

L'imagerie fonctionnelle ultrasonore à résolution microscopique

NOÉMI RENAUDIN, MICKAEL TANTER
et SOPHIE PEZET

*Institut Physique pour la Médecine Paris, INSERM
U1273, ESPCI Paris, CNRS UMR 8063, PSL
Université Recherche, Paris, France*



Depuis les travaux fondateurs des anatomistes comme Ramon y Cajal ou Golgi qui ont apporté une connaissance structurale des constituants des systèmes nerveux périphériques et centraux, puis de l'électrophysiologie qui a permis de comprendre le fonctionnement des connections neuronales, la neuroimagerie permet d'étudier le fonctionnement du cerveau de façon intégrée.

Etude du fonctionnement cérébral

Les nombreuses techniques qui ont été développées mesurent des éléments physiques différents permettant d'imager et de quantifier la structure cérébrale (comme l'intégrité des substances blanche ou grise) ou enfin les changements neurophysiologiques liés à l'activation neuronale. L'étude de l'activité neuronale au niveau cérébral peut être réalisée par électrophysiologie, technique qui mesure directement l'activité neuronale dans un volume réduit de tissu, avec une résolution temporelle importante. Cependant, elle est invasive. La technique de l'électroencéphalogramme (EEG) permet également de mesurer l'activité neuronale, grâce à des électrodes qui sont placées sur le scalp. Cependant, celles-ci étant situées loin des structures cérébrales à étudier, la résolution spatiale est assez faible. D'autres techniques s'intéressent indirectement à l'activation neuronale comme l'imagerie PET (Imagerie par émission de positrons) qui mesure la consommation locale de glucose lors de l'activation neuronale,

l'imagerie des récepteurs, l'imagerie calcique ou enfin l'imagerie à sondes sensibles au potentiel électrochimique des neurones (qui sont toutes deux des techniques invasives).

Du fait de l'existence du ***couplage neurovasculaire***, qui est un mécanisme neurobiologique complexe mettant en œuvre de nombreux types cellulaires (neurones, cellules gliales et cellules du système vasculaire, figure 1A2), l'activation neuronale locale induit, via la libération de neuropeptides et autres substances vasoactives, la propagation d'un message rétrograde vasodilatateur tout le long de l'arbre vasculaire : des capillaires aux artères piales superficielles (figure 1A3). Les conséquences de ces mécanismes neuro-gliaux sont un afflux sanguin local (Figure 1A3). Une majorité des techniques de neuroimagerie cliniques utilisent ce principe pour étudier le fonctionnement cérébral. Chacune suit un des éléments de ce couplage. Par exemple, l'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique (fMRI) mesure

