

Université de Montréal

**Méthode acoustique basée sur l'agrégation érythrocytaire
pour le suivi non invasif de l'inflammation**

par

Julián García-Duitama

Institut de génie biomédical

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en génie biomédical

Décembre 2017

© Julián García-Duitama, 2017

Résumé

Tout patient subissant une chirurgie majeure est à risque de développer un syndrome systémique d'inflammation. Lorsque l'inflammation disproportionnée se produit, le sang devient très visqueux et le transfert d'oxygène aux tissus est affaibli. Cette situation peut causer la défaillance d'organes et ultimement la mort du patient. Il est important donc d'évaluer et surveiller rapidement la réponse inflammatoire du patient pour guider son traitement et éviter la dégradation de sa condition. Actuellement, la détection de l'inflammation repose sur la surveillance de signes vitaux, tels que la température corporelle et le rythme de la respiration, ou bien sur l'estimation de marqueurs sanguins d'inflammation. La première méthode a le désavantage de manquer grandement de spécificité. Contrairement, les marqueurs sanguins sont des mesures directes et quantitatives de l'état inflammatoire du patient, mais impliquent un échantillonnage du sang et un délai de traitement d'au moins une heure. Ceci se fait au détriment de l'évaluation continue de l'inflammation et peut retarder le diagnostic et le traitement adéquat qui y est associé, spécialement dans les cas des soins périopératoires.

Cette thèse présente un ensemble de travaux visant à la détection et à la surveillance non invasive de l'inflammation en analysant le signal ultrasonore rétrodiffusé par le sang. La motivation de la méthodologie proposée est de surveiller continuellement la réponse inflammatoire du patient et de réduire le délai de traitement. Le principe général utilisé dans la méthode exploite la réaction collective des globules rouges à la présence de protéines inflammatoires de phase aiguë, notamment le fibrinogène. En effet, la concentration de ces macromolécules se corrèle positivement avec la force d'attraction intercellulaire. Ainsi, sous conditions de faible écoulement, le niveau d'agrégation érythrocytaire sert de marqueur indirect de l'état inflammatoire du patient.

Bien que les agrégats érythrocytaires soient de taille insuffisante pour être observés dans une image échographique, ils laissent une signature spectrale identifiable lors de l'analyse du signal rétrodiffusé du sang. En ajustant son spectre à des modèles physiques ou mathématiques de diffusion acoustique, il est possible de remonter à paramètres quantitatifs d'intérêt clinique, tels que la taille ou l'organisation spatiale de l'agrégat. Ce type d'analyse est encadré dans le

domaine des ultrasons quantitatifs qui cherche la caractérisation de tissus à partir de ses signatures spectrales communément dénommées les coefficients de rétrodiffusion.

Le premier objectif de cette thèse est d'évaluer d'un point de vue clinique l'interprétation des paramètres obtenus à partir du signal ultrasonore du sang. Cinq modèles mathématiques de rétrodiffusion acoustique, incluant des versions classiques et récentes, ont été évalués. On observe en expériences *ex vivo* et en une étude préclinique que lorsque l'agrégation érythrocyte augmente, notamment par un processus inflammatoire, certains paramètres offrent un excellent contraste et permettent son évaluation. On conclut que les modèles « Estimateur de taille et du facteur de structure », « Théorie du milieu effectif combinée au facteur de structure » et l'approximation « gaussienne » permettent la caractérisation de plusieurs niveaux d'agrégation érythrocytaire et sont de bons candidats pour l'évaluation de la réaction inflammatoire en clinique.

Des travaux pionniers pour la mesure de l'inflammation requéraient que l'acquisition ultrasonore se fasse de façon invasive. Ce fait joue contre l'intérêt général de la technique et rend son utilisation impossible en salle de soins intensifs. Alors, un deuxième objectif de cette thèse est de proposer un protocole de mesure de l'agrégation érythrocytaire non invasif. Les solutions analysées se centrent en la compensation des facteurs confondants intrinsèques à la mesure *in vivo*, notamment l'écoulement sanguin. On observe que l'arrêt du flux sanguin rend la technique sensible aux conditions d'écoulement précédentes et joue contre sa répétabilité. Contrairement, on constate en expériences *ex vivo* que l'utilisation d'un écoulement sanguin à faible débit produit des mesures répétables et permet de distinguer entre l'étendue normale et élevée de l'agrégation d'érythrocytes. Des validations sur une cohorte de onze volontaires montrent que le protocole à faible débit offre aussi une bonne répétabilité *in vivo* et se corrèle significativement avec les tests de laboratoire *ex vivo* d'agrégation érythrocytaire.

Enfin, en visant le transfert de technologie vers la clinique, le troisième objectif de cette thèse est d'évaluer la reproductibilité de résultats en utilisant des méthodes d'imagerie ultrarapide et des échographes cliniques. En effet, les travaux précédents sur la caractérisation de l'agrégation érythrocytaire sont faits avec des transducteurs d'un seul élément piézo-électrique, typiquement utilisés en recherche fondamentale. Cependant, les transducteurs utilisés en clinique sont équipés avec plus d'une centaine de ces éléments. Cette configuration permet la formation de faisceaux ultrasonores focalisés et des techniques d'imagerie ultrarapide.

Nos validations *ex vivo* démontrent que l'utilisation des machines cliniques multiélément est tout à fait viable pour la caractérisation de l'agrégation érythrocytaire et que les résultats obtenus avec elles sont comparables à ceux des machines de recherche.

Mots-clés : Inflammation systémique; diffusion acoustique du sang; agrégation érythrocytaire; ultrasons quantitatifs; analyse spectrale.

Abstract

Any patient undergoing major surgery is at risk of developing a systemic inflammatory syndrome. When disproportionate inflammation occurs, the blood becomes very viscous and the transfer of oxygen to the tissues is weakened. This often causes organ failure and ultimately death. Nevertheless, inflammation is less harmful if detected and treated early. Currently, detection of inflammation is based on the monitoring of vital signs, such as body temperature and respiration rate, or on the estimation of blood markers of inflammation. The first method has the disadvantage of lacking specificity. Blood markers, on the other hand, are direct and quantitative measurements of the patient's inflammatory state but involve blood sampling and processing delays that prevent continuous monitoring of the patient. These difficulties the automation of the evaluation of inflammation and can delay the diagnosis and the associated treatment, especially in the cases of perioperative cares.

This thesis presents a set of works aimed at the noninvasive detection and monitoring of inflammation by analyzing the ultrasound signal backscattered by blood. The motivation of the proposed methodology is to continuously monitor the patient's inflammatory response and reduce the time before treatment. The general principle used in the method exploits the collective reaction of red blood cells to the presence of acute phase inflammatory proteins, in particular fibrinogen. Indeed, the concentration of these macromolecules correlates positively with the force of intercellular attraction. Thus, under low flow conditions, the level of erythrocyte aggregation serves as a surrogate marker of the patient's inflammatory state.

Although the erythrocyte aggregates are not large enough to be observed in an ultrasound image, they leave a spectral signature on the backscattered blood signal. By fitting the blood spectrum to physical or mathematical models of acoustic diffusion, it is possible to obtain quantitative parameters of clinical interest, such as the size or spatial organization of the aggregate. This type of analysis belongs to the field of quantitative ultrasound which seeks the characterization of tissues from its spectral signatures commonly referred to as the backscattering coefficient.

The first objective of this thesis is to evaluate from a clinical point of view the interpretation of the parameters obtained from the ultrasound signal of the blood. Five mathematical models of acoustic backscattering, including both classical and recent versions, were evaluated. In *ex vivo* experiments and in a preclinical study, we observed that when the erythrocyte aggregation increases, in particular by an inflammatory process, certain parameters offer an excellent contrast and allow its classification. It is concluded that the "structure factor and size estimator", "effective medium theory considering a structure factor" and the "Gaussian" models allow the characterization of several levels of erythrocyte aggregation and are good candidates for the evaluation of the inflammatory reaction in clinics.

Pioneer works on the measurement of inflammation required that ultrasound acquisition would be done in an invasive fashion. This fact plays against the general interest of the technique and makes its use impossible in the intensive care room. A second objective of this thesis is thus to propose a protocol for the non-invasive measuring of erythrocyte aggregation. The analyzed solutions concentrate on the compensation of the confounding factors intrinsic to the *in vivo* measurement, in particular the blood flow. It was observed that the cessation of blood flow rendered the technique sensitive to the previous flow conditions and played against its repeatability. Conversely, *ex vivo* experiments showed that maintaining a low-flow provided repeatable measures and could distinguish between normal and high extents of erythrocyte aggregation. Validations on a cohort of eleven volunteers showed that the low-flow protocol also offers good *in vivo* repeatability and correlates significantly with *ex vivo* laboratory tests of erythrocyte aggregation.

Finally, by aiming at the transfer of technology to clinics, the third objective of this thesis was to evaluate the reproducibility of results using ultrafast imaging methods and clinical ultrasound machines. Indeed, previous works on the characterization of erythrocyte aggregation were done with single element transducers, typically used in fundamental research. However, the transducers used in the clinics are equipped with more than a hundred of piezoelectric elements. This configuration allows the formation of focused ultrasound beams as well as ultrafast imaging techniques. Our *ex vivo* validations demonstrated that the use of these new technologies is quite possible for the characterization of erythrocyte aggregation and leads to results comparable to those of previous technologies.

Keywords: Systemic inflammation; acoustic blood scattering; erythrocyte aggregation; quantitative ultrasound; spectral analysis.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures	xiii
Liste de symboles et d'abréviations	xxi
Remerciements.....	xxiv
Chapitre 1 Contexte clinique et hémorhéologique.....	1
1.1. Rationnelle clinique	1
1.2. Notions d'hématologie.....	2
1.3. L'agrégation érythrocytaire	4
1.4. Conditions affectant l'agrégation érythrocytaire.....	5
1.4.1. L'écoulement de Couette	7
1.4.2. L'écoulement de tube cylindrique	8
1.5. Mesures de l'agrégation érythrocytaire	12
1.5.1. Taux de sédimentation érythrocytaire ou ESR.....	13
1.5.2. Syllectométrie ou agrégométrie photométrique	13
1.5.3. Viscosité à faible et fort cisaillement.....	15
1.5.4. Analyse d'images de microscope	15
1.5.5. Propriétés électriques	16
1.5.6. Rétrodiffusion ultrasonore.....	16
1.6. Importance clinique de l'évaluation immédiate de l'agrégation érythrocytaire	17
Chapitre 2 Imagerie ultrasonore.....	18
2.1. Notions d'échographie	18
2.2. Production d'ondes ultrasonores	20
2.2.1. Principe des transducteurs.....	20
2.2.2. Propagation de l'onde ultrasonore	21
2.2.3. Interactions de l'onde acoustique avec le milieu.....	22
2.3. Notions de formation d'images ultrasonores	24

2.3.1. Prétraitement du signal et affichage en Mode-A	25
2.3.2. Affichage en Mode-B	27
2.3.3. Signal RF.....	28
2.4. Transducteurs cliniques	29
2.4.1. Formation du faisceau.....	30
2.5. Besoin de paramètres quantitatifs pour l'imagerie diagnostique	33
Chapitre 3 Ultrasons quantitatifs	35
3.1. Analyse spectrale.....	35
3.1.1. Notions de l'analyse spectrale	35
3.1.2. Analyse spectrale des signaux ultrasonores	37
3.2. Composants du spectre	40
3.2.1. L'atténuation	42
3.2.2. La diffraction	45
3.2.3. Le coefficient de rétrodiffusion	46
3.3. Interprétation du coefficient de rétrodiffusion	48
3.3.1. Modèles théoriques de la diffusion du sang	48
Chapitre 4 Objectifs et plan de thèse.....	52
Chapitre 5 Sensitivity of five models of acoustic backscatter coefficient of blood to describe varying erythrocyte aggregation levels	55
5.1. Avant propos	55
5.2. Résumé.....	55
5.3. Abstract.....	56
5.4. Introduction.....	57
5.5. Theory.....	58
5.5.1. General framework for BSC and attenuation estimation	58
5.5.2. Formulation of the inverse problem.....	59
5.5.3. Scattering models.....	60
5.6. Materials and methods.....	65
5.6.1. Blood preparation for <i>ex vivo</i> experiments	65
5.6.2. Assessment of increased erythrocyte aggregation.....	66
5.6.3. <i>Ex vivo</i> experimental setup.....	67

5.6.4. Ultrasound acquisitions	68
5.6.5. <i>In vivo</i> dataset	68
5.6.6. BSC measurements	69
5.6.7. Optimization algorithms.....	70
5.6.8. Assessment criteria for BSC modeling	71
5.7. Results.....	72
5.7.1. Confirmation of an increase in erythrocyte aggregation.....	72
5.7.2. BSC model fitting assessment	75
5.7.3. Correlation of model parameters with benchmark laboratory tests.....	76
5.7.4. Contrast of model parameters with enhancement of erythrocyte aggregation	78
5.7.5. Contrast of blood attenuation	80
5.8. Discussion	81
5.9. Conclusion	84
5.10. Annexe 1 Traitement du signal	85
Chapitre 6 Protocol for robust <i>in vivo</i> measurements of erythrocyte aggregation using ultrasound spectroscopy	86
6.1. Avant-propos.....	86
6.2. Résumé.....	86
6.3. Abstract.....	87
6.4. Introduction.....	88
6.5. Materials and Methods.....	91
6.5.1. Blood preparation for <i>ex vivo</i> experiments	91
6.5.2. Apparatuses for <i>ex vivo</i> assessment of erythrocyte aggregation	92
6.5.3. <i>Ex-vivo</i> ultrasound protocol.....	92
6.5.4. <i>In vivo</i> ultrasound protocol.....	93
6.5.5. Evaluation of the variability and sensitivity of the <i>in vivo</i> technique.....	94
6.5.6. Ultrasound acquisitions	95
6.5.7. Regions of interest in ultrasound images	95
6.5.8. BSC estimation	95
6.5.9. Parameterization of the BSC	97
6.6. Results.....	97

6.6.1. <i>Ex vivo</i> assessment of erythrocyte aggregation using laser aggregometry	97
6.6.2. Considerations for evaluating the RBC aggregation with ultrasounds	98
6.6.3. <i>Ex vivo</i> kinetics of RBC aggregation with stopped flow	98
6.6.4. <i>Ex vivo</i> kinetics of RBC aggregation with low flow	99
6.6.5. Intra-assay variability of <i>in vivo</i> measurements	101
6.6.6. Sensitivity of the ultrasound technique to biological inter-subject variations	101
6.7. Discussion	103
6.7.1. Techniques for controlling the flow shear rate	103
6.7.2. Clinical relevance of results	104
6.7.3. Behavior of the backscattering coefficient during the kinetic of RBC aggregation	105
6.8. Conclusion	107
Chapitre 7 Experimental application of ultrafast imaging to spectral tissue characterization	108
7.1. Avant-propos.....	108
7.2. Résumé.....	108
7.3. Abstract.....	109
7.4. Introduction	110
7.5. Materials and Methods.....	114
7.5.1. Overview	114
7.5.2. Description of phantoms	115
7.5.3. Porcine blood experimental setup.....	116
7.5.4. Array transducer acquisition protocol (for FI and PWI).....	117
7.5.5. Speed of sound and attenuation coefficient.....	119
7.5.6. Definition of regions of interest.....	120
7.5.7. Spectral estimation.....	120
7.5.8. Signal processing for BSC estimation using an array transducer	121
7.5.9. Comparison of estimated PWI BSCs with benchmark BSCs	122
7.5.10. Estimation of the BSC of phantoms with a single-element transducer	122
7.5.11. Quantitative assessment of PWI BSCs	123
7.5.12. Derived BSC scatterer size and anisotropy assessment	124
7.6. Results.....	125

