. 8, pp. 662–664, Aug. 2011, doi: 10.1038/nmeth.1641.

- [19] C. Demené et al., “Ultrafast Doppler reveals the mapping of cerebral vascular resistivity in neonates,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 34, no. 6, pp. 1009–1017, Jun. 2014, doi: 10.1038/jcbfm.2014.49.
- [20] Comprehensive Biomedical Physics. Accessed: Jul. 21, 2021. [Online]. Available: <https://www.elsevier.com/books/comprehensive-biomedicalphysics/brahme/978-0-444-53632-7>
- [21] O. Couture, V. Hingot, B. Heiles, P. Muleki-Seya, and M. Tanter, “Ultrasound localization microscopy and super-resolution: A state of the art,” *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelectr., Freq. Control*, vol. 65, no. 8, pp. 1304–1320, Aug. 2018, doi: 10.1109/TUFFC.2018.2850811.
- [22] K. Christensen-Jeffries et al., “Super-resolution ultrasound imaging,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 46, no. 4, pp. 865–891, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.11.013.
- [23] C. Errico et al., “Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging,” *Nature*, vol. 527, no. 7579, pp. 499–502, Nov. 2015, doi: 10.1038/nature16066.
- [24] V. Hingot, C. Errico, B. Heiles, L. Rahal, M. Tanter, and O. Couture, “Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in ultrasound localization microscopy,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, Art. no. 2456, doi: 10.1038/s41598-01838349-x.
- [25] C. Demené et al., “Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients,” *Nature Biomed. Eng.*, vol. 5, no. 3, pp. 219–228, Mar. 2021, doi: 10.1038/s41551-021-00697-x.
- [26] B. Berthon et al., “Spatiotemporal matrix image formation for programmable ultrasound scanners,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 63, no. 3, 2018, Art. no. 03NT03, doi: 10.1088/1361-6560/aaa606.
- [27] C. Demené et al., “Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast ultrasound data highly increases Doppler and fUltrasound sensitivity,” *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 34, no. 11, pp. 2271–2285, Nov. 2015, doi: 10.1109/TMI.2015.2428634.
- [28] S. Shahriari and D. Garcia, “Meshfree simulations of ultrasound vector flow imaging using smoothed particle hydrodynamics,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 63, no. 20, Oct. 2018, Art. no. 205011, doi: 10.1088/1361-6560/aae3c3.

- [29] B.-F. Osmanski, M. Pernot, G. Montaldo, A. Bel, E. Messas, and M. Tanter, "Ultrafast Doppler imaging of blood flow dynamics in the myocardium," *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 31, no. 8, pp. 1661–1668, Aug. 2012, doi: 10.1109/TMI.2012.2203316.
- [30] C. Greis, "Quantitative evaluation of microvascular blood flow by contrast-enhanced ultrasound (CEUS)," *Clin. Hemorheol. Microcirculat.*, vol. 49, nos. 1–4, pp. 137–149, Jan. 2011, doi: 10.3233/CH-2011-1464.
- [31] D. Premilovac, S. J. Blackwood, C. J. Ramsay, M. A. Keske, D. W. Howells, and B. A. Sutherland, "Transcranial contrast-enhanced ultrasound in the rat brain reveals substantial hyperperfusion acutely post-stroke," *J. Cerebral Blood Flow Metabolism*, vol. 40, no. 5, pp. 939–953, May 2020, doi: 10.1177/0271678X20905493.
- [32] N. Otsu, "A threshold selection method from gray-level histograms," *IEEE Trans. Syst., Man, Cybern.*, vol. SMC-9, no. 1, pp. 62–66, Jan. 1979, doi: 10.1109/TSMC.1979.4310076.
- [33] B.-F. Osmanski, E. Lecarpentier, G. Montaldo, V. Tsatsaris, P. Chavatte-Palmer, and M. Tanter, "Discriminative imaging of maternal and fetal blood flow within the placenta using ultrafast ultrasound," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, Sep. 2015, Art. no. 13394, doi: 10.1038/srep13394.
- [34] M. E. Wagshul, P. K. Eide, and J. R. Madsen, "The pulsating brain:
A review of experimental and clinical studies of intracranial pulsatility,"
Fluids Barriers CNS, vol. 8, no. 1, p. 5, Jan. 2011, doi: 10.1186/2045-8118-8-5.
- [35] T. P. Santisakultarm et al., "In vivo two-photon excited fluorescence microscopy reveals cardiac- and respiration-dependent pulsatile blood flow in cortical blood vessels in mice," *Amer. J. Physiol.-Heart Circulat. Physiol.*, vol. 302, no. 7, pp. H1367–H1377, Apr. 2012, doi: 10.1152/ajpheart.00417.2011.
- [36] J. Seki, Y. Satomura, Y. Ooi, T. Yanagida, and A. et Seiyama, "Velocity profiles in the rat cerebral microvessels measured by optical coherence tomography," *Clin. Hemorheol. Microcirculat.*, vol. 34, nos. 1–2, pp. 233–239, Jan. 2006.
- [37] C. Sun et al., "Influence of temperature, needle gauge and injection rate on the size distribution, concentration and acoustic responses of ultrasound contrast agents at high frequency," *Ultrasonics*, vol. 70, pp. 84–91, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.ultras.2016.04.013.

- [38] H. Belgharbi et al., “An anatomically and hemodynamically realistic simulation framework for 3D ultrasound localization microscopy,” Oct. 2021, doi: 10.1101/2021.10.08.463259.
- [39] L. Milecki et al., “A deep learning framework for spatiotemporal ultrasound localization microscopy,” *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 40, no. 5, pp. 1428–1437, May 2021, doi: 10.1109/TMI.2021.3056951.
- [40] V. Hingot, C. Errico, M. Tanter, and O. Couture, “Subwavelength motion-correction for ultrafast ultrasound localization microscopy,” *Ultrasonics*, vol. 77, pp. 17–21, May 2017.
- [41] P. Cormier, J. Poree, C. Bourquin, and J. Provost, “Dynamic myocardial ultrasound localization angiography,” *IEEE Trans. Med. Imag.*, Jun. 2021, doi: 10.1109/TMI.2021.3086115.

CHAPITRE 6 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Ce Chapitre présente quelques résultats complémentaires au **Chapitre 5**.

6.1 Influence de la concentration sur la mesure de la pulsatilité

Concernant les mesures présentées chez le rat en particulier, nous avons pu effectuer, sur le même animal et dans le même plan d'imagerie, deux autres acquisitions ultrasonores à plus basses concentrations (25 μ L et 12.5 μ L de microbulles, diluées respectivement dans 25 μ L et 12.5 μ L de saline). Ces deux autres acquisitions n'étant constituées que de 384 blocs, nous avons gardé pour l'analyse suivante les 384 premiers blocs de l'acquisition présentée dans l'article (50 μ L de microbulles diluées dans 50 μ L de saline), pour comparer les différentes concentrations avec un nombre de blocs égal (voir **Figure 6.1**).

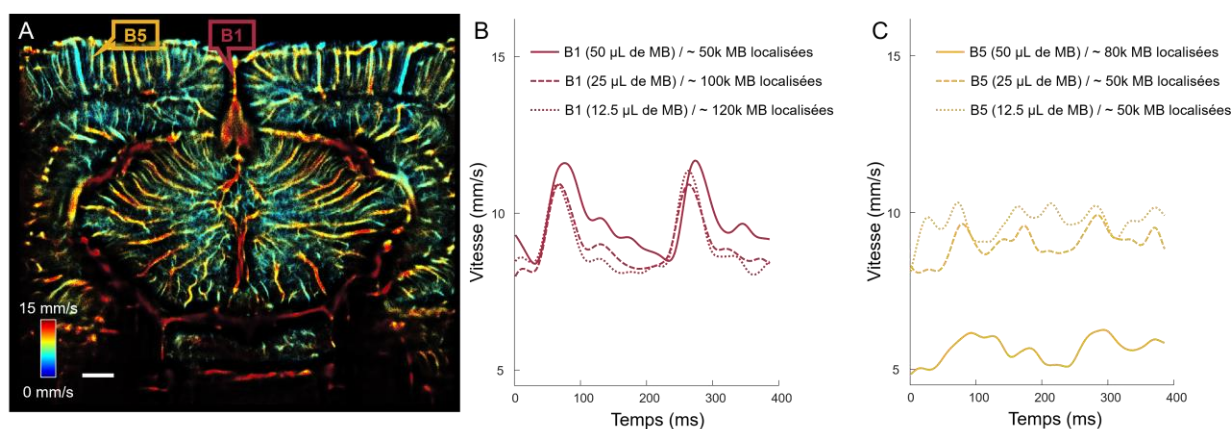


Figure 6.1 Influence de la concentration sur la mesure de la pulsatilité.

A. Carte de vitesse moyenne dans le cerveau de rat issue de l'article (**Chapitre 6**) ; B. Exemple d'évolution de la vitesse au cours du temps pour un vaisseau présentant une forte pulsatilité (B1), pour trois concentrations différentes ; C. Exemple d'évolution de la vitesse au cours du temps pour un vaisseau du cortex (B5), pour trois concentrations différentes.

Figure (A) adaptée de [138]

On remarque que, pour un vaisseau majeur présentant une très forte pulsatilité comme B1, à forte concentration, on détecte environ deux fois moins de microbulles qu'à moyenne ou faible concentration. Cela peut s'expliquer par le fait qu'à forte concentration, les interactions multiples

entre les microbulles sont plus fréquentes, mais elles sont éliminées au cours du processus de traitement des données (SVD, corrélation avec la PSF).

Les courbes de pulsatilité pour les 3 concentrations restent néanmoins similaires, de même que la vitesse moyenne (9.7 ± 0.9 mm/s, 9.0 ± 0.8 mm/s et 8.9 ± 0.9 mm/s pour une concentration de 50 μ L, 25 μ L et 12.5 μ L respectivement) et le PI (0.33 ± 0.01 , 0.29 ± 0.02 et 0.34 ± 0.04 pour une concentration de 50 μ L, 25 μ L et 12.5 μ L respectivement). Les courbes de pulsatilité sont également reproductibles dans le temps, et elles présentent toutes une onde dicrotique caractéristique d'une forte pulsatilité.

Pour certains vaisseaux au niveau du cortex en revanche, comme celui présenté en exemple B5, 1.6 fois moins de microbulles ont été détectées pour de moyennes ou faibles concentrations qu'à forte concentration. Par conséquent, à faible et moyenne concentration, il n'est pas possible de retrouver une courbe de pulsatilité dans ce vaisseau ; mais une onde de pulsatilité est clairement visible à forte concentration (PI = 0.21 ± 0.02 , PI = 0.15 ± 0.07 et PI = 0.12 ± 0.01 pour une concentration de 50 μ L, 25 μ L et 12.5 μ L respectivement). Or, comme on peut le voir sur la **Figure 5.5** de l'article au chapitre précédent, ce vaisseau du cortex est descendant ; il s'agit d'une artère, qui devrait donc logiquement présenter une forte pulsatilité. Ces hypothèses devraient néanmoins être confirmées à l'aide d'une autre technique d'imagerie, afin de s'assurer que les faibles vitesses mesurées à forte concentration sont cohérentes (on mesure une vitesse moyenne de 5.6 ± 0.4 mm/s, 9.0 ± 0.5 mm/s, 9.7 ± 0.4 mm/s pour une concentration de 50 μ L, 25 μ L et 12.5 μ L respectivement).

6.2 Influence de la quantité de microbulles sur la mesure de la pulsatilité

Pour évaluer l'influence de la quantité de microbulles mesurées sur la qualité des vitesses mesurées, nous avons généré les mesures de vitesse au cours du temps en faisant varier le nombre de blocs conservés pour les mesures (voir **Figure 6.2**). On constate que le bruit sur les mesures augmente lorsqu'on diminue le nombre de buffers conservés pour la mesure. Ce bruit est particulièrement problématique pour la mesure de l'indice de pulsatilité, surtout au niveau des petits vaisseaux dont la vitesse moyenne est relativement faible. La mesure de la pulsatilité dans de petits vaisseaux

nécessite donc de moyenner les données sur un nombre important de buffers, comme c'est le cas pour mesurer la vitesse ou la densité dans un vaisseau en ULM [136].

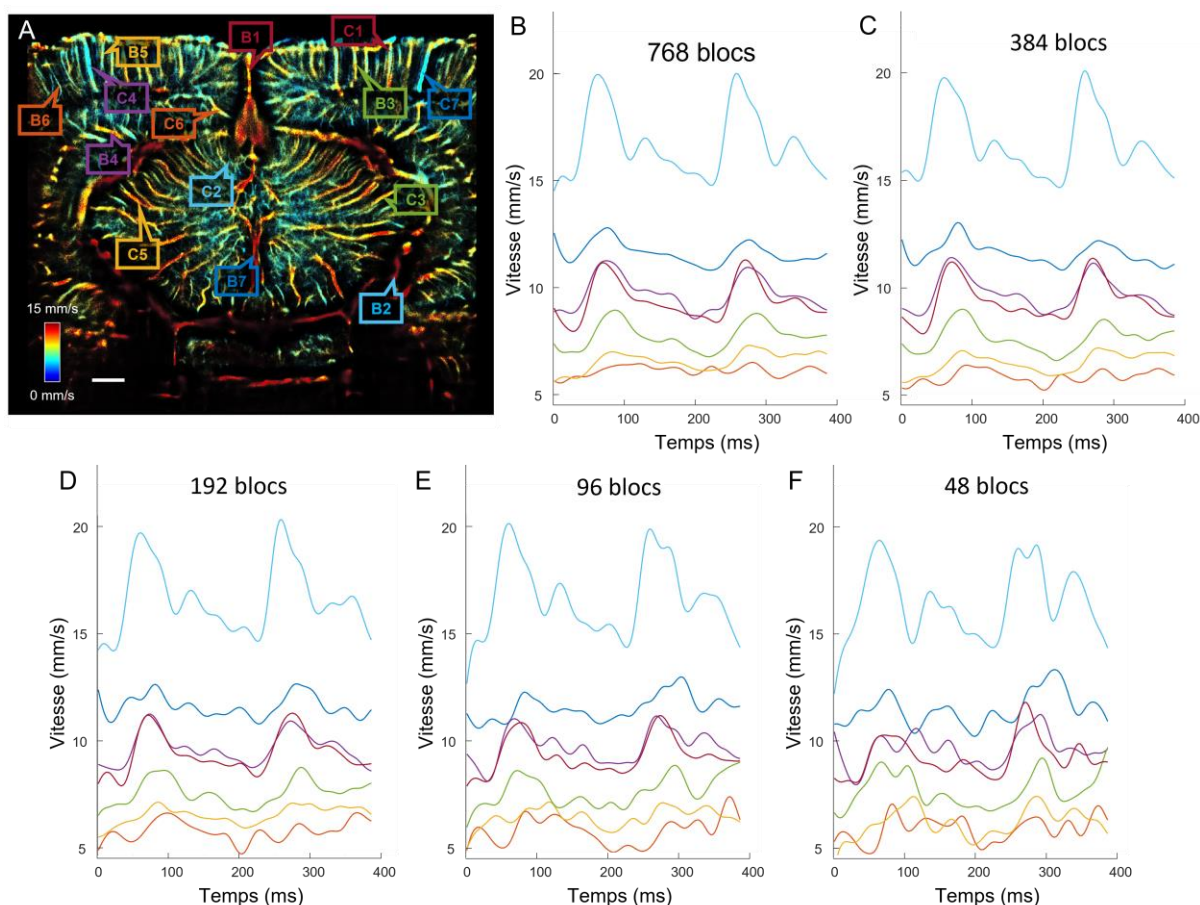


Figure 6.2 Influence de la quantité de microbulles sur la mesure de la pulsativité.

A. Carte de vitesse moyenne dans le cerveau de rat issue de l'article (**Chapitre 6**) ;
 B-F. Évolution de la vitesse au cours du temps pour différents vaisseaux sélectionnés dans l'ensemble du cerveau, en conservant tous les blocs (B), un bloc sur 2 (C), un sur 4 (D), un sur 8 (E) et un sur 16 (F). Figure (A) adaptée de [138]

6.3 Corrélation avec la PSF

Les différentes étapes du traitement des données présentées dans l'article 1 ont été effectuées, mais sans la corrélation avec la PSF. La carte de densité de microbulles obtenue, de même que deux exemples de mesure de la pulsativité dans de petits vaisseaux, sont présentés à la **Figure 6.3**. La dynamique des deux cartes est la même (entre 0 et 500 microbulles par pixel de 10 μm).

On remarque que les interactions multiples ont été supprimées grâce à la corrélation avec la PSF, faisant ainsi ressortir les microvaisseaux (notamment en profondeur). Le nombre de microbulles détectées par exemple dans les vaisseaux du cortex est globalement le même dans les deux méthodes (vaisseau B3), et permet d'obtenir des courbes de pulsativité équivalentes. En profondeur cependant, le faible nombre de microbulles détectées dans le vaisseau B8 empêche d'estimer sa pulsativité dans les données sans corrélation avec la PSF, tandis qu'avec la corrélation avec la PSF, on remarque bien une pulsativité faible, avec deux maxima bien distincts (flèches rouges).

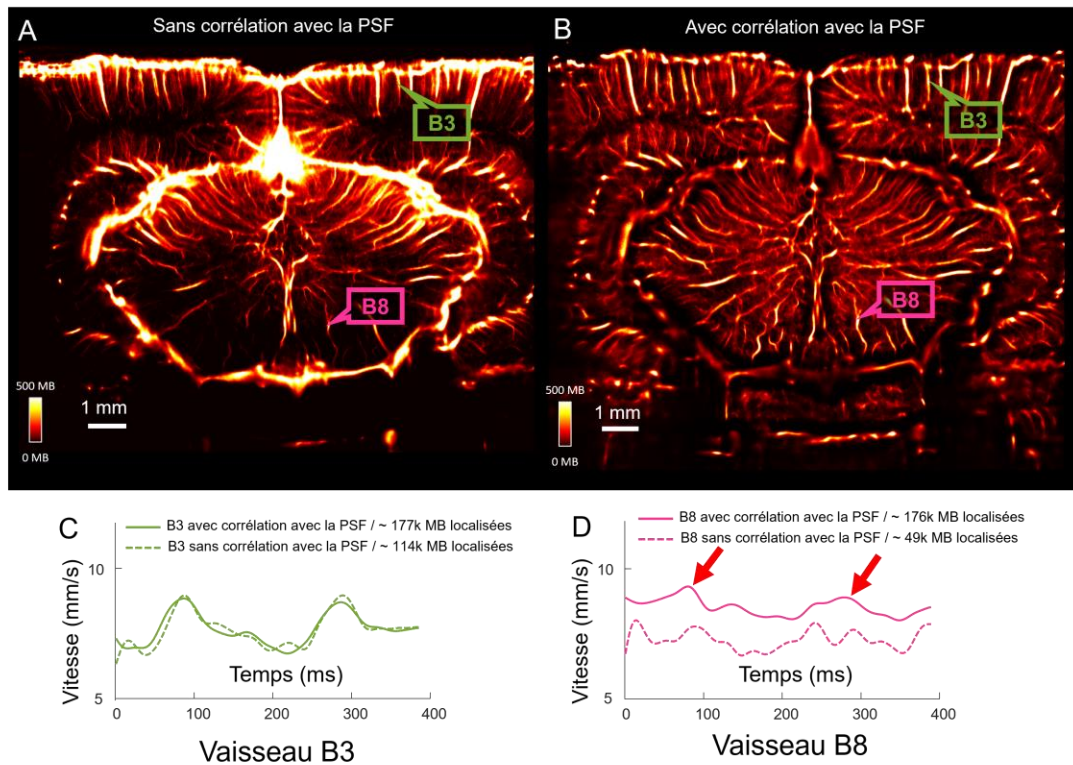


Figure 6.3 Influence de la corrélation avec la PSF sur la mesure de la pulsativité.

A. Carte de densité de microbulles dans le cerveau de rat, sans appliquer la corrélation avec la PSF ; B. Carte de densité dans le cerveau de rat avec application de la corrélation avec la PSF ; C/D. Évolution de la vitesse au cours du temps pour deux vaisseaux sélectionnés dans le cortex (B3, figure C) et en profondeur (B8, figure D), avec et sans corrélation avec la PSF.

Figure (B) adaptée de [138]

6.4 Correction de mouvement

Il est à noter que les étapes de traitement des données présentées dans l'article ne présentent pas de correction de mouvement. Un tel algorithme pourrait cependant permettre d'améliorer la résolution des cartes de densité et donc, ultimement, d'améliorer les mesures de pulsatilité.

Nous avons implémenté un algorithme de correction de mouvement permettant de recalibrer tous les blocs par rapport à un bloc de référence (celui acquis à la moitié de l'acquisition).

On remarque que la résolution de la carte de densité de microbulles est légèrement améliorée avec la correction de mouvement (MoCo) – voir **Figure 6.4**. Les mesures de pulsatilité sont néanmoins équivalentes avec et sans correction de mouvement (voir **Figure 6.5**).

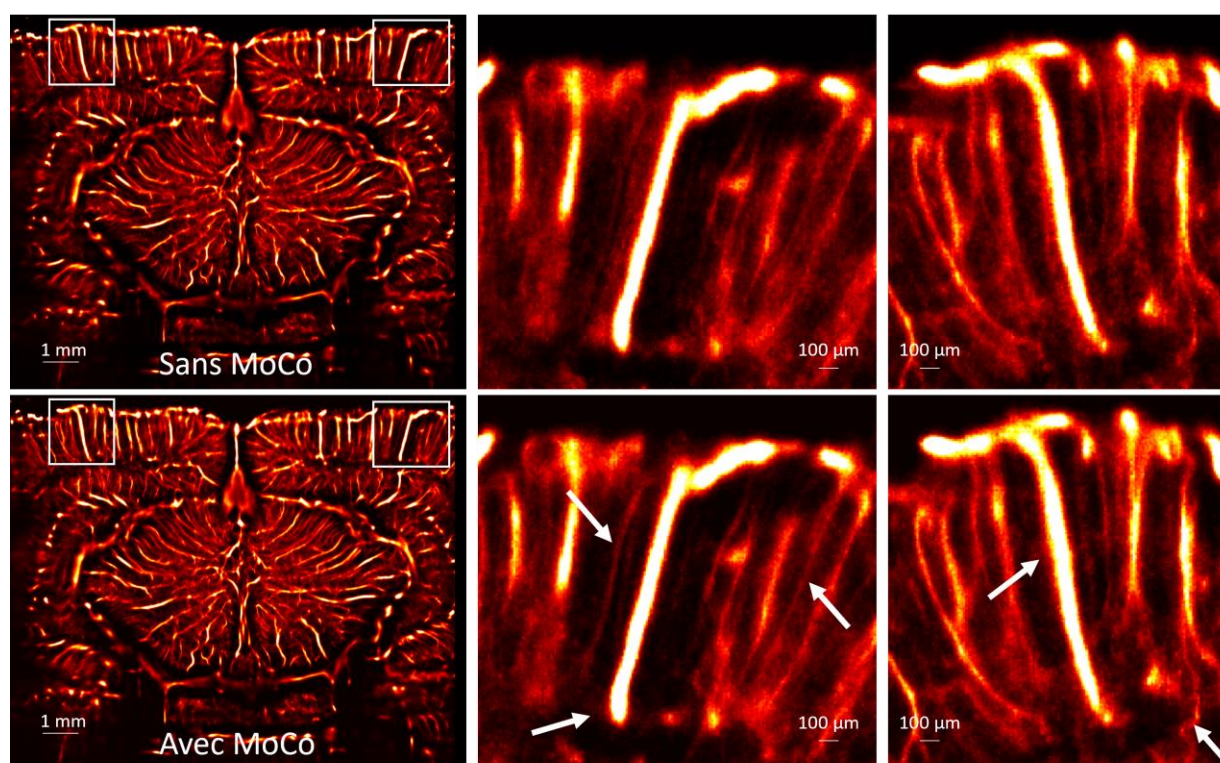


Figure 6.4 Influence de la correction de mouvement (MoCo) sur la résolution des cartes de densité.