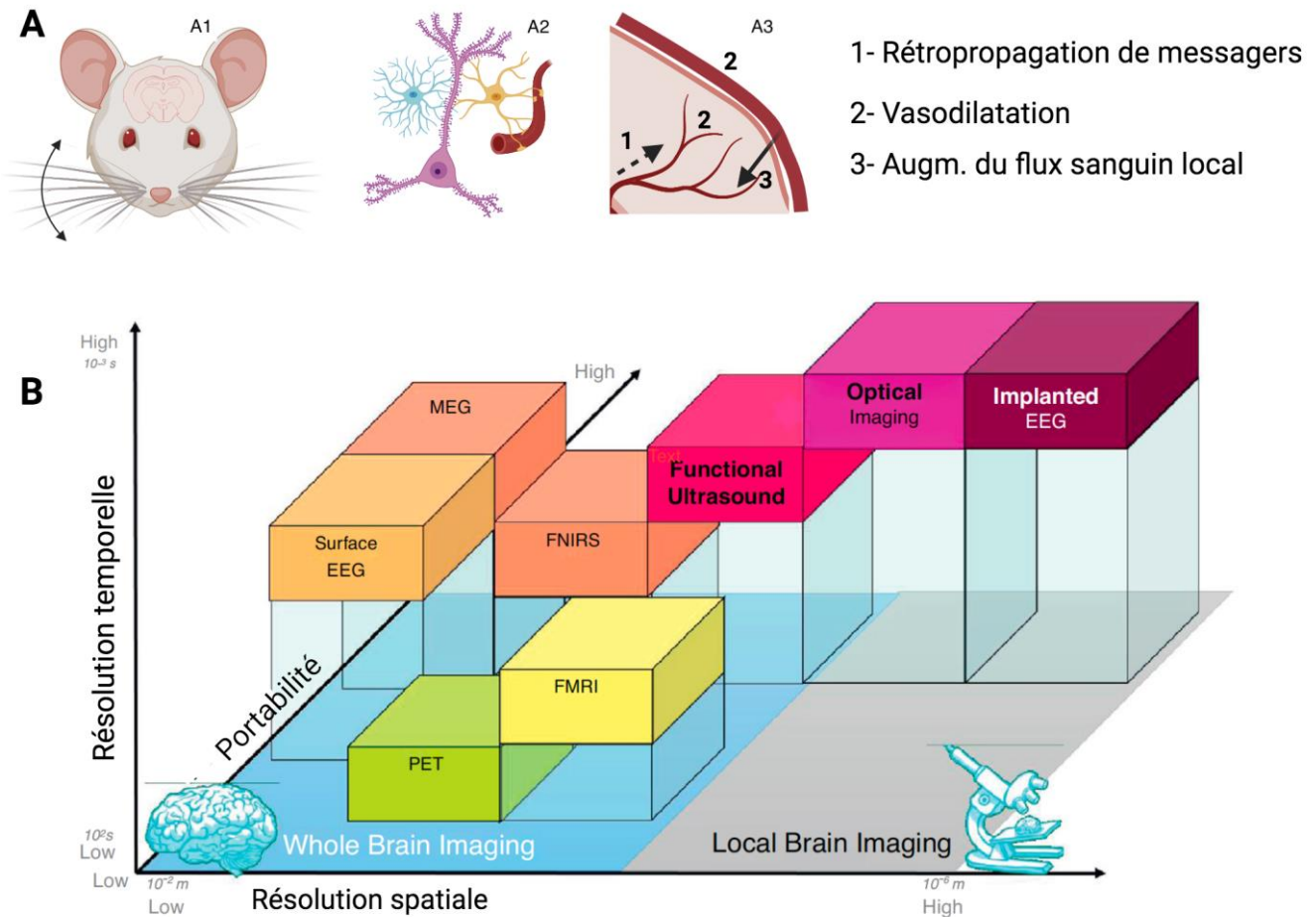


Figure 1 : Le couplage neurovasculaire est le principe neurobiologique à l'origine d'une majorité de techniques de neuroimagerie fonctionnelle. A: Schémas résumant le mécanisme du couplage neurovasculaire. Suite à une stimulation, (comme la déflexion des vibrisses chez le rongeur, (A1) ou à l'implication du sujet dans une tâche donnée, l'activation neuronale localisée induit, via un mécanisme complexe impliquant des cellules gliales et des cellules de l'intégrité vasculaire (A2). Il s'agit d'une augmentation du flux sanguin local, dû à un message rétrograde provenant des capillaires jusqu'aux artères piales superficielles et des artères pénétrantes (A3, mécanismes 1 à 3). B : Résumé et comparaison des résolutions spatiale et temporelle, ainsi que de la portabilité de grandes familles de modalités d'imagerie et d'étude du fonctionnement cérébral. Modifié de (2). MEG : Magnétoencéphalographie, EEG: Électroencéphalographie, FNIRS : Imagerie spectroscopique proche infrarouge, fMRI : Imagerie fonctionnelle par résonance magnétique, PET : Tomographie par émission de positons, FUS ; imagerie fonctionnelle ultrasonore.

la désoxygénation locale grâce à la mesure du signal BOLD (*Blood Oxygen Level-Dependent*) ; alors que l'imagerie optique de signaux intrinsèques ou de NIRS (*Near Infrared Spectroscopy*) mesure les variations de fluorescence de tissus au cours des variations de flux sanguin local.

