



UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS DE TOURS

École Doctorale Énergie-Matériaux-Sciences de la Terre et de l'Univers
UMR « Imagerie et cerveau » Inserm U930, Université François-Rabelais

THÈSE présentée par :

Emma KANBAR

soutenue le : 18 décembre 2017

pour obtenir le grade de : Docteur de l'université François - Rabelais de Tours
Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**Génération et optimisation du signal sous-harmonique des agents
de contraste ultrasonore**

THÈSE DIRIGÉE PAR :

BOUAKAZ Ayache Directeur de recherche Inserm, HDR, Université François - Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

COUTURE Olivier Chargé de recherche CNRS, HDR, Institut Langevin, Paris
PADILLA Frédéric Chargé de recherche Inserm, HDR, LabTAU, Lyon

JURY :

BOUAKAZ Ayache Directeur de recherche Inserm, HDR, Université François - Rabelais, Tours
CACHARD Christian Professeur des Universités, Université Claude Bernard, CREATIS, Lyon
COUTURE Olivier Chargé de recherche CNRS, HDR, Institut Langevin, Paris
PADILLA Frédéric Chargé de recherche Inserm, HDR, LabTAU, Lyon

INVITÉ :

FRINKING Peter Chercheur, Dr., Bracco Suisse SA, Plan-les-Ouates

Résumé

Les produits de contraste ultrasonore ont considérablement fait évoluer la pratique de l'imagerie échographique. Composés de microbulles de gaz, capables de circuler dans le sang, ils ont facilité la visualisation de la perfusion tissulaire et le diagnostic de tumeurs cancéreuses. L'efficacité d'un agent de contraste se définit par sa capacité à rehausser le signal ultrasonore. La lecture de ce signal a nécessité la mise en place de séquences d'imagerie spécifiques, lesquelles exploitent les composantes non linéaires émises par les microbulles, et plus particulièrement le second harmonique. Néanmoins, l'exploitation du second harmonique pâtit de la propagation non linéaire des ultrasons dans les tissus, réduisant ainsi la discrimination entre les tissus et les zones pathologiques. Depuis quelques années, différents groupes de recherche tentent d'isoler d'autres harmoniques. La composante sous-harmonique apparaît comme une alternative intéressante et offrent de nombreux avantages : parmi ceux-ci, notons tout particulièrement la moindre atténuation du signal et l'absence de génération de composantes sous-harmoniques par propagation non linéaire. Néanmoins, le rayonnement du sous-harmonique par les microbulles est moins aisé que celui du second harmonique, et requiert l'émission de pressions plus élevées ce qui en fait un inconvénient notable pour son exploitation en imagerie. Dans le cadre de cette thèse, nous proposons d'étudier expérimentalement la génération du sous-harmonique et d'apporter des solutions afin de permettre son optimisation et son exploitation. Les microbulles, qui constituent les produits de contraste, ont des compositions chimiques diverses, ce qui modifie leur comportement. De plus, leur interaction avec les ondes ultrasonores engendre des phénomènes mécaniques tels que la déflation, les rendant instable au cours du temps et pouvant provoquer des modifications dans leur réponse acoustique, voire leur destruction. Dans un premier temps, nous avons étudié les effets du composant gazeux de la microbulle sur la réponse sous-harmonique. Ces travaux ont permis de découvrir que ce signal n'est pas constant au cours du temps. Pourtant, la stabilité de celui-ci est indispensable à la mise en place de cette modalité de manière efficace. À l'issue de nos résultats, nous avons démontré qu'il était possible de stabiliser la composante sous-harmonique et de l'optimiser grâce à une sélection précise du constituant gazeux. Cette étude sera illustrée par des modèles expérimentaux et une étude préliminaire en imagerie. Afin d'avoir une meilleure compréhension du phénomène, notre étude se poursuit sur les effets de la déflation, laquelle engendre des échanges gazeux. Pour cela nous avons caractérisé individuellement un groupe de microbulles à l'aide d'une caméra ultra-rapide (Brandaris 128). Les résultats obtenus montrent que la déflation engendre une amplification de la composante sous-harmonique. Tous ces résultats mettent en avant l'importance de considérer, à l'avenir, la composition chimiques des microbulles et ses interactions avec les ondes ultrasonores pour le dévelop-

RÉSUMÉ

pement des futures modalités d'imageries de contraste.

Mots clés Agent de contraste ultrasonore, microbulle, sous-harmonique, imagerie non-linéaire, diffusion, déflation acoustique

Table des matières

Introduction	15
1 Les agents de contraste ultrasonore	19
1.1 Introduction aux agents de contraste ultrasonore	19
1.1.1 Les microbulles	19
1.1.2 Exemples d'applications	21
1.1.3 Activation d'un agent de contraste	24
1.2 Interaction avec les ultrasons	24
1.2.1 Un diffuseur d'ultrasons	24
1.2.2 L'équation de Rayleigh-Plesset	26
1.2.3 Le modèle de Marmottant	29
1.2.4 Fréquence de résonance	29
1.3 Imagerie de contraste	31
1.4 Les sous-harmoniques	33
1.4.1 Facteurs de génération du sous-harmonique	33
1.4.2 Exemples d'applications	36
1.5 Conclusion	37
2 Nouvelle approche pour la caractérisation de la distribution en taille des agents de contraste	39
2.1 Contexte et objectifs	39
2.2 Matériel et méthodes	41
2.3 Description de la méthode de comptage	42
2.3.1 Acquisition des images	42
2.3.2 Description du <i>plugin</i>	42
2.4 Validation du <i>plugin</i>	43
2.5 Résultats et discussion	45
2.5.1 Validation sur des billes de calibration	45
2.5.2 Validation sur un agent de contraste : BR14 [®]	45

TABLE DES MATIÈRES

2.6	Conclusion	46
3	Effets de la composition en gaz des agents de contraste ultrasonore sur l'émission sous-harmonique	47
3.1	Contexte et objectifs	48
3.1.1	Quelques propriétés au sujet du composant gazeux des microbulles	48
3.1.2	Retard d'émission du sous-harmonique	49
3.1.3	Objectifs de l'étude	49
3.2	Matériel et méthodes	50
3.2.1	Les microbulles	50
3.2.2	Installation expérimentale	50
3.2.3	Analyse des données	52
3.2.4	Substitution du gaz	52
3.2.5	Système d'imagerie	53
3.3	Résultats	54
3.3.1	Caractérisation de retard de l'apparition de sous-harmonique	54
3.3.2	Substitution des gaz	57
3.3.3	Distribution en taille	60
3.3.4	Imagerie	62
3.4	Discussion	63
3.5	Conclusion	66
4	Effets de la déflation sur la réponse sous-harmonique des agents de contraste ultrasonore	69
4.1	Contexte et objectifs	70
4.1.1	Déflation des microbulles	70
4.1.2	Caractérisation optique des microbulles	71
4.1.3	Objectifs de l'étude	73
4.2	Matériel et méthodes	73
4.2.1	Les microbulles	73
4.2.2	Installation expérimentale	73
4.2.3	Analyse optique	75
4.2.4	Séquence de déflation acoustique	76
4.2.5	Traitements des données	76
4.3	Résultats	77
4.3.1	Analyse de la déflation	77
4.3.2	Étude de la réponse sous-harmonique	78
4.4	Discussion	81

TABLE DES MATIÈRES

4.5 Conclusion	82
Conclusion	85
A	89
B	103
B.1 Le système Verasonics	103
B.2 Stratégie de formation de faisceaux	103
Glossaire	119
Index	121

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux

1.1	Liste des principaux agents de contraste.	22
2.1	Diamètre des billes de calibration : Flow-Set TM et CountBright TM donné par le fabricant et calculé par le <i>plugin BubblesizerJ</i>	45
2.2	Concentration et diamètre des billes de calibration Flow-Count TM et de l'agent de contraste BR14 [®] mesurés par le <i>plugin BubblesizerJ</i> et donnés dans la littérature.	46
3.1	Liste des agents de contraste utilisés lors de cette étude et leur composition en gaz.	50
3.2	Dilution effectuée pour chaque agent de contraste lors de cette étude.	52
3.3	Tableau récapitulatif du gain en contraste entre les deux populations de microbulles, et pour chacune des deux acquisitions.	62
3.4	Coefficient de diffusion des gaz, les données proviennent de la publication de Sarkar <i>et al</i> [1].	64
4.1	Populations de microbulles étudiées, nombre d'échantillons, diamètres et pressions employées pour caractériser le sous-harmonique et réaliser la déflation.	75
4.2	Populations de microbulles de diamètres correspondant à la fréquence de résonance, nombre, diamètre et pression utilisé pour caractériser le sous-harmonique.	79

LISTE DES TABLEAUX

Table des figures

1.1	Image en microscopie d'un échantillon d'un agent de contraste, ici des microbulles de MM1 [®]).	20
1.2	Représentation schématique d'une microbulle (Figure adaptée de Sennoga <i>et al</i> [2]).	23
1.3	Photo d'un agent de contraste sous forme lyophilisé, inactivé (à gauche) et après activation (à droite).	25
1.4	Distribution en taille d'un échantillon de SonoVue [®] obtenue par mesure optique.	25
1.5	Spectre de la réponse acoustique d'un échantillon de microbulles MM1 [®] excité à 10 MHz.	27
1.6	Mesure de la fréquence de résonance d'un échantillon de microbulles de BG7725 [®]	30
1.7	Mesure théorique de la composante sous-harmonique d'une microbulle de 2.5 μm étudiés aux pressions suivantes : 0 et 140 mmHg (la figure est tirée de la publication de Frinking <i>et al.</i>).	34
1.8	Mesure optique montrant un comportement de <i>compression-only</i> d'une microbulle de BR14 [®] de 2.9 μm de diamètre initial, excitée à 5 MHz et 100 kPa. A) présente la courbe de variation du diamètre de la microbulle en fonction du temps et B) la réponse spectrale correspondante.	35
1.9	Évolution temporel de la réponse des composantes a) sous-harmonique, b) fondamentale, c) ultra-harmonique et d) second-harmonique des microbulles de Targestar- <i>p</i> à 10 MHz et à une pression négative de 290 kPa (la figure est tirée de la publication de Shekhar <i>et al.</i> [3]).	36
2.1	Algorigramme du <i>plugin BubblesizerJ</i>	43
2.2	Analyse et mesure effectuées par le <i>plugin BubblesizerJ</i> . A) Chargement et traitement des images microscopiques puis B) affichage de la distribution en taille, concentration et diamètre moyen de l'échantillon.	44
3.1	Dispositif expérimental utilisé pour caractériser la réponse du sous-harmonique des microbulles.	50

TABLE DES FIGURES

3.2	Présentation schématique du processus de substitution du gaz à partir d'une fiole contenant l'agent de contraste inactivée.	52
3.3	Schéma de l'installation expérimentale.	53
3.4	Réponse spectrale des composantes sous-harmonique et fondamentale des microbulles de BG7725 [®] à 10 MHz et 450 kPa au temps a) $t = 0$ min, b) $t = 15$ min, c) $t = 30$ min, d) $t = 45$ min, e) $t = 90$ min et f) représentation de l'ensemble des acquisitions recueillies, toutes les 3 minutes au cours de 90 minutes.	55
3.5	Évolution de l'émission du sous-harmonique (à gauche) et représentation sonogramme de l'évolution des composantes sous-harmonique et fondamentale (à droite) à 10 MHz et 450 kPa de a) BG7725 [®] , b) MM1 [®] , c) BR14 [®] , d) BR1 [®] , et e) Definity [®]	56
3.6	Évolution de la composante fondamentale et second harmonique à 10 MHz et 450 kPa de a) BR14 [®] et b) MM1 [®]	57
3.7	Réponse spectrale au temps initial ($t = 0$ min) et évolution de la composante sous-harmonique au cours du temps à 10 MHz et 450 kPa de a-c) BG7725 [®] et b-d) BR14 [®] quand ils sont constitués de leur gaz initial, C_4F_{10} (trait plein, rouge) et quand ils sont constitués d'air (trait en pointillé, noir).	58
3.8	Évolution de l'amplitude de la réponse sous-harmonique au cours du temps à 10 MHz et 450 kPa de deux échantillons de microbulles de a) BG7725 [®] et b) BR14 [®] , quand l'un des échantillons a été conservé dans la fiole (trait plein, rouge) et le second a été placé dans un eppendorf pendant 1 heure (trait en pointillé, noir).	59
3.9	Évolution de la réponse sous-harmonique des microbulles à 10 MHz et 450 kPa de a) BR14 [®] quand elles sont constituées de leur gaz original, C_4F_{10} (trait plein, rouge) et lorsque ce gaz a été substitué avec du SF_6 (trait en pointillé, noir) et b) évolution de la réponse sous-harmonique des microbulles de BR1 [®] quand elles sont constituées de leur gaz original, SF_6 (trait en pointillé, noir) et lorsque ce gaz a été substitué avec du C_4F_{10} (trait plein, rouge).	60
3.10	Évolution de la distribution en taille des microbulles de BR14 [®] aux temps a) 0 minute, b) 36 minute et c) 90 minute quand celles-ci sont constituées de C_4F_{10} (trait plein, bleu) et d'air (trait en pointillé, rouge).	61
3.11	Évolution du diamètre moyen des microbulles de BR14 [®] au cours du temps quand celles-ci sont reconstituées à partir a) de leur gaz initial, C_4F_{10} et b) d'air.	61
3.12	Comparaison de l'amplitude du sous-harmonique dans le canal en fonction du gaz de chargement des agents de contraste.	62
3.13	Simulation de la réponse sous-harmonique et fondamentale d'une microbulle ayant un rayon de $1.5 \mu m$, excitée à 10 MHz et une pression négative de 100 kPa. Dans un cas, la microbulle est composée d'un gaz de coefficient polytropique égal à 1.4 (trait plein) et dans l'autre un coefficient polytropique de 1.04 (trait pointillé).	66

TABLE DES FIGURES

4.1	Observation de la paroi d'une microbulle durant un processus de déflation, excitée à 1 MHz et 150 kPa et identification de points à fortes concentration de phospholipides avant, pendant et après insonification (Figure rapportée dans la littérature par Kooiman <i>et al.</i> [4]).	71
4.2	Photo du système optique constitué de la caméra Brandaris (bleu) et d'un microscope (à gauche). Schéma de le Brandaris tiré de la publication de Chin <i>et al.</i> [5] (à droite).	72
4.3	Schéma du système de la caméra Brandaris 128.	74
4.4	A) Échantillon d'images obtenu avec la brandaris 128 et à partir d'une séquence présentant les oscillations d'une microbulle de BR14 [®] de 3 µm de diamètre, excitée à 5 MHz, 100 kPa et B) variation du diamètre en fonction du temps correspondant.	75
4.5	Schéma représentant les séquences réalisées sur les deux populations de microbulles étudiées (M_{ND} et M_D) avec les étapes suivantes : mesure du diamètre à 100 kPa, caractérisation du sous-harmonique (SH) à 100 kPa et déflation à 350 ou 450 kPa. Toutes les séquences ont été réalisées à une fréquence de 5 MHz et 10 cycles.	76
4.6	Déflation à 5 MHz et 350 kPa, d'une microbulle de BR14 [®] de A) 4.3 µm de diamètre initial et B) 3.4 µm de diamètre après déflation.	77
4.7	Diamètre final en fonction du diamètre initial des microbulles ayant subi un processus de déflation acoustique à 5 MHz, 10 cycles et à une pression négative de 350 kPa ou 450 kPa.	78
4.8	Pourcentage de microbulles au sein des populations non déflatées (M_{ND}) et déflatées (M_D), ayant émis une composante sous-harmonique à 5 MHz et 100 kPa (n correspond au total des microbulles analysées au sein d'une population).	78
4.9	Étude des microbulles à la résonance. Pourcentage des microbulles au sein des population non déflatées (M_{ND}) et déflatées (M_D) qui émettent une composante sous-harmonique à 5 MHz et 100 kPa (n correspond au total des microbulles analysées au sein d'une population).	79
4.10	Diagramme en boîte à moustache représentant la distribution des amplitudes du sous-harmonique normalisés par rapport à la fréquence fondamentale en fonction des populations M_{ND} et M_D	80
4.11	Pourcentage des microbulles déflatées (population M_D) qui émettent une composante sous-harmonique à 5MHz et 100 kPa, en fonction du taux de réduction du diamètre.	81
B.1	Représentation fréquentielle des filtres d'acquisition. A) Filtre FIR passe-bas B) Filtre FIR passe-bande.	104
B.2	Caractérisation à l'hydrophone du signal mesuré à la focale de la sonde L11-4v avec un tir de 21 éléments. A) signal temporel et B) Spectre correspondant.105	
B.3	a) Plan du fantôme vasculaire b) Image échographique de référence.	106

TABLE DES FIGURES

Introduction

Au cours de ces vingt dernières années, l'intérêt de l'imagerie échographique, bien connu du grand public pour ses applications obstétriques, n'a cessé de croître au sein du corps médical. Les raisons de ce succès tiennent à son caractère non-invasif, à son coût relativement faible, à une mise à disposition facile et à la possibilité de réaliser une imagerie en temps réel. Avec ces atouts, l'échographie occupe une place importante au sein de l'imagerie clinique et se distingue clairement des autres modalités d'imagerie telles que l'IRM ou encore la tomodensitométrie.

L'analyse du flux sanguin représente une indication majeure dans le diagnostic de nombreuses pathologies. Grâce à sa technologie Doppler, l'échographie permet l'observation des vaisseaux et la mesure du débit sanguin. L'examen échographique est ainsi indiqué dans le diagnostic et le suivi de maladies telles que la thrombose et l'athérosclérose, mais aussi pour la surveillance du rythme cardiaque chez le fœtus. Cependant, l'imagerie Doppler se révèle insuffisante pour la détection de certains vaisseaux difficiles tels que les flux lents, la microcirculation ou encore les vaisseaux profonds. Afin de pallier à cette contrainte une nouvelle approche a vu le jour : l'utilisation des agents de contraste ultrasonore. Il s'agit de microbulles de gaz de quelques micromètres de diamètre capables de circuler dans le sang et de rehausser le signal ultrasonore. Aujourd'hui, l'emploi des agents de contraste a démontré son efficacité pour la détection et la caractérisation des tumeurs abdominales, allant jusqu'à rivaliser avec l'IRM, notamment pour la détection des lésions hépatiques. Les agents de contraste utilisés en clinique ne présentent aucun danger pour l'homme, ils ne sont pas néphrotoxiques et n'interagissent pas avec la thyroïde ou le foie. Parmi les perspectives futures, les microbulles sont envisagées pour la thérapie ciblée.

Pour leur utilisation en imagerie, lorsque les microbulles interagissent avec les ondes ultrasonores, elles émettent des composantes harmoniques, lesquelles sont exploitées pour discriminer les tissus sains des lésions perfusées. C'est ainsi que, pour extraire ces harmoniques, différentes méthodes d'extraction ont été développées : émission d'ondes ultrasonores qui sont en opposition de phase (inversion de phase), modulées en amplitudes (modulation d'amplitude) ou encore la combinaison des modulations de phase et d'amplitude (CPS). L'ensemble de ces méthodes est principalement basé sur l'exploitation de la composante seconde harmonique des microbulles. Malgré les avantages réels de ces méthodes, l'utilisation du second harmonique n'est pas dénuée d'inconvénients. En effet, les tissus émettent également un second harmonique en raison de la propagation non linéaire des ultrasons, ce qui a pour effet de réduire le rapport contraste au tissu ou CTR (*contrast-to-tissue ratio*). Dans ces conditions, l'exploitation d'une autre signature des microbulles est régulièrement

envisagée par différents groupes de recherche.

Parmi les signaux considérés, la composante dite sous-harmonique, car diffusée à la moitié de la fréquence ultrasonore d'excitation, représente un candidat idéal. En effet, celle-ci n'est pas émise par les tissus, ce qui contribue à améliorer le rapport contraste au tissu. Cette analyse a été confirmée par Forsberg *et al.* dans une étude lors de laquelle ils ont effectué une imagerie sous-harmonique pour détecter des lésions cancéreuses en sénologie [6]. D'autre part, la composante sous-harmonique présente une atténuation beaucoup moins importante que la seconde harmonique en réception en raison de sa fréquence basse.

L'émission sous-harmonique d'une bulle a été observée pour la première fois dans le cadre d'une expérience réalisée par Esche au début des années cinquante [7]. Par la suite, de nombreuses études ont été effectuées, dont l'une des plus majeures est celle de Prosperetti, qui a caractérisé les conditions d'émissions du sous-harmonique [8]. Toutefois, l'imagerie sous-harmonique reste à un stade exploratoire et la compréhension des mécanismes physiques responsables de sa génération continue à faire défaut. Très récemment, une étude de Shekhar *et al.* ont démontré que l'amplitude du signal sous-harmonique variait au cours du temps. Pourtant, la stabilité de celle-ci est indispensable à la mise en place de cette modalité de manière efficace [3].

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à optimiser la composante sous-harmonique. Il s'agit d'une étude expérimentale durant laquelle nous avons caractérisé la composante sous-harmonique des agents de contraste ultrasonore en fonction de la composition physico-chimique des microbulles et de leurs interactions avec les ultrasons.

Le plan de ce manuscrit s'articule autour de deux principaux axes. Le premier composé des chapitres 1 et 2 propose un aperçu non exhaustif des principales méthodes de caractérisations des agents de contraste ultrasonore. Le premier chapitre débute par une présentation avec un bref rappel historique et un inventaire des différents agents de contraste présents dans la littérature. Puis, le discours se poursuit sur les propriétés physico-chimiques et le comportement oscillatoire des microbulles : composition, interactions avec les ultrasons, comportement non linéaire. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous abordons la question de la génération des sous-harmoniques en dressant un état des connaissances des principales contributions sur ce sujet. Cet axe se conclut par le chapitre 2 qui traite d'un travail expérimental de caractérisation nécessaire pour optimiser le comptage et la concentration des microbulles pour de futures études. Dans le second axe, nous nous attacherons à présenter les résultats de nos différentes études de caractérisation du sous-harmonique. Pour se faire, nous nous sommes intéressés aux effets de deux facteurs, l'un inhérent à la composition chimique de la microbulle et le second inhérent à l'interaction des microbulles avec les ondes ultrasonores. Ainsi, le chapitre 3 abordera les effets du constituant gazeux de la microbulle sur la génération et l'amplitude du sous-harmonique. Cette approche sera illustrée par une série d'expériences. Nous verrons aussi qu'il est possible de stabiliser temporellement l'amplitude du sous-harmonique en sélectionnant un gaz en fonction de ses propriétés de diffusion. Nous concluons ce chapitre, par une étude préliminaire d'imagerie sous-harmonique *in vitro* où nous avons comparé des microbulles chargées avec deux gaz différents. Dans le chapitre 4, nous adresserons la question de la déflation, et de son impact sur la composante sous-harmonique. Pour se faire, nous avons employé une caméra

INTRODUCTION

ultra rapide permettant d'échantillonner le mouvement de la microbulle et d'en extraire sa réponse vibratoire. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un travail de recherche collaboratif avec le laboratoire Biomedical Engineering à l'université Erasmus MC (Rotterdam, Pays-Bas).

Enfin, nous présenterons en Annexe A, un article de review publié dans le journal *Expert Opinion on Drug Delivery*, dans lequel j'ai contribué avec notre équipe de recherche et qui traite des récentes avancées de l'utilisation des microbulles en thérapie. En annexe B, nous présenterons de manière succincte l'échographe Verasonics ainsi que la stratégie de formation de faisceaux employée, lors d'une de nos études.

INTRODUCTION

Chapitre 1

Les agents de contraste ultrasonore

Dans ce chapitre, nous présentons le principe des agents de contraste ultrasonore. Nous évoquerons, dans les grandes lignes les microbulles de nouvelles générations et les applications diagnostiques et thérapeutiques qui en ont découlées. Nous traiterons également d'aspects plus fondamentaux, en présentant de manière succincte les principales équations qui régissent la dynamique d'une microbulle. Nous décrirons ensuite les interactions des microbulles avec les ultrasons, où il sera question de leur comportement non-linéaire.

Dans la seconde partie du chapitre nous nous focaliserons sur la génération de la composante sous-harmonique par les microbulles. Les principaux travaux seront d'abord passés en revue, puis nous discuterons de l'intérêt de l'exploitation du sous-harmonique en imagerie. Nous introduirons ensuite la notion de retard du sous-harmonique, mécanisme méconnu et responsable d'une émission instable au cours du temps.

1.1 Introduction aux agents de contraste ultrasonore

1.1.1 Les microbulles

Un agent de contraste ultrasonore consiste en une suspension de microbulles de gaz (Air, SF_6 , C_3F_8 , C_4F_{10}) encapsulées dans une paroi constituée d'un matériau biocompatible tels que des phospholipides, des protéines ou des polymères [9] [10]. Les microbulles ont un diamètre généralement compris entre 1 et 8 μm (Figure 1.1).

1.1.1.1 Imagerie classique

L'histoire des microbulles commence à la fin des années 60 quand Gramiak et Shah ont observé, lors d'un examen intracardiaque, un rehaussement échographique due à la formation de microbulles d'air [11]. Cette découverte a entraîné le développement des agents de contraste en échographie. Néanmoins, il faut attendre le début des années 1990, pour voir arriver les premiers agents de contraste dédiés à l'exploitation clinique [12]. La première tentative fut l'Echovist[®] (1991), mais du fait du diamètre des microbulles, trop grands,

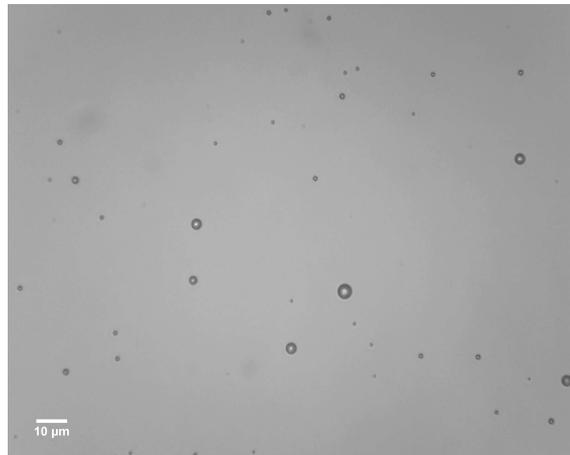


FIGURE 1.1 – Image en microscopie d’un échantillon d’un agent de contraste, ici des microbulles de MM1[®]).

celles-ci ne passaient pas le lit capillaire pulmonaire. C’est pourquoi, cet agent ne fut pas exploité par les médecins. Le premier agent de contraste validé pour la clinique arriva quelques années plus tard, c’est l’Albunex[®] (1994) [13]. Il s’agissait de microbulles d’air stabilisées dans une paroi d’albumine humaine. Plus tard, de nouvelles microbulles ont été mises à disposition des médecins, il s’agit du Levovist[®] (1996), des microbulles d’air avec une paroi composée de galactose et d’acide palmitique [14]. Cependant, ces agents de première génération étaient très instables. En effet, l’air diffusait rapidement dans le sang, rendant la durée de vie des microbulles particulièrement courte. Après injection intraveineuse, l’Albunex avait une durée de vie inférieure à une minute ce qui réduisait considérablement le temps d’examen [15]. Par conséquent, au début des années 2000, ces agents de contraste ont cédé la place à une seconde génération d’agents de contraste constitués de gaz à hauts poids moléculaires, moins solubles, moins diffusants et donc plus stables. L’air est remplacé par des gaz tels que des perfluorocarbones ou de l’hexafluorure de soufre. Le SonoVue[®] (Bracco, Plan-les-Ouates, Suisse) est ainsi constitué de microbulles contenant un gaz d’hexafluorure de soufre (SF_6) [16] stabilisé par une monocouche de phospholipides (Figure 1.1 a). SonoVue[®] fut initialement commercialisé à partir de 2001 et est actuellement l’agent de contraste le plus exploité en Europe. D’autres agents de contraste de seconde génération sont exploités dans le monde tels que Definity[®] (Lantheus Medical Imaging, North Billerica, États-Unis), constitué d’octafluoropropane (C_3F_8) encapsulé dans une monocouche de phospholipides et Sonazoid[®] (General Electric, Oslo, Norvège) constitués de perfluorobutane (C_4F_{10}) aussi encapsulé dans une monocouche de phospholipides [17] [18]. Une liste des principaux agents de contraste utilisés ces deux dernières décennies au niveau mondial sont présentés dans le tableau 1.1.

1.1.1.2 Imagerie moléculaire

Une fois administrés, les agents de contraste circulent dans tout l’organisme. Pour limiter la dispersion des microbulles et augmenter leur concentration vers les régions patholo-

giques, l'imagerie moléculaire ou ciblée des agents de contraste a été envisagée [19]. Cette méthode consiste à intégrer à la paroi des microbulles, des ligands spécifiques à certaines molécules surexprimées au niveau du tissu pathologique. Cette fonctionnalisation de la paroi peut être effectuée grâce à des ligands tels que des anticorps spécifiques de marqueurs tumoraux, des peptides ou des hydrates de carbones. Ces ligands peuvent être directement ou indirectement conjugués à la paroi des microbulles [20]. Il en existe deux approches. L'une d'elles consiste à attacher les ligands aux microbulles à l'aide d'une liaison covalente (1.2 c) et l'autre via une liaison non-covalente (1.2 b). La liaison covalente est réalisée en couplant des groupements chimiques présents sur le ligand à ceux présents sur les chaînes polyéthylènes glycol (PEG) ou une molécule lipidique de la paroi des microbulles [21]. La liaison non-covalente consiste à attacher le ligand à la microbulle à l'aide d'une liaison très forte comme la liaison streptavidine-biotine [22].

1.1.1.3 Agents thérapeutiques

Bien qu'initialement conçue pour l'imagerie, l'utilisation des microbulles s'élargit aujourd'hui, aux applications thérapeutiques. Les microbulles sont envisagées pour le transport et la délivrance ciblée de médicaments [23] [24]. Les microbulles deviennent alors des vecteurs de molécules thérapeutiques. Le médicament est ensuite délivré localement sous l'effet des oscillations des microbulles provoquées par une excitation ultrasonore [2] (Annexe A). Ainsi, ces dernières années, les chercheurs ont mis en oeuvre différentes techniques pour convertir une microbulle en vecteur. La figure 1.2 d,e,f,g présente de manière schématique quelques-unes de ces approches. L'une d'elles consiste à fixer à la surface des microbulles, via une liaison covalente ou une liaison avidine-biotine, des liposomes chargés en agents thérapeutiques [25] (Figure 1.2 d). Une autre approche, consiste à inclure des lipides chargés positivement au sein de la paroi des microbulles afin d'adsorber, à l'aide d'une liaison électrostatique, des composants chargés négativement (ADN, ARN) [26] [27] (Figure 1.2 e). Il est également possible d'incorporer des agents thérapeutiques dans la paroi des microbulles, entre les lipides de la monocouche [28] (Figure 1.2 f). Enfin, la paroi des microbulles peut être épaissie pour y inclure des agents thérapeutiques à caractère hydrophobe [29] (Figure 1.2 g).

1.1.2 Exemples d'applications

L'administration des microbulles en imagerie échographique permet de visualiser les vaisseaux sanguins. L'imagerie de contraste s'est montrée performante pour la caractérisation de la microcirculation tumorale, la perfusion tissulaire [30] ou encore le diagnostic de maladies vasculaires telle que l'athérosclérose [31]. Les agents de contraste ultrasonore sont aujourd'hui employés dans de nombreuses applications cliniques et plus particulièrement en cardiologie et en imagerie abdominale. Par exemple, les produits de contraste permettent de mettre en évidence l'existence de tumeurs dans le foie [32, 33, 34]. La prise de contraste dans les lésions tumorales est visualisée en temps réel, ce qui apporte des informations sur le profil vasculaire de la tumeur, caractéristique de sa nature et de son degré de malignité. Ainsi, cet examen est particulièrement performant pour le diagnostic

1.1. INTRODUCTION AUX AGENTS DE CONTRASTE ULTRASONORE

Agent	Gaz	Paroi	Application	Fabricant	Statut
Echovist [®]	Air	Galactose	Imagerie	Bayer Schering Pharma AG	arrêté
Albunex [®]	Air	Sérum albumine humaine	Imagerie	Molecular Biosystems	arrêté
Levovist [®]	Air	Galactose/Acide palmitique	Imagerie	Bayer Schering Pharma AG	arrêté
Optison [®]	C ₃ F ₈	Sérum albumine humaine	Imagerie	GE Healthcare	Approuvé (UE, Norvège, États-Unis)
SonoVue [®]	SF ₆	Phospholipides	Imagerie	Bracco	Approuvé (UE, Suisse, Norvège, Canada, Brésil, Chine, Inde, Corée du Sud)
Definity [®]	C ₃ F ₈	Phospholipides	Imagerie	Lantheus Medical Imaging	Approuvé (États-Unis, Australie, Brésil, Canada, Inde)
Sonazoid [®]	C ₄ F ₁₀	Phospholipides	Imagerie	Amersham Health	Approuvé (Japon)
BR14 [®]	C ₄ F ₁₀ /N ₂	Phospholipides	Imagerie	Bracco	Stade expérimental
Targestar- <i>p</i> [®]	C ₄ F ₁₀	Phospholipides	Imagerie	Targeson Inc.	Stade expérimental
MM1 [®]	C ₄ F ₁₀	Phospholipides	Imagerie	VisualSonics	Essai préclinique
BG7725 [®]	C ₄ F ₁₀	Phospholipides, ligands streptavidinylés	Imagerie moléculaire	Bracco	Stade expérimental

UE : Union européenne
 SF₆ : Hexafluorure de soufre
 C₃F₈ : Octafluoropropane
 C₄F₁₀ : Perfluorobutane
 N₂ : Diazote

TABLE 1.1 – Liste des principaux agents de contraste.

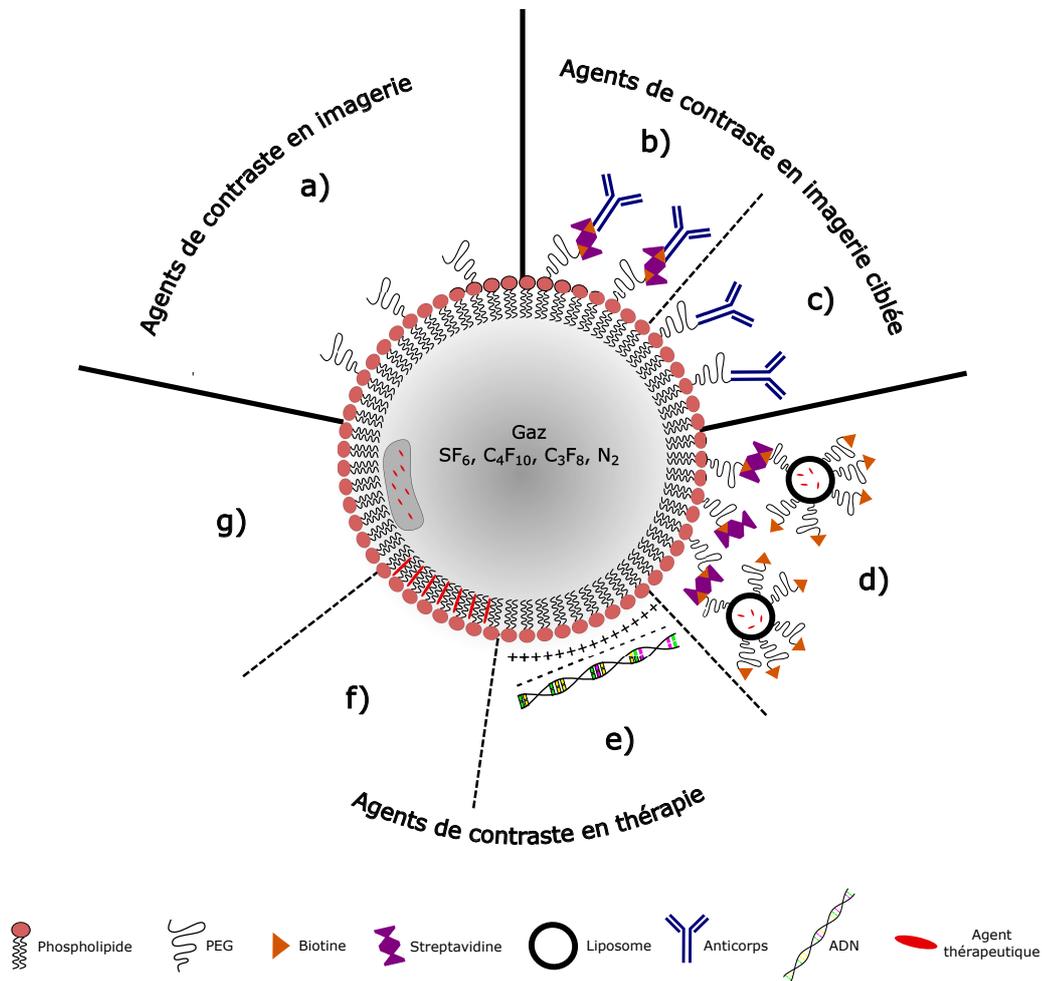


FIGURE 1.2 – Représentation schématique d'une microbulle (Figure adaptée de Sennoga *et al* [2]).

des tumeurs hépatiques malignes et des tumeurs bénignes telles que l'hémangiome [35], l'adénome-hépatocellulaire [36] ou encore l'hyperplasie nodulaire focale (HNF) [37]. Ce procédé de caractérisation des lésions tumorales peut également être réalisé dans d'autres régions de l'organisme comme le sein [38], néanmoins cet examen reste plus occasionnel que l'échographie de contraste du foie. En échocardiographie, les microbulles sont un outil pour évaluer les fonctions ventriculaires du coeur. Elles permettent de définir les contours de l'endocarde, un paramètre important pour mesurer le volume ventriculaire et la fraction d'éjection [39].

Comme nous l'avons mentionné précédemment les agents de contraste ultrasonore font l'objet d'une attention très particulière en thérapie anti-cancéreuse. De nombreuses études ont montré que, sous l'effet des ultrasons, les oscillations des microbulles induisaient une perméabilisation temporaire des barrières biologiques (membrane plasmique, couche endothéliale) se trouvant à proximité [40]. Ce procédé, appelé sonoporation, offre un potentiel très prometteur en thérapie ciblée. De fait, l'utilisation des microbulles augmenterait la

concentration de médicaments délivrés dans la tumeur et réduirait les effets toxiques sur les tissus sains. À ce stade de la recherche, les études restent précliniques car les mécanismes physiques de la sonoporation sont mal connus. Autrement dit, s'il est démontré que les oscillations des microbulles sont à l'origine des contraintes qui engendrent la perméabilisation cellulaire [41], les mécanismes acoustiques mis en jeu ne sont pas encore élucidés. En effet, la perméabilisation peut être induite par un seul ou la combinaison de plusieurs phénomènes acoustiques, inhérents à la vibration des microbulles, tels que des micro-courants [42], des micro-jets [43] ou des ondes de chocs [44].

1.1.3 Activation d'un agent de contraste

Les microbulles sont administrées au patient par voie intraveineuse, en bolus ou par infusion. Le volume généralement administré est aux alentours de 2 ml ce qui correspond à l'injection de centaines de millions de microbulles. Par exemple, 1 ml de SonoVue[®] correspond à l'injection d'environ $2,5 \times 10^8$ microbulles [45]. Du fait de leur taille (1 à 8 μm), inférieure à celle des globules rouges, les microbulles peuvent circuler au sein des vaisseaux sanguins et traverser le lit capillaire pulmonaire sans difficulté [46].

Les agents de contraste constitués de microbulles à paroi phospholipidique sont généralement fournis dans une fiole scellée et dans un état "inactivé", c'est à dire que les microbulles ne sont pas encore formées. Les composants de la paroi se trouvent alors sous une forme lyophilisés (SonoVue[®]) ou liquide (Definity[®]) et le constituant gazeux occupe le volume du flacon. La reconstitution des microbulles se fait par l'ajout, via une injection à travers le septum de la fiole, d'un sérum physiologique. La fiole est ensuite agitée à l'aide d'un agitateur ou manuellement. Cette étape va permettre la dispersion du gaz dans le solvant aqueux, par un processus d'émulsification et les phospholipides s'auto-assemblent autour du gaz pour former une monocouche. L'ajout du sérum n'est utile que dans le cas où les phospholipides sont lyophilisés, dans le cas de Definity[®] le sérum est déjà mélangé aux composants phospholipidiques. Après activation, l'agent de contraste présente l'aspect d'un liquide blanc laiteux et homogène. La figure 1.3 montre une fiole d'un agent de contraste quand celui-ci est inactivé et après activation.

Pour les applications biomédicales, l'agitation manuelle ou mécanique est la principale méthode employée pour générer des microbulles en grande quantité. Cette procédure ne permet pas de contrôler la taille des microbulles, c'est la raison pour laquelle ces dernières présentent des diamètres très différents avec une distribution en taille de type gaussienne, variant de 0.5 à 8 μm [47] [48]. La figure 1.4 montre la distribution en taille d'un échantillon de microbulles de SonoVue[®] fraîchement activé.

1.2 Interaction avec les ultrasons

1.2.1 Un diffuseur d'ultrasons

Lorsqu'une onde ultrasonore excite une microbulle, une partie de l'énergie incidente est rétrodiffusée par celle-ci. Cette propriété est due à la différence d'impédance acoustique



FIGURE 1.3 – Photo d’un agent de contraste sous forme lyophilisé, inactivé (à gauche) et après activation (à droite).