En haut : carte de densité sans MoCo, et vues rapprochées sur deux ROI. En bas : carte de densité avec MoCo, et vues rapprochées sur deux ROI. Les flèches blanches désignent les vaisseaux où l'on voit une amélioration de la résolution grâce à la MoCo. Figure (en haut) adaptée de [138]

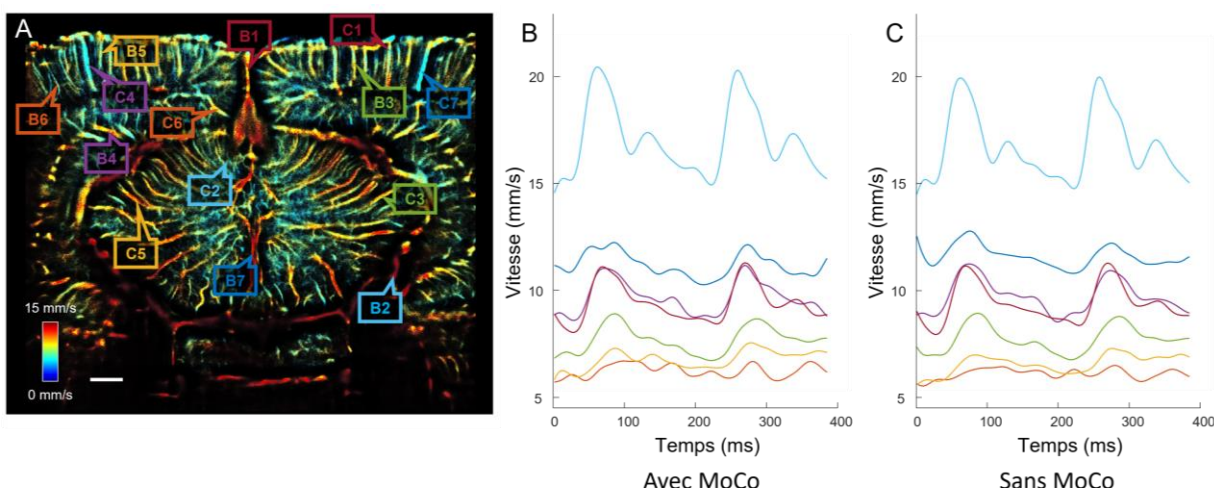


Figure 6.5 Influence de la correction de mouvement (MoCo) sur la mesure de la pulsatilité.

A. Carte de vitesse moyenne dans le cerveau de rat issue de l'article (**Chapitre 6**) ;
 B-C. Évolution de la vitesse au cours du temps pour différents vaisseaux sélectionnés dans l'ensemble du cerveau, avec (B) et sans MoCo (C). Figure (A) adaptée de [138]

6.5 Conclusion

Il existe plusieurs paramètres influençant la mesure de la pulsatilité, comme la concentration ou encore la quantité totale de microbulles (soit la longueur du temps d'acquisition). Si ces paramètres semblent peu influencer les mesures réalisées sur les vaisseaux majeurs du cerveau, où la pulsatilité est forte, ils jouent néanmoins un rôle important dans la mesure de la pulsatilité au niveau des microvaisseaux, où la pulsatilité est plus faible.

La possibilité d'ajouter une correction de mouvement au processus de traitement des images a également été étudiée : si celle-ci semble améliorer la qualité de l'image, les mesures de pulsatilité semblent cependant équivalentes avec et sans correction de mouvement. Cela pourrait être dû au fait que la pulsatilité est mesurée à partir d'une segmentation des vaisseaux, rendant la mesure relativement robuste au mouvement. Mais une telle correction pourrait s'avérer essentielle si l'on souhaite appliquer DULM à d'autres organes présentant de plus amples mouvements, comme au niveau du cœur.

Enfin, nous avons observé que la mesure de la pulsatilité dans les petits vaisseaux nécessite de corréler les données avec la PSF, afin de faire ressortir les microbulles situées dans ces vaisseaux (notamment ceux en profondeur).

CHAPITRE 7 ARTICLE 2 : QUANTITATIVE PULSATILITY MEASUREMENTS USING 3D DYNAMIC ULTRASOUND LOCALIZATION MICROSCOPY

Chloé Bourquin¹, Jonathan Porée¹, Brice Rauby¹, Vincent Perrot¹, Nin Ghigo¹, Hatim Belgharbi^{1,2}, Samuel Bélanger³, Gerardo Ramos-Palacios⁴, Nelson Cortes⁵, Hugo Ladret^{5,6}, Lamyae Ikan⁵, Christian Casanova⁵, Frédéric Lesage^{7,8}, and Jean Provost^{1,8}

1. Department of Engineering Physics, Polytechnique Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada
2. Department of Biomedical Engineering, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA
3. Labeo Technologies Inc., Montréal, QC H3V 1A2, Canada
4. Montreal Neurological Institute, McGill University, Montréal, QC H3A 2B4, Canada
5. School of Optometry, University of Montreal, Montréal, QC H3T 1P1, Canada
6. Institut de Neurosciences de la Timone, UMR 7289, CNRS and Aix-Marseille Université, Marseille, 13005, France
7. Department of Electrical Engineering, Polytechnique Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada
8. Montreal Heart Institute, Montréal, QC H1T 1C8, Canada

Ce Chapitre correspond au second article soumis auprès de *Physics in Medicine & Biology* le 17 juillet 2023. Une version antérieure de cet article est également disponible sur arXiv (<https://arxiv.org/abs/2303.14330>). **Il répond à l’objectif 3 de cette thèse, à savoir le transfert et la validation de la technologie en 3D, pour permettre des mesures dans le volume complet du cerveau et pour en extraire des informations quantitatives sur la dynamique des flux sanguins.**

Les contributions des différents co-auteurs sont détaillées à la **Section 4.6**.

7.1 Abstract

A rise in blood flow velocity variations (i.e., pulsatility) in the brain, caused by the stiffening of upstream arteries, is associated with cognitive impairment and neurodegenerative diseases. The

study of this phenomenon requires brain-wide pulsatility measurements, with large penetration depth and high spatiotemporal resolution. The development of Dynamic Ultrasound Localization Microscopy (DULM), based on ULM, has enabled pulsatility measurements in the rodent brain in 2D. However, 2D imaging accesses only one slice of the brain and measures only 2D-projected and hence biased velocities. Herein, we present 3D DULM: using a single ultrasound scanner at high frame rate (1000-2000 Hz), this method can produce dynamic maps of microbubbles flowing in the bloodstream and extract quantitative pulsatility measurements in the cat brain with craniotomy and in the mouse brain through the skull, showing a wide range of flow hemodynamics in both large and small vessels. We highlighted a decrease in pulsatility along the vascular tree in the cat brain, which could be mapped with ultrasound down to a few tens of micrometers for the first time. We also performed an intra-animal validation of the method by showing consistent measurements between the two sides of the Willis circle in the mouse brain. Our study provides the first step towards a new biomarker that would allow the detection of dynamic abnormalities in microvessels in the brain, which could be linked to early signs of neurodegenerative diseases.

Keywords: Dynamic Ultrasound Localization Microscopy, 3D Brain Imaging, Pulsatility Index, Kalman filtering.

7.2 Introduction

Arterial stiffening and the subsequent rise in pulsatility in downstream microvessels is known to be associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) [1]. AD patients were not only found to have a higher pulsatility index (PI) [2] in cerebral arteries compared to controls [3], but a high pulsatility in non-demented subjects was also linked to a significant cognitive decline a few years later [4]. These findings suggest that a high pulsatility might be involved in the early pathogenesis of some neurodegenerative diseases.

Thus, assessing the blood flow pulsatility in main cerebral arteries with Transcranial Doppler (TCD) ultrasound was proposed as a tool to monitor the progression of neurodegenerative diseases such as AD [5]. However, even at high frequency [6], TCD only allows for pulsatility measurements in major vessels, which may not be sufficient to report on pulse transmission to downstream microvessels and potential damage. Other brain imaging techniques such as optical coherence tomography [7] or two-photon microscopy [8] can also perform pulsatility

measurements in microvessels at the surface of the brain, but do not provide sufficient penetration depth to achieve brain-wide pulsatility measurements.

A new imaging technique was recently developed, called Ultrasound Localization Microscopy (ULM), or sometimes Super-resolution Ultrasound Imaging [9–11]. It consists in injecting microbubbles in the blood stream to follow them in the vascular tree using an ultrasound system. After a few minutes of acquisition, isolated microbubbles are localized with a subwavelength precision and tracked across frames to produce a map of the vasculature with a resolution of approximately 10 μm . ULM was applied in 2D in small animals [12–14] and later in humans to perform angiographies of the brain, kidney, liver and heart [15–18]. More recently, 3D ULM was demonstrated in small animals in several organs or tissues, including the rodent kidney [19] brain [20–23], and heart [24]. In brain studies in particular, 2D ULM was shown to retrieve blood flow parameters such as cerebral vascularity, mean blood velocity and vessel tortuosity in an Alzheimer's mouse model [25], and systolic and diastolic velocities in the human brain [15]. The method was also tested to characterize strokes in the rodent brain, in both 2D [26] and 3D [27]. In silico, it was shown that microbubble tracks in ULM could even contain more information such as the pulsatility [28].

In particular, Dynamic Ultrasound Localization Microscopy (DULM) [29] localizes microbubbles both in space and time within a periodic phenomenon (e.g., heart cycle, or repeated stimuli). The main difference between ULM and DULM is DULM's temporal resolution: after the acquisition, the sequence triggering of DULM allows us to know perform a retrospective analysis of the images to retrieve the position of each frame within the cardiac cycle, leading to a measurement of the velocity variations with a temporal resolution of a few milliseconds. Using DULM, brain-wide pulsatility measurements in microvessels in 2D were shown to be possible in vivo, in a rat brain with craniotomy and a mouse brain through skull and skin [29], along with the detection of functional activation in a rat brain [30]. DULM was also used in the rat heart [31], where it successfully retrieved a pulsatility signal in the microbubbles density variations throughout the cardiac cycles.

Herein, we show that 3D DULM can produce highly resolved dynamic maps of microbubbles flowing in the vasculature at a high frame rate using a single ultrasound scanner, and perform quantitative pulsatility measurements in the cat brain with craniotomy and in the mouse brain

through the skull. In the cat brain, we showed a significant pulsatility attenuation in the vascular tree, from large feeding vessels to downstream smaller ones. An intra-animal validation of the measurements was performed in the mouse brain using the symmetry of the Willis circle. This novel method could be used to better understand blood flow dynamics in the vascular tree, by performing deep pulsatility measurements in the brain.

7.3 Methods

7.3.1 In vivo experiments

7.3.1.1 Ethics

All surgical and experimental procedures were undertaken according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Ethics Committee of the University of Montreal (CDEA 19-008 and 19-064).

7.3.1.2 Animal's preparation

Cat: detailed procedures are described in [32]. Before surgery, a 3.64-kg female cat received a solution of atropine (0.1 mg/kg) and acepromazine (Atravet, 1 mg/kg) subcutaneously. Anesthesia was induced with 3.5% isoflurane in a 50:50 gas mixture of O₂ and N₂O. A catheter was placed in the cephalic vein to provide intravenous access. A tracheotomy was performed prior to the transfer of the animal to the stereotaxic apparatus. Following anesthetic induction, isoflurane concentration was 1.5% during surgical procedures. During recording sessions, the anesthesia was changed to halothane (0.5–0.8%) in a 30:70 gas mixture of O₂ and N₂O. An intravenous bolus injection of 2% gallamine triethiodide was administered to induce muscular paralysis, and subsequently, the animal was placed under artificial ventilation. A 1:1 solution of 2% gallamine triethiodide (10 mg/kg/h) in 5% of dextrose in lactated Ringer's solution was continuously administered intravenously. Expired levels of CO₂ were maintained between 35 and 40 mmHg by adjusting the tidal volume and respiratory rate. Temperature, SpO₂ and heart rate were monitored during the whole experiment. 3D in vivo DULM imaging of the cat brain was performed after a three-day optical imaging experiment, during which the animal was immobilized and under anesthesia (data not shown for the current study). Just before the ultrasound imaging, a 15 × 15 mm² craniotomy window was performed on the contralateral side of the one used for optical imaging procedures, in

order to mitigate any potential harm to the associated tissue, despite the absence of any discernibly injury. A durotomy was done to access the brain surface, where ultrasound gel was applied. The animal's heart rate was monitored throughout the procedure (Labeo Technologies Inc., QC, Canada). A 2-mL solution of 1 mL of microbubbles (1.2×10^{10} microbubbles per milliliter, Definity, Lantheus Medical Imaging, MA, USA) diluted in 1 mL of saline was injected as a bolus in the paw using a catheter. To minimize any potential complication, the catheter was placed in the animal's paw opposite to the one used for the gallamine and lactated Ringer's solutions administration.

Mouse: After sedation with chlorprothixene (5 mg/kg), a 16-week-old female mouse weighting 24 g was anesthetized with urethane (1.0–1.5 g/kg, i.p., at 10% w/v in saline). Atropine (0.05 mg/kg) was also injected to reduce secretions in the airway. A tracheotomy was performed, which is recommended when using urethane [33]. The animal was placed on a platform (Labeo Technologies Inc., QC, Canada), where temperature and heart rate were monitored throughout the experiment. Before exposing the skull, a subcutaneous injection of lidocaine 2% was applied. The skin above the skull was removed, to ensure that the images would not be degraded by unshaved hair or air bubbles on the skin. Then, ultrasound gel was applied on the skull surface. A 50- μ L solution containing 25 μ L of microbubbles in solution (1.2×10^{10} microbubbles per milliliter, Definity, Lantheus Medical Imaging, MA, USA) and 25 μ L of saline was injected as a bolus in the tail vein.

7.3.1.3 Ultrasound acquisition

3D in vivo ultrasound imaging of both species (see **Table 7.1**) was performed using an 2D matrix probe centered at 7.81 MHz with a 60 % bandwidth (Verasonics, WA, USA). This probe is a 32-by-35 matrix array, but the 9th, 17th and 25th lines were not connected, resulting in a total number of active elements equal to 1024 (32×32 elements). Since it has a 0.3-mm pitch, the transmitted frequency was set at 6 MHz to reduce side lobes. The pulse length was set to 2 cycles for the mouse and 4 cycles for the cat, to maintain a good contrast in the cat's brain despite a large imaging depth. The probe was placed at the surface of the mouse's skull (resp. the cat's brain) and connected to a programmable ultrafast ultrasound system (Vantage 256, Verasonics, WA, USA). As it is described in [21], driving a 2D-matrix array with a single ultrasound scanner requires to adopt a multiplexing approach. In our sequence, each frame was completed with a succession of four

Transmits/Receives: for one Transmit/Receive, we sent plane waves at angle 0° with all 1024 elements of the probe and received them with a sub-aperture of 256 elements ($\frac{1}{4}$ of the probe). We primarily designed this sequence to image the cat brain and keep a high frame rate (1000 Hz) despite a high penetration depth (37 mm). The sequence was then adapted for the mouse brain, in which the 19-mm depth allowed for a frame rate of 2000 Hz.

Both animals were imaged using an ultrasound sequence synchronized with the ECG. In the cat brain, frames were acquired in groups of 600 during 15 min; in the mouse brain, frames were acquired in groups of 400 during 17 min. The sequence included pauses for data transfer and saving between each group. Without taking the pauses into account, the effective acquisition time was about 3 min for the mouse brain and 8 min for the cat brain. The first frame of each group started when the monitoring platform (Labeo Technologies Inc., QC, Canada) detected an R-wave in the ECG. Such a gated sequence allowed us to record almost two cardiac cycles for each group (1.6 cardiac cycles in the cat and 1.7 cardiac cycles in the mouse).

Table 7.1 3D ultrasound imaging sequence gated on the ECG

Sequence parameters	Cat brain	Mouse brain
Probe	2D matrix probe	
Bandwidth	60 %	
Active elements	1024 (32 x 32)	
Pitch (mm)	0.3	
Center frequency (MHz)	7.81	
Transmitted frequency (MHz)	6	
Sampling	100 %	
Duty cycle	67 %	
Voltage (V)	30	
# of groups acquired	800	
# of transmits / receives	4 per frame at angle 0°	
Mechanical index	0.09	0.09
# of cycles	4	2
Frame rate (Hz)	1000	2000
Penetration depth (mm)	37	19
# of frames acquired per group	600	400
Heart rate (bpm)	160	504
# of cardiac cycles per group	1.6	1.7
Total acquisition time (min)	15	17
Effective acquisition time (min)	8	3

7.3.2 Data processing

7.3.2.1 DULM processing

As in [29], after a Delay-and-Sum (DAS) beamforming [34] on a $\lambda/2$ isotropic grid for the cat (resp. $\lambda/3$ for the mouse), the noise was normalized by dividing each pixel by the square root of the number of channels contributing to each pixel [35]. We then used a Singular Value Decomposition (SVD) filter on each group (600 frames for the cat and 400 frames for the mouse), to remove tissue by setting the first 20 singular values to zero. To enhance the microbubbles' signal, the images were correlated with the Point Spread Function (PSF) of the system, which was simulated using an in-house GPU implementation of the SIMUS simulation software [36]. The microbubbles were localized using a Gaussian least square fitting [37], as a 1D fit in each direction (x,y,z). 1024 local maxima were detected in each frame, and only the ones with a high correlation coefficient (> 0.2 in the mouse brain and > 0.4 in the cat brain) were kept as microbubbles for the following tracking algorithm. All these pre-processing algorithms (beamforming, tissue cancellation and localization, see **Figure 7.1**) were implemented on MATLAB 2021a (The MathWorks, Inc., Natick, MA).

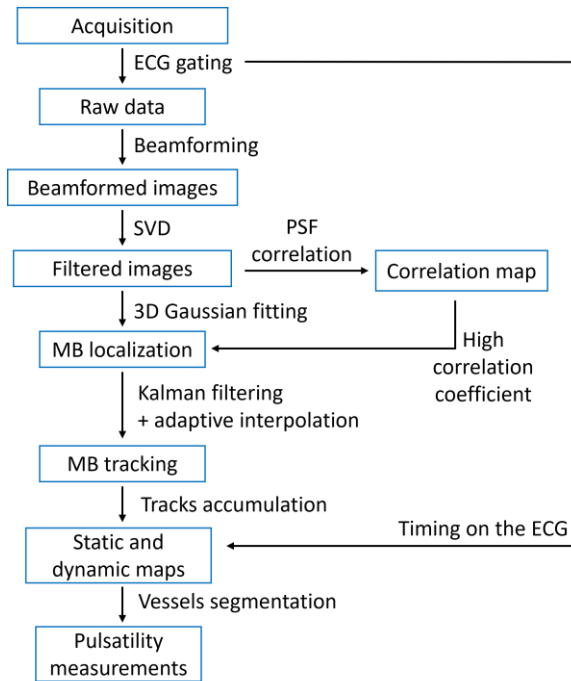


Figure 7.1 3D DULM pipeline (see Methods).

SVD: Singular Value Decomposition filtering, PSF: Point Spread Function, MB: microbubbles.

A linear Kalman filter was then used to track the microbubbles. We implemented an algorithm based on the one described in [38] and adapted it to 3D on Python 3.9, using a constant velocity model. For each new microbubble, we allocated a new Kalman filter to predict its position and velocity in the next frame. The prediction was then updated in the following frames, depending on the previous positions and velocities. As mentioned in [38], we then used an adaptive interpolation to bridge the gaps in the tracks between distant microbubbles: the interpolation factor was set to obtain, in each track, a maximum distance between two consecutive microbubbles of $\sim 2 \mu\text{m}$ in the mouse brain, and $\sim 5 \mu\text{m}$ in the cat brain. This approach enabled the recovery of microbubbles positions, even in vessels where only a few microbubbles were detected, and to follow microbubbles with different behaviors (fast, slow, accelerating, etc.) from one frame to another, to finally calculate their velocity. No other constraint, e.g., on the microbubbles' trajectory or acceleration, were used.

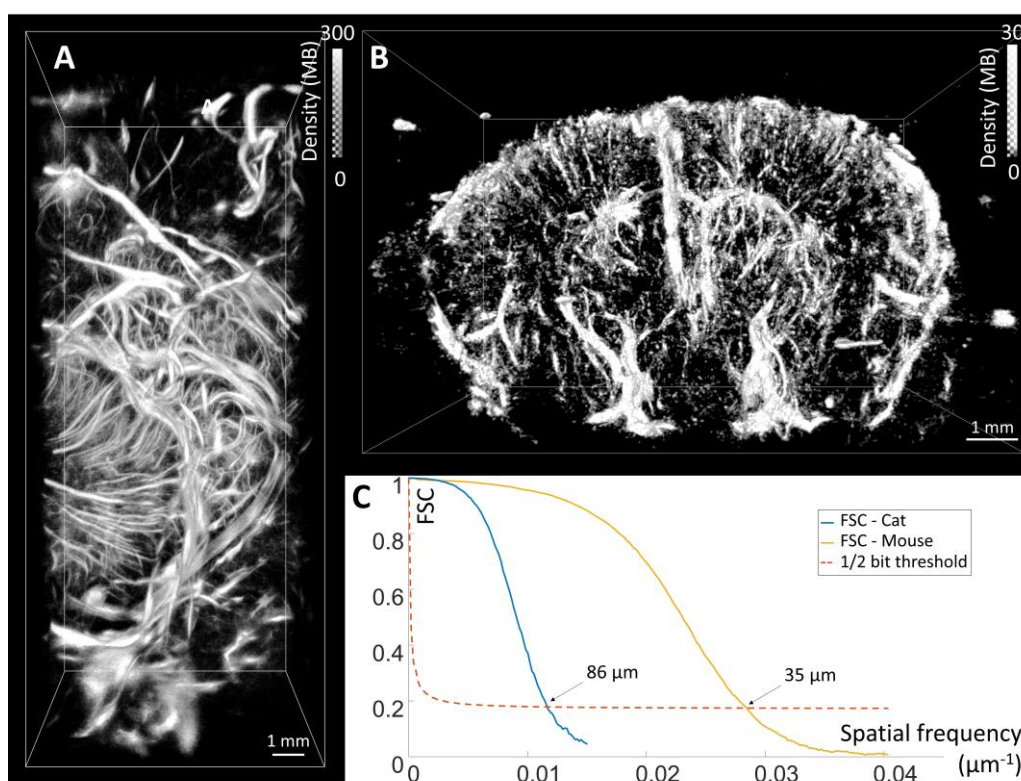


Figure 7.2 Resolution measurements based on the Fourier Shell Correlation (FSC).