7.6.1. Speed of sound and attenuation of phantoms	125
7.6.2. Estimated BSCs using plane wave imaging versus benchmark measures.....	125
7.6.3. Derived scatterer sizes and anisotropy assessment.....	130
7.7. Discussion	133
7.8. Conclusion	137
7.9. Annexe 1 : Calcul expérimental de l'atténuation.....	138
Chapitre 8 Discussion et conclusion générale	140
8.1. Résumé général	140
8.2. Originalité des travaux.....	142
8.2.1. Interprétation clinique des modèles de diffusion acoustique du sang	143
8.2.2. Protocole de mesure <i>in vivo</i> de l'agrégation érythrocytaire.....	144
8.2.3. Instrumentation clinique.....	145
8.3. Travaux futurs	146
8.3.1. Vers l'application en soins intensifs et à l'urgence	146
8.3.2. Au-delà de la détection de l'inflammation.....	150
8.4. Conclusion générale	151
Bibliographie	152
Annexe A.....	159

Liste des tableaux

Table 1.1 Approximation de la viscosité dynamique du sang de deux espèces en utilisant la loi de puissance d'Ostwald-De Waele	10
Table 5.1 Assumptions of scattering models based on empirical description or an acoustic theory	60
Table 5.2 Range and step size of model parameters used for pre-computing the lookup table of EMTSFM models. Hematocrit and depth were considered known and were thus fixed during the exhaustive search in the inverse problem. Both parameters were nevertheless allowed to vary within pre-defined ranges when computing the lookup table	71
Table 5.3 Pearson correlation coefficient, R^2 , of BSC model parameters with benchmark laboratory tests of RBC aggregation; i.e., with viscosity in Cohort 1 and laser aggregometry in Cohort 2. P-values in bold are statistically significant.....	78
Table 6.1 Averaged erythrocyte aggregation in three species as assessed by laser aggregometry. Parameters S10 and S60 represent the aggregometer measurements after 10 s and 60 s after stoppage of shearing, respectively. Indices are expressed as mean \pm std.	98
Table 7.1 Effective radius of scatterers (in mm) in phantoms (i.e., glass beads) and blood (i.e., erythrocyte aggregates) after fitting of their backscatter coefficients to appropriate scattering models.....	131

Liste des figures

- Figure 1.1 Image de microscopie électronique des cellules sanguines. De gauche à droit: Globule rouge, plaquette (activée) et globule blanc. La taille du globule blanc n'est pas à l'échelle. Image adaptée de NCI-Frederick.3
- Figure 1.2 Macro composition du sang. Après centrifugation le sang se sépare en ses trois composantes principales : plasma, couche leucocytaire (ou « buffy coat ») et globules rouges. L'hématocrite correspond à la fraction volumique occupée par les globules rouges. Chez l'humain l'hématocrite typique est de 40%.4
- Figure 1.3 Écoulement de Couette. a) Dispositif de Couette avec deux cylindres concentriques b) La longueur des flèches représente la vitesse de chaque couche de sang. Cependant, la différence de vitesse entre chaque couche et la suivante est constante, ainsi un seul cisaillement est induit dans l'entrefer. Adapté de (Nguyen et al. 2008)8
- Figure 1.4 Coupe longitudinale d'un écoulement de tube cylindrique. Les couches dans l'axe du tube circulent à vitesse maximale. Les couches près des parois ont une vitesse de zéro. Inversement, le cisaillement induit dans le centre du vaisseau est zéro et maximale près des parois.9
- Figure 1.5 Taux de cisaillement médian en écoulement de tube. Les rayons représentés correspondent à la taille type d'une veine antébrachiale médiane. Le cadre rouge indique les régions pour lesquelles le taux cisaillement est inférieur à 3 1/s. 12
- Figure 1.6 Exemples de syllectogrames de rétrodiffusion de la lumière. a) Échantillon sanguin humain b) Échantillon sanguin équine 14
- Figure 2.1 Modes principaux de propagation des ondes acoustiques. a) Ondes de compression b) Ondes de cisaillement. L'imagerie par ultrasons se base en la production d'ondes de compression. Adapté de http://www.khadley.com/courses/Astronomy/ph_205/topics/earth/earth-structure.html (Consulté le 21-07-2017)..... 19
- Figure 2.2 Interactions de l'onde acoustique avec le milieu. Le type d'interaction dépend de la taille de l'objet. Si l'objet est plus grand que la longueur d'onde, la transmission, réflexion, réfraction ou diffraction peuvent survenir. La diffusion arrive quand l'inhomogénéité est plus petite que la longueur d'onde.23

Figure 2.3 Exemples des images RF avant et après traitement	25
Figure 2.4 Traitement de signal pour former une ligne en Mode-A. Image adaptée de (Bushberg et al. 2002).	26
Figure 2.5 Transducteur monoélément à balayage (Vevo 707B Visualsonix, Toronto, Canada). a) Image du transducteur portable. L'élément piézoélectrique est placé dans un réservoir d'eau pour un meilleur accouplement avec le tissu. b) Le réservoir d'eau a été enlevé pour montrer le balayage de l'élément ultrasonore. La distance focale de l'élément est de 10 mm. Le cadre blanc représente l'espace scanné, c.-à-d., la section du milieu de laquelle l'image sectorielle sera formée.	28
Figure 2.6 Configuration des éléments d'une barrette linéaire. Définition de quelques propriétés de la barrette.	29
Figure 2.7 Types de formation de faisceaux ultrasonores avec de transducteurs cliniques. a) Imagerie focalisée. B) Imagerie par ondes planes. Plusieurs insonorisations sont envoyées à différents angles. Chaque image présente de problèmes de contraste et résolution. En ajoutant cohéremment les images de chaque angle, ces propriétés sont améliorées.....	31
Figure 2.8 Fonction de délais pour la focalisation d'un faisceau ultrasonore avec une barrette linéaire (Porée 2017)	32
Figure 2.9 Formation du faisceau en réception pour un front d'onde plane. Panneau à gauche : fantôme de points à imager. Panneau central : Image brute montrant des hyperboles causées par le délai. Panneau droit : Image Mode-B après la formation de faisceau.	33
Figure 3.1 Décomposition de la lumière blanche en son spectre par la réfraction d'un prisme. (Image adaptée de https://www.britannica.com)	36
Figure 3.2 Interprétation visuelle de la transformée de Fourier (Image adaptée de https://irenevigieux.wordpress.com)	38
Figure 3.3 Image échographique d'une veine fémorale de porc. La grille représente l'ensemble de cellules (PER) dans une région rectangulaire de l'image. Les PERs en rouge montrent la région d'intérêt qui est conservée pour l'analyse spectrale, tandis que les PERs jaunes ne sont pas pris en considération. Les lignes RF qui ont donné lieu à l'image seront découpées et analysées individuellement par chaque PER.....	39
Figure 3.4 Processus de création d'une image ultrasonore décrite par ses composantes. Les carrés rouges représentent des processus électriques à l'intérieur du transducteur et du	

système d'imagerie. Les carrés jaunes représentent les processus acoustiques qui se produisent dans le tissu.....	40
Figure 3.5 Atténuation d'un signal d'un réflecteur plan représenté en a) tension et b) en spectre de puissance. Les courbes en noir représentent le signal acquis dans l'eau, pour laquelle l'atténuation est négligeable. Les courbes en rouge représentent le même signal atténué par un fantôme placé dans le trajet de l'onde.....	42
Figure 3.6 Diffraction du faisceau ultrasonore. Adapté de (Szabo 2004).....	45
Figure 3.7 Analyse spectrale d'un fantôme de gélatine avec des microbilles de polystyrène de 10.7 µm de rayon. Des pics et des vallées sont uniques à chaque taille et permettent la caractérisation du milieu. a) Spectre de puissance b) Coefficient de rétrodiffusion.....	47
Figure 5.1 Backscatter coefficient (BSC) of blood as predicted by five scattering models. A physiological hematocrit (i.e., 40%) was simulated with increasing aggregate sizes. a), b), c) correspond to aggregate sizes of 1 (no aggregation), 5.5 and 8 red blood cells. W was estimated as equal to D^2 as observed by others (Yu and Cloutier 2007). h_i was fixed at 99% as recommended in (de Monchy et al. 2016a). Z was fixed to be 199, 50 and 20, respectively, to simulate higher polydispersity in bigger aggregates. Values of b and n were found empirically to follow the trend of other models.....	61
Figure 5.2 Experimental setup for the ex vivo experiments (Cohort 1). It aimed simulating blood flow conditions (i.e., vessel size, flow speed and temperature) within a human antebrachial vein.....	68
Figure 5.3 Confirmation by laboratory tests of an increase in RBC aggregation in Cohort 1. The increase in dextran 450-650 kDa concentration induces an increase in erythrocyte aggregation. Laser aggregometry showed saturation after attaining 0.6 g/dL. However, except for a few dextran concentrations, a progressive increase of the viscometry index is observed.	73
Figure 5.4 Confirmation by laboratory tests of an increase in RBC aggregation caused by an inflammatory condition in Cohort 2. The inflammatory reaction occurred during the first 120 min after the beginning of CPB surgery and was reduced afterwards. a) RBC aggregation evaluated by the laser aggregometry index s_{10} . b) Cytokines analysis: IL-6 and IL-10 are markers of pro-inflammatory and anti-inflammatory processes, respectively.	74

Figure 5.5 Evolution of attenuated BSCs (i.e., BSCs not compensated for attenuation) with increasing erythrocyte aggregation. a) Ex vivo porcine blood samples. Rupture points corresponding to a change in spectral slope are observed indicating a strong erythrocyte aggregation. b) In vivo measurements in pigs experiencing a CPB surgery.75

Figure 5.6 Examples of model fitting in Cohort 1 (ex vivo porcine blood experiments). With the exception of EMTSFM monodisperse, all models described correctly experimental BSC spectra at all erythrocyte aggregation levels..... 76

Figure 5.7 Spectral BSC model fitting assessment. Mean R2 values as a function of the dextran concentration and time after CPB (standard deviations are not shown for clarity). Reported mean R2 in parenthesis were averaged over the whole dataset of each cohort. 76

Figure 5.8 Mean values of the model contrast compared with intra-subject value before increasing of erythrocyte aggregation (standard deviations are not shown for clarity). Parameters a of Gaussian and W of SFSE showed the best contrast in both cohorts, but results..... 79

Figure 5.9 Mean values of model parameters (standard deviations are not shown for clarity). In a) and b) the units for parameter a (aggregate size) of Gaussian, EMTSFM monodisperse and polydisperse, and D of SFSE are the number of red blood cells. c) and d) parameters of the power law model with a different numerical scale. Parameters marked with a star showed significant differences in the group ANOVA tests..... 80

Figure 5.10 Estimated contrast and mean attenuation coefficients (standard deviations are not shown for clarity). Higher erythrocyte aggregation causes an increase in blood attenuation. a) and b) Mean attenuation contrast, compared with the same subject before incre 81

Figure 5.11 Composantes requises pour l'obtention du BSC ou BSCatt 85

Figure 6.1 Examples of in vivo velocity and shear rate profiles in vein flow. (a) Theory predicts a blunted parabolic velocity profile created by the non-Newtonian behavior of blood. Shear rate is zero at the central axis of the vein and maximum at the wall. (b) Experimental flow profile calculated with the particle image velocimetry method (see details below). Artifacts close to the wall are caused by the lack of precision of the estimation under 1 mm/s because of the use of a spatial filter. (c) Region of interest for

spectral analysis (see details below). This area contains a median shear rate of about 3 s^{-1} .
90

Figure 6.2 Couette shearing protocol. During the disaggregation stage, blood was sheared at 300 s^{-1} to dissociate any aggregate. During the stabilization stage, blood was sheared at several transitional levels (shear rates of 75, 50, 25, 10, 5 and 1 s^{-1} were employed). During the measuring stage, ultrasound images were acquired for spectral analysis in post-processing.....93

Figure 6.3 Average kinetics of erythrocyte aggregation after flow stoppage, monitored by the midband amplitude (a, b) and by the spectral slope (c, d). Comparison of porcine (a, c) and equine (b, d) blood samples. By application of different initial shear rates, amplitude and slope of the backscattering coefficient do not converge to the same values. This causes a lack of repeatability for the flow stoppage technique.99

Figure 6.4 Average kinetics of erythrocyte aggregation with a residual shear at 5 s^{-1} , monitored by the midband amplitude (a, b) and the spectral slope (c, d). Comparison of porcine (a, c) and equine (b, d) blood samples. The amplitude and slope of the backscattering coefficient converge to the same mean value whatever the initial shear rate applied. This suggests a better repeatability for this technique of shear rate control..... 100

Figure 6.5 (a) Evaluation of the control flow method during the ultrasound acquisitions in vivo. Each bar represents the average median shear rate during the 60 s of acquisitions for a single repetition. Measured median shear rate was close to the targeted value of 3 s^{-1} . (b) Aggregation kinetics monitored in vivo for 1 min using the spectral slope. The slope is quite stable during the whole ultrasound acquisition period. 101

Figure 6.6 Correlation between ex vivo index S10 and the backscatter coefficient spectral slope after 60 s of reduced flow in vivo. The dark red points represent two participants with chronic inflammatory conditions. They scored the highest values with both acoustic and laboratory techniques. 102

Figure 6.7 Examples of erythrocyte aggregation kinetics ex vivo after flow control monitored by the frequency-dependent backscatter coefficient (BSC). Under disaggregated states (dotted lines), the spectral slope on a log-log scale is close to 4, indicating Rayleigh scattering. In the presence of erythrocyte aggregation, the spectral slope is reduced. With the biggest aggregates (panel b, horse blood at a low residual shear rate), the BSC

presents two regions with characteristic slopes, named here the low- and high-frequency regimes; these regimes are separated by a characteristic rupture point, which is downshifted in frequency by stronger aggregation. 106

Figure 7.1 Process for formation of plane wave images. (a) Envelope-detected radiofrequency images insonified at -10° , 0° and 10° . (b) Migrated images showing a lack of lateral resolution. Note that beamforming artifacts depend on the angle of insonification after migration. (c) Compounded image with restored lateral resolution..... 113

Figure 7.2 Spectra required for instrumentation compensation during backscatter coefficient (BSC) estimation using different setups. The first letter of the spectrum subscripts indicates the interrogated medium (S = tested sample, P = planar reflector, R = reference medium); the second letter denotes the instrument used (S = single-element transducer, A = array transducer). Complete expressions for BSC estimation are given in eqns (7.2) and (7.4) for the reference medium and planar reflector techniques, respectively. For phantoms, BSC_{RS} was experimentally estimated using the planar reflector technique. For the erythrocyte suspension, BSC_{RS} was analytically calculated from a blood scattering model. 115

Figure 7.3 Experimental setup used for estimating backscatter coefficients of porcine flowing blood. Blood is pumped from a lower to an upper reservoir, where height differences cause a non-pulsatile flow. Ultrasound images are acquired through an acoustic window in agar placed toward the end of the tube entrance. The entrance length allowed a laminar steady flow. 117

Figure 7.4 Ultrasound B-mode image of porcine blood flowing into the circuit of Figure 7.3. The arrowhead to the left indicates the focal distance used for focusing imaging. (a) Angles considered for plane-wave imaging steering of the wavefront. (b, c) Lower and upper regions of interest for backscatter coefficient analysis. (d) Schematic representation of the orientation of flowing erythrocyte aggregates, inspired by Figure 9 of Qin et al. (1998) and used to interpret the effective scatterer radius analysis of Figure 7.10..... 119