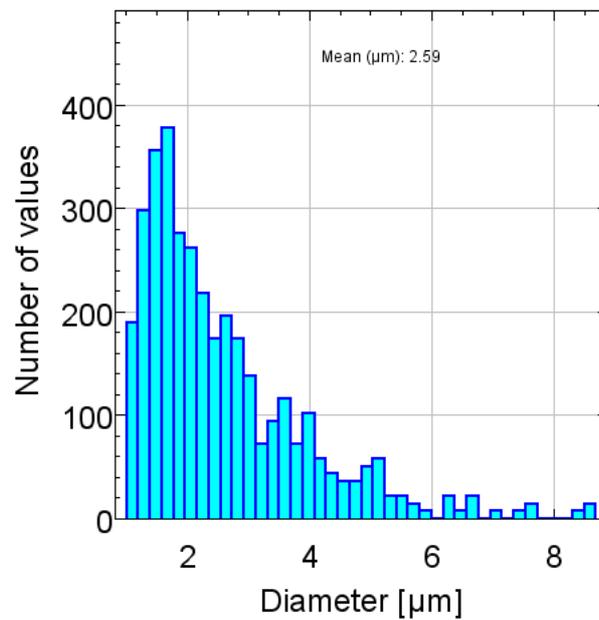


FIGURE 1.4 – Distribution en taille d’un échantillon de SonoVue[®] obtenue par mesure optique.

entre la microbulle et le milieu environnant. De plus, les diamètres des microbulles étant négligeables devant les longueurs d’onde du champ ultrasonore (0.1 et 1 mm), elles se comportent comme des diffuseurs ponctuels.

À chaque microbulle est associée une section efficace de diffusion, Σ_d , qui représente la surface qui interagit avec les ultrasons. Ce paramètre permet de définir l’efficacité d’interaction entre la microbulle et les ondes ultrasonores. Son expression est donnée par l’approximation de Born [49] :

$$\Sigma_d = \frac{4}{9}\pi k^4 R^6 \left[\left(\frac{\kappa_d - \kappa}{\kappa} \right)^2 + \frac{1}{3} \left(\frac{3(\rho_d - \rho)}{2\rho_d + \rho} \right)^2 \right] \quad (1.1)$$

Où k est le nombre d'onde, R le rayon de la microbulle, κ_d la compressibilité de la microbulle, κ la compressibilité du milieu, ρ_d la densité de la microbulle et ρ la densité du milieu.

L'équation 1.1 montre que la section efficace de diffusion est fonction du milieu environnant mais aussi des paramètres de densité et de compressibilité du diffuseur. Ainsi, en appliquant cette équation, De Jong a comparé la section efficace de diffusion à 3 MHz d'une microbulle de 1.5 μm avec celle d'une particule de fer faisant la même taille. Les deux particules ont des propriétés compressibles très différentes, la microbulle étant beaucoup plus compressible que la particule de fer. Les résultats de l'équation ont montré que la section efficace de diffusion de la microbulle était 10^9 fois plus grande que celle de la particule de fer. Cela démontre que l'efficacité d'une microbulle à rétrodiffuser l'énergie ultrasonore, est principalement due à sa compressibilité, une propriété conférée par son composant gazeux. [50].

Les paramètres de l'excitation ultrasonore, tels que la fréquence incidente (f_0) et la pression négative de raréfaction influencent la réponse acoustique des microbulles. Dans un champ ultrasonore, la microbulle se comprime pendant la phase de pression positive de l'onde ultrasonore et se dilate pendant la phase de raréfaction de l'onde. À faibles pressions acoustiques, la compression et la dilatation de la microbulle sont symétriques mais à des pressions plus élevées, elles deviennent très asymétriques [51]. Ces oscillations asymétriques se traduisent par la génération de composants fréquentiels non linéaires, multiples de la fréquence incidente, les harmoniques [52] [53]. Le signal rétrodiffusé par les microbulles peut alors contenir des composantes telles que la seconde harmonique ($2f_0$), les superharmoniques ($3f_0, 4f_0, \dots$), les ultraharmoniques ($3/2f_0$) ou encore des sous-harmoniques ($f_0/2$). La figure 1.5 illustre une mesure expérimentale correspondant à la réponse acoustique d'un échantillon de microbulles de MM1[®] excité à 10 MHz.

Actuellement, les modes d'imagerie de contraste implémentés dans les échographes cliniques exploitent les composantes harmoniques des microbulles, en particulier le second harmonique. L'imagerie de contraste n'est pas à confondre avec l'imagerie harmonique en mode B, laquelle exploite les harmoniques issus de la propagation non linéaire des ultrasons dans les tissus [54] [55].

1.2.2 L'équation de Rayleigh-Plesset

La dynamique d'une microbulle de gaz soumise à un champ de pression est décrite par l'équation de Rayleigh-Plesset. Cette équation découle du modèle de Lord Rayleigh qui décrit en 1917 les oscillations radiales d'une bulle de gaz [56].

Considérons une bulle de gaz sphérique de rayon R plongée dans un liquide supposé incompressible ($\text{div } \vec{v} = 0$). L'écoulement engendré dans le fluide est supposé irrotationnel, la vitesse est alors définie à partir du potentiel de vitesse ϕ telle que :

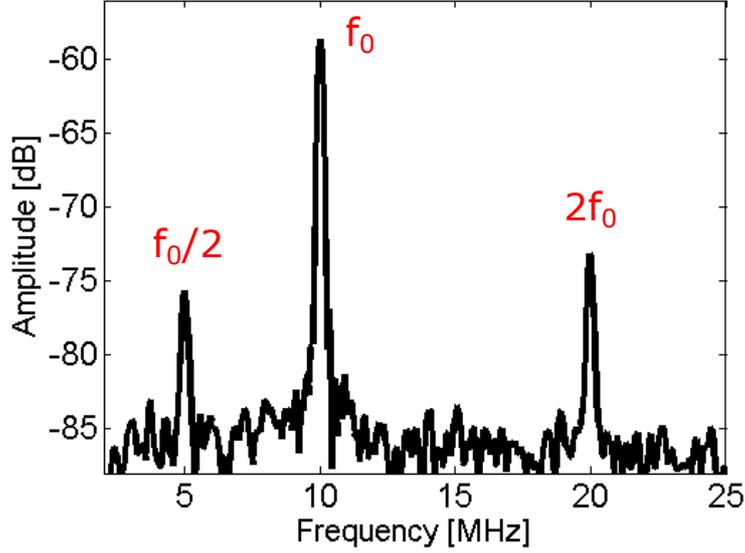


FIGURE 1.5 – Spectre de la réponse acoustique d'un échantillon de microbulles MM1[®] excité à 10 MHz.

$$\vec{v} = \vec{\nabla} \phi, \quad (1.2)$$

L'équation de continuité vérifie alors :

$$\phi = -\frac{R^2 \dot{R}}{r}, \quad (1.3)$$

Nous pouvons donc à partir de ces hypothèses (écoulement incompressible et irrotationnel), calculer les pressions à partir de l'équation de Bernoulli :

$$\dot{\phi} + \frac{1}{2}(\vec{\nabla} \phi)^2 = -\frac{P_l(r)}{\rho} + \frac{P_\infty(t)}{\rho} \quad (1.4)$$

Où ρ est la masse volumique du liquide, $P_l(r)$ est la pression du liquide située à une distance r du centre de la bulle et P_∞ la pression du liquide loin de la bulle.

En écrivant l'équation 1.4 en $r = R$, on obtient l'équation dite de Rayleigh-Plesset :

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho}(P_l(R) - P_\infty(t)). \quad (1.5)$$

Où \dot{R} est la vitesse de paroi de la bulle et \ddot{R} son accélération.

À partir de 1949, le modèle est révisé par Plesset (1949), Noltingk et Neppiras (1950-1951) puis Poritsky (1952). Ils redéfinissent les expressions des pressions $P_l(R)$ et P_∞ . La pression à l'infini P_∞ est définie comme la somme de la pression acoustique incidente $P_i(t)$ et de la pression ambiante $p_0(t)$:

1.2. INTERACTION AVEC LES ULTRASONS

$$P_\infty = P_i(t) + p_0, \quad (1.6)$$

L'expression de la pression du liquide $P_l(R)$, est définie en fonction de la pression du gaz dans la bulle P_g , la pression de Laplace et la viscosité. En supposant que le gaz à l'intérieur de la bulle a un comportement polytropique, P_g s'écrit :

$$P_g = P_{g,eq} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa}, \quad (1.7)$$

Où $P_{g,eq}$ est la pression à l'intérieur de la bulle à l'équilibre. Son expression est définie à partir de la pression ambiante p_0 et de l'équation de Laplace telle que :

$$P_{g,eq} = p_0 + \frac{2\sigma}{R_0}, \quad (1.8)$$

Le terme κ représente le coefficient polytropique. Pour les agents de contraste ultrasonore, le gaz est considéré comme adiabatique. Dans ces conditions, κ est égale au rapport des capacités thermiques, ou indice adiabatique du gaz γ ($\gamma = C_p/C_v$). Par exemple, si l'on considère une microbulle constituée d'air on a $\gamma = 1.4$, si la bulle est constituée de C_4F_{10} on a alors $\gamma = 1.07$.

En remplaçant l'équation 1.8 dans 1.7, et en tenant compte de la pression de Laplace ($\frac{2\sigma}{R}$) et des effets visqueux ($4\mu\frac{\dot{R}}{R}$), l'expression de $P_l(R)$ devient :

$$P_l(R) = p_0 + \frac{2\sigma}{R_0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} - \frac{2\sigma}{R} - 4\mu\frac{\dot{R}}{R}, \quad (1.9)$$

Où σ est la tension de surface et μ la viscosité.

En remplaçant les expressions 1.6 1.9 dans 1.5, on obtient l'équation modifiée de Rayleigh-Plesset :

$$\rho R \ddot{R} + \frac{3}{2} \rho \dot{R}^2 = (p_0 + \frac{2\sigma}{R_0} - p_v) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\mu}{R} \dot{R} + p_v - p_0 - P_i(t). \quad (1.10)$$

L'équation 1.10, a fait l'objet d'autres modifications dont celle de Keller et Miksis (1980) qui incluent les effets dues aux amortissements générés par les rayonnements de la microbulle. Pour cela, ils considèrent la microbulle dans un milieu liquide compressible [57]. Le modèle de Keller-Miksis a pour expression :

$$\rho \left[R \ddot{R} \left(1 - \frac{\dot{R}}{c} \right) + \frac{3}{2} \dot{R}^2 \left(1 - \frac{\dot{R}}{3c} \right) \right] = \left(1 + \frac{\dot{R}}{c} + \frac{R}{c} \frac{d}{dt} \right) (p_0 + \frac{2\sigma}{R_0} - p_v) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} - \frac{4\mu}{R} \dot{R} - \frac{2\sigma}{R} + p_v - p_0 - P_i(t) \quad (1.11)$$

L'équation 1.11 est valable lorsque, en réponse à une excitation de forte pression, les oscillations de la microbulle deviennent très intenses.

Les équations présentées jusqu'à présent ne s'appliquent qu'à des microbulles "nues", c'est à dire sans paroi. Plus tard, d'autres modèles qui décrivent les oscillations d'une microbulle encapsulée ont été proposés [58, 59, 60], parmi lesquels le modèle de Marmottant.

1.2.3 Le modèle de Marmottant

Le modèle de Marmottant décrit la dynamique d'une microbulle encapsulée dans une couche de phospholipides. Il décrit la variation de la tension de surface pendant les oscillations de la microbulle [61]. Son expression est donnée par :

$$\begin{aligned} \rho_l(R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2) = [P_0 + \frac{2\sigma(R_0)}{R_0}](\frac{R}{R_0})^{-3\kappa}(1 - \frac{3\kappa}{c}\dot{R}) \\ - P_0 - \frac{2\sigma(R)}{R} - \frac{4\mu\dot{R}}{R} - \frac{4\kappa_s\dot{R}}{R^2} - P_{ac}(t) \end{aligned} \quad (1.12)$$

L'équation 1.12 découle de l'équation de Rayleigh-plesset 1.10. Les effets de la paroi phospholipidiques sont pris en compte via les paramètres κ_s , la viscosité de la paroi et une tension de surface $\sigma(R)$ qui varie en fonction du rayon de la microbulle.

La tension de surface $\sigma(R)$ de la microbulle varie selon trois régimes : flambage, élastique et rupture. La tension de surface est modélisée de la manière suivante :

$$\sigma(R) = \begin{cases} 0, & \text{si } R \leq R_{flambage} \\ \chi(\frac{R^2}{R_{flambage}^2} - 1), & \text{si } R_{flambage} \leq R \leq R_{cassure} \\ \sigma_{eau} & \text{si rupture et } R \geq R_{rupture} \end{cases} \quad (1.13)$$

Où χ correspond au module d'élasticité de la paroi.

En régime de flambage, la tension de surface $\sigma(R)$ est nulle. La concentration de phospholipides sur la paroi de la microbulle devient très grande et la microbulle se retrouve dans un état appelé *compression-only* où la microbulle se comprime plus qu'elle ne se dilate.

Dans le régime élastique, la tension de surface est fonction d'une constante d'élasticité χ . Le rayon de la microbulle varie de $R_{flambage}$ à $R_{cassure}$, lequel correspond au rayon limite avant la rupture de l'enveloppe.

Dans le régime de rupture, le rayon de la microbulle R atteint le rayon $R_{rupture}$, correspondant à la rupture de la paroi. Le composant gazeux de la bulle se retrouve au contact immédiat avec le milieu, la tension de surface à l'interface devient alors égale à σ_{eau} .

1.2.4 Fréquence de résonance

Le comportement d'une microbulle est assimilable à un système d'oscillateur harmonique. De fait, comme tout système oscillant la microbulle est caractérisée par une fréquence de résonance [62]. Lorsque la fréquence ultrasonore incidente est proche de la fréquence de résonance, la microbulle entre dans un mouvement oscillatoire très important qui conduit à la rétrodiffusion d'un signal très intense. Ce phénomène relève d'une grande importance

1.2. INTERACTION AVEC LES ULTRASONS

en imagerie car la résonance des microbulles se situe dans la gamme des fréquences utilisée en échographie clinique (1-12 MHz).

On peut obtenir une expression pour calculer la fréquence de résonance d'une microbulle encapsulée en linéarisant l'équation de Marmottant 1.12. La fréquence de résonance est ainsi donnée par l'expression [63] :

$$f_{res} = \frac{1}{2\Pi} \sqrt{\frac{1}{\rho R_0^2} \left[3\gamma P_0 + \frac{2(3\gamma - 1)\sigma_w}{R_0} + \frac{4\chi}{R_0} \right]} \quad (1.14)$$

Comme le montre l'équation 1.14, la fréquence de résonance dépend de la tension de surface, des paramètres d'élasticité de la paroi mais aussi de la taille des microbulles. Un agent de contraste étant constitué d'un ensemble de microbulles de tailles différentes, sa fréquence de résonance tient compte de la résonance de chacune de ces bulles. Par conséquent, la fréquence de résonance d'un agent de contraste dépend de la distribution en taille des microbulles [64].

Il est possible de caractériser expérimentalement la fréquence de résonance d'un agent de contraste en effectuant une mesure d'atténuation. En effet, les microbulles sont à l'origine d'une atténuation des signaux ultrasonores qui augmente avec la concentration des bulles et qui est maximale à la fréquence de résonance [65]. La figure 1.6 montre une mesure d'atténuation effectuée par une méthode de pulse-écho de substitution sur un échantillon de microbulles BG7725[®]. Le graphique montre que la fréquence de résonance est située autour de 2.9 MHz pour cet échantillon.

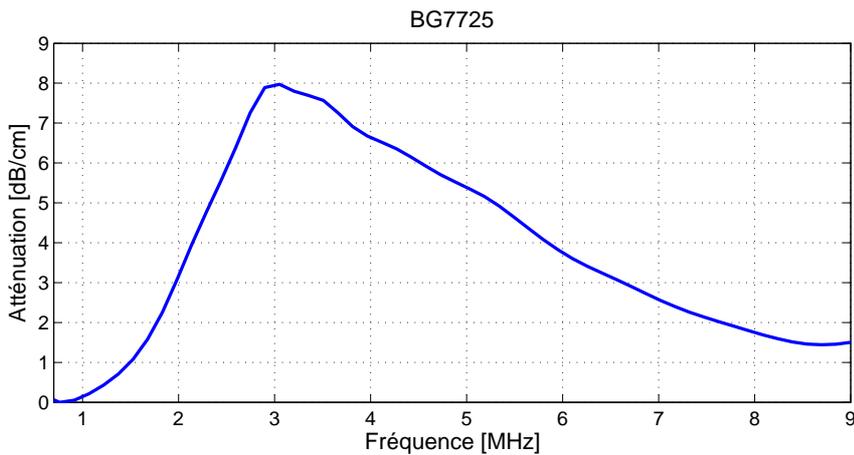


FIGURE 1.6 – Mesure de la fréquence de résonance d'un échantillon de microbulles de BG7725[®].

1.3 Imagerie de contraste

1.3.0.1 Index mécanique

La propagation du faisceau ultrasonore dans les tissus peut induire des effets biologiques indésirables. Parmi ces effets, il existe des effets mécaniques qui se traduisent par la génération de bulles de gaz dans les milieux liquides. Sous l'effet d'une impulsion ultrasonore élevée, ces bulles oscillent et peuvent imploser. Ce phénomène peut alors induire la formation de radicaux libres, responsables de dégradations au niveau cellulaire. En d'autres termes les ultrasons peuvent induire des effets de cavitation transitoire [66]. C'est pourquoi, et afin de prévenir ce risque de cavitation, un indice mécanique (IM) a été proposé. L'indice mécanique est défini en fonction de la pression négative P_- (en MPa) et de la fréquence d'excitation f_0 (en MHz) de l'impulsion ultrasonore, son expression est la suivante :

$$IM = \frac{P_-}{\sqrt{f_0}} \quad (1.15)$$

D'après les recommandations de la FDA (*Food and drug administration*) cet indice ne doit pas dépasser 1.9 en imagerie conventionnelle. En imagerie de contraste, la limite maximale est généralement abaissée à 0.5 pour minimiser la destruction des microbulles.

L'indice mécanique est un paramètre très important en imagerie de contraste. En effet, la valeur de l'indice mécanique va nous renseigner du comportement oscillatoire ou régime acoustique des microbulles, et de surcroît leurs réponses acoustiques [67]. À faible indice mécanique, correspondant à $IM \leq 0.1$, les microbulles se retrouvent dans un régime linéaire. Pour des indices mécaniques compris entre 0.1 et 0.5, correspondant à ceux utilisés en imagerie, les microbulles sont induites dans des oscillations non linéaires, non destructives et génèrent des composantes harmoniques. Enfin, pour un indice mécanique plus fort ($IM \geq 0.5$) les microbulles sont détruites.

Toutefois, les valeurs des indices mécaniques données ci-dessus sont des valeurs générales qui peuvent varier d'un agent de contraste à l'autre. De fait, dans ce manuscrit nous adressons l'impact de la composition des microbulles sur leurs émissions non linéaires.

1.3.0.2 CTR

La performance de l'imagerie de contraste est généralement quantifiée par le rapport de la puissance rétrodiffusée par les microbulles à celle rétrodiffusée par les tissus [68]. Ce rapport appelé CTR pour *Contrast to tissue ratio* a pour expression :

$$CTR = 10 \log_{10} \frac{P_{microbulles}}{P_{tissus}} \quad (1.16)$$

L'objectif de l'imagerie de contraste est d'obtenir un CTR élevé, lequel traduirait une bonne discrimination entre les régions perfusées (agents de contraste) et les régions non perfusées (tissus). L'exploitation des oscillations harmoniques des microbulles a contribué à améliorer le CTR et ainsi une meilleure visualisation de la circulation sanguine.

1.3.0.3 Techniques d'imagerie de contraste

Dans cette partie nous présentons, les principaux modes d'imagerie de contraste actuellement utilisés et implémentés dans les échographes cliniques. Nous décrivons ci-dessous la technique *pulse inversion* (PI), modulation d'amplitude (MA) et *Contrast pulse sequence* (CPS).

L'imagerie par *pulse inversion* ou inversion de phases (PI), transmet une séquence de deux impulsions successives, la seconde impulsion étant identique à la première mais en opposition de phase. Après transmission, les signaux rétrodiffusés sont récupérés puis sommés, les composantes fondamentales (linéaires) sont alors annulées mais les composantes harmoniques sont conservées. En réalité, PI annule toutes les composantes harmoniques impaires parmi lesquelles le fondamental et ne garde que les composantes harmoniques paires [69]. Cependant, PI rencontre quelques limitations, la première vient du fait que la méthode est basée sur la transmission de plusieurs impulsions, ce qui implique un ralentissement de la cadence d'image (d'un facteur 2). Puis, une seconde limitation est due au fait qu'entre deux ondes transmises les tissus sont au mouvement. Ce phénomène engendre alors des différences entre les échos linéaires qui ne s'annulent plus, occasionnant des artefacts de mouvement. Pour remédier à ce problème, la technique PI est en général exploitée en émettant plusieurs impulsions successives [70].

La méthode de modulation d'amplitude (AM) transmet, comme le PI, une séquence de deux impulsions successives. Dans la méthode AM les deux impulsions ont des amplitudes différentes [71] [72]. Dans le cas le plus simple, la première impulsion possède une amplitude deux fois plus importante que la seconde. Le signal rétrodiffusé par celle-ci est collecté, multiplié par 2 (rapport des deux amplitudes transmises) puis soustrait à l'écho de la première impulsion. De cette manière, les composantes linéaires sont annulées, préservant l'information non linéaire. Néanmoins, pour les mêmes raisons que PI, AM subit un ralentissement de la cadence image et des artefacts dus aux mouvements.

Enfin, l'imagerie *Contrast pulse sequence* ou CPS est basé sur la transmission d'une séquence composée de trois impulsions qui combinent une modulation de phase et une modulation d'amplitude [73] [74].

Toutes les techniques présentées ci-dessus ont pour objectif de supprimer les signaux en provenance des tissus, pour ne garder que ceux issus des microbulles. Pour cela, PI, AM et CPS détectent les microbulles en récupérant, principalement les seconds harmoniques générés par ces dernières. L'utilisation de cette composante a contribué à améliorer le CTR. Néanmoins, les tissus engendrent également des composantes secondes harmoniques en raison de la propagation non linéaire des ultrasons dans les tissus [75]. Cet effet a pour conséquence la dégradation du CTR [76]. Pour cette raison, des nouvelles méthodes de détection de microbulles sont en cours de développement. Parmi ces techniques, on peut citer le *Chirp Reversal Imaging* [77], le SURF Imaging [78], l'imagerie de contraste par onde plane [79], l'imagerie *Dual frequency* [80] [81], l'imagerie super-harmoniques [82] ou encore l'imagerie sous-harmonique [83] [84]. Le développement de cette dernière a motivé le travail réalisé durant cette thèse.

1.4 Les sous-harmoniques

L'amélioration significative du contraste induite par l'exploitation du second harmonique a pleinement justifié son implémentation en routine clinique. Néanmoins, les microbulles possèdent une signature acoustique exclusive qui est la composante sous-harmonique ($f_0/2$). Des études ont montré que le sous-harmonique émis par les tissus était négligeable voire absent. Par conséquent, l'exploitation de cette composante améliorerait de manière certaine le CTR.

Son exploitation a déjà fait l'objet de nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* par différents groupes [85, 86, 87, 88]. Leurs études ont confirmé une nette amélioration du contraste comparé au second harmonique. L'utilisation du sous-harmonique présente quelques avantages : Outre la non génération de cette composante par les tissus, il bénéficie d'une moindre atténuation en réception comparé au fondamental et au second harmonique, ce qui en fait un outil de diagnostic très intéressant pour l'imagerie. Cependant, à ce jour, l'imagerie sous-harmonique reste à un stade exploratoire, car la compréhension des divers mécanismes physiques mis en jeu dans la génération du sous-harmonique restent mal connus.

1.4.1 Facteurs de génération du sous-harmonique

La génération du sous-harmonique est un phénomène qui ne se manifeste que lorsque certains critères sont remplis. De nombreuses études ont été menées afin d'identifier ces derniers. Nous allons nous attacher à en décrire certains dans la section suivante.

1.4.1.1 L'excitation ultrasonore

Les microbulles sont capables de générer du sous-harmonique à partir d'une certaine valeur seuil de pression acoustique. Il a été théoriquement et expérimentalement montré, que ce seuil était minimal quand la microbulle était insonifiée à deux fois sa fréquence de résonance [8] [89]. L'évolution du sous-harmonique en fonction de la pression n'est pas linéaire, à partir du seuil celle-ci augmente jusqu'à atteindre un point de saturation [90]. La paroi des microbulles affecte la génération du sous-harmonique et plus particulièrement le seuil de pression. En effet, il a été montré que le seuil de pression des microbulles encapsulées était beaucoup plus faible que celui des microbulles nues [91]. Ce résultat est contraire à ce qui avait été initialement considéré, les premières études suggéraient que l'amortissement induit par l'encapsulation augmenterait le seuil [92] [93]. Dans le cas de microbulles phospholipidiques, Sijl *et al* ont montré, à l'aide du modèle de Marmottant 1.12, 1.13 que cette diminution du seuil était due aux variations rapides de l'élasticité de la paroi durant l'excitation ultrasonore [94].

D'autres paramètres, inhérents à l'excitation ultrasonore, tels que la forme de l'enveloppe d'excitation et le nombre de cycles influent sur la génération du sous-harmonique. Une enveloppe rectangulaire [95] et un nombre de cycle élevé [88] favorisent la génération de sous-harmonique.

1.4.1.2 Concentration des microbulles

Un échantillon d'un agent de contraste est constitué de microbulles de tailles différentes ayant chacune sa propre fréquence de résonance. Ainsi, il est possible d'obtenir un fort signal sous-harmonique en travaillant avec un échantillon de microbulles de taille homogène et sélectionnée en fonction de la fréquence d'excitation [96]. Un autre paramètre, inhérent aux microbulles, est leur concentration. En effet, les microbulles atténuent les ultrasons et Biagi *et al* ont montré que ce phénomène affectait la détection du sous-harmonique. Ils ont caractérisé la réponse sous-harmonique d'un échantillon de SonoVue[®] et ont montré que l'amplitude du sous harmonique diminuait quand la concentration en microbulle augmentait [97],

1.4.1.3 Pression hydrostatique

Plusieurs études ont montré l'influence de la pression hydrostatique sur l'émission sous-harmonique des microbulles [98] [99]. La figure 1.7 tirée de la publication de Frinking *et al* montre le résultat d'une mesure théorique réalisée sur une microbulle de 2.5 μm et indique que lorsque la pression hydrostatique augmente, l'amplitude du sous-harmonique augmente également. Cette découverte est aujourd'hui envisagée pour des application cliniques afin de mesurer des pressions sanguines. Une de ces méthodes sera présentée dans le paragraphe suivant.

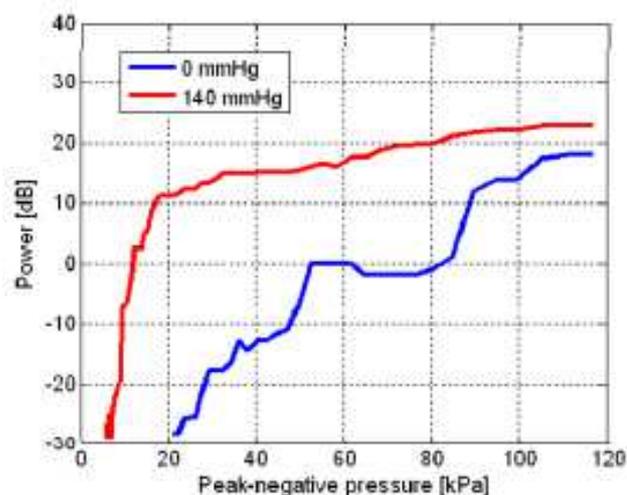


FIGURE 1.7 – Mesure théorique de la composante sous-harmonique d'une microbulle de 2.5 μm étudiés aux pressions suivantes : 0 et 140 mmHg (la figure est tirée de la publication de Frinking *et al.*).

1.4.1.4 *compression-only*

Des mesures optiques effectuées sur des microbulles de SonoVue[®] et de BR14[®], à partir d'une caméra ultra-rapide (Brandaris) [5] ont montré que les oscillations des microbulles pouvaient manifester un comportement non linéaire appelé *compression-only*. Il s'agit d'un comportement où la phase de compression de la microbulle est plus importante que la phase d'expansion [100]. Un exemple de comportement *compression-only* est montré dans la figure 1.8 A). Le comportement *compression-only* de la microbulle correspond à l'état de flambage décrit par le modèle de Marmottant ($\sigma(R)=0$) et à l'émission d'une forte composante sous-harmonique [101] [94]. La relation entre *compression-only* et l'émission sous-harmonique est illustrée sur la figure 1.8 B) qui montre la présence d'une composante sous-harmonique dans la réponse spectrale d'un comportement *compression-only* d'une microbulle de BR14[®].

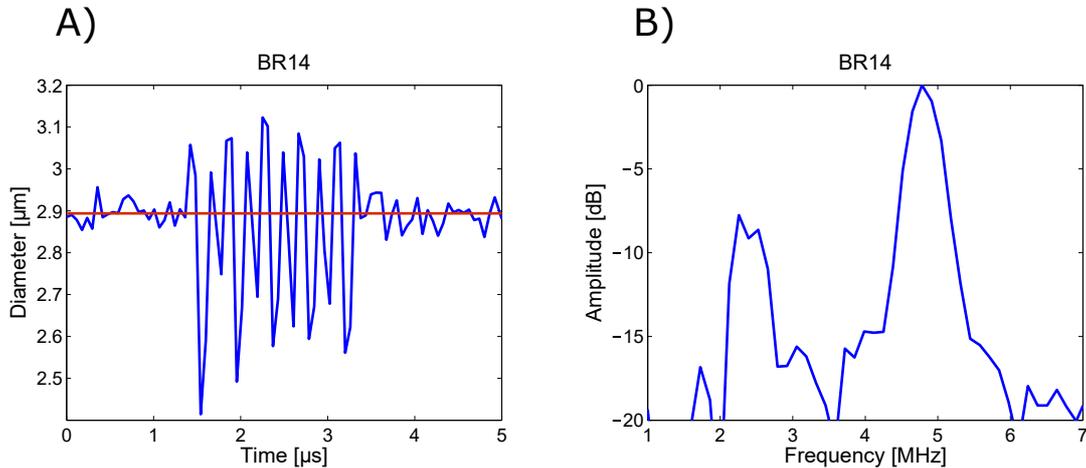


FIGURE 1.8 – Mesure optique montrant un comportement de *compression-only* d'une microbulle de BR14[®] de 2.9 μm de diamètre initial, excitée à 5 MHz et 100 kPa. A) présente la courbe de variation du diamètre de la microbulle en fonction du temps et B) la réponse spectrale correspondante.

1.4.1.5 Retard d'émission

Un retard entre le début d'insonification et la génération du sous-harmonique a été observé par plusieurs groupes mais son origine n'a jamais fait l'objet d'une étude approfondie. Parmi les études les plus récentes, celle de Shekhar *et al*, qui ont observé ce phénomène en caractérisant l'émission non-linéaire des microbulles de l'agent de contraste Targestar-*p* (Targeson Inc., San Diego, États-Unis) [3]. Ces observations ont été obtenues en insonifiant les microbulles à 10 MHz et à 290 kPa. L'évolution de la réponse sous-harmoniques, fondamentale, ultra-harmonique et celle du second-harmoniques de Targestar-*p* sont montrées dans la figure 1.9

Le signal sous-harmonique n'est pas constant au cours du temps. Pourtant la stabilité

1.4. LES SOUS-HARMONIQUES

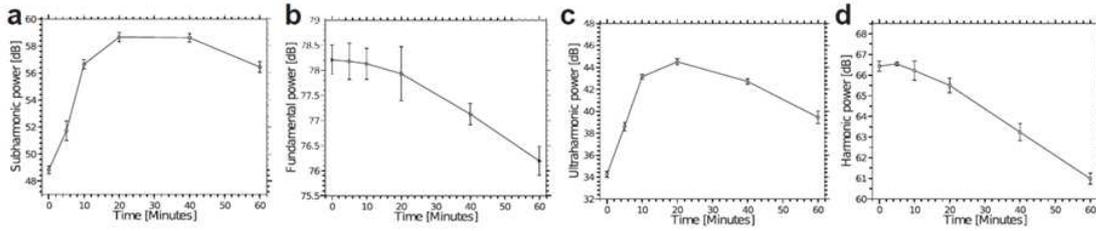


FIGURE 1.9 – Évolution temporelle de la réponse des composantes a) sous-harmonique, b) fondamentale, c) ultra-harmonique et d) second-harmonique des microbulles de Targestar-*p* à 10 MHz et à une pression négative de 290 kPa (la figure est tirée de la publication de Shekhar *et al.* [3]).

de celui-ci est indispensable à la mise en place de cette modalité de manière efficace. Les mécanismes à l'origine de l'émission du sous-harmonique par les microbulles sont encore mal compris. Néanmoins, cette compréhension est primordiale afin d'exploiter cette composante pleinement, que ce soit en imagerie ou en thérapie.

1.4.2 Exemples d'applications

Palanchon *et al* ont réalisé l'une des premières études dédiée à l'utilisation du sous-harmonique émis par les bulles. Ce travail portait sur le développement d'une technique capable de détecter la présence et de mesurer la taille d'embolies gazeuses à partir de leurs émissions sous-harmoniques [102].

En imagerie, plusieurs études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré la faisabilité de l'imagerie sous-harmonique [103]. Des examens préliminaires en imagerie ont déjà été effectués. Forsberg *et al* ont été les premiers à mener un essai clinique portant sur l'évaluation de l'imagerie de contraste sous-harmonique. Cette étude a été réalisée chez 14 patientes pour le diagnostic du cancer du sein. À l'issue de ce travail, les résultats ont montré une nette amélioration de la visualisation et du diagnostic des lésions mammaires [6]. L'utilisation du mode sous-harmonique s'est également traduite par d'importantes améliorations du contraste en imagerie 3D et 4D dans le cadre d'études *in vivo* réalisées chez le chien [104] [105].

Comme nous l'avons mentionné dans la partie 1.4.1.3, la composante sous-harmonique est sensible aux variations de pressions hydrostatiques du milieu [106]. Cette observation a permis l'élaboration d'une technique non-invasive pour estimer la pression sanguine, il s'agit de la technique SHAPE (*Subharmonic Aided Pressure Estimation*). Cette méthode est actuellement au stade expérimental où elle fait l'objet d'études pour le diagnostic de l'hypertension portale [90] [107]. Plus récemment, l'exploitation de la technique SHAPE s'est étendue. En effet, Halldorsdottir *et al.* ont conduit des expériences, dans la perspective d'aboutir au suivi de la pression lymphatique dans les tumeurs [108].

1.5 Conclusion

Au regard des applications prometteuses présentées dans le dernier paragraphe, la compréhension du comportement sous-harmonique des microbulles semble essentielle.

Le travail de cette thèse est orienté vers une meilleure connaissance de l'émission sous-harmonique. Bien que de nombreuses études théoriques ont permis de mieux expliquer ce phénomène, nous allons nous attacher à comprendre sa génération d'un point de vue expérimentale. Pour cela, à partir de caractérisations acoustiques et optiques, nous étudierons les effets de la formulation des agents de contraste ultrasonore et les interactions de ces derniers avec les ondes ultrasonores et leur environnement.

1.5. CONCLUSION

Chapitre 2

Nouvelle approche pour la caractérisation de la distribution en taille des agents de contraste

Le chapitre précédent a montré que l'émission du sous-harmonique était fortement influencée par la fréquence de résonance et l'atténuation des microbulles, deux paramètres qui sont directement liés à la distribution en taille et à la concentration des microbulles. Bien que ces dernières aient une grande influence sur la réponse acoustique des microbulles, peu d'auteurs s'attachent à caractériser de manière systématique le contenu structurel des agents de contraste ultrasonores. Néanmoins, il semble nécessaire d'avoir une pleine connaissance des dimensions et concentration des microbulles pour fournir des résultats solides à toute étude liée à l'émission des composantes sous-harmoniques.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes attachés à proposer une méthode simple et robuste permettant d'accéder à ces informations. Cette méthode a pour ambition d'être une alternative aux méthodes coûteuses existantes aujourd'hui. Dans un premier temps, nous allons faire un rapide tour d'horizon des méthodes actuellement utilisées, avant de présenter notre approche. Enfin, celle-ci sera d'abord validée sur des échantillons de billes de calibration, puis sur un agent de contraste ultrasonore.

2.1 Contexte et objectifs

Déterminer la distribution en taille et la concentration des microbulles contenues dans un échantillon d'un agent de contraste ultrasonore est fondamental pour contrôler sa qualité et suivre sa viabilité au cours du temps. En imagerie, ces paramètres affectent la réponse et l'intensité du signal rétrodiffusé par les agents de contraste [109]. Les agents de contraste utilisés en imagerie, tels que SonoVue[®] et Definity[®] sont composés d'un ensemble de microbulles de tailles différentes couvrant une gamme allant de 0.5 à 10 μm . Par conséquent, l'intensité de leur réponse acoustique correspond à la réponse acoustique de chacune des microbulles. Plusieurs études à ce sujet ont été publiées, elles démontrent qu'aux fréquences utilisées en échographie clinique (1-7 MHz) les grosses et moyennes mi-

crobulles contribuent de manière plus significative à la réponse acoustique que les petites microbulles. Par exemple, si l'on considère SonoVue[®], les microbulles supérieures à 2 μm contribuent le plus à l'intensité du signal rétrodiffusé alors que la majorité des microbulles qui constitue SonoVue ont un diamètre inférieur à 2 μm [16]. La durée de vie des microbulles dans la circulation sanguine joue également un rôle dans l'intensité du signal rétrodiffusé, cette persistance étant liée au temps de dissolution des microbulles, inhérent à la taille des microbulles. En thérapie, il a été démontré que la distribution en taille des microbulles pouvait affecter la sonoporation et la délivrance de médicaments. Novell *et al.* ont justement observé l'influence de la taille de microbulles de BR14[®] sur la sonoporation et la transfection. Cette étude a montré que les petites bulles (diamètre moyen = 1.58 μm) permettaient une meilleure incorporation du médicament dans les cellules que les microbulles plus grosses (diamètre moyen = 5.83 μm) à 1MHz. De plus, des études récentes menées par Choi *et al.* et Wang *et al.* ont montré que les microbulles supérieures à 4 μm induisaient plus facilement l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique [110] [111]. Ces résultats montrent l'importance de connaître et de contrôler au préalable et de manière systématique la distribution en taille des microbulles pour optimiser leur action et la reproductibilité des mesures expérimentales.

Aujourd'hui, les méthodes utilisées pour déterminer la distribution en taille et la concentration des agents de contraste ultrasonore sont basées sur des mesures par microscopie optique [112], diffraction laser [113] [114] ou des mesures de résistance électrique dans un électrolyte (*Compteur Coulter*) [115] [116]. Cependant, bien que toutes ces méthodes aient montré leur efficacité, il n'existe pas de consensus au sein de la communauté scientifique qui consiste à privilégier l'une d'entre elles. Une étude réalisée par Sennoga *et al.* a comparé ces trois techniques [117]. Ils ont mesuré un échantillon de microbulles de SonoVue[®] et ont montré que la méthode optique permettait d'obtenir des mesures de diamètre plus exactes. Selon cette même étude, ils ont montré que les méthodes de diffraction laser et celle de *Compteur Counter* étaient performantes pour le calcul de la concentration mais n'étaient pas adaptées pour la détermination de la taille des microbulles.

La méthode de diffraction laser utilise la théorie de diffusion de la lumière de Mie pour calculer la distribution des particules [118]. Cette théorie est fonction de l'indice de réfraction de la particule mesurée. Cependant, cette indice n'est pas toujours connu. De plus, dans le cas de la microbulle, il ne peut pas être considéré comme homogène car celle-ci est constituée de deux matériaux (le gaz et la coque lipidique) ayant des propriétés optiques très différentes. Par conséquent, son indice de réfraction est estimé, ce qui peut induire une erreur dans les mesures [119].

Les auteurs de Sennoga *et al.* ont également mis en exergue un paramètre pouvant induire des erreurs de mesure dans l'utilisation du *Compteur Counter*. L'appareil de *Compteur Coulter* est constitué d'une sonde munie d'un orifice et qui est immergé dans un électrolyte dans lequel deux électrodes sont également plongées. Une fois diluées dans l'électrolyte, les microbulles passent dans l'orifice ce qui modifie la résistance électrique, cette modification du milieu se traduit par une impulsion dont l'intensité est proportionnelle à la dimension de la microbulle. Néanmoins, l'appareil possède un système d'aspiration constitué d'une pompe à vide pour forcer la microbulle à passer dans l'orifice. Or, les variations de pressions affectent la concentration en gaz des microbulles et de surcroît leur diamètre.

Dans la présente étude, nous avons fait le choix d'appliquer la méthode optique pour des raisons d'efficacité mais également de disponibilité. En effet, notre méthode nécessite un microscope, outil facilement accessible en laboratoire et d'un logiciel disponible gratuitement. Au contraire, les méthodes de diffraction laser et *Compteur Coulter* exigent un appareillage coûteux et une bonne prise en main du matériel. Enfin, il est important de noter que ces méthodes n'ont pas initialement été développées pour la caractérisation des microbulles. C'est pourquoi, nous avons réfléchi à une méthode simple, performante et exclusivement dédiée aux mesures et au comptage des microbulles [120].