A. Static density map of the cat brain. B. Static density map of the mouse brain. C. FSC calculation. The measured resolutions are 86 μm in the cat brain and 35 μm in the mouse brain.

7.3.2.2 Dynamic maps

As described in [29], after tracking, the microbubbles' positions and velocities were averaged across all the groups according to their timing in each ECG-gated acquisition. By doing so, we obtained dynamic maps of the microbubbles flowing in the blood stream, lasting more than one cardiac cycle. Dynamic maps were further processed as videos using the Amira 3D software 2021.2 (Thermo Fisher) (e.g., Supplementary videos 1 and 2).

7.3.2.3 Resolution calculation

For analysis, the microbubbles' positions were accumulated to compute a static density map (**Figure 7.2 (A) and (B)**), corresponding to the sum of all the microbubbles detected in each pixel during the whole acquisition. These static maps were used for resolution estimation and vessel segmentation, which was used for the quantitative pulsatility analysis (see below).

The 3D spatial resolution was calculated using the Fourier Shell Correlation (FSC), also known in 2D as the Fourier Ring Correlation (FRC), which is a tool used to estimate spatial resolution in Single Molecule Localization Microscopy (<https://github.com/bionanoimaging/cellSTORM-MATLAB/> [39]). It was recently introduced to calculate the resolution in ULM in 2D [40] and in 3D [41].

For both species, we randomly separated the tracks across all the buffers into two datasets Im_1 and Im_2 , to obtain two independent reconstructions of the same brain volume. After calculating their spectra F_1 and F_2 (corresponding to shells in the Fourier space), we calculated the FSC (**Figure 7.2 (C)**) as the normalized cross-correlation coefficient between F_1 and F_2 , along all the voxels r_i located at the radius r :

$$FSC(r) = \frac{\sum_{r_i \in r} F_1(r_i) \cdot F_2(r_i)^*}{\sqrt{\sum_{r_i \in r} |F_1(r_i)|^2 \cdot \sum_{r_i \in r} |F_2(r_i)|^2}} \quad (7-1)$$

The resolution was estimated as the intersection between the FSC curve and the 1/2-bit-threshold curve, as a function of r . This value was compared with the axial and lateral resolutions in diffraction-limited conventional imaging, where the axial resolution is approximately equal to half

of the spatial pulse length (i.e., λ in the mouse brain and 2λ in the cat brain) and the lateral resolution LR is given by:

$$LR = \frac{\lambda f}{d} \quad (7-2)$$

where d is the aperture and f the focal distance (see **Table 7.1**). Here, the lateral resolution was thus approximately equal to the axial resolution: $\sim 2\lambda$ (i.e., $513 \mu\text{m}$ at 6 MHz) in the cat brain, and $\sim \lambda$ (i.e., $257 \mu\text{m}$ at 6 MHz) in the mouse brain.

7.3.2.4 Segmentation and pulsatility measurements

Vessels were segmented in the static maps using a Hessian filter. For each vessel, the velocities of all the microbubbles detected within a segmented vessel and within a time interval were averaged. High frequencies in the velocity signal were filtered out (moving average of 100 values in the cat brain, or 75 values in the mouse brain, which corresponds to a frequency cutoff of 10 Hz and 26.67 Hz respectively). The resulting filtered signal was sufficient to sample the cardiac cycles of both species, which had a frequency of 2.67 Hz for the cat and 8.4 Hz for the mouse. Because of this filtering step, the temporal resolution of the velocity variations presented in **Figure 7.3C**, **Figure 7.4C** and **Figure 7.5B** are 100 ms in the cat brain and 37 ms in the mouse brain.

The pulsatility index (PI) [2] was computed as the difference between the peak systolic velocity (PSV) and the end-diastolic velocity (EDV), divided by the mean flow velocity (MFV):

$$PI = \frac{PSV - EDV}{MFV} \quad (7-3)$$

7.3.2.5 Willis circle analysis

In the mouse brain static map (**Figure 7.6 (A)**), the shape of the Willis circle structure could be recognized. This symmetrical structure corresponds to the joining and the branching of several main arteries, in the left and the right hemispheres: the posterior communicating artery (PComA), the internal carotid artery (ICA), the anterior cerebral artery (ACA) and the middle cerebral artery (MCA). Some sections of these arteries were segmented as described above using a Hessian filter, to compute their velocity variations and pulsatility indices.

7.4 Results

7.4.1 Resolution calculation

Static density maps obtained after processing can be observed in **Figure 7.2 (A)** and **(B)**.

After calculating the FSC for both species, the resolution in these maps was estimated at 86 μm in the cat brain and 35 μm in the mouse brain (**Figure 7.2 (C)**), which correspond to $\lambda/3$ and $\lambda/7$ respectively ($\lambda \sim 257 \mu\text{m}$ at 6 MHz).

7.4.2 Qualitative pulsatility measurements

Dynamic maps generated by 3D DULM (Supplementary videos 1 and 2) show microbubbles flowing in the bloodstream in the brain in 3D and their velocity variations during the cardiac cycles. The pulsatility can be qualitatively observed in the videos during the cardiac cycles in some large and small vessels shown by the arrows, in both animals.

Figure 7.3 (A) and **Figure 7.4 (A)** show an example of the 3D velocity map obtained at $t = 120$ ms in the cat brain and $t = 25$ ms in the mouse brain. Two regions of interest (ROI) were extracted from these maps and displayed in **Figure 7.3 (B)** and **Figure 7.4 (B)** at different time points of the cardiac cycles. Velocity variations could be observed in both large vessels (for example, A1 and A4 in both species), as well as in small vessels (for example, A2 in both species).

7.4.3 Quantitative pulsatility measurements

A few vessels with different diameters and mean velocities were segmented from these ROI, in the cat and the mouse brains, and their velocity variation through time was calculated (**Figure 7.3 (C)** and **Figure 7.4 (C)**). By doing so, we obtained an overview of the performance of the method applied to different flow patterns: large and small vessels, and fast and slow flow. Blood flow pulsatility was quantified by calculating the PI [2] (see Methods). Examples of quantitative pulsatility measurements that could be performed in these vessels are shown in **Table 7.2** and **Table 7.3**. The number of microbubble events, i.e., the sum of the microbubbles detected across all the frames, was also given for each vessel.

A reproducible and synchronized pulsatility pattern was observed in both species, even in microvessels with a diameter close to the resolution provided by the FSC calculation (A2: $\varnothing 46 \mu\text{m}$

in the mouse, A2: $\varnothing$ 96 μm in the cat). The velocity variations were coherent with the heart cycle duration of both animals: within the 200-ms cine-loop produced in the mouse brain, we expected to measure 1.7 cardiac cycles (resp. 1.6 cardiac cycles in the cat brain, for a 600-ms cine-loop). Some microvessels also presented a flat velocity variations pattern, with a low PI, such as A3 ($\varnothing$ 38 μm , PI: 0.24) in the mouse brain.

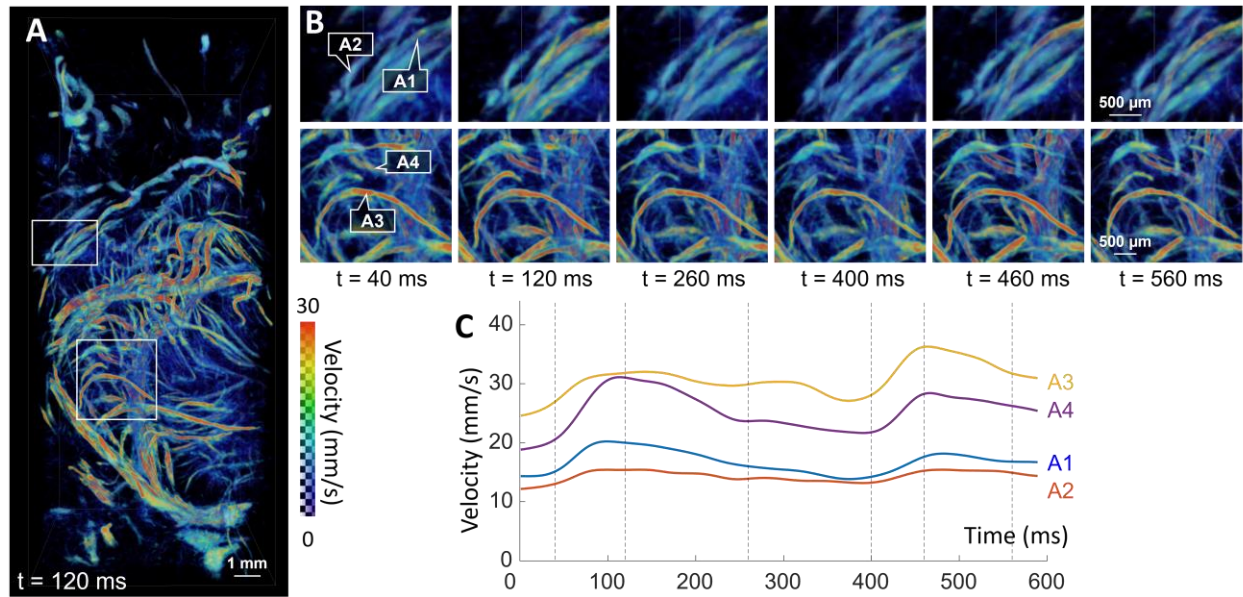


Figure 7.3 Pulsatility measurements performed in the 3D volume of the cat brain.

A. Projection of the 3D velocity map of the cat brain, taken at $t = 120$ ms during the acquisition.

Two regions of interest (ROI) were selected in the brain. B. Qualitative velocity variations observed in selected vessels (A1-4) observed in the ROI selected in A, at different time points during the acquisition. C. Velocity variations over time (600 ms) of vessels A1-4. Vertical lines correspond to the timing of the images displayed in B.

Table 7.2 Examples of Pulsatility Index measurements performed by 3D DULM in the cat brain. MB: microbubbles, PI: pulsatility index.

Vessel	Number of MB events detected	Diameter $\varnothing$ (μm)	Length (mm)	Mean velocity (mm/s)	Pulsatility index
A1	2,153k	212	14	16.81	0.30
A2	734k	96	16	14.35	0.19
A3	1,552k	154	18	30.80	0.27
A4	1,237k	156	9	25.41	0.37

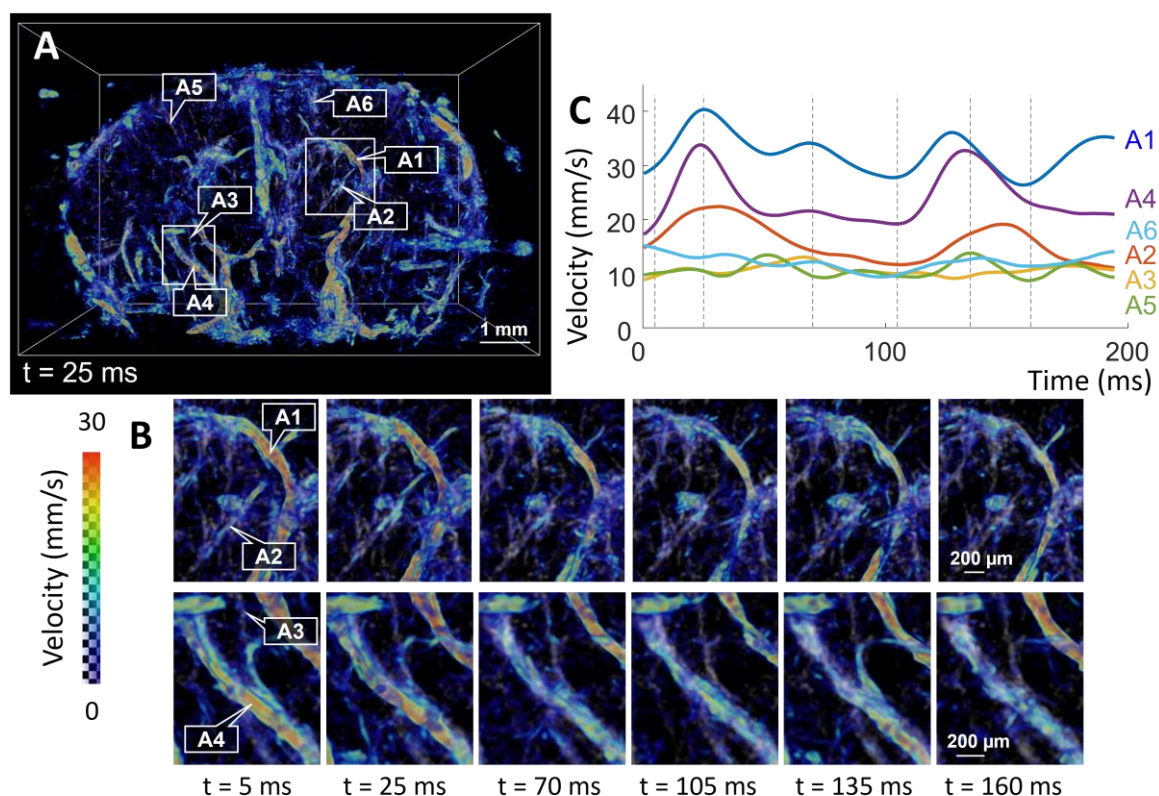


Figure 7.4 Pulsatility measurements performed in the 3D volume of the mouse brain.

A. Projection of the 3D velocity map of the mouse brain, taken at $t = 25$ ms during the acquisition. Two regions of interest (ROI) were selected in the brain. B. Qualitative velocity variations observed in selected vessels (A1-6) observed in the ROI selected in A, at different time points during the acquisition. C. Velocity variations over time (200 ms) of vessels A1-6. Vertical lines correspond to the timing of the ROI displayed in B.

Table 7.3 Examples of Pulsatility Index measurements performed by 3D DULM in the mouse brain. MB: microbubbles, PI: pulsatility index

Vessel	Number of MB events detected	Diameter $\varnothing$ (μ m)	Length (mm)	Mean velocity (mm/s)	Pulsatility index
A1	454k	91	4.2	32.13	0.31
A2	85k	46	1.7	15.95	0.46
A3	15k	38	0.9	10.84	0.24
A4	294k	113	4.1	23.81	0.58
A5	13k	58	0.4	10.84	0.42
A6	57k	86	1.0	12.20	0.31

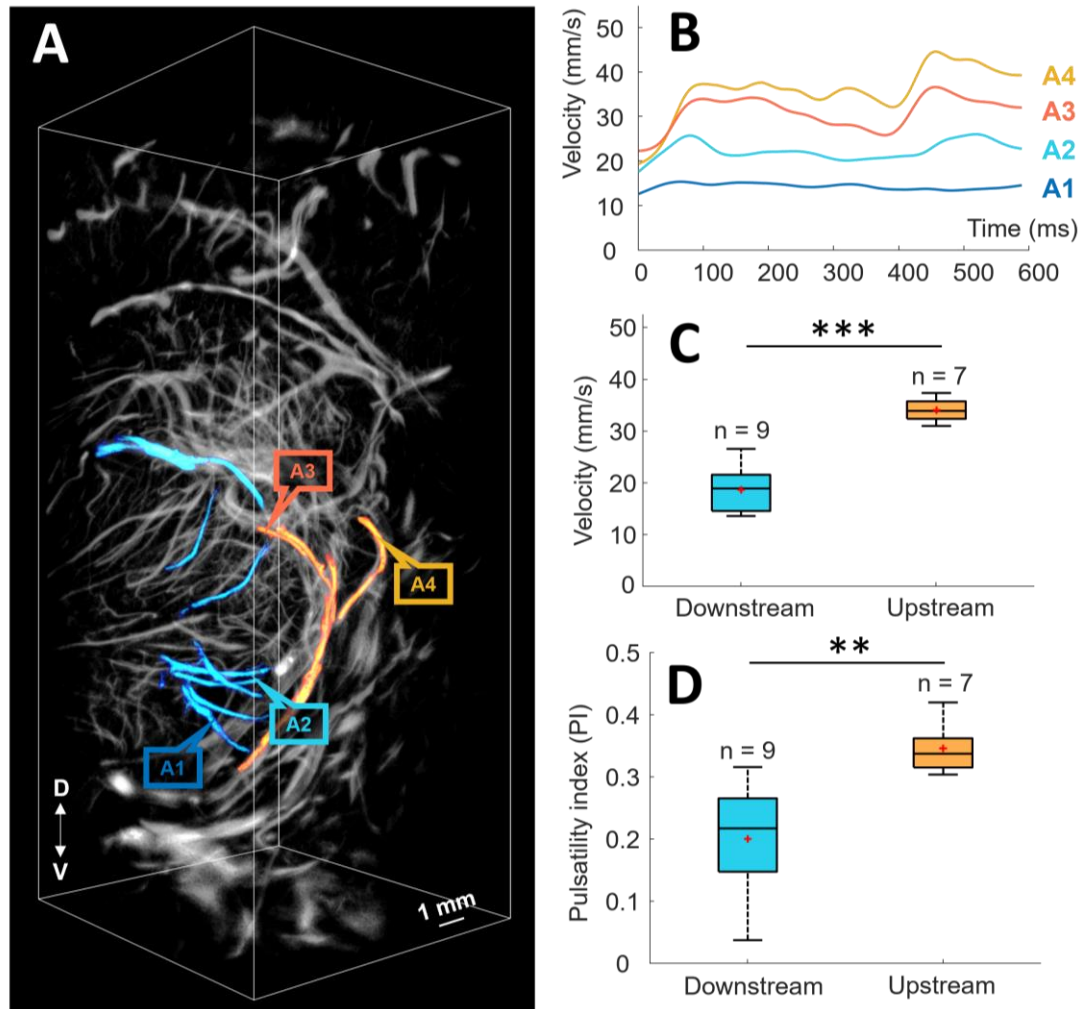


Figure 7.5 Pulsatility measurements performed in the cat brain.

A: Static density map with vessel labels. A3 and A4 correspond to upstream feeding vessels, and A1 and A2 correspond to downstream vessels. B: Velocity variations over time (600 ms) in vessels. C. Comparison of mean velocities between upstream feeding vessels (orange) and downstream vessels (blue) ($P < 0.001$, Student t-test). D. Comparison of PI between upstream feeding vessels (orange) and downstream vessels (blue) ($P < 0.01$, Student t-test). $n=9$ and $n=7$ correspond to the number of downstream (resp. upstream) vessels segmented within the same animal.

In some vessels, the presence of a dicrotic notch was observed, corresponding to a decrease in arterial pressure occurring immediately after the systole. In the cat brain, this dicrotic notch could be observed in vessels A3 and A4; in the mouse brain, it could be observed in vessels A1 and A4.

In the mouse brain, we could also measure different pulsatility indices in some cortical vessels, such as in vessels A5 (PI: 0.42) and A6 (PI: 0.31): A5 has two velocity maxima, whereas A6 presents a flat velocity variations pattern.

7.4.4 Pulsatility and velocity attenuations along the vascular tree

Large upstream feeding vessels and their subsequent downstream vessels were segmented in the 3D volume of the cat brain (**Figure 7.5 (A)**). Pulsatility measurements were performed in 9 downstream vessels and 7 upstream ones. Examples of the velocity variations in time obtained in these vessels can be observed in **Figure 7.5 (B)**.

In **Figure 7.5 (B)**, in upstream vessels (A3 and A4), a strong, synchronized, and consistent pulsatility pattern can be observed in the velocity variations. In downstream vessel A2, a smaller but still noticeable pulsatility pattern can be seen. In A1, no pulsatility pattern can be observed.

Mean velocity and PI were calculated for both groups of vessels (upstream and downstream) in **Figure 7.5 (C, D)**. A significant difference between the two groups, in both, mean velocity ($P < 0.001$) and PI ($P < 0.01$), was observed.

7.4.5 Intra-animal validation in the Willis circle

Several main arteries belonging to the symmetrical structure of the Willis circle were recognized in the mouse brain and were segmented (**Figure 7.6 (A, B)**). We found similar velocity waveforms for each vessel between the two sides (left and right) of the Willis circle, with a high pulsatility index and a high velocity, as shown for example in **Figure 7.6 (C)** for the PComA 1 vessel section (represented in dark blue in **Figure 7.6 (A, B)**).

The pulsatility and mean velocity measurements between the two sides of the brain were compared (**Figure 7.6 (D)**): the PI of all the left vessels was found to be 0.35 ± 0.06 , and 0.35 ± 0.08 for the right vessels; the mean velocity was found to be 50 ± 6 mm/s for the left and 47 ± 5 mm/s for the right. A Student t-test was performed, and the differences in PI and mean velocity between the left and the right sides of the Willis circle were found to be non-significant (resp. $P = 0.93$ and $P = 0.42$).

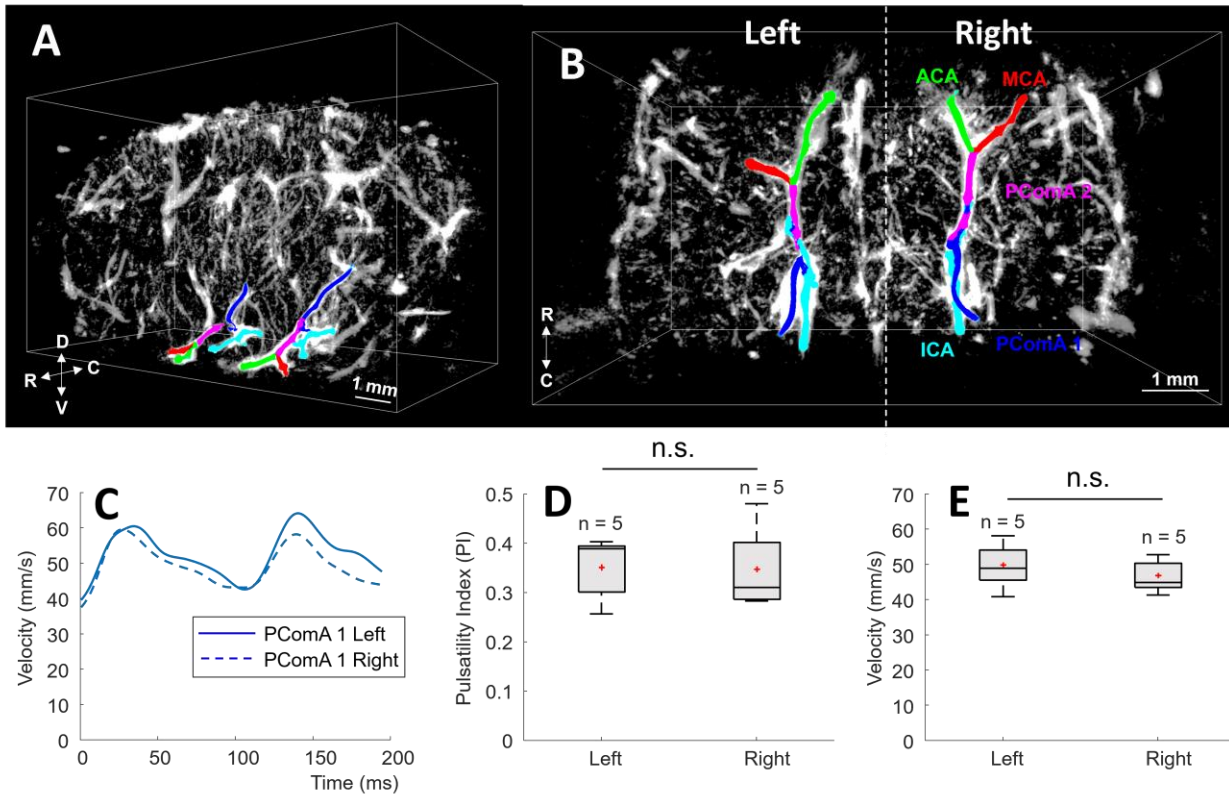


Figure 7.6 Pulsatility measurements in the Willis circle.