Figure 7.5 Mean backscatter coefficient (BSC) from isotropic phantoms after averaging of nine image frames. Solid and dotted lines represent benchmark BSCs measured with single element transducers. Hollow and filled markers represent BSCs estimated for focused, compounded and single-angle plane wave images for Duke40 and Duke50

phantoms, respectively. Focused and all plane wave techniques reproduced consistently benchmark BSCs. Standard deviations are hidden for clarity.	126
Figure 7.6 Mean backscatter coefficients (BSCs) of porcine flowing blood estimated with conventional focusing imaging at mean shear rates of 2 s ⁻¹ (a) and 10 s ⁻¹ (b). Dotted blue and red lines are BSC estimations made with a single-element transducer at normal and low plasma fibrinogen concentrations, respectively (data taken from Yuan and Shung 1988b). Less erythrocyte aggregation and smaller BSCs are obtained at a low fibrinogen level (Weng et al. 1996a, 1996b). Filled markers represent the BSCs estimated from blood samples of three swine. Quantitative comparisons of PWI BSCs to benchmark FI BSCs	128
Figure 7.7 Mean backscatter coefficients (BSCs) of porcine flowing blood estimated with compounded and single-angle.....	129
Figure 7.8 Deviation of the backscatter coefficient (BSC) in decibels.....	130
Figure 7.9 Parametric images of the mean deviation of the backscatter coefficient (in dB) reveal regions with systematic artifacts induced by the beamforming protocol. Higher values (red) indicate regions with larger deviations from the benchmark backscatter coefficient (focused images). (a–c) Single-angle plane wave insonification at -10°, 10° and 0°, respectively; lateral biases caused by the steering of the wave front are observed. (d) Image compounded from plane wave insonifications; attenuated lateral biases are still present on both sides. The white box in (a) indicates the region of interest considered for backscatter coefficient analysis.....	132
Figure 7.10 Effective scatterer radius estimated from the fitting of the backscatter coefficient to a model of blood backscatter at shear rates of 2 and 10 s ⁻¹ . Raising and decreasing trends in scatterer dimensions are observed when considering lower and upper regions of interest depicted in Figure 7.4.....	133
Figure 7.11 Depiction of the triangle with a higher lateral resolution for plane-wave compounded images, defined by the intersection of single-angle plane-wave images. After a distance d, the gain in lateral resolution offered by compounding is lost and the backscatter coefficient estimation quality may be affected.	136
Figure 7.12 Définition des temps de vol, des distances et des régions du faisceau pour les expériences. a) et b) Transducteur sans et avec fantôme dans le trajet du faisceau,	

respectivement; t_w , t_u , t_b et t_s sont les temps de vol vers le réflecteur dans l'eau, vers les parois supérieure et inférieure du fantôme et vers le plexiglas avec le fantôme dans le chemin, respectivement; W_s est la largeur du fantôme; c) Région de faisceau utilisée pour l'estimation du BSC correspondant à -6 dB d'amplitude de la pression. L'amplitude maximale se produit au focus..... 139

Liste de symboles et d'abréviations

- α : Coefficient d'atténuation d'un tissu ou matériel [dB/cm ou dB/cm/MHz]
- α_{Np} : Coefficient d'atténuation d'un tissu ou matériel exprimé en Nepers [Np/cm ou Np/cm/MHz]
- $\dot{\gamma}$: Taux de cisaillement dans un écoulement sanguin [s^{-1}]
- $\partial_z P$: Gradient de pression dans l'écoulement sanguin tubulaire [mPa/cm]
- η : Viscosité dynamique du sang [mPa.s]
- κ : Compressibilité d'un milieu homogène [Pa^{-1}]
- λ : Longueur d'onde [mm] ou [μm]
- ρ : Masse volumique d'un milieu homogène [kg/m^3] ou [g/cm^3]
- Ω : Vitesse de rotation d'un système de Couette [rev/s]
- a : Atténuation totale souffert par une onde ultrasonore [dB ou Np]
- a_α : Coefficient pour la modélisation du coefficient d'atténuation qui exprime son amplitude
- a_{visco} : Premier coefficient d'approximation de la viscosité dynamique du sang approximé par une loi de puissance [un. arb.]
- b : Coefficient pour la modélisation du coefficient d'atténuation qui exprime sa relation avec la fréquence
- b_{visco} : Deuxième coefficient d'approximation de la viscosité dynamique du sang approximé par une loi de puissance [un. arb.]
- f : fréquence d'insonification [MHz]
- g : Fonction du temps représentant un signal
- i : Unité imaginaire ($\sqrt{-1}$)
- p : Pression causée par le transducteur [Pa]
- s_{10} : Index d'agrégation érythrocytaire après 10 s sans écoulement. Calculé par agrégométrie laser [un. arb.]
- s_{60} : Index d'agrégation érythrocytaire après 60 s sans écoulement. Calculé par agrégométrie laser [un. arb.]
- v_{max} : Vitesse maximale de flux dans un écoulement dans un tube cylindrique [cm/s]
- t : Variable de temps [s]
- z : Impédance acoustique d'un tissu [Rayl] ou [Pa s/m]

- A : Aire au-dessus de la courbe d'un syllectogramme [un. arb.]
- A_A : Fonction de transfert de l'atténuation du tissu en transmission
- A_R : Fonction de transfert de l'atténuation du tissu en réception
- AI_{visco} : Index d'agrégation érythrocytaire calculé par viscosimétrie [un. arb.]
- B : Aire au-dessous de la courbe d'un syllectogramme [un. arb.]
- BSC : Fonction de transfert de la diffusion causée par le tissu. Le BSC est le composant central de l'analyse spectrale ultrasonore. Il dépend de la taille et l'organisation spatiale du tissu.
- BSC_{att} : BSC sous l'effet de l'atténuation du tissu.
- C : Fonction de transfert causé par le post-traitement du signal ultrasonore pour l'affichage
- CMUT : Type de transducteur qui utilise les changements de capacitance pour induire des ondes acoustiques. Après l'anglais *Capacitive micromachined ultrasonic transducers*.
- D_A : Fonction de transfert de la diffraction causée par le tissu en transmission
- D_N : Fonction de transfert du processus de détection de signal ultrasonore
- D_R : Fonction de transfert de la diffraction causée par le tissu en réception
- E : Fonction de transfert de l'excitation électrique appliqué au transducteur
- G_A : Fonction de transfert de la réponse du transducteur en transmission
- G_R : Fonction de transfert de la réponse du transducteur en réception
- Q : Vitesse volumétrique d'un flux [cm^3/s]
- L : Fonction de transfert des filtres appliqués dans le post traitement des signaux ultrasonores
- PER : Fragments d'images dans lesquels la région d'intérêt (ROI) est découpée pour l'analyse spectrale. D'après l'expression anglaise *parameter estimation region*.
- R_1 : Rayon du cylindre interne d'un système de Couette [cm]
- R_2 : Rayon du cylindre externe d'un système de Couette [cm]
- ROI : Région d'intérêt d'une image. D'après l'expression anglaise *Region of interest*
- R_B : Fonction de transfert de la formation du faisceau ultrasonore en réception
- S : Spectre de puissance d'un signal temporel
- SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique. D'après l'expression anglaise *Systemic inflammatory response syndrome*
- X_B : Fonction de transfert de la formation du faisceau ultrasonore en transmission

À Melba, Santiago et Luna

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma gratitude vers Guy Cloutier qui m'a témoigné la confiance pour entreprendre ce projet d'envergure et qui m'a encadré pour six ans. Un gros merci aussi à Yves Goussard qui a codirigé cette thèse, mais qui m'a aussi encouragé et soutenu pendant les moments de crise scientifique et professionnel.

Un remerciement spécial à François Destremes avec qui j'ai eu la fortune de travailler en plusieurs projets. J'ai beaucoup appris de sa persévérance, rigueur scientifique et talent. Un grand merci à Louise Allard qui n'a jamais perdu la confiance en moi et qui m'a appuyé dans tous les expériences, les démarches administratives et financières.

Merci aussi à Boris Chayer à qui je dois la plupart de ma formation en techniques de laboratoire et le goût pour la recherche expérimentale.

Un gros merci aux personnes qui m'ont formé au début et à qui je dois la passion pour l'agrégation érythrocytaire et les ultrasons quantitatifs : Julien Tripette, Ali Traore, Émilie Franceschini et Michael Oelze.

Merci aussi à tous les membres du LBUM qui m'ont accompagné et guidé pendant cette thèse : Arnaud, Damien, Marie-Hélène, Jonathan, Siavash, Abdel, Romain, Daniel, Pol, Julia, Simon, Sarah, Pierre et tous les autres qui ont contribué directement ou indirectement à ces travaux.

Merci à mes parents et à ma famille en Colombie et un peu partout dans le monde. Cette thèse est une mission de plus de 25 ans accomplie par vous.

Finalement, un spécial remerciement à ceux qui m'ont donné l'envie de me dépasser, de chercher plus loin. Ce sont ces trois personnes qui m'ont soutenu moralement, émotivement et même financièrement. Ce sont eux qui ont dû endurer mes angoisses, mes changements d'humeur, mes absences, mais aussi qui se sont réjouis avec moi des succès de ma recherche scientifique. Merci *Melba, Santiago et Luna*. Comme je vous ai toujours dit : « *Ustedes pueden ser lo que se propongan* ». Voici un rêve devenu réalité.

Chapitre 1 Contexte clinique et hémorhéologique

1.1. Rationnelle clinique

L'inflammation est la réponse immunitaire coordonnée des tissus aux agressions qui vise à maintenir ou à restaurer leur intégrité (Raja and Dreyfus 2005; Warltier et al. 2002b). L'inflammation peut être causée par plusieurs types d'insultes comme des infections, des traumatismes, des blessures thermiques ou des processus inflammatoires stériles (Levy et al. 2003). Bien que la réaction inflammatoire soit généralement bénéfique et réversible, elle peut devenir disproportionnée. On parle alors du syndrome de réponse inflammatoire systémique (ou SIRS par son acronyme en anglais). Pendant un processus inflammatoire, les globules blancs libèrent des cytokines, des protéines qui agissent comme un messageur moléculaire pour déclencher la réponse immunitaire et neutraliser la cause d'inflammation. Cependant, quand la réaction inflammatoire est disproportionnée une cascade d'événements s'installe et peut conduire au décès du patient. Une des possibilités de réaction est que les cytokines inflammatoires augmentent la force d'attraction entre les érythrocytes qui se regroupent en agrégats. Ces structures volumineuses augmentent la viscosité du sang, ce qui rend difficile son accès aux capillaires et diminue la perfusion des tissus. Avec moins d'oxygène, la fonction cellulaire est réduite, ce qui peut induire la défaillance d'organes et ultimement la mort du patient. Cependant, les risques associés à l'inflammation peuvent être diminués si la réaction disproportionnée est détectée et traitée rapidement (Warltier et al. 2002b).

Couramment, le diagnostic du SIRS se fait en surveillant des critères cliniques comme la température corporelle, la fréquence cardiaque, le rythme respiratoire et la leucocytémie (Hirai 2003). L'anomalie dans deux ou plus de ces critères est considérée comme un cas de SIRS. Néanmoins, il a été démontré que ces marqueurs manquent grandement de spécificité et des marqueurs biochimiques sont généralement utilisés, soit : la quantification des protéines C-réactive (CRP), l'interleukine 6 (IL-6), le TNF-alpha et la procalcitonine (Levy et al. 2003; Tang et al. 2007; Tripette et al. 2013). Ces marqueurs quantifiés sur des échantillons sanguins appartiennent aux protéines de phase aiguë impliquées et permettent de déterminer le stade inflammatoire du patient. Cependant, le temps nécessaire à cette quantification représente encore un défi technique à surmonter et ne permet pas une intervention rapide, le cas échéant.

Un autre marqueur utilisé en clinique pour le diagnostic de SIRS est le taux de sédimentation des érythrocytes (ou ESR pour le sigle en anglais *Erythrocyte sedimentation rate*). Cette analyse consiste à mesurer la vitesse de séparation des globules rouges du plasma d'un échantillon sanguin (Baskurt et al. 2011c). La vitesse de sédimentation se corrèle avec la présence de protéines inflammatoires. En effet, ces protéines ont l'effet d'augmenter la tendance d'agglutination des globules rouges qui se sédimentent plus rapidement sous l'effet de son agrégation. L'ESR est encore utilisée en clinique, mais sa pratique est considérée par certaines communautés comme une méthode archaïque et une réponse tardive (Epstein et al. 1999; Warltier et al. 2002b). Cependant, l'effet de l'agrégation érythrocytaire peut se détecter de façons différentes à la sédimentation. Dans ces travaux de doctorat, on exploitera l'interaction des globules rouges avec les ultrasons pour s'approcher de délais de réponse près du temps réel et sans nécessiter d'échantillons sanguins.

En résumé, en addition aux problèmes spécifiques liés à chaque test, toutes les analyses sanguines partagent une problématique commune : elles impliquent un échantillonnage sanguin fréquent et des délais associés aux analyses de laboratoire. Ceci se fait au détriment de l'automatisation des mesures d'évaluation du patient et peut retarder le diagnostic et le traitement adéquat associé.

1.2. Notions d'hématologie

Le sang est un fluide composé d'une solution aqueuse, appelé le plasma, et d'un contenu cellulaire comprenant les globules rouges, les leucocytes et les plaquettes (Figure 1.1). Le plasma est une solution tampon contenant des protéines (c.-à-d., fibrinogène, albumine), des ions inorganiques (c.-à-d., sodium, calcium) et des nutriments (c.-à-d., carbohydrates, lipides, acides aminés) (Arthur and Luciano 2000). Les globules rouges, ou érythrocytes, comptent pour 98-99% du contenu cellulaire du sang et sont les cellules sanguines les plus nombreuses (autour de 5 millions de cellules par mm^3). Les globules rouges assurent le transport d'oxygène à tous les tissus et organes du corps. Les leucocytes, ou globules blancs, sont responsables des processus immunitaires comme la phagocytose et la sécrétion d'anticorps. Finalement, les plaquettes assurent l'hémostase, c.-à-d. le processus physiologique activant la cascade de coagulation du sang pour empêcher le saignement lors de blessures.

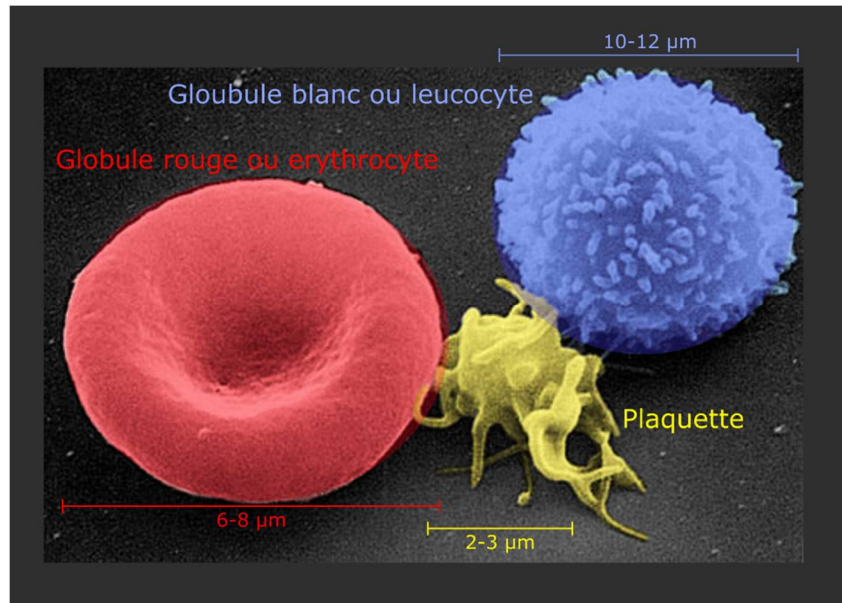


Figure 1.1 Image de microscopie électronique des cellules sanguines. De gauche à droit: Globule rouge, plaquette (activée) et globule blanc. La taille du globule blanc n'est pas à l'échelle. Image adaptée de NCI-Frederick.