Toutes ces techniques ont leurs forces et leurs faiblesses en termes de résolutions spatiales, temporelles, taille de la zone étudiée et enfin de la portabilité des dispositifs expérimentaux nécessaires. Certaines (comme les techniques d'imagerie optique) ont une excellente résolution spatiale (quelques micromètres à une centaine de micromètres), permettant d'identifier les compartiments vasculaires différents, mais un champ de vue restreint, ne permettant pas d'étudier avec une haute résolution spatiale le couplage sur une zone plus grande. A

l'inverse, les techniques qui ont un grand champ de vue (comme la fMRI), ont une résolution spatiale moins bonne (centaines de micromètres à quelques millimètres) et ainsi ne permettent pas d'étudier les changements d'activité neuronale ou les variations de flux sanguin local de façon très résolutive (Figure 1B). De plus, ces techniques varient grandement de par leur sensibilité et leur portabilité. La grande majorité ont une faible portabilité, rendant difficile l'imagerie chez l'animal vigile libre de ses mouvements.

Du fait de l'absence de méthodologies permettant de suivre les variations vasculaires cérébrales à plusieurs échelles (micro- et mésoscopique), certaines études fondamentales sur la physiologie cérébrale ou sur le rôle central des hormones sur la régulation vasculaire cérébrale n'ont pu être réalisées. En effet, aucune technique à ce jour ne peut mesurer simultanément en

détail les effets de l'activation neuronale à l'échelle microscopique dans des zones cérébrales distinctes et éloignées les unes des autres. **La technique d'imagerie idéale pour réaliser de telles études devrait avoir une excellente résolution spatiale, avec un large champ de vue.** De plus, afin de mieux cerner la physiologie de ces régulations, elle devrait être applicable à l'animal vigile.

L'imagerie de super-résolution ultrasonore

L'imagerie ultrasonore (ou échographique) est une modalité d'imagerie extrêmement utilisée en pratique clinique du fait de sa capacité à diagnostiquer un très grand nombre de pathologies des tissus mous du corps humain, de sa simplicité d'utilisation et de son relatif faible coût. L'imagerie ultrasonore a connu un bouleversement majeur au cours des 10 dernières années, avec le développement et l'utilisation dans le domaine des neurosciences de **l'imagerie ultrasonore ultrarapide** (La Lettre des Neurosciences n°42, 2012 et n°54, 2018). Sa cadence d'imagerie est fortement augmentée par rapport à l'imagerie ultrasonore conventionnelle et permet (grâce aussi à l'utilisation d'algorithmes de traitements de données de pointe) d'imager en plus des flux rapides, des flux beaucoup plus lents (1mm/sec), comme ceux observés au niveau des artérioles, ce qui n'était pas possible auparavant (1). Cette technique, qui a une excellente sensibilité aux

variations de flux sanguin locaux, permet l'étude du fonctionnement cérébral chez le nouveau-né humain et dans de nombreuses espèces animales (2) avec une excellente résolution spatiale (100 μ m) et temporelle (0,2 msec). Il est à noter, que du fait de l'existence d'une atténuation du signal et de la création d'aberrations au cours de la traversée des ondes dans le crâne, ces études sont réalisées dans des conditions où l'os est fin comme chez la souris adulte et le rat juvénile (où l'on image à travers la peau et le crâne), ou sans os. Ainsi, chez le nouveau-né humain, l'imagerie est réalisée au travers de la fontanelle. Enfin, chez le rat adulte, l'os crânien est remplacé par une fenêtre de plastique compatible (3).

En 2015, grâce à l'utilisation de nouveaux agents de contrastes (composés de microbulles détectables par les ultrasons) injectées par voie intraveineuse, nous avons développé une nouvelle technique de neuroimagerie extrêmement résolutive : **la super-résolution ultrasonore** (4).

Outre sa capacité à augmenter considérablement la sensibilité de la technique, permettant ainsi de s'affranchir des atténuations produites par l'os chez le rat adulte (5), elle permet pour la première fois la détection de l'arbre vasculaire avec une résolution d'une centaine de microns et un grand champ de vue pour des études cliniques (6) et pré-cliniques (4, 7). De plus, grâce au développement d'algorithmes complexes permettant le suivi individuel de ces microbulles, il est