A/B. Identification and segmentation of 5 vessels sections (PComA 1, ICA, PComA 2, ACA and MCA) in both sides of the Willis circle (left and right). C. Velocity variations in time (200 ms) for the PComA 1 vessel section (left and right). D. Mean velocities measured in the 5 vessel sections identified in both sides of the Willis circle (Student t-test, $P = 0.93$). E. Pulsatility indices of these vessel sections (Student t-test, $P = 0.42$). $n=5$ correspond to the number of vessel sections segmented in both sides of the Willis circle, within the same animal.

7.5 Discussion

In this study, 3D Dynamic Ultrasound Localization Microscopy (3D DULM) was used to image blood velocity as a function of time and to measure pulsatility indices in a cat brain and a mouse brain, with and without craniotomy, respectively. More particularly, DULM could map the cat's brain vasculature down to a few tens of micrometers for the first time.

With 3D DULM, not only highly resolved maps of the brain vasculature were produced (see **Figure 7.2**), but also cine-loops of flowing microbubbles in the entire volume of the brain, reflecting the

blood flow variations during the cardiac cycles. An example of these cine-loops was provided in Supplementary videos 1 and 2, in both animals.

This qualitative observation was confirmed with quantitative measurements: in **Figure 7.3** and **Figure 7.4**, velocity variations over time and PI calculations were extracted for different vessels in the brain, including in large vessels and in cortical ones, and a pulsatile pattern synchronized with the cardiac rhythm of the animals was recognized in the velocity waveforms, even for slow flows and small vessels.

In the cat brain (**Figure 7.5**), we observed a significant attenuation of the mean velocity and the pulsatility index along the vascular tree, between upstream feeding vessels and downstream subsequent ones. This result is consistent with the cerebral hemodynamics: as the cerebral arteries branch progressively, the resistance increases, leading to a dampening of the pulsatility before it reaches the microcirculation [42].

In **Figure 7.6**, the main arteries in the mouse Willis circle were identified. Their mean velocities and PI were measured and found to be high and reproducible between the left and the right sides of the brain, which is consistent with the literature [42], [43].

3D DULM could provide both qualitative and quantitative information on the blood flow pulsatility in the brain, with 1) dynamic 3D maps of microbubbles circulating in the brain, reflecting changes in blood flow during the cardiac cycle; 2) the measurement of velocity variations over time in any observable vessel in the vascular tree, with a < 100 -ms temporal resolution and a sub-wavelength spatial resolution ($< 100 \mu\text{m}$, i.e. $\lambda/2.5$); and 3) the PI estimation in these vessels, to quantify the pulsatility. Until now, in small animals, the pulsatility could only be quantified using TCD or MRI in the carotid [44], in the Willis circle [45–49], in small vessels at the surface of the brain [7,8], or in a 2D section of the brain using 2D DULM [29]. With 3D DULM, we were able to extract pulsatility measurements in a large range of vessels along the cerebral vascular tree, in depth, in 3D, with a high spatiotemporal resolution. With this technique, dynamic measurements could be extracted in a range of vessels that were inaccessible for brain imaging modalities before. Such a modality could be used for example to study the pulsatility propagation in the brain vasculature and to better understand its impact on microvessels. This technique could also be used in other organs such as the kidney, where dynamic blood flow parameters such as the pulsatility are also important metrics to monitor [50,51].

The study presented herein is however not without limitations.

This study has been performed on two species, but only in one animal each (one cat and one mouse). It is a proof-of-concept that one can measure the pulsatility in the vascular tree using 3D DULM; but a study on a larger number of animals would be necessary to validate its reproducibility, especially since the Willis circle anatomy may vary from one animal to another [52].

To our knowledge, no in vivo pulsatility measurements were performed deep in the brain in the cat brain before, which make them difficult to compare with the literature. In the rodent brain, some studies were done in the Willis circle, e.g., in fetal mice brains using Ultrasound Biomicroscopy (UBM) [49] and in mice and rat brains using TCD [45–47] or MRI [48]. In adult mice studies, the measurements or simulations performed by different methods show a large range of maximal, minimal and mean velocity values in the Willis circle arteries, between ~50 and 200 mm/s. The values we obtained in the Willis circle are on the lower end of that range (50 ± 6 mm/s for the left and 47 ± 5 mm/s for the right hemisphere). Another study in 3D ULM reported for example a maximal velocity of 64 mm/s in the rat brain [23], while studies in TCD this animal model show peak systolic velocities up to 81.6 cm/s [45]. Future work should be done to better understand ULM and DULM limitations in terms of hemodynamic quantification.

This study was conducted using experimental procedures primarily designed to study the functional activity of the visual cortex, which rely on urethane as an anesthetic. Indeed, other anesthetics such as isoflurane can induce large modifications in the blood flow due to their vasodilating effects [53], whereas urethane is known to have a smaller impact [54]. But urethane is lethal, so it cannot be used in experiments where animals are followed for several days, weeks or months. The experiments were also invasive for both animals (craniotomy in the cat and skin removal in the mouse) and were done after a 3-day optical procedure on the cat, which may have affected the pulsatility measurements compared to what could have been done non-invasively on awaken animals.

Our experimental set up relied on an initial bolus injection, which leads to a variation in the microbubble concentration over time during the acquisition. Although bolus injection is a frequently used method in ULM, a continuous infusion could have been used [10], which may be

optimized to improve resolution and decrease the acquisition time by better controlling microbubble concentrations [55].

For now, DULM relies on the triggering of the ultrasound sequence on the ECG to start each group of frames acquired with an R-wave of the ECG and thus ensure the synchronicity between the groups. But in [28], another group showed *in silico* that pulsatility could be retrieved in the microbubbles tracks without ECG-gating. Also, it could be possible to measure, in each group, the microbubbles density in a large vessel as in [56] or the tissue movement to temporally register the images according to their timing in the cardiac cycles. ECG-gating would thus not be mandatory to perform DULM: one could extract dynamic measurements from a regular ULM sequence. This is an ongoing study in our group.

The maximal frame rate we could achieve was limited by multiplexing: indeed, we used a fully addressed probe driven by only one ultrasound scanner, so each frame required to perform four Transmits/Receives per angle. A combination of several ultrasound systems, such as the one described in [24], may overcome such a limitation and allow for performing several angles while keeping a high frame rate and a large penetration depth, but at a much higher cost.

The ~ 15 -min sequences also included pauses for the transfer and the saving of the data. This may be an issue for the pulsatility estimation since our measurement relies on the averaging of groups of frames acquired during the whole acquisition, and the blood flow velocity may fluctuate in the meantime. However, as it is mentioned in [20], this drawback of performing volumetric images will decrease in the coming years with the increase of transfer speed and computational power: For example, without the pauses in the sequence, the mouse brain could have been imaged with a 3-min acquisition, dividing the acquisition time five-fold.

The achieved temporal resolution of ~ 0.1 second in this study was not sufficient to measure an increase in the time of arrival of the pulsatile flow along the vascular tree, but this could be another interesting biomarker to measure in the study of neurodegenerative diseases.

In the current study, animals were placed in a stereotaxic frame, resulting in negligible motion and breathing artifacts. Through initial analysis, we determined that motion correction had minimal influence on pulsatility measurements in segmented vessels. However, future studies will characterize pulsatility measurements in the context of motion and aberration correction [15,57].

Moreover, the sub-wavelength spatial resolutions we obtained (86 μm in the cat brain and 35 μm in the mouse brain, corresponding to $\lambda/3$ and $\lambda/7$ respectively) are not as small as the ones reported in previous 3D ULM studies. For example, two non-invasive studies in the rat brain [21,23] and one through the skull without the skin in the mouse brain [22] reported a spatial resolution of 31 μm , 31 μm and 20 μm respectively. This can be explained by different factors. First, this study was performed using a single ultrasound scanner, and only one angle (at 0°) was used in the sequences to maintain a high frame rate despite the limited transfer rate of the host computer used at the time of this study. Hence, the quality of the images and the resolution could have been improved by using several compounding angles, in the lateral and the elevation directions, or even by exploring other multiplexing combinations such as the “light” sequence described in [21]. Better contrast was achieved in the cat brain; one can speculate that using a 6-MHz pulse in the mouse brain is more subject to clutter due to its small size, e.g., from multiple reflections on the skull. DULM relies on high microbubble concentrations to increase the number of detections in comparison to ULM. Simulations [55] indicate that an optimal concentration exists, but it is difficult to achieve this optimal value experimentally because of the variability linked to microbubble destruction at the injection site, and the bolus injection dynamics. Infusions could also be used, but are also associated with experimental challenges, especially in small animals, in which injected fluid volumes are limited.

However, compared to the diffraction-limited axial and lateral resolutions that can be obtained (see Methods) with the matrix probe that we used, at 6 MHz, the resolution that we achieved shows a gain of a factor ~ 6 in the cat brain and a gain of a factor ~ 7 in the mouse brain. These resolutions are comparable with the ones obtained with a similar probe (at 7.8 MHz) and a similar sequence in [58], which achieved a 52- μm resolution at an 11-mm depth in a chicken embryo brain, corresponding to a gain of a factor ~ 4 , in both lateral and axial directions.

7.6 Conclusion

3D DULM is a novel ultrasound imaging technique that generates dynamic maps of flowing microbubbles in the vasculature in the brain, and performs quantitative pulsatility measurements. This approach can be used to obtain dynamic information along the cerebral vascular tree, in both large feeding vessels and microvessels, in-depth and in 3D. Such a technology could be used as an adjunct biomarker in the study of neurodegenerative diseases.

7.7 Acknowledgements

The authors would like to thank M. Abran for technical help with the monitoring platform, S. Lee for the mechanical index measurements and M. Vanni for his advice for the cat surgery. F. Lesage and S. Bélanger declare a minority ownership stake in Labeo Technologies Inc.

This work was supported in part by the Institute for Data Valorization (IVADO), in part by the Canada Foundation for Innovation under Grant 38095, in part by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) under Grant 452530, in part by the New Frontiers in Research Fund under Grant NFRFE-2018-01312 and in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) under Grant RGPIN-2019-04982. The work of C. Bourquin, J. Porée, B. Rauby, V. Perrot and H. Belgharbi was supported in part by IVADO, in part by the TransMedTech Institute, in part by the Fonds de recherche du Québec — Nature et technologies, in part by the Quebec Bio-Imaging Network, and in part by the Canada First Research Excellence Fund (Apogée/CFREF). This research was enabled in part by support provided by Calcul Québec (calculquebec.ca) and the Digital Research Alliance of Canada (alliancecan.ca).

7.8 References

- [1] van den Kerkhof M, van der Thiel M M, van Oostenbrugge R J, Postma A A, Kroon A A, Backes W H and Jansen J F 2023 Impaired damping of cerebral blood flow velocity pulsatility is associated with the number of perivascular spaces as measured with 7T MRI *J Cereb Blood Flow Metab* 0271678X231153374
- [2] Gosling R G and King D H 1974 Arterial Assessment by Doppler-shift Ultrasound *Proc R Soc Med* 67 447–9
- [3] Roher A E, Garami Z, Tyas S L, Maarouf C L, Kokjohn T A, Belohlavek M, Vedders L J, Connor D, Sabbagh M N, Beach T G and Emmerling M R 2011 Transcranial doppler ultrasound blood flow velocity and pulsatility index as systemic indicators for Alzheimer’s disease *Alzheimers Dement* 7 445–55
- [4] Chung C-P, Lee H-Y, Lin P-C and Wang P-N 2017 Cerebral Artery Pulsatility is Associated with Cognitive Impairment and Predicts Dementia in Individuals with Subjective Memory Decline or Mild Cognitive Impairment *J Alzheimers Dis* 60 625–32

- [5] Tomek A, Urbanová B and Hort J 2014 Utility of transcranial ultrasound in predicting Alzheimer's disease risk *J Alzheimers Dis* 42 Suppl 4 S365-374
- [6] Xu X, Sun L, Cannata J M, Yen J T and Shung K K 2008 High-frequency Ultrasound Doppler System for Biomedical Applications with a 30 MHz Linear Array Ultrasound *Med Biol* 34 638–46
- [7] Baraghis E, Bolduc V, Lefebvre J, Srinivasan V J, Boudoux C, Thorin E and Lesage F 2011 Measurement of cerebral microvascular compliance in a model of atherosclerosis with optical coherence tomography *Biomed. Opt. Express*, BOE 2 3079–93
- [8] Santisakultarm T P, Cornelius N R, Nishimura N, Schafer A I, Silver R T, Doerschuk P C, Olbricht W L and Schaffer C B 2012 In vivo two-photon excited fluorescence microscopy reveals cardiac- and respiration-dependent pulsatile blood flow in cortical blood vessels in mice *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302 H1367–77
- [9] Couture O, Hingot V, Heiles B, Muleki Seya P and Tanter M 2018 Ultrasound Localization Microscopy and Super-Resolution: A State of the Art *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* PP 1–1
- [10] Christensen-Jeffries K, Couture O, Dayton P A, Eldar Y C, Hynynen K, Kiessling F, O'Reilly M, Pinton G F, Schmitz G, Tang M-X, Tanter M and Sloun R J G van 2020 Super-resolution Ultrasound Imaging *Ultrasound in Medicine and Biology* 46 865–91
- [11] Couture O, Besson B, Montaldo G, Fink M and Tanter M 2011 Microbubble ultrasound super-localization imaging (MUSLI) 2011 IEEE International Ultrasonics Symposium 2011 IEEE International Ultrasonics Symposium pp 1285–7
- [12] Errico C, Pierre J, Pezet S, Desailly Y, Lenkei Z, Couture O and Tanter M 2015 Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging *Nature* 527 499–502
- [13] Foiret J, Zhang H, Ilovitsh T, Mahakian L, Tam S and Ferrara K W 2017 Ultrasound localization microscopy to image and assess microvasculature in a rat kidney *Sci Rep* 7 13662
- [14] Christensen-Jeffries K, Browning R J, Tang M-X, Dunsby C and Eckersley R J 2015 In vivo acoustic super-resolution and super-resolved velocity mapping using microbubbles *IEEE Trans Med Imaging* 34 433–40

- [15] Demené C, Robin J, Dizeux A, Heiles B, Pernot M, Tanter M and Perren F 2021 Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients *Nat Biomed Eng* 5 219–28
- [16] Yan J, Huang B, Tonko J, Toulemonde M, Hansen-Shearer J, Tan Q, Riemer K, Ntagiantas K, Chowdhury R A, Lambiase P, Senior R and Tang M-X 2023 Transthoracic super-resolution ultrasound localisation microscopy of myocardial vasculature in patients
- [17] Huang C, Zhang W, Gong P, Lok U-W, Tang S, Yin T, Zhang X, Zhu L, Sang M, Song P, Zheng R and Chen S 2021 Super-resolution ultrasound localization microscopy based on a high frame-rate clinical ultrasound scanner: an in-human feasibility study *Phys. Med. Biol.* 66 08NT01
- [18] Denis L, Bodard S, Hingot V, Chavignon A, Battaglia J, Renault G, Lager F, Aissani A, Hélén O, Correas J-M and Couture O 2023 Sensing ultrasound localization microscopy for the visualization of glomeruli in living rats and humans *eBioMedicine* 91
- [19] Taghavi I, Andersen S B, Hoyos C A V, Schou M, Gran F, Hansen K L, Nielsen M B, Sørensen C M, Stuart M B and Jensen J A 2022 Ultrasound super-resolution imaging with a hierarchical Kalman tracker *Ultrasonics* 122 106695
- [20] Heiles B, Correia M, Hingot V, Pernot M, Provost J, Tanter M and Couture O 2019 Ultrafast 3D Ultrasound Localization Microscopy Using a 32x32 Matrix Array *IEEE Transactions on Medical Imaging* 38 2005–15
- [21] Chavignon A, Heiles B, Hingot V, Orset C, Vivien D and Couture O 2022 3D Transcranial Ultrasound Localization Microscopy in the Rat Brain With a Multiplexed Matrix Probe *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 69 2132–42
- [22] Demeulenaere O, Bertolo A, Pezet S, Ialy-Radio N, Osmanski B, Papadacci C, Tanter M, Deffieux T and Pernot M 2022 In vivo whole brain microvascular imaging in mice using transcranial 3D Ultrasound Localization Microscopy *eBioMedicine* 79 103995
- [23] McCall J R, Santibanez F, Belgharbi H, Pinton G F and Dayton P A 2023 Non-invasive transcranial volumetric ultrasound localization microscopy of the rat brain with continuous, high volume-rate acquisition *Theranostics* 13 1235–46
- [24] Demeulenaere O, Sandoval Z, Mateo P, Dizeux A, Villemain O, Gallet R, Ghaleh B, Deffieux T, Deméné C, Tanter M, Papadacci C and Pernot M 2022 Coronary Flow Assessment

Using 3-Dimensional Ultrafast Ultrasound Localization Microscopy JACC: Cardiovascular Imaging 15 1193–208

[25] Lowerison M R, Sekaran N V C, Zhang W, Dong Z, Chen X, Llano D A and Song P 2022 Aging-related cerebral microvascular changes visualized using ultrasound localization microscopy in the living mouse Sci Rep 12 619

[26] Hingot V, Brodin C, Lebrun F, Heiles B, Chagnot A, Yetim M, Gauberti M, Orset C, Tanter M, Couture O, Deffieux T and Vivien D 2020 Early Ultrafast Ultrasound Imaging of Cerebral Perfusion correlates with Ischemic Stroke outcomes and responses to treatment in Mice Theranostics 10 7480–91

[27] Chavignon A, Hingot V, Orset C, Vivien D and Couture O 2022 3D transcranial ultrasound localization microscopy for discrimination between ischemic and hemorrhagic stroke in early phase Sci Rep 12 14607

[28] Wiersma M, Heiles B, Kalisvaart D, Maresca D and Smith C S 2022 Retrieving Pulsatility in Ultrasound Localization Microscopy IEEE Open Journal of Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control 2 283–98

[29] Bourquin C, Porée J, Lesage F and Provost J 2021 In vivo pulsatility measurement of cerebral microcirculation in rodents using Dynamic Ultrasound Localization Microscopy IEEE Transactions on Medical Imaging 1–1

[30] Renaudin N, Demené C, Dizeux A, Ialy-Radio N, Pezet S and Tanter M 2022 Functional ultrasound localization microscopy reveals brain-wide neurovascular activity on a microscopic scale Nat Methods 19 1004–12

[31] Cormier P, Porée J, Bourquin C and Provost J 2021 Dynamic Myocardial Ultrasound Localization Angiography IEEE Transactions on Medical Imaging 1–1

[32] Cortes N, Demers M, Ady V, Ikan L and Casanova C 2022 Reliable, Fast and Stable Contrast Response Function Estimation Vision 6 62

[33] Moldestad O, Karlsen P, Molden S and Storm J F 2009 Tracheotomy improves experiment success rate in mice during urethane anesthesia and stereotaxic surgery J Neurosci Methods 176 57–62

- [34] Perrot V, Polichetti M, Varray F and Garcia D 2021 So you think you can DAS? A viewpoint on delay-and-sum beamforming *Ultrasonics* 111 106309
- [35] Berthon B, Morichau-Beauchant P, Porée J, Garofalakis A, Tavitian B, Tanter M and Provost J 2018 Spatiotemporal matrix image formation for programmable ultrasound scanners *Phys Med Biol* 63 03NT03
- [36] Shahriari S and Garcia D 2018 Meshfree simulations of ultrasound vector flow imaging using smoothed particle hydrodynamics *Phys. Med. Biol.* 63 205011
- [37] Guo H 2011 A Simple Algorithm for Fitting a Gaussian Function [DSP Tips and Tricks] *IEEE Signal Processing Magazine* 28 134–7
- [38] Tang S, Song P, Trzasko J D, Lowerison M, Huang C, Gong P, Lok U-W, Manduca A and Chen S 2020 Kalman Filter-Based Microbubble Tracking for Robust Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 67 1738–51
- [39] Diederich B, Then P, Jügler A, Förster R and Heintzmann R 2019 cellSTORM - Cost-effective Super-Resolution on a Cellphone using dSTORM *PLoS ONE* 14 e0209827
- [40] Hingot V, Chavignon A, Heiles B and Couture O 2021 Measuring Image Resolution in Ultrasound Localization Microscopy *IEEE Transactions on Medical Imaging* 40 3812–9
- [41] Heiles B, Chavignon A, Bergel A, Hingot V, Serroune H, Maresca D, Pezet S, Pernot M, Tanter M and Couture O 2022 Volumetric Ultrasound Localization Microscopy of the Whole Rat Brain Microvasculature *IEEE Open Journal of Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2 261–82
- [42] Vrselja Z, Brkic H, Mrdenovic S, Radic R and Curic G 2014 Function of circle of Willis J Cereb Blood Flow *Metab* 34 578–84
- [43] Yankova G, Tur D, Parshin D, Cherevko A and Akulov A 2021 Cerebral arterial architectonics and CFD simulation in mice with type 1 diabetes mellitus of different duration *Scientific Reports* 11

- [44] Hartley C J, Reddy A K, Madala S, Entman M L, Michael L H and Taffet G E 2011 Doppler velocity measurements from large and small arteries of mice *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 301 H269–78
- [45] Li L, Ke Z, Tong K Y and Ying M 2010 Evaluation of Cerebral Blood Flow Changes in Focal Cerebral Ischemia Rats by Using Transcranial Doppler Ultrasonography *Ultrasound in Medicine & Biology* 36 595–603
- [46] Lebas H, Boutigny A, Maupu C, Salfati J, Orset C, Mazighi M, Bonnin P and Boulaftali Y 2023 Imaging Cerebral Arteries Tortuosity and Velocities by Transcranial Doppler Ultrasound Is a Reliable Assessment of Brain Aneurysm in Mouse Models *Stroke: Vascular and Interventional Neurology* 3 e000476
- [47] Bonnin P, Debbabi H, Mariani J, Charriaut-Marlangue C and Renolleau S 2008 Ultrasonic assessment of cerebral blood flow changes during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats *Ultrasound Med Biol* 34 913–22
- [48] Wei Z, Chen L, Lin Z, Jiang D, Xu J, Liu P, van Zijl P C M and Lu H 2019 Optimization of phase-contrast MRI for the estimation of global cerebral blood flow of mice at 11.7T *Magnetic Resonance in Medicine* 81 2566–75
- [49] Cahill L, Zhou Y-Q, Seed M, Macgowan C and Sled J 2014 Brain Sparing in Fetal Mice: BOLD MRI and Doppler Ultrasound Show Blood Redistribution During Hypoxia *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34
- [50] Heine G H, Gerhart M K, Ulrich C, Kaler H and Girndt M 2005 Renal Doppler resistance indices are associated with systemic atherosclerosis in kidney transplant recipients *Kidney International* 68 878–85
- [51] Madero M, Peralta C, Katz R, Canada R, Fried L, Najjar S, Shlipak M, Simonsick E, Lakatta E, Patel K, Rifkin D, Hawkins M, Newman A, Sarnak M and Study for the H A 2013 Association of Arterial Rigidity with Incident Kidney Disease and Kidney Function Decline: The Health ABC Study *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 8 424
- [52] Qian B, Rudy R F, Cai T and Du R 2018 Cerebral Artery Diameter in Inbred Mice Varies as a Function of Strain *Front Neuroanat* 12 10

- [53] Sullender C T, Richards L M, He F, Luan L and Dunn A K 2022 Dynamics of isoflurane-induced vasodilation and blood flow of cerebral vasculature revealed by multi-exposure speckle imaging *J Neurosci Methods* 366 109434
- [54] Shumkova V, Sitdikova V, Rechapov I, Leukhin A and Minlebaev M 2021 Effects of urethane and isoflurane on the sensory evoked response and local blood flow in the early postnatal rat somatosensory cortex *Sci Rep* 11 9567
- [55] Belgharbi H, Porée J, Damseh R, Perrot V, Milecki L, Delafontaine-Martel P, Lesage F and Provost J 2023 An Anatomically Realistic Simulation Framework for 3D Ultrasound Localization Microscopy *IEEE Open Journal of Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 3 1–13
- [56] Yu J, Lavery L and Kim K 2018 Super-resolution ultrasound imaging method for microvasculature in vivo with a high temporal accuracy *Scientific Reports* 8 13918
- [57] Xing P, Porée J, Rauby B, Malescot A, Martineau É, Perrot V, Rungta R L and Provost J 2023 Phase Aberration Correction for in vivo Ultrasound Localization Microscopy Using a Spatiotemporal Complex-Valued Neural Network
- [58] Lok U-W, Huang C, Trzasko J D, Kim Y, Lucien F, Tang S, Gong P, Song P and Chen S 2022 Three-Dimensional Ultrasound Localization Microscopy with Bipartite Graph-Based Microbubble Pairing and Kalman-Filtering-Based Tracking on a 256-Channel Verasonics Ultrasound System with a 32×32 Matrix Array *J. Med. Biol. Eng.*

CHAPITRE 8 DIFFUSION ET IMPACT DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Ce Chapitre présente la diffusion et l'impact qu'ont eu ces travaux auprès de la communauté ultrasonore, et plus largement auprès de la communauté scientifique et du grand public.