Le volume de globules rouges par rapport au volume de sang est connu comme l'hématocrite (Figure 1.2). L'intervalle normal d'hématocrite pour les adultes dépend du sexe du donneur et est de 40 à 50% et de 36 à 46% respectivement pour les hommes et les femmes, (Rampling 2007). Chez d'autres espèces animales, l'intervalle normal d'hématocrite diffère de celui de l'humain, mais sa moyenne et écart type sont souvent de $40 \pm 5\%$ (Hawkey et al. 1991). L'hématocrite est une propriété déterminante du sang. D'un point de vue fonctionnel, une déficience de globules rouges amènerait à une anémie. Contrairement, un hématocrite trop élevé est associé à l'hyperviscosité du sang. Dans les deux cas, le transfert d'oxygène aux tissus est affecté et peut dériver en problèmes comme la fatigue chronique ou de maladies majeurs, comme la défaillance d'organes.

L'hématocrite affecte plusieurs propriétés du sang comme sa viscosité (Section 1.4.2), le niveau d'agrégation des globules rouges (Section 1.3) et l'interaction avec les ultrasons, notamment la diffusion acoustique (Section 2.3). Pour cette raison, pour les études *ex vivo*, il est recommandé d'ajuster l'hématocrite à une valeur standard (normalement de 40%) en utilisant

du plasma autologue, après centrifugation de l'échantillon (c.-à-d. qui vient du même donneur) (Baskurt et al. 2009).

Une méthode classique pour calculer l'hématocrite est la micro centrifugation des échantillons de sang en capillaires de verre. Due à la différence de masse volumique des globules rouges, les leucocytes et le plasma, il y a une excellente séparation de ses phases, ce qui facilite sa lecture (Figure 1.2). Cependant, des méthodes plus modernes incluent l'estimation du nombre de globules rouges multiplié par le volume moyen de la cellule.

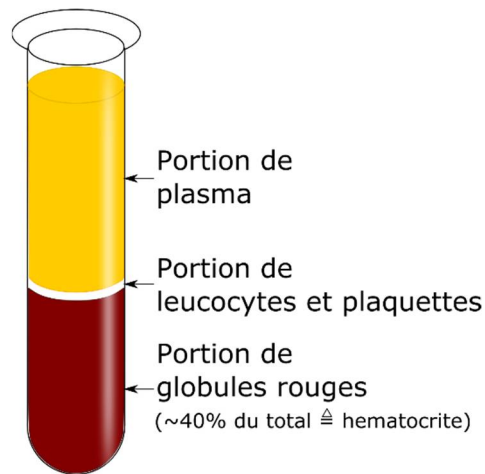


Figure 1.2 Macro composition du sang. Après centrifugation le sang se sépare en ses trois composantes principales : plasma, couche leucocytaire (ou « buffy coat ») et globules rouges.

L'hématocrite correspond à la fraction volumique occupée par les globules rouges. Chez l'humain l'hématocrite typique est de 40%.

1.3. L'agrégation érythrocytaire

Les globules rouges des mammifères ont une tendance naturelle à se regrouper lorsque le sang est stagné ou sous l'effet d'un faible écoulement. La présence d'une molécule agrégante dans le plasma est requise pour la formation d'agrégats. Auparavant, certains supposaient que c'était le poids moléculaire de la molécule (supérieur à de plus de 30 kDa) qui déterminait son effet agrégant. Néanmoins, des rapports contradictoires font penser que cette caractéristique n'est pas suffisante pour induire l'agrégation (Baskurt et al. 2011d). Il est accepté maintenant que le rayon hydrodynamique est un meilleur critère pour distinguer des molécules qui induisent l'agrégation (Armstrong et al. 2004). En général, des molécules de plus de 4 nm de rayon

hydrodynamique induisent une agrégation augmentée et contrairement, des molécules plus petites que ce seuil l'inhibent.

En conditions physiologiques normales, ce sont les macro-protéines suspendues dans le plasma, comme le fibrinogène, l'haptoglobine et les immunoglobulines, qui induisent l'agrégation (Weng et al. 1996a). Dans ces cas, c'est la concentration de la protéine qui se corrèle positivement avec la force d'attraction intercellulaire et le niveau d'agrégation érythrocytaire. Étant donné que la concentration du fibrinogène et de l'haptoglobine est augmentée lors de la phase aiguë de l'inflammation (Weng et al. 1996a), l'agrégation érythrocytaire sert comme un marqueur indirect d'inflammation.

Lorsque les conditions sont propices, le regroupement de globules rouges s'effectue en deux phases. Pendant la première phase (pendant les premières 15 s approximativement), les globules rouges forment des structures similaires à des piles de monnaies, dénommées rouleaux. Par la suite, durant la deuxième phase (de 15 à 60 secondes après le début de l'agrégation), les rouleaux se plient et s'associent entre eux, en formant des amas tridimensionnels d'érythrocytes. Après environ 40-120 s, les globules rouges arrivent à un état d'équilibre où ils ne grandissent ni ne rétrécissent pas. Lorsqu'une force de séparation est appliquée (par exemple une force de cisaillement), les agrégats perdent des globules rouges et arrivent à une taille d'équilibre en accord avec la force appliquée. Si cette force est assez grande, les agrégats peuvent être complètement défaits. Les globules rouges sont alors disponibles pour recommencer le cycle d'agrégation à nouveau. Contrairement à l'agrégation, la désagrégation survient quasi instantanément (en moins de 1.5 s après l'application de la force).

1.4. Conditions affectant l'agrégation érythrocytaire

L'agrégation érythrocytaire est un phénomène transitoire qui dépend de plusieurs facteurs extrinsèques et intrinsèques du sang. Les facteurs intrinsèques peuvent être séparés en facteurs plasmatiques ou cellulaires. Le premier fait référence à la présence de macromolécules suspendues dans le plasma, pendant que le deuxième réfère à des propriétés membranaires des globules rouges. Il est accepté que la présence de macromolécules dans le plasma, notamment le fibrinogène à des concentrations pathologiques, est la cause intrinsèque la plus importante

causant l'hyper-agrégation. D'autres paramètres comme la rigidité des globules rouges, se corrént négativement avec l'agrégation érythrocytaire. La forme biconcave des globules rouges, typiques des mammifères (Figure 1.1) est une condition pour l'agrégation (Cicha et al. 2003). Également, l'augmentation de l'hématocrite favorise la formation d'agrégats érythrocytaires (Baskurt et al. 2007).

Parmi les facteurs extrinsèques au sang se démarquent la température et l'écoulement du sang. En effet, il a été reporté qu'avec de moindres températures (entre 10 à 20 °C) l'agrégation de globules rouges augmente (Neumann et al. 1987). Cependant, à des températures corporelles stables (36 – 38°C) la température n'affecte pas significativement l'agrégation d'érythrocytes. Physiologiquement, le cisaillement est la force principale qui empêche la formation d'agrégats de façon non permanente. Le terme cisaillement fait référence à une force mécanique qui s'applique de façon parallèle à la surface d'un matériel. Lors d'un écoulement sanguin sans turbulence, le sang se déplace en couches qui circulent à différentes vitesses. Ce type de circulation se dénomme flux laminaire. La friction créée par ces couches implique l'apparition de forces de cisaillement qui affectent la formation d'agrégats d'érythrocyte. En hémorhéologie, le cisaillement est mesuré par la variable $\dot{\gamma}$ (ou taux de cisaillement), défini comme :

$$\dot{\gamma} = \frac{\partial v}{\partial x}, \quad (1.1)$$

où, v est la vitesse du fluide et x est la hauteur de la zone cisailée. L'unité de mesure est 1/s, communément lue comme seconde inverse. Intuitivement, le cisaillement moyen sera augmenté si la vitesse d'écoulement est augmentée.

En général, le taux de cisaillement est inversement proportionnel à la formation d'agrégats de globules rouges. Cependant, à très faible cisaillement (inférieur à 1 s⁻¹) l'effet est contraire et l'agrégation augmente. Ce phénomène s'explique par l'intensification de collisions des globules rouges sans la force de séparation nécessaire pour distancer les globules déjà agrégés (Shehada et al. 1993). Également, le taux de cisaillement requis pour défaire tous les agrégats dépend des forces d'attraction intercellulaires de chaque échantillon. Par exemple, des cisaillements plus fort que 500 s⁻¹ seraient nécessaires pour défaire des agrégats des échantillons

équins, une des espèces animales avec l'agrégation érythrocytaire la plus forte (Weng et al. 1996b).

Le cisaillement dépend grandement du type d'écoulement auquel l'échantillon est soumis. En hémorhéologie deux écoulements se démarquent : l'écoulement de Couette et l'écoulement de tube cylindrique. Le premier s'utilise couramment en les montages *ex vivo* car il permet d'étudier l'effet d'un seul type de cisaillement à la fois, comme l'on verra dans la section suivante. L'écoulement de tube cylindrique modélise quant à lui le flux sanguin qui se produit dans le système vasculaire humain. Il présente un niveau de complexité supérieur à cause de la présence de plusieurs vitesses et de taux de cisaillement tout le long du diamètre du vaisseau. Cet écoulement est introduit dans la section 1.4.2.

1.4.1. L'écoulement de Couette

L'écoulement de type Couette est le modèle qui sera utilisé dans les études *ex vivo* du sang de cette thèse. Cet écoulement fait référence à celui induit dans un fluide placé entre deux surfaces parallèles dont une est en mouvement par rapport à l'autre. En hémorhéologie, une géométrie de Couette courante est celle de deux cylindres concentriques de taille similaire (Figure 1.3a). Les couches de sang les plus près du cylindre en rotation circulent plus rapidement que celles proches du cylindre statique (Figure 1.3b). L'écoulement de Couette se caractérise pour induire un seul taux de cisaillement en l'échantillon, ce qui le rend propice pour les études rhéologiques à cisaillement constant. Dans ce type de géométrie, le taux de cisaillement est déterminé par (Zimmer 2002) :

$$\dot{\gamma} = \frac{4\pi R_1 R_2}{R_2^2 - R_1^2} \Omega, \quad (1.2)$$

où R_1 et R_2 sont les rayons des cylindres interne et externe, respectivement; Ω est la vitesse de rotation du cylindre tournant, exprimé en rev/s.

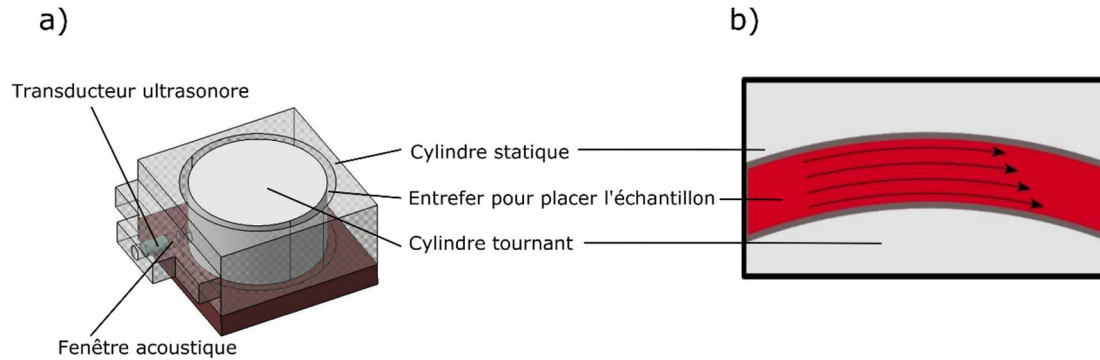


Figure 1.3 Écoulement de Couette. a) Dispositif de Couette avec deux cylindres concentriques
 b) La longueur des flèches représente la vitesse de chaque couche de sang. Cependant, la différence de vitesse entre chaque couche et la suivante est constante, ainsi un seul cisaillement est induit dans l'entrefer. Adapté de (Nguyen et al. 2008)

1.4.2. L'écoulement de tube cylindrique

Un deuxième type d'écoulement est celui de tube cylindrique. Couramment, les flux veineux et artériel sont modélisés comme ce type d'écoulement. Lors des études de l'agrégation érythrocytaire *in vivo* de cette thèse, le taux de cisaillement sera évalué en utilisant ce modèle. L'écoulement de tube cylindrique est caractérisé par des couches concentriques de fluide qui circulent à vitesses variant de son maximum (au centre du vaisseau), à un minimum (trouvé près des parois du vaisseau) (Figure 1.4, courbe blanche). Comme observé dans la figure, les vitesses varient peu dans la région centrale du vaisseau, ce qui induit un taux de cisaillement très faible (Figure 1.4, courbe orange). Également, près des parois du vaisseau le flux est presque nul, ce qui accentue la différence de vitesses et induit le cisaillement le plus fort.

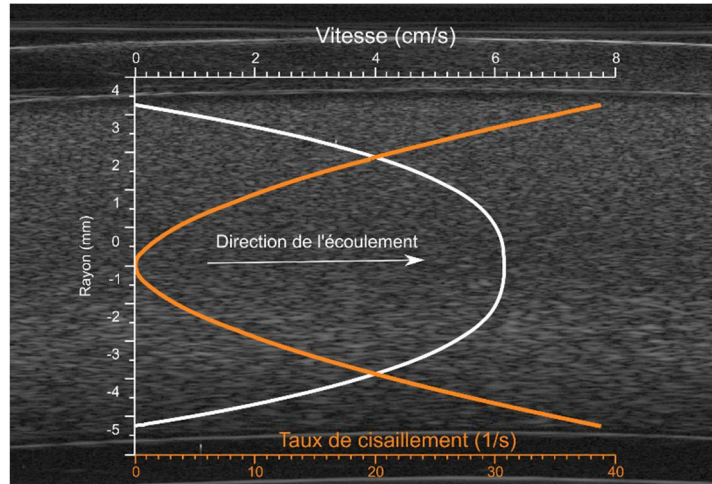


Figure 1.4 Coupe longitudinale d'un écoulement de tube cylindrique. Les couches dans l'axe du tube circulent à vitesse maximale. Les couches près des parois ont une vitesse de zéro. Inversement, le cisaillement induit dans le centre du vaisseau est zéro et maximale près des parois.

Description de l'écoulement

Dans l'expérimentation de cette thèse, il sera nécessaire d'estimer le cisaillement subi par le sang à l'intérieur d'un vaisseau. Comme on verra, le cisaillement est aussi relié à la viscosité du fluide et des modèles plus complexes seront introduits.

L'apparition de microstructures de taille considérable, comme les agrégats érythrocytaires, a comme conséquence une augmentation de la viscosité du sang. Comme l'ajout d'une contrainte de cisaillement défait partiellement ou totalement les agrégats, la viscosité du sang dépend du cisaillement appliqué. Ainsi, à l'intérieur d'un vaisseau sanguin, la viscosité du sang est variable et dépend de sa distance aux parois. Ce comportement rhéofluidifiant est connu comme étant un comportement non newtonien. Contrairement, un fluide newtonien est celui dont la viscosité ne dépend pas du cisaillement. Tel est le cas de l'eau.