Notre méthode est basée sur la création d'un module d'extension ou *plugin*, appelé *BubblesizerJ* développé pour le logiciel ImageJ/FIJI (NIH, Bethesda, États-Unis). ImageJ/FIJI est un logiciel *open source* développé par le *National Institutes of Health*, initialement conçu pour le traitement d'image en biologie et en médecine. ImageJ/FIJI offre la possibilité de développer ses propres *plugin* en langage Java [121] [122] à partir d'algorithmes et de fonctions déjà préexistantes. Aujourd'hui, le logiciel est particulièrement exploité et apprécié pour l'analyse quantitative des cellules [123, 124, 125].

La méthode que nous proposons ici se compose de deux parties :

- Une acquisition manuelle d'un panel d'images microscopiques de notre échantillon de microbulles [112],
- un traitement séquentiel des images effectué automatiquement par le *plugin*.

2.2 Matériel et méthodes

Nous avons utilisé un microscope optique (Leitz, Laborlux D, Stuttgart, Allemagne) et un hémacytomètre (Hausser Scientific, Horsham, États-Unis) qui est une lamelle de comptage. Notre microscope est équipé d'un objectif au grossissement x25 (Leitz, Wetzlar, Allemagne) et d'une caméra CCD. La caméra est reliée à un ordinateur qui va servir à visualiser et à enregistrer les images grâce au logiciel *Digital Microscope Suite* (EasyOn Technology, États-Unis). Le *plugin BubblesizerJ* est exécuté à partir du logiciel ImageJ/FIJI (NIH, Bethesda, États-Unis).

Nous avons testé notre *plugin* en caractérisant trois populations de particules de tailles et de concentrations calibrées et certifiées par le constructeur : Flow-SetTM Pro Fluorospheres (Beckman Coulter, Brea, États-Unis), CountBrightTM (ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis) et FlowCountTM (Beckman Coulter, Brea, États-Unis). Enfin, nous avons validé la méthode en caractérisant la concentration et la distribution en taille des microbulles de l'agent de contraste BR14[®]. Les microbulles sont diluées dans une solution de tampon phosphate salin ou PBS (Phosphate Buffered Saline) préparées en dissolvant des tablettes de PBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis) dans de l'eau distillé.

2.3 Description de la méthode de comptage

2.3.1 Acquisition des images

Pour réaliser le comptage, un échantillon de microbulles est extrait et dilué dans du PBS. La suspension de microbulles est ensuite injectée à l'aide d'une micropipette dans la plaque d'hémacytomètre qui se remplit par capillarité. Différentes dilutions ont été préalablement testées afin de vérifier l'absence d'agglomérats et la dispersion spatiale des microbulles. En effet, une concentration trop élevée ou trop faible, occasionnerait des erreurs dans l'estimation de la concentration. Dans le cas de BR14[®], nous avons effectué une dilution au 1/50ème.

Une fois la plaque d'hémacytomètre remplie, elle est placée sous le microscope optique. Avant de commencer l'acquisition, nous attendons quelques secondes pour permettre aux microbulles de remonter à la surface de la lamelle et être ainsi mises sur le même plan. Nous commençons ensuite l'étape d'acquisition. Pour cela, plusieurs captures de notre échantillon sont effectuées à plusieurs endroits choisis aléatoirement. Entre 30 et 40 images sont prises. Si l'on considère la dilution que nous avons effectuée (1/50ème), ce nombre d'images permet d'obtenir un total de microbulles significatif du point de vue statistique pour déterminer la concentration et la distribution en taille de notre échantillon [126].

2.3.2 Description du *plugin*

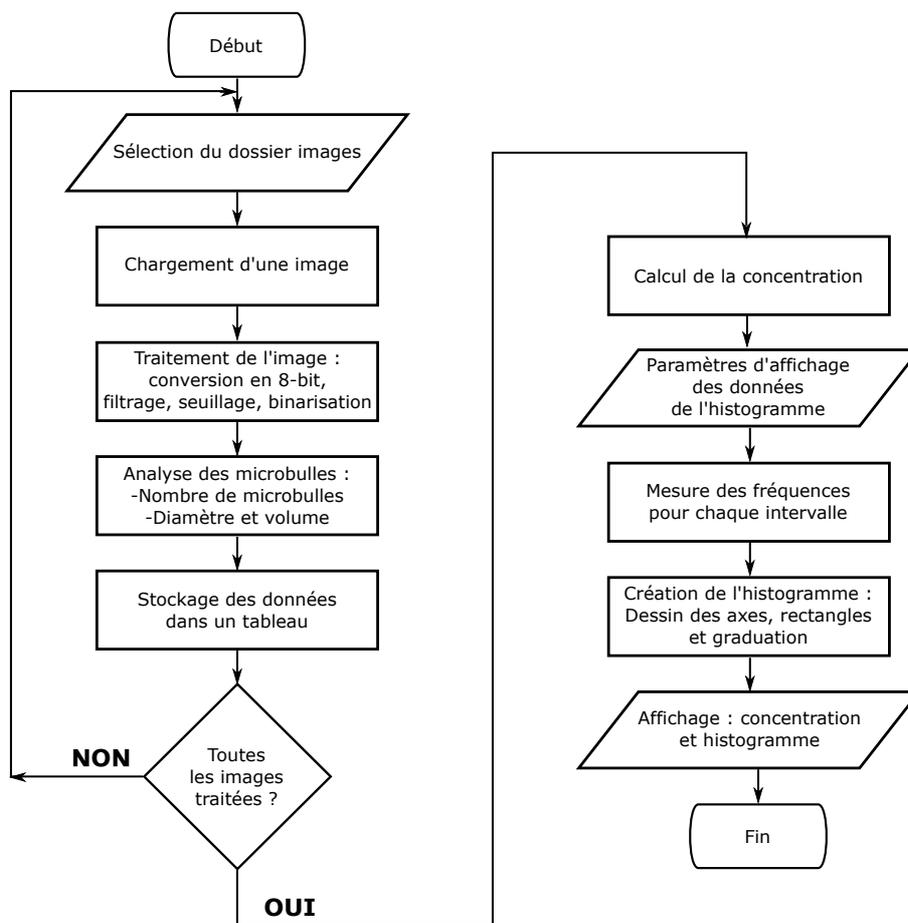
Une fois les images acquises, elles sont interprétées par *BubblesizerJ* qui va automatiquement calculer la distribution en taille et la concentration de notre échantillon.

Les images issues du microscope et acquises par le détecteur CCD présentent des défauts qui peuvent altérer la qualité de l'image et donc les performances de l'analyse. Parmi les éléments qui peuvent dégrader la qualité de l'image, il y a le bruit inhérent au capteur CCD. Par conséquent, chaque image va être préalablement traitée. Ce traitement réalisé par *BubblesizerJ* comporte une succession d'algorithmes et de filtres accessibles depuis la plateforme ImageJ. Dans la figure 2.1, nous avons résumé les différentes étapes d'exécution de notre programme par un algorithme.

Tout d'abord, *BubblesizerJ* cherche et ouvre le fichier contenant toutes les images microscopiques. Les images sont ensuite codées en 8-bit. Puis, un filtre gaussien (flou gaussien) est appliqué sur chacune des images afin de réduire le bruit. L'arrière plan est soustrait en appliquant l'algorithme du *rolling-ball* [127], ne reste alors que les microbulles dans l'image. A ce stade, nous effectuons un seuillage ou *thresholding* qui est un processus de segmentation qui sépare des parties de l'image en fonction de l'intensité des pixels [128]. Cette étape nous permet d'attribuer deux valeurs de pixels et ainsi binariser notre image. Par la suite, d'autres traitements de segmentation sont appliqués tel que l'algorithme de *Watershed* qui permet de différencier les microbulles qui se sont agrégées [129]. Enfin, notre processus de binarisation s'achève avec une suite d'instruction telle que *Fill Holes*, qui permet de combler les trous à l'intérieur de la microbulle, qui deviennent alors un cercle de couleur homogène [130]. Un exemple est illustré dans la figure 2.2 A) qui montre le traitement effectué sur un échantillon de microbulles de BR14[®].

A partir des images traitées, ImageJ va pouvoir effectuer les mesures sur les microbulles,

via l'instruction *Analyse Particles*. Les microbulles sont alors identifiées, dénombrées et calibrées. Les microbulles situées en bordure de l'image ne sont pas comptabilisées, quant à leur diamètre, nous fixons un seuil minimal de détection qui correspond à la limite de la résolution de notre microscope. Cette dernière condition est très intéressante dans la mesure où elle permet d'éviter le comptage de pixels en provenance du bruit de fond. Les mesures sont ensuite rangées dans un tableau, pour être traitées afin d'obtenir la mesure de concentration et la distribution en taille qui s'affichera sous la forme d'un histogramme comme le montre la figure Figure 2.2 B).

FIGURE 2.1 – Algorithme du *plugin Bubblesizer.J*.

2.4 Validation du *plugin*

Dans le but de valider notre méthode, nous avons effectué des tests sur des billes dont la taille et la concentration sont calibrées.

Dans un premier temps, nous avons calibré le diamètre des particules de Flow-SetTM et CountBrightTM qui sont des billes de cytométrie dont les diamètres sont connus et calibrés. Les billes de Flow-SetTM ont un diamètre de 1 μm et les billes de CountBrightTM ont un

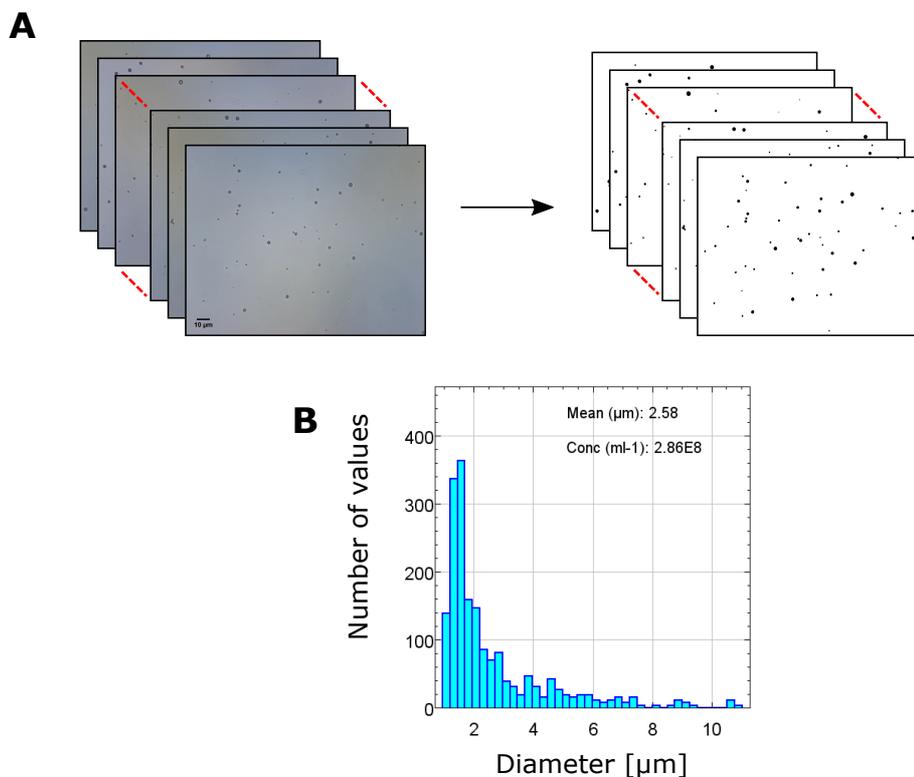


FIGURE 2.2 – Analyse et mesure effectuées par le *plugin Bubblesizer.J*. A) Chargement et traitement des images microscopiques puis B) affichage de la distribution en taille, concentration et diamètre moyen de l'échantillon.

diamètre de 7 μm (données fournies par le fabricant). Leurs diamètres correspondent à celui d'une "petite" microbulle (1 μm) et à celui d'une "grosse" microbulle (7 μm). Il s'agit là de déterminer la précision des mesures de notre *plugin*.

Dans un second temps, nous avons caractérisé le diamètre et la concentration d'un échantillon de billes Flow-CountTM Fluorospheres, qui sont des billes en polystyrène de diamètre homogène (10 μm) et de concentration connus, certifiés par le constructeur.

Enfin, le *plugin* a été testé en caractérisant les microbulles de l'agent de contraste BR14[®]. Nous avons comparé les mesures de BR14[®] obtenues avec notre méthode avec celles rapportées dans la littérature [131].

Tous les résultats figurant dans cette étude sont présentés sous forme d'une moyenne d'au moins trois essais indépendants répétés, et associés à un écart-type représentant la dispersion des données. Pour chaque nouvel essai, un échantillon était nouvellement prélevé. Dans le cas de BR14[®] chaque échantillon provenait d'une fiole différente et fraîchement activée.

2.5 Résultats et discussion

2.5.1 Validation sur des billes de calibration

Le tableau 2.1 présente les mesures de diamètre des billes de Flow-SetTM et de CountBrightTM obtenues avec *BubblesizerJ*. Le diamètre moyen des billes présenté dans le tableau a été calculé à la suite d'un essai répété trois fois (n=3). Aucune dilution n'a été effectuée au préalable. Si l'on regarde les résultats, notre *plugin BubblesizerJ* a mesuré un diamètre moyen de 1.04 μm pour les billes de Flow-SetTM et 6.94 μm pour les billes de CountBrightTM. Lorsque l'on compare ces valeurs avec ceux fournis par le fabricant (1 μm pour Flow-SetTM et 7 μm pour CountBrightTM), on constate une bonne concordance. Ces résultats montrent que notre *plugin* est capable de fournir une mesure précise du diamètre.

	Diamètre moyen (μm)	
Particules	Littérature	<i>BubblesizerJ</i>
Flow-Set TM	1	1.04 (\pm 0.12)
CountBright TM	7	6.94 (\pm 0.11)

TABLE 2.1 – Diamètre des billes de calibration : Flow-SetTM et CountBrightTM donné par le fabricant et calculé par le *plugin BubblesizerJ*.

Le tableau 2.2 montre les résultats des mesures de diamètre et de concentration des billes de FlowCountTM (n=4) obtenus à partir de *BubblesizerJ*. Chaque essai correspond ici à l'analyse de 30 images microscopiques.

Pour les mesures effectuées sur les billes de FlowCountTM, le diamètre calculé par *BubblesizerJ* (9.94 μm) concorde bien avec la valeur donnée par le fabricant (10 μm). En ce qui concerne la mesure de la concentration, *BubblesizerJ* donne une valeur de 1.1×10^6 billes/mL, un résultat également en bon accord avec la concentration donnée du constructeur (0.9- 1.1×10^6 billes/mL).

2.5.2 Validation sur un agent de contraste : BR14[®]

Enfin, nous avons caractérisé la concentration, le diamètre moyen et la distribution en taille de l'agent de contraste BR14[®]. Chaque essai correspond à l'analyse d'une trentaine d'images. Une dilution de 1/50ème a été effectuée pour chacun des essais.

BubblesizerJ a mesuré un diamètre moyen égale à 2.40 μm et une concentration moyenne de 3.12×10^8 microbulles/mL. D'après les données présents dans la littérature, BR14 à un diamètre moyen de 2 μm et une concentration comprises entre 2 et 5 microbulles/mL [131]. Par conséquent, les résultats que nous avons obtenus avec *BubblesizerJ* présentent une bonne concordance avec les valeurs publiées.

Il est à noter que le programme s'exécute assez rapidement, pour la caractérisation de l'agent de contraste BR14[®] le *plugin* s'est exécuté en moyenne en 1 minute sur un

2.6. CONCLUSION

Particules	Concentration (mL^{-1})		Diamètre moyen (μm)	
	Littérature	<i>BubblesizerJ</i>	Littérature	<i>BubblesizerJ</i>
FlowCount TM	0.9-1.1x10 ⁶	1.1x10 ⁶ ($\pm 3.4 \times 10^5$)	10	9.94 (± 0.05)
BR14 [®]	2-5x10 ⁸	3.12x10 ⁸ ($\pm 1.1 \times 10^7$)	2.5-3	2.40 (± 0.23)

TABLE 2.2 – Concentration et diamètre des billes de calibration Flow-CountTM et de l’agent de contraste BR14[®] mesurés par le *plugin BubblesizerJ* et donnés dans la littérature.

ordinateur portable ayant une configuration standard.

2.6 Conclusion

BubblesizerJ est une méthode simple et rapide pour déterminer la distribution en taille, le diamètre moyen et la concentration d’un agent de contraste à partir d’un lot d’images microscopiques d’un échantillon de microbulles.

BubblesizerJ a été validé à partir de billes de calibration de différentes tailles. Nous l’avons ensuite testé sur un agent de contraste ultrasonore BR14[®], les mesures que nous avons obtenues sont comparables à celles publiées dans la littérature.

À l’avenir, la caractérisation systématique des agents de contraste ultrasonore a vocation à prendre une place de plus en plus importante en raison de l’émergence de techniques en thérapie. Ainsi, l’objectif de cette étude était de mettre en place un outil de caractérisation simple et facile avec un matériel accessible, peu onéreux et permettant une bonne prise en main. Dans la suite de la thèse nous utiliserons cet outil afin de caractériser nos échantillons de microbulles.

Chapitre 3

Effets de la composition en gaz des agents de contraste ultrasonore sur l'émission sous-harmonique

La compréhension des paramètres impliqués dans l'émission du sous-harmonique des microbulles est primordiale pour son exploitation en imagerie. Dans ce chapitre, nous mettons en évidence le fait que la composante sous-harmonique des agents de contraste ultrasonore présente un retard d'émission. Les causes de ce retard, qui se traduit par une émergence du sous-harmonique des minutes après le début de l'excitation ultrasonore, restent encore indéfinies.

Comme nous l'avons vu dans la partie 1.4, de nombreux groupes ont examiné les facteurs impliqués dans la génération de la composante sous-harmonique par les microbulles. Ces facteurs concernent pour la plupart des paramètres inhérents à l'excitation ultrasonore (fréquence, pression acoustique), ou aux propriétés physiques de la paroi des microbulles (tension de surface, concentration des phospholipides). Bien que ces études, aient grandement contribué à la compréhension et à l'optimisation de l'émission sous-harmonique, la littérature manque de données quant aux effets du constituant gazeux de la microbulle sur la réponse sous-harmonique ou plus généralement sur sa réponse acoustique. Dans ce chapitre, nous mettons en exergue le rôle du gaz dans la génération du sous-harmonique. Plus précisément, nous développons une approche mettant en relation la nature du gaz et le temps de retard du sous-harmonique par les microbulles. Cette approche sera illustrée par des modèles expérimentaux [132].

3.1 Contexte et objectifs

3.1.1 Quelques propriétés au sujet du composant gazeux des microbulles

Les microbulles sont composées d'un gaz à haut poids moléculaire. Celui-ci peut être combiné avec un second gaz, lequel s'agit généralement du N_2 (BR14[®]). Lorsque les microbulles sont administrées, dans un environnement gazeux différents, tel que l'eau ou le sang, elles se retrouvent en proie à des échanges gazeux [133]. En effet, dans les milieux aqueux, la tension de surface à l'interface gaz/liquide (σ) de la microbulle génère une pression de Laplace (ΔP) qui conduit à la diffusion du gaz de l'intérieur de la bulle vers le milieu extérieur, telle que défini par l'équation suivante :

$$\Delta P = P_{int} - P_{ext} = \frac{2\sigma}{r} \quad (3.1)$$

Où P_{int} est la pression interne, et P_{ext} la pression dans le milieu environnant.

Ainsi, pour ralentir la diffusion des microbulles, celles-ci sont stabilisées à la fois par un gaz à faible solubilité et par une paroi.

La paroi a pour rôle de réduire la tension de surface à l'interface entre le gaz et le liquide environnant de la microbulle, et agit comme une barrière imperméable à la diffusion du gaz. Cette résistance à la perméabilité a fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, Borden et Longo ont modifié l'équation de dissolution d'une bulle de gaz d'Epstein-Plesset [134] pour tenir compte de cette résistance dans le cas des microbulles à paroi phospholipidiques. Ils ont montré que la résistance des parois de phospholipides était étroitement liée à la taille des chaînes hydrophobes. Plus celles-ci sont longues plus elles accroissent la résistance de la paroi à la diffusion du gaz [135], et réduisent la tension de surface [136]. Par la suite, Sarkar *et al* ont développé un modèle théorique pour estimer le temps de diffusion du gaz d'une microbulle en tenant compte des effets d'une paroi de phospholipides [1]. Leur étude a notamment montré que le SF_6 contenu dans les microbulles avait un temps de diffusion beaucoup plus rapide que les gaz de perfluorocarbures. Dans notre étude, nous nous référons aux temps de diffusion rapportés dans les travaux de Sarkar *et al*.

Les propriétés de diffusion des gaz contenus dans les microbulles ont également fait l'objet d'études, notamment en imagerie de contraste. Kabalnov *et al* ont étudié la durée de vie des microbulles en fonction de leur gaz dans la circulation sanguine. Pour cela, ils ont comparé des microbulles lesquelles avaient la même paroi mais un composant gazeux différent. Leurs travaux ont montré que, les microbulles qui étaient constituées du gaz le moins diffusant persistaient le plus longtemps [137] [138].

Les effets de la nature du gaz des microbulles en imagerie ont également été étudiés par Forsberg *et al*. Plus précisément, ils ont mené une étude *in vivo* quant aux effets du composant gazeux sur l'énergie rétrodiffusée par les microbulles. Ils ont étudié la réponse de deux agents de contraste, ST68 et ST44 [139] lesquels sont tantôt formulés avec de l'air, du C_4F_{10} ou du SF_6 . Ces deux agents sont composés d'une paroi de surfactants monoionique, le sorbitane, mais leurs parois diffèrent en ce qui concerne la formulation chimique

de ce dernier. Les résultats ont montré que lorsque les microbulles sont constituées des gaz à haut poids moléculaires, celles-ci rétrodiffusent un signal beaucoup plus intense que les microbulles d'air. Ils ont également mis en évidence le fait que les bulles de ST68 composé de SF₆ génèrent un signal plus intense que les bulles de ST44 également composées de SF₆, ce qui démontre que la paroi joue également un rôle dans l'intensité de l'énergie rétrodiffusée par les microbulles [140].

Bien que toutes ces études mettent en évidence le rôle du gaz dans l'efficacité des agents de contraste, il n'existe, à notre connaissance qu'une seule étude (Shekhar *et al*) qui ait abordé ses effets sur la réponse non linéaire des microbulles [3]. Ainsi, dans le cadre de notre étude, nous nous attacherons à étudier l'impact du gaz sur la génération de la composante sous-harmonique.

3.1.2 Retard d'émission du sous-harmonique

Le coeur de cette étude porte sur une observation, inhérente à l'émission de la composante sous-harmonique, à savoir sa génération tardive dans le temps par les microbulles. Ce phénomène, très méconnu, témoigne d'une instabilité de l'amplitude du sous-harmonique au cours du temps. De fait, cela compromet l'exploitation du sous-harmonique en imagerie et la reproductibilité des mesures expérimentales. Ainsi, une compréhension des paramètres à l'origine de ce retard est primordiale. Dans la partie 1.4.1.5 du chapitre 1, nous avons abordé l'étude de Shekhar *et al* [3] qui ont caractérisé l'émission du sous-harmonique des microbulles de l'agent de contraste Targestar-*p*[®] (microbulles de C₄F₁₀ et à paroi phospholipidiques). Ces derniers, ont montré un retard de plusieurs minutes, de la composante sous-harmonique, alors que le fondamental et la seconde harmonique émergent dès l'application de l'excitation ultrasonore, comme cela est montrée dans la Figure 1.9. Néanmoins, aucune autre étude n'a été portée à notre connaissance s'agissant d'expliquer ce retard ou de savoir s'il est observé avec d'autres agents de contraste.

3.1.3 Objectifs de l'étude

Lors de cette étude nous nous sommes attachés à caractériser l'émission du sous-harmonique de cinq agents de contraste ultrasonore contenant des gaz différents. Nous avons tenu à sélectionner des microbulles disponibles sur le marché et constituées de parois ayant une composition principale similaire (paroi à phospholipides). Suite à ces observations, nous nous sommes intéressés d'une part aux effets inhérents à la nature du gaz et d'autre part à ceux dus à la diffusion, car ce phénomène modifie la composition en gaz des microbulles au cours du temps. En tenant compte des propriétés du gaz contenu dans les microbulles, nous avons émis des hypothèses pour enrayer le retard de la composante sous-harmonique, afin de stabiliser son amplitude au cours du temps.

Ainsi, dans un premier temps, nous allons présenter les résultats de caractérisation de l'évolution temporelle du sous-harmonique des différents agents de contraste. Puis, nous modifierons les constituants gazeux de ces derniers, via une procédure que nous détaillerons. Enfin, nous re-caractériserons l'émission du sous-harmonique après la substitution du gaz.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Les microbulles

Nous avons caractérisé l'émission du sous-harmonique de cinq agents de contraste : BR1[®], BR14[®], BG7725[®], MM1[®] et Definity[®]. Tous ces agents sont constitués de microbulles à coque phospholipidique, mais leur composant gazeux peut différer. La composition en gaz des microbulles est présentée dans le tableau 3.1.

Agent de contraste	Gaz	Fabricant
BR1 [®]	SF ₆	Bracco
Definity [®]	C ₃ F ₈	Lantheus Medical Imaging
BR14 [®]	C ₄ F ₁₀ /N ₂	Bracco
MM1 [®]	C ₄ F ₁₀	VisualSonics
BG7725 [®]	C ₄ F ₁₀	Bracco

TABLE 3.1 – Liste des agents de contraste utilisés lors de cette étude et leur composition en gaz.

3.2.2 Installation expérimentale

La figure 3.1 présente le schéma du dispositif expérimental utilisé pour caractériser la réponse sous-harmonique des agents de contraste ultrasonore.

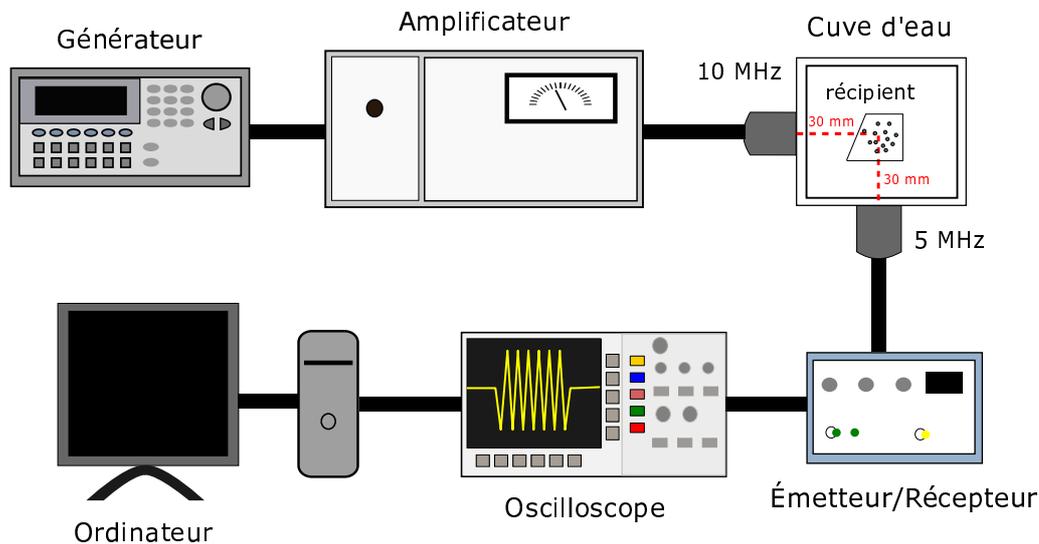


FIGURE 3.1 – Dispositif expérimental utilisé pour caractériser la réponse du sous-harmonique des microbulles.

L'expérimentation est conduite à température ambiante et à pression atmosphérique dans une cuve remplie d'eau faisant 6 cm de hauteur, 9.4 cm de largeur et 9.4 cm de lon-

3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

gueur. Les mesures ont été effectuées en transmission avec un transducteur mono-élément centré à 10 MHz pour l'émission (V311, Olympus Panametrics, Waltham, États-Unis) et un second transducteur mono-élément centré à 5 MHz pour la réception (V309, Olympus Panametrics, Waltham, États-Unis). Chaque transducteur est placé sur une face de la cuve et positionné perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. Le champ ultrasonore des transducteurs a été caractérisé avec un hydrophone (0.2 mm, Precision Acoustics, Dorchester, Grande-Bretagne), ces mesures ont permis de déterminer une distance focale de 30 mm pour les deux mono-éléments et la pression négative (PNP) a également été mesurée en ce point.

Les microbulles sont immergées dans un récipient (hauteur 6.4 cm, largeur 3.1 cm et longueur 3.1 cm) contenant 60 mL d'une solution de tampon phosphate salin, préalablement préparée en dissolvant des tablettes de PBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis) dans de l'eau distillée. Le récipient est ensuite placé à l'intérieur de la cuve, à l'intersection des distances focales des deux transducteurs. Le récipient possède sur chaque face, une ouverture constituée d'une fine membrane de mylar laissant passer les ondes ultrasonores.

Les microbulles sont excitées par un signal ultrasonore de 10 MHz produit par un générateur (Agilent Technologies, Santa-Clara, États-Unis), amplifié par un amplificateur (ADECE, Artannes sur Indre, France) puis transmis au transducteur centré à 10 MHz. Le signal contient des trains d'onde de 50 cycles, répétés à une fréquence de 2 Hz (PRF) et une pression négative de 450 kPa (indice mécanique = 0.14). Le signal rétrodiffusé par les microbulles est récupéré par le transducteur centré à 5 MHz puis amplifié de 30 dB par un émetteur/récepteur (5077 PR, Olympus, Tokyo, Japon). La réponse est ensuite visualisée sur un oscilloscope (TDS 3044B, Tektronix, Beaverton, États-Unis) à partir duquel les données sont récupérées et stockées sur un ordinateur. Toutes les données présentées dans cette étude ont été traitées avec le logiciel Matlab (The MathWorks, Natick, États-Unis).

La durée totale de l'expérience est de 90 minutes, la réponse acoustique des microbulles est acquise toutes les 3 minutes. Pour minimiser la destruction des microbulles, l'agent de contraste n'est pas insonifié entre deux transmissions/acquisitions. Les microbulles sont agitées en continu par un agitateur magnétique, afin de maintenir une suspension homogène. À la fin de chaque expérience, le récipient est soigneusement nettoyé et des microbulles fraîchement activées sont introduites.

La concentration et distribution en taille des microbulles introduites dans le récipient, ont été systématiquement calculées avec la méthode *BubblesizerJ*, que nous avons développée dans le chapitre 2. Afin de comparer la réponse sous-harmonique des différents agents de contraste entre eux, nous avons effectué des dilutions de telle sorte à caractériser la même concentration de microbulles. Si bien que tous les agents de contraste ont été caractérisés à la même concentration de 1.7×10^5 microbulles/mL. Les dilutions effectuées pour chaque agent de contraste sont présentées dans le tableau 3.2.

Agent de contraste	Dilution
BG7725 [®]	1 :20 000
BR14 [®]	1 :2317
MM1 [®]	1 :7416
BR1 [®]	1 :2100
Definity [®]	1 :200 000

TABLE 3.2 – Dilution effectuée pour chaque agent de contraste lors de cette étude.

3.2.3 Analyse des données

Nous avons relevé les amplitudes maximales correspondantes aux composants fondamentale et sous-harmonique à partir de la réponse spectrale des microbulles. Chaque point de mesure, effectué toutes les 3 minutes, correspond à la moyenne de 20 acquisitions. Les barres d'erreurs, représentent l'écart type et indiquent la dispersion des données sur les 20 acquisitions. Toutes les mesures ainsi que les traitements ont été effectués à partir du logiciel Matlab.

3.2.4 Substitution du gaz

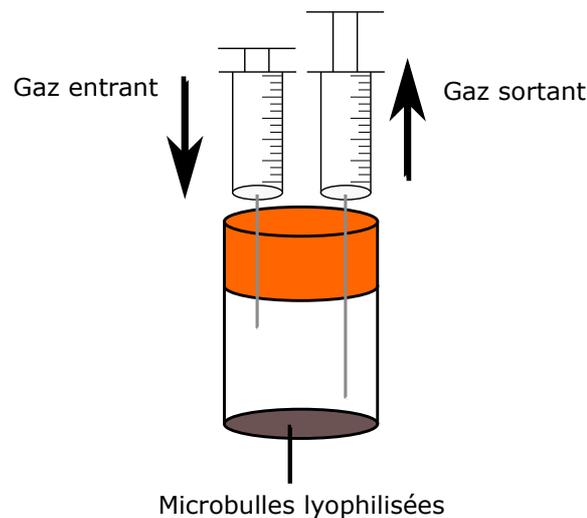


FIGURE 3.2 – Présentation schématique du processus de substitution du gaz à partir d'une fiole contenant l'agent de contraste inactivé.

Afin de comparer l'effet du gaz sur la réponse sous-harmonique des microbulles, celles-ci ont été caractérisées avec leur gaz original, puis elles ont été re-caractérisées après substitution de leur gaz par un autre. Afin de modifier le gaz des agents de contraste, nous avons mis en place la procédure suivante. Elle consiste à échanger les gaz avant l'activation des microbulles. Comme nous l'avons évoqué dans la partie 1.1.3, quand l'agent de contraste est "inactivé", la fiole est composée du mélange membranaire sous forme lyophilisé et l'espace est comblé du gaz, lequel formera les microbulles. Ainsi, pour modifier le composant

3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

gazeux des microbulles, il suffit d'extraire le gaz de la fiole quand les microbulles sont "inactivées", puis d'y administrer le nouveau gaz en remplacement. De cette manière, les microbulles seront constituées du nouveau gaz après leur activation. Pour ce faire, nous avons placé deux aiguilles (20 Gauge, Terumo, Leuven, Belgique) à travers le septum de la fiole. La première aiguille est montée sur une seringue vide de 5 mL, qui va permettre l'extraction du gaz en tirant sur celle-ci. La seconde aiguille est montée sur une seringue qui a été préalablement remplie du gaz de substitution, qui occupera l'espace de la fiole une fois injecté. Un schéma de la manoeuvre de substitution est présenté dans la figure 3.2.

3.2.5 Système d'imagerie

Pour compléter le travail sur les effets du gaz et offrir des perspectives d'évolution, nous avons effectué une expérience préliminaire pour regarder sa faisabilité en imagerie échographique de contraste. Pour cela, nous avons mené une étude sur les microbulles de BG7725[®]. Dans un premiers temps, nous avons imagé les microbulles qui sont initialement constituées de C_4F_{10} , puis nous avons reproduit l'acquisition après substitution du gaz d'origine avec de l'air. Un schéma de l'installation expérimentale est présenté dans la figure 3.3.

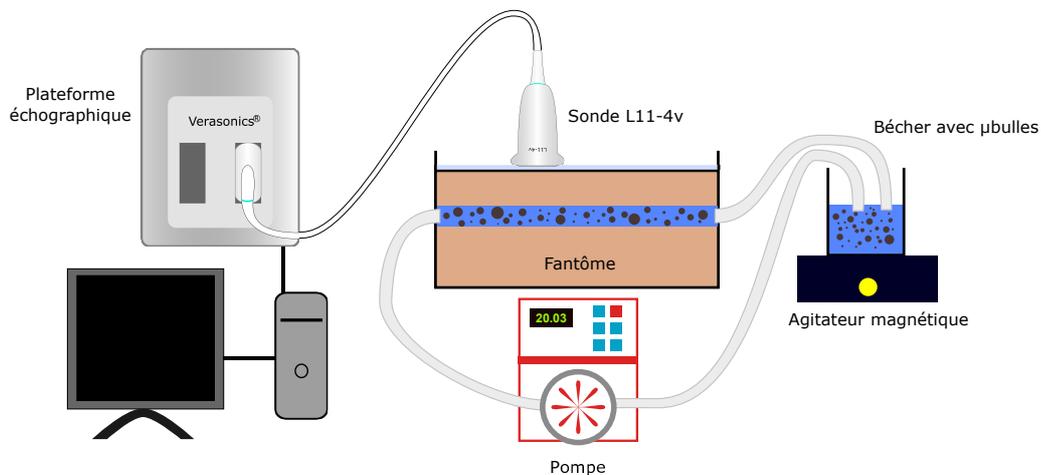


FIGURE 3.3 – Schéma de l'installation expérimentale.

Les images échographiques ont été réalisées à partir de l'échographe Verasonics Vantage et d'un fantôme Doppler (524, ATS Laboratories, Bridgeport, États-Unis) dédié à l'étude de la vascularisation périphérique (Le système Verasonics ainsi que la formation de faisceaux sont décrits en Annexe B). Le fantôme est constitué de 4 canaux, de diamètres variables, qui simulent un conduit vasculaire. Ces derniers sont placés 15 mm en dessous de la surface du fantôme, dans un milieu ayant une absorption acoustique proche de la valeur moyenne dans les tissus mous ($0.5 \text{ dB cm}^{-1} \text{ MHz}^{-1}$), mais dénué de tout réflecteur diffusant. Dans le cadre de notre étude, et pour des raisons purement pratiques, la mesure de contraste a été réalisée sur le canal de 6mm. Une pompe (Ismatec, Wertheim, Allemagne) reliée au fantôme assure la circulation des microbulles à l'intérieur du tube. Une solution

3.3. RÉSULTATS

de BG7725[®] a été diluée au 1/3000 ème pour les microbulles de C₄F₁₀ et 1/2000 ème pour celles chargées avec de l'air, dans un réservoir remplie de 30 mL d'une solution de tampon phosphate salin (PBS, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis). Les microbulles sont agitées en continu grâce à un agitateur magnétique. À la fin de chaque expérience le récipient est nettoyé, la solution de PBS est renouvelée et des microbulles fraîchement activées sont introduites. Deux échantillons de microbulles de BG7725[®] ont été étudiés. Le premier est composé des microbulles formées à partir de leur gaz initial C₄F₁₀ et le second est composé de microbulles reconstituées avec l'air. Le procédé de substitution du gaz est le même que celui décrit dans la partie 3.2.4.

Pour donner une plus grande valeur statistique à l'étude, l'acquisition a été réalisée sur 30 *frames* pour chacune des deux populations de microbulles. De plus, et afin de confirmer la reproductibilité de la mesure, la même expérience a été réalisée deux fois consécutivement, en réinitialisant à chaque fois le matériel expérimental. La première acquisition sera appelée "Expérience 1", tandis que la seconde sera appelée "Expérience 2" dans la suite de ce document.

3.3 Résultats

3.3.1 Caractérisation de retard de l'apparition de sous-harmonique

Nous avons caractérisé l'émission du sous-harmonique de l'agent de contraste BG7725[®], pendant une durée de 90 minutes suite à l'émission à 10 MHz et 450 kPa. La réponse spectrale aux temps $t = 0, 15, 30, 45$ et 90 minutes et l'ensemble des mesures recueillies au cours des 90 minutes sont présentées dans la figure 3.4.

Les spectres à $t = 0$ min et $t = 15$ min (Figure 3.4 a et b) montrent la présence d'une composante fondamentale mais une absence de composante sous-harmonique. Si l'on regarde l'évolution de la réponse des microbulles de BG7725[®], on s'aperçoit qu'au temps $t = 30$ min, le spectre révèle l'émergence d'une composante sous-harmonique (Figure 3.4 c). Cette dernière croît de 7 dB en amplitude au temps $t = 45$ min et de 10 dB au temps $t = 90$ min 3.4 d et e).

En observant la Figure 3.4 f, qui représente l'ensemble des acquisitions effectuées au cours des 90 minutes, on remarque que l'amplitude du sous-harmonique évolue selon trois phases. La première phase se situe entre 0 et 20 minutes et correspond à l'absence de la composante sous-harmonique. La seconde phase est entre 20 et 60 minutes, et coïncide avec une phase d'accroissement. Enfin, la dernière phase se situe au-delà de 60 minutes, et correspond à une saturation de l'amplitude du sous-harmonique. Au cours de cette période, la composante fondamentale reste sensiblement constante.

Ces résultats sont en accord avec ceux de shekhar *et al* qui avaient également observé, dans un premier temps une absence, puis une émergence de la composante sous-harmonique des microbulles de Targestar-*p* au cours du temps. Par la suite nous qualifierons ces observations de "retard" du sous-harmonique.

Dans un second temps, nous avons cherché à savoir si ce retard était présent chez d'autres agents de contraste ultrasonore. Ainsi, nous avons caractérisé l'émission du sous-harmonique de BR1[®] (SF₆), Definity[®] (C₃F₈), BR14[®] (C₄F₁₀) et MM1[®] (C₄F₁₀). La cinétique d'ap-

3.3. RÉSULTATS

parition de leur réponse sous-harmonique à 10 MHz et 450 kPa est illustrée dans la figure 3.5.

En regardant les graphes qui représentent la réponse sous-harmonique des agents de contraste BR14[®] et MM1[®] (Figure 3.5 b et c), on s’aperçoit que ceux-ci sont caractérisés par une émergence tardive, similairement à BG7725[®]. En examinant de plus près l’évolution de leur composante sous-harmonique, celle-ci évolue selon les trois phases (absence, émergence et saturation) que nous avons décrites précédemment pour BG7725[®] (Figure 3.4). Pour déterminer le retard temporel, nous considérerons le temps pour lequel l’amplitude du sous-harmonique est égale à la moitié de sa valeur maximale. Le retard d’émission du sous-harmonique des échantillons de BG7725[®], BR14[®] et MM1[®] peut alors être estimé à environ 40 minutes.