En effet, l'autrice de cette thèse a choisi, au cours de celle-ci, de mettre l'accent sur le développement de ses compétences en vulgarisation et en communication scientifique.

Dans le cadre de cette thèse, deux stages ont ainsi été réalisés en journalisme scientifique. Un premier stage de six semaines a été effectué à l'Agence Science Presse sous la direction de Pascal Lapointe, et un second stage de quatre semaines a été effectué à La Presse sous la supervision de Marie Allard. Ces stages ont été effectués en 2021 dans le cadre de la bourse d'excellence octroyée par l'Institut TransMedTech. Un troisième stage de huit semaines a ensuite été réalisé en journalisme auprès du média Le Devoir en 2023, grâce au soutien des Amis du Devoir.

L'autrice a également eu l'occasion de participer à plusieurs concours de vulgarisation et de journalisme scientifique, dont Ma Thèse en 180 secondes de l'Acfas en 2021 et la Bourse Fernand-Seguin de l'Association des Communicateurs Scientifiques du Québec en 2023.

Ces expériences ont été l'occasion pour elle de développer ses aptitudes en vulgarisation, pour diffuser ses travaux de recherche auprès d'un public plus large que la communauté scientifique en imagerie ultrasonore. Cet effort de vulgarisation a également permis de sensibiliser un large public à la recherche en imagerie ultrasonore d'une part, et à la recherche sur les maladies neurodégénératives et des maladies cardiovasculaires d'autre part.

8.1 Diffusion et impact auprès de différents publics

Les travaux de recherche exposés dans cette thèse ont fait l'objet de plusieurs publications scientifiques et de présentations dans des conférences locales et internationales, de même que des présentations vulgarisées et des entrevues auprès de médias s'adressant au grand public. Les impacts auprès des différents publics ont été mesurés et quantifiés dans cette section. Dans la section suivante (**Section 8.2**), on donne la liste des contributions (activités de diffusion, transfert et valorisation des connaissances) reliées à cette thèse.

8.1.1 Diffusion et impact auprès de la communauté de la recherche en imagerie ultrasonore

L'impact auprès du milieu de la recherche en imagerie ultrasonore comptabilise l'essentiel des vues et des citations des publications d'articles scientifiques. Le premier article a été publié dans un journal à fort facteur d'impact (IEEE TMI, facteur d'impact de 11 en 2022-2023). Le second a été publié sous forme de pré-publication sur arXiv, et est en cours de révision auprès du journal *Physics in Medicine & Biology*. La participation aux conférences internationales IEEE IUS (2019-2022) a également aidé à diffuser les travaux de recherche auprès des experts et expertes en imagerie ultrasonore. C'est également une communauté qui a pu être rejointe via la création d'un compte Twitter (@ProvostLab) et d'un compte sur ResearchGate. Au total, environ 3 000 personnes ont pu être rejointes dans cette communauté, principalement via la publication d'articles scientifiques et via Twitter.

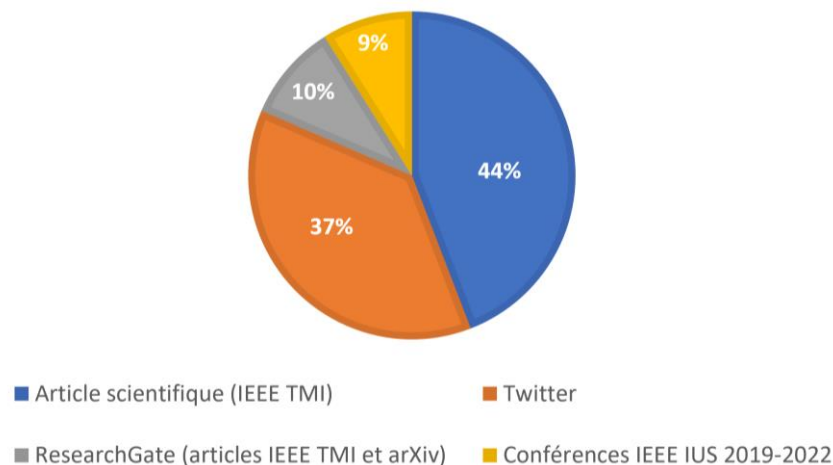


Figure 8.1 Impact des travaux de recherche sur la communauté en imagerie ultrasonore
(environ 3 000 personnes)

8.1.2 Diffusion et impact dans le milieu de la recherche universitaire

L'impact auprès du milieu de la recherche universitaire, de façon plus globale, a été mesuré en estimant le nombre de personnes atteintes via les conférences institutionnelles, de même que via la participation à des concours de vulgarisation et à des entrevues. Cela a permis en particulier d'atteindre les communautés universitaires (Polytechnique Montréal, Université de Sherbrooke), institutionnelles (Acfas) et celles des organismes de financement (TransMedTech, RBCQ, FRQNT,

IVADO). Les principales communautés qui ont été atteintes sont celles de l'Acfas, Polytechnique Montréal et le Réseau de Bio-Imagerie du Québec, pour un total d'environ 5 000 personnes.

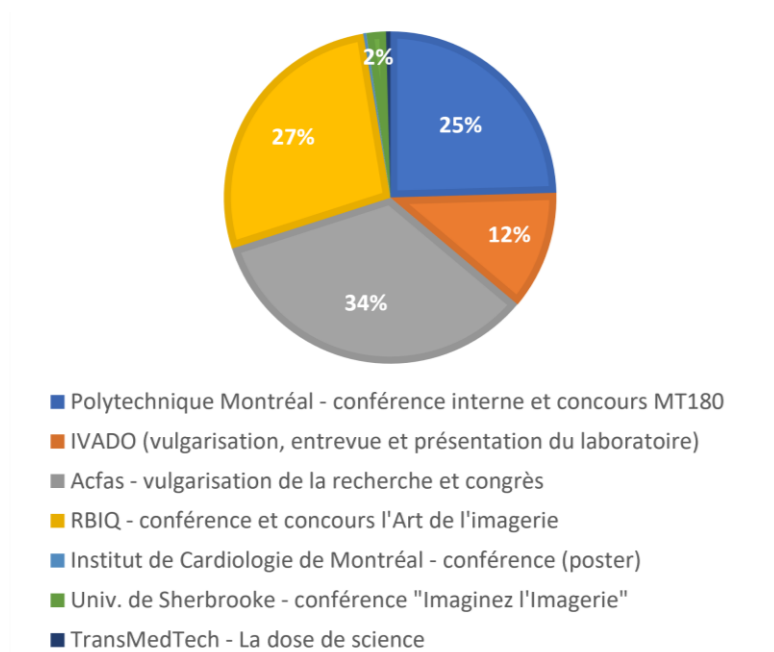


Figure 8.2 Impact des travaux de recherche sur la communauté scientifique universitaire
(environ 5 000 personnes)

8.1.3 Diffusion et impact auprès du grand public

Enfin, ce projet de recherche a mené à la rédaction d'articles de vulgarisation scientifique publiés dans des médias traditionnels (La Presse, L'Actualité, La Conversation). Plusieurs entrevues ont également été effectuées à propos du projet de recherche, notamment à la radio sur ICI Radio-Canada Première, sur YouTube (chaîne de Viviane Lalande, Scilabus) ou encore pour le magazine Curium. Ainsi, 453 000 personnes ont pu être atteintes, en particulier grâce à l'entrevue réalisée pour la chaîne YouTube Scilabus et l'article rédigé pour La Presse.

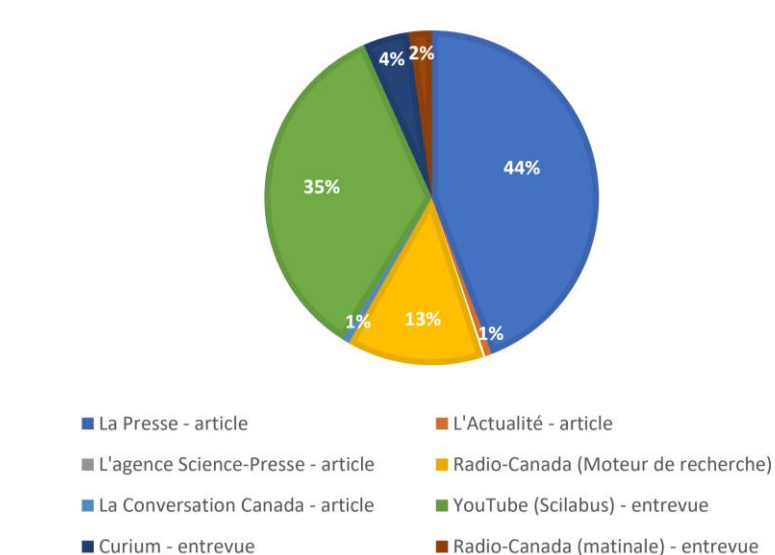


Figure 8.3 Impact des travaux de recherche sur le grand public

(environ 453 000 personnes)

8.1.4 Conclusion

Finalement, ce projet de recherche a permis d'atteindre une audience totale de près d'un demi-million de personnes, dont 98% fait partie du grand public. De ces chiffres, on peut noter l'importance de la vulgarisation si l'on souhaite atteindre un grand nombre de personnes via ses recherches.

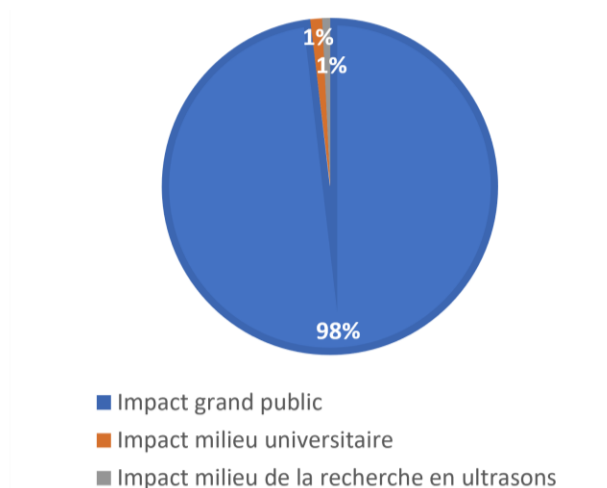


Figure 8.4 Impact total des travaux de recherche

(environ 460 000 personnes)

Cette démarche a ainsi permis de faire découvrir DULM au plus grand nombre. Le contexte physiologique d'augmentation de la pulsatilité, mais aussi les limites des techniques d'imagerie actuelles ont été abordés, de même que le principe et les algorithmes sur lesquels repose DULM. Cette démarche a donc permis de montrer comment l'on développe une nouvelle technique d'imagerie et dans quel but. Plus largement, elle a permis de sensibiliser la population au sujet des maladies cardiovasculaires et de la démence.

Certains écueils ont également été identifiés et évités autant que possible : lors du développement d'une telle méthode, il est important de rappeler par exemple qu'elle a pour le moment été testée sur des animaux, sur un petit nombre d'entre eux, et uniquement sur des modèles sains. Il est également nécessaire de rappeler qu'il s'agit d'une méthode d'imagerie qui pourrait permettre de repérer l'augmentation de la pulsatilité, mais qu'elle ne pourrait pas servir directement à diminuer celle-ci. Vulgariser implique donc de bien identifier les limites de la méthode, pour ne pas induire son audience en erreur ou qu'elle reparte avec un message faussé, voire de faux espoirs.

Cette démarche de vulgarisation a permis à l'autrice de cette thèse de mieux embrasser le contexte global dans lequel s'inscrit ce projet de recherche, pour finalement mieux le présenter auprès de ses pairs en conférence et dans des articles scientifiques.

8.2 Liste des activités de diffusion, transfert et valorisation des connaissances

8.2.1 Diffusion auprès de la communauté en recherche ultrasonore

8.2.1.1 Publications scientifiques

C. Bourquin, J. Porée, F. Lesage, J. Provost. « In vivo pulsatility measurement of cerebral microcirculation in rodents using Dynamic Ultrasound Localization Microscopy », IEEE Transactions on Medical Imaging, p. 1-1, 2021, doi: 10.1109/TMI.2021.3123912.

Bourquin, C., Porée, J., Rauby, B., Perrot, V., Ghigo, N., Belgharbi, H., Bélanger, S., Ramos-Palacios, G., Cortes, Ladret, H., Ikan, L., Casanova, C., Lesage, F., Provost, J. (2023). Quantitative pulsatility measurements using 3D Dynamic Ultrasound Localization Microscopy, arXiv, 24 mars 2023. doi: 10.48550/arXiv.2303.14330.

Milecki L., Poree J., Belgharbi H., **Bourquin C.**, Damseh R., Delafontaine-Martel P., Lesage F., Gasse M., Provost J. « A Deep Learning Framework for Spatiotemporal Ultrasound Localization Microscopy », IEEE Transactions on Medical Imaging. 2021 May;40(5):1428-1437. doi: 10.1109/TMI.2021.3056951. Epub 2021 Apr 30. PMID: 33534705.

P. Cormier, J. Porée, **C. Bourquin**, J. Provost, « Dynamic Myocardial Ultrasound Localization Angiography », IEEE Transactions on Medical Imaging, p. 1-1, 2021, doi: 10.1109/TMI.2021.3086115.

E. Hardy, J. Porée, H. Belgharbi, **C. Bourquin**, F. Lesage, et J. Provost, « Sparse channel sampling for ultrasound localization microscopy (SPARSE-ULM) », Phys. Med. Biol., vol. 66, no 9, p. 095008, avr. 2021, doi: 10.1088/1361-6560/abf1b6.

8.2.1.2 Présentations orales, posters et vidéos en premier auteur – conférences internationales

Bourquin, C., Perrot, V., Porée, J., Belgharbi, H., Cortés, N., Bélanger, S., Ladret, H., Ikan, L., Casanova, C., Lesage, F., & Provost, J. (2022). Dynamic Ultrasound Localisation Microscopy Achieves Quantitative Pulsatility Measurements in the Whole Brain Using Kalman Filtering, IEEE International Ultrasonics Symposium, présentation orale.

Bourquin, C., Perrot, V., Porée, J., Belgharbi, H., Cortés, N., Miquel, G., Bélanger, S., Ladret, H., Ikan, L., Casanova, C., Thorin, E., Lesage, F., & Provost, J. (2021). 3D Dynamic Ultrasound Localization Microscopy in vivo validation in normal and pathological animal models, IEEE International Ultrasonics Symposium, présentation orale (vidéo)

Bourquin, C., Porée, J., Lesage, F., & Provost, J. (2020). 2D and 3D transcranial brain-wide pulsatility mapping in vivo with Dynamic Ultrasound Localization Microscopy (DULM), IEEE International Ultrasonics Symposium, e-poster (vidéo).

Bourquin, C., Porée, J., Lesage, F., & Provost, J. (2019). Brain-wide pulsatility mapping with gated ultrasound localization microscopy in vivo, Acoustical Society of America (ASA), accepté pour présentation orale.

Bourquin, C., Belgharbi, H., Cormier, P., Hardy, E., Gesnik, M., Cloutier, G., Lesage, F., & Provost, J. (2019). Pulsatility mapping using time-resolved ultrasound localization microscopy in the rodent's brain in vivo, IEEE International Ultrasonics Symposium, présentation orale.

8.2.2 Diffusion auprès de la communauté scientifique

8.2.2.1 Présentations orales, posters et vidéos en premier auteur – conférences institutionnelles

Bourquin, C., Porée, J., Rauby, B., Perrot, V., Ghigo, N., Belgharbi, H., Bélanger, S., Ramos-Palacios, G., Cortes, Ladret, H., Ikan, L., Casanova, C., Lesage, F., & Provost, J. (2023). La Microscopie de Localisation Ultrasonore Dynamique : une nouvelle méthode d'imagerie pour détecter les signes précurseurs de démence, 90^e Congrès de l'Acfas, communication orale libre.

Bourquin, C., Porée, J., Lesage, F., & Provost, J. (2021). Microscopie de Localisation Ultrasonore Dynamique (DULM), Journées Scientifiques virtuelles du Réseau de Bio-Imagerie du Québec, présentation éclair (live) et poster.

Bourquin, C., Porée, J., Lesage, F., & Provost, J. (2020). Microscopie de Localisation Ultrasonore Dynamique (DULM), Symposium Imaginez l'Imagerie, présentation orale (vidéo) - Prix REMDUS coup de cœur du public (300\$), prix argent patient partenaire.

Bourquin, C., Porée, J., Lesage, F., & Provost, J. (2019). Mapping pulsatility of cerebral microcirculation with ultrasound localization microscopy in a rodent brain in vivo, Journée de l'Innovation en Génie Physique à Polytechnique Montréal, présentation orale.

Bourquin, C., Belgharbi, H., Cormier, P., Hardy, E., Gesnik, M., Cloutier, G., Lesage, F., & Provost, J. (2019). Mapping pulsatility of cerebral microcirculation using ultrasound localization microscopy in a rat model in vivo, XXII^e Journée de la recherche à l'Institut de Cardiologie de Montréal, poster.

8.2.2.2 Présentation des travaux de recherche et vulgarisation au sein d'institutions et d'organismes de financement

Participation à l'exposition « L'Art de l'Imagerie » 2023 du Réseau de Bio-Imagerie du Québec

Lauréate de la 29^e édition du Concours de vulgarisation de la recherche de l'Acfas (format texte)

Obtention du Prix Relève étoile Louis-Berlinguet du FRQNT pour l'article "In vivo pulsatility measurement of cerebral microcirculation in rodents using Dynamic Ultrasound Localization Microscopy" publié dans IEEE Transactions on Medical Imaging

Participation aux Neurodiscussions du Groupe de recherche sur la signalisation neurale et la circuiterie (GRSNC) - présentation des travaux de recherche

Article de vulgarisation rédigé pour le site web d'IVADO dans le cadre de Mon projet de recherche en 800 mots

Participation à « La dose de science » de l'Institut TransMedTech - présentation des travaux de recherche

Participation aux ateliers de vulgarisation ComSciCon-QC, rédaction d'un article de vulgarisation à propos de son sujet de recherche et présentation orale vulgarisée

Participation à la finale nationale du concours Ma Thèse en 180 secondes 2021 de l'Acfas

Participation au concours Ma Thèse en 180 secondes 2021 de l'Acfas à Polytechnique Montréal - premier prix du jury et prix du public

Présentation du Laboratoire d'Ultrasons de Jean Provost au premier Café scientifique IVADO

Participation au concours Mon Projet de Recherche IVADO en 180 secondes 2021 – prix du jury

Participation au Concours l'Art de l'Imagerie du Réseau de Bio-Imagerie du Québec 2021 - prix du public

8.2.3 Diffusion auprès du grand public

8.2.3.1 Entrevues données dans les médias

Entrevue donnée pour la chaîne YouTube Scilabus (2023)

Entrevue donnée pour le magazine Curium (2022)

Entrevue donnée à Octobre Numérique d'IVADO à propos de Mon projet de recherche IVADO en 180 secondes (2021)

Entrevue donnée à la radio ICI Radio-Canada pour l'émission "Moteur de recherche" (2021)

Entrevue donnée à la radio ICI Radio-Canada (Nord de l'Ontario, Toronto, Windsor) pour l'émission "Pas comme d'habitude" (2021)

Rediffusée par ICI Radio-Canada (Windsor) dans l'émission "Matins sans frontières" (2021)

Rediffusée par ICI Radio-Canada (Toronto) dans l'émission "Y a pas deux matins pareils" (2021)

8.2.3.2 Rédaction d'articles de vulgarisation pour des médias traditionnels

Article rédigé pour l'Acfas publié dans l'Actualité (2022)

Article rédigé pour La Presse à propos de la Microscopie de Localisation Ultrasonore, "Le cerveau comme vous ne l'avez jamais vu" (2021)

Article cité par le blogue de vulgarisation "Le Cerveau à tous les niveaux" (2021)

Article cité par l'Agence Science-Pressé (2021)

Article de vulgarisation publié dans La Conversation Canada, "Une nouvelle technique d'imagerie pourrait détecter les signes précurseurs de démence" (2021)

CHAPITRE 9 DISCUSSION

L'objectif de cette thèse était de proposer une nouvelle méthode d'imagerie, la Microscopie de Localisation Ultrasonore Dynamique (DULM), permettant de visualiser la dynamique des flux sanguin dans l'ensemble de l'arbre vasculaire cérébral, afin d'en tirer des mesures quantitatives de pulsatilité.