Une autre conséquence de la propriété non newtonienne du sang est son profil de vitesses en écoulement qui ne suit pas une forme parabolique (courbe blanche de la Figure 1.4). Les profils de vitesse ayant un profil parabolique sont caractéristiques des fluides newtoniens et peuvent être décrits entièrement par la loi de Poiseuille :

$$Q = \frac{\pi P r^4}{8 \eta l}. \quad (1.3)$$

Dans l'équation précédente, Q représente la vitesse volumique du fluide (mesurée en ml/s); P est la pression exercée par la pompe; r est le rayon du tube; η est la viscosité du fluide et l est la largeur du tube. Malheureusement, cette modélisation n'est pas précise pour le sang où la viscosité, η , varie pour chaque taux de cisaillement et position dans le tube.

Pour modéliser le flux en écoulement tubulaire d'un fluide non newtonien comme le sang, il est nécessaire de modéliser d'abord la fonction de viscosité dynamique. Un modèle courant en hémorhéologie est la loi de puissance d'Ostwald-De Waele:

$$\eta(\dot{\gamma}) = a_{visco} \cdot (-\dot{\gamma})^{b_{visco}+1}, \quad (1.4)$$

Où a_{visco} et b_{visco} sont les coefficients d'approximation. Ces coefficients peuvent être estimés expérimentalement *ex vivo* à l'aide d'un viscosimètre capable d'évaluer de très bas et de très hauts cisaillements. Des valeurs de référence évaluées au LBUM chez des sujets sains sont montrées à la Table 1.1.

Table 1.1 Approximation de la viscosité dynamique du sang de deux espèces en utilisant la loi de puissance d'Ostwald-De Waele

	a_{visco}	b_{visco}
Humain (4 sujets)	17.52 ± 4.88	-0.33 ± 0.07
Porc (6 sujets)	46.1 ± 7.31	-0.42 ± 0.03

En supposant que le flux est constant et laminaire et en appliquant l'équation de Navier-Stokes, on peut estimer le taux de cisaillement à une position radiale spécifique, r , en utilisant

$$\dot{\gamma}(r) = \left(-\frac{1}{2a_{visco}} r \partial_z P \right)^{\frac{1}{b_{visco}+1}} \quad (1.5)$$

Où $\partial_z P$ est le gradient de pression défini comme

$$\partial_z P = -2a_{visco} \cdot \left(\frac{Q \cdot (3b_{visco}+4)}{\pi (b_{visco}+1) r^{\frac{3b_{visco}+4}{b_{visco}+1}}} \right)^{b_{visco}+1}. \quad (1.6)$$

Dans l'équation 1.6, Q est défini en fonction de la vitesse d'écoulement maximale, v_{max} , qui se produit sur l'axe central du tube. Formellement,

$$Q = \pi \cdot v_{max} \cdot r^2 \cdot \frac{b_{visco} + 2}{3b_{visco} + 4}. \quad (1.7)$$

Ce développement est très puissant parce qu'il habilite la description du flux avec peu de variables. En effet, en connaissant des approximations de la viscosité du sang de la Table 1, le rayon du vaisseau et la vitesse maximale du flux (mesurés expérimentalement à l'aide de méthodes échographiques comme le Doppler ou le PIV), il est possible d'estimer le taux de cisaillement dans tous les rayons du tube.

Finalement, au lieu de décrire l'ensemble de taux de cisaillement dans le vaisseau, il est convenable d'avoir une valeur représentative. Comme la distribution de cisaillements de ce type d'écoulement n'est pas gaussienne, le cisaillement médian est une valeur plus représentative de sa population que sa moyenne. Alors, dans le reste de cette thèse on rapportera le cisaillement médian comme la valeur représentative.

En utilisant cette définition, la Figure 1.5 montre le cisaillement médian dans un tube de rayon de maximum 1.5 mm. Cette taille correspond à la taille type d'une veine antébrachiale médiane située dans l'avant-bras humain. Ce type de carte est d'utilité lorsqu'un examen médical requiert un cisaillement au-dessous d'un seuil minimal (voir Chapitre 5).

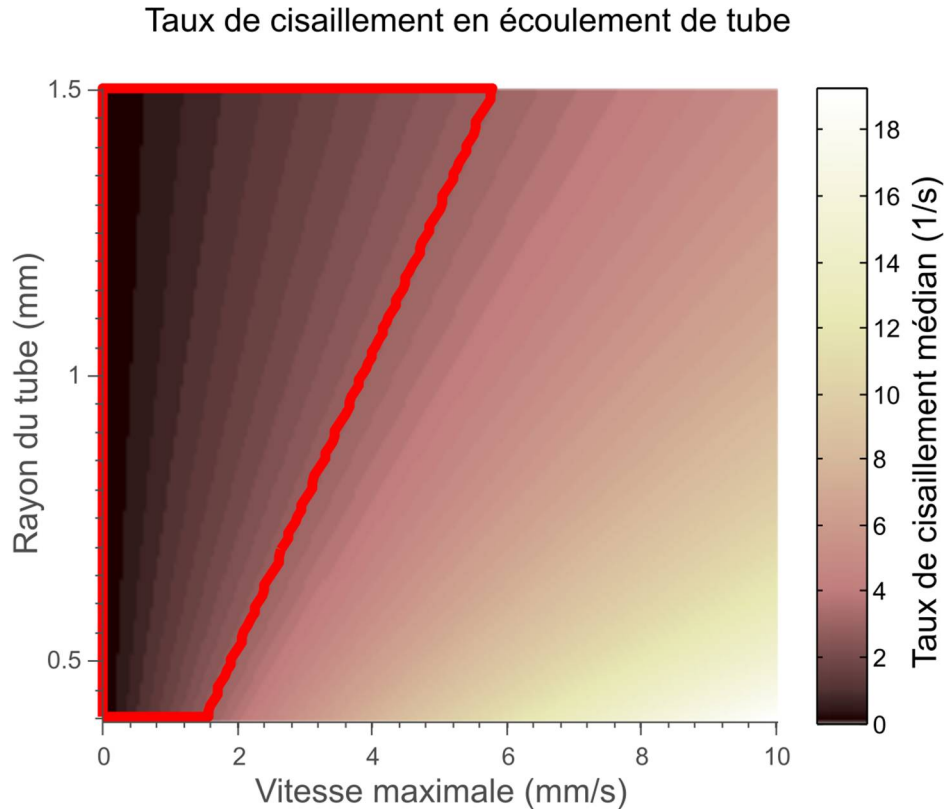


Figure 1.5 Taux de cisaillement médian en écoulement de tube. Les rayons représentés correspondent à la taille type d'une veine antébrachiale médiane. Le cadre rouge indique les régions pour lesquelles le taux cisaillement est inférieur à 3 1/s.

1.5. Mesures de l'agrégation érythrocytaire

Depuis la première description de l'agrégation érythrocytaire par Robin Fåhræus en 1929 (Fåhræus 1929), plusieurs techniques pour sa mesure sont apparues. Plusieurs de ces techniques sont quantitatives, mais la plupart d'entre elles mesurent des effets indirects découlant de l'agrégation et non du phénomène en soit. Généralement, toutes les techniques requièrent que l'hématocrite de l'échantillon soit normalisé à 40% avec du plasma autologue. Ceci se fait pour pallier l'effet proagrégant d'un hématocrite plus fort.

Trois caractéristiques d'intérêt clinique du sang sont généralement évaluées. Premièrement, la taille moyenne de l'agrégat mesuré en quantité de globules rouges par agrégat. Deuxièmement, le temps de formation, nommé formellement comme la cinétique de formation d'agrégats. Finalement, la force intercellulaire d'attraction, mesurée couramment comme le taux de cisaillement requis pour la séparation totale ou partielle de l'agrégat.

1.5.1. Taux de sédimentation érythrocytaire ou ESR

Les érythrocytes ont une masse volumique légèrement plus élevée que le plasma. En conséquence, ils ont une tendance à sédimenter lorsque le sang est en repos. La formation d'agrégats d'érythrocytes accélère la sédimentation et se corrèle positivement avec la taille des agrégats. Cette observation découle des travaux pionniers de Robin Fåhræus sur la séparation du sang (Fåhræus 1929). La méthode standardisée de Westergreen requiert des échantillons de sang de 1 à 10 mL anticoagulés avec du EDTA et mis en tubes calibrés. Une attente d'une heure est requise pour observer la distance de séparation du plasma et des globules rouges causée par la sédimentation. Cette procédure est reconnue en clinique comme un marqueur sensible et positivement corrélé au stade d'inflammation du patient. Cependant, peu de cliniciens connaissent le lien entre agrégation érythrocytaire et sédimentation. Néanmoins, la communauté clinique considérait cette méthode de diagnostic de l'inflammation comme archaïque déjà en 2002 (Warltier et al. 2002b).

1.5.2. Syllectométrie ou agrégométrie photométrique

L'agrégométrie photométrique est la technique de référence acceptée pour la communauté d'hémorhéologie (Baskurt et al. 2007). Communément appelée agrégométrie laser, elle utilise la relation entre le sang et la lumière, soit les effets de rétrodiffusion ou de transmission. En effet, lorsque la lumière trouve un échantillon de sang désagrégé, la plupart de la lumière est réfléchi à cause de la densité du nombre élevée d'érythrocytes. Contrairement, au fur et à mesure que l'agrégation se produit, beaucoup de cellules sont attrapées dans les agrégats et plus d'espaces intercellulaires sont créés. Ceci permet une transmission plus élevée de la lumière (Dobbe et al. 2003).

Les agrégomètres photométriques requièrent un échantillon de sang de 1 mm³, approximativement. L'échantillon est placé à l'intérieur d'un système de Couette (voir Section 1.4.1) pour lequel la température est contrôlée. Normalement, les mesures se font à 37°C pour imiter la température physiologique. L'appareil induit initialement un très fort taux de cisaillement ($\sim 500 \text{ s}^{-1}$) sur l'échantillon pendant 10 secondes pour désagréger le sang et commencer avec un état contrôlé d'agrégation. Ensuite, il arrête subitement le cisaillement et mesure la lumière réfléchi ou transmise pendant les deux premières minutes d'agrégation. Avec

cette information, l'appareil crée un profil temporel du niveau de lumière lorsque l'agrégation se produit. La courbe créée avec cette méthode est connue comme *sylllectogramme* et décrit simultanément la cinétique et la taille de l'agrégation. Le sylllectogramme de rétrodiffusion de la lumière décrit la diminution de lumière captée par le senseur optique lorsque l'agrégation survient (Figure 1.6). Après approximativement 30-40 s l'agrégation atteint un état d'équilibre et la courbe devient statique. Lorsque l'agrégation érythrocytaire est forte, comme c'est le cas chez le cheval (Figure 1.6b), la courbe atteint son équilibre rapidement, ce qui a comme conséquence que l'aire sur la courbe soit plus importante que celle d'une agrégation plus faible, par exemple celle chez l'humain (région A de la Figure 1.6a).

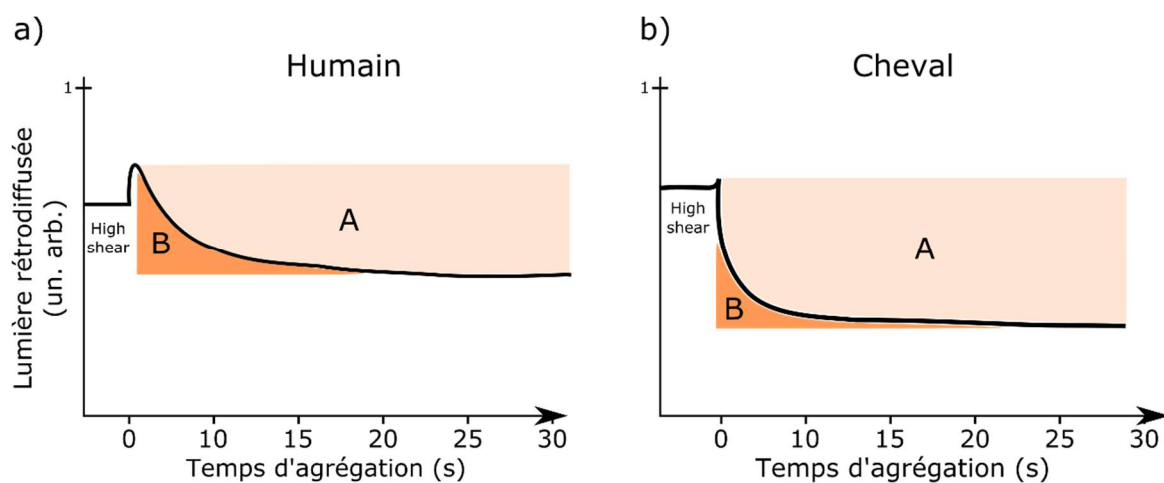


Figure 1.6 Exemples de sylllectogrammes de rétrodiffusion de la lumière. a) Échantillon sanguin humain b) Échantillon sanguin équine

Un agrégomètre photométrique comme le Regulest (Florange, France) calcule un index d'agrégation en comparant les aires relatives sur et sous la courbe (Figure 1.6), pendant une quantité de temps déterminée, normalement les premières 10 ou 60 secondes, comme suit (Baskurt et al. 2011c):

$$s_{10} = \frac{A}{A + B} * 100. \quad (1.8)$$

Dans l'équation (1.8), s_{10} correspond à l'index d'agrégation calculé après 10 s de l'arrêt du cisaillement. A et B sont les aires du sylllectogramme sur et sous la courbe. Notez que ces aires

sont relatives aux points supérieurs et inférieurs de lumière réfléchi. En conséquence, la mesure ne dépend pas du niveau initial de lumière appliqué.

En contrôlant le cisaillement appliqué, l'agrégomètre peut également trouver le seuil de dissociation partiel et total, c.-à-d., les taux de cisaillement auxquels l'échantillon réfléchit la moitié ou la même lumière que celle reçue lors de l'état de désagrégation, mesuré au début.

1.5.3. Viscosité à faible et fort cisaillement

Comme présentée dans la section 1.4.2, l'agrégation érythrocytaire provoque une augmentation de la viscosité du sang. Lorsque le sang est soumis à un fort taux de cisaillement (entre 100-500 s⁻¹), sa viscosité dépend principalement de celle du plasma due à l'empêchement de la formation d'agrégats. Contrairement, lorsque le taux de cisaillement est très faible (inférieure à 1 s⁻¹), la viscosité du sang est dominée par le niveau d'agrégation érythrocytaire. Un index d'agrégation peut se calculer en normalisant la viscosité sanguine dépendant de l'agrégation par celle qui dépend de la viscosité du plasma, comme suit :

$$AI_{visco} = \frac{\eta_L - \eta_H}{\eta_H} * 100. \quad (1.9)$$

Dans l'équation (1.9), η_L et η_H représentent les viscosités dynamiques à faible et fort cisaillement, respectivement. Une erreur commune est de considérer des taux de cisaillement de 5 à 10 s⁻¹ comme de faibles cisaillements. Pour cette valeur, les lignes directrices de la communauté hémorhéologique suggèrent un cisaillement de 1 s⁻¹ (Baskurt et al. 2009).