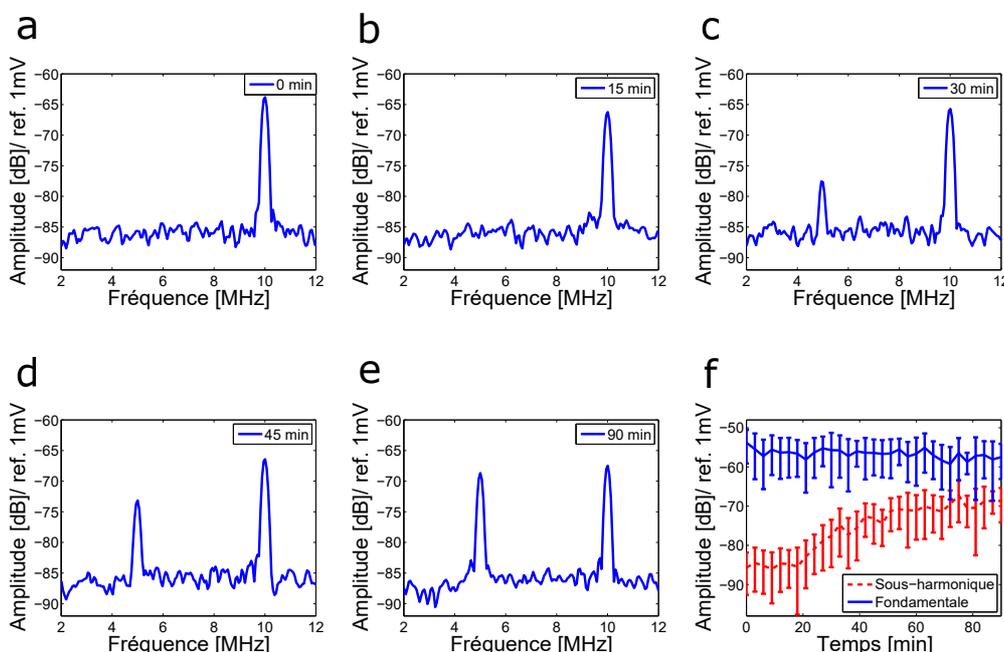


FIGURE 3.4 – Réponse spectrale des composantes sous-harmonique et fondamentale des microbulles de BG7725[®] à 10 MHz et 450 kPa au temps a) $t = 0$ min, b) $t = 15$ min, c) $t = 30$ min, d) $t = 45$ min, e) $t = 90$ min et f) représentation de l’ensemble des acquisitions recueillies, toutes les 3 minutes au cours de 90 minutes.

La figure 3.5 d présente l’évolution de la réponse sous-harmonique de BR1[®]. On peut voir que, contrairement, à ce que nous avons observé pour les trois autres agents de contraste, celle-ci émerge rapidement, au bout de trois minutes (Figure 3.5 a). Néanmoins, aucune mesure n’a été effectuée entre le temps initial et la 3^{ème} minute, il est donc possible que le sous-harmonique apparaisse un peu avant. Enfin, la figure 3.5 e présente l’évolution de la réponse sous-harmonique de Definity[®]. Celle-ci présente un retard, que l’on peut estimer à environ 10 minutes et qui est plus faible que celui observé pour BG7725[®], BR14[®] et MM1[®].

3.3. RÉSULTATS

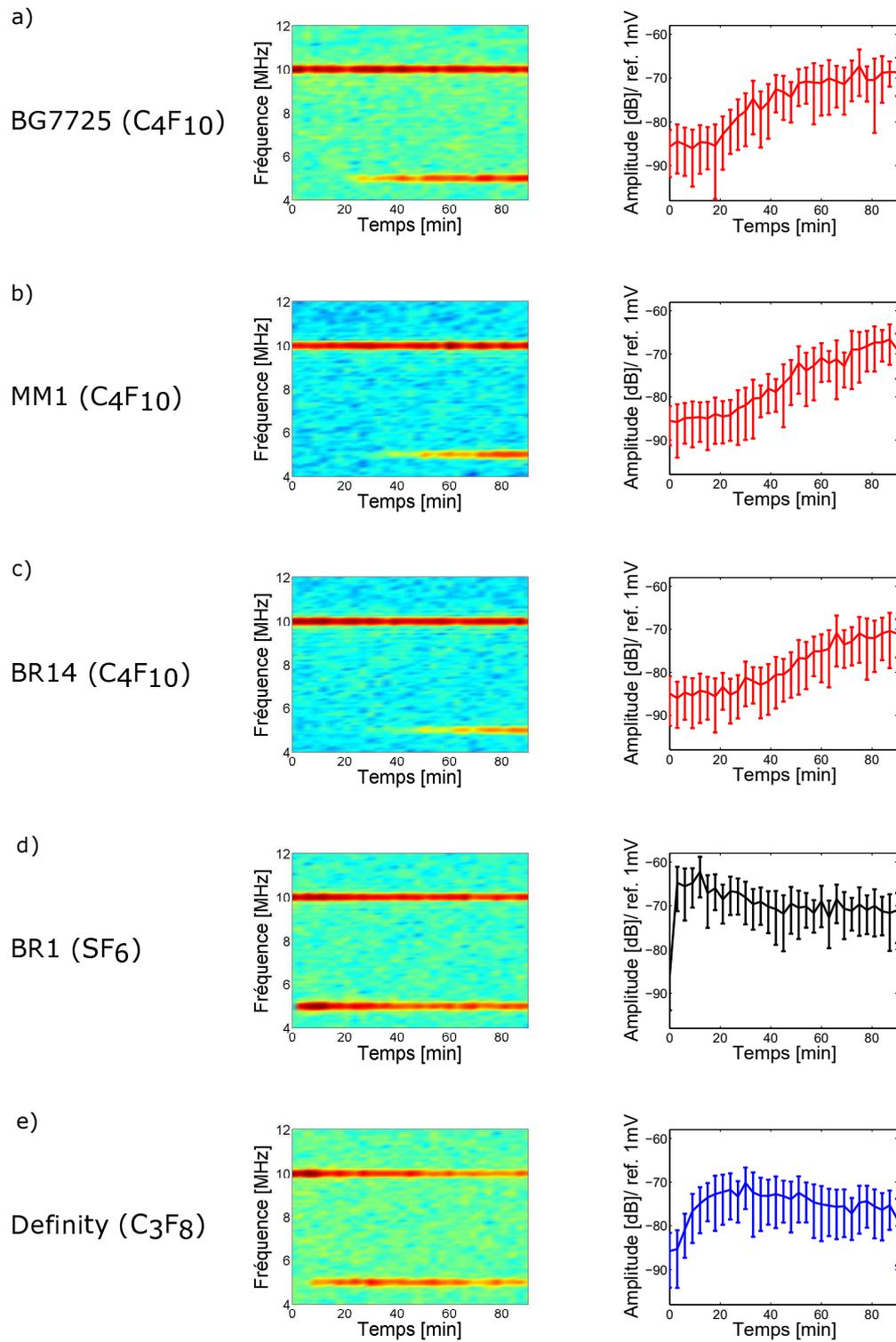


FIGURE 3.5 – Évolution de l'émission du sous-harmonique (à gauche) et représentation sonogramme de l'évolution des composantes sous-harmonique et fondamentale (à droite) à 10 MHz et 450 kPa de a) BG7725[®], b) MM1[®], c) BR14[®], d) BR1[®], et e) Definity[®].

3.3.1.1 Évolution du second harmonique

Comme nous l'avons vu précédemment, BR14[®] et MM1[®] présentent un retard d'émission du sous-harmonique très important. La question peut se poser de savoir si cette cinétique d'apparition est propre au sous-harmonique. Ainsi, nous avons caractérisé l'évolution de la réponse second harmonique des agents de contraste de BR14[®] et MM1[®]. Pour cela, les deux agents ont été caractérisés en utilisant le même dispositif expérimental présenté dans la section 3.2.2, hormis que nous avons utilisé un transducteur mono-élément centré à 15 MHz en réception. Les résultats sont présentés dans la figure 3.6 :

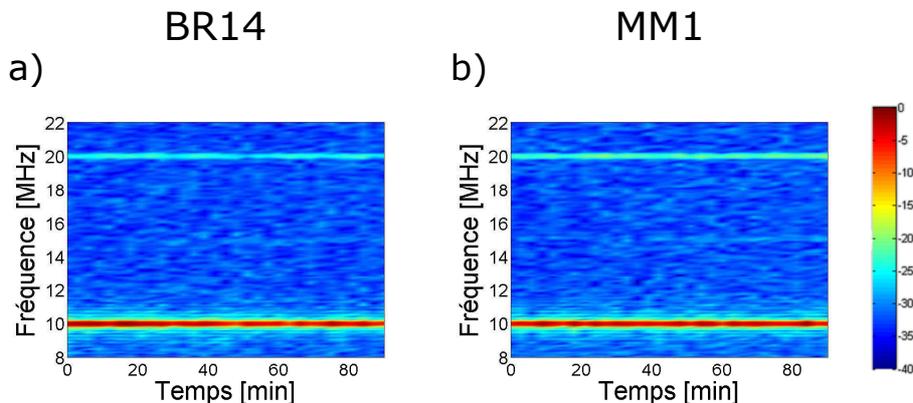


FIGURE 3.6 – Évolution de la composante fondamentale et second harmonique à 10 MHz et 450 kPa de a) BR14[®] et b) MM1[®].

La figure 3.6, montre que l'émission du second harmonique ne présente aucun retard d'émission et que celle-ci reste stable au cours du temps. Ces résultats sont en accord avec ceux de Shekhar *et al* qui avait également montré que la seconde harmonique de Targestar-*p* présentait une émission stable au cours du temps.

Dans la suite, notre étude sera axée sur la caractérisation des sous-harmoniques générées par les microbulles de BR14[®] et BG7725[®].

3.3.2 Substitution des gaz

3.3.2.1 Substitution avec de l'air

La figure 3.7 a),b) compare les spectres au temps 0 minute de la réponse fondamental et sous-harmonique de l'échantillon de microbulles de BG7725[®] et BR14[®], quand celles-ci sont constituées de C_4F_{10} (leur gaz initial) et quand le gaz de celles-ci a été substitué avec de l'air, selon la méthode décrite dans la section 3.2.4. Les spectres montrent qu'au temps 0 minute les microbulles de BG7725[®] et BR14[®], constituées de leur gaz initial C_4F_{10} , n'émettent aucune composante sous-harmonique comme nous avons déjà pu le voir dans les figures précédentes (Figure 3.4 a et Figure 3.5 c et e). Cependant, lorsque celles-ci sont reformulées à partir d'un gaz composé d'air, une composante sous-harmonique émerge immédiatement. Si on regarde l'évolution de la composante sous-harmonique des

3.3. RÉSULTATS

microbulles de BR14[®] et de BG7725[®] composées d'air, présentée dans la figure 3.7 c),d), on s'aperçoit qu'elle est présente et stable au cours du temps, contrairement au retard observé précédemment pour ces mêmes microbulles avec du C₄F₁₀.

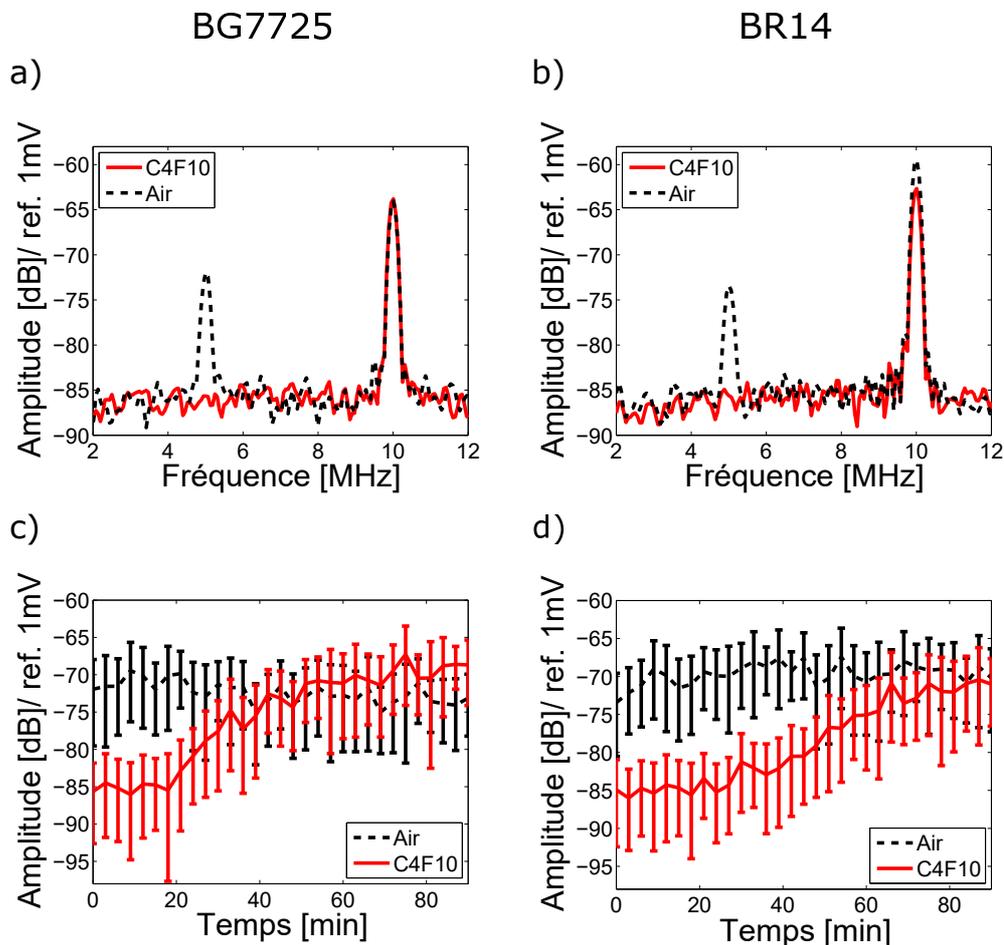


FIGURE 3.7 – Réponse spectrale au temps initial ($t = 0$ min) et évolution de la composante sous-harmonique au cours du temps à 10 MHz et 450 kPa de a-c) BG7725[®] et b-d) BR14[®] quand ils sont constitués de leur gaz initial, C₄F₁₀ (trait plein, rouge) et quand ils sont constitués d'air (trait en pointillé, noir).

Afin d'observer les effets des échanges gazeux sur les microbulles, nous avons procédé à une autre manière d'échanger le gaz initial des microbulles avec de l'air. Dans cette expérience, un échantillon d'1 mL de BG7725[®] et BR14[®] ont été extrait de leur fiole puis placés séparément dans deux eppendorfs pendant 1 heure. Après ce temps, les microbulles ont été extraites puis diluées afin de caractériser leur réponse. L'objectif de cette expérience est de montrer l'influence de l'environnement extérieur sur la réponse des microbulles. En effet, dans la fiole les microbulles se trouvent dans un environnement gazeux qui est similaire à leur composant, le C₄F₁₀, celui-ci est alors en équilibre et ne diffuse pas. Dans l'eppendorf, les microbulles se trouvent dans un environnement composé d'air, par conséquent, les molécules de C₄F₁₀ diffusent à travers la paroi des microbulles vers l'extérieur. La réponse

3.3. RÉSULTATS

sous-harmoniques des microbulles de BG7725[®] et BR14[®] après avoir passé 1 heure dans l'éppendorf est présentée dans la figure 3.8.

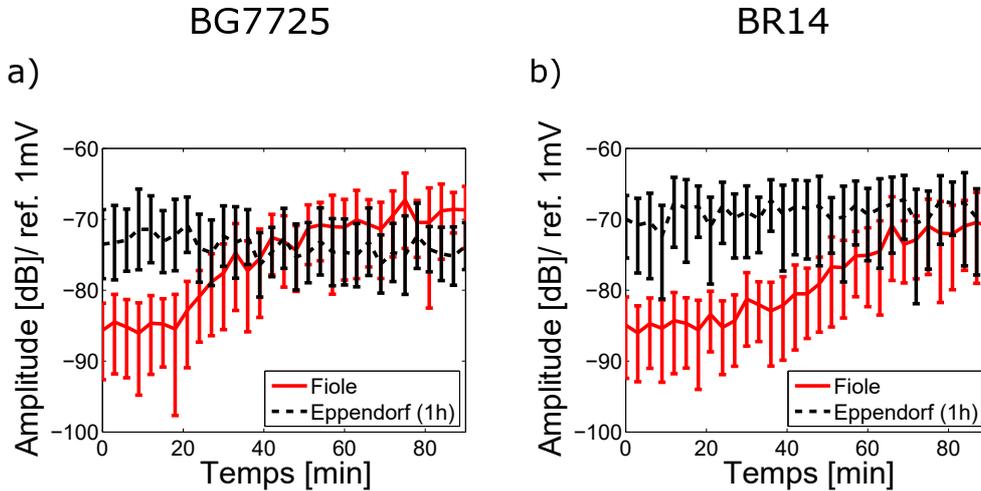


FIGURE 3.8 – Évolution de l'amplitude de la réponse sous-harmonique au cours du temps à 10 MHz et 450 kPa de deux échantillons de microbulles de a) BG7725[®] et b) BR14[®], quand l'un des échantillons a été conservé dans la fiole (trait plein, rouge) et le second a été placé dans un eppendorf pendant 1 heure (trait en pointillé, noir).

La figure 3.8 compare l'évolution de la composante sous-harmonique des deux échantillons de microbulles (BG7725[®] et BR14[®]), l'un a été conservé dans la fiole et l'autre a été placé dans un eppendorf durant 1 heure. Contrairement à l'échantillon maintenu dans la fiole, les microbulles qui ont été placées dans l'eppendorf, qu'il s'agisse du BG7725[®] ou du BR14[®], émettent une composante sous-harmonique immédiatement. De plus, si on regarde son évolution au cours des 90 minutes, celle-ci émerge au temps initial avec une amplitude maximale qui reste stable au cours du temps.

3.3.2.2 Substitution SF₆ et C₄F₁₀

L'évolution de la composante sous-harmonique entre BR1[®] et BR14[®] est très différente. Comme le montre la figure 3.5, BR14[®] émet une composante sous-harmonique avec un retard important (Figure 3.5 e), alors que la composante sous-harmonique de BR1[®] est émise avec un retard très faible, négligeable par rapport à BR14[®] (figure 3.5 a). Pourtant ces deux agents de contraste, ont une composition membranaire très similaire d'après les données du constructeur, et une distribution en taille des microbulles très proche. Néanmoins, ils diffèrent par leur composant gazeux. De fait, nous avons cherché à déterminer si la nature du gaz pouvait être responsable du comportement sous-harmonique de l'un et de l'autre. Ainsi, nous avons substitué le gaz original de BR1[®] (SF₆) avec du C₄F₁₀ et nous avons substitué le gaz original de BR14[®] (C₄F₁₀) avec du SF₆. Les réponses sous-harmoniques sont présentées dans la figure 3.9.

La figure 3.9 montre les effets de la composition en gaz des microbulles sur leur réponse sous-harmonique. On observe que la composante sous-harmonique de BR14[®] qui était

initialement caractérisée par un retard de 20 minutes, émerge dès la 3ème minute quand le gaz des microbulles est substitué avec du SF₆. Quant à BR1[®], qui était caractérisé par une émergence à la 3ème minute, la substitution du SF₆ avec du C₄F₁₀ a engendré un retard similaire à BR14[®]. Ainsi, il est intéressant de constater que l'évolution de la composante sous-harmonique de BR14[®], formé à partir du SF₆ adopte celle de BR1[®] et que celle de la composante sous-harmonique de BR1[®], formé à partir du C₄F₁₀ adopte celle de BR14[®].

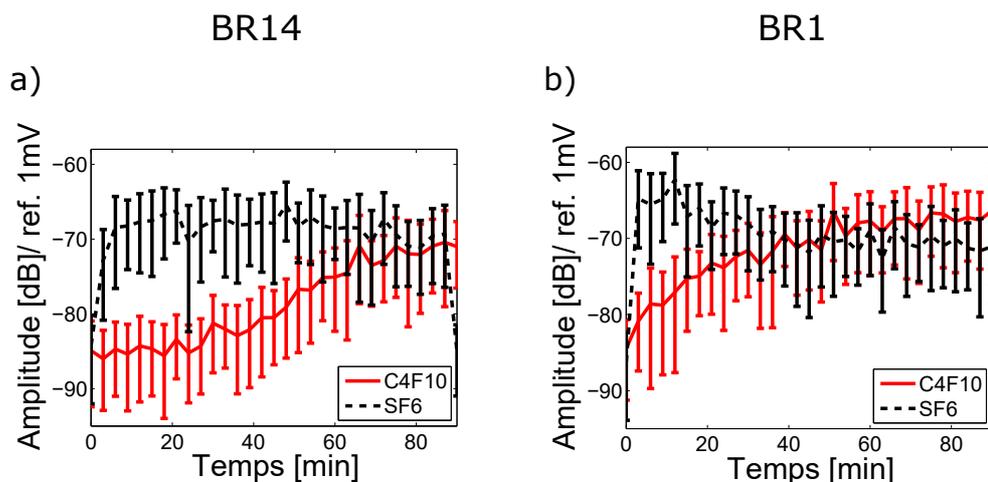


FIGURE 3.9 – Évolution de la réponse sous-harmonique des microbulles à 10 MHz et 450 kPa de a) BR14[®] quand elles sont constituées de leur gaz original, C₄F₁₀ (trait plein, rouge) et lorsque ce gaz a été substitué avec du SF₆ (trait en pointillé, noir) et b) évolution de la réponse sous-harmonique des microbulles de BR1[®] quand elles sont constituées de leur gaz original, SF₆ (trait en pointillé, noir) et lorsque ce gaz a été substitué avec du C₄F₁₀ (trait plein, rouge).

3.3.3 Distribution en taille

L'objectif de cette mesure est de déterminer si la taille et le nombre des microbulles changent au cours de l'expérimentation et si ces changements ont un impact sur le retard de la génération du sous-harmonique. Ainsi, l'évolution de la distribution en taille des microbulles de l'agent de contraste BR14[®] au cours du temps (90 minutes) a été déterminée à partir de la méthode optique *BubblesizerJ*. Cette mesure a été réalisée en plaçant les microbulles dans la cuve, dans les conditions similaires à l'expérience de caractérisation 3.2.2. La concentration et la distribution en taille des microbulles ont été mesurées en prélevant un échantillon de microbulles à six instants différents : 0, 18, 36, 54, 75 et 90 minutes. Afin d'avoir un nombre de microbulles significatif, la dilution de BR14[®] a été réduite au 1/100ème. Les figures 3.10 et 3.11 présentent l'évolution de la distribution en taille des microbulles de BR14[®] quand celles-ci sont reconstituées avec leur gaz initial C₄F₁₀, et quand celles-ci ont été reconstituées avec de l'air. La concentration initiale des microbulles de BR14[®] constituées à partir de son gaz initial est de 6.5×10^6 microbulles.mL⁻¹ tandis que la concentration initiale de BR14[®] reconstituées à partir de l'air est de 2.8×10^6

3.3. RÉSULTATS

microbulles.mL⁻¹. Ces mesures indiquent que le processus de substitution du gaz a induit une légère réduction de la concentration des microbulles.

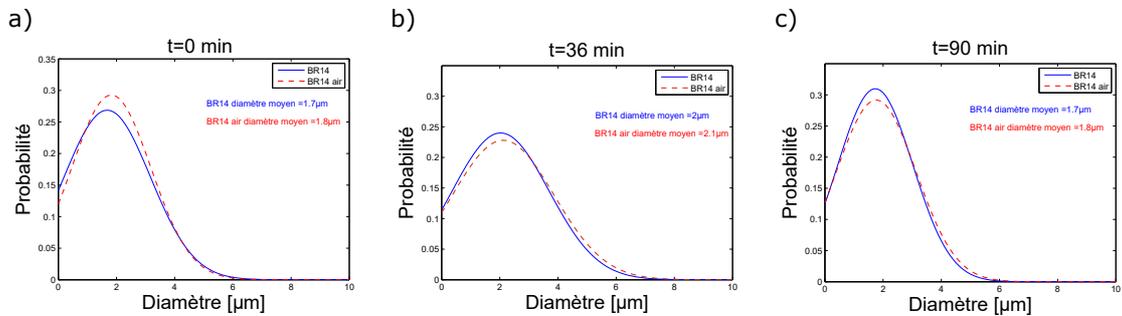


FIGURE 3.10 – Évolution de la distribution en taille des microbulles de BR14® aux temps a) 0 minute, b) 36 minute et c) 90 minute quand celles-ci sont constituées de C₄F₁₀ (trait plein, bleu) et d’air (trait en pointillé, rouge).

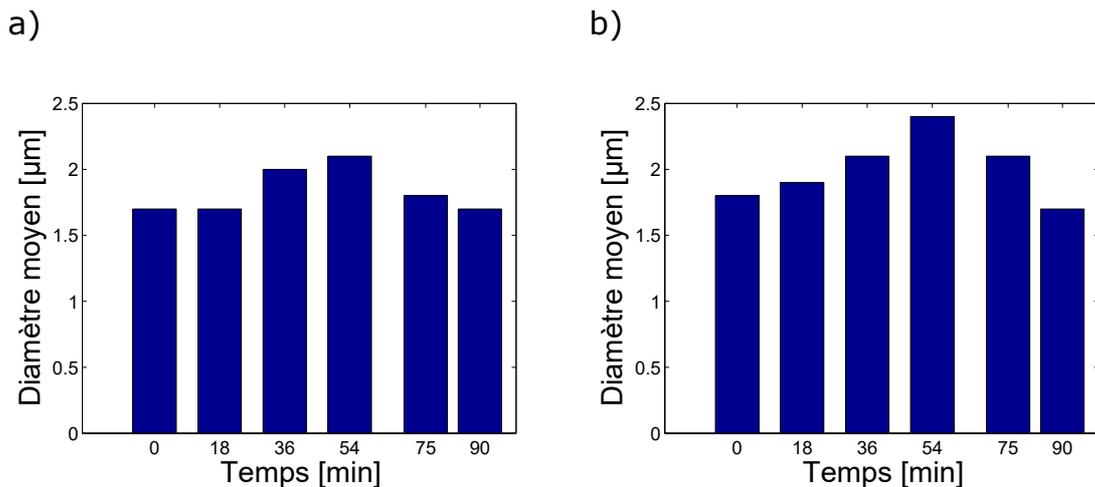


FIGURE 3.11 – Évolution du diamètre moyen des microbulles de BR14® au cours du temps quand celles-ci sont reconstituées à partir a) de leur gaz initial, C₄F₁₀ et b) d’air.

Néanmoins, au temps initial le diamètre moyen des deux populations de microbulles de BR14® ne présentent pas de différence significative. En effet, le diamètre moyen initial des microbulles de BR14® avec son gaz original est de 1.7 µm et celui de BR14®, avec l’air, est de 1.8 µm (Figure 3.11). Si on regarde l’évolution du diamètre moyen de BR14®, constitué de C₄F₁₀, celui-ci évolue de manière croissante jusqu’à obtenir un diamètre moyen de 2.1 µm 54 minutes après reconstitution. D’après la figure 3.5 c), cette période correspond au temps où le sous-harmonique émerge puis croit de manière constante. Puis, entre la 54ème et la 90ème, laquelle correspond à la phase où l’amplitude du sous-harmonique est stable, le diamètre moyen diminue jusqu’à atteindre 1.7 µm. Les résultats suggèrent donc que l’évolution de la composante sous-harmonique est indépendante de l’évolution du diamètre moyen des microbulles. De même, l’évolution du diamètre moyen de BR14® qui contient

3.3. RÉSULTATS

de l'air, a été mesurée. Similairement à BR14[®] (C_4F_{10}) celle-ci augmente au cours du temps, pour atteindre une valeur $2.4 \mu\text{m}$ à la 54^{ème} minute. Cette période correspond à celle durant laquelle le sous-harmonique est présent et stable tout au long (Figure 3.7 d). Puis, de même que pour le BR14[®] (C_4F_{10}), le diamètre moyen diminue passant de $2.4 \mu\text{m}$ à $1.8 \mu\text{m}$ alors que l'amplitude du sous-harmonique reste constante (Figure 3.7 d). Ces résultats montrent qu'en dépit de la variation de diamètre moyen de BR14[®] (air) au cours des 90 minutes, l'amplitude du sous-harmonique reste stable et ne semble donc pas être affectée par l'évolution de la distribution en taille des microbulles.

3.3.4 Imagerie

Nous présentons ici des résultats préliminaires d'imagerie réalisés *in vitro* afin de comparer l'intensité de la composante sous-harmonique de microbulles de BG7725[®] quand celles-ci sont constituées de C_4F_{10} ou d'air.

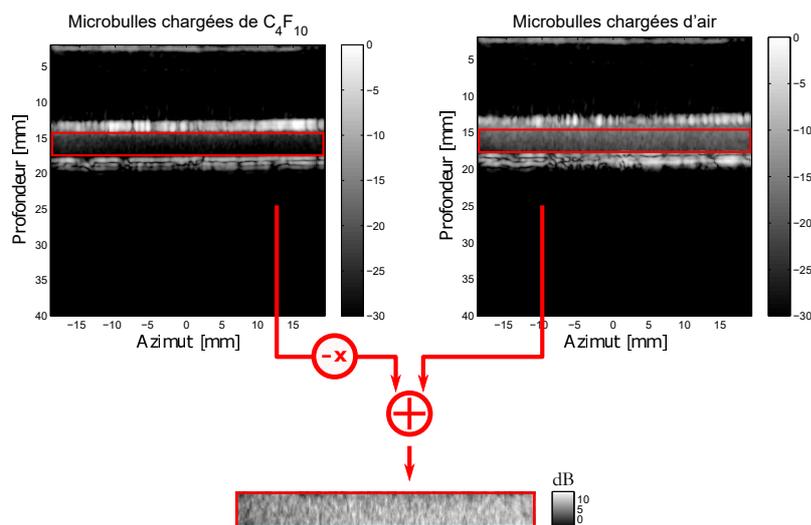


FIGURE 3.12 – Comparaison de l'amplitude du sous-harmonique dans le canal en fonction du gaz de chargement des agents de contraste.

	\bar{G}_{SH} [dB]	$\sigma^2(G_{SH})$ [dB]	échantillons
Expérience 1	7.27	8	30
Expérience 2	6.8	8.04	30

TABLE 3.3 – Tableau récapitulatif du gain en contraste entre les deux populations de microbulles, et pour chacune des deux acquisitions.

Les résultats d'imagerie sont présentés sur la Figure 3.12 avec les données issues de la première mesure. Chaque image a été générée par moyennage de pixel à pixel sur l'ensemble des 30 *frames* qui ont été enregistrées. On constate aisément à l'oeil nu une augmentation significative du contraste dans la zone de transit des agents de contraste. Ce gain peut être

3.4. DISCUSSION

facilement chiffré quantitativement par le calcul du gain en contraste noté G_{SH} et défini comme suit :

$$G_{SH} = 10 \log_{10} \left(\frac{I_{air,i,j}}{I_{C_4F_{10},i,j}} \right) \quad (3.2)$$

Avec $I_{X,i,j}$ l'intensité acoustique du signal sous-harmonique pour le gaz X au pixel ayant les coordonnées i, j . Notons que la quantification du contraste est généralement réalisée par le calcul du CTR (*Contrast to tissue ratio*), que nous avons volontairement choisi de ne pas employer ici. En effet, la notion de "signal des tissus" n'a que peu de sens dans le cas d'un fantôme présentant peu de réflecteurs diffusant, comme c'est le cas ici. Nous avons donc choisi de comparer directement l'amplitude des signaux dans les deux configurations de bulle. D'autant plus que, comme attendu, on peut constater qu'il n'y a pas de signal provenant des zones qui ne sont pas occupées par les agents de contraste. Dans le bas de la Figure 3.12, on peut facilement constater par l'observation de la dynamique d'affichage un gain moyen sur toute la zone compris en 0 et 12 dB environ.

Une meilleure appréciation du gain en contraste est présentée dans le Tableau 3.3. Pour chacune des deux mesures réalisées, la distribution de gain pour chacun des pixels de la zone d'intérêt et pour l'ensemble des 30 *frames* d'acquisition a été reportée sous forme d'une valeur moyenne et d'un écart-type. On peut tout d'abord constater la bonne reproductibilité des résultats entre les deux mesures. En moyenne, on constate un gain de contraste moyen de 7.27 dB et 6.8 dB pour la première et seconde mesure respectivement. Les bulles chargées en air présentent une composante sous-harmonique plus forte que celles chargées en perfluorobutane dans les premières minutes après injection dans le fantôme. Notons également, par l'intermédiaire de l'écart-type, un fort étalement de la distribution. Ceci est parfaitement normal si l'on considère que durant l'étude, la dispersion des agents de contraste est variable au cours du temps de par le flux imposé par la pompe.

3.4 Discussion

Conformément à la discussion abordée dans le chapitre 1.4, l'exploitation de la composante sous-harmonique des microbulles permet d'améliorer les performances de l'imagerie de contraste. Néanmoins, une modalité d'imagerie basée sur l'extraction de la composante sous-harmonique des microbulles n'est pas encore envisageable en clinique. En effet, la génération du sous-harmonique est plus occasionnelle et requière quelques conditions (fréquence de résonance, pression seuil, tension de surface...), contrairement à la seconde harmonique laquelle est d'avantage observée car générée par un plus grand nombre de microbulles, à différentes fréquences et à partir de pressions plus basses.

Récemment, il a été démontré que la composante sous-harmonique pouvait être caractérisée par un retard d'émission, qui rend celle-ci instable au cours du temps. Afin de mieux comprendre les causes à l'origine de ce retard, nous nous sommes intéressés au rôle du composant gazeux des microbulles. Pour cela, l'émission du sous-harmonique de cinq agents de contraste phospholipidiques a été caractérisée. Tous ces agents, sont composés de gaz possédant des coefficients de diffusion différents (Tableau 3.4).

Du point de vue qualitatif, les cinq agents de contraste présentent un retard d'émission

3.4. DISCUSSION

du sous-harmonique (Figure 3.5). Néanmoins, la durée du retard varie selon les agents de contraste, donc du gaz à l'intérieur. Suite à ces observations, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle ce retard serait lié aux coefficients de diffusion du gaz des microbulles. En effet, le retard le plus faible est observé pour BR1[®] (< 3 minutes), qui est composé du gaz SF₆ lequel est caractérisé par un coefficient de diffusion égal à $1.2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ (3.5 d). S'en suit, le retard observé pour Definity[®] (environ 10 minutes), composé du gaz C₃F₈ et dont le coefficient de diffusion est égal à $7.45 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (3.5 e). Enfin, le retard le plus important est observé pour les microbulles de BG7725[®], BR14[®] et MM1[®], lesquels sont constitués de C₄F₁₀ dont le coefficient est égale à $6.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (3.5 a, b, c).

Aucun retard n'a été observé en ce qui concerne la composante fondamentale et ce, pour tous les agents de contraste qui ont été étudiés. Celle-ci émerge dès le début de l'excitation ultrasonore et atteint une amplitude maximale immédiatement. Au contraire, l'amplitude du sous-harmonique évolue progressivement au cours du temps et atteint sa valeur maximale des dizaines de minutes après le début de l'excitation ultrasonore. Dans le cas de la composante fondamentale, seule une décroissance de 2 à 3 dB est observée après 90 minutes. Nous supposons que, en raison des perturbations acoustiques générées par les ultrasons, cette décroissance soit due à une diminution de la concentration des microbulles au cours du temps.

Gaz	Coefficient de diffusion dans l'eau (m^2/s)
Air	2.05×10^{-9}
SF ₆	1.2×10^{-9}
C ₃ F ₈	7.45×10^{-10}
C ₄ F ₁₀	6.9×10^{-10}

TABLE 3.4 – Coefficient de diffusion des gaz, les données proviennent de la publication de Sarkar *et al* [1].

La figure 3.5 montre que la réponse sous-harmonique des microbulles de l'agent de contraste BR1[®] atteint son amplitude maximale dès son émergence et reste stable au cours du temps. Tandis que, la composante sous-harmonique des microbulles constituées de gaz à faible diffusivité tel que C₄F₁₀, comportent trois phases d'évolution : (1) absence d'émission d'une composante sous-harmonique ; (2) émission d'une composante sous-harmonique et évolution progressive de son amplitude ; (3) phase de saturation qui intervient après que l'amplitude maximale ait été atteint.

Le retard le plus important est observé pour les microbulles de C₄F₁₀, lequel est un gaz qui diffuse plus lentement que le SF₆ et le C₃F₈ (Tableau 3.4). Dès lors, et afin de corroborer notre hypothèse, selon laquelle la diffusivité du gaz influence le temps de retard des microbulles, le gaz C₄F₁₀ contenu dans les fioles de BG7725[®] et de BR14[®] a été remplacé par un gaz qui diffuse plus rapidement, l'air. Les deux agents de contraste ont ensuite été activés et les microbulles nouvellement formées d'air ont été recharacterisées. Les résultats de cette expérience présentés dans la figure 3.7 révèlent que la réponse sous-harmonique des microbulles de BR14[®] et BG7725[®] ne présentent plus aucun retard d'émission, lorsque celles-ci sont constituées d'air. En effet, la composante sous-harmonique émerge dès le début de l'excitation ultrasonore avec une amplitude maximale, laquelle reste stable au cours

3.4. DISCUSSION

du temps comme pour la composante fondamentale. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'impact du milieu environnant sur la réponse sous-harmonique des microbulles. En effet, lorsque les microbulles sont au contact de l'air ambiant, des échanges gazeux se produisent via un processus de diffusion. Dans ces conditions, l'air peut alors se substituer au C_4F_{10} . Pour ce faire, un échantillon de microbulles de BG7725[®] et BR14[®] activé a été extrait de la fiole puis placé pendant une heure dans un eppendorf. Après ce temps, la réponse sous-harmonique des microbulles a été caractérisée. Les résultats présentés dans la figure 3.8 montrent que l'émission du sous-harmonique ne présente aucun retard. Il est intéressant de constater que la composante sous-harmonique présente un comportement similaire avec les résultats obtenus lors de l'expérience précédente (Figure 3.7). Cette expérience met en exergue l'impact de la diffusion et des échanges gazeux sur la réponse sous-harmonique des microbulles et confirme le rôle de la composition gazeuse des microbulles.

Après avoir observé les effets de l'air sur la réponse sous-harmonique des microbulles, les effets du SF_6 et du C_4F_{10} ont été comparés. Ces deux gaz sont pourvus de coefficients de diffusion différents, tel que $C_4F_{10} < SF_6$ (Tableau 3.4). Pour réaliser cette expérience, le SF_6 de BR1[®] a été remplacé par du C_4F_{10} et le C_4F_{10} de BR14[®] a été remplacé par du SF_6 . Ainsi, les microbulles de BR1[®] ont été reconstituées à partir du C_4F_{10} et les microbulles de BR14[®] à partir du SF_6 . Le choix s'est porté sur l'étude de BR1[®] et de BR14[®] car la composition membranaire de ces deux agents de contraste est identique. Ainsi, les effets inhérents, à la composition gazeuse des microbulles peuvent être plus facilement isolés. Les résultats de la caractérisation sont présentés dans la figure 3.9. Ils montrent que la réponse sous-harmonique du BR14[®] modifié (BR14[®]- SF_6) présente une évolution très différente par rapport au BR14[®]. En effet, le sous-harmonique des microbulles de BR14[®] modifié présente un retard inférieur à 3 minutes et une évolution (Figure 3.9 a), qui est très similaire à BR1[®] (Figure 3.5 d). Quant à la composante sous-harmonique de BR1[®] modifié (BR1[®]- C_4F_{10}), celle-ci présente un retard d'environ 30 minutes et un accroissement de 12 dB au cours du temps. Il est intéressant de voir que l'évolution de cette courbe suit une tendance très similaire à BR14[®] (Figure 3.5 c). Par conséquent, en substituant les gaz respectifs de BR1[®] et BR14[®], il a été possible de "transformer" BR1[®] en BR14[®] et inversement. Ces résultats montrent clairement l'influence du composant gazeux des microbulles sur la génération du sous-harmonique et étayent un peu plus l'hypothèse de base.

Les résultats obtenus lors de l'étude d'imagerie ont permis de confirmer un impact du composant gazeux sur la réponse sous harmonique, des agents de contraste ultrasonore. Ces observations sont très encourageantes, mais il serait nécessaire de reproduire l'expérience. De plus, un suivi au cours du temps de la réponse du sous-harmonique permettrait de cerner plus clairement les conséquences pour l'imagerie sous-harmonique.

Afin d'évaluer de manière plus approfondie l'influence du gaz, la réponse sous-harmonique d'une microbulle en fonction du composant gazeux a été simulée à partir du modèle de Marmottant [61]. La mesure de simulation concerne une microbulle de SonoVue de rayon $1.5 \mu m$, excitée à 10 MHz et 100 kPa. L'exposant polytropic a été modifié, en considérant le cas où la microbulle est composée d'air ($\gamma = 1.4$) et le cas où celle-ci est composée de C_4F_{10} ($\gamma = 1.07$). Les résultats présentés dans la figure 3.13 montrent que dans les

3.5. CONCLUSION

deux cas, les microbulles émettent une composante fondamentale avec la même amplitude. Cependant, la réponse sous-harmonique de la microbulle composée de C_4F_{10} présente une plus faible amplitude. Ces résultats permettent de confirmer que le composant gazeux est un paramètre qui influe sur la réponse sous-harmonique des microbulles.