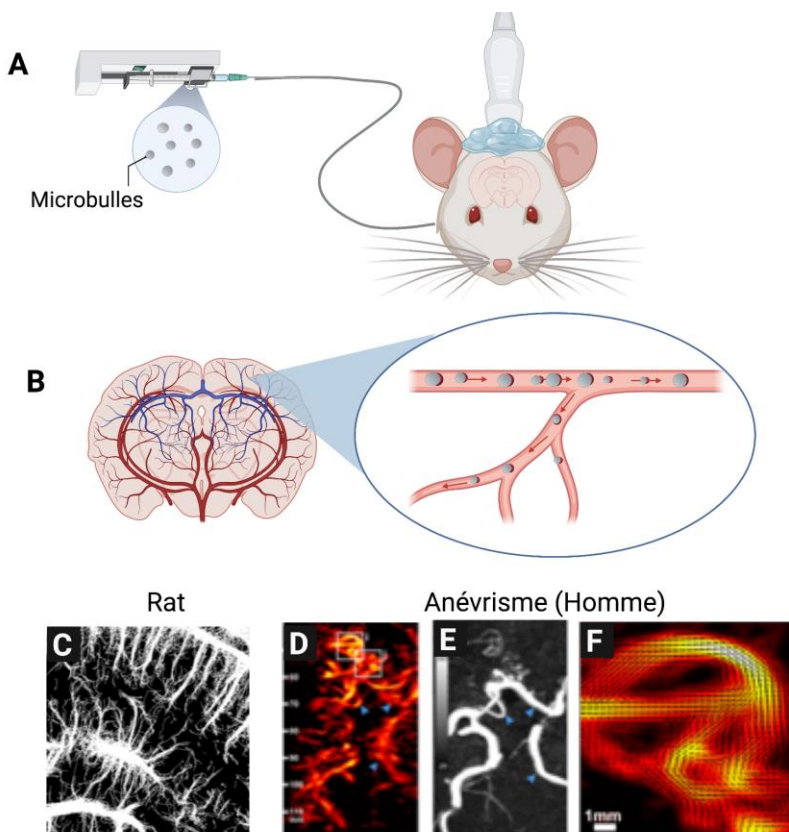
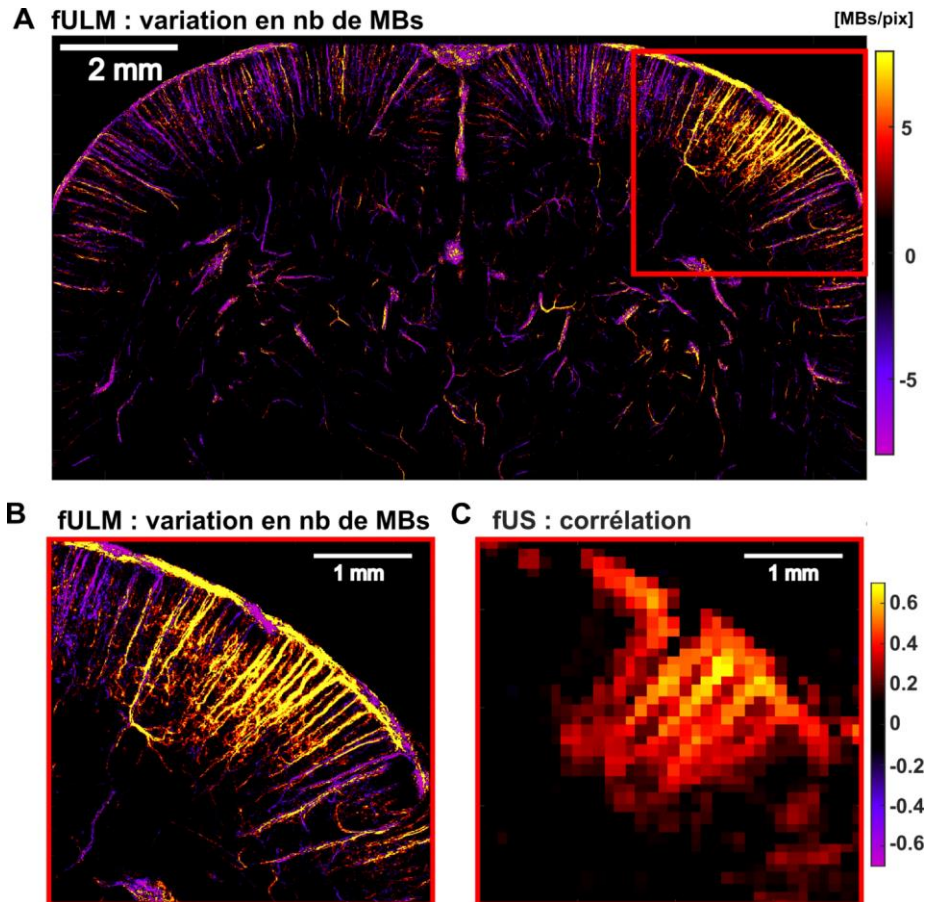