1.5.4. Analyse d'images de microscope

L'agrégation érythrocytaire est observable par microscopie lorsque l'hématocrite est très faible (inférieur à 3%). Dans ce cas, il est possible de compter la quantité de globules rouges par agrégats ou de comparer les aires intercellulaires libres à celles occupées par les agrégats. Un index typique d'agrégation est le MAI (pour l'expression anglaise *Microscopic aggregation index*). Pour le calculer, deux préparations sont nécessaires, la première en plasma autologue et la deuxième dans un milieu non agrégeant comme le PBS. Les deux préparations doivent être calibrées pour avoir exactement un hématocrite de 1%. La première étape consiste à calculer la quantité moyenne de globules rouges par unité d'aire. Ceci se fait en comptant les globules

rouges dans la suspension non agrégante. La deuxième partie se fait en comptant les unités cellulaires (c.-à-d., globules rouges ou des agrégats de toutes les tailles) dans la suspension avec du plasma. L'index MAI est calculé en divisant la quantité d'unités cellulaires par la quantité totale de globules rouges. Lorsque l'agrégation est nulle, cet index est égal à 1 (Baskurt et al. 2011c). De nouvelles techniques sont proposées pour l'automatisation de la mesure, mais en général, toutes utilisent un algorithme pour compter les unités cellulaires ou les aires occupées.

Cette méthode est la seule technique directe de mesure de l'agrégation érythrocytaire dans le sens qu'elle donne une valeur précise de globules rouges par agrégats. Cependant, le faible hémocrite requis fait que ces résultats ne soient pas directement transférables aux valeurs trouvées *in vivo*.

1.5.5. Propriétés électriques

L'impédance et la capacitance électrique du sang sont directement liées à l'agrégation érythrocytaire. Les deux valeurs sont généralement réduites lorsque l'agrégation survient. C'est ainsi que certains auteurs ont proposé une analyse similaire à celui des syllectogrammes utilisés dans les mesures photométriques (Baskurt et al. 2010). L'autre grand avantage de cette technique est de pouvoir faire de mesures *in vivo* et possiblement en temps réel. En effet, l'impédance électrique du sang a été utilisée en clinique pour surveiller *in vivo* la viscosité du sang comme un marqueur d'inflammation dans le contexte de chirurgie cardiaque (Pop et al. 2004; Pop et al. 2013).

1.5.6. Rétrodiffusion ultrasonore

Bien que les agrégats érythrocytaires soient de taille insuffisante pour être observés dans une image échographique, ils laissent une signature spectrale identifiable lors de l'analyse du signal acoustique rétrodiffusé du sang. Alors, en ajustant un modèle de diffusion ultrasonore au spectre reçu, il est possible d'obtenir des paramètres quantitatifs qui permettent la caractérisation des agrégats de globules rouges. Le principal avantage de cette technique est la possibilité de l'appliquer *in vivo* et de façon non invasive. Les principes physiques et le développement théorique des modèles du signal ultrasonore sont introduits dans le Chapitre 3 de cette thèse. Le développement d'une technique *in vivo* pour mesurer l'agrégation érythrocytaire est un sujet principal de ces travaux et s'introduit dans les Chapitre 5 et Chapitre 6 de ce manuscrit.

1.6. Importance clinique de l'évaluation immédiate de l'agrégation érythrocytaire

L'augmentation soudaine de l'agrégation érythrocytaire est couramment associée à des cas aigus d'inflammation. Au-delà de la surveillance de patients en chirurgies majeures, d'autres contextes nécessitant une évaluation immédiate de l'état inflammatoire peuvent bénéficier de lectures rapides de ce marqueur. Des exemples de ceci comprennent l'évaluation de la septicémie aux unités d'urgence (Reggiori et al. 2009), le syndrome d'hyperviscosité sanguin (Lacerda et al. 2017) et la sélection des donneurs de greffons (Avlonitis et al. 2005).

Au-delà de la détection de l'inflammation, l'agrégation des érythrocytes est également un déterminant pronostique de la formation de thrombus (Yu et al. 2011). Comme mentionné précédemment, l'hyperagrégation érythrocytaire entraîne une augmentation de la viscosité sanguine à faible cisaillement. Ceci implique qu'à des endroits de faible écoulement dans l'arbre vasculaire, le sang exercera un stress mécanique plus élevé sur les parois vasculaires et éventuellement pourrait les endommager. À la fois, une blessure sur la paroi déclenchera une réaction inflammatoire pour répondre à l'insulte. Cette réponse implique la libération de cytokines inflammatoires qui amplifient localement l'agrégation érythrocytaire et qui finissent par l'activation de plaquettes et la formation d'un caillot sanguin. Dans ce contexte, le protocole d'échographie pour l'évaluation de l'agrégation érythrocytaire pourrait permettre l'évaluation de l'hyperviscosité du sang, l'un des facteurs de la triade de thromboembolie de Virchow (Bagot and Arya 2008).

Chapitre 2 Imagerie ultrasonore

Dans le premier chapitre, on a introduit l'échographie comme une méthode pour l'évaluation non-invasive de l'agrégation érythrocytaire et ses possibles applications cliniques, notamment la détection de l'inflammation. Cette méthodologie requiert l'analyse spectrale du signal ultrasonore. Cependant, cette analyse est affectée par plusieurs variables du système d'imagerie et par l'interaction physique de l'onde acoustique avec la matière. Dans ce chapitre, on présente les notions physiques, l'instrumentation et le traitement de signal qui seront modélisés dans l'analyse spectrale abordée au Chapitre 3.

2.1. Notions d'échographie

Les sons sont l'interprétation du cerveau humain des ondes mécaniques de compression qui se propagent dans l'air. Les ondes de compression, ou ondes p, sont un des deux principaux modes de propagation des ondes acoustiques. Ce type d'onde se produit lorsque le mouvement des particules du milieu est parallèle au déplacement de l'onde (Figure 2.1a). Contrairement, les ondes de cisaillement, ou ondes s, sont des ondes qui se propagent de façon perpendiculaire à l'excitation ou au mouvement des particules du milieu (Figure 2.1b).

Pour une onde de compression, la *longueur d'onde*, λ , est déterminée par la distance entre deux compressions ou, équivalentement, deux raréfactions consécutives (Figure 2.1a). L'unité de mesure de la longueur d'onde est le millimètre (mm) ou le micron (μm). La longueur d'onde est une façon intuitive d'analyser les ondes ultrasonores dans le domaine spatial. Une deuxième caractéristique de l'onde est la *fréquence* d'insonification, f , qui est définie comme le nombre de fois que l'onde oscille à chaque seconde. Son unité de mesure est l'Hertz (Hz). La fréquence de l'onde est à la base de l'analyse spectrale car lors de son interaction avec la matière, la fréquence réfléchi de l'onde change en dépendant des caractéristiques du milieu. La vitesse du son, c , est la distance voyagée par l'onde par unité de temps et elle est équivalente à :

$$c = \lambda f. \quad (2.1)$$

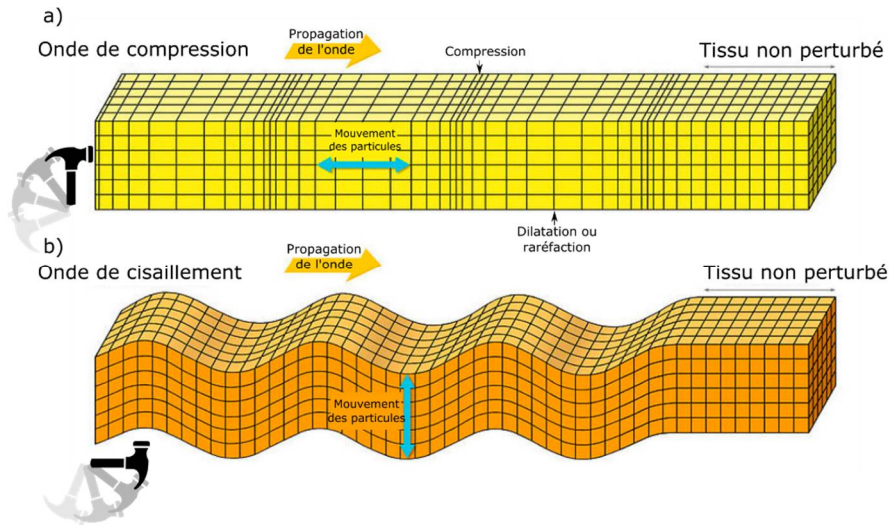


Figure 2.1 Modes principaux de propagation des ondes acoustiques. a) Ondes de compression
 b) Ondes de cisaillement. L'imagerie par ultrasons se base en la production d'ondes de compression. Adapté de http://www.khadley.com/courses/Astronomy/ph_205/topics/earth/earth-structure.html
 (Consulté le 21-07-2017)

La vitesse du son varie peu dans les tissus mous, oscillant entre 1480 et 1580 m/s. La vitesse du son est à la base de l'imagerie anatomique, parce que le temps de vol (c.-à-d. le lapsus entre l'émission de l'onde et la réception de l'écho) s'utilise pour estimer la distance à l'objet, en assumant une vitesse du son constante.

Un dernier concept important pour les ondes de compression est l'impédance acoustique. Cette propriété mesure l'opposition que le milieu présente à la propagation de l'onde. L'unité de mesure est le Rayl qui équivaut à Pa s/m et se dénote par le symbole z . Formellement, l'impédance acoustique est définie comme :

$$z = \rho c. \quad (2.2)$$

Le terme ultrason fait référence à des ondes de compression pour lesquelles la fréquence d'oscillation est plus haute que les limites d'écoute de l'oreille humaine. Dans ce contexte, toute onde de compression de plus de 20 kHz devrait être considérée comme des ultrasons. Cependant, en imagerie biomédicale, les fréquences d'insonification sont typiquement d'entre 2-10 MHz. Pour les examens vasculaires, des ondes de 9-15 MHz sont utilisées. Finalement, pour les petits animaux et la recherche fondamentale des ondes de plus de 20 MHz sont utilisées.

L'échographie médicale se base sur la création d'ondes de compression dans le tissu et sur la transformation de ses échos en images. Contrairement, les ondes de cisaillement sont utilisées pour la caractérisation mécanique des tissus (c.-à-d. l'estimation de la viscosité et l'élasticité du tissu), notamment pour l'élastographie, mais pas couramment en imagerie anatomique. Pour le reste de cette thèse on se référera uniquement aux ondes de compression et à ses propriétés.

2.2. Production d'ondes ultrasonores

Pour produire une onde ultrasonore, il est nécessaire d'employer un élément vibrant à haute fréquences. En échographie, la plupart des instruments emploient des matériaux piézoélectriques pour créer les ondes. Le terme piézoélectrique provient de l'expression grecque *piézein* qui signifie électricité provenant de la pression. Il fait référence à la propriété de certains matériaux qui augmentent ou diminuent leur volume quand une tension électrique (voltage) positive ou négative leur ait appliquée, respectivement. Réciproquement, ces matériaux génèrent une tension électrique quand une pression mécanique ou vibration leur ait appliquée. Pour créer des vibrations, un signal oscillant (changeant de tensions négatives à positives ou vice-versa) est appliqué au matériel. Différents types de matériaux ont ces propriétés. En particulier, le titanate de baryum et le titanate de zirconate de plomb (PZT) sont utilisés pour l'élaboration de transducteurs ultrasonores.

2.2.1. Principe des transducteurs

Un transducteur est un outil capable de transformer un signal physique en une autre. Par exemple, les transducteurs ultrasonores transforment des signaux électriques en ondes acoustiques et vice-versa. Un transducteur acoustique dispose d'un cristal PZT placé entre deux plaques métalliques. Quand un signal de courant alterne est appliqué sur les plaques, l'élément piézoélectrique vibre en fonction de sa taille et des fréquences du signal appliqué. La vibration de l'élément se propage sous la forme d'une onde acoustique dans le tissu et, éventuellement, lorsqu'elle trouve des inhomogénéités, des échos se produisent. Lorsque l'écho arrive à la plaque, il produit une vibration dans tout l'élément et une faible tension électrique est produite dans les plaques par l'effet piézoélectrique.

Les propriétés de l'onde générée dépendent de plusieurs facteurs. D'abord, la hauteur de coupe de l'élément piézoélectrique détermine la fréquence de vibration naturelle du cristal. Des fréquences plus élevées nécessitent des cristaux plus minces. Néanmoins, cette fréquence n'est pas unique. Un matériel peut vibrer à plusieurs fréquences. L'ensemble de fréquences auxquelles le matériel peut vibrer est connu comme sa bande passante. En plus de la grosseur, les cristaux peuvent être coupés avec une forme parabolique ou plate. Les premiers sont appelés de transducteurs focalisés. Dans ce type de géométrie, l'énergie acoustique est concentrée dans un seul point focal du matériel. Les propriétés de l'onde acoustique, comme sa fréquence et son amplitude, changent tout au long du chemin traversé par l'onde. En particulier, la plus haute fréquence et l'amplitude maximale se trouvent au point focal. Ceci a une incidence sur la résolution et le contraste de l'image générée. Les transducteurs plans, ou non focalisés, génèrent un faisceau plan avec des propriétés acoustiques plutôt homogènes dans la région lointaine du trajet.

Le signal avec lequel l'élément piézoélectrique est excité a également une forte incidence sur les propriétés de l'onde générée. Le type de signal transmis dépend de l'application d'imagerie visée. Plus le signal est long, plus la bande passante produite sera étroite. Par exemple, la mesure de vitesses de fluides à l'aide de l'effet Doppler nécessite d'une bande étroite et, en conséquence, on utilise un signal long. Contrairement, une impulsion ou *Dirac* est le signal théorique approprié pour exploiter toute la bande passante naturelle de l'élément piézoélectrique. Cette configuration est requise pour l'imagerie anatomique (B-Mode) ou les ultrasons quantitatifs, traités dans cette thèse. Cependant, il est aussi possible d'exciter l'élément avec de fonctions de différentes formes, comme des ondes sinusoïdales, carrées, etc. En particulier, il est possible d'utiliser de signaux encodés de type *chirp* pour exploiter des bandes passantes au-delà des possibilités naturelles de l'élément piézoélectrique (Sanchez et al. 2009). Ce domaine de recherche est connu comme excitation codée (Sanchez 2010), cependant, son application est en dehors de la portée de ce projet doctoral.

2.2.2. Propagation de l'onde ultrasonore

La vibration causée par l'élément piézoélectrique produit une pression mécanique sur le tissu. Lorsque la pression est maintenue à faible puissance, elle se propage aux tissus

environnants avec un front d'onde sphérique et avec une amplitude linéaire, ce qui peut être décrit avec l'équation d'onde homogène :

$$\nabla^2 p - \rho\kappa \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} = 0. \quad (2.3)$$

Dans l'équation (2.3), p représente la pression mécanique exercée par le transducteur, ρ est la masse volumique (densité) du tissu et κ sa compressibilité adiabatique (c.-à-d., sans conversion de l'énergie en chaleur). Expérimentalement, dans un milieu complètement homogène, comme de l'eau pure, l'onde se propagera indéfiniment jusqu'à la dissipation de l'énergie mécanique par conversion en chaleur. Cet effet de perte d'énergie est connu comme l'absorption, discuté dans la section suivante. Cependant, les tissus biologiques ne sont pas homogènes, ils sont composés de plusieurs couches de gras, fibres musculaires, différents types de cellules, etc. Lorsque l'onde trouve une inhomogénéité, un effet de diffusion est provoqué et des échos qui se propagent en toutes les directions se produisent.

2.2.3. Interactions de l'onde acoustique avec le milieu

L'interaction acoustique avec le milieu fait référence à la réradiation d'ondes acoustiques avec des propriétés différentes de celles de l'onde originale (Insana and Brown 1993). Les interactions sont produites lorsque l'onde trouve une inhomogénéité dans le milieu de propagation, soit des obstacles avec différentes masses volumiques ou de différentes compressibilités du milieu original. En général, l'effet produit dépend de la taille de l'inhomogénéité par rapport à la longueur d'onde. Si l'inhomogénéité est plus grande que la longueur d'onde, par exemple quand l'onde trouve une frontière de l'organe, elle peut expérimenter une ou plusieurs formes d'interactions, comme la transmission, la réflexion, la réfraction et la diffraction (Figure 2.2). Si l'inhomogénéité est plus petite que la longueur d'onde, l'onde sera diffusée. En générale, on peut décrire six formes d'interactions de l'onde (Figure 2.2), mais pour l'analyse spectrale on mettra l'accent sur trois d'entre elles: la diffraction, l'atténuation et la diffusion.