9.1 Synthèse des résultats

9.1.1 Développement de la méthode

DULM est basée sur la Microscopie de Localisation Ultrasonore (ULM). Cette dernière consiste à injecter des microbulles dans la circulation sanguine, avant de les suivre par imagerie ultrasonore dans l'organe d'intérêt (ici, le cerveau), pour reconstruire une carte de la vascularisation en profondeur, avec une excellente résolution. Les séquences ultrasonores et algorithmes de reconstruction ont été pensés pour DULM, pour permettre de générer non pas une image statique comme en ULM, mais plutôt un film complet de plus d'un cycle cardiaque, dont on peut tirer des mesures qualitatives et quantitatives sur la pulsatilité. Pour ce faire, nous avons dû faire face à de nombreux choix et compromis lors du développement de la méthode, qui sont détaillés dans le **Chapitre 4**. DULM a dans un premier temps été développée pour générer des images du cerveau en 2D (voir premier article et résultats complémentaires aux **Chapitre 5** et **Chapitre 6**), puis a été transférée en 3D (voir second article, **Chapitre 7**).

9.1.2 Premier article

La première étude a permis de démontrer que DULM permettait de produire des cartes dynamiques (ou films) du cerveau entier en 2D chez le petit animal (rat avec craniotomie et souris à travers la peau et le crâne), où l'on peut voir les variations du flux sanguin au niveau de plusieurs vaisseaux. De ces cartes ont été tirées des mesures quantitatives effectuées au niveau de vaisseaux de différentes tailles, vitesses et pulsatilités, pour montrer les performances de la méthode dans diverses situations. Nous avons également pu comparer ces résultats à ceux effectués sans le processus de localisation et de suivi des microbulles caractéristique de l'ULM, pour montrer une amélioration de la résolution spatiotemporelle atteinte par rapport à l'imagerie de contraste Doppler ultrarapide (CEUFD). Enfin, nous avons pu montrer chez ces deux espèces qu'au niveau du cortex,

les vaisseaux ascendants (correspondant à des veines) présentaient une pulsatilité significativement plus faible que les vaisseaux descendants (correspondant à des artères), validant ainsi nos résultats chez ces deux rongeurs sains.

À notre connaissance, l'étude effectuée chez la souris a été la première à montrer qu'il était possible de réaliser des images du cerveau avec une technique dérivée de l'ULM, et de façon non-invasive, chez ce modèle animal.

9.1.3 Résultats complémentaires

Des résultats complémentaires à l'article en 2D ont été produits, et ont permis de mettre en évidence plusieurs paramètres influençant la qualité des mesures de la pulsatilité. Il en ressort que certains paramètres tels que la concentration en microbulles et la longueur de l'acquisition jouent beaucoup sur les mesures de pulsatilité (en particulier dans les petits vaisseaux). De plus, on a pu mettre en évidence dans ces résultats complémentaires que la corrélation avec la PSF était un paramètre important dans le traitement des données pour compenser la concentration élevée en microbulles, par exemple pour mesurer la pulsatilité au niveau de petits vaisseaux en profondeur.

9.1.4 Second article

La seconde étude a permis de démontrer que DULM pouvait être transférée en 3D, afin d'imager non plus une tranche du cerveau, mais un volume de celui-ci, chez le chat avec craniotomie et chez la souris à travers le crâne (sans la peau). Dans cette seconde étude, nous avons pu produire de nouveau des cartes dynamiques de la pulsatilité chez les deux animaux, de même que des mesures quantitatives de pulsatilité et de vitesse dans différents vaisseaux. Chez le chat, nous avons pu repérer des vaisseaux principaux et plusieurs vaisseaux subséquents en aval : comme attendu, la vitesse et la pulsatilité diminuaient significativement entre ces deux groupes de vaisseaux. Chez la souris, le cercle de Willis a pu être segmenté ; la pulsatilité et la vitesse moyenne mesurées dans les deux parties du cercle ne montraient pas de différence significative, comme attendu.

De plus, à notre connaissance, l'étude effectuée chez le chat a été la première à montrer qu'il était possible de réaliser des images du cerveau avec une technique dérivée de l'ULM chez ce modèle animal.

9.2 Limites de DULM pour la mesure de la pulsatilité

Plusieurs points de discussion ont été soulevés dans chacun des deux articles (voir **Chapitres 5** et **7, Sections Discussion**). Cette méthode présente également plusieurs limites plus globales quant à la quantification de la pulsatilité dans l'arbre vasculaire.

9.2.1 Les limites de la quantification

Au cours de ces travaux, de nombreux choix ont été faits, en accord avec la littérature et/ou avec la théorie. Cependant, il faut garder à l'esprit que certains choix, comme la cadence d'imagerie, le seuil de SVD, la fréquence de coupure du filtre lors du lissage des données, ou même la concentration en microbulles et le temps total d'acquisition, peuvent avoir de grandes conséquences sur les valeurs de vitesse et donc de pulsatilité mesurées, comme on a pu le voir dans les résultats complémentaires notamment (voir **Chapitre 6**).

De plus, la pulsatilité est habituellement quantifiée à l'aide du PI : c'est donc cet indice que nous avons mesuré au cours de ces travaux, mais il présente des limites. En effet, il s'appuie uniquement sur les vitesses maximale, minimale et moyenne du flux sanguin. Il ne rend donc pas compte de la complexité du flux et de ses variations qui, en Doppler pulsé notamment, sont essentielles pour évaluer la santé vasculaire.

DULM repose aussi, comme on l'a vu, sur la mesure de la pulsatilité à partir d'un cycle cardiaque « moyen » mesuré sur plusieurs minutes. Or, le cycle cardiaque pourrait varier au cours de l'acquisition, que ce soit à cause d'un changement de température, d'une légère variation de l'anesthésie, etc. Le flux sanguin lui-même pourrait être perturbé lors de l'injection de microbulles, puisque cette injection ajoute un volume supplémentaire au volume sanguin initial.

Intrinsèquement, DULM est également confrontée à des limitations similaires à celles rencontrées en ULM. Il est difficile de s'assurer que les résultats que l'on obtient à la fin du traitement des données sont bien représentatifs des flux sanguins que l'on cherche à imager. Une trajectoire de microbulle en zigzag par exemple, montrant une vitesse fluctuante, pourrait être le fruit d'une erreur de localisation, d'une erreur d'appariement ou d'une simple trajectoire complexe au sein d'un vaisseau tortueux.

9.2.2 Les limites de la validation

Afin de valider les mesures trouvées en DULM, l'idéal serait d'effectuer une comparaison avec la littérature, ou de valider la méthode in vitro.

Or, la comparaison des mesures effectuées avec DULM avec certaines méthodes proposées dans la littérature est complexe. En effet, comme on l'a vu dans la revue de la littérature (**Section 2.6.2**) et dans l'article 1 (**Chapitre 5**), le Doppler pulsé présente de grandes variabilités dans ses mesures chez le petit animal, même lorsqu'il s'agit de vaisseaux majeurs. DULM repose également sur la moyenne des vitesses des microbulles mesurées à tout instant du cycle cardiaque ; mais à l'inverse, le Doppler pulsé est généralement calculé à partir de l'enveloppe du signal (donc du maxima des vitesses des globules rouges à tout instant du cycle cardiaque). Les mesures en Doppler pulsé peuvent aussi être biaisées par l'orientation du vaisseau par rapport à la sonde ultrasonore, ce qui complique encore la comparaison avec les mesures réalisées en DULM. Cette dernière pourrait également être confrontée à des mesures effectuées en imagerie optique, mais ces techniques présentent une faible profondeur de pénétration (voir **Section 2.5.2**).

De plus, la validation de la méthode in vitro est complexe. En effet, les fantômes de flux qui sont habituellement utilisés dans la littérature simulent généralement des flux sanguins dans des vaisseaux majeurs, comme la carotide ; mais il n'existe pas, à ce jour, de fantôme de la vascularisation du cerveau, qui représente fidèlement l'écoulement du sang dans tout l'arbre vasculaire cérébral – qui, comme on l'a vu dans le **Chapitre 2**, présente de grandes variations de compliance et de diamètre entre les artères principales et les microvaisseaux notamment.

9.2.3 Les limites du transfert en clinique

DULM présente également une résolution spatiale moins performante que l'ULM, et elle n'a pour l'instant été testée de façon non-invasive que chez la souris en 2D. Son transfert non-invasif vers de plus gros animaux, voire à l'humain, est cependant possible théoriquement, puisque l'ULM a par exemple été testée avec succès chez le rat en transcrânien en 3D [152], et chez l'humain en transcrânien en 2D [119].

De plus amples développements algorithmiques pourraient cependant être nécessaires avant le transfert de DULM en clinique : par exemple, le cycle cardiaque chez l'humain est plus long que celui d'un rat, d'un chat ou d'une souris, et nécessite d'imager le cerveau plus en profondeur, donc

d'adapter les séquences ultrasonores en conséquence. Imager un cerveau humain nécessitera également l'utilisation d'une sonde à plus basse fréquence, ce qui pourrait induire plus de superposition de signaux de microbulles à l'image ; la quantité de microbulles injectées devra donc être ajustée pour éviter de dégrader la qualité de celle-ci, et donc les mesures de pulsatilité. Un algorithme de correction d'aberrations devra également être ajouté pour compenser ces dernières, en raison de l'épaisseur du crâne. Il pourrait également être envisagé de réaliser des mesures à travers l'œil ou la tempe, pour limiter les aberrations dues au crâne.

Dans l'éventualité où DULM pourrait être transférée en clinique, il est également important de noter que si sa profondeur de pénétration peut lui permettre d'observer le cerveau en profondeur, son champ de vue est cependant limité (comme en Doppler transcrânien). Il ne lui sera donc pas possible d'imager le cerveau entier chez l'humain en une seule acquisition, contrairement à d'autres méthodes d'imagerie comme l'IRM. Le cerveau pourrait cependant être imagé dans son ensemble (en 2D ou en 3D) en réalisant des acquisitions de différents points de vue.

9.3 Discussion - diffusion et impact des travaux de recherche

Ces travaux ont également été diffusés auprès de différents publics (communauté ultrasonore, communauté universitaire au sens large et grand public), pour un total de près d'un demi-million de personnes.

Au niveau de la communauté ultrasonore, le premier article de cette thèse publié dans IEEE Transactions on Medical Imaging a été cité 9 fois et lu 1727 fois au moment où ces lignes sont écrites. DULM a d'ores et déjà été utilisée auprès d'autres groupes de recherche en ultrasons pour mesurer l'activité fonctionnelle du cerveau [132], preuve que cette méthode ne se limite pas à la seule mesure de la pulsatilité et pourrait être utilisée pour un large éventail d'applications.

Pour ce qui est de la communauté universitaire, la diffusion de ces travaux de recherche auprès de celle-ci a permis de tisser des liens avec d'autres laboratoires, qui pourront éventuellement mener à des collaborations futures et transdisciplinaires. Par exemple, les algorithmes de suivi des microbulles pourraient être utilisés dans d'autres contextes, comme en vision par ordinateur.

Enfin, au niveau du grand public, bien que ces travaux aient atteint un grand nombre de personnes, il est difficile de quantifier leur impact sur court, moyen et long terme. De quelle façon le message a-t-il été perçu ? Quelles informations ont été retenues ? Des commentaires positifs et de

nombreuses questions ont cependant été recueillis par l'auteur de cette thèse suite à ses interventions dans les médias, signe que cette méthode d'imagerie suscite la curiosité et l'intérêt du public.

CHAPITRE 10 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Cette thèse a ainsi permis de montrer la faisabilité de mesurer la pulsatilité à l'aide de DULM, à la fois en 2D et en 3D. Cette méthode ouvre plusieurs pistes d'exploration pour de futures applications cliniques et pré-cliniques.

10.1 Recommandations

10.1.1 Optimisation de DULM

10.1.1.1 Optimisation des séquences ultrasonores

Les séquences ultrasonores utilisées dans cette thèse ont été programmées pour être utilisées sur un échographe Vantage 256, avec une sonde ultrasonore à haute fréquence (15 MHz en 2D, 8 MHz en 3D). Un système à quatre échographes [154], par exemple, pourrait permettre d'augmenter le nombre d'images par seconde et améliorer ainsi la cadence d'imagerie ou le nombre d'angles effectués pour réaliser les images. Une plus haute cadence d'imagerie pourrait en effet permettre de suivre des microbulles présentant une plus large gamme de vitesses, et donc d'obtenir des mesures plus précises de la pulsatilité.

Il serait également intéressant d'explorer des sondes à plus haute fréquence en 3D, comme la sonde ligne-colonne RCA [112], pour améliorer la résolution obtenue, en particulier sur petit animal. De même, les séquences utilisées ici n'ont qu'un angle en 3D, et trois angles en 2D ; il pourrait être préférable d'utiliser plus d'angles afin d'améliorer la résolution, mais au détriment de la cadence d'imagerie.

DULM est également présentée ici comme une séquence ultrasonore synchronisée avec l'ECG. Il pourrait cependant être possible de retrouver le signal du cycle cardiaque pour chaque bloc, à partir des mouvements du sang ou des tissus par exemple, afin de les recaler temporellement, et d'ainsi s'affranchir de la contrainte que constitue cette synchronisation. Depuis le début de ce projet, une étude d'un autre groupe [174] a également montré sur des simulations de flux dans des veinules et des artérioles que l'on pouvait retrouver le signal de la pulsatilité à partir des trajectoires des microbulles, avec des séquences d'ULM non-synchronisées avec l'ECG. Il pourrait être intéressant d'appliquer cette méthode à un modèle in vivo, et de comparer ses performances avec celles de DULM.

10.1.1.2 Optimisation de la concentration

DULM nécessite également d'injecter et de suivre un plus grand nombre de microbulles qu'en ULM. En effet, cette méthode demande de générer non pas une mais plusieurs images, afin de pouvoir en tirer des paramètres dynamiques sur le flux sanguin. Pour ce faire, nous avons dû augmenter en 2D la concentration en microbulles, dégradant ainsi légèrement la résolution spatiale obtenue. Pour compenser partiellement cet effet, nous avons réalisé une corrélation des images avec la PSF du système ; mais la résolution finale obtenue reste cependant dégradée par rapport à des images ULM, notamment pour les images obtenues sur la souris en 3D. Il serait intéressant d'effectuer une étude paramétrique en DULM 3D, afin de déterminer quelle quantité de microbulles est nécessaire pour imager des vaisseaux d'un certain diamètre par exemple.

10.1.1.3 Optimisation du traitement des images

Dans ces travaux, nous n'avons utilisé ni correction de mouvement, ni correction d'aberrations. Il serait intéressant d'explorer différents algorithmes pour ces deux approches, qui pourraient permettre d'améliorer la localisation des microbulles, et finalement la résolution des images obtenues et la qualité des mesures de pulsatilité.

Nous avons également exploré plusieurs techniques de suivi des microbulles lors de cette thèse. Nous avons opté en 2D pour un algorithme d'appariement avec le plus proche voisin, et en 3D pour un filtre de Kalman. Cependant, le filtre de Kalman présuppose que la microbulle suit une trajectoire relativement linéaire ; or, le flux sanguin peut s'avérer plus complexe et tortueux dans certaines parties du cerveau, comme dans les capillaires.

10.1.2 Développement de nouveaux biomarqueurs

Dans ces travaux, nous avons essentiellement étudié la mesure quantitative de la pulsatilité, notamment à l'aide du PI. DULM pourrait néanmoins permettre le développement d'autres biomarqueurs de la pulsatilité que le PI, qui pourraient mieux rendre compte de la complexité des flux sanguins par exemple.

10.1.3 Application de DULM à d'autres organes

Cette méthode a d'ores et déjà pu être appliquée *in vivo* au cœur de rat [120] afin d'y visualiser les vaisseaux au niveau du myocarde, de même que la variation de la quantité de microbulles dans ces

vaisseaux au cours du cycle cardiaque. Il pourrait être intéressant de pousser plus loin l'analyse afin de mesurer les variations de vitesse (et donc la pulsatilité) dans ces microvaisseaux.

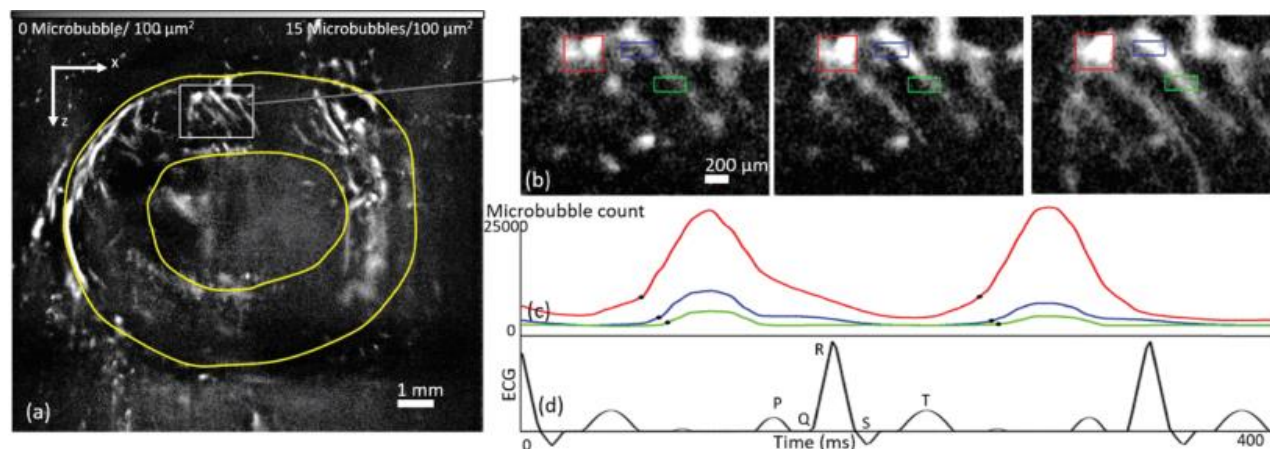


Figure 10.1 Mesures de variation de densité de microbulles réalisées grâce à DULM dans un cœur de rat.

(a) Image du cœur d'un rat réalisée par DULM (carte de densité) ; (b) Régions d'intérêt visualisées à différents instants durant le cycle cardiaque ; (c) Nombre de microbulles circulant dans trois vaisseaux au cours du temps. Figures issues de [120]

De plus, DULM pourrait être appliquée à d'autres organes, comme le rein ou le foie. En effet, la rigidité artérielle a non seulement été associée à une augmentation de la pulsatilité en aval et à des dommages cérébraux, mais également à un déclin de la fonction rénale [175]. Il est courant d'évaluer l'indice de pulsatilité et de résistivité dans le rein à l'aide de l'imagerie Doppler [176], mais l'utilisation de DULM pourrait permettre de mesurer la pulsatilité au niveau des microvaisseaux, afin de mieux comprendre son impact sur la fonction rénale.

10.1.4 Application de la méthode à des cas pathologiques

L'étape suivante pour DULM serait de tester la méthode chez des animaux pathologiques, afin de vérifier si elle est suffisamment sensible et quantitative pour mesurer une augmentation de la pulsatilité au cours du développement de maladies comme l'athérosclérose.

Trois modèles animaux en particulier pourraient être utilisés : les souris ATX [177], les souris TAC [11], [177] et les souris présentant une calcification artificielle de la carotide (CaCl_2) [178]. Dans le premier cas, il s'agirait d'effectuer une étude inter-animale, afin de

vérifier si la pulsatilité est plus élevée chez des souris atteintes de démence par exemple, et à quel stade de la maladie on peut éventuellement commencer à voir une différence significative entre sujets sains et sujets malades. Dans les deux autres cas, l'étude pourrait se faire de façon intra-animale, puisqu'il s'agit d'une méthode consistant à rigidifier l'aorte ou la carotide d'un seul côté. La comparaison peut donc être effectuée entre les deux hémisphères du cerveau sur les semaines suivant la chirurgie.

10.1.5 Transfert de la méthode en clinique

Cette méthode présente également de nombreux avantages pour l'utilisation en clinique, comme la portabilité, le faible coût ou encore la rapidité de l'examen (en comparaison avec un IRM par exemple). Comme on l'a vu dans la revue de littérature, l'ULM a d'ores et déjà été testée avec succès chez l'humain. Sur le long terme, il serait donc intéressant de tester également DULM sur l'humain, notamment sur des sujets atteints d'athérosclérose, afin de voir si la pulsatilité mesurée dans les microvaisseaux cérébraux grâce à cette méthode est significativement plus élevée chez ces sujets comparés à des sujets sains. Cette méthode pourrait également être utilisée chez l'humain dans le cadre de l'étude de traitements pour atténuer la pulsatilité dans l'arbre vasculaire, et éviter ainsi les dommages cérébraux qui pourraient en résulter sur le long terme.

10.2 Recommandations - diffusion et impact des travaux de recherche

L'autrice tient également à souligner la place qu'a eu la diffusion des travaux de recherche dans cette thèse, que ce soit auprès de ses pairs ou auprès du grand public. De nombreux outils sont aujourd'hui à la disposition des étudiants qui souhaitent se former en vulgarisation et diffuser leurs travaux de recherche, qu'il s'agisse de cours, de formations, d'ateliers ou encore de concours. Cette démarche peut permettre de prendre du recul sur son sujet de recherche, et les compétences acquises peuvent être réutilisées de façon transversale. Ces efforts devraient donc également être encouragés, quelle que soit la carrière que l'on envisage à la suite de la thèse.

10.3 Conclusion générale

Cette thèse présente le développement de DULM, une nouvelle méthode d'imagerie ultrasonore. Nous avons pu montrer que DULM pouvait, pour la première fois, réaliser des mesures de pulsatilité en profondeur, dans tout l'arbre vasculaire, avec une résolution spatiale inférieure à la

longueur d'onde et une résolution temporelle suffisante pour mesurer des variations de vitesse au cours du cycle cardiaque. Cette méthode pourrait permettre le développement de nouveaux biomarqueurs permettant de mieux comprendre l'impact de la pulsatilité au niveau du cerveau, dans le cadre de l'étude du lien entre maladies cardiovasculaires et neurodégénératives.