Figure 2 : Principe de la super-résolution ultrasonore (fULM) et application dans l'étude de la structure vasculaire à l'échelle microscopique chez le rongeur et dans les pathologies vasculaires chez l'Humain A-B : Mise en œuvre et principe de l'imagerie de super-résolution ultrasonore. Des microbulles sont injectées par voie intraveineuse au cours de la séance d'imagerie transcânienne chez le rongeur (seringue, A), détection et suivi de ces bulles. Exemples d'application de cette technique chez le rat (C) et chez l'Humain dans le cas d'un anévrisme (D-F). D représente une vue en imagerie de super-résolution et E une vue en angiographie par résonance magnétique, illustrant la grande sensibilité et résolution de l'imagerie de super-résolution comparée aux approches angiographiques classiquement utilisées. F : zone de l'anévrisme zoomée. La barre d'échelle en F mesure 0,2mm en C et 1mm en F.

Figure 3 : Comparaison entre les cartes d'activation fonctionnelle obtenues chez le même animal en imagerie fUS (C) et en imagerie fonctionnelle de super-résolution (A, B). L'imagerie de super-résolution ultrasonore permet d'imager une hyperhémie fonctionnelle sur cerveau entier avec une résolution micrométrique. (A-B) Cartes d'activation obtenues suite à une stimulation des vibrisses : cerveau entier (A) et zoom sur le cortex activé (B : carré rouge en A). (C) Par comparaison : carte correspondante obtenue par imagerie fUS chez le même animal.



possible de quantifier et suivre leur vitesse de déplacement dans les différents compartiments vasculaires (veines, artères, artérioles, veinules, Figure 2). Dans une étude clinique que notre laboratoire a réalisé avec l'université de Genève chez des patients suivis pour une pathologie vasculaire cérébrale, cette technique a permis de mettre en évidence la présence de vortex à l'intérieur de petits anévrysmes avec une extrême résolution (de l'ordre de centaines de microns) (Figure 2D - F). Cependant, jusqu'ici, sa faible résolution temporelle (il faut un temps d'acquisition de l'ordre de la minute pour obtenir une image) l'a limitée à des descriptions statiques des flux sanguins et l'a privée d'applications dynamiques, comme la neuroimagerie fonctionnelle.

Emergence d'une nouvelle technique d'étude du fonctionnement cérébral, via l'étude de l'hyperémie fonctionnelle, à une échelle microscopique et un large champ de vue

Dans une étude parue récemment dans le journal 'Nature Methods', notre équipe a repoussé encore les limites des techniques d'imagerie ultrasonore en faisant la preuve de concept d'une nouvelle technique de neuroimagerie fonctionnelle à une résolution micrométrique : **l'imagerie de super-résolution fonctionnelle** (fULM pour Fonctionnal ultrasound

localization microscopy)⁷. Dans cet article, suite à des stimulations visuelles ou somesthésiques de la moustache chez le rat anesthésié, les variations de flux sanguin induites dans les zones corticales et sous-corticales correspondantes sont mesurées avec une résolution spatio-temporelle excellente (1s ; 6.5µm) dans le cerveau de rats anesthésiés. De plus, il s'agit d'une méthode d'imagerie quantitative qui permet de quantifier simultanément l'augmentation du flux sanguin (via le flux de microbulles), de vitesse et de diamètre dans tous les vaisseaux du plan d'imagerie.

Pour la première fois, il a été possible de mesurer les conséquences de l'activation neuronale locale sur les vitesses de perfusion locale dans toutes les veines ou artères du plan d'imagerie, qu'elles se trouvent dans les zones activées et ou des zones contrôles, et de façon simultanée (Figure 3). Les analyses ont montré dans les artérioles de la zone cérébrale activée, une augmentation du nombre d'hématies et de la vitesse de perfusion uniquement dans les couches corticales 1 à 4 (Figures 4 A, C). Simultanément, notre étude décrit une activation du drainage veineux et sa vitesse de flux dans ces mêmes couches (Figures 4 B, D). De plus, l'activation neuronale induit une augmentation du diamètre des deux types de vaisseaux sanguins dans toutes les couches corticales (Figure 4 C, D).