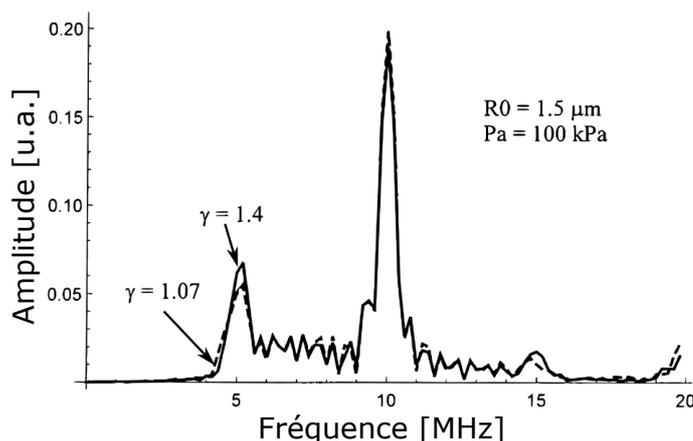


FIGURE 3.13 – Simulation de la réponse sous-harmonique et fondamentale d’une microbulle ayant un rayon de $1.5 \mu\text{m}$, excitée à 10 MHz et une pression négative de 100 kPa. Dans un cas, la microbulle est composée d’un gaz de coefficient polytropique égal à 1.4 (trait plein) et dans l’autre un coefficient polytropique de 1.04 (trait pointillé).

Les résultats présentés dans ce chapitre concordent avec ceux de Shekhar et *al*, qui avaient caractérisé le retard de la composante sous-harmonique des microbulles de Targestar-*p*, celles-ci étant constituées d’un gaz de C_4F_{10} . D’après cette même étude, ils ont aussi mis en évidence un retard de la composante ultra-harmonique. Ils ont montré que celle-ci, similairement au sous-harmonique, est absente au début de l’excitation ultrasonore puis émerge au cours du temps. La composante ultra-harmonique n’a pas fait l’objet de notre étude, mais les résultats de Shekhar et *al* suggèrent que des modifications du signal au cours du temps affecte d’autres composantes non-linéaires.

À ce jour, les conclusions de cette étude permettent d’affirmer que le gaz joue un rôle dans la réponse acoustique des microbulles. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées sur l’impact de celui-ci. L’une d’elle concerne les propriétés compressibles du gaz qui peuvent induire une modification du comportement vibratoire des microbulles. Ou encore, le processus de diffusion qui peut altérer les propriétés de la membrane (flambage, perte des phospholipides), modifiant ainsi la tension de surface.

3.5 Conclusion

Durant cette étude, les différentes expériences menées ont toutes permis de mettre en évidence l’influence du composant gazeux des microbulles sur l’émission sous-harmonique de celles-ci. Il a été démontré que le changement du composant gazeux des microbulles

3.5. CONCLUSION

entraînait une modification de leur comportement sous-harmonique. Ce dernier est notamment caractérisé par un retard qui survient lorsque les microbulles sont composées d'un gaz à faible coefficient de diffusion, tel que le C_3F_8 et le C_4F_{10} . De fait, la diffusion se révèle être le mécanisme principal qui affecte le retard d'émergence et l'amplitude du sous-harmonique. En effet, le retard est considérablement réduit lorsque les microbulles sont reconstituées à partir d'un gaz qui diffuse rapidement tel que le SF_6 et il est complètement supprimé lorsque les microbulles sont reconstituées avec de l'air. Dans ce dernier cas, la composante sous-harmonique émerge avec une amplitude maximale dès le début de l'excitation ultrasonore.

Au cours de ces expériences, nous avons montré qu'il était possible de stabiliser l'amplitude du sous-harmonique et de supprimer son retard d'émission. Ces résultats suggèrent la possibilité d'optimiser et d'assurer la reproductibilité de la composante sous-harmonique par les microbulles par une sélection précise du composant gazeux de celles-ci pour l'imagerie sous-harmonique de contraste.

3.5. CONCLUSION

Chapitre 4

Effets de la déflation sur la réponse sous-harmonique des agents de contraste ultrasonore

L'interaction entre la microbulle et les ultrasons peut engendrer la déflation de celle-ci. Ce phénomène s'accompagne de la diffusion du constituant gazeux et, d'après la littérature, de changements structurelles de la paroi phospholipidique. Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que la composition gazeuse des microbulles affectait sa réponse sous-harmonique. Par conséquent, la déflation pouvant impliquer des échanges gazeux, nous présentons dans ce chapitre une analyse expérimentale de ses effets sur la réponse sous-harmonique des microbulles.

La présente étude a été effectuée dans le cadre d'un séjour de recherche au sein du laboratoire Erasmus MC de Rotterdam aux Pays-Bas (financement de l'école doctorale et du BQI Inserm U930). Au cours de ce projet, la caméra ultra-rapide Brandaris 128 couplée à un dispositif d'excitation acoustique, ont été utilisés afin de procéder à la déflation et à la caractérisation d'un lot de microbulles de BR14[®], isolées individuellement.

La première partie de ce chapitre, fait office d'introduction au mécanisme de déflation, avec les dernières avancées de l'état de l'art. Ensuite, nous décrirons et présenterons, de manière succincte la caméra ultra rapide Brandaris. Dans la seconde partie, nous présenterons notre démarche expérimentale et les paramètres ultrasonores, lesquels ont été nécessaires pour induire la déflation des microbulles. Enfin, nous exposerons les résultats de la déflation et ses effets sur la génération et l'amplitude de la composante sous-harmonique.

4.1 Contexte et objectifs

4.1.1 Déflation des microbulles

Selon les fréquences et les pressions ultrasonores appliquées, les microbulles peuvent, par exemple, se fragmenter [141], induire une cavitation inertielle [142] ou encore subir un processus de déflation. Au cours du temps, ces perturbations peuvent modifier la réponse acoustique des microbulles. C'est pourquoi, l'analyse de leur impact sur le signal est essentielle.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes tout particulièrement intéressés au processus de déflation et à ses effets sur la réponse sous-harmonique.

La déflation ou "dégonflement" est la réduction du diamètre, surface ou volume de la microbulle provoquée par la diffusion du gaz de la microbulle vers le milieu environnant [143]. La déflation peut être passive, ou active si elle est induite par une excitation ultrasonore [144]. Dans la suite de l'étude, nous ne considérerons que la déflation active ou acoustique.

À l'évidence, la déflation acoustique d'une microbulle est inhérente aux paramètres d'excitation ultrasonores classiques, tels que la fréquence et la pression. Des études ont montré que la déflation des microbulles était plus importante à des fréquences autour de leur résonance [145]. Cependant, Les conditions d'excitation ultrasonores ne sont pas les seuls paramètres mis en jeu [146]. En effet, la nature du composant gazeux des microbulles joue également un rôle majeur. Klibanov *et al.* ont démontré que la vitesse de diffusion du gaz influait sur la cinétique de déflation [147]. Lors de cette étude, ils ont comparé la déflation acoustique des microbulles d'Albunex[®] et d'Optison[®], lesquelles présentent une composition membranaire similaire (Sérum albumine humaine) mais un composant gazeux différents (air et C₃F₈ respectivement). Ils ont observé que les vitesses de déflation des microbulles d'Albunex[®] étaient beaucoup plus importantes. Plus tard, Borden *et al.* ont mis en évidence le rôle de la composition des parois. Pour cela, ils ont caractérisé la déflation de microbulles composées de différentes parois lipidiques. Ils ont montré que la longueur des chaînes de phospholipides renforçait la cohésion de la paroi et ralentissait le processus de déflation [148].

De nombreuses études ont montré que le processus de déflation pouvait induire des modifications structurelles de la paroi phospholipidique des microbulles [149]. Pu *et al.* et Borden *et al.* ont observé la formation de plis ou bourgeonnements (*buckles*) à la surface de la paroi [150] [148]. Ces observations ont été confirmées récemment par l'étude de Kooiman *et al.* qui ont analysé, à l'aide d'un système de caméra ultra-rapide couplé à une imagerie de fluorescence, l'évolution structurelle de la paroi d'une microbulle phospholipidique, dans un champ ultrasonore [4]. Leurs observations ont montré qu'après déflation, plusieurs régions intensément fluorescentes, lesquelles correspondent à des zones de forte concentration de phospholipides, se forment de manière irréversible sur la paroi des microbulles (Figure 4.1 B). Cette étude ne confirme pas s'il s'agit de flambage, mais témoigne d'une modification de la densité de la fluorescence et de la structure de la paroi durant le processus de déflation.

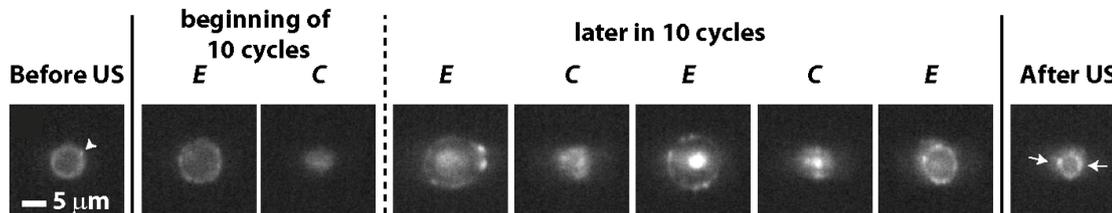


FIGURE 4.1 – Observation de la paroi d’une microbulle durant un processus de déflation, excitée à 1 MHz et 150 kPa et identification de points à fortes concentration de phospholipides avant, pendant et après insonification (Figure rapportée dans la littérature par Kooiman *et al.* [4]).

Comme nous l’avons évoqué dans le paragraphe 1.2.3, la densité et la concentration des phospholipides influencent la réponse sous-harmonique des microbulles. Ainsi, au regard des effets de la déflation sur la paroi, nous nous sommes intéressés à son impact sur la réponse sous-harmonique.

Les conséquences de la déflation sur la réponse acoustique des microbulles ont déjà fait l’objet d’études préalables. En premier lieu, Guidi *et al.* ont comparé les signaux rétrodiffusés de microbulles Definity[®] avant et après déflation, et ont mis en évidence une baisse d’amplitude significative [143]. Plus tard, Lindsey *et al.* ont élargi l’analyse aux composantes super-harmoniques [151]. Pour compléter ces travaux, nous allons nous intéresser à l’impact de la déflation sur la réponse sous-harmonique.

4.1.2 Caractérisation optique des microbulles

4.1.2.1 Caractérisation d’une microbulle individuelle

Il existe différentes stratégies pour caractériser les agents de contraste ultrasonore. Les plus utilisées reposent sur des caractérisations acoustiques des microbulles, telles que des mesures de diffusion ou d’atténuation, lesquelles ont été présentées dans la partie 1.2. Toutefois, ces méthodes ne permettent pas d’observer directement le comportement oscillatoire d’une microbulle. Les oscillations sont pourtant à l’origine du signal rétrodiffusé par les microbulles et sont capables de perméabiliser des membranes biologiques (Partie 1.1.2). Par conséquent, au cours de ces deux dernières décennies, des systèmes de caractérisation optique ont été développés par différents groupes de recherches [152, 153, 154].

La caractérisation optique offre de nombreux avantages. Tout d’abord, elle permet d’isoler et d’observer directement la dynamique d’une microbulle lorsque celle-ci est soumise à un champ ultrasonore. Cette individualisation, va permettre d’identifier la signature acoustique des différentes microbulles en fonction de leur taille. En termes d’analyse, la longueur d’onde de la lumière visible (0.4-0.7 μm) étant plus petite que les longueurs d’ondes ultrasonores utilisées, la mesure optique présente une résolution bien meilleure comparée à l’acoustique.

4.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les microbulles vibrent à des fréquences de l'ordre de la dizaine de mégahertz. Par conséquent, la mise en place d'une approche optique nécessite l'utilisation d'une caméra capable d'enregistrer des millions d'images par seconde. L'équipe du laboratoire Erasmus de Rotterdam aux Pays-Bas, a développé un système optique dédié à la caractérisation des microbulles, appelé Brandaris 128. Ce système est composé d'une caméra ultra-rapide qui intègre un ensemble de dispositifs optiques qui lui permettent d'opérer jusqu'à 25 millions d'images par seconde [5].

4.1.2.2 La caméra Brandaris 128

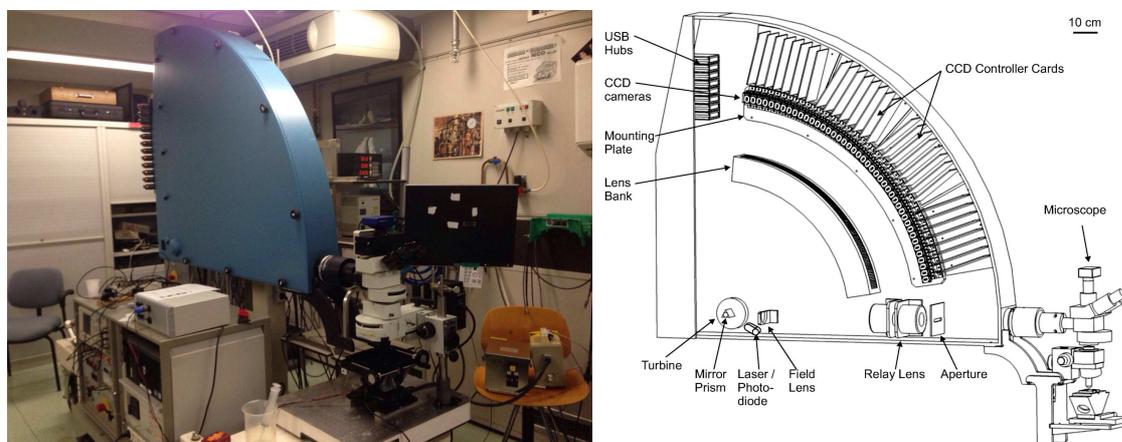


FIGURE 4.2 – Photo du système optique constitué de la caméra Brandaris (bleu) et d'un microscope (à gauche). Schéma de le Brandaris tiré de la publication de Chin *et al.* [5] (à droite).

La Brandaris 128 est un système optique composé d'un microscope connecté à une caméra ultra-rapide, comme le montre la photographie présentée dans la figure 4.2.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la caméra Brandaris opère jusqu'à 25 millions d'images par seconde. À titre de comparaison, une caméra grand public moderne peut générer jusqu'à 60 images par seconde. Chin *et al.* ont décrit de manière très précise le fonctionnement de la Brandaris. Un croquis tiré de leur publication est présenté dans la figure 4.2. Le principe de la brandaris est basé sur un dispositif de miroir rotatif et couplé à 128 capteurs d'images CCD (*Charge coupled device*). Dans un premier temps, une image est prise au microscope, puis relayée via un système de lentilles placées après le microscope, vers le miroir. Celui-ci est monté sur une turbine qui est alors actionnée par un flux d'hélium, induisant ainsi la rotation du miroir. En tournant, les faces du miroir balayent l'ensemble des faisceaux lumineux, qui sont acheminés via des lentilles vers les 128 capteurs CCD, lesquels sont disposés en arc de cercle. Les images sont enregistrées sur les CCD puis transférées vers un ordinateur, via des câbles USB, pour être visualisées et analysées. C'est la vitesse de rotation de la turbine qui détermine la cadence d'acquisitions des images de la caméra. Ainsi, pour atteindre une fréquence de 25 millions d'images par seconde, la

turbine de la Brandaris opère environ 20 000 tours par secondes.

4.1.3 Objectifs de l'étude

Grâce à un système optique de caméra ultra rapide combiné à une installation acoustique, nous avons induit la déflation de microbulles de BR14[®] isolées individuellement. Puis, nous avons caractérisé leurs réponse sous-harmonique, lesquelles ont ensuite été comparées à la réponse d'autres microbulles de BR14[®] de taille similaires mais n'ayant pas subi de déflation.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Les microbulles

La réponse sous-harmonique des microbulles de BR14[®] a été caractérisée en utilisant la caméra ultrarapide Brandaris 128. Les microbulles ont été activées, selon les recommandations du fabricant et analysées le jour même des mesures. Comme décrit précédemment (tableau 1.1), BR14[®] contient des microbulles à paroi phospholipidique et composées d'une combinaison de gaz de C₄F₁₀/N₂.

Les microbulles ont été placées et caractérisées à l'intérieur d'une chambre d'OptiCell[®] (BioCrystal, Westerville, États-Unis) qui est une plaque de culture constituée de deux membranes en polystyrène, lesquelles sont transparentes aux ultrasons. Pour les besoins de l'expérience, la plaque d'OptiCell[®] a été préalablement incubée avec une solution d'albumine de sérum bovin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis) de manière à prévenir la formation de liaisons non-spécifiques. Après une heure d'incubation et trois rinçages au PBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis), une suspension composée de 3 µL de microbulles et 10 mL de DPBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis) est introduite dans l'OptiCell[®], permettant d'obtenir une concentration de 1.3×10^5 microbulles mL⁻¹. Cette concentration, permet aux microbulles d'être espacées d'une distance telle qu'il est possible d'en observer une seule à chaque image.

4.2.2 Installation expérimentale

Un schéma du montage expérimental est représenté dans la figure 4.3. La plaque d'OptiCell[®] est immergée à la surface d'une cuve d'eau placée sous un microscope (BX-FM, Olympus, Tokyo, Japon) avec un objectif à immersion $\times 60$ (Olympus, Tokyo, Japon). La cuve intègre, par en dessous, une fibre optique pour éclairer la plaque d'OptiCell[®] et sur le côté, un transducteur mono-élément centré à 5 MHz, placé à 3 cm de l'échantillon (V309, Olympus Panametrics, Waltham, États-Unis).

Afin d'observer les oscillations d'une microbulle soumise à une pression ultrasonore, il

est nécessaire de superposer la focale du microscope avec celle du transducteur. D'après la configuration de la Brandaris, ce réglage se fait sur trois axes. Dans un premier temps, une plaque d'OptiCell[®], sur laquelle est dessiné un motif est placée à la surface de la cuve. La mise au point du microscope sur le dessin permet de régler un premier axe. Les deux autres axes sont réglés acoustiquement via un système de vis micrométriques, placé sous le plateau qui maintient la cuve. Pour cela, l'objectif du microscope est remplacé par une cible (réflecteur) de même dimension, la focale est alors déterminée par mesure de pulse-écho.

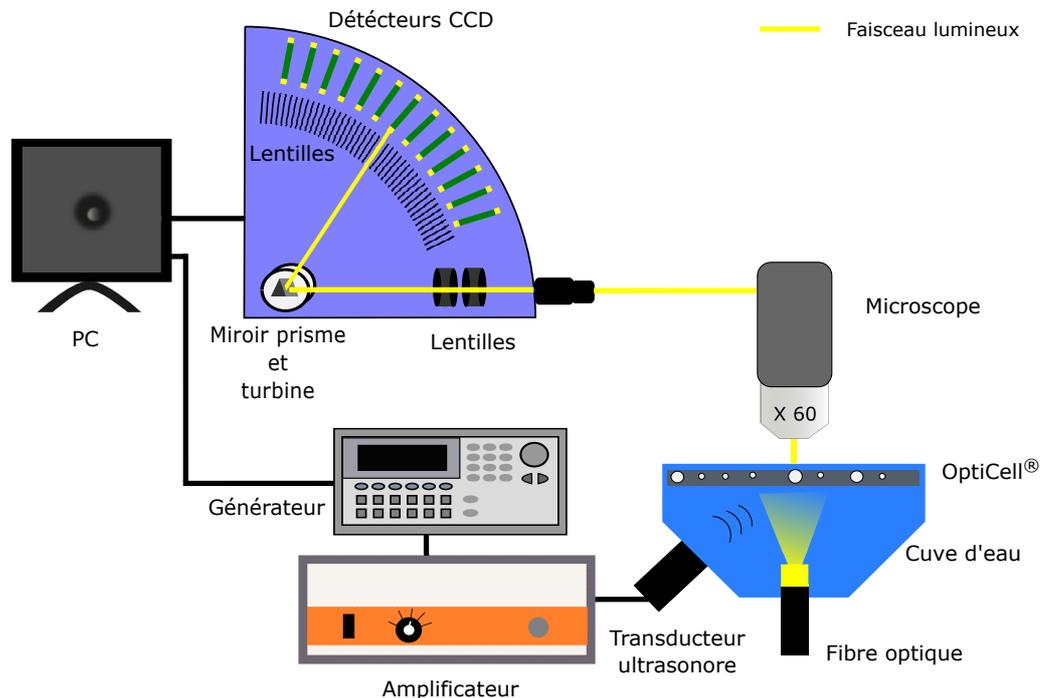


FIGURE 4.3 – Schéma du système de la caméra Brandaris 128.

Au total, 43 microbulles de BR14[®] de diamètre compris entre $2.8\ \mu\text{m}$ et $5.5\ \mu\text{m}$ ont été étudiées. Les microbulles ont été séparées en deux populations. La première population dite conventionnelle correspond aux microbulles qui n'ont pas subi de processus de déflation (M_{ND}) et la seconde correspond aux microbulles déflatées (M_D). Les caractéristiques des deux populations sont présentées dans le tableau 4.1.

La déflation des microbulles a été effectuée à 5 MHz, avec une pression négative de 350 ou 450 kPa et des trains d'ondes de 10 cycles. La réponse sous-harmonique a été caractérisée à 5 MHz, avec une pression négative de 100 kPa et 10 cycles. Le signal ultrasonore est produit par un générateur (Agilent Technologies, Santa-Clara, États-Unis) et amplifié par un amplificateur (Amplifier Research, Souderton, États-Unis). La focale du transducteur ainsi que les pressions en ce point ont été préalablement caractérisées avec un hydrophone (0.2 mm, Precision Acoustics, Dorchester, Grande-Bretagne). Toutes les mesures ont été effectuées à température ambiante.

4.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Microbulles	Nombre	Diamètre (μm)	P	
			Sous-harmonique	ression (kPa)
M_{ND}	26	2.7-6.1	100	Déflation /
M_D	17	2.8-5.3*	100	350-450

M_{ND} : Microbulles conventionnelles ou non déflatées

M_D : Microbulles déflatées

* Diamètres des microbulles après déflation

TABLE 4.1 – Populations de microbulles étudiées, nombre d'échantillons, diamètres et pressions employées pour caractériser le sous-harmonique et réaliser la déflation.

4.2.3 Analyse optique

Lors de cette étude, la caméra Brandaris a opéré à une cadence de 17 millions d'images par seconde (17 MHz). La réponse du sous-harmonique a été analysée à partir de quatre enregistrements vidéo, séparés d'un intervalle de 80 ms. Chaque vidéo contient 128 images. La première vidéo est enregistrée sans ultrasons et va permettre d'estimer le bruit. Les trois autres vidéos sont enregistrées avec la transmission ultrasonore. Ces derniers vont permettre d'obtenir une séquence de 128 images, à partir desquels une courbe représentant la variation du diamètre de la microbulle en fonction du temps sera tracée. La figure 4.4 présente un exemple de courbe, obtenue à partir d'un enregistrement vidéo (Figure 4.4 A), d'une microbulle de BR14[®] insonifiée à 5 MHz et 100 kPa .

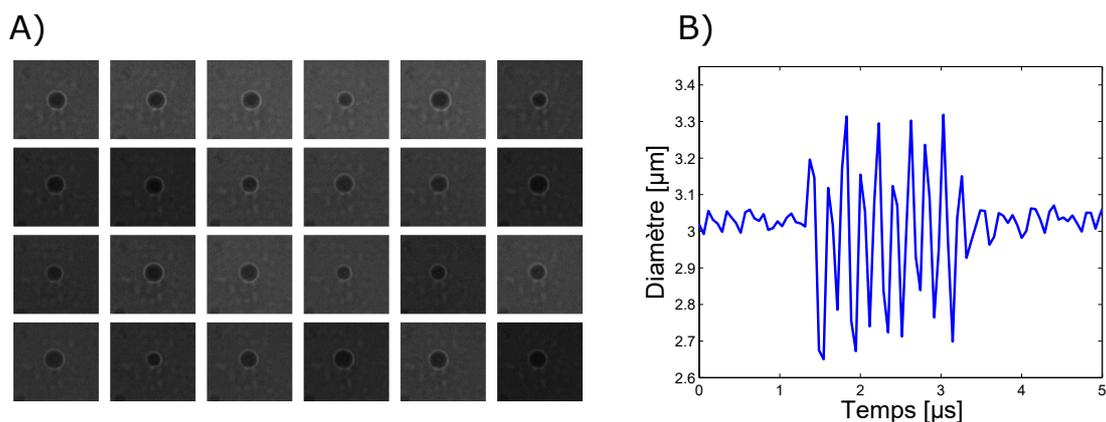


FIGURE 4.4 – A) Échantillon d'images obtenu avec la brandaris 128 et à partir d'une séquence présentant les oscillations d'une microbulle de BR14[®] de 3 μm de diamètre, excitée à 5 MHz, 100 kPa et B) variation du diamètre en fonction du temps correspondant.

Le signal ultrasonore consiste en un train d'onde de 10 cycles à 5 MHz, lequel corres-

pond à un temps d'insonification de $2\ \mu\text{s}$. L'excitation ultrasonore est déclenchée quelques microsecondes après le début de l'enregistrement vidéo, soit entre 15 et 18 images après. Ainsi, ces premières images vont permettre d'estimer le diamètre de la microbulle au repos. Durant l'excitation ultrasonore, la variation du diamètre de la microbulle, est mesurée à l'aide d'un programme de détection des contours, développé par l'équipe du laboratoire Erasmus de Rotterdam [63].

En ce qui concerne la séquence de déflation, celle-ci a été réalisée à partir d'un train d'onde transmis une seule fois, ce qui correspond à l'enregistrement de deux vidéos. Comme dans le cas précédent, la première vidéo est sans ultrasons et la seconde vidéo est réalisée avec la transmission ultrasonore.

4.2.4 Séquence de déflation acoustique

La figure 4.5 présente, dans l'ordre, les différentes étapes de déflation et de caractérisation du sous-harmonique appliquées à la population M_D . Comme le montre le schéma, la microbulle est préalablement excitée à 100 kPa avant de subir une déflation. Cette première étape permet d'analyser la composante sous-harmonique, mais également de mesurer le diamètre initial de la microbulle. Ensuite, une séquence de déflation est appliquée à la microbulle. Celle-ci consiste en un train d'onde à 5 MHz et une pression de 350 kPa ou 450 kPa, en fonction de la taille de la microbulle. Après déflation, le diamètre final et la réponse sous-harmoniques sont à nouveau analysés à 100 kPa. Seules les microbulles dont la taille a été réduite d'au moins 20 % par rapport à leur diamètre initial ont été considérées dans l'étude.

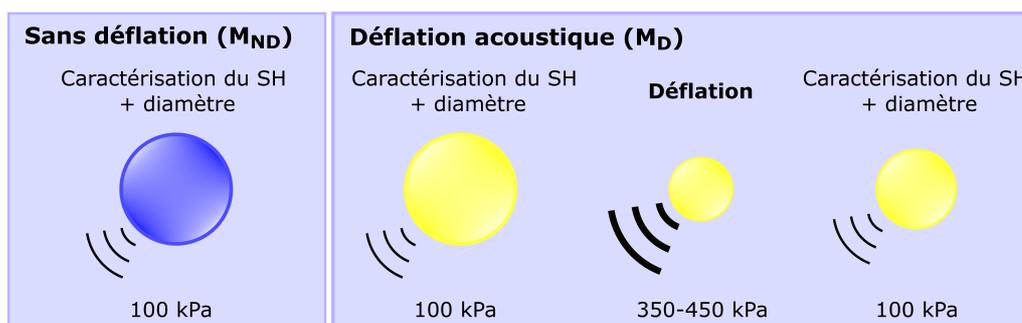


FIGURE 4.5 – Schéma représentant les séquences réalisées sur les deux populations de microbulles étudiées (M_{ND} et M_D) avec les étapes suivantes : mesure du diamètre à 100 kPa, caractérisation du sous-harmonique (SH) à 100 kPa et déflation à 350 ou 450 kPa. Toutes les séquences ont été réalisées à une fréquence de 5 MHz et 10 cycles.

4.2.5 Traitements des données

La réponse spectrale de la microbulle est obtenue à partir de la courbe de variation du diamètre de celle-ci en fonction du temps (Figure 4.4 B). Un fenêtrage de Hamming

4.3. RÉSULTATS

ainsi que du *zero padding* ont été appliqués sur le signal. La réponse fondamentale et sous-harmonique a été déterminée à partir de leur amplitude maximales dans une fenêtre de 0.5 MHz et 1 MHz respectivement. Les amplitudes fondamentales et sous-harmoniques présentées dans l'étude correspondent à la valeur moyenne calculée à partir des trois enregistrements avec ultrasons. Tous les traitements ont été effectués à partir du logiciel Matlab.

Il est à noter que les échantillons conventionnels et déflatés initiaux, comportaient un plus grand nombre de microbulles. En effet, les cas suivants ont été exclues de l'étude : les microbulles dont l'image optique a été défocalisée durant le processus de déflation et de caractérisation du sous-harmonique, les microbulles qui ont subi une déflation durant le processus de caractérisation du sous-harmonique, les microbulles qui se sont fragmentées, et lorsqu'une nouvelle microbulle est apparue dans le champ optique.

4.3 Résultats

4.3.1 Analyse de la déflation

La figure 4.6 présente un exemple d'une microbulle de BR14[®] ayant subi une déflation à 5 MHz et à une pression négative de 350 kPa. Son diamètre initial était de 4.3 μm et après excitation ultrasonore, le diamètre est passé à 3.4 μm , soit une réduction de taille d'environ 21 %.

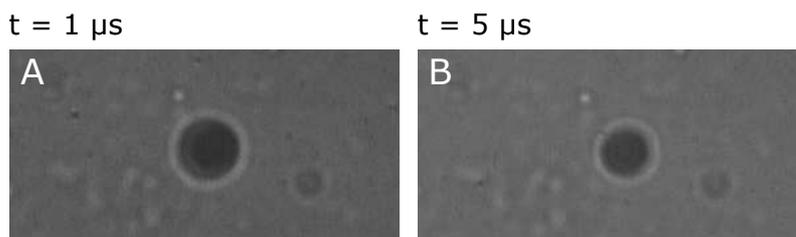


FIGURE 4.6 – Déflation à 5 MHz et 350 kPa, d'une microbulle de BR14[®] de A) 4.3 μm de diamètre initial et B) 3.4 μm de diamètre après déflation.

Au total, 17 microbulles de BR14[®] ont subi un processus de déflation. Le diamètre final en fonction du diamètre initial des microbulles est présenté dans la figure 4.7. A 350 kPa une déflation a pu être réalisée pour toutes les microbulles, dont le diamètre initial était compris entre 4.3 μm et 5.7 μm . La moyenne de réduction est alors d'environ 33 %. Néanmoins, à cette pression, la déflation des microbulles supérieur à 6 μm , n'a pas été constatée ou a été négligeable (< 20%). La déflation de ces microbulles n'a été achevée qu'à partir d'une pression de 450 kPa. À cette pression une moyenne de réduction d'environ 34 % a été observée.

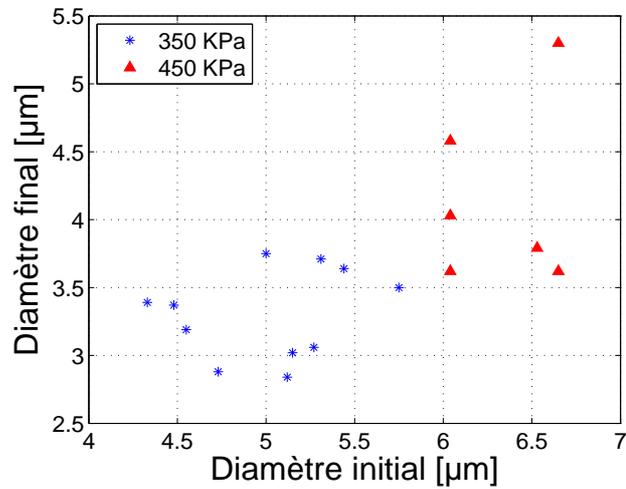


FIGURE 4.7 – Diamètre final en fonction du diamètre initial des microbulles ayant subi un processus de déflation acoustique à 5 MHz, 10 cycles et à une pression négative de 350 kPa ou 450 kPa.

4.3.2 Étude de la réponse sous-harmonique

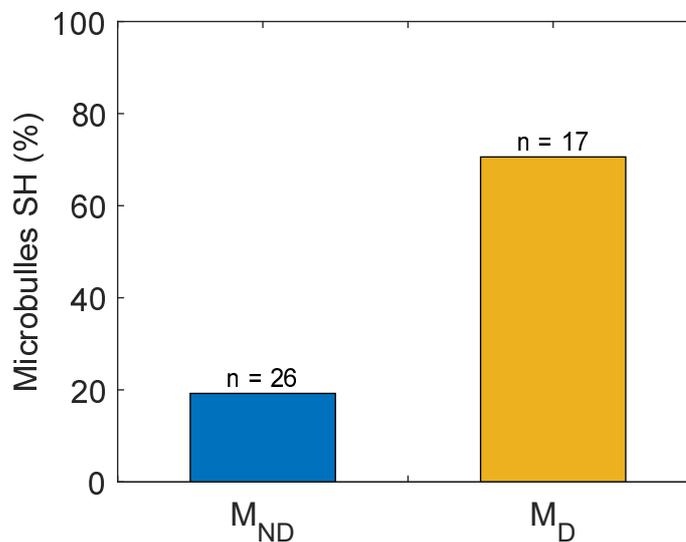


FIGURE 4.8 – Pourcentage de microbulles au sein des populations non déflatées (M_{ND}) et déflatées (M_D), ayant émis une composante sous-harmonique à 5 MHz et 100 kPa (n correspond au total des microbulles analysées au sein d'une population).

Une mesure de caractérisation de la réponse sous-harmonique a été réalisée sur l'ensemble des microbulles à 5 MHz et 100 kPa. Les résultats de cette analyse sont reportés dans la figure 4.8. Celle-ci présente le nombre de microbulles, au sein des populations M_{ND} et M_D , qui ont présentées une composante sous-harmonique. Les résultats présen-

4.3. RÉSULTATS

tés ci-dessous montrent que, 19 % des microbulles non déflatées émettent une composante sous-harmonique contre 70 % pour les microbulles déflatées.

Microbulles	Nombre	Diamètre (μm)	Pression SH (kPa)
M_{ND}	12	2.6-3.7 et 4.7-5.4	100
M_D	16	2.7-3.7 et 4.6-5.3	100

M_{ND} : Microbulles conventionnelles ou non déflatées

M_D : Microbulles déflatées

TABLE 4.2 – Populations de microbulles de diamètres correspondant à la fréquence de résonance, nombre, diamètre et pression utilisé pour caractériser le sous-harmonique.

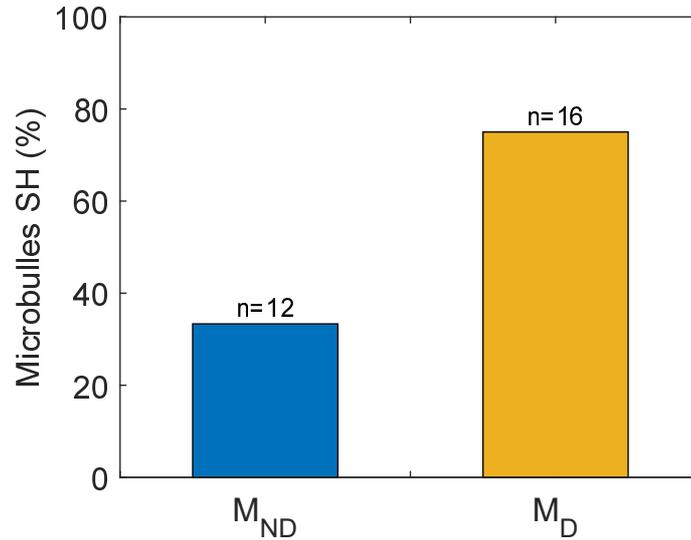


FIGURE 4.9 – Étude des microbulles à la résonance. Pourcentage des microbulles au sein des population non déflatées (M_{ND}) et déflatées (M_D) qui émettent une composante sous-harmonique à 5 MHz et 100 kPa (n correspond au total des microbulles analysées au sein d'une population).

Afin de favoriser l'émission d'une composante sous-harmonique, il est convenable d'exciter les microbulles à leur résonance ou à deux fois la fréquence de résonance [155]. Dès lors, afin d'étudier les effets de la déflation sur la réponse sous-harmonique, notre analyse s'est centrée sur les microbulles dont le diamètre se situe à la résonance de la fréquence d'excitation. Pour déterminer ces diamètres, nous nous sommes basés sur les travaux de van der Meer *et al.*, qui ont caractérisé la résonance des microbulles de BR14[®] [63]. D'après leur étude, une excitation à 5MHz, correspond à la fréquence de résonance des microbulles de 3 μm et à deux fois la fréquence de résonance des microbulles de 5 μm de diamètre. À partir de ces données, toutes les microbulles de 3 et 5 μm issues des groupes M_{ND} et M_D ont été sélectionnées et leur composante sous-harmonique a été analysée (Tableau 4.2).

4.3. RÉSULTATS

Notons que pour les deux diamètres, un intervalle de $0.7 \mu\text{m}$ a été admis.

Au total, 28 microbulles avec une répartition de 12 microbulles dans la population M_{ND} et 16 dans la population M_D ont été étudiées. Les résultats sont reportés dans la figure 4.9, présentée ci-dessous.

Le graphique (4.9) montre que 33 % des microbulles résonantes issues de la population conventionnelle (M_{ND}) émettent une composante sous-harmonique. En revanche, dans le cas de la population déflatée (M_D), ce taux devient plus important avec 75 % des microbulles qui présentent une réponse sous-harmonique.

Pour compléter la caractérisation des microbulles déflatées, nous avons analysé la réponse sous-harmonique de celles-ci. L'amplitude du signal sous-harmonique des microbulles conventionnelles (M_{ND}) a été comparée avec celle des microbulles déflatées (M_D). Les résultats de cette analyse ont été reportés dans la figure 4.10, qui représente un diagramme de la distribution de l'amplitude sous-harmonique des populations conventionnelles et déflatées.

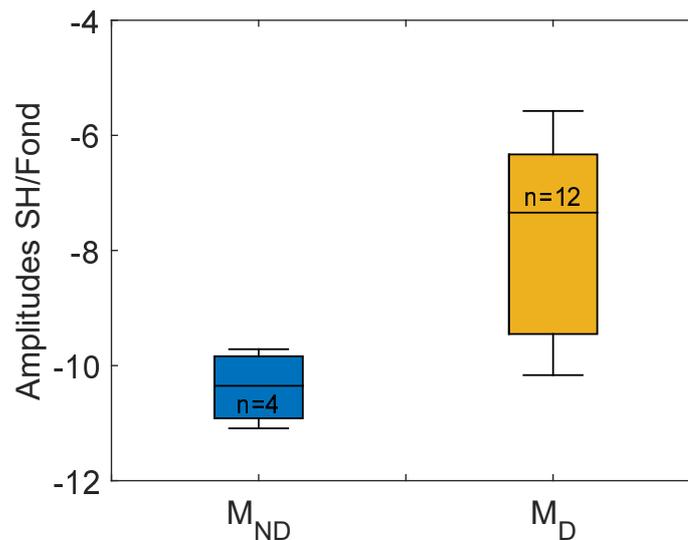


FIGURE 4.10 – Diagramme en boîte à moustache représentant la distribution des amplitudes du sous-harmonique normalisés par rapport à la fréquence fondamentale en fonction des populations M_{ND} et M_D .

On observe une différence significative entre les microbulles M_{ND} et M_D , avec une augmentation réelle du signal sous-harmonique pour la population déflatée (M_D). Cette dernière présente une médiane qui est environ 4 dB supérieure à la médiane de la population conventionnelle (M_{ND}). Notons toutefois, que la population M_{ND} possède une distribution moins étalée comparée à la population déflatée, dont l'échantillon est plus grand avec 12 microbulles, contre 4 microbulles pour M_{ND} .

La figure 4.11, présente le pourcentage de microbulles déflatées qui émettent une compo-

4.4. DISCUSSION

sante sous-harmonique en fonction de leur taux de réduction ($\text{diamètre}_{final}/\text{diamètre}_{initial}$). Les résultats montrent que 50 % des microbulles qui ont déflatées entre 20 et 30 % présentent une composante sous-harmonique. Ce taux monte à 80 % quand elles ont été déflatées entre 30 et 40 %, et toutes les microbulles (100%) qui ont été réduites de plus de 40% émettent une composante sous-harmonique. Ces observations suggèrent que plus le taux de réduction est élevé plus, l'émission d'une composante sous-harmonique est favorisée.

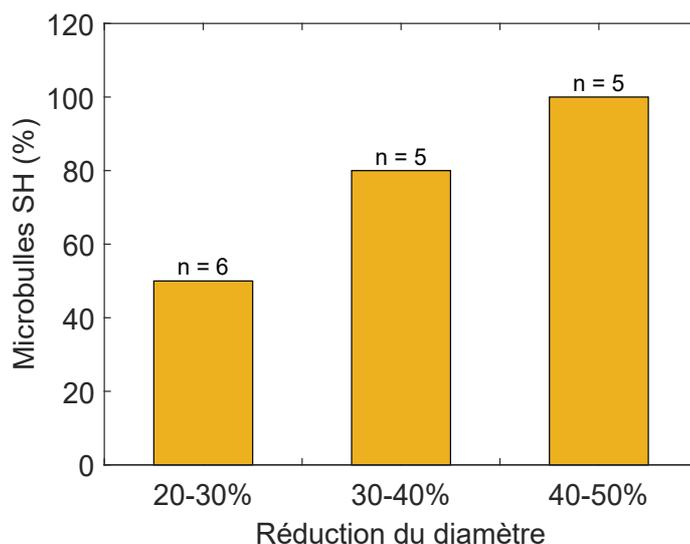


FIGURE 4.11 – Pourcentage des microbulles déflatées (population M_D) qui émettent une composante sous-harmonique à 5MHz et 100 kPa, en fonction du taux de réduction du diamètre.