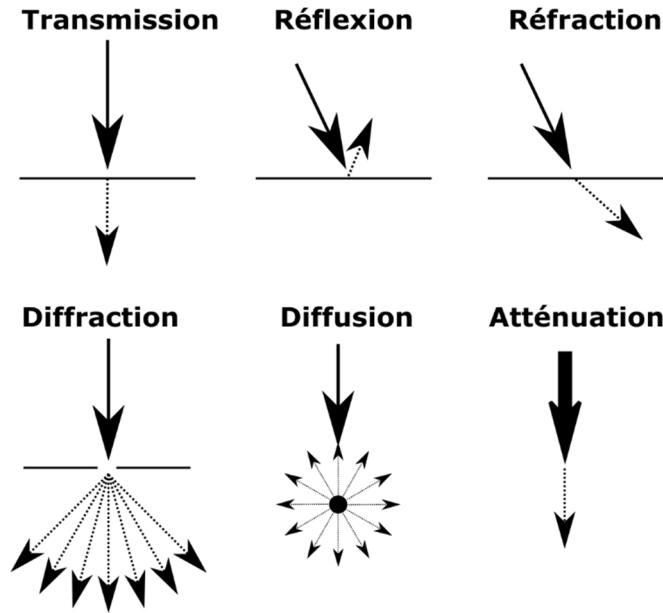


Figure 2.2 Interactions de l'onde acoustique avec le milieu. Le type d'interaction dépend de la taille de l'objet. Si l'objet est plus grand que la longueur d'onde, la transmission, réflexion, réfraction ou diffraction peuvent survenir. La diffusion arrive quand l'inhomogénéité est plus petite que la longueur d'onde.

La transmission fait référence au passage de pression acoustique vers le deuxième milieu. La réflexion suppose que l'énergie qui n'a pas traversé dans le deuxième milieu rebondisse et reste dans le premier. En particulier, si la surface de l'organe est lisse, la réflexion est dite *spéculaire* et l'onde sera réfléchiée avec un angle égal à celui d'incidence. La réfraction fait référence au passage de pression acoustique au deuxième milieu avec un changement d'angle (Figure 2.2). L'angle de réfraction dépend de la vitesse du son du tissu. Si le deuxième tissu a une vitesse du son plus rapide que le milieu de propagation original, l'angle de réfraction s'éloignera du vecteur normal et vice-versa.

La diffraction fait référence au détournement de l'onde quand elle passe à travers d'un trou ou autour d'un obstacle dans son chemin. La diffraction est un concept important pour l'analyse spectrale parce que les faisceaux ultrasonores créés par les transducteurs se comportent comme si une onde plane traversait un trou. Ceci produit de variations d'intensité de la pression acoustique tout le long du faisceau : des régions de haute intensité comme le lobe principal et les lobes secondaires.

Quand l'onde trouve une inhomogénéité plus petite que la longueur d'onde, le phénomène est connu comme diffusion (Figure 2.2). Dans ce cas, l'onde est réfléchiée dans plusieurs directions avec des amplitudes correspondantes à chaque angle. En particulier, l'onde qui est réfléchiée dans le sens contraire de la propagation de l'onde originale est connue comme onde de rétrodiffusion (ou *backscattering* pour son équivalent en anglais). Ce phénomène est d'une importance particulière dans l'échographie biomédicale. En effet, c'est la rétrodiffusion qui génère la plupart des échos qui sont cartographiés dans les images ultrasonores. Sans rétrodiffusion, les images échographiques n'auraient que les échos spéculaires produits par les réflexions, ce qui est plutôt rare. Également, l'onde réfléchiée par rétrodiffusion dépend des caractéristiques de la particule qui l'a générée, comme sa taille, sa densité de masse et son impédance acoustique. Il est alors possible de caractériser les diffuseurs d'un organe à l'aide de son écho. Ceci est le sujet de recherche du domaine connu comme les ultrasons quantitatifs (ou *Quantitative ultrasound* pour son expression en anglais). Une introduction à ce sujet est présentée dans le Chapitre 3 et sera utilisée amplement dans le développement de la technique de mesure de l'agrégation érythrocytaire.

Finalement, l'atténuation fait référence à la perte d'énergie acoustique lors du déplacement de l'onde. L'atténuation est le résultat de l'absorption, ou la transformation de pression acoustique en chaleur, et par l'énergie perdue par diffusion. L'atténuation est un phénomène qui dépend de la fréquence d'insonification et de la distance traversée par l'onde. En effet, les fréquences plus hautes génèrent plus de perte d'énergie par transformation en chaleur et sont plus facilement absorbées par les tissus. Également, des distances plus longues augmentent l'effet de perte de chaleur et d'absorption. Ainsi, malgré une résolution améliorée des hautes fréquences, grâce à sa courte longueur d'onde, elles souffrent de problèmes de pénétration dans le tissu. À mode d'exemple, une onde de 30 MHz peut pénétrer jusqu'à 1,2 cm de profondeur d'un tissu mou, comparé aux 8 à 10 cm de profondeur d'une onde à 7 MHz.

2.3. Notions de formation d'images ultrasonores

Les sections précédentes décrivent la physique et les instruments nécessaires pour générer les ondes ultrasonores et examiner le tissu. Cependant, la conversion des sons en images requiert un processus complémentaire également complexe. Les sections suivantes décrivent ce

processus qui commence avec le signal électrique formé par le transducteur, grâce à l'effet piézoélectrique, lors que l'onde rétrodiffusée retourne : le signal RF. Le signal traité ne peut pas être utilisé en analyse spectrale. Cependant, il sera important pour comprendre le transfert de technologie de la mesure ultrasonore pour l'évaluation de l'agrégation érythrocytaire.

2.3.1. Prétraitement du signal et affichage en Mode-A

Il est possible de représenter le signal généré par le transducteur, ou signal RF, sous forme d'image, en assignant les valeurs d'amplitude à différents niveaux de gris. Cependant, ceci cause plusieurs problèmes. D'abord, les échelles des échos de grands diffuseurs sont de magnitude différente à ceux des petits. Alors, ils ne peuvent pas être représentés dans une même plage dynamique. De la même façon, les échos des diffuseurs lointains sont assujettis à de plus grandes atténuations, et en conséquence ils souffrent aussi de problèmes d'échelle et de plage dynamique. En outre, le caractère fluctuant du signal RF (des valeurs positives et négatives) restreint la localisation précise des contours d'organes. Un exemple d'un signal RF converti en image est donné dans la Figure 2.3.

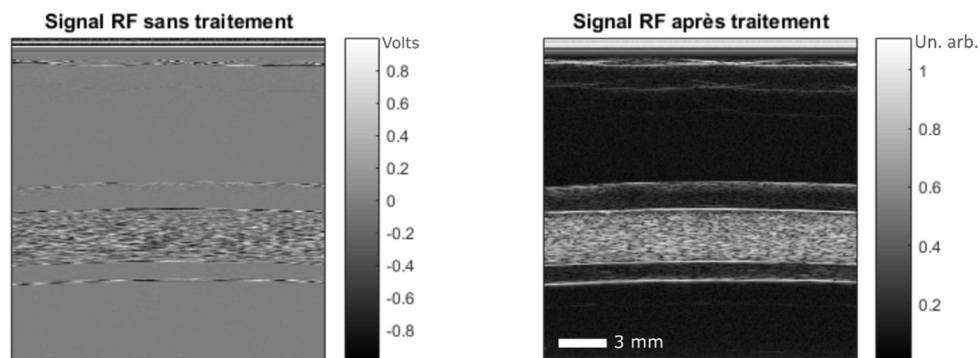


Figure 2.3 Exemples des images RF avant et après traitement

Pour ces raisons, il est nécessaire d'appliquer un traitement de signal pour générer une image exploitable. Ce processus est réalisé par un composant de la machine ultrasonore appelé le récepteur (ou en anglais *receiver*). Les pas de ce traitement sont listés dans la Figure 2.4 (Bushberg et al. 2002). Tout d'abord, une amplification du signal au complet est réalisée, suivie d'une amplification proportionnelle à la distance au transducteur. Cette dernière est appelée compensation du gain du temps (ou TGC pour l'expression anglaise *Time gain compensation*).

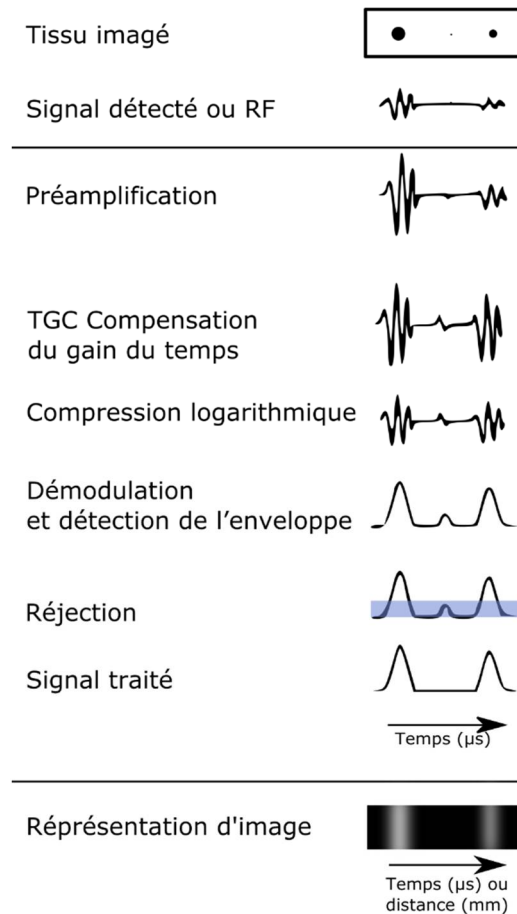


Figure 2.4 Traitement de signal pour former une ligne en Mode-A. Image adaptée de (Bushberg et al. 2002).

Le TGC permet de mettre dans la même échelle les échos proches et lointains. Pour mettre à la même échelle les échos de grands et petits diffuseurs, une compression du signal est réalisée. Ce pas peut se faire en calculant le logarithme du signal, ce qui est connu comme compression logarithmique, ou en appliquant des exposants fractionnaires (typiquement 1/5 ou 1/3). Ensuite, un processus de détection de l'enveloppe enlève les oscillations produites par les compressions et les raréfactions de l'onde acoustique. Ce processus est normalement fait en réalisant une transformation d'Hilbert du signal RF et en obtenant sa valeur absolue. Notez que ce pas enlève l'information de phase du signal et alors une perte d'information est causée. Il est aussi possible d'inverser les pas de la détection de l'enveloppe et la compression logarithmique. Un dernier pas optionnel est de rejeter les échos plus petits qu'un seuil de bruit.

Les affichages en Mode-A (A d'amplitude) sont une représentation sous forme de ligne temporelle du signal RF traité (voir ligne « Signal traité » dans la Figure 2.4). Toute l'information captée par le transducteur est le temps de vol de l'onde (aller-retour). Comme la vitesse du son est relativement stable dans un tissu mou (approximativement 1540 m/s), il est possible d'estimer la distance aux parois d'organes, à partir du temps de vol. Cette technique est encore utilisée en ophtalmologie pour mesurer les distances aux différentes structures intraoculaires. Sinon, l'utilisation des images Mode-A est très rare aujourd'hui.

L'opérateur de l'échographe contrôle certains aspects du traitement du signal. En particulier, il peut changer l'amplitude de la tension électrique appliquée à l'élément (jusqu'à une certaine limite de sécurité), le TGC et le seuil de détection de bruit.

2.3.2. Affichage en Mode-B

L'affichage en Mode-B (B de brillance ou *brightness*) est la représentation sous forme d'image d'un ensemble de signaux en Mode-A juxtaposés. Les échos les plus forts (ou plus *échogènes*) sont représentés par pixels blancs. Contrairement, une absence d'échos (causés par des milieux dits *anéchoïques*) est représentée par des pixels noirs. Ces images sont normalement anatomiques dans le sens qu'elles montrent une représentation réaliste de la forme des tissus.

Pour former une image en Mode-B, il y a deux techniques principales. La première technique se base sur le balayage mécanique d'un transducteur monoélément et de la juxtaposition des lignes en Mode-A. Ceci est le cas des sondes Vevo 660 à 770 de VisualSonix (Toronto, Canada) qui utilisent un réservoir d'eau où le transducteur se balaye et sert d'accouplement acoustique au tissu (Figure 2.5). Ce dispositif permet une imagerie où l'opérateur peut manipuler la sonde en la plaçant sur l'organe requis. En autres techniques de la même approche, le transducteur est placé sur un système de positionnement en 2D ou 3D et la cible est fixe. Ceci est le cas de microscopes à base d'ultrasons (Mamou et al. 2016). Cette dernière technique requiert de plusieurs minutes pour la formation d'une image simple et s'utilise plutôt en configurations de recherche fondamentale.

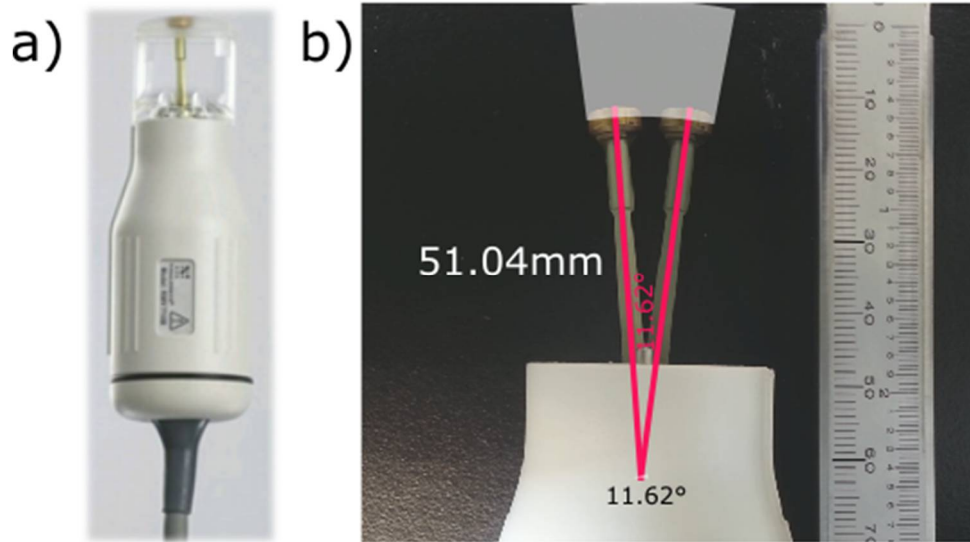


Figure 2.5 Transducteur monoélément à balayage (Vevo 707B Visualsonix, Toronto, Canada).
 a) Image du transducteur portable. L'élément piézoélectrique est placé dans un réservoir d'eau pour un meilleur accouplement avec le tissu. b) Le réservoir d'eau a été enlevé pour montrer le balayage de l'élément ultrasonore. La distance focale de l'élément est de 10 mm. Le cadre blanc représente l'espace scanné, c.-à-d., la section du milieu de laquelle l'image sectorielle sera formée.