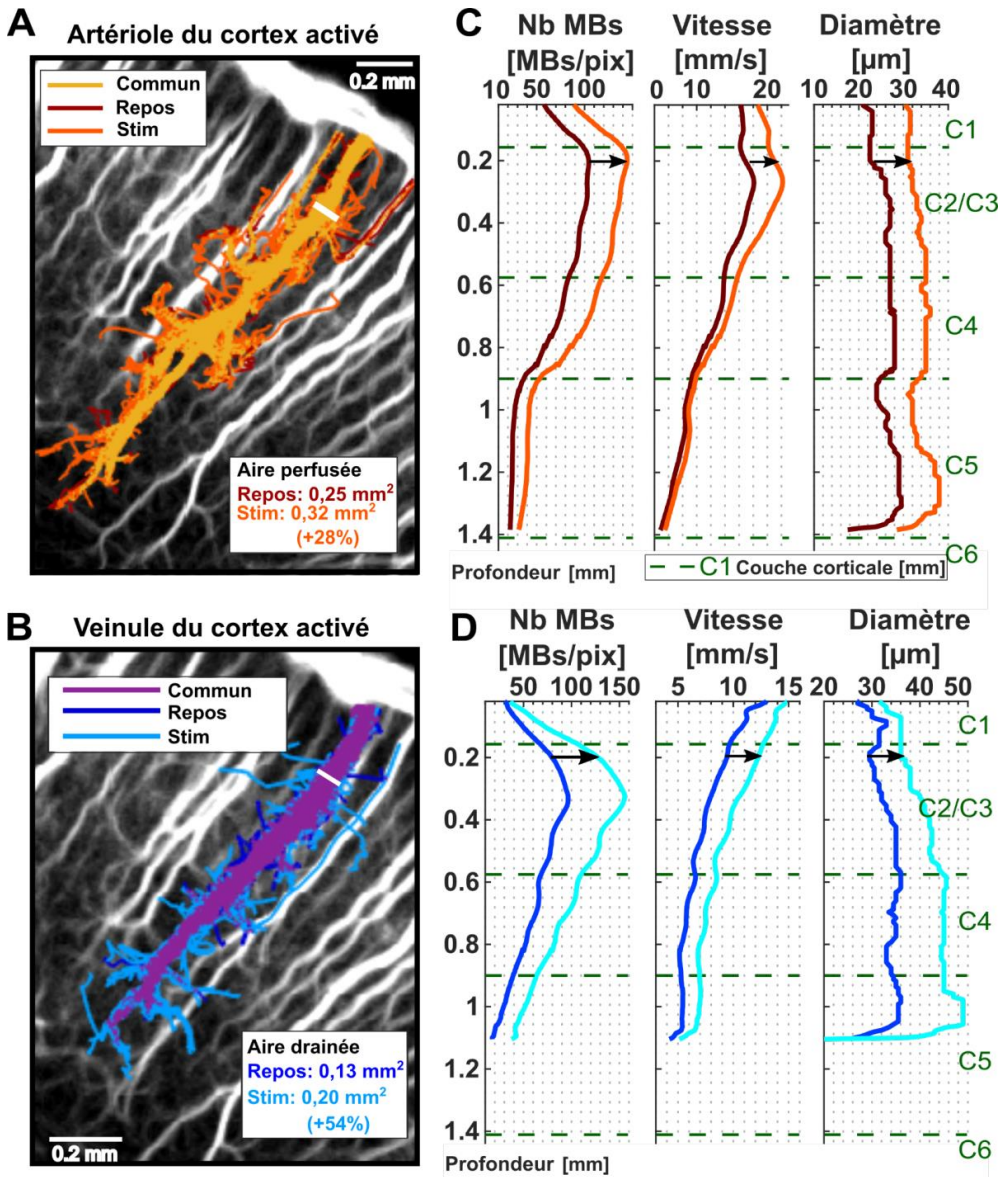


Figure 4 : L'imagerie de super résolution ultrasonore révèle une augmentation du nombre d'hématies et de la vitesse de perfusion dans les couches corticales 1 à 4, mais pas dans la couche 5 au cours de l'hyperémie fonctionnelle induite par stimulation des vibrisses. (A-B) Quantification au niveau d'une artériole (A) et veinule (B) du cortex activé. Les trajectoires des MBs (microbulles) pendant les périodes de repos ou de stimulation permettent de quantifier les différences d'aires perfusées ou drainées. (C-D) Mesures des variations en nombre de MBs, vitesse et diamètre le long de l'artériole (C) et de la veinule (D) montrées en (A) et (B) respectivement entre les périodes de repos et de stimulation des vibrisses.