4.4 Discussion

Lors de cette étude la déflation des microbulles de BR14[®] a été achevée à 5 MHz et à partir d'une pression négative de 350 kPa. À cette pression, toutes les microbulles inférieures à 6 μm ont été réduites d'au moins 20% par rapport à leur diamètre initial. En revanche, la déflation des microbulles de plus de 6 μm n'a été observée qu'à 450 kPa (Figure 4.7).

Dans un premier temps, la réponse sous-harmonique de l'ensemble des microbulles a été caractérisée à 5 MHz et 100 kPa. Les résultats de cette analyse, reportés dans la figure 4.8, montrent qu'une grande majorité des microbulles déflatées présentent une composante sous-harmonique. En effet, 70 % des microbulles issues de la population déflatée ($n = 17$) émettent une composante sous-harmonique, alors que celle-ci n'est observée que chez seulement 17 % des microbulles conventionnelles ($n = 26$). Afin de mieux examiner les effets de la déflation sur la génération du sous-harmonique, nous avons trié les microbulles sur la base de leur fréquence de résonance : pour ce faire, les microbulles ayant leur fréquence de résonance proche de la fréquence d'émission et à la moitié de celle-ci ont été sélection-

nées. Cette sélection des fréquences de résonance a été réalisée sur la base des travaux de van der Meer *et al.*. Ces derniers ont caractérisé la réponse vibratoire d'échantillons de BR14[®] à partir d'une mesure de spectroscopie, corrélant ainsi fréquence de résonance et diamètre de l'agent. Par conséquent, seules les microbulles ayant des diamètres de 3 et 5 μm ont été conservées dans l'analyse. La caractérisation de ces microbulles a permis d'identifier de manière plus précise les effets de la déflation (figure 4.9). En comparant les figures 4.8 et 4.9, on constate que les taux de sous-harmonique augmentent, dans les deux populations, une fois le tri effectué. Cette analyse confirme bien que le choix du diamètre en accord avec la fréquence d'émission est un paramètre essentiel à la génération de sous-harmonique. Néanmoins, on constate toujours une différence significative dans l'amplitude du sous-harmonique entre les microbulles déflatées et les microbulles conventionnelles.

En supplément de cette étude comparative sur la présence ou non de sous-harmonique entre les deux populations, l'analyse a été poussée à l'examen quantitatif de l'amplitude du sous-harmonique des microbulles déflatées et non déflatées. La figure 4.10 montre que la population déflatée présente une amplitude significativement plus importante. Par conséquent, en plus de favoriser la génération du sous-harmonique, la déflation semble accentuer l'amplitude de celui-ci. Enfin, la figure 4.11 présente le pourcentage de microbulles présentant du sous-harmonique en fonction du taux de réduction. Il semble clairement ressortir de cette figure que, plus la microbulle est réduite, plus elle présente du sous-harmonique. Ce résultat mériterait néanmoins d'être confirmé sur un échantillon de bulles plus important.

Les résultats présentés lors de cette étude montrent que le processus de déflation favorise la génération de la composante sous-harmonique. Ces résultats sont préliminaires, mais quelques hypothèses peuvent être avancées. Les études Borden *et al.* et Kooiman *et al.* ont montré que lors du processus de déflation, des plis ou *buckles* se formaient sur la paroi phospholipidique des microbulles [4] [148]. Ce phénomène de flambage témoigne, d'après les travaux de Marmottant *et al* de l'émission d'une composante sous-harmonique. Dans le cas de notre étude, il nous était impossible d'observer la paroi. En effet, ce type de mesure requiert un marquage de la paroi à la fluorescence [156].

Enfin, dans le chapitre précédent, nous avons démontré que la composition gazeuse des microbulles influençait la réponse sous-harmonique. La déflation étant gouvernée par la pression de Laplace, elle est sujette à des échanges gazeux. Par conséquent, une génération de sous-harmonique liée à une modification du composant gazeux n'est pas à exclure.

4.5 Conclusion

Les paramètres d'excitation employés lors de cette étude, ont permis de réaliser avec succès, la déflation des microbulles de BR14[®]. Lors de cette étude, l'ensemble des mesures réalisées, à 5 MHz et 100 kPa, confirme que la déflation affecte la réponse sous-harmonique. En comparant deux échantillons de microbulles de diamètres similaires, l'une conventionnel l'autre déflatée, nous avons constaté que la déflation favorisait la génération du sous-harmonique. De plus, une analyse plus approfondie a démontré, que celle-ci présentait une amplitude plus importante. Ces résultats sont préliminaires mais se doivent d'être mis

4.5. CONCLUSION

en évidence, car l'état de l'art sur les effets de la déflation sur la réponse acoustique des microbulles est peu fourni. Globalement, cette étude a eu pour but de définir avec soin la nécessité de considérer les paramètres d'émissions ultrasonores, ainsi que la sensibilité mécanique de la microbulle à ces derniers. Cet aspect mériterait une considération accrue lors des routines de caractérisation des agents de contraste.

4.5. CONCLUSION

Conclusion et perspectives

Tout au long de cette thèse, nous avons tenté d'optimiser la génération du sous-harmonique par les microbulles, dans le but de l'adapter à l'imagerie de contraste. Nous avons menés des expériences qui ont permis de mettre en évidence un paramètre, le composant gazeux de la microbulle, lequel faisait l'objet de peu d'attention. En effet, au sein de la communauté scientifique, il est plus couramment admis que la génération du sous-harmonique ne dépend que de paramètres inhérents à l'excitation ultrasonore (pression, fréquence de résonance) ou à ceux inhérents aux propriétés physiques et mécaniques de la paroi des microbulles (tension de surface, *buckles*). Nous avons également confirmé le retard d'émission du sous-harmonique et l'avons mis en évidence pour différents agents de contraste, tous constitués d'une paroi phospholipidique. Les résultats obtenus ont montré l'influence significative du composant gazeux sur la génération et l'amplitude du sous-harmonique, alors que les composantes fondamentales et seconde harmonique ne semblent pas être affectées, ce qui indique que ce retard semble inhérent à l'émission du sous-harmonique. Ces observations démontrent que l'exploitation de la composante sous-harmonique n'est pas simple et nécessite une stabilisation.

À la suite de ce travail nous avons cherché à identifier les effets du processus de déflation, sur la réponse sous-harmonique des microbulles. Ici, nous sommes partis de l'idée que la déflation affectait les échanges gazeux de la microbulle et de surcroît pouvait avoir des effets sur la réponse acoustique. Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé la caméra ultra-rapide Brandaris, pour caractériser la déflation d'une microbulle seule et en fonction de sa taille. Les résultats préliminaires de cette étude ont montré que la majorité des microbulles qui avaient subi une déflation présentait une composante sous-harmonique et que celle-ci avait une amplitude plus élevée, comparé à des microbulles conventionnelles de même diamètre. Plusieurs hypothèses peuvent être émises, en plus des échanges gazeux, comme par exemple la formation de plis ou *buckles*.

En terme de perspectives, les performances des agents de contraste pour l'imagerie sous-harmonique peuvent être amélioré grâce à une sélection précise des propriétés du composant gazeux. Toutefois, il ne s'agit pas de considérer le gaz comme un paramètre isolé, car ses propriétés de diffusion dépendent également de la perméabilité de la paroi. Dans ces conditions, il serait convenable de considérer les effets d'un couple gaz-paroi. Ainsi, il serait intéressant de caractériser le retard du sous-harmonique en fonction du gaz de microbulles composés d'une paroi différentes des phospholipides, pour avoir une pleine validation des effets de la diffusion.

Un des axes qu'il serait intéressant d'investiguer est celui de l'imagerie sous-harmonique des

CONCLUSION

microbulles ciblées. En effet, ces dernières souffrent d'une diminution du signal une fois attachées. Ainsi, on pourrait analyser la manière dont évolue la composante sous-harmonique et voir si elle montre des tendances similaire aux microbulles conventionnelles.

Lors de notre étude les caractérisations de génération du sous-harmonique ont été effectuées dans une solution saline. Il serait convenable, à l'avenir, de réaliser ces expérimentations *in vitro* dans les conditions de pressions du sang et des artères. En effet, les vitesses de diffusion du gaz y seraient très différents et ce serait une étape préalable avant de passer à l'imagerie.

À long terme, l'intérêt de ses perspectives est naturellement, l'exploitation des microbulles en imagerie non linéaire pour les microbulles conventionnels et ciblées.

Annexes

Annexe A

EXPERT OPINION ON DRUG DELIVERY, 2017
VOL. 14, NO. 9, 1031–1043
<https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1266328>



REVIEW

Microbubble-mediated ultrasound drug-delivery and therapeutic monitoring

Charles A. Sennoga^a, Emma Kanbar^a, Laurent Auboire , Paul-Armand Dujardin^b, Damien Fouan^a, Jean-Michel Escoffre^a and Ayache Bouakaz^a

^aUMR Imagerie et Cerveau, Inserm U930, Université François Rabelais, Tours, France; ^bInserm CIC 1415, CHRU Tours, Tours, France

ABSTRACT

Introduction: Recent developments in ultrasound imaging and ultrasound contrast agents (UCAs) improved diagnostic confidence in echography and set into motion their combined use as a tool for drug delivery and therapeutic monitoring. Non-invasive, precise and targeted delivery of drug molecules to pathological tissues by employing different mechanisms of drug release is becoming feasible.

Areas covered: We sought to describe: the nature and features of UCAs; outline current contrast-specific imaging modes; before describing a variety of strategies for using ultrasound and microbubbles as a drug delivery system. Our expert opinion focusses on results and prospects of using ultrasound and microbubbles as a dual modality for drug delivery and therapeutic monitoring.

Expert opinion: Today, ultrasound and microbubbles present a realistic prospect as drug delivery tools that have been demonstrated in a variety of animal models and clinical indications. Besides delivering drugs, ultrasound and microbubbles have demonstrated added value through therapeutic monitoring and assessment. Successful evaluation of the sonoporation mechanism(s), ultrasound parameters, drug type and dose will need to be addressed before translating this technology for clinic use. Ultimately, the development of a strategy for monitoring targeted delivery and its implementation in clinical practice would advance therapeutic treatment to a new qualitative level.

ARTICLE HISTORY

Received 19 January 2016
Accepted 25 November 2016

KEYWORDS

Contrast agents; diagnostic imaging; drug-delivery; microbubbles; sonoporation; therapeutic monitoring; ultrasound

Downloaded by [88.106.128] at 05:54 25 October 2017

1. Introduction

An important challenge of conventional therapies is the non-specific distribution of cytotoxic drugs within the body, resulting into reduced therapeutic efficacy and systemic side effects. Strict localization of a drug's pharmacological activity at the site of vascular pathology (targeted drug delivery) would lead to significant reduction in drug toxicity, drug dose required, and increased therapeutic efficacy [1]. To better improve therapeutic efficacy and reduce the side effects, two challenges need to be addressed. The first is concerned with how vascular extravasation of the drug in the pathological region of interest (ROI) is triggered. The second is concerned with how to efficiently induce targeted delivery with minimal side effects.

Promising approaches for targeted drug delivery based on the combined use of ultrasound (US) and US contrast agents (UCAs) have been developed [2–4]. UCAs are shell encapsulated, micrometer-sized gas bubbles that are usually injected into the blood circulation of the test subject in order to enhance US image contrast and as a result, improve diagnostic confidence. Indeed, UCAs are now used routinely in cardiology and in radiology [2] with the aim of improving the detection and visualization of the blood pool and to evaluate vascular perfusion in a variety of organs (Table 1). Moreover, continued improvements in contrast-enhanced US (CEUS) and its clinical diagnostic applications are due in part to developments in US imaging modes such as pulse inversion (PI) [2,3] and power modulation (PM) imaging. Significant effort has been directed

toward developing and improving US detection methods based on specific acoustic signatures from UCAs with the requirement that the resultant imaging methods be sensitive to UCAs while simultaneously discriminating echoes originating from non-perfused tissue.

Elsewhere, the combined use of US and microbubbles represents a novel and promising approach to achieving targeted therapy which will likely add a new therapeutic dimension to this modality. Specifically, drug uptake and biodistribution into target tissues can be amplified using US and UCAs, through a phenomenon termed sonoporation. It is now thought that the volumetric oscillations of microbubbles under the action of US induces a number of local acoustic phenomena which engenders the permeability of the vascular barriers (e.g. cell membrane, blood–tumor barrier or blood–brain barrier (BBB)) leading to enhanced extravasation of drugs in the targeted tissue and increasing drug bioavailability [5,6]. Accordingly, the delivery of therapeutic agents into sites of interest can be triggered on demand and controlled spatially and temporally through US focusing and directed propagation.

In this article, we describe some of the emerging therapeutic applications and discuss the potential of using US for both image guidance and therapy. Briefly, in Section 2, we illustrate the nature, composition, and types of UCAs in current use. In Section 3, we describe the main acoustic properties of UCAs and how they are exploited in newly available contrast imaging modes dedicated to the visualization of microcirculation.

Article highlights

- Ultrasound contrast agents (UCAs), used in conjunction with ultrasound can play a major role in clinical decision-making.
- Recent advances in the design of UCAs have opened up powerful microbubble applications such as ultrasound molecular imaging, site-specific drug delivery and triggered-release of therapeutic payloads.
- In addition to their exploitation for diagnosis, ultrasound (US) combined with UCAs today represent a new method of localised drug delivery, in which sonoporation induces a transient opening of biological barriers ultimately leading to the uptake and enhanced accumulation of drugs in the targeted region.
- Drug-delivery using contrast-enhanced ultrasound (CEUS) has the potential of becoming a clinically accepted approach for locally potentiating anticancer chemotherapies; and an effective adjunct with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) for clot lysis.
- Careful evaluation of the choice of drugs, clinical indication, ultrasound settings, microbubble type and concentration is needed to facilitate translation of sonoporation to the clinic.
- Ultimately, the overall goal of imaging, drug-delivery and monitoring response to treatment by using the same equipment would be the perfect drug delivery system, combining as it does: ease-of-use, mobility, real-time and bedside availability.

This box summarizes key points contained in the article.

Therapeutic applications based on US and UCAs are described in the subsequent section, with specific focus on sonothrombolysis and sonoporation-induced drug delivery. The use of US and UCAs as a tool for evaluating therapeutic response is presented in Section 5. The article ends with a short conclusion and Expert Opinion outlining our vision of how US- and UCAs-based drug delivery methods will likely develop in the future.

2. Microbubbles as US contrast agents (UCAs)

2.1. Nature and constitution of UCAs

UCAs are dispersions of small (typically 3 μm in diameter) gaseous microbubbles that are stabilized against dissolution and coalescence by a lipid monolayer, cross-linked polymer or denatured protein (see Figure 1(a,b)). Microbubbles are usually administered into the circulation of the test subject either as an intravenously infusion or bolus injection of approximately 200 μl of gas volume, in humans. Because of their micrometer size range, microbubbles are primarily confined to the vasculature after administration, a feature that makes them excellent blood-pool tracers because they can be easily interrogated using US, as they circulate through the vasculature of the test subject. However, the circulation life-time of most microbubbles, is often short lived (typically 3–5 min [7] for SonoVue™) and this is due in part to the acoustic parameters used, that is, whether the US pressures used are destructive; and diffusivity of the gas from microbubble interiors and its solubility into the surrounding media. UCAs increase the intensity of US signals backscattered from blood for several minutes after their injection, and this signal enhancement can be prolonged by infusing them. Perhaps most importantly, UCAs have a stronger signal enhancement at the frequencies (1–14 MHz) employed for medical imaging. This makes UCAs extremely useful for US image enhancement, and useful for diagnostic applications such as the

identification of angiogenesis in malignant tumors, left ventricular opacification (LVO), and myocardial perfusion [2]. A number of microbubbles are in current clinical use (Table 1).

2.2. Types of UCAs

Although microbubbles were originally developed to improve US imaging, recent advances have opened up powerful emerging applications including: CEUS molecular imaging [8] using target-specific microbubbles [9,10], site-specific drug delivery using microbubbles as vehicles for carrying [11] and triggering the release of therapeutic payloads [12]. This has the potential of changing the way US is used in drug delivery, acoustic therapy, and treatment monitoring. Recently, it has been reported [13] that some, but not all, microbubbles are retained by the liver and spleen in a nonspecific and time-dependent manner. The retention and accumulation of microbubbles in other organs have been reported and now thought to depend on microbubble physical and chemical properties. The transit times of such microbubbles through the liver now forms the basis of a powerful new liver-specific imaging mode [4].

2.3. Microbubbles as drug vehicles

US waves can potentiate therapeutic drug delivery by creating transient nonlethal perforations in cell membranes and so aid delivery of variously sized molecules that would otherwise be excluded from accessing the cell interior. While this requires substantially high acoustic power beyond levels approved for diagnostic imaging, the power needed is greatly reduced when microbubbles are present. This is because microbubbles lower the amount of energy needed for cavitation, the process in which extreme oscillations induced by US pulses lead to microbubble collapse [2,14]. Microbubbles can be formulated not only to carry therapeutic agents, but also to protect the drug payload (Figure 1(e–h)) from enzymatic digestion during its transition to the target site or tissue. In this way, therapeutic drugs can be delivered with high precision and accuracy, although certain drug carrying approaches are preferred because of their drug loading efficiency and/or ability to protect the therapeutic payload. For example, microbubbles with shells comprising positively charged lipids are known to electrostatically bind negatively charged nucleic acids (NAs) such as siRNA, miRNA, mRNA, and plasmid DNA. Similarly, hydrophobic drugs can be encapsulated within lipid or polymeric shells that stabilize microbubbles (Figure 1). The circulation of these drug/NA-loaded microbubbles can be followed using CEUS imaging and subsequently disrupted using either purpose designed US pulses or temperature [12] to release its therapeutic payload upon reaching the target organ or tissue [15]. Using drug incorporation into UCA shells, Shohet et al. [16] showed that the delivery of a reporter gene in the mouse heart could be increased 10-fold by using microbubbles loaded with an adenoviral vector in their shell encapsulations.

2.4. Targeted microbubbles

Site-specific delivery can be aided by incorporating ligands or monoclonal antibodies onto the outer surface of drug loaded

Table 1. Microbubble ultrasound contrast agents in current clinical use.

UCA trade name manufacturer/license holder	Shell material and gaseous core	Approving country	Approved indication(s)	Date of approval	Notes
DEFINITY® Lantheus Medical Imaging, North Billerica, MA	Phospholipids: DPPC, DPPA, MPEG5000DPPE sodium dihydrogen phosphate monohydrate, disodium hydrogen phosphate heptahydrate, sodium chloride, propylene glycol, glycerol, water for injections (octafluoropropane)	Australia, Brazil, Canada, India, Israel, Mexico, New Zealand, Singapore, South Korea, UAE, USA	Left ventricular opacification (LVO); Endocardial border delineation (EBD); liver/kidney imaging	2001	Canada: Abdominal imaging including gynecological applications; some off-label studies including bowel and carotid artery
Lumason® Bracco Diagnostics Inc., New Jersey, USA	Phospholipid (sulfur hexafluoride)	USA	LVO in adults with suboptimal echocardiograms; EBD	2014	Marketed as SonoVue® in the EU and elsewhere
Lumason® Bracco, New Jersey, USA	Phospholipid (sulfur hexafluoride)	USA	Characterization of focal liver lesions in adult and pediatric patients; to improve the sensitivity and specificity of US imaging for the differentiation between malignant and benign focal hepatic lesions	2016	Marketed as SonoVue® in the EU and elsewhere
Luminity Bristol Mayer Squibb	Phospholipid: DPPC, DPPA, MPEG5000DPPE, sodium dihydrogen phosphate monohydrate, disodium hydrogen phosphate heptahydrate, sodium chloride, propylene glycol, glycerol, water for injections (octafluoropropane)	EU	LVO /EBD, liver, kidney	2006	
Optison™ GE Healthcare, Buckinghamshire, UK	Human serum albumin, sodium chloride, N-acetyltryptophan, caprylic acid, sodium hydroxide, (pH adjustment), water for injections (octafluoropropane)	Brazil, EU, Norway, USA	LVO/EBD	1998	Prostate cancer diagnosis with Contrast-enhanced ultrasound dispersion imaging (CUDI).
Sonazoid GE Healthcare, Buckinghamshire, UK/Daiichi Saniko, Tokyo, JP	Phospholipids, sucrose, HEPS, sterile water (perfluorobutane)	Denmark, Japan, Norway, South Korea	Focal breast and liver lesions	2007	
SonoVue® Bracco Diagnostics, Milano, Italy	Phospholipid: Macrogol 400, DSPC, DPPG, Sodium palmitic acid, sodium chloride 9 mg/ml (0.9%) solution for injection (sulfur hexafluoride)	Brazil, Canada, China, EU, Iceland, India, Japan, Norway, Russia, Singapore, South Korea, Switzerland	LVO, EBD, microvascular enhancement (liver and breast lesion detection) breast, liver, portal vein, extracranial carotid, peripheral arteries (macrovascular and microvascular)	2001	

1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidic acid, monosodium salt (DPPA), N-(methoxypolyethylene glycol 5000 carbamoyl)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine, monosodium salt (MPEG5000 DPPE); Distearoylphosphatidylcholine (DSPC), Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG), hydrogenated egg phosphatidyl serine (HEPS); left ventricular opacification (LVO); endocardial border delineation (EBD).

UCAs (Figure 1(d)) and subsequently used to target receptors expressed on vascular cell membranes. For example, incorporation of a surface ligand that binds to the GPIIB/IIIA receptors expressed on activated platelets, allowed microbubbles to avidly bind to arterial thrombi [17,18]. Delivery of thrombolytic agents was then easily achieved upon disruption of the target-bound microbubbles. Similarly, microbubbles that carry anti P-selectin, E-selectin, VCAM-1, and VEGF-R2 antibodies have been widely employed for the *in vivo* identification of molecular expression, clearly showing that a number of receptors can be potentially used for targeted drug delivery. For a detailed review, see Supplemental Material to reference [10].

3. US contrast imaging modes

Microbubbles scatter US waves both passively and actively when exposed to US. The earlier is due to differences in acoustic impedance between microbubble gas cores and the

surrounding medium [19] while the latter is due to oscillations emanating from the high compressibility of gas cores which initiates a volume pulsation, although the shell encapsulation can dampen these effects. Because they are gas filled and smaller than the US wavelength, microbubbles undergo radial oscillation which involves sequential compression and expansion in the alternating pressures of the US field. Stable cavitation is a term that refers to oscillation without significant loss of microbubble integrity whereas inertial cavitation refers to disruption of microbubble caused by excessive oscillation. The latter event can result in the release of transient-free microbubbles. Radial oscillation of either encapsulated or free microbubbles results in strong acoustic signals that can greatly exceed conventional US backscatter signals. The degree of oscillation is in turn dependent on the density of the gas core, material properties of the surrounding medium, the nature of the encapsulating shell, and US characteristics such as frequency and pressure amplitude. These oscillations

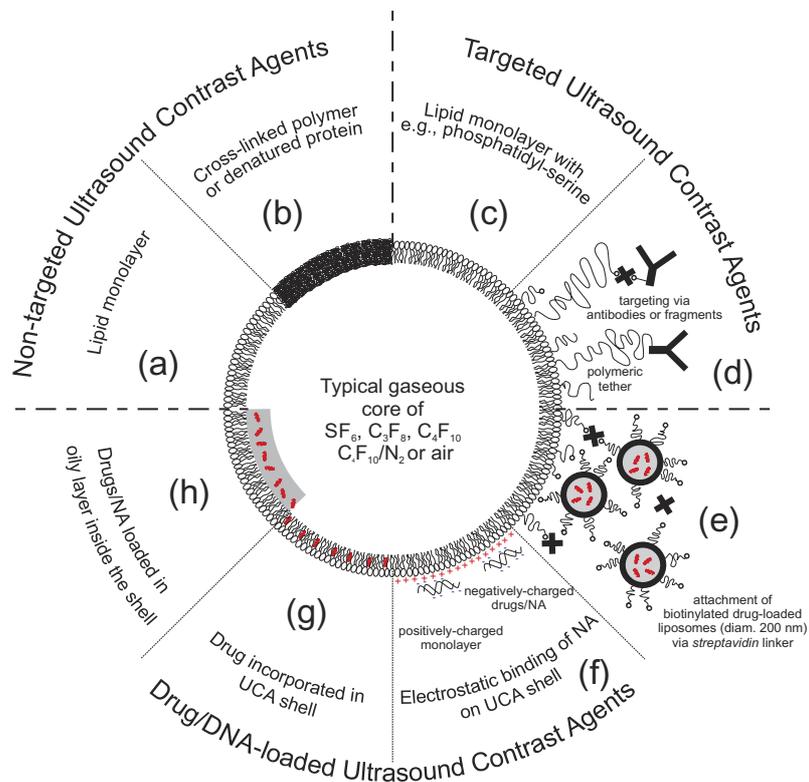


Figure 1. Schematic representation of microbubble UCAs highlighting different functions and features. A shell encapsulation of (a) lipid monolayer, (b) cross-linked polymer or denatured protein surround the perfluorocarbon, gas composite or air bubble. Gas-filled UCAs can be designed to carry specific lipid molecules, such as (c) phosphatidylserine allowing them to non-specifically bind to certain tissues *in vivo*, or (d) monoclonal antibodies or antibody fragments, allowing them to bind specifically to certain tissues *in vivo*. Similarly, (e) hydrophilic drugs can be loaded into stealth liposomes which are in turn conjugated onto the surfaces of microbubbles; (f) negatively charged drugs or NAs can be electrostatically bound onto the surface of positively charged microbubbles; (g) drugs can be incorporated by themselves into the shell or, if insoluble in water, (h) in an oil layer inside the UCA thus allowing the drug payloads to be carried and delivered to the required site.

are governed by variations in pressure of the US wave, constituted of a compression phase (leading to microbubble compression) and rarefaction phase (microbubble expansion). For higher US amplitudes, the scattering of the microbubble becomes nonlinear and as a result, the US echoes contain harmonic components in addition to the main fundamental frequency. In fact, the interaction of US and microbubbles can be described as a function of the applied acoustic pressure, as described by mechanical index (MI) in clinical US scanners. MI is defined as the ratio of the peak negative pressure (PNP) in MPa, that is, the maximum amplitude of the peak rarefaction pressure, to the square root of the driving frequency (f) in MHz [14].

$$MI = \frac{PNP}{\sqrt{f}}$$

MI can be used to predict the degree of linear and nonlinear bioeffects that a given set of US parameters will induce. When exposed to $MI < 0.1$, microbubbles exhibit a weak nonlinear and nondestructive response. At $MI = (0.1-0.3)$, microbubble responses are nondestructive but exhibit a significant

nonlinear response. Finally, at $MI > 0.3$, most microbubbles exhibit nonlinear response and are easily destroyed [20].

Based on the nonlinear acoustic signatures of UCAs and the advanced understanding of their dynamics in an US field, a number of imaging modes directed to the detection and imaging of microbubbles have been proposed. CEUS imaging modes are generally aimed at detecting US echoes emanating from microbubbles while eliminating or reducing echoes issued from non-perfused tissues. Below we describe the main CEUS imaging modes currently used on clinical US scanners.

3.1. Pulse inversion

PI is widely exploited in clinical applications for medical diagnosis. This imaging mode provides contrast enhancement between the microbubbles injected intravenously and the surrounding tissues by detecting the nonlinear backscattered signal components from microbubbles [2,3,21-24]. PI involves a successive transmission of two US pulses; the second pulse being an inverted replica of the first pulse. The echoes received from the two pulses are collected and

summed. Because tissue responds mostly linearly, the sum of its echoes will thus be canceled out. Conversely, microbubbles exhibit asymmetric oscillations resulting into nonlinear echoes and their sum will be cumulative instead of suppressed. In other words, with PI linear components cancel while nonlinear components do not cancel. PI is known to preserve all even harmonic components and to cancel out the uneven ones (including the fundamental component). Accordingly, PI allows the detection of the second harmonic component arising from the microbubbles. PI offers greater advantages over conventional harmonic imaging which requires the transmission of long pulses (narrow bandwidth signals) to avoid the overlapping of the fundamental frequency and the second harmonic frequency bands. PI overcomes this technical limitation by providing a better compromise between axial resolution and sensitivity. However, because it is a multi-pulse technique, PI suffers from substantial frame rate reduction (down by a factor of 2) when two pulses are transmitted. Another limitation of the PI is due to the fact that two firings are required to create one beam. As a result, relative motion of the tissue can occur during these firings. Under these conditions, the fundamental signal component is not completely canceled, but instead results into motion artifacts [3].

3.2. Power modulation

Like PI imaging mode, PM also called amplitude modulation is a multi-pulse sequence which enables the detection of the nonlinear backscattered signals of the microbubbles with cancellation of the linear response from non-perfused tissue [25,26]. Here, two US pulses are transmitted, where the second pulse has twice the amplitude of the first pulse. The scattered echo from the first pulse (E_1) is scaled by a factor of two and then subtracted from the second echo (E_2). As a result, linear echoes are canceled by this simple operation ($E_2 - 2E_1$) while echoes from microbubble nonlinear scatter, is enhanced. As with PI, the frame rate in PM mode is similarly reduced by a factor of 2.

3.3. Contrast pulse sequence

Contrast pulse sequencing (CPS) has been developed to further increase the specificity of microbubble detection. CPS is based on the combination of PI and PM sequences [27–29]. CPS uses a sequence of more than two pulses which can reduce motion artifacts [30] leading to better sensitivity and specificity for microbubble detection (see also Figure 2).

CEUS is still an active research area where acoustic microbubble-specific signatures are carefully exploited in order to develop more sensitive microbubble detection methods. Other novel approaches have been proposed based on coded excitations such as Chirp Reversal Imaging [31] as well as specific nonlinear behavior of microbubbles such as sub-harmonic imaging [32,33] and super-harmonic imaging [34,35].



Figure 2. Detection and delineation of a patient liver lesion in contrast ultrasound image with CPS imaging mode showing an early uptake of the contrast microbubbles compared to adjacent hepatic tissue (courtesy, A. Bleuzen and F. Tranquart CHRU Tours).

4. Microbubbles as drug delivery and therapeutic agents

4.1. Drug delivery using microbubble-assisted US

Research into *in vivo* drug delivery using CEUS has developed rapidly throughout the past decade and the potential of this modality is clearly demonstrated by the increasing number of publications [36] on the subject. The exposure of biological tissues to US in the presence of microbubbles, induces nonlinear microbubble oscillations which mediate permeabilization of cells and tissues, through a process termed sonoporation [37]. Here, microbubbles are co-injected [38] with the therapeutic drug or directly administered into the targeted superficial tissues [39]. It is thought that in the former, oscillation of microbubbles in the tumor microvasculature promotes permeabilization of the tumor endothelium only, and enhances drug extravasation. The permeabilization of endothelial cells is thought to augment drug uptake into the cells, thus leading to the destruction of tumor vasculature and reduction of nutrient supply. In the latter, oscillating microbubbles close to the target cells probably result in the permeabilization of the cell plasma membrane, which is followed by increased intracellular uptake of drugs.

Although the exact mechanism(s) underlying CEUS drug delivery are still not fully understood, it is now recognized that cell/tissue permeabilization is correlated to the acoustic response of the microbubbles. Since, US-driven microbubble response depends on the acoustic parameters of the US wave (i.e. excitation frequency, acoustic pressure, exposure time, etc.) used [40], when exposed to low acoustic pressure, microbubbles will undergo stable oscillation through a process termed stable cavitation. In this regime, microbubble oscillations produce fluid flows around the microbubbles, termed acoustic microstreaming, which result in shear stress on the cell membrane (Figure 3) [41]. At higher acoustic pressures, microbubbles oscillate more vigorously, leading to their violent collapse and destruction, through a process termed

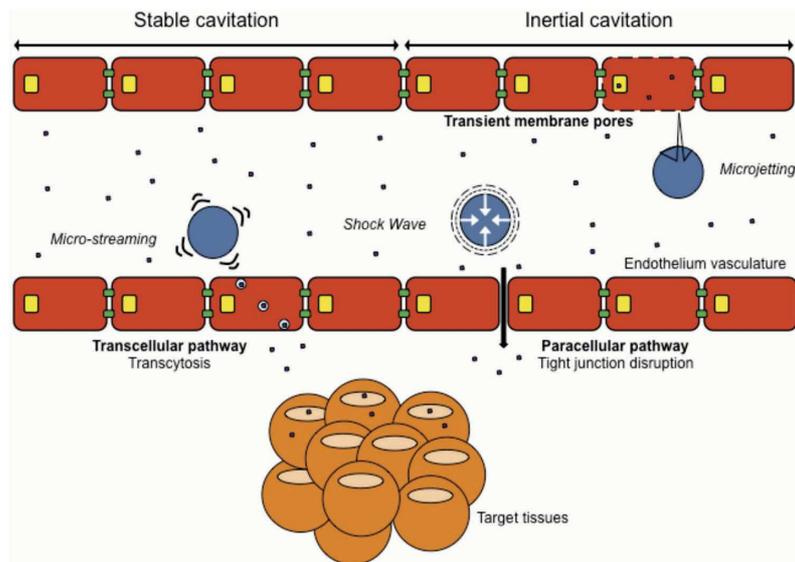


Figure 3. Extravasation and cellular uptake of drug using microbubble ultrasound (Adapted with permission from [31] – Copyright ©2015 Lammertink, Bos, Deckers, Storm, Moonen and Escoffre).

inertial cavitation. Such microbubble disruptions can be accompanied by a formation of shock waves in the medium close to the microbubbles. This acoustically induced collapse of the microbubbles is asymmetric in nature, and thought to be associated with the generation of high velocity jets [42]. While shock waves shear stresses cells in close proximity, high velocity jets perforates cell plasma membrane and can cause cell death. It should be understood however that while certain acoustic phenomena (such as shock waves) can be irreversibly damaging to cells, others (such as acoustic streaming), are not. Both stable and inertial cavitation phenomena are believed to play a role in the transient increase of the permeability of biological barriers, including the vascular endothelium and plasma membrane. The permeabilization of cell barriers presumably favors the extravasation and intracellular uptake of therapeutic molecules by stimulating paracellular [43] and transcellular pathways [44,45] and/or the formation of transient membrane pores [46].

As with any drug-delivery method, CEUS therapy aims to deliver optimal amounts of therapeutic molecules in targeted cells and tissues. The efficiency of this delivery method depends on: (a) sufficient accumulation of therapeutic molecules and microbubbles close to cells or tissues, which is directly influenced by the properties of therapeutic molecules, microbubbles, (i.e. pharmacokinetics, pharmacodynamics, bio-distribution) [47], cells (i.e. membrane composition, fluidity) and tissues (i.e. localization, perfusion), as well as administration route (i.e. intravascular, intraperitoneal, intratissue) [39,48,49] employed; (b) US parameters [50] and devices (i.e. home-made or commercial medical systems) [5]; and (c) treatment schedule(s) including the delay between the administrations of therapeutic molecules and/or microbubbles and US treatment [31,51,52], as well as the number of treatments and

the time interval between them [53–55]. Given that US scanners employ differing sequences and probes that differ in size and therefore characteristics, the use of similar acoustic modes and parameters does not always guarantee similar results. To ensure a better comparison, researchers commonly choose and adhere to the same scanner and probe types which are then calibrated against a known standard and used over the time course of any longitudinal study. The influence of these factors on drug delivery has been investigated in order to enhance accumulation of therapeutic molecules into the target tissues, thereby increasing the treatment efficacy, while minimizing side effects to healthy tissues. For example, Yan et al. [56], described that the application of US on subcutaneous breast tumors following intravenous administration of paclitaxel-loaded microbubbles resulted in a fourfold increase in intratumor accumulation of paclitaxel and, a 2.5-fold decrease in tumor volume compared to treatment with paclitaxel-loaded microbubbles alone [56]. Similarly, delivery of paclitaxel using microbubble-assisted US led to significant decreases in paclitaxel concentration in by-stander organs such as liver and kidney as compared to treatment with paclitaxel-loaded microbubbles alone. No significant loss of body weight or other side effects were reported for this therapeutic protocol.

CEUS is a noninvasive, easy to use, and cost-effective treatment modality, that can be used to deliver a wide range of therapeutic molecules including chemotherapeutic agents [5], NAs (e.g. siRNA, miRNA, oligonucleotides, plasmid DNA) [57], therapeutic peptides, and monoclonal antibodies [58] to a target site. For example, Jordao et al. recently reported the successful delivery of anti-A β antibodies into the brain of a mouse model of Alzheimer diseases after transient opening of the BBB using microbubble-assisted US [59,60] under MRI

guidance. Four days after treatment, the number and mean size as well as surface area of A β plaques of treated mice brain, were significantly reduced as compared to the nontreated control brain [59]. Several investigations show that BBB disruption can be reliably and repeatedly achieved with no or limited histologic (i.e. micro-hemorrhages, macrophage infiltration) or functional damage (i.e. behavior and visual deficits) [61–63]. No tissue damage was detected in sonicated brain tissues, thus suggesting good overall safety of this method. Recently, the first noninvasive opening of BBB using focused US in patients with high-grade glioblastoma has been reported. See <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02343991>. This clinical study based on 10 patients sought to establish the feasibility, safety, and efficacy of using CEUS to transiently open the BBB with the aim of delivering chemotherapeutic molecules (e.g. doxorubicin) for the treatment of brain tumors.

CEUS has emerged as a promising and efficient therapeutic method for treating genetic and acquired human diseases such as diabetic nephropathy [64], cardiovascular diseases [65,66], cancer [67], certain brain diseases [68], and ischemic stroke (IS) [69]. Despite the novelty of this treatment approach, clinical trials aimed at CEUS-mediated delivery of gemcitabine using SonoVue™ have been conducted in patients with locally advanced pancreatic cancer [70]. Although this study showed tumor shrinkage in only 2 out of the 5 cases; and transient reduction in only one case, we note that the method is safe for patient use. All patients tolerated increased numbers of treatment cycles, as compared to patients treated with gemcitabine without CEUS (16 ± 7 versus 9 ± 6 cycles), clearly reflecting improvement in patients' physical state and the increased survival to 60%.

4.2. Thrombolysis with US and microbubbles

IS, described as death of neuronal cells due to reduction/interruption of regional cerebral blood flow by a clot, is the second leading cause of death worldwide [71]. Besides mechanical clot retrieval, alternative treatment for IS commonly involve the use of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) [72]. However, rt-PA is presently only applicable in 3–5% of acute IS patients. This is due in part to strict treatment initiation times of ≤ 4.5 h and associated hemorrhagic side effects [73]. Today, transcranial US used in conjunction with microbubbles, which can be coadministered

with other drugs or used as a drug carrier, are under investigation as an alternative thrombolysis treatment (sonothrombolysis).

4.2.1. Preclinical studies of sonothrombolysis

Two different therapeutic strategies are used to deliver medication to lyse thrombus (sonothrombolysis). The first, based on the coadministration of UCAs and fibrinolytic drugs showed that US combined with UCAs potentiates the effect of fibrinolytic drugs. Tachibana et al. [74] showed that the use of UCAs led to significant enhancement of clot fibrinolysis rates and clot destructions equating to: 26.6% for clots treated with urokinase alone; 33.3% for urokinase and US; and, 51.3% for UCAs, urokinase, and US, thus giving the first clear demonstration of the potential role of UCAs as suitable adjuncts for sonothrombolysis. Indeed, the ability of UCAs to enhance fibrinolysis has been extensively studied and the findings (also described 4.1), have led to the accepted view that during stable cavitation, microstreaming promotes contact between fibrinolytic drugs and fibrin, leading to better access to the enzymatic sites. This assumption is supported by the work of Lauer et al. [75] who showed that flow between the fibrin fibers is potentiated by US radiation forces. In addition, Datta et al. [76] showed a deeper penetration of rt-PA within clots, when UCAs were coadministered with rt-PA and subsequent treatment with US. In related studies, Rooney [77] had shown that hemolysis was achievable using US alone and more recently with the combined use of US and UCAs (see Figure 4) [78,79].

The second therapeutic strategy involves the incorporation of therapeutic agents within microbubbles in order to locally deliver drugs at the ROI. The ability to maximize the concentration of medication where therapeutic action is needed and to lower the overall dose used, remains a key goal for achieving better therapeutic benefit-to-risk ratio. Luan et al. [80] showed that stable and inertial cavitation-induced lipid shedding from the shell of the microbubbles, thus giving a clear demonstration of how drugs can be released under sonothrombolytic conditions. While the amount of lipid shedding is significant for inertial cavitation, there remains concern that using this acoustic regime in the ischemic brain, might lead to dramatic intracerebral hemorrhages [81,82]. To illustrate the potential of drug-loaded microbubbles, Hua et al. [83], have successfully recanalized femoral arteries in rabbits by using rt-

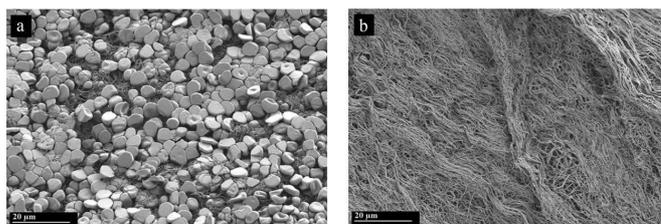


Figure 4. (a): Images of a control clot (without insonification nor microbubbles) after one hour in a plasma flow circuit (10 cm/s, tube of 1.6 mm inner diameter), the clot is full of red blood cells. (b): Images of a clot after one hour in a plasma flow circuit (10 cm/s, tube of 1.6 mm inner diameter) after ultrasound insonation at 500 KHz (Peak negative pressure of 500 KPa and duty cycle of 0.08%) in the presence of BR14® microbubbles (4×10^5 MB/min): No red blood cells are identified, the fibrin network is still present. A-B: Scale of 20 μ m. Adapted with permission from [79].