RÉFÉRENCES

- [1] D. Barić, « Why pulsatility still matters: a review of current knowledge », *Croat Med J*, vol. 55, n° 6, p. 609-620, déc. 2014, doi: 10.3325/cmj.2014.55.609.
- [2] T.-T. N *et al.*, « Impact of pulse pressure on cerebrovascular events leading to age-related cognitive decline », *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 314, n° 6, janv. 2018, doi: 10.1152/ajpheart.00637.2017.
- [3] E. G. Lakatta, M. Wang, et S. S. Najjar, « Arterial Aging and Subclinical Arterial Disease are Fundamentally Intertwined at Macroscopic and Molecular Levels », *Medical Clinics of North America*, vol. 93, n° 3, p. 583-604, mai 2009, doi: 10.1016/j.mcna.2009.02.008.
- [4] G. F. Mitchell, « Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage », *Journal of Applied Physiology*, vol. 105, n° 5, p. 1652-1660, nov. 2008, doi: 10.1152/jappphysiol.90549.2008.
- [5] M. P. Pase, A. Herbert, N. A. Grima, A. Pipingas, et M. F. O'Rourke, « Arterial stiffness as a cause of cognitive decline and dementia: a systematic review and meta-analysis », *Intern Med J*, vol. 42, n° 7, p. 808-815, juill. 2012, doi: 10.1111/j.1445-5994.2011.02645.x.
- [6] G. F. Mitchell, « Aortic stiffness, pressure and flow pulsatility, and target organ damage », *Journal of Applied Physiology*, vol. 125, n° 6, p. 1871-1880, déc. 2018, doi: 10.1152/jappphysiol.00108.2018.
- [7] R. Aaslid, T. M. Markwalder, et H. Nornes, « Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries », *J. Neurosurg.*, vol. 57, n° 6, p. 769-774, déc. 1982, doi: 10.3171/jns.1982.57.6.0769.
- [8] E.-Y. Lim, D.-W. Yang, A.-H. Cho, et Y. S. Shim, « Cerebrovascular Hemodynamics on Transcranial Doppler Ultrasonography and Cognitive Decline in Mild Cognitive Impairment », *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 65, n° 2, p. 651-657, janv. 2018, doi: 10.3233/JAD-180026.
- [9] M. Holmgren, A. Wåhlin, T. Dunås, J. Malm, et A. Eklund, « Assessment of Cerebral Blood Flow Pulsatility and Cerebral Arterial Compliance With 4D Flow MRI », *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. n/a, n° n/a, doi: 10.1002/jmri.26978.
- [10] E. Guevara, N. Sadekova, H. Girouard, et F. Lesage, « Optical imaging of resting-state functional connectivity in a novel arterial stiffness model », *Biomed Opt Express*, vol. 4, n° 11, p. 2332-2346, oct. 2013, doi: 10.1364/BOE.4.002332.
- [11] O. de Montgolfier *et al.*, « High Systolic Blood Pressure Induces Cerebral Microvascular Endothelial Dysfunction, Neurovascular Unit Damage, and Cognitive Decline in Mice », *Hypertension*, vol. 73, n° 1, p. 217-228, janv. 2019, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12048.
- [12] J. Bercoff, *Ultrafast Ultrasound Imaging*. IntechOpen, 2011. doi: 10.5772/19729.
- [13] O. Couture, M. Tanter, et M. Fink, « Method and Device for Ultrasound Imaging », US20130301382A1, 14 novembre 2013 Consulté le: 12 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US20130301382A1/en>
- [14] C. Errico *et al.*, « Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging », *Nature*, vol. 527, n° 7579, p. 499-502, nov. 2015, doi: 10.1038/nature16066.
- [15] O. Couture, V. Hingot, B. Heiles, P. Muleki Seya, et M. Tanter, « Ultrasound Localization Microscopy and Super-Resolution: A State of the Art », *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. PP, p. 1-1, juin 2018, doi: 10.1109/TUFFC.2018.2850811.

- [16] K. Christensen-Jeffries *et al.*, « Super-resolution Ultrasound Imaging », *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 46, n° 4, p. 865-891, avr. 2020, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.11.013.
- [17] « Figure: Irrigation sanguine du cerveau », *Manuels MSD pour le grand public*. <https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/multimedia/figure/irrigation-sanguine-du-cerveau> (consulté le 10 avril 2023).
- [18] A. J. Cocciolone, J. Z. Hawes, M. C. Staiculescu, E. O. Johnson, M. Murshed, et J. E. Wagenseil, « Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease », *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 315, n° 2, p. H189-H205, août 2018, doi: 10.1152/ajpheart.00087.2018.
- [19] J. Bellien, « Exploration biologique de la fonction endothéliale », *Revue Francophone des Laboratoires*, vol. 2020, n° 523, p. 45-51, juin 2020, doi: 10.1016/S1773-035X(20)30199-4.
- [20] C.-H. Cottart, C. Laguillier, V. Nivet-Antoine, C. Klimczak, C. Sebban, et J.-L. Beaudoux, « Biologie du vieillissement artériel et artériosclérose », *Comptes Rendus Biologies*, vol. 332, n° 5, p. 433-447, mai 2009, doi: 10.1016/j.crv.2008.10.002.
- [21] J. C. Kohn, M. C. Lampi, et C. A. Reinhart-King, « Age-related vascular stiffening: causes and consequences », *Front Genet*, vol. 6, p. 112, 2015, doi: 10.3389/fgene.2015.00112.
- [22] M. Rahman et A. B. Siddik, « Anatomy, Arterioles », in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. Consulté le: 3 mars 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555921/>
- [23] O. de Montgolfier, « Rôle de la pression pulsée dans la détérioration des fonctions cérébrovasculaires et cognitives, avec l'âge et en association avec des facteurs de risque vasculaires », mars 2020, Consulté le: 9 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/23542>
- [24] S. J. Marchais, A. P. Guerin, B. Pannier, G. Delavaud, et G. M. London, « Arterial compliance and blood pressure », *Drugs*, vol. 46 Suppl 2, p. 82-87, 1993, doi: 10.2165/00003495-199300462-00015.
- [25] R. Chaudhry, J. H. Miao, et A. Rehman, « Physiology, Cardiovascular », in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Consulté le: 4 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493197/>
- [26] D. College, « 20.2 Blood Flow, Blood Pressure, and Resistance », août 2017, Consulté le: 1 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://pressbooks.bccampus.ca/dcbiol11031109/chapter/20-2-blood-flow-blood-pressure-and-resistance/>
- [27] O. de Montgolfier, N. Thorin-Trescases, et E. Thorin, « Pathological Continuum From the Rise in Pulse Pressure to Impaired Neurovascular Coupling and Cognitive Decline », *American Journal of Hypertension*, vol. 33, n° 5, p. 375-390, avr. 2020, doi: 10.1093/ajh/hpaa001.
- [28] R. G. Gosling et D. H. King, « Arterial Assessment by Doppler-shift Ultrasound », *Proc R Soc Med*, vol. 67, n° 6 Pt 1, p. 447-449, juin 1974.
- [29] P. L., « Applications cliniques de l'examen Doppler transcutané », *Velocimétrie Ultrasonor Doppler*, p. 213-240, 1974.
- [30] A. Uryga, M. Kasproicz, L. Calviello, R. R. Diehl, K. Kaczmarek, et M. Czosnyka, « Assessment of cerebral hemodynamic parameters using pulsatile versus non-pulsatile cerebral blood outflow models », *J Clin Monit Comput*, vol. 33, n° 1, p. 85-94, févr. 2019, doi: 10.1007/s10877-018-0136-1.

- [31] C. Molnar et J. Gair, « 21.4. Blood Flow and Blood Pressure Regulation », mai 2015, Consulté le: 1 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://opentextbc.ca/biology/chapter/21-4-blood-flow-and-blood-pressure-regulation/>
- [32] The Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration, « Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values' », *European Heart Journal*, vol. 31, n° 19, p. 2338-2350, oct. 2010, doi: 10.1093/eurheartj/ehq165.
- [33] J. D. Pollock, I. V. Murray, S. J. Bordes, et A. N. Makaryus, « Physiology, Cardiovascular Hemodynamics », in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Consulté le: 12 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470310/>
- [34] H. R. Muñoz et C. M. Sacco, « Cardiac mechanical energy and effects on the arterial tree », *J Cardiothorac Vasc Anesth*, vol. 11, n° 3, p. 289-298, mai 1997, doi: 10.1016/s1053-0770(97)90098-7.
- [35] O. Frank, « The basic shape of the arterial pulse. First treatise: Mathematical analysis », *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 22, n° 3, p. 255-277, mars 1990, doi: 10.1016/0022-2828(90)91460-O.
- [36] P. W. Pires, C. M. Dams Ramos, N. Matin, et A. M. Dorrance, « The effects of hypertension on the cerebral circulation », *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 304, n° 12, p. H1598-1614, juin 2013, doi: 10.1152/ajpheart.00490.2012.
- [37] M. Félétou, R. Busse, G. Edwards, I. Fleming, A. H. Weston, et P. M. Vanhoutte, « Dialogue entre cellules endothéliales et cellules musculaires lisses », *Med Sci (Paris)*, vol. 19, n° 12, Art. n° 12, déc. 2003, doi: 10.1051/medsci/200319121242.
- [38] N. Thorin-Trescases et E. Thorin, « Lifelong Cyclic Mechanical Strain Promotes Large Elastic Artery Stiffening: Increased Pulse Pressure and Old Age-Related Organ Failure », *Canadian Journal of Cardiology*, vol. 32, n° 5, p. 624-633, mai 2016, doi: 10.1016/j.cjca.2015.12.022.
- [39] « Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises | Circulation ». <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.0000048892.83521.58> (consulté le 10 avril 2023).
- [40] « Echocardiographic assessment of a normal adult aging population. | Circulation ». <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.56.2.273> (consulté le 10 avril 2023).
- [41] J. E. Wagenseil et R. P. Mecham, « Elastin in large artery stiffness and hypertension », *J Cardiovasc Transl Res*, vol. 5, n° 3, p. 264-273, juin 2012, doi: 10.1007/s12265-012-9349-8.
- [42] D. S. Celermajer, K. E. Sorensen, D. J. Spiegelhalter, D. Georgakopoulos, J. Robinson, et J. E. Deanfield, « Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women », *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 24, n° 2, p. 471-476, août 1994, doi: 10.1016/0735-1097(94)90305-0.
- [43] Z. Springo *et al.*, « Aging impairs myogenic adaptation to pulsatile pressure in mouse cerebral arteries », *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 35, n° 4, p. 527-530, avr. 2015, doi: 10.1038/jcbfm.2014.256.
- [44] P. Libby, P. M. Ridker, et A. Maseri, « Inflammation and Atherosclerosis », *Circulation*, vol. 105, n° 9, p. 1135-1143, mars 2002, doi: 10.1161/hc0902.104353.
- [45] G. F. Mitchell *et al.*, « Arterial stiffness, pressure and flow pulsatility and brain structure and function: the Age, Gene/Environment Susceptibility – Reykjavik Study », *Brain*, vol. 134, n° 11, p. 3398-3407, nov. 2011, doi: 10.1093/brain/awr253.

- [46] G. F. Mitchell *et al.*, « Changes in Arterial Stiffness and Wave Reflection With Advancing Age in Healthy Men and Women », *Hypertension*, vol. 43, n° 6, p. 1239-1245, juin 2004, doi: 10.1161/01.HYP.0000128420.01881.aa.
- [47] T. T. van Sloten, A. D. Protogerou, R. M. A. Henry, M. T. Schram, L. J. Launer, et C. D. A. Stehouwer, « Association between arterial stiffness, cerebral small vessel disease and cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis », *Neurosci Biobehav Rev*, vol. 53, p. 121-130, juin 2015, doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.03.011.
- [48] G. L. Baumbach, « Effects of Increased Pulse Pressure on Cerebral Arterioles », *Hypertension*, vol. 27, n° 2, p. 159-167, févr. 1996, doi: 10.1161/01.HYP.27.2.159.
- [49] P. H. Charlton, J. Mariscal Harana, S. Vennin, Y. Li, P. Chowienczyk, et J. Alastruey, « Modeling arterial pulse waves in healthy aging: a database for in silico evaluation of hemodynamics and pulse wave indexes », *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 317, n° 5, p. H1062-H1085, nov. 2019, doi: 10.1152/ajpheart.00218.2019.
- [50] D. Ho, X. Zhao, S. Gao, C. Hong, D. E. Vatner, et S. F. Vatner, « Heart Rate and Electrocardiography Monitoring in Mice », *Curr Protoc Mouse Biol*, vol. 1, p. 123-139, mars 2011, doi: 10.1002/9780470942390.mo100159.
- [51] L. E. Moses, « Heart Rate of the Albino Rat. », *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 63, n° 1, p. 58-62, oct. 1946, doi: 10.3181/00379727-63-15492.
- [52] A. B. Newberg *et al.*, « Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Pilot Study of Cerebral Blood Flow Patterns Employing SPECT Imaging in Dental Postsurgical Pain Patients With and Without Pain Relief », *Clinical Therapeutics*, vol. 33, n° 12, p. 1894-1903, déc. 2011, doi: 10.1016/j.clinthera.2011.10.013.
- [53] N. J. Shah *et al.*, « Advances in multimodal neuroimaging: Hybrid MR–PET and MR–PET–EEG at 3T and 9.4T », *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 229, p. 101-115, avr. 2013, doi: 10.1016/j.jmr.2012.11.027.
- [54] S. A. Hilli, V. Mathew, et Z. T. Jaleel, « Unusual CT perfusion imaging pattern with normal CT angiography due to unintended intra-arterial contrast injection; report of 2 cases », *Radiology Case Reports*, vol. 16, n° 7, p. 1794-1797, juill. 2021, doi: 10.1016/j.radcr.2021.04.002.
- [55] A. Del Guerra et N. Belcari, « State-of-the-art of PET, SPECT and CT for small animal imaging », *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, vol. 583, n° 1, p. 119-124, déc. 2007, doi: 10.1016/j.nima.2007.08.187.
- [56] S. C. Bosshard, F. Stuker, C. von Deuster, A. Schroeter, et M. Rudin, « BOLD fMRI of C-Fiber Mediated Nociceptive Processing in Mouse Brain in Response to Thermal Stimulation of the Forepaws », *PLOS ONE*, vol. 10, n° 5, p. e0126513, mai 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126513.
- [57] F. Andreelli et H. Mosbah, « IRM fonctionnelle cérébrale : les principes », *Médecine des Maladies Métaboliques*, vol. 8, n° 1, p. 13-19, févr. 2014, doi: 10.1016/S1957-2557(14)70677-7.
- [58] A. Sun, B. Zhao, R. Li, et C. Yuan, « 4D real-time phase-contrast flow MRI with sparse sampling », in *2017 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, juill. 2017, p. 3252-3255. doi: 10.1109/EMBC.2017.8037550.
- [59] K. M. van Hespén, H. J. Kuijf, J. Hendrikse, P. R. Luijten, et J. J. M. Zwanenburg, « Blood Flow Velocity Pulsatility and Arterial Diameter Pulsatility Measurements of the Intracranial

- Arteries Using 4D PC-MRI », *Neuroinformatics*, vol. 20, n° 2, p. 317-326, 2022, doi: 10.1007/s12021-021-09526-7.
- [60] L. M. Gottwald *et al.*, « High Spatiotemporal Resolution 4D Flow MRI of Intracranial Aneurysms at 7T in 10 Minutes », *American Journal of Neuroradiology*, vol. 41, n° 7, p. 1201-1208, juill. 2020, doi: 10.3174/ajnr.A6603.
- [61] J. J. Iliff *et al.*, « Cerebral Arterial Pulsation Drives Paravascular CSF–Interstitial Fluid Exchange in the Murine Brain », *J. Neurosci.*, vol. 33, n° 46, p. 18190-18199, nov. 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1592-13.2013.
- [62] S. Hu et L. Wang, « Neurovascular photoacoustic tomography », *Frontiers in Neuroenergetics*, vol. 2, 2010, Consulté le: 14 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnene.2010.00010>
- [63] B. Baumann *et al.*, « Total retinal blood flow measurement with ultrahigh speed swept source/Fourier domain OCT », *Biomed. Opt. Express*, *BOE*, vol. 2, n° 6, p. 1539-1552, juin 2011, doi: 10.1364/BOE.2.001539.
- [64] E. Baraghis *et al.*, « Measurement of cerebral microvascular compliance in a model of atherosclerosis with optical coherence tomography », *Biomed. Opt. Express*, *BOE*, vol. 2, n° 11, p. 3079-3093, nov. 2011, doi: 10.1364/BOE.2.003079.
- [65] L. H. Lowe et Z. Bailey, « State-of-the-Art Cranial Sonography: Part 1, Modern Techniques and Image Interpretation », *American Journal of Roentgenology*, vol. 196, n° 5, p. 1028-1033, mai 2011, doi: 10.2214/AJR.10.6160.
- [66] J. D. Kirsch, M. Mathur, M. H. Johnson, G. Gowthaman, et L. M. Scoutt, « Advances in Transcranial Doppler US: Imaging Ahead », *RadioGraphics*, vol. 33, n° 1, p. E1-E14, janv. 2013, doi: 10.1148/rg.331125071.
- [67] P. Bonnin *et al.*, « Impact of intracranial blood-flow redistribution on stroke size during ischemia–reperfusion in 7-day-old rats », *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 198, n° 1, p. 103-109, mai 2011, doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.02.030.
- [68] L. Li, Z. Ke, K. Y. Tong, et M. Ying, « Evaluation of Cerebral Blood Flow Changes in Focal Cerebral Ischemia Rats by Using Transcranial Doppler Ultrasonography », *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 36, n° 4, p. 595-603, avr. 2010, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2010.01.005.
- [69] L. Cahill, Y.-Q. Zhou, M. Seed, C. Macgowan, et J. Sled, « Brain Sparing in Fetal Mice: BOLD MRI and Doppler Ultrasound Show Blood Redistribution During Hypoxia », *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 34, avr. 2014, doi: 10.1038/jcbfm.2014.62.
- [70] C. K. Macgowan, S. J. Stoops, Y.-Q. Zhou, L. S. Cahill, et J. G. Sled, « Evaluation of Cerebrovascular Impedance and Wave Reflection in Mouse by Ultrasound », *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 35, n° 3, p. 521-526, mars 2015, doi: 10.1038/jcbfm.2014.229.
- [71] C. K. L. Phoon, « Imaging Tools for the Developmental Biologist: Ultrasound Biomicroscopy of Mouse Embryonic Development », *Pediatr Res*, vol. 60, n° 1, Art. n° 1, juill. 2006, doi: 10.1203/01.pdr.0000219441.28206.79.
- [72] A. Ng et J. Swanevelder, « Resolution in ultrasound imaging », *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, vol. 11, n° 5, p. 186-192, oct. 2011, doi: 10.1093/bjaceaccp/mkr030.
- [73] T. Farncombe et K. Iniewski, *Medical Imaging: Technology and Applications*. CRC Press, 2017.

- [74] M. Vega, « High Frequency Linear Array Transducers | High Frequency Ultrasound Transducer », *Verasonics*, 30 décembre 2015. <https://verasonics.com/high-frequency-transducers/> (consulté le 26 mai 2023).
- [75] B. Müller *et al.*, « High-resolution tomographic imaging of microvessels », *Proc SPIE*, vol. 7078, p. 70780B, août 2008, doi: 10.1117/12.794157.
- [76] F. S. Foster *et al.*, « A new 15-50 MHz array-based micro-ultrasound scanner for preclinical imaging », *Ultrasound Med Biol*, vol. 35, n° 10, p. 1700-1708, oct. 2009, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2009.04.012.
- [77] H. B. Skinner, « Velocity-Diameter Relationships of the Microcirculation », *Medical Informatics*, vol. 4, n° 4, p. 243-256, janv. 1979, doi: 10.3109/14639237909017762.
- [78] D. A. Christopher, « Detecting, measuring, and imaging the microcirculation with high-frequency Doppler ultrasound », University of Toronto., 2000. Consulté le: 9 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/12998/1/NQ41417.pdf>
- [79] D. A. Christopher, P. N. Burns, B. G. Starkoski, et F. S. Foster, « A high-frequency pulsed-wave Doppler ultrasound system for the detection and imaging of blood flow in the microcirculation », *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 23, n° 7, p. 997-1015, janv. 1997, doi: 10.1016/S0301-5629(97)00076-8.
- [80] D. E. Goertz, D. A. Christopher, J. L. Yu, R. S. Kerbel, P. N. Burns, et F. S. Foster, « High-frequency color flow imaging of the microcirculation », *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 26, n° 1, p. 63-71, janv. 2000, doi: 10.1016/S0301-5629(99)00101-5.
- [81] D. A. Christopher, P. N. Burns, J. Armstrong, et F. S. Foster, « A high-frequency continuous-wave Doppler ultrasound system for the detection of blood flow in the microcirculation », *Ultrasound Med Biol*, vol. 22, n° 9, p. 1191-1203, 1996, doi: 10.1016/s0301-5629(96)00153-6.
- [82] G. Montaldo, M. Tanter, J. Bercoff, N. Benech, et M. Fink, « Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography », *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 56, n° 3, p. 489-506, mars 2009, doi: 10.1109/TUFFC.2009.1067.
- [83] J. Bercoff *et al.*, « Ultrafast compound Doppler imaging: providing full blood flow characterization », *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 58, n° 1, p. 134-147, janv. 2011, doi: 10.1109/TUFFC.2011.1780.
- [84] M. Tanter et M. Fink, « Ultrafast imaging in biomedical ultrasound », *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 61, n° 1, p. 102-119, janv. 2014, doi: 10.1109/TUFFC.2014.6689779.
- [85] L. Sandrin, S. Catheline, M. Tanter, X. Hennequin, et M. Fink, « Time-resolved pulsed elastography with ultrafast ultrasonic imaging », *Ultrason Imaging*, vol. 21, n° 4, p. 259-272, oct. 1999, doi: 10.1177/016173469902100402.
- [86] J. S. Au, R. L. Hughson, et A. C. H. Yu, « Riding the Plane Wave: Considerations for In Vivo Study Designs Employing High Frame Rate Ultrasound », *Applied Sciences*, vol. 8, n° 2, Art. n° 2, févr. 2018, doi: 10.3390/app8020286.
- [87] E. E. Konofagou et J. Provost, « Electromechanical wave imaging for noninvasive mapping of the 3D electrical activation sequence in canines and humans in vivo », *J Biomech*, vol. 45, n° 5, p. 856-864, mars 2012, doi: 10.1016/j.jbiomech.2011.11.027.
- [88] C. Dmené *et al.*, « Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity », *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 34, n° 11, p. 2271-2285, nov. 2015, doi: 10.1109/TMI.2015.2428634.