Perspectives

Ce travail (8) est une première preuve de concept d'imagerie fonctionnelle du cerveau entier à résolution microscopique, ouvrant sur des travaux en cours et futurs visant à augmenter la robustesse expérimentale et celle des algorithmes de traitement du signal. Cette modalité unique devrait permettre d'étudier beaucoup plus finement le phénomène de couplage neurovasculaire. La notion d'unité neurovasculaire introduite il y a deux décennies par C. Iadecola ne tient pas compte de l'interaction coordonnée des microvaisseaux intracérébraux avec les artères plus grosses en amont et avec les signaux vasoactifs provenant de la périphérie, qui sont essentiels à la régulation dynamique de la fonction cérébrovasculaire (9). Ces considérations suggèrent le concept d'un complexe neurovasculaire composé de modules fonctionnels distincts englobant l'ensemble de l'arbre cérébrovasculaire et régulé par des facteurs

intrinsèques et extrinsèques au cerveau. En raison de son aspect multi-échelle, la super-résolution fonctionnelle ultrasonore devrait jouer un rôle clé dans la compréhension future de ce complexe. De plus, l'agent de contraste utilisé en imagerie ULM et fULM permet de s'affranchir de l'atténuation dû au crâne (5). Ainsi, les futurs travaux vont permettre d'étendre l'imagerie de super-résolution ultrasonore à de l'imagerie transcrânienne (au travers du crâne, donc non-invasive) chez l'animal éveillé et l'Homme. La possibilité d'imager en imagerie fUS au travers du crâne a déjà été réalisée chez le rongeur (5) et chez l'Homme (10), et la possibilité de faire de l'imagerie ultrasonore en éveillée chez le rongeur a aussi été établie (3, 11).

Récemment, le développement de diverses technologies de sondes ultrasonores couvrant l'intégralité du cerveau a permis de réaliser une imagerie de super-résolution tridimensionnelle chez la souris (12). A l'avenir, les études fonctionnelles de super-

résolution pourront ainsi être réalisées sur le cerveau entier de rongeurs (juvéniles ou adultes). De plus, au-delà de l'application de stimuli évoqués par des tâches, elle pourra à l'avenir être utilisée pour étudier l'activité cérébrale spontanée. Enfin, de nouveaux agents de contraste (vésicules de gaz pouvant être encodées génétiquement par des bactéries ou des cellules eucaryotes) sont actuellement développés pour l'imagerie ultrasonore. Elles permettront d'offrir à l'ULM dans un avenir proche un contraste encore meilleur.

noemi.renaudin@gmail.com

mickael.tanter@gmail.com

sophie.pezet@espci.fr

Références

- (1) Mace E. et al. (2011) *Nat Methods* 8, 662–664.
- (2) Deffieux, T. (2018) *Current Opinion in Neurobiology* 50, 128–135.
- (3) Bergel, A. et al. (2020) *Nat Commun* 11, 6193.
- (4) Errico, C. et al. (2015) *Nature* 527.
- (5) Errico, C. et al. (2016) *NeuroImage* 124, 752–761.
- (6) Demené, C. et al. (2021) *Nature Biomedical Engineering* 5, 219–228
- (7) Réaux-Le-Goazigo, A. et al. (2022) *Commun Biol* 5, 330.
- (8) Renaudin, N. et al. (2022) *Nat Methods* 19, 1004–1012.
- (9) Schaeffer, S. & Iadecola, C. (2021) *Nat Neurosci* 24, 1198–1209.
- (10) Demene, C. et al. (2017) *Science Translational Medicine* 9.
- (11) Tiran, E. et al. (2017) *Ultrasound in Medicine and Biology* 43, 1679–1689.
- (12) Demeulenaere, O. et al. (2022) *eBioMedicine* 79, 103995.