PA loaded microbubbles. In addition, these authors showed that microbubbles loaded with rt-PA at a concentration 15-times lower than the recommended dose, achieved similar rates of recanalization as non-loaded microbubbles coadministered with a normal rt-PA dose.

4.2.2. Clinical studies of sonothrombolysis

The broadly positive *in vitro* and *in vivo* results led to the initiation of clinical trials. However, two trials, MUST and CLOTBUST [84,85], have been interrupted after significant levels of intracerebral hemorrhages were recorded, without prognostic improvement at 3 months. Other clinical trials have been conducted, but the significant loss (60%) of subjects at 3 months [85] and/or absence of study randomization [86,87] were notable concerns. A more recent clinical trial, NOR-SASS [88], has been prematurely ended for lack of funding. Today, the safety of sonothrombolysis remains a concern and will require careful evaluation of preclinical studies using clinical end points (e.g. hemorrhage rates, volume of infarcted brain, and functional recovery), and well-defined protocols of microbubbles administration and US parameters employed. Finally, implementation of recent technologies such as MRI guidance [66] should increase the safety of sonothrombolysis as this would allow for adjustment of US treatment parameters to the skull on a personalized level.

5. US contrast imaging for therapeutic monitoring

A number of objectively measured and evaluated biomarkers are implicated in normal biological, pharmacologic responses to therapeutic intervention or pathogenic processes, including angiogenesis in tumor progression. Angiogenesis, the process by which tumors increase their blood and nutrients supplies, is an essential feature of tumor growth and invasion; and its continued expansion is thought to be associated with poor prognosis [89]. The goal of anti-angiogenic therapies is to interrupt tumor supplies by inhibiting vessel formation [90]. Unfortunately, the classical approach recommended for monitoring therapeutic response, response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) [91], have proved to be of limited value in assessing tumor response to anti-angiogenic therapies because early necrosis is often observed prior to any reduction in tumor size [92]. As a result, CEUS, an imaging modality based on vascularity assessment has been adopted for the early monitoring of tumor therapeutic efficacies.

CEUS has the advantage of being low-cost, nonionizing and presents a better tolerance compared to other imaging modalities such as CT or PET. Because microbubbles are incapable of extravasation from the vasculature, today CEUS is under evaluation as a tool for quantifying tumor perfusion before and after treatment. CEUS quantification involves the selection of an ROI bordering the lesion and plotting the US enhancement intensity in the ROI to obtain a time-intensity curve (TIC). The resultant TICs are then fitted to a mathematical model reflecting the kinetics of UCA tumor uptake [93]. Amplitude parameters of the TIC, for example, peak enhancement (PE), wash-in rate (WiR), wash-out rate (WoR), wash-in area under-the-curve (WiAUC), wash-out area under-the-curve (WoAUC), or total area under-the-curve (AUC), and temporal parameters,

for example, time-to-peak (TTP) or mean transit-time (mTT) are then analyzed, to assess blood volume or blood flow in the lesion. A similarly sized ROI, in the healthy tissue is usually employed as a background reference (Figure 5) [94].

A number of studies have investigated the utility of CEUS in monitoring treatment response to anti-angiogenic therapies. Williams et al. evaluated the impact of sunitinib on renal cell carcinomas [95] and reported a significant reduction of PE, WiAUC, and TTP after the first cycle of treatment. Lassau et al. assessed the efficacy of bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma [96]. The study showed significant correlation between a decrease in PE and progression-free survival, for tumor perfusion before treatment and 3 days after treatment. More recently, a large multicenter study reported the effects of several anti-angiogenic treatments on different types of tumors, comprising >2330 CEUS examinations from 539 patients [97]. The study demonstrated that the ratio of AUC at day 30 as compared to baseline (before treatment) of less than 0.6, corresponding to a decrease of >40% of AUC, is an indicator of lesions not responding to treatment. Together, these results support the development of a patient-specific adaptation of treatment regimens, which will allow early decision-making on the efficacy of anti-angiogenic treatment based on the evolution of CEUS quantification results [98]. However, additional investigations need to be undertaken to further improve the efficacy of CEUS quantification techniques. In particular, 3-dimensional acquisition would be more informative for the monitoring of whole lesion instead of single plane acquisitions. Post-processing tools, such as parametric imaging which allows displaying with a color map, a group of pixels according to a parameter's mean value at a given location, could provide an additional way of enhancing diagnostic confidence [99].

6. Conclusions

The exploitation of US modality for drug delivery and therapeutic guidance has evolved with the introduction of microbubbles as a tool for the therapeutic delivery of drugs and the realization that the selected acoustic behavior of microbubble can noninvasively drive clot lysis. The main advantages of US are its wide availability, portability, real-time character, ease-of-use, and low cost as compared to other imaging modalities. In particular, the use of real-time imaging can lead to novel insights and facilitate US-triggered drug delivery.

Currently available reports indicate that CEUS can play a major role in monitoring and evaluating response to anti-angiogenic therapies. Large multicenter studies carried out on different types of tumors in large cohorts of patients have demonstrated the correlation between quantitative parameters and response to therapy. These results support the development of a patient-specific adaptation of treatment regimens, which will allow early decision-making on the efficacy of anti-angiogenic treatment based on the evolution of CEUS quantification results

US and microbubbles can indeed induce the permeabilization of tumor barrier and potentiate the extravasation of chemotherapies and therapeutic antibodies into the targeted lesion. Today, a number of clinical studies have demonstrated

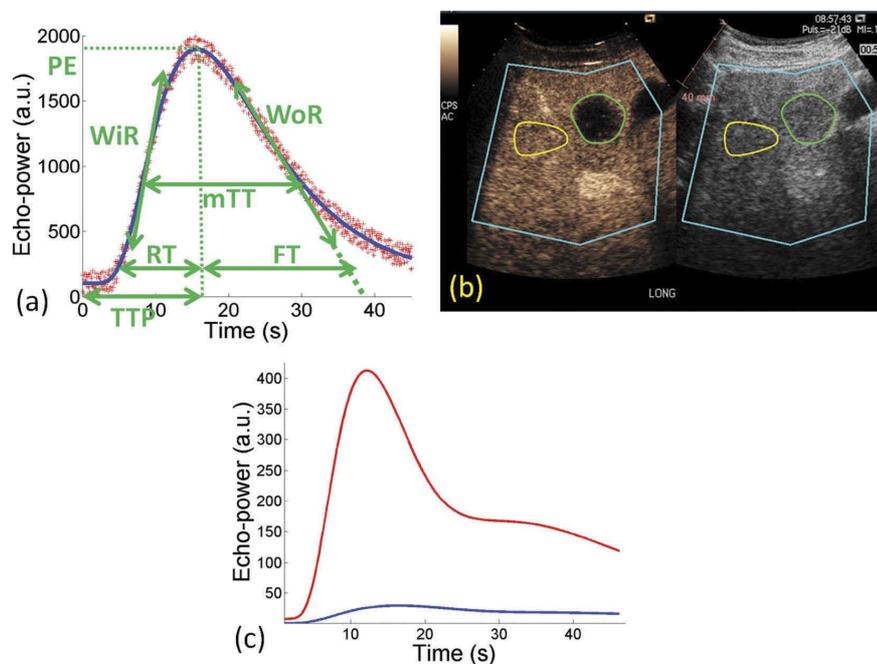


Figure 5. (a) Parameters extracted from a Time-Intensity Curve (TIC): Peak Enhancement (PE), Wash-in Rate (WiR), Wash-out Rate (WoR), Time-to Peak (TTP), Rise Time (RT), Fall Time (FT) and mean Transit Time (mTT). (b) B-mode and contrast-enhanced ultrasonography of the liver in late phase. Two ROIs are drawn: one outlining a metastasis (green) and one placed in the healthy parenchyma (yellow). (c) Two TICs before treatment (red) and two months after treatment (blue) of a metastasis from a responder patient. Amplitude parameters are shortened and temporal parameters are increased. More particularly, total Area Under the Curve (AUC) decreased of 87%. The analysis was carried out using Bracco software VueBox™. Full color available online.

the ability of sonoporation to induce enhanced uptake of chemotherapies for both glioblastoma and pancreatic cancer. Nevertheless, a number of evaluation and clinical validation issues need to be tackled including standardization of US parameters, selection of appropriate microbubbles, identification of optimal clinical indications and drugs before further translation to the clinic. In addition, there is evidence to show that the increased throughput of free radicals resulting from HIFU and inertial cavitation in the presence of some chemotherapeutic drugs carry sufficient capacity to weaken the therapeutic potency of certain drug molecules [100].

The ultimate goal is to realize image-guided/monitored drug delivery into the desired tissues within a clinical setting as demonstrated elsewhere [101] for other modalities. Various reports in this journal [102–104] closely relate to the present topic and interested readers are encouraged to examine these reports.

7. Expert opinion

UCAs can have a role in clinical decision-making. This is characterized by demonstrable success in a number of clinical indications aimed at vascular diagnosis and therapy in various organs. For example, CEUS has emerged as a new functional imaging approach for assessing tumor perfusion. Using this approach, it is now feasible to predict with accuracy and well in advance, the outcome of anti-angiogenic therapy using CEUS. This is a highly effective treatment monitoring approach

compared with current therapeutic evaluations [91]. Accordingly, the use of CEUS for the monitoring of anti-angiogenic treatment has been added to the clinical practice guidelines by both the European Federation of Societies for US in Medicine and Biology and World Federation for US in Medicine and Biology.

Beyond their exploitation for diagnosis, UCAs and US, today represent a new method of localized drug delivery. Recent research shows that under the action of US waves, microbubbles transiently perforate biological barriers (e.g. cell membrane, endothelial layer) thus leading to the uptake and enhanced accumulation of drugs in the targeted region. In this way, the bioavailability of therapeutic agents is site-specifically augmented only in the zone where US waves are focused with millimetric precision.

Significant progress has been made in the field of CEUS drug delivery. Whereas CEUS drug delivery has been demonstrated in proof-of-concept studies in various organs as well as clinical indications in a number of small animal models, only a few studies report on the evaluation and validation of this therapeutic strategy in large animals, with the majority focusing mainly on the opening of the BBB [105–109]. To facilitate CEUS drug delivery to the clinic, a number of questions need to be addressed such as: which organ should be targeted? Which drugs are suitable for sonoporation drug delivery? If cancer is the clinical target, which lesions (solid tumors or metastases) should be considered? Since microbubbles need to be localized within the target organ or zone for better drug

extravasation, should considerations concerning the perfusion of the target lesion take precedence? What US parameters (frequency, pressure/MI, and duty cycle) should be used to activate the microbubbles and induce drug uptake? A number of studies show that sonoporation efficiency is strongly correlated with the concentration of UCAs in the target zone, suggesting that UCA concentration is a crucial sonoporation parameter. Accordingly, what UCA concentrations should be used? Similarly, the appropriate method of UCA administration, that is, bolus injection or continuous infusion delivered intra-arterially or intravenously needs careful consideration. Similarly, the treatment schedule is of significant importance, since administration of UCAs and drugs should be performed in a prescribed manner and US insonation timing (duty cycle) should be synchronized to coincide with the arrival of elevated UCA concentrations. The type of UCAs employed is also of significant importance because UCA response to US activation depends on its physical properties. Pragmatically, it should be easier and faster to evaluate drug delivery using existing commercial agents, as that will facilitate quick translation to clinic. Whether US scanners operated in specific modes (such as Doppler mode) can deliver US sequences capable of inducing drug delivery; are just some of the questions that also need addressing for the effective translation of this therapeutic technology to the clinic.

Another essential aspect is the mechanism behind the sonoporation process. Despite the proof-of-concept achieved in preclinical studies, there is no consensus, neither with regard to the acoustic phenomena involved, nor the underlying US-induced permeabilization mechanism(s). Although an increasing amount of data on sonoporation now exist, several challenges still need addressing before bringing a number of US-based therapeutic strategies, including sonoporation and sonothrombolysis to clinical use. The main translational challenges include a clear understanding of the underlying mechanism(s) of permeabilization; and fully tested US protocols that will ensure precise, efficient, and localized drug delivery.

US is now experiencing a paradigm shift in both technology and applications. In addition to its intrinsic advantages of real time, portability and low cost; US is being intensively investigated as a drug delivery tool. The goal therefore is to realize image-guided and monitored drug delivery into the desired tissues. It is anticipated that the combined use of CEUS in therapy may eventually become even more important than its diagnostic use. Ultimately, image guidance, drug delivery, and the ability to monitor treatment response if successfully implemented on the same equipment, would be the perfect drug delivery system; providing combined ease-of-use, mobility, real time, and bedside availability. We anticipate that in the future, the combined use of US and microbubbles in therapy will be planned, applied, and monitored in a rapid sequence with high spatial and temporal resolutions. Moreover, this would alleviate the need for image coregistration since the imaging equipment would also be used to induce local therapy ensuring a perfect collocation. Finally, striking a balance between safety and efficacy will remain a key challenge for the successful clinical application of this methodology, which combines real-time imaging guidance with drug delivery and therapeutic monitoring.

Funding

This paper was not funded.

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

ORCID

Laurent Auboire  <http://orcid.org/0000-0002-7379-8506>

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

1. Moonen C, Lentacker I. (Theme Editors). Ultrasound assisted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;72:1–154.
2. Becher H, Burns PN. *Handbook of contrast echocardiography*, Springer, Berlin, Germany: Springer; 2000.
3. Simpson DH, Chin CT, Burns PN. Pulse inversion Doppler: a new method for detecting nonlinear echoes from microbubble contrast agents. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 1999;46:372–382.
4. Harvey CJ, Blomley MJ, Eckersley RJ, et al. Pulse-inversion mode imaging of liver specific microbubbles: improved detection of sub centimetre metastases. *Lancet.* 2000;355:807–808.
5. Shapiro G, Wong AW, Bez M, et al. Multi-parameter evaluation of in vivo gene delivery using ultrasound-guided, microbubble-enhanced sonoporation. *J Control Release.* 2016;223:157–164.
6. Wang S, Olumolade O, Sun T, et al. Non-invasive, neuron-specific gene therapy can be facilitated by focused ultrasound and recombinant adeno-associated virus. *Gene Ther.* 2015;22:104–110.
7. Schneider M. Characteristics of SonoVue trade mark. *Echocardiography.* 1999;16:743–746.
8. Lindner JR. Microbubbles in medical imaging: current applications and future directions. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:527–533.
9. Klivanov AL. Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agents for ultrasound imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999;37:139–157.
10. Yeh JSM, Sennoga CA, McConnell E, et al. A targeting microbubble for ultrasound molecular imaging. *PLoS One.* 2015;10:e0129681.
11. Escoffre J, Mannaris C, Geers B, et al. Doxorubicin liposome-loaded microbubbles for contrast imaging and ultrasound-triggered drug delivery. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2013;60:78–87.
12. Deckers R, Rome C, Moonen CTW. The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *J Magn Reson Imaging.* 2008;27:400–409.
13. Blomley MJ, Albrecht T, Cosgrove DO, et al. Improved imaging of liver metastases with stimulated acoustic emission in the late phase of enhancement with the US contrast agent SH U 508A: early experience. *Radiology.* 1999;210:409–416.

14. Apfel RE, Holland CK. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 1991;17:179–185.
15. Alter J, Sennoga CA, Lopes DM, et al. Microbubble stability is a major determinant of the efficiency of ultrasound and microbubble mediated in vivo gene transfer. *Ultrasound Med Biol.* 2009;35:976–984.
16. Shohet RV, Chen S, Zhou YT, et al. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation.* 2000;101:2554–2556.
17. Schumann PA, Christiansen JP, Quigley RM, et al. Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb/IIIa receptors of platelet thrombi. *Invest Radiol.* 2002;37:587–593.
18. Wu W, Wang Y, Shen S, et al. In vivo ultrasound molecular imaging of inflammatory thrombosis in arteries with cyclic Arg-Gly-Asp-modified microbubbles targeted to glycoprotein IIb/IIIa. *Invest Radiol.* 2013;48:803–812.
19. Caskey CF, Hu X, Ferrara KW. Leveraging the power of ultrasound for therapeutic design and optimization. *J Control Release.* 2011 Dec 20;156(3):297–306.
20. Correas J-M, Bridal L, Lesavre A, et al. Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts. *Eur Radiol.* 2001;11:1316–1328.
21. Bartolotta TV, Midiri M, Galia M, et al. Characterization of benign hepatic tumors arising in fatty liver with SonoVue and pulse inversion US. *Abdom Imaging.* 2007;32:84–91.
22. Patel DN, Bloch SH, Dayton PA, et al. Acoustic signatures of sub-micron contrast agents. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2004 Mar;51(3):293–301.
23. Rasmussen JH, Du Y, Jensen JA. Third harmonic imaging using pulse inversion. *IEEE Int Ultrason Symp.* 2011;2001:2269–2272.
24. Wilson SR, Burns PN. Liver mass evaluation with ultrasound: the impact of microbubble contrast agents and pulse inversion imaging. *Semin Liver Dis.* 2001;21:147–160.
25. Mor-Avi V, Caiani E, Collins K, et al. Quantitative analysis of myocardial perfusion and regional left ventricular function from contrast-enhanced power modulation images. *Comput Cardiol.* 2001;28:97–100.
26. Brock-Fisher GA, Poland MD, Rafter PG. Means for increasing sensitivity in non-linear ultrasound imaging systems. US5577505A (1996)
27. Eckersley RJ, Chin CT, Burns PN. Optimizing phase and amplitude modulation schemes for imaging microbubble contrast agents at low acoustic power. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31:213–219.
28. Haider B, Chiao RY. Higher order nonlinear ultrasonic imaging. *IEEE Ultrason Symp Proceedings Int Symp.* 1999;1999:1527–1531.
29. Phillips PJ. Contrast pulse sequences (CPS): imaging nonlinear microbubbles. *IEEE Ultrason Symp Proceedings Int Symp.* 2001;2001:1739–1745.
30. Tiemann K, Lohmeier S, Kuntz S, et al. Real-time contrast echo assessment of myocardial perfusion at low emission power: first experimental and clinical results using power pulse inversion imaging. *Echocardiography.* 1999;16:799–809.
31. Lammertink BHA, Bos C, Deckers R, et al. Sonochemotherapy: from bench to bedside. *Front Pharmacol.* 2015;6:138.
32. Novell A, Sennoga CA, Escoffre JM, et al. Evaluation of chirp reversal power modulation sequence for contrast agent imaging. *Phys Med Biol.* 2014;59:5101–5117.
33. Forsberg F, Piccoli CW, Merton DA, et al. Breast lesions: imaging with contrast-enhanced subharmonic US-initial experience. *Radiology.* 2007;244:718–726.
34. Chomas JE, Dayton P, May D, et al. Non-destructive subharmonic imaging. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2002;49:883–892.
35. Gessner RC, Frederick CB, Foster FS, et al. Acoustic angiography: a new imaging modality for assessing microvasculature architecture. *Int J Biomed Imaging.* 2013;2013:1–9.
36. Bouakaz A, Frigstad S, Ten CFJ, et al. Super harmonic imaging: a new imaging technique for improved contrast detection. *Ultrasound Med Biol.* 2002;28:59–68.
37. Fan C-H, Ting C-Y, Liu H-L, et al. Antiangiogenic-targeting drug-loaded microbubbles combined with focused ultrasound for glioma treatment. *Biomaterials.* 2013;34:2142–2155.
38. Burke CW, Alexander E, Timbie K, et al. Ultrasound-activated agents comprised of 5FU-bearing nanoparticles bonded to microbubbles inhibit solid tumour growth and improve survival. *Mol Ther.* 2014;22:321–328.
39. Sasaki N, Kudo N, Nakamura K, et al. Ultrasound image-guided therapy enhances antitumor effect of cisplatin. *J Med Ultrason.* 2013;41:11–21.
40. Shpak O, Verweij M, De Jong N, et al. Droplets, bubbles and ultrasound interactions. *Adv Exp Med Biol.* 2016;880:157–174.
41. Doinikov AA, Bouakaz A. Acoustic microstreaming around an encapsulated particle. *J Acoust Soc Am.* 2010;127:1218–1227.
42. Postema M, van Wamel A, Ten Cate FJ, et al. High-speed photography during ultrasound illustrates potential therapeutic applications of microbubbles. *Med Phys.* 2005;32:3707–3711.
43. Kooiman K, Emmer M, Foppen-Harteveld M, et al. Increasing the endothelial layer permeability through ultrasound-activated microbubbles. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2010;57:29–32.
44. Derieppe M, Rojek K, Escoffre J-M, et al. Recruitment of endocytosis in sonopermeabilization-mediated drug delivery: a real-time study. *Phys Biol.* 2015;12:046010.
45. Zeghimi A, Escoffre J-M, Bouakaz A. Role of endocytosis in sonoporation-mediated membrane permeabilization and uptake of small molecules: a electron microscopy study. *Phys Biol.* 2015;12:066007.
46. Meijering BDM, Juffermans LJM, van Wamel A, et al. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circ Res.* 2009;104:679–687.
47. Tran TA, Roger S, Le Guennec JY, et al. Effect of ultrasound-activated microbubbles on the cell electrophysiological properties. *Ultrasound Med Biol.* 2007;33:158–163.
48. Bettinger T, Tranquart F. Design of microbubbles for gene/drug delivery. *Adv Exp Med Biol.* 2016;880:191–204.
49. Pu C, Chang S, Sun J, et al. Ultrasound-mediated destruction of LHRHa-targeted and paclitaxel-loaded lipid microbubbles for the treatment of intraperitoneal ovarian cancer xenografts. *Mol Pharm.* 2014;11:49–58.
50. Sirsi SR, Hernandez SL, Zielinski L, et al. Polyplex-microbubble hybrids for ultrasound-guided plasmid DNA delivery to solid tumours. *J Control Release.* 2012;157:224–234.
51. Matsuo M, Yamaguchi K, Feril LB, et al. Synergistic inhibition of malignant melanoma proliferation by melphalan combined with ultrasound and microbubbles. *Ultrason Sonochem.* 2011;18:1218–1224.
52. Song J, Chappell JC, Qi M, et al. Influence of injection site, microvascular pressure and ultrasound variables on microbubble-mediated delivery of microspheres to muscle. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:726–731.
53. Tzu-Yin W, Wilson KE, Machtaler S, et al. Ultrasound and microbubble guided drug delivery: mechanistic understanding and clinical implications. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14:743–752.
54. Aryal M, Vykhodtseva N, Zhang Y-Z, et al. Multiple sessions of liposomal doxorubicin delivery via focused ultrasound mediated blood-brain barrier disruption: a safety study. *J Control Release.* 2015;204:60–69.
55. Escoffre J-M, Novell A, Serrière S, et al. Irinotecan delivery by microbubble-assisted ultrasound: in vitro validation and a pilot preclinical study. *Mol Pharm.* 2013;10:2667–2675.
- **In vivo preclinical study demonstrating that acoustically mediated irinotecan delivery lead to significant decreases in growth and perfusion of glioblastoma tumors.**
56. Yan F, Li L, Deng Z, et al. Paclitaxel-liposome-microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers. *J Control Release.* 2013;166:246–255.
57. Xie A, Belcik T, Qi Y, et al. Ultrasound-mediated vascular gene transfection by cavitation of endothelial-targeted cationic microbubbles. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2012;5:1253–1262.

58. Escoffre J-M, Deckers R, Bos C, et al. Bubble-assisted ultrasound: application in immunotherapy and vaccination. *Adv Exp Med Biol.* 2016;880:243–261.
59. Jordão JF, Ayala-Grosso CA, Markham K, et al. Antibodies targeted to the brain with image-guided focused ultrasound reduces amyloid-beta plaque load in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2010;5:e10549.
- **Using microbubble-assisted ultrasound, the intracerebral delivery of therapeutic antibody, BAM-10, reduces the β -amyloid plaque pathology in transgenic TgCRND8 mice.**
60. Raymond SB, Treat LH, Dewey JD, et al. Ultrasound enhanced delivery of molecular imaging and therapeutic agents in Alzheimer's disease mouse models. *PLoS One.* 2008;3:e2175.
61. McDannold N, Arvantis CD, Vykhodtseva N, et al. Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer Res.* 2012;72:3652–3663.
62. Kobus T, Vykhodtseva N, Pilatou M, et al. Safety validation of repeated blood-brain barrier disruption using focused ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2016;42:481–492.
63. Downs ME, Buch A, Sierra C, et al. Long-term safety of repeated blood-brain barrier opening via focused ultrasound with microbubbles in non-human primates performing a cognitive task. *PLoS One.* 2015;10:e0125911.
64. Leong-Poi H. Contrast ultrasound and targeted microbubbles: diagnostic and therapeutic applications in progressive diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 2012;32:494–504.
65. Castle J, Feinstein SB. Drug and gene delivery using sonoporation for cardiovascular disease. *Adv Exp Med Biol.* 2016;880:331–338.
66. Dixon AJ, Kilroy JP, Dhanaliwala AH, et al. Microbubble-mediated intravascular ultrasound imaging and therapy. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2015;62:1674–1685.
67. Wang TY, Choe JW, Pu K, et al. Ultrasound-guided delivery of microRNA loaded nanoparticles into cancer. *J Control Release.* 2015;203:99–108.
68. Down ME, Buch A, Karakatsani ME, et al. Blood-brain barrier opening in behaving non-human primates via focused ultrasound with systemically administered microbubbles. *Sci Rep.* 2015;5:15076.
69. Wu J, Xie F, Kumar T, et al. Improved sonothrombolysis from a modified diagnostic transducer delivering impulses containing a longer pulse duration. *Ultrasound Med Biol.* 2014;40:1545–1553.
70. Kotopoulos S, Dimceviski G, Helge Gilja O, et al. Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: a clinical case study. *Med Phys.* 2013;40:072902.
71. Kutty S, Xie F, Gao S, et al. Sonothrombolysis of intra-catheter aged venous thrombi using microbubble enhancement and guided three-dimensional ultrasound pulses. *J Am Soc Echocardiogr.* 2010 Sep;23(9):1001–1006.
72. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1581–1588.
73. Kutty S, Wu J, Hammel JM, et al. Microbubble mediated thrombus dissolution with diagnostic ultrasound for the treatment of chronic venous thrombi. *PLoS One.* 2012;7(12):e51453.
74. Tachibana K, Tachibana S. Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation.* 1995;92:1148–1150.
75. Lauer CG, Burge R, Tang DB, et al. Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. *Circulation.* 1992;86:1257–1264.
76. Datta S, Coussios CC, Ammi AY, et al. Ultrasound-enhanced thrombolysis using definity as a cavitation nucleation agent. *Ultrasound Med Biol.* 2008;34:1421–1433.
77. Rooney JA. Hemolysis near an ultrasonically pulsating gas bubble. *Science.* 1970;169:869–871.
78. Petit B, Bohren Y, Gaud E, et al. Sonothrombolysis: the contribution of stable and inertial cavitation to clot lysis. *Ultrasound Med Biol.* 2015;41:1402–1410.
79. Auboire L, Tranquart F, Ossant F, et al. Impact of sonothrombolysis on in vitro blood clot: pictographic validation with electron microscopy. *Ultraschall Med.* 2015. [cited 2015 Sep 2]. DOI:10.1055/s-0035-1553322
80. Luan Y, Lajoinie G, Gelderblom E, et al. Lipid shedding from single oscillating microbubbles. *Ultrasound Med Biol.* 2014;40:1834–1846.
81. Miao H, Gracewski SM, Dalecki D. Ultrasonic excitation of a bubble inside a deformable tube: implications for ultrasonically induced hemorrhage. *J Acoust Soc Am.* 2008;124:2374–2384.
82. Skyba DM, Price RJ, Linka AZ, et al. Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue. *Circulation.* 1998;98:290–293.
83. Hua X, Zhou L, Liu P, et al. In vivo thrombolysis with targeted microbubbles loading tissue plasminogen activator in a rabbit femoral artery thrombus model. *J Thromb Thrombolysis.* 2014;38:57–64.
84. Larrue V, Viguier A, Arnaud C, et al. Transcranial ultrasound combined with intravenous microbubbles and tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: a randomized controlled study. *Stroke.* 2007;38:472.
85. Alexandrov AV, Mikulik R, Ribo M, et al. A pilot randomized clinical safety study of sonothrombolysis augmentation with ultrasound-activated perflutren-lipid microspheres for acute ischemic stroke. *Stroke.* 2008;39:1464–1469.
86. Perren F, Loulidi J, Poglia D, et al. Microbubble potentiated transcranial duplex ultrasound enhances IV thrombolysis in acute stroke. *J Thromb Thrombolysis.* 2008;25:219–223.
87. Nicoli FJL, Squarcioni C, Grimaud L, et al. Microbubble administration during prolonged 2 MHz TCD improves recanalization and long-term functional outcome in acute stroke patients treated with iv thrombolysis for isolated mca m1 occlusion. *Cerebro Vasc Dis.* 2010;29:Q39.
88. Nacu A, Kvistad CE, Logallo N, et al. A pragmatic approach to sonothrombolysis in acute ischaemic stroke: the Norwegian randomised controlled sonothrombolysis in acute stroke study (NOR-SASS). *BMC Neurol.* 2015;15:110–122.
89. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285:1182–1186.
90. Lamuraglia M, Bridal SL, Santinet M, et al. Clinical relevance of contrast-enhanced ultrasound in monitoring anti-angiogenic therapy of cancer: current status and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010;73:202–212.
91. Therasse P, Arbutck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European organization for research and treatment of cancer, national cancer institute of the United States, national cancer institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:205–216.
92. Smith AD, Lieber ML, Shah SN, et al. Assessing tumor response and detecting recurrence in metastatic renal cell carcinoma on targeted therapy: importance of size and attenuation on contrast-enhanced CT. *AJR Am J Roentgenol.* 2010;194:157–165.
93. Dietrich CF, Averkiou MA, Correas JM, et al. An EFSUMB introduction into Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound (DCE-US) for quantification of tumour perfusion. *Ultraschall Med.* 2012;33:344–351.
94. Tranquart F, Mercier L, Frinking P, et al. Perfusion quantification in contrast-enhanced ultrasound (CEUS)-ready for research projects and routine clinical use. *Ultraschall Med.* 2012;33:531–8.
95. Williams R, Hudson JM, Lloyd BA, et al. Dynamic microbubble contrast-enhanced US to measure tumor response to targeted therapy: a proposed clinical protocol with results from renal cell carcinoma patients receiving antiangiogenic therapy. *Radiology.* 2011;260:581–590.
96. Lassau N, Koscielny S, Chami L, et al. Advanced hepatocellular carcinoma: early evaluation of response to bevacizumab therapy at dynamic contrast-enhanced US with quantification-preliminary results. *Radiology.* 2011;258:291–300.
97. Lassau N, Bonastre J, Kind M, et al. Validation of dynamic contrast-enhanced ultrasound in predicting outcomes of antiangiogenic therapy for solid tumors: the French multicenter support for innovative and expensive techniques study. *Invest Radiol.* 2014;49:794–800.
- **This study comprises a large population cohort with many tumors treated using different anti-angiogenic indications, followed by CEUS.**

98. Piscaglia F, Nolsøe C, Dietrich C, et al. The EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical practice of Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS): update 2011 on non-hepatic applications. *Ultraschall Med.* **2012**;33:33–59.
99. Anaye A, Perrenoud G, Rognin N. Differentiation of focal liver lesions: usefulness of parametric imaging with contrast-enhanced US. *Radiology.* **2011**;261:300–310.
100. Yu T, Zhang Y, He H, et al. Anticancer potency of cytotoxic drugs after exposure to high-intensity focused ultrasound in the presence of microbubbles and hematoporphyrin. *Mol Pharm.* **2011**;8:1408–1415.
101. Ojha T, Rizzo L, Storm G, et al. Image-guided drug delivery: pre-clinical applications and clinical translation. *Expert Opin Drug Deliv.* **2015**;12:1203–1207.
102. Aw MS, Paniwnyk L, Losic D. The progressive role of acoustic cavitation for non-invasive therapies, contrast imaging and blood-tumor permeability enhancement. *Expert Opin Drug Deliv.* **2016**;13:1383–1396.
103. Grundy M, Coussios C, Carlisle R. Advances in systemic delivery of anti-cancer agents for the treatment of metastatic cancer. *Expert Opin Drug Deliv.* **2016**;13:999–1013.
104. Goins B, Phillips WT, Bao A. Strategies for improving the intratumoral distribution of liposomal drugs in cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv.* **2016**;13:873–889.
105. Liu HL, Jan CK, Chu PC, et al. Design and experimental evaluation of a 256-channel dual-frequency ultrasound phased-array system for transcranial blood-brain barrier opening and brain drug delivery. *IEEE Trans Biomed Eng.* **2014**;61:1350–1360.
106. Shih CP, Chen HC, Chen HK, et al. Ultrasound-aided microbubbles facilitate the delivery of drugs to the inner ear via the round window membrane. *J Control Release.* **2013**;167:167–174.
107. Xie F, Boska MD, Lof J, et al. Effects of transcranial ultrasound and intravenous microbubbles on blood brain barrier permeability in a large animal model. *Ultrasound Med Biol.* **2008**;34:2028–2034.
108. Horodyckid C, Canney M, Vignot A, et al. A safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device: a multiparametric study in a primate model. *J Neurosurg.* **2016**;10:1–11.
109. Wang F, Cheng Y, Mei J, et al. Focused ultrasound microbubble destruction-mediated changes in blood-brain barrier permeability assessed by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Ultrasound Med.* **2009**;28(11):1501–1509.

Annexe B

B.1 Le système Verasonics

Durant notre étude, nous avons été amené à utiliser l'échographe Verasonics Vantage 256 (Verasonics Inc., Kirkland, États-Unis). Il s'agit d'une plateforme échographique ouverte destinée à la recherche, permettant la mise en place de protocoles d'imagerie spécifiques, sur des sondes de recherche, sans les sur-couches cosmétiques proposées par les échographes cliniques conventionnels. En effet, et contrairement à ces derniers, le Vantage autorise l'accès aux données brutes (signaux radiofréquences) recueillis par les éléments de la sonde. L'interface homme-machine est réalisée par l'intermédiaire du logiciel Matlab et son environnement de développement. La déclinaison matérielle du Vantage présent au laboratoire permet l'utilisation de 256 éléments en émission/réception, dans une plage fréquentielle comprise entre 500 kHz et 20 MHz. La fréquence d'échantillonnage maximale proposée par le système est de 62.5 MHz, et est par défaut fixée à 4 points par longueur d'onde correspondant à la fréquence centrale de la sonde employée. L'acquisition des images échographiques a été effectué à partir d'une sonde fournie par le constructeur, dénommée L11-4v (Verasonics Inc., Kirkland, États-Unis). Il s'agit d'une sonde linéaire composée de 128 éléments, avec une fréquence centrale à 6.25 MHz. Comme son nom l'indique, sa bande passante s'étend de 4 MHz à 11 MHz.

B.2 Stratégie de formation de faisceaux

L'acquisition de l'image échographique s'effectue à partir d'une formation de faisceau conventionnelle en balayage linéaire. La configuration d'émission est composée d'une ouverture non apodisée de 21 éléments. Le signal d'excitation consiste en un train d'onde de 5 cycles de sinusoïdes à la fréquence de 6 MHz, dans le but d'exciter les agents avec un signal en bande étroite. Cette fréquence a été choisie car elle correspond à la fréquence centrale de la sonde. En revanche, il faut garder à l'esprit lors de l'analyse des résultats obtenus qu'il ne s'agit pas forcément de la fréquence de travail optimale des agents de contraste employés. Le faisceau est focalisé à une profondeur de 20 mm, au niveau du flux de la solution de microbulles. La reconstruction est de type retards et sommation (*delay and sum*) à partir d'une ouverture adaptatrice permettant de conserver le *f-number* constant sur toute la profondeur, et centrée sur l'ouverture d'émission. L'ouverture en réception est

B.2. STRATÉGIE DE FORMATION DE FAISCEAUX

potentiellement tronquée sur les bords de la sonde pour respecter ce dernier critère. Le signal RF est traité par un filtre passe-bas puis un filtre passe-bande. Les paramètres de ces filtres sont programmables par l'utilisateur en fonction des besoins de la mesure. Le filtre passe-bas prévient de la dégradation du signal en s'assurant que les informations sont en dessous de la fréquence de Nyquist. Le filtre passe-bande permet quant à lui de sélectionner le spectre autour de la composante sous-harmonique. Les caractéristiques des deux filtres utilisés pour notre imagerie sont présentées dans la figure B.1.

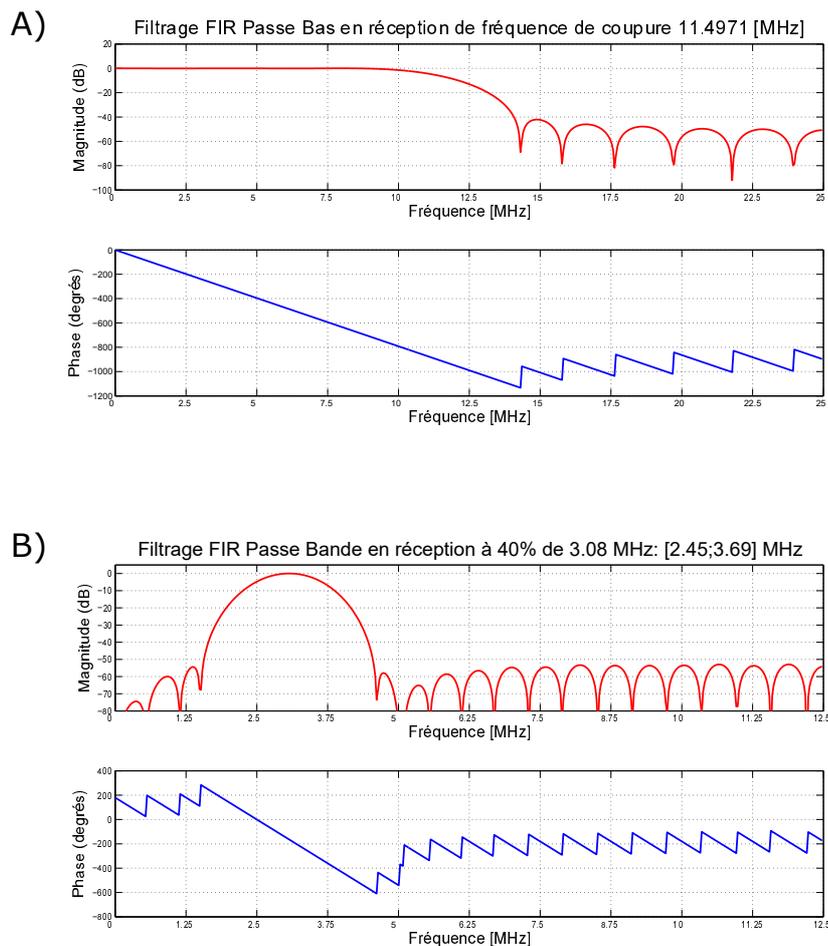


FIGURE B.1 – Représentation fréquentielle des filtres d'acquisition. A) Filtre FIR passe-bas
B) Filtre FIR passe-bande.

B.2.0.1 Mesure préliminaire de calibration en pression

Il est nécessaire dans un premier temps de déterminer l'ouverture en émission qui permettra de réaliser l'imagerie échographique tout en s'assurant de préserver l'intégrité des microbulles durant le processus d'insonification. Ceci peut se déterminer à partir de l'indice mécanique qui, comme nous l'avons déjà mentionné dans la partie 1.3.0.1, se doit d'être compris entre 0.2 et 0.5. Ceci a été réalisé à partir d'une mesure du signal rayonné par

la sonde L11-4v à la focale, à l'aide d'un hydrophone (0.2 mm, Precision Acoustics, Dorchester, Grande-Bretagne). La pression de raréfaction de crête, et par conséquent l'indice mécanique, ont été mesurés pour différentes ouvertures en émission.

À l'issue de cette mesure, une ouverture de 21 éléments a été sélectionnée. Cette taille d'ouverture semblait représenter un bon compromis, permettant d'avoir un niveau de pression conséquent tout en gardant une marge de sécurité suffisante vis-à-vis de l'indice mécanique. En effet, on peut constater sur la figure B.2 que cette taille d'ouverture permet d'obtenir une pression de raréfaction de crête de l'ordre de 800 kPa, ce qui représente à la fréquence de travail utilisée un indice mécanique de 0.3. Nous conservons donc une certaine marge de sécurité pour ne pas risquer de détériorer les agents de contraste. Celle-ci est par ailleurs entièrement justifiée par le fait que le signal mesuré est loin d'être parfaitement linéaire. Nous constatons sans difficulté sur la figure B.2 b) un niveau d'harmoniques important, très probablement dû à la propagation non linéaire dans l'eau, bien que d'autres facteurs ne sont pas à exclure. La présence d'harmoniques complexifie significativement la détermination de l'indice mécanique, ce qui justifie donc pleinement la conservation d'une certaine marge de sécurité.