- [89] B. Denarie *et al.*, « Coherent plane wave compounding for very high frame rate ultrasonography of rapidly moving targets », *IEEE Trans Med Imaging*, vol. 32, n° 7, p. 1265-1276, juill. 2013, doi: 10.1109/TMI.2013.2255310.
- [90] J. Poree, D. Posada, A. Hodzic, F. Tournoux, G. Cloutier, et D. Garcia, « High-Frame-Rate Echocardiography Using Coherent Compounding With Doppler-Based Motion-Compensation », *IEEE Trans Med Imaging*, vol. 35, n° 7, p. 1647-1657, juill. 2016, doi: 10.1109/TMI.2016.2523346.
- [91] G. C. Ng, S. S. Worrell, P. D. Freiburger, et G. E. Trahey, « A comparative evaluation of several algorithms for phase aberration correction », *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 41, n° 5, p. 631-643, sept. 1994, doi: 10.1109/58.308498.
- [92] W. Lambert, L. A. Cobus, M. Couade, M. Fink, et A. Aubry, « Reflection Matrix Approach for Quantitative Imaging of Scattering Media », *Phys. Rev. X*, vol. 10, n° 2, p. 021048, juin 2020, doi: 10.1103/PhysRevX.10.021048.
- [93] H. Bendjador, T. Deffieux, et M. Tanter, « The SVD Beamformer: Physical Principles and Application to Ultrafast Adaptive Ultrasound », *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 39, n° 10, p. 3100-3112, oct. 2020, doi: 10.1109/TMI.2020.2986830.
- [94] B.-F. Osmanski, E. Lecarpentier, G. Montaldo, V. Tsatsaris, P. Chavatte-Palmer, et M. Tanter, « Discriminative imaging of maternal and fetal blood flow within the placenta using ultrafast ultrasound », *Scientific Reports*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, sept. 2015, doi: 10.1038/srep13394.
- [95] J. Provost, W.-N. Lee, K. Fujikura, et E. E. Konofagou, « Imaging the electromechanical activity of the heart in vivo », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, n° 21, p. 8565-8570, mai 2011, doi: 10.1073/pnas.1011688108.
- [96] D. Maresca *et al.*, « Noninvasive Imaging of the Coronary Vasculature Using Ultrafast Ultrasound », *JACC Cardiovasc Imaging*, vol. 11, n° 6, p. 798-808, juin 2018, doi: 10.1016/j.jcmg.2017.05.021.
- [97] B.-F. Osmanski, M. Pernot, G. Montaldo, A. Bel, E. Messas, et M. Tanter, « Ultrafast Doppler Imaging of Blood Flow Dynamics in the Myocardium », *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 31, n° 8, p. 1661-1668, août 2012, doi: 10.1109/TMI.2012.2203316.
- [98] J. Vappou, J. Luo, et E. E. Konofagou, « Pulse Wave Imaging for Noninvasive and Quantitative Measurement of Arterial Stiffness In Vivo », *Am J Hypertens*, vol. 23, n° 4, p. 393-398, avr. 2010, doi: 10.1038/ajh.2009.272.
- [99] T. Deffieux, C. Demene, M. Pernot, et M. Tanter, « Functional ultrasound neuroimaging: a review of the preclinical and clinical state of the art », *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 50, p. 128-135, juin 2018, doi: 10.1016/j.conb.2018.02.001.
- [100] E. Macé, G. Montaldo, I. Cohen, M. Baulac, M. Fink, et M. Tanter, « Functional ultrasound imaging of the brain », *Nature Methods*, vol. 8, n° 8, p. 662-664, août 2011, doi: 10.1038/nmeth.1641.
- [101] E. Mace, G. Montaldo, B.-F. Osmanski, I. Cohen, M. Fink, et M. Tanter, « Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles », *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Contr.*, vol. 60, n° 3, p. 492-506, mars 2013, doi: 10.1109/TUFFC.2013.2592.
- [102] K. Blaize *et al.*, « Functional ultrasound imaging of deep visual cortex in awake nonhuman primates », *PNAS*, vol. 117, n° 25, p. 14453-14463, juin 2020, doi: 10.1073/pnas.1916787117.

- [103] M. Imbault, D. Chauvet, J.-L. Gennisson, L. Capelle, et M. Tanter, « Intraoperative Functional Ultrasound Imaging of Human Brain Activity », *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, août 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06474-8.
- [104] S. Soloukey *et al.*, « Functional Ultrasound (fUS) During Awake Brain Surgery: The Clinical Potential of Intra-Operative Functional and Vascular Brain Mapping », *Front Neurosci*, vol. 13, p. 1384, 2019, doi: 10.3389/fnins.2019.01384.
- [105] C. Demené, J. Mairesse, J. Baranger, M. Tanter, et O. Baud, « Ultrafast Doppler for neonatal brain imaging », *NeuroImage*, vol. 185, p. 851-856, janv. 2019, doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.04.016.
- [106] J. Baranger *et al.*, « Bedside functional monitoring of the dynamic brain connectivity in human neonates », *Nat Commun*, vol. 12, n° 1, Art. n° 1, févr. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21387-x.
- [107] J. Provost *et al.*, « 3D ultrafast ultrasound imaging in vivo », *Phys. Med. Biol.*, vol. 59, n° 19, p. L1-L13, sept. 2014, doi: 10.1088/0031-9155/59/19/L1.
- [108] M. Correia *et al.*, « Quantitative imaging of coronary flows using 3D ultrafast Doppler coronary angiography », *Phys Med Biol*, vol. 65, n° 10, p. 105013, juin 2020, doi: 10.1088/1361-6560/ab8d78.
- [109] C. Papadacci, E. A. Bunting, E. Y. Wan, P. Nauleau, et E. E. Konofagou, « 3D myocardial elastography and electromechanical wave imaging in vivo », *IEEE Trans Med Imaging*, vol. 36, n° 2, p. 618-627, févr. 2017, doi: 10.1109/TMI.2016.2623636.
- [110] C. Demené *et al.*, « 4D microvascular imaging based on ultrafast Doppler tomography », *NeuroImage*, vol. 127, p. 472-483, févr. 2016, doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.11.014.
- [111] C. Rabut *et al.*, « 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents », *Nature Methods*, vol. 16, n° 10, Art. n° 10, oct. 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0572-y.
- [112] J. Sauvage *et al.*, « 4D Functional Imaging of the Rat Brain Using a Large Aperture Row-Column Array », *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 39, n° 6, p. 1884-1893, juin 2020, doi: 10.1109/TMI.2019.2959833.
- [113] Rayleigh, « XXXI. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope », *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 8, n° 49, p. 261-274, oct. 1879, doi: 10.1080/14786447908639684.
- [114] Y. Desailly, J. Pierre, O. Couture, et M. Tanter, « Resolution limits of ultrafast ultrasound localization microscopy », *Phys. Med. Biol.*, vol. 60, n° 22, p. 8723-8740, nov. 2015, doi: 10.1088/0031-9155/60/22/8723.
- [115] E. Betzig *et al.*, « Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution », *Science*, vol. 313, n° 5793, p. 1642-1645, sept. 2006, doi: 10.1126/science.1127344.
- [116] K. Christensen-Jeffries, R. J. Browning, M.-X. Tang, C. Dunsby, et R. J. Eckersley, « In vivo acoustic super-resolution and super-resolved velocity mapping using microbubbles », *IEEE Trans Med Imaging*, vol. 34, n° 2, p. 433-440, févr. 2015, doi: 10.1109/TMI.2014.2359650.
- [117] O. M. Viessmann, R. J. Eckersley, K. Christensen-Jeffries, M. X. Tang, et C. Dunsby, « Acoustic super-resolution with ultrasound and microbubbles », *Phys Med Biol*, vol. 58, n° 18, p. 6447-6458, sept. 2013, doi: 10.1088/0031-9155/58/18/6447.
- [118] M. A. O'Reilly et K. Hynynen, « A super-resolution ultrasound method for brain vascular mapping », *Med Phys*, vol. 40, n° 11, p. 110701, nov. 2013, doi: 10.1118/1.4823762.
- [119] C. Demené *et al.*, « Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients », *Nat Biomed Eng*, vol. 5, n° 3, p. 219-228, mars 2021, doi: 10.1038/s41551-021-00697-x.

- [120] P. Cormier, J. Porée, C. Bourquin, et J. Provost, « Dynamic Myocardial Ultrasound Localization Angiography », *IEEE Transactions on Medical Imaging*, p. 1-1, 2021, doi: 10.1109/TMI.2021.3086115.
- [121] L. Milecki *et al.*, « A Deep Learning Framework for Spatiotemporal Ultrasound Localization Microscopy », *IEEE Trans Med Imaging*, vol. PP, févr. 2021, doi: 10.1109/TMI.2021.3056951.
- [122] B. Heiles, A. Chavignon, V. Hingot, P. Lopez, E. Teston, et O. Couture, « Performance benchmarking of microbubble-localization algorithms for ultrasound localization microscopy », *Nat Biomed Eng*, vol. 6, n° 5, p. 605-616, mai 2022, doi: 10.1038/s41551-021-00824-8.
- [123] P. Song, A. Manduca, J. D. Trzasko, R. E. Daigle, et S. Chen, « On the Effects of Spatial Sampling Quantization in Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging », *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 65, n° 12, p. 2264-2276, déc. 2018, doi: 10.1109/TUFFC.2018.2832600.
- [124] R. Parthasarathy, « Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers », *Nat Methods*, vol. 9, n° 7, Art. n° 7, juill. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2071.
- [125] D. Ackermann et G. Schmitz, « Detection and Tracking of Multiple Microbubbles in Ultrasound B-Mode Images », *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 63, n° 1, p. 72-82, janv. 2016, doi: 10.1109/TUFFC.2015.2500266.
- [126] J. Foiret, H. Zhang, T. Ilovitsh, L. Mahakian, S. Tam, et K. W. Ferrara, « Ultrasound localization microscopy to image and assess microvasculature in a rat kidney », *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, p. 13662, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13676-7.
- [127] P. Song *et al.*, « Improved Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging With Spatiotemporal Nonlocal Means Filtering and Bipartite Graph-Based Microbubble Tracking », *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 65, n° 2, p. 149-167, févr. 2018, doi: 10.1109/TUFFC.2017.2778941.
- [128] O. Solomon, R. J. G. van Sloun, H. Wijkstra, M. Mischi, et Y. C. Eldar, « Exploiting Flow Dynamics for Superresolution in Contrast-Enhanced Ultrasound », *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 66, n° 10, p. 1573-1586, oct. 2019, doi: 10.1109/TUFFC.2019.2926062.
- [129] H. W. Kuhn, « The Hungarian method for the assignment problem », *Naval Research Logistics Quarterly*, vol. 2, n° 1-2, p. 83-97, 1955, doi: 10.1002/nav.3800020109.
- [130] J. Munkres, « Algorithms for the Assignment and Transportation Problems », *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, vol. 5, n° 1, p. 32-38, mars 1957, doi: 10.1137/0105003.
- [131] R. E. Kalman, « A New Approach to Linear Filtering and Prediction Problems », *Journal of Basic Engineering*, vol. 82, n° 1, p. 35-45, mars 1960, doi: 10.1115/1.3662552.
- [132] N. Renaudin, C. Demené, A. Dizeux, N. Ialy-Radio, S. Pezet, et M. Tanter, « Functional ultrasound localization microscopy reveals brain-wide neurovascular activity on a microscopic scale », *Nat Methods*, vol. 19, n° 8, Art. n° 8, août 2022, doi: 10.1038/s41592-022-01549-5.
- [133] H. Ul Banna, B. Mitchell, S. Chen, et J. Palko, « Super-Resolution Ultrasound Localization Microscopy Using High-Frequency Ultrasound to Measure Ocular Perfusion Velocity in the Rat Eye », *Bioengineering*, vol. 10, n° 6, Art. n° 6, juin 2023, doi: 10.3390/bioengineering10060689.

- [134] B. Heiles *et al.*, « Ultrafast 3D Ultrasound Localization Microscopy Using a 32x32 Matrix Array », *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 38, n° 9, p. 2005-2015, sept. 2019, doi: 10.1109/TMI.2018.2890358.
- [135] S. Tang *et al.*, « Kalman Filter-Based Microbubble Tracking for Robust Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging », *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 67, n° 9, p. 1738-1751, sept. 2020, doi: 10.1109/TUFFC.2020.2984384.
- [136] V. Hingot, C. Errico, B. Heiles, L. Rahal, M. Tanter, et O. Couture, « Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localization Microscopy », *Sci Rep*, vol. 9, n° 1, p. 2456, déc. 2019, doi: 10.1038/s41598-018-38349-x.
- [137] H. Belgharbi *et al.*, « An Anatomically Realistic Simulation Framework for 3D Ultrasound Localization Microscopy », *IEEE Open Journal of Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 3, p. 1-13, 2023, doi: 10.1109/OJUFFC.2023.3235766.
- [138] C. Bourquin, J. Porée, F. Lesage, et J. Provost, « In vivo pulsatility measurement of cerebral microcirculation in rodents using Dynamic Ultrasound Localization Microscopy », *IEEE Transactions on Medical Imaging*, p. 1-1, 2021, doi: 10.1109/TMI.2021.3123912.
- [139] O. Couture, B. Besson, G. Montaldo, M. Fink, et M. Tanter, « Microbubble ultrasound super-localization imaging (MUSLI) », in *2011 IEEE International Ultrasonics Symposium*, oct. 2011, p. 1285-1287. doi: 10.1109/ULTSYM.2011.6293576.
- [140] M. Siepmann, G. Schmitz, J. Bzyl, M. Palmowski, et F. Kiessling, « Imaging tumor vascularity by tracing single microbubbles », in *2011 IEEE International Ultrasonics Symposium*, oct. 2011, p. 1906-1909. doi: 10.1109/ULTSYM.2011.0476.
- [141] M. R. Lowerison *et al.*, « Aging-related cerebral microvascular changes visualized using ultrasound localization microscopy in the living mouse », *Sci Rep*, vol. 12, n° 1, Art. n° 1, janv. 2022, doi: 10.1038/s41598-021-04712-8.
- [142] Y. Liao, X. Chen, S. Chen, H. Lin, et Y. Shen, « Super-resolution Imaging of Cerebral Vasculature in Transgenic Alzheimer's Disease Mice with Ultrasound Localization Microscopy », in *2022 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, oct. 2022, p. 1-4. doi: 10.1109/IUS54386.2022.9957654.
- [143] I. Taghavi *et al.*, « Ultrasound super-resolution imaging with a hierarchical Kalman tracker », *Ultrasonics*, vol. 122, p. 106695, mai 2022, doi: 10.1016/j.ultras.2022.106695.
- [144] Y. Yang *et al.*, « Assessment of Diabetic Kidney Disease Using Ultrasound Localization Microscopy: An in Vivo Feasibility Study in Rats », in *2018 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, oct. 2018, p. 1-4. doi: 10.1109/ULTSYM.2018.8579963.
- [145] F. Lin, S. Shelton, D. Espindola, J. Rojas, G. Pinton, et P. Dayton, « 3-D Ultrasound Localization Microscopy for Identifying Microvascular Morphology Features of Tumor Angiogenesis at a Resolution Beyond the Diffraction Limit of Conventional Ultrasound », *Theranostics*, vol. 7, p. 196-204, janv. 2017, doi: 10.7150/thno.16899.
- [146] J. Yu, L. Lavery, et K. Kim, « Super-resolution ultrasound imaging method for microvasculature in vivo with a high temporal accuracy », *Scientific Reports*, vol. 8, n° 1, Art. n° 1, sept. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-32235-2.
- [147] T. Opacic *et al.*, « Motion model ultrasound localization microscopy for preclinical and clinical multiparametric tumor characterization », *Nat Commun*, vol. 9, n° 1, p. 1527, déc. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03973-8.

- [148] D. Ghosh *et al.*, « Super-Resolution Ultrasound Imaging of Skeletal Muscle Microvascular Dysfunction in an Animal Model of Type 2 Diabetes », *J Ultrasound Med*, vol. 38, n° 10, p. 2589-2599, oct. 2019, doi: 10.1002/jum.14956.
- [149] Y. Hao *et al.*, « Non-rigid Motion Correction for Ultrasound Localization Microscopy of the Liver in vivo », in *2019 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, oct. 2019, p. 2263-2266. doi: 10.1109/ULTSYM.2019.8925749.
- [150] Y. Desailly, O. Couture, M. Fink, et M. Tanter, « Sono-activated ultrasound localization microscopy », *Applied Physics Letters*, vol. 103, n° 17, p. 174107, oct. 2013, doi: 10.1063/1.4826597.
- [151] B. Heiles *et al.*, « Volumetric Ultrasound Localization Microscopy of the Whole Rat Brain Microvasculature », *IEEE Open Journal of Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 2, p. 261-282, 2022, doi: 10.1109/OJUFFC.2022.3214185.
- [152] A. Chavignon, B. Heiles, V. Hingot, C. Orset, D. Vivien, et O. Couture, « 3D Transcranial Ultrasound Localization Microscopy in the Rat Brain With a Multiplexed Matrix Probe », *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 69, n° 7, p. 2132-2142, juill. 2022, doi: 10.1109/TBME.2021.3137265.
- [153] O. Demeulenaere *et al.*, « In vivo whole brain microvascular imaging in mice using transcranial 3D Ultrasound Localization Microscopy », *eBioMedicine*, vol. 79, p. 103995, mai 2022, doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103995.
- [154] O. Demeulenaere *et al.*, « Coronary Flow Assessment Using 3-Dimensional Ultrafast Ultrasound Localization Microscopy », *JACC: Cardiovascular Imaging*, vol. 15, n° 7, p. 1193-1208, juill. 2022, doi: 10.1016/j.jcmg.2022.02.008.
- [155] J. Zhu *et al.*, « 3D Super-Resolution US Imaging of Rabbit Lymph Node Vasculature in Vivo by Using Microbubbles », *Radiology*, vol. 291, n° 3, p. 642-650, juin 2019, doi: 10.1148/radiol.2019182593.
- [156] I. Taghavi *et al.*, « In vivo 3D Super-Resolution Ultrasound Imaging of a Rat Kidney using a Row-Column Array », in *2022 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, oct. 2022, p. 1-3. doi: 10.1109/IUS54386.2022.9957892.
- [157] T. M. Kierski *et al.*, « Super harmonic ultrasound for motion-independent localization microscopy: applications to microvascular imaging from low to high flow rates », *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 67, n° 5, p. 957-967, mai 2020, doi: 10.1109/TUFFC.2020.2965767.
- [158] B. Wang, J. Yan, K. Riemer, M. Toulemonde, J. Hansen-Shearer, et M.-X. Tang, « Comparison of localization methods for 3D Super-Resolution Ultrasound Imaging », in *2022 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, oct. 2022, p. 1-3. doi: 10.1109/IUS54386.2022.9957144.
- [159] M. R. Lowerison, C. Huang, F. Lucien, S. Chen, et P. Song, « Ultrasound localization microscopy of renal tumor xenografts in chicken embryo is correlated to hypoxia », *Scientific Reports*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, févr. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-59338-z.
- [160] C. Huang *et al.*, « Short Acquisition Time Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging via Microbubble Separation », *Scientific Reports*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, avr. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-62898-9.
- [161] M. L. Ommen *et al.*, « 3D Printed Flow Phantoms with Fiducial Markers for Super-Resolution Ultrasound Imaging », in *2018 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, oct. 2018, p. 1-9. doi: 10.1109/ULTSYM.2018.8580217.

- [162] H. Belgharbi *et al.*, « An Anatomically and Hemodynamically Realistic Simulation Framework for 3D Ultrasound Localization Microscopy », oct. 2021. doi: 10.1101/2021.10.08.463259.
- [163] S. Harput *et al.*, « Two-Stage Motion Correction for Super-Resolution Ultrasound Imaging in Human Lower Limb », *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 65, n° 5, p. 803-814, mai 2018, doi: 10.1109/TUFFC.2018.2824846.
- [164] C. Huang *et al.*, « Super-resolution ultrasound localization microscopy based on a high frame-rate clinical ultrasound scanner: an in-human feasibility study », *Phys. Med. Biol.*, vol. 66, n° 8, p. 08NT01, avr. 2021, doi: 10.1088/1361-6560/abef45.
- [165] R. J. G. van Sloun *et al.*, « Super-Resolution Ultrasound Localization Microscopy Through Deep Learning », *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 40, n° 3, p. 829-839, mars 2021, doi: 10.1109/TMI.2020.3037790.
- [166] E. Kanoulas *et al.*, « Super-Resolution Contrast-Enhanced Ultrasound Methodology for the Identification of In Vivo Vascular Dynamics in 2D », *Invest Radiol*, vol. 54, n° 8, p. 500-516, août 2019, doi: 10.1097/RLI.0000000000000565.
- [167] L. Denis *et al.*, « Sensing ultrasound localization microscopy for the visualization of glomeruli in living rats and humans », *eBioMedicine*, vol. 91, mai 2023, doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104578.
- [168] S. Dencks *et al.*, « Clinical Pilot Application of Super-Resolution US Imaging in Breast Cancer », *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 66, n° 3, p. 517-526, mars 2019, doi: 10.1109/TUFFC.2018.2872067.
- [169] V. Hingot *et al.*, « Early Ultrafast Ultrasound Imaging of Cerebral Perfusion correlates with Ischemic Stroke outcomes and responses to treatment in Mice », *Theranostics*, vol. 10, n° 17, p. 7480-7491, juin 2020, doi: 10.7150/thno.44233.
- [170] A. Chavignon, V. Hingot, C. Orset, D. Vivien, et O. Couture, « 3D transcranial ultrasound localization microscopy for discrimination between ischemic and hemorrhagic stroke in early phase », *Sci Rep*, vol. 12, n° 1, Art. n° 1, août 2022, doi: 10.1038/s41598-022-18025-x.
- [171] C. Bourquin *et al.*, « Quantitative pulsatility measurements using 3D Dynamic Ultrasound Localization Microscopy ». arXiv, 24 mars 2023. doi: 10.48550/arXiv.2303.14330.
- [172] S.-K. Wu *et al.*, « Characterization of Different Microbubbles in Assisting Focused Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening », *Sci Rep*, vol. 7, p. 46689, avr. 2017, doi: 10.1038/srep46689.
- [173] V. Perrot, M. Polichetti, F. Varray, et D. Garcia, « So you think you can DAS? A viewpoint on delay-and-sum beamforming », *Ultrasonics*, vol. 111, p. 106309, mars 2021, doi: 10.1016/j.ultras.2020.106309.
- [174] M. Wiersma, B. Heiles, D. Kalisvaart, D. Maresca, et C. S. Smith, « Retrieving Pulsatility in Ultrasound Localization Microscopy », *IEEE Open Journal of Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, vol. 2, p. 283-298, 2022, doi: 10.1109/OJUFFC.2022.3221354.
- [175] M. Madero *et al.*, « Association of Arterial Rigidity with Incident Kidney Disease and Kidney Function Decline: The Health ABC Study », *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 8, n° 3, p. 424, mars 2013, doi: 10.2215/CJN.07900812.
- [176] G. H. Heine, M. K. Gerhart, C. Ulrich, H. Kaler, et M. Girndt, « Renal Doppler resistance indices are associated with systemic atherosclerosis in kidney transplant recipients », *Kidney International*, vol. 68, n° 2, p. 878-885, août 2005, doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00470.x.
- [177] O. de Montgolfier *et al.*, « Systolic hypertension-induced neurovascular unit disruption magnifies vascular cognitive impairment in middle-age atherosclerotic LDLr-/-:hApoB+/+ mice », *Geroscience*, vol. 41, n° 5, p. 511-532, oct. 2019, doi: 10.1007/s11357-019-00070-6.

- [178] G. Muhire *et al.*, « Arterial Stiffness Due to Carotid Calcification Disrupts Cerebral Blood Flow Regulation and Leads to Cognitive Deficits », *J Am Heart Assoc*, vol. 8, n° 9, p. e011630, mai 2019, doi: 10.1161/JAHA.118.011630.