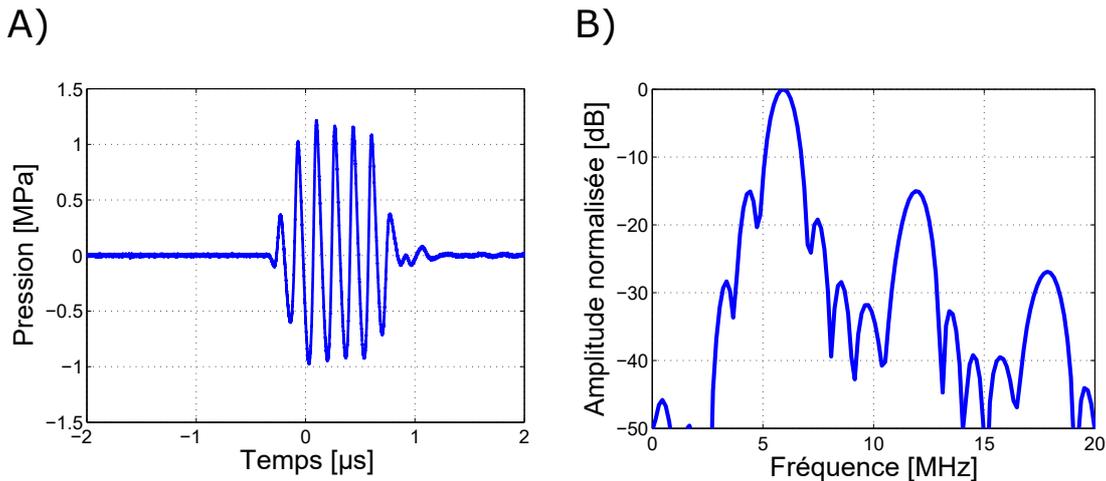


FIGURE B.2 – Caractérisation à l'hydrophone du signal mesuré à la focale de la sonde L11-4v avec un tir de 21 éléments. A) signal temporel et B) Spectre correspondant.

B.2.0.2 Image de référence du fantôme

Afin de valider la stratégie de formation de faisceau et avoir une première image de référence, le fantôme a été imagé une première fois en imagerie conventionnelle, c'est-à-dire sans filtrage d'une quelconque composante harmonique. Le résultat, comparé avec un schéma décrivant l'organisation du fantôme, est présenté en figure B.3. Nous observons sans difficulté les parois qui définissent le conduit simulant un vaisseau sanguin de par leur caractère fortement échogène. Le *speckle*, signature du gel constituant le fantôme, est visible de part et d'autre du conduit. Quelques échos de répétition sont visibles aux plus fortes profondeurs, mais facilement identifiables ce qui ne devrait pas entraver la lecture des acquisitions à venir.

B.2. STRATÉGIE DE FORMATION DE FAISCEAUX

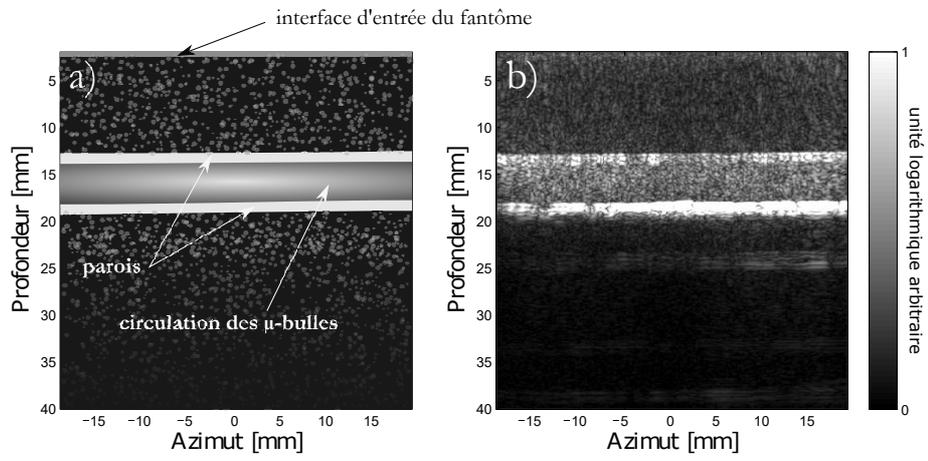


FIGURE B.3 – a) Plan du fantôme vasculaire b) Image échographique de référence.

Bibliographie

- [1] K. Sarkar, A. Katiyar, and P. Jain, “Growth and Dissolution of an Encapsulated Contrast Microbubble : Effects of Encapsulation Permeability,” *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 35, pp. 1385–1396, aug 2009.
- [2] C. A. Sennoga, E. Kanbar, L. Auboire, P.-A. Dujardin, D. Fouan, J.-M. Escoffre, and A. Bouakaz, “Microbubble-mediated ultrasound drug-delivery and therapeutic monitoring,” *Expert Opinion on Drug Delivery*, pp. 1–13, dec 2016.
- [3] H. Shekhar, I. Awuor, K. Thomas, J. J. Rychak, and M. M. Doyley, “The Delayed Onset of Subharmonic and Ultraharmonic Emissions from a Phospholipid-Shelled Microbubble Contrast Agent,” *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 40, pp. 727–738, apr 2014.
- [4] K. Kooiman, T. van Rooij, B. Qin, F. Mastik, H. J. Vos, M. Versluis, A. L. Klibanov, N. de Jong, F. S. Villanueva, and X. Chen, “Focal areas of increased lipid concentration on the coating of microbubbles during short tone-burst ultrasound insonification,” *PLOS ONE*, vol. 12, jul 2017.
- [5] C. T. Chin, C. Lancée, J. Borsboom, F. Mastik, M. E. Frijlink, N. de Jong, M. Versluis, and D. Lohse, “Brandaris 128 : A digital 25 million frames per second camera with 128 highly sensitive frames,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 74, pp. 5026–5034, dec 2003.
- [6] F. Forsberg, C. W. Piccoli, D. A. Merton, J. J. Palazzo, and A. L. Hall, “Breast Lesions : Imaging with Contrast-enhanced Subharmonic US—Initial Experience,” *Radiology*, vol. 244, pp. 718–726, sep 2007.
- [7] R. Esche, “Investigations on oscillating cavities in liquids,” *Acustica 2*, pp. 208–218, 1952.
- [8] A. Prosperetti, “Nonlinear oscillations of gas bubbles in liquids : steady state solutions,” *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 56, pp. 878–885, sep 1974.
- [9] J. Ophir and K. J. Parker, “Contrast agents in diagnostic ultrasound,” *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 15, no. 4, pp. 319–333, 1989.
- [10] E. Stride and N. Saffari, “Microbubble ultrasound contrast agents : A review,” *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H : Journal of Engineering in Medicine*, vol. 217, pp. 429–447, jun 2003.
- [11] R. Gramiak and P. M. Shah, “Echocardiography of the Aortic Root,” *Investigative Radiology*, vol. 3, pp. 356–366, sep 1968.

- [12] S. Campbell, T. H. Bourne, S. L. Tan, and W. P. Collins, "Hysterosalpingo contrast sonography (HyCoSy) and its future role within the investigation of infertility in Europe," *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, vol. 4, pp. 245–253, may 1994.
- [13] N. Sponheim, L. Hoff, A. Waaler, B. Muan, H. Morris, S. Holm, M. Myrum, N. De Jong, and T. Skotland, "Albunex-a new ultrasound contrast agent," in *International Conference on Acoustic Sensing and Imaging.*, pp. 103–108, 1993.
- [14] M. Uggowitz, C. Kugler, R. Gröll, H. J. Mischinger, R. Stacher, P. Fickert, and A. Weiglein, "Sonographic evaluation of focal nodular hyperplasias (FNH) of the liver with a transpulmonary galactose-based contrast agent (Levovist).," *The British Journal of Radiology*, vol. 71, pp. 1026–1032, oct 1998.
- [15] B. B. Goldberg, J.-B. Liu, and F. Forsberg, "Ultrasound contrast agents : A review," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 20, pp. 319–333, jan 1994.
- [16] J.-M. Gorce, M. Arditi, and M. Schneider, "Influence of Bubble Size Distribution on the Echogenicity of Ultrasound Contrast Agents," *Investigative Radiology*, vol. 35, pp. 661–671, nov 2000.
- [17] D. W. Kitzman, M. E. Goldman, L. D. Gillam, J. L. Cohen, G. P. Aurigemma, and J. S. Gottdiener, "Efficacy and safety of the novel ultrasound contrast agent perflutren (definity) in patients with suboptimal baseline left ventricular echocardiographic images," *The American Journal of Cardiology*, vol. 86, pp. 669–674, sep 2000.
- [18] P. C. Sontum, "Physicochemical Characteristics of Sonazoid, A New Contrast Agent for Ultrasound Imaging," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 34, pp. 824–833, may 2008.
- [19] A. Klibanov, "Ultrasound molecular imaging with targeted microbubble contrast agents," *Journal of Nuclear Cardiology*, vol. 14, pp. 876–884, nov 2007.
- [20] S. Hernot and A. L. Klibanov, "Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, pp. 1153–1166, jun 2008.
- [21] A. L. Klibanov, "Ligand-Carrying Gas-Filled Microbubbles : Ultrasound Contrast Agents for Targeted Molecular Imaging," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 16, pp. 9–17, jan 2005.
- [22] G. M. Lanza, K. D. Wallace, M. J. Scott, W. P. Cacheris, D. R. Abendschein, D. H. Christy, A. M. Sharkey, J. G. Miller, P. J. Gaffney, and S. A. Wickline, "A Novel Site-Targeted Ultrasonic Contrast Agent With Broad Biomedical Application," *Circulation*, vol. 94, pp. 3334–3340, dec 1996.
- [23] M. R. Böhmer, A. L. Klibanov, K. Tiemann, C. S. Hall, H. Gruell, and O. C. Steinbach, "Ultrasound triggered image-guided drug delivery," *European Journal of Radiology*, vol. 70, pp. 242–253, may 2009.
- [24] K. Ferrara, R. Pollard, and M. Borden, "Ultrasound Microbubble Contrast Agents : Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 9, pp. 415–447, aug 2007.
- [25] J. Escoffre, C. Mannaris, B. Geers, A. Novell, I. Lentacker, M. Averkiou, and A. Bouakaz, "Doxorubicin liposome-loaded microbubbles for contrast imaging and ultrasound-triggered drug delivery," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 60, jan 2013.

- [26] M. A. Borden, C. F. Caskey, E. Little, R. J. Gillies, and K. W. Ferrara, "DNA and Polylysine Adsorption and Multilayer Construction onto Cationic Lipid-Coated Microbubbles," *Langmuir*, vol. 23, pp. 9401–9408, aug 2007.
- [27] J. J. Rychak and A. L. Klibanov, "Nucleic acid delivery with microbubbles and ultrasound," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 72, pp. 82–93, jun 2014.
- [28] A. L. Klibanov, "Microbubble contrast agents : targeted ultrasound imaging and ultrasound-assisted drug-delivery applications," *Investigative Radiology*, vol. 41, pp. 354–362, mar 2006.
- [29] S. Ibsen, Schutt, and Esener, "Microbubble-mediated ultrasound therapy : a review of its potential in cancer treatment," *Drug Design, Development and Therapy*, p. 375, may 2013.
- [30] S. Meairs, M. Daffertshofer, W. Neff, C. Eschenfelder, and M. Hennerici, "Pulse-inversion contrast harmonic imaging : ultrasonographic assessment of cerebral perfusion.," *Lancet*, vol. 355, pp. 550–551, 2000.
- [31] D. E. Goertz, M. E. Frijlink, R. Krams, N. de Jong, and a. F. W. van der Steen, "Vasa vasorum and molecular imaging of atherosclerotic plaques using nonlinear contrast intravascular ultrasound.," *Neth Heart J ;*, vol. 15, no. 2, pp. 77–80, 2007.
- [32] C. Nicolau, V. Catalá, and C. Brú, "Characterization of focal liver lesions with contrast-enhanced ultrasound," *European Radiology*, vol. 13, pp. N70–N78, nov 2003.
- [33] E. Quaia, F. Calliada, M. Bertolotto, S. Rossi, L. Garioni, L. Rosa, and R. Pozzi-Mucelli, "Characterization of Focal Liver Lesions with Contrast-specific US Modes and a Sulfur Hexafluoride-filled Microbubble Contrast Agent : Diagnostic Performance and Confidence," *Radiology*, vol. 232, pp. 420–430, aug 2004.
- [34] S. Kondo, K. Takagi, M. Nishida, T. Iwai, Y. Kudo, K. Ogawa, T. Kamiyama, H. Shibuya, K. Kahata, and C. Shimizu, "Computer-Aided Diagnosis of Focal Liver Lesions Using Contrast-Enhanced Ultrasonography With Perflubutane Microbubbles," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 36, pp. 1427–1437, jul 2017.
- [35] S. R. Wilson, P. N. Burns, D. Muradali, J. A. Wilson, and X. Lai, "Harmonic Hepatic US with Microbubble Contrast Agent : Initial Experience Showing Improved Characterization of Hemangioma, Hepatocellular Carcinoma, and Metastasis," *Radiology*, vol. 215, pp. 153–161, apr 2000.
- [36] F. Tranquart, A. Le Gouge, J. Correas, V. Ladam Marcus, P. Manzoni, V. Vilgrain, C. Aube, M. Bellin, L. Chami, M. Claudon, M. Cuilleron, J. Drouillard, B. Gallix, O. Lucidarme, D. Marion, A. Rode, J. Tasu, H. Trillaud, A. Fayault, E. Rusch, and B. Giraudeau, "Role of contrast-enhanced ultrasound in the blinded assessment of focal liver lesions in comparison with MDCT and CEMRI : Results from a multicentre clinical trial," *European Journal of Cancer Supplements*, vol. 6, pp. 9–15, sep 2008.
- [37] J. Correas, A. Bleuzen, C. Huang Wei, A. Vallet-Pichard, O. Hélénon, and F. Tranquart, "Caracterisation de l'hyperplasie nodulaire focale en échographie de contraste," *Journal de Radiologie*, vol. 86, p. 1359, oct 2005.
- [38] H. Zhao, R. Xu, Q. Ouyang, L. Chen, B. Dong, and Y. Huihua, "Contrast-enhanced ultrasound is helpful in the differentiation of malignant and benign breast lesions," *European Journal of Radiology*, vol. 73, pp. 288–293, feb 2010.

- [39] R. Senior, H. Becher, M. Monaghan, L. Agati, J. Zamorano, J. L. Vanoverschelde, and P. Nihoyannopoulos, "Contrast echocardiography : evidence-based recommendations by European Association of Echocardiography," *European Journal of Echocardiography*, vol. 10, pp. 194–212, aug 2009.
- [40] J.-M. Escoffre, A. Zeghimi, A. Novell, and A. Bouakaz, "In-Vivo Gene Delivery by Sonoporation : Recent Progress and Prospects," *Current Gene Therapy*, vol. 13, pp. 2–14, dec 2013.
- [41] A. A. Doinikov and A. Bouakaz, "Theoretical investigation of shear stress generated by a contrast microbubble on the cell membrane as a mechanism for sonoporation," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 128, pp. 11–19, jul 2010.
- [42] A. A. Doinikov and A. Bouakaz, "Acoustic microstreaming around an encapsulated particle," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 127, pp. 1218–1227, mar 2010.
- [43] C.-D. Ohl, M. Arora, R. Ikin, N. de Jong, M. Versluis, M. Delius, and D. Lohse, "Sonoporation from Jetting Cavitation Bubbles," *Biophysical Journal*, vol. 91, pp. 4285–4295, dec 2006.
- [44] J.-M. Escoffre and A. Bouakaz, eds., *Therapeutic Ultrasound*, vol. 880 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham : Springer International Publishing, 2016.
- [45] M. Schneider, "Characteristics of SonoVue," *Echocardiography*, vol. 16, pp. 743–746, oct 1999.
- [46] A. Bouakaz, N. de Jong, C. Cachard, and K. Jouini, "On the effect of lung filtering and cardiac pressure on the standard properties of ultrasound contrast agent," *Ultrasonics*, vol. 36, pp. 703–708, feb 1998.
- [47] J. A. Feshitan, C. C. Chen, J. J. Kwan, and M. A. Borden, "Microbubble size isolation by differential centrifugation," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 329, pp. 316–324, jan 2009.
- [48] S. B. Feinstein, P. M. Shah, R. J. Bing, S. Meerbaum, E. Corday, B.-L. Chang, G. Santillan, and Y. Fujibayashi, "Microbubble dynamics visualized in the intact capillary circulation," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 4, pp. 595–600, sep 1984.
- [49] P. Morse and K. Ingard, *Theoretical acoustics*. mcgraw hil ed., 1968.
- [50] N. de Jong, *Acoustic properties of ultrasound contrast agents*. PhD thesis, Erasmus University, 1993.
- [51] F. Tranquart, J. Correas, and A. Bouakaz, eds., *Échographie de contraste : Méthodologie et applications cliniques*. Springer, 2007.
- [52] B. A. Schrope and V. L. Newhouse, "Second harmonic ultrasonic blood perfusion measurement," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 19, pp. 567–579, jan 1993.
- [53] W. T. Shi and F. Forsberg, "Ultrasonic characterization of the nonlinear properties of contrast microbubbles," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 26, pp. 93–104, jan 2000.

- [54] M. Averkiou, D. Roundhill, and J. Powers, "A new imaging technique based on the nonlinear properties of tissues," in *IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings.*, vol. 2, pp. 1561–1566, IEEE, 1997.
- [55] K. Spencer, J. Bednarz, P. Rafter, C. Korcarz, and R. Lang, "Use of harmonic imaging without echocardiographic contrast to improve two-dimensional image quality," *The American Journal of Cardiology*, vol. 82, pp. 794–799, sep 1998.
- [56] L. Rayleigh, "On the pressure developed in a liquid during the collapse of a spherical cavity," *Philosophical Magazine*, vol. 34, pp. 94–98, aug 1917.
- [57] J. B. Keller and M. Miksis, "Bubble oscillations of large amplitude," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 68, pp. 628–633, aug 1980.
- [58] N. de Jong, R. Cornet, and C. Lancée, "Higher harmonics of vibrating gas-filled microspheres. Part one : simulations," *Ultrasonics*, vol. 32, pp. 447–453, nov 1994.
- [59] C. C. Church, "The effects of an elastic solid surface layer on the radial pulsations of gas bubbles," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 97, pp. 1510–1521, mar 1995.
- [60] L. Hoff, P. C. Sontum, and J. M. Hovem, "Oscillations of polymeric microbubbles : Effect of the encapsulating shell," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 107, pp. 2272–2280, apr 2000.
- [61] P. Marmottant, S. van der Meer, M. Emmer, M. Versluis, N. de Jong, S. Hilgenfeldt, and D. Lohse, "A model for large amplitude oscillations of coated bubbles accounting for buckling and rupture," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 118, pp. 3499–3505, dec 2005.
- [62] N. de Jong, M. Emmer, A. van Wamel, and M. Versluis, "Ultrasonic characterization of ultrasound contrast agents," *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 47, pp. 861–873, aug 2009.
- [63] S. M. van der Meer, B. Dollet, M. M. Voormolen, C. T. Chin, A. Bouakaz, N. de Jong, M. Versluis, and D. Lohse, "Microbubble spectroscopy of ultrasound contrast agents," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 121, pp. 648–656, jan 2007.
- [64] L. Hoff, *Acoustic Characterization of Contrast Agents for Medical Ultrasound Imaging*. Dordrecht : Springer, 2001.
- [65] N. de Jong, L. Hoff, T. Skotland, and N. Bom, "Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres : Theoretical considerations and some measurements," *Ultrasonics*, vol. 30, pp. 95–103, mar 1992.
- [66] R. E. Apfel and C. K. Holland, "Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 17, pp. 179–185, jan 1991.
- [67] J.-M. Correas, L. Bridal, A. Lesavre, A. Méjean, M. Claudon, and O. Hélénon, "Ultrasound contrast agents : properties, principles of action, tolerance, and artifacts," *European Radiology*, vol. 11, pp. 1316–1328, aug 2001.
- [68] A. Bouakaz, S. Frigstad, F. J. Ten Cate, and N. de Jong, "Super harmonic imaging : a new imaging technique for improved contrast detection," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 28, pp. 59–68, jan 2002.

- [69] S. R. Wilson and P. N. Burns, "Liver Mass Evaluation with Ultrasound : The Impact of Microbubble Contrast Agents and Pulse Inversion Imaging," *Seminars in Liver Disease*, vol. 21, no. 02, pp. 147–160, 2001.
- [70] D. Simpson, Chien Ting Chin, and P. Burns, "Pulse inversion Doppler : a new method for detecting nonlinear echoes from microbubble contrast agents," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 46, pp. 372–382, mar 1999.
- [71] G. A. Brock-Fisher, M. D. Poland, and P. G. Rafter, "Means for increasing sensitivity in non-linear ultrasound imaging systems," 1996.
- [72] V. Mor-Avi, E. Caiani, K. Collins, C. Korcarz, and R. Lang, "Quantitative analysis of myocardial perfusion and regional left ventricular function from contrast-enhanced power modulation images," in *Computers in Cardiology 2001. Vol.28*, pp. 97–100, IEEE.
- [73] P. Phillips, "Contrast pulse sequences (CPS) : imaging nonlinear microbubbles," in *2001 IEEE Ultrasonics Symposium. Proceedings. An International Symposium*, vol. 2, pp. 1739–1745, IEEE.
- [74] R. J. Eckersley, C. T. Chin, and P. N. Burns, "Optimising phase and amplitude modulation schemes for imaging microbubble contrast agents at low acoustic power," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 31, pp. 213–219, feb 2005.
- [75] S. Krishnan, J. Hamilton, and M. O'Donnell, "Suppression of propagating second harmonic in ultrasound contrast imaging," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 45, pp. 704–711, may 1998.
- [76] D. Goertz, E. Cherin, A. Needles, R. Karshafian, A. Brown, P. Burns, and F. Foster, "High frequency nonlinear B-scan imaging of microbubble contrast agents," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 52, pp. 65–79, jan 2005.
- [77] A. Novell, C. Sennoga, J. Escoffre, J. Chaline, and A. Bouakaz, "Evaluation of chirp reversal power modulation sequence for contrast agent imaging," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 59, pp. 5101–5117, sep 2014.
- [78] R. Hansen and B. Angelsen, "SURF imaging for contrast agent detection," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 56, pp. 280–290, feb 2009.
- [79] O. Couture, M. Fink, and M. Tanter, "Ultrasound contrast plane wave imaging," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 59, dec 2012.
- [80] R. Gessner, M. Lukacs, M. Lee, E. Cherin, F. S. Foster, and P. A. Dayton, "High-resolution, high-contrast ultrasound imaging using a prototype dual-frequency transducer : In vitro and in vivo studies," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 57, pp. 1772–1781, aug 2010.
- [81] R. C. Gessner, C. B. Frederick, F. S. Foster, and P. A. Dayton, "Acoustic Angiography : A New Imaging Modality for Assessing Microvasculature Architecture," *International Journal of Biomedical Imaging*, vol. 2013, pp. 1–9, 2013.

- [82] A. Bouakaz, B. J. Krenning, W. B. Vletter, F. J. ten Cate, and N. De Jong, "Contrast superharmonic imaging : A feasibility study," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 29, pp. 547–553, apr 2003.
- [83] J. Chomas, P. Dayton, D. May, and K. Ferrara, "Nondestructive subharmonic imaging," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 49, pp. 883–892, jul 2002.
- [84] D. E. Goertz, M. E. Frijlink, D. Tempel, V. Bhagwandas, A. Gisolf, R. Krams, N. de Jong, and A. F. van der Steen, "Subharmonic Contrast Intravascular Ultrasound for Vasa Vasorum Imaging," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 33, pp. 1859–1872, dec 2007.
- [85] P. Shankar, P. Krishna, and V. Newhouse, "Advantages of Subharmonic Over Second Harmonic Backscatter for Contrast-To-Tissue Echo Enhancement," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 24, pp. 395–399, mar 1998.
- [86] T. Faez, M. Emmer, M. Docter, J. Sijl, M. Versluis, and N. de Jong, "Characterizing the Subharmonic Response of Phospholipid-Coated Microbubbles for Carotid Imaging," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 37, pp. 958–970, jun 2011.
- [87] W. Shi, L. Hoff, and F. Forsberg, "Subharmonic performance of contrast microbubbles : an experimental and numerical investigation," in *Proceedings of the IEEE Ultrasonics Symposium*, vol. 2, pp. 1957–1960, IEEE, 2002.
- [88] F. Forsberg, W. Shi, and B. Goldberg, "Subharmonic imaging of contrast agents," *Ultrasonics*, vol. 38, pp. 93–98, mar 2000.
- [89] E. A. Neppiras, "Subharmonic and Other Low-Frequency Emission from Bubbles in Sound-Irradiated Liquids," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 46, pp. 587–601, sep 1969.
- [90] W. Shi, F. Forsberg, J. Raichlen, L. Needleman, and B. Goldberg, "Pressure dependence of subharmonic signals from contrast microbubbles," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 25, pp. 275–283, feb 1999.
- [91] O. Lotsberg, J. M. Hovem, and B. Aksum, "Experimental observation of subharmonic oscillations in Infuson bubbles," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 99, pp. 1366–1369, mar 1996.
- [92] A. Prosperetti, "Application of the subharmonic threshold to the measurement of the damping of oscillating gas bubbles," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 61, pp. 11–16, jan 1977.
- [93] P. M. Shankar, P. D. Krishna, and V. L. Newhouse, "Subharmonic backscattering from ultrasound contrast agents," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 106, pp. 2104–2110, oct 1999.
- [94] J. Sijl, B. Dollet, M. Overvelde, V. Garbin, T. Rozendal, N. de Jong, D. Lohse, and M. Versluis, "Subharmonic behavior of phospholipid-coated ultrasound contrast agent microbubbles," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 128, pp. 3239–3252, nov 2010.
- [95] V. Daeichin, G. Renaud, J. Bosch, A. van der Steen, and N. de Jong, "Effect of excitation envelope on volumetric subharmonic vibrations of single contrast agent

- microbubbles using an acoustical camera,” in *2013 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, pp. 537–540, IEEE, jul 2013.
- [96] H. Shekhar, J. J. Rychak, and M. M. Doyley, “Modifying the size distribution of microbubble contrast agents for high-frequency subharmonic imaging,” *Medical Physics*, vol. 40, p. 082903, jul 2013.
- [97] E. Biagi, L. Breschi, E. Vannacci, and L. Masotti, “Subharmonic emissions from microbubbles : effect of the driving pulse shape,” *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 53, pp. 2174–2182, nov 2006.
- [98] W. T. Shi, F. Forsberg, A. L. Hall, R. Y. Chiao, J.-B. Liu, S. Miller, K. E. Thomenius, M. A. Wheatley, and B. B. Goldberg, “Subharmonic Imaging with Microbubble Contrast Agents : Initial Results,” *Ultrasonic Imaging*, vol. 21, pp. 79–94, apr 1999.
- [99] P. Frinking, E. Gaud, and M. Arditi, “Compression-only behavior and subharmonic scattering of phospholipid-shell microbubbles,” in *2009 IEEE International Ultrasonics Symposium*, pp. 263–266, IEEE, sep 2009.
- [100] N. de Jong, M. Emmer, C. T. Chin, A. Bouakaz, F. Mastik, D. Lohse, and M. Versluis, “Compression-Only Behavior of Phospholipid-Coated Contrast Bubbles,” *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 33, pp. 653–656, apr 2007.
- [101] P. A. Frinking, E. Gaud, J. Brochot, and M. Arditi, “Subharmonic scattering of phospholipid-shell microbubbles at low acoustic pressure amplitudes,” *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 57, pp. 1762–1771, aug 2010.
- [102] P. Palanchon, A. Bouakaz, J. Klein, and N. De Jong, “Subharmonic and ultraharmonic emissions for emboli detection and characterization,” *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 29, pp. 417–425, mar 2003.
- [103] M. Dahibawkar, M. A. Forsberg, A. Gupta, S. Jaffe, K. Dulin, J. R. Eisenbrey, V. G. Halldorsdottir, A. I. Forsberg, J. K. Dave, A. Marshall, P. Machado, T. B. Fox, J.-B. Liu, and F. Forsberg, “High and low frequency subharmonic imaging of angiogenesis in a murine breast cancer model,” *Ultrasonics*, vol. 62, pp. 50–55, sep 2015.
- [104] J. Eisenbrey, A. Sridharan, P. Machado, D. A. Merton, J. Liu, K. Wallace, S. Park, S. Dianis, C. Chalek, K. Thomenius, and F. Forsberg, “4D subharmonic imaging in vivo,” in *2012 IEEE International Ultrasonics Symposium*, pp. 1106–1109, IEEE, oct 2012.
- [105] J. R. Eisenbrey, A. Sridharan, P. Machado, H. Zhao, V. G. Halldorsdottir, J. K. Dave, J.-B. Liu, S. Park, S. Dianis, K. Wallace, K. E. Thomenius, and F. Forsberg, “Three-Dimensional Subharmonic Ultrasound Imaging In Vitro and In Vivo,” *Academic Radiology*, vol. 19, pp. 732–739, jun 2012.
- [106] A. Bouakaz, P. J. Frinking, N. de Jong, and N. Bom, “Noninvasive measurement of the hydrostatic pressure in a fluid-filled cavity based on the disappearance time of micrometer-sized free gas bubbles,” *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 25, pp. 1407–1415, nov 1999.
- [107] J. K. Dave, V. G. Halldorsdottir, J. R. Eisenbrey, D. A. Merton, J.-B. Liu, J.-H. Zhou, H.-K. Wang, S. Park, S. Dianis, C. L. Chalek, F. Lin, K. E. Thomenius,

- D. B. Brown, and F. Forsberg, "Investigating the Efficacy of Subharmonic Aided Pressure Estimation for Portal Vein Pressures and Portal Hypertension Monitoring," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 38, pp. 1784–1798, oct 2012.
- [108] V. G. Halldorsdottir, J. K. Dave, A. Marshall, A. I. Forsberg, T. B. Fox, J. R. Eisenbrey, P. Machado, J.-B. Liu, D. A. Merton, and F. Forsberg, "Subharmonic-Aided Pressure Estimation for Monitoring Interstitial Fluid Pressure in Tumors : Calibration and Treatment with Paclitaxel in Breast Cancer Xenografts," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 43, pp. 1401–1410, jul 2017.
- [109] M.-X. Tang, H. Mulvana, T. Gauthier, A. K. P. Lim, D. O. Cosgrove, R. J. Eckersley, and E. Stride, "Quantitative contrast-enhanced ultrasound imaging : a review of sources of variability," *Interface Focus*, vol. 1, pp. 520–539, aug 2011.
- [110] J. Choi, J. Feshitan, B. Baseri, Shougang Wang, Yao-Sheng Tung, M. Borden, and E. Konofagou, "Microbubble-Size Dependence of Focused Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening in Mice In Vivo," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 57, pp. 145–154, jan 2010.
- [111] S. Wang, G. Samiotaki, O. Olumolade, J. A. Feshitan, and E. E. Konofagou, "Microbubble Type and Distribution Dependence of Focused Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 40, pp. 130–137, jan 2014.
- [112] C. A. Sennoga, V. Mahue, J. Loughran, J. Casey, J. M. Seddon, M. Tang, and R. J. Eckersley, "On Sizing and Counting of Microbubbles Using Optical Microscopy," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 36, pp. 2093–2096, dec 2010.
- [113] C. Moran, J. Ross, C. Cunningham, M. Butler, T. Anderson, D. Newby, K. Fox, and W. McDicken, "Manufacture and acoustical characterisation of a high-frequency contrast agent for targeting applications," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 32, pp. 421–428, mar 2006.
- [114] U. Farook, H. Zhang, M. Edirisinghe, E. Stride, and N. Saffari, "Preparation of microbubble suspensions by co-axial electrohydrodynamic atomization," *Medical Engineering & Physics*, vol. 29, pp. 749–754, sep 2007.
- [115] A. Bouakaz, N. De Jong, L. Gerfault, and C. Cachard, "In vitro standard acoustic parameters of ultrasound contrast agents : definitions and calculations," in *1996 IEEE Ultrasonics Symposium. Proceedings*, vol. 2, pp. 1445–1448, IEEE.
- [116] J. A. Feshitan, C. C. Chen, J. J. Kwan, and M. A. Borden, "Microbubble size isolation by differential centrifugation," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 329, pp. 316–324, jan 2009.
- [117] C. A. Sennoga, J. S. Yeh, J. Alter, E. Stride, P. Nihoyannopoulos, J. M. Seddon, D. O. Haskard, J. V. Hajnal, M.-X. Tang, and R. J. Eckersley, "Evaluation of Methods for Sizing and Counting of Ultrasound Contrast Agents," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 38, pp. 834–845, may 2012.
- [118] G. B. J. de Boer, C. de Weerd, D. Thoenes, and H. W. J. Goossens, "Laser Diffraction Spectrometry : Fraunhofer Diffraction Versus Mie Scattering," *Particle & Particle Systems Characterization*, vol. 4, no. 1-4, pp. 14–19, 1987.

- [119] A. Beekman, D. Shan, A. Ali, W. Dai, S. Ward-Smith, and M. Goldenberg, “Micrometer-Scale Particle Sizing by Laser Diffraction : Critical Impact of the Imaginary Component of Refractive Index,” *Pharmaceutical Research*, vol. 22, pp. 518–522, apr 2005.
- [120] C. A. Sennoga, E. Kanbar, and A. Bouakaz, “An ImageJ plugin for the sizing and counting of microbubbles,” in *2015 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, pp. 1–4, IEEE, oct 2015.
- [121] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis,” *Nature Methods*, vol. 9, pp. 671–675, jun 2012.
- [122] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona, “Fiji : an open-source platform for biological-image analysis,” *Nature Methods*, vol. 9, pp. 676–682, jun 2012.
- [123] C.-F. Cho, J. M. Wolfe, C. M. Fadzen, D. Calligaris, K. Hornburg, E. A. Chiocca, N. Y. R. Agar, B. L. Pentelute, and S. E. Lawler, “Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents,” *Nature Communications*, vol. 8, p. 15623, jun 2017.
- [124] A. Latorre-Pellicer, R. Moreno-Loshuertos, A. V. Lechuga-Vieco, F. Sánchez-Cabo, C. Torroja, R. Acín-Pérez, E. Calvo, E. Aix, A. González-Guerra, A. Logan, M. L. Bernad-Miana, E. Romanos, R. Cruz, S. Cogliati, B. Sobrino, Á. Carracedo, A. Pérez-Martos, P. Fernández-Silva, J. Ruíz-Cabello, M. P. Murphy, I. Flores, J. Vázquez, and J. A. Enríquez, “Mitochondrial and nuclear DNA matching shapes metabolism and healthy ageing,” *Nature*, vol. 535, pp. 561–565, jul 2016.
- [125] S. Oeck, N. M. Malewicz, S. Hurst, J. Rudner, and V. Jendrossek, “The Focinator - a new open-source tool for high-throughput foci evaluation of DNA damage,” *Radiation Oncology*, vol. 10, p. 163, dec 2015.
- [126] E. Vigneau, C. Loisel, M. Devaux, and P. Cantoni, “Number of particles for the determination of size distribution from microscopic images,” *Powder Technology*, vol. 107, pp. 243–250, feb 2000.
- [127] S. Sternberg, “Biomedical Image Processing,” *IEEE Computer*, vol. 16, pp. 22–34, jan 1983.
- [128] B. Sankur, “Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation,” *Journal of Electronic Imaging*, vol. 13, p. 146, jan 2004.
- [129] P. Soille and L. M. Vincent, “Determining watersheds in digital pictures via flooding simulations,” in *Proc. SPIE 1360*, pp. 240–250, sep 1990.
- [130] G. Landini, “Advanced shape analysis with ImageJ,” in *the ImageJ User and Developer Conference*, 2008.
- [131] N. G. Fisher, J. P. Christiansen, H. Leong-Poi, A. R. Jayaweera, J. R. Lindner, and S. Kaul, “Myocardial and microcirculatory kinetics of BR14, a novel third-generation intravenous ultrasound contrast agent,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 39, pp. 530–537, feb 2002.

- [132] E. Kanbar, D. Fouan, C. A. Sennoga, A. A. Doinikov, and A. Bouakaz, "Impact of Filling Gas on Subharmonic Emissions of Phospholipid Ultrasound Contrast Agents," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 43, pp. 1004–1015, may 2017.
- [133] J. J. Kwan and M. A. Borden, "Microbubble Dissolution in a Multigas Environment," *Langmuir*, vol. 26, pp. 6542–6548, may 2010.
- [134] P. S. Epstein and M. S. Plesset, "On the Stability of Gas Bubbles in Liquid Gas Solutions," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 18, pp. 1505–1509, nov 1950.
- [135] M. A. Borden and M. L. Longo, "Dissolution Behavior of Lipid Monolayer-Coated, Air-Filled Microbubbles : Effect of Lipid Hydrophobic Chain Length," *Langmuir*, vol. 18, pp. 9225–9233, nov 2002.
- [136] P. B. Duncan and D. Needham, "Test of the Epstein–Plesset Model for Gas Microparticle Dissolution in Aqueous Media : Effect of Surface Tension and Gas Under-saturation in Solution," *Langmuir*, vol. 20, pp. 2567–2578, mar 2004.
- [137] A. Kabalnov, D. Klein, T. Pelura, E. Schutt, and J. Weers, "Dissolution of multi-component microbubbles in the bloodstream : 1. theory," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 24, pp. 739–749, jun 1998.
- [138] A. Kabalnov, J. Bradley, S. Flaim, D. Klein, T. Pelura, B. Peters, S. Otto, J. Reynolds, E. Schutt, and J. Weers, "Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream : 2. experiment," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 24, pp. 751–760, jun 1998.
- [139] F. Forsberg, Y. Wu, I. R. Makin, W. Wang, and M. A. Wheatley, "Quantitative acoustic characterization of a new surfactant-based ultrasound contrast agent," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 23, pp. 1201–1208, jan 1997.
- [140] F. Forsberg, R. Basude, J.-B. Liu, J. Alessandro, W. T. Shi, N. M. Rawool, B. B. Goldberg, and M. A. Wheatley, "Effect of filling gases on the backscatter from contrast microbubbles : theory and in vivo measurements," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 25, pp. 1203–1211, oct 1999.
- [141] J. Chomas, P. Dayton, J. Allen, K. Morgan, and K. Ferrara, "Mechanisms of contrast agent destruction," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 48, no. 1, pp. 232–248, 2001.
- [142] W. T. Shi, F. Forsberg, A. Tornes, J. Østensen, and B. B. Goldberg, "Destruction of contrast microbubbles and the association with inertial cavitation," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 26, pp. 1009–1019, jul 2000.
- [143] F. Guidi, H. Vos, R. Mori, N. De Jong, and P. Tortoli, "Microbubble characterization through acoustically induced deflation," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 57, pp. 193–202, jan 2010.
- [144] H. J. Vos, *Single Microbubble Imaging*. PhD thesis, Erasmus Universiteit Rotterdam, 2010.
- [145] H. Vos, M. Emmer, and N. de Jong, "Oscillation of single microbubbles at room versus body temperature," in *2008 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 982–984, IEEE, nov 2008.
- [146] D. J. Cox and J. L. Thomas, "Rapid Shrinkage of Lipid-Coated Bubbles in Pulsed Ultrasound," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 39, pp. 466–474, mar 2013.

- [147] A. L. Klibanov, M. S. Hughes, J. K. Wojdyla, J. H. Wible, and G. H. Brandenburger, "Destruction of Contrast Agent Microbubbles in the Ultrasound Field," *Academic Radiology*, vol. 9, pp. S41–S45, jan 2002.
- [148] M. Borden, D. Kruse, C. Caskey, Shukui Zhao, P. Dayton, and K. Ferrara, "Influence of lipid shell physicochemical properties on ultrasound-induced microbubble destruction," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 52, pp. 1992–2002, nov 2005.
- [149] J.-P. O'Brien, E. Stride, and N. Ovenden, "Surfactant shedding and gas diffusion during pulsed ultrasound through a microbubble contrast agent suspension," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 134, pp. 1416–1427, aug 2013.
- [150] G. Pu, M. A. Borden, and M. L. Longo, "Collapse and Shedding Transitions in Binary Lipid Monolayers Coating Microbubbles," *Langmuir*, vol. 22, pp. 2993–2999, mar 2006.
- [151] B. D. Lindsey, J. D. Rojas, and P. A. Dayton, "On the Relationship Between Microbubble Fragmentation, Deflation and Broadband Superharmonic Signal Production," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 41, pp. 1711–1725, jun 2015.
- [152] P. Dayton, K. Morgan, A. Klibanov, G. Brandenburger, and K. Ferrara, "Optical and acoustical observations of the effects of ultrasound on contrast agents," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 46, pp. 220–232, jan 1999.
- [153] C. F. Caskey, S. M. Stieger, S. Qin, P. A. Dayton, and K. W. Ferrara, "Direct observations of ultrasound microbubble contrast agent interaction with the microvessel wall," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 122, pp. 1191–1200, aug 2007.
- [154] N. de Jong, P. J. Frinking, A. Bouakaz, M. Goorden, T. Schourmans, X. Jingping, and F. Mastik, "Optical imaging of contrast agent microbubbles in an ultrasound field with a 100-MHz camera," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 26, pp. 487–492, mar 2000.
- [155] A. Katiyar and K. Sarkar, "Excitation threshold for subharmonic generation from contrast microbubbles," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 130, pp. 3137–3147, nov 2011.
- [156] Y. Luan, G. Lajoinie, E. Gelderblom, I. Skachkov, A. F. van der Steen, H. J. Vos, M. Versluis, and N. De Jong, "Lipid Shedding from Single Oscillating Microbubbles," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 40, pp. 1834–1846, aug 2014.

Glossaire

- *notation*₁ : définition de cette notation
- *notation*₂ : définition de cette notation
- *notation*₃ : définition de cette notation
- *notation*₄ : définition de cette notation

Résumé :

ici...

...
...
...
...
...
...
...

Mots clés :

mot 1, mot 2, mot 3, ...

Abstract :

here...

...
...
...
...
...
...
...

Keywords :

word 1, word 2,...