La deuxième technique pour la formation d'images en Mode-B est la juxtaposition de plusieurs éléments piézoélectriques et son activation synchronique. Cette approche est la plus répandue entre les transducteurs cliniques. La prochaine section décrit le matériel et le processus nécessaires pour la formation d'images.

2.3.3. Signal RF

Le signal de radio fréquence ou RF est la séquence temporelle de voltages enregistrés à partir des échos retournés (Figure 2.4 deuxième ligne). La tension électrique générée par le transducteur correspond à l'amplitude de l'écho reçu. Ainsi, les raréfactions sont enregistrées comme des pics de tension électrique négative et les compressions comme des tensions positives (Figure 2.1a). En particulier, le signal RF est analogique et contient de l'information sur les champs de pression générés par les diffuseurs et ses interactions. Cependant, la plupart des échographes modernes font une transformation du signal RF en signal digital en utilisant des convertisseurs. À ce propos, le théorème de Nyquist-Shannon stipule que pour la

numérisation sans perte d'information, la fréquence d'échantillonnage doit être au moins deux fois plus élevée que celle contenue dans le signal analogique.

2.4. Transducteurs cliniques

Les transducteurs décrits jusqu'à maintenant sont composés d'un seul élément piézoélectrique. Néanmoins, les transducteurs utilisés pour l'imagerie en clinique sont le résultat de la juxtaposition de plus d'une centaine de ces éléments, couramment 128 éléments (Figure 2.6). Ce type de transducteur est connu comme barrette linéaire (ou *linear array transducer* pour l'expression en anglais). Le principal avantage d'utiliser ce type de transducteur repose sur le fait de pouvoir combiner plusieurs fronts d'onde pour créer des faisceaux ultrasonores variables et la reconstruction en temps réel des images anatomiques en Mode-B. En effet, contrairement aux transducteurs monoéléments avec une coupe fixe, les barrettes linéaires peuvent focaliser l'énergie acoustique dans un point focal variable et même changer la directivité du faisceau. Également, elles peuvent créer de fronts d'ondes planes ou divergentes, ce qui est de spécial intérêt pour obtenir des cadences d'image élevées (supérieur à 500 cadres/s). Ces technologies ont des applications en l'échographie cardiaque (Zhang et al. 2016) et en l'élastographie (Montaldo et al. 2009).

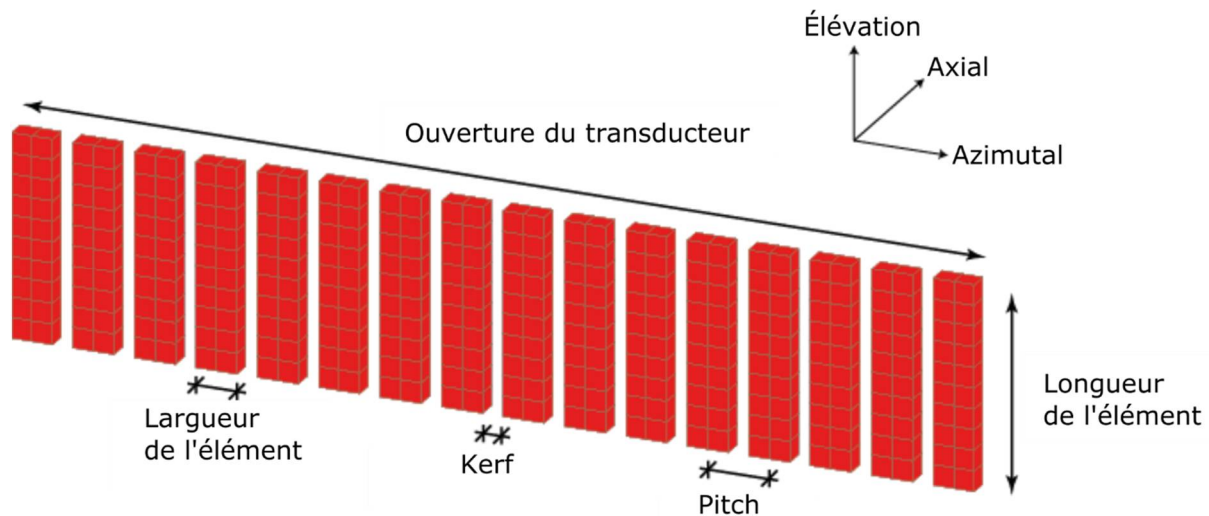


Figure 2.6 Configuration des éléments d'une barrette linéaire. Définition de quelques propriétés de la barrette.

2.4.1. Formation du faisceau

Le terme formation du faisceau fait référence à deux traitements complémentaires. Premièrement, la formation du faisceau en émission allude à la création d'un faisceau acoustique avec caractéristiques différentes de celles produites naturellement par les éléments, notamment en termes de fronts d'onde (c.-à-d. focalisation ou d'ondes planes) et directivité (Figure 2.7). Le principe d'Huygens-Fresnel stipule que n'importe quel front d'ondes peut être produit par la superposition d'ondes sphériques produites par des sources ponctuelles. Dans ce contexte, les éléments des barrettes linéaires agissent comme des sources ponctuelles.

Un deuxième composant de la formation de faisceau est la conversion des signaux rétrodiffusés reçus par plusieurs éléments en un seul signal. En effet, les échos produits par les diffuseurs se propagent sphériquement et arrivent à chaque élément avec un retard propre (Figure 2.8). Cette technique est connue comme formation de faisceau en réception.

Imagerie focalisée

Deux types de formation du faisceau ultrasonore sont d'importance pour les travaux présentés dans cette thèse : les faisceaux focalisés et les faisceaux plans. Dans les premiers, toute l'énergie de la barrette, ou d'un sous-ensemble d'éléments nommés sous ouverture, est concentrée dans un point (Figure 2.7a). Pour focaliser l'énergie, il est nécessaire d'appliquer un délai au signal d'excitation de sorte que les ondes circulaires provenant des éléments extérieurs arrivent au point focal en même temps que ceux des éléments centraux de la barrette (Figure 2.8). Ceci est possible en créant une fonction de délai parabolique.

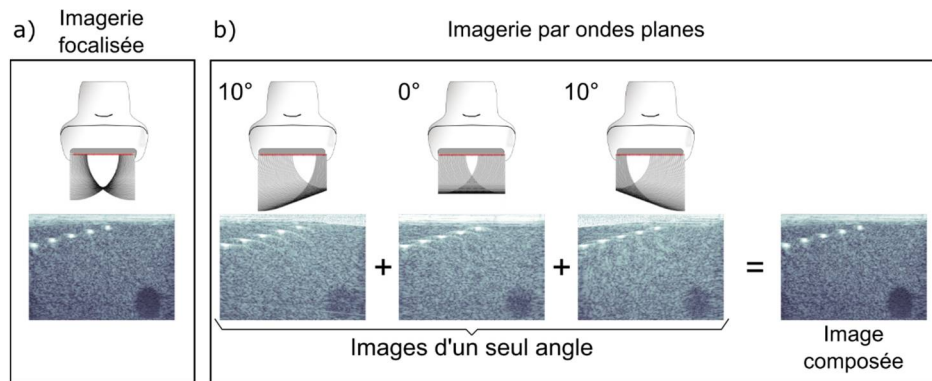


Figure 2.7 Types de formation de faisceaux ultrasonores avec de transducteurs cliniques. a) Imagerie focalisée. B) Imagerie par ondes planes. Plusieurs insonorisations sont envoyées à différents angles. Chaque image présente de problèmes de contraste et résolution. En ajoutant cohéremment les images de chaque angle, ces propriétés sont améliorées

Lorsque l'imagerie focalisée est utilisée, la ligne RF de l'élément central de la sous ouverture contient les échos d'amplitude maximale et de meilleure résolution. Pour former une image de haute qualité, il est nécessaire de juxtaposer une collection de ces lignes. Pour ceci, des sous-ensembles d'éléments autour de la ligne sont excités séquentiellement avec de délais paraboliques. Ainsi, pour former une seule image, 64 ou 128 tirs focalisés avec différentes sous-ouvertures sont faits. Le résultat est une image d'haute résolution avec excellent contraste. En revanche, le délai associé à la formation d'image ligne par ligne fait que la cadence d'imagerie soit réduite de 30 à 100 cadres/s, selon la profondeur imagée.

Une autre possibilité est de construire une image à plusieurs points focaux, ce qui se connaît sous le nom d'imagerie multifocale. Dans ce type d'imagerie, l'image est divisée en différentes profondeurs; le transducteur fait un tir focalisé à chacun et pour chaque ligne de Mode-A. Ceci joue encore plus contre la cadence d'images.

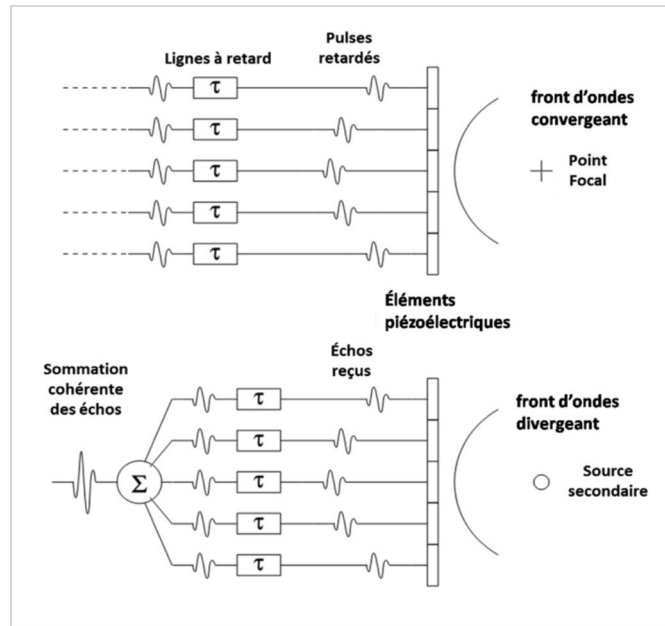


Figure 2.8 Fonction de délais pour la focalisation d'un faisceau ultrasonore avec une barrette linéaire (Porée 2017)

Imagerie par ondes planes

Le deuxième groupe de faisceaux d'intérêt à cette recherche est celui d'ondes planes, utilisé pour l'imagerie à haute cadence (Figure 2.7b). Dans le cas le plus simple, la fonction de retard est nulle et tous les éléments sont activés simultanément. Ceci produit un front d'onde plane qui se propage parallèlement à la surface du transducteur (Figure 2.7b image centrale). En appliquant, une fonction de retard linéaire, il est possible de changer la directivité du faisceau en conservant le front d'onde plane (Figure 2.7b images gauche et droite). L'avantage de ces faisceaux est qu'ils couvrent une région plus grande qu'un faisceau focalisé et ne nécessitent pas des répétitions de tirs pour chaque ligne. Ceci permet d'avoir une cadence d'image beaucoup plus élevée que celle de l'imagerie focalisée. Contrairement, l'amplitude et la résolution d'une onde plane sont plus basses que celles de l'imagerie focalisée (Figure 2.7). Il est nécessaire alors d'utiliser des techniques de formation de faisceau en réception pour restaurer ces propriétés de l'image.

Lorsqu'une source ponctuelle est imagée par des ondes planes, l'onde rétrodiffusée arrive avec un délai spécifique à chaque élément de la barrette. L'image du signal brut présente la source ponctuelle comme une hyperbole, communément appelée « le moustache » (Figure

2.9 panneau central). Alors, la formation de faisceau en réception consiste à estimer la position de la source à partir de l'hyperboles. La technique la plus simple pour ceci est l'addition cohérente des signaux reçus par chaque élément en appliquant des délais hyperboliques à chacun. Cette technique nommée « Délai et somme » est décrite en détails en (Montaldo et al. 2009).

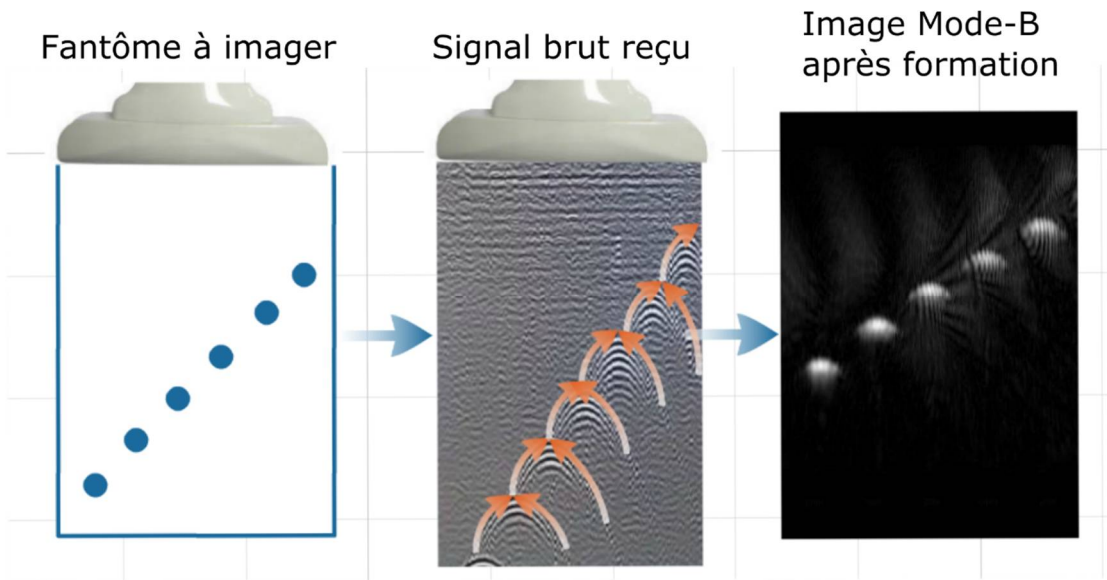


Figure 2.9 Formation du faisceau en réception pour un front d'onde plane. Panneau à gauche : fantôme de points à imager. Panneau central : Image brute montrant des hyperboles causées par le délai. Panneau droit : Image Mode-B après la formation de faisceau.

Néanmoins, la qualité de l'image obtenue est basse en termes de résolution et contraste, quand elle est comparée à celle de l'imagerie focalisée. Pour restaurer la qualité de l'image, plusieurs insonifications avec des ondes planes à différents angles sont faites. Chaque image formée présente les mêmes problèmes de qualité, cependant, quand les images de chaque angle sont sommées cohéremment la qualité de l'image résultante est restaurée et est comparable à celle de l'imagerie focalisée (Garcia et al. 2013).

2.5. Besoin de paramètres quantitatifs pour l'imagerie diagnostique

L'imagerie de type Mode-B est une technique significative dans le contexte biomédical. C'est une technique ne représentant pas de risques pour le patient, non ionisante, non invasive, de faible coût et facilement accessible. C'est pour cette raison qu'elle est la technique la plus

répandue en pratique clinique. Cependant, plusieurs diagnostics dépendent de l'habileté de l'opérateur pour reconnaître les caractéristiques des maladies cherchées et pour choisir les paramètres d'imagerie les plus appropriés pour chaque patient. Ces faits jouent contre la reproductibilité des analyses échographiques et réduisent le niveau de confiance dans les techniques de certaines associations de professionnels de la santé. Pour pallier à cette problématique au Canada, quelques organisations médicales préfèrent restreindre la pratique d'examens échographiques à des techniciens homologués.

Également, il a été postulé que seulement une fraction de l'information disponible dans le signal rétrodiffusé est disponible dans l'image Mode-B. L'information contenue dans les ondes réfléchies serait uniquement disponible en utilisant des techniques sophistiquées de traitement de signal. Ceci est le rationnel pour le domaine d'étude des ultrasons quantitatifs décrit dans le prochain chapitre (Insana and Brown 1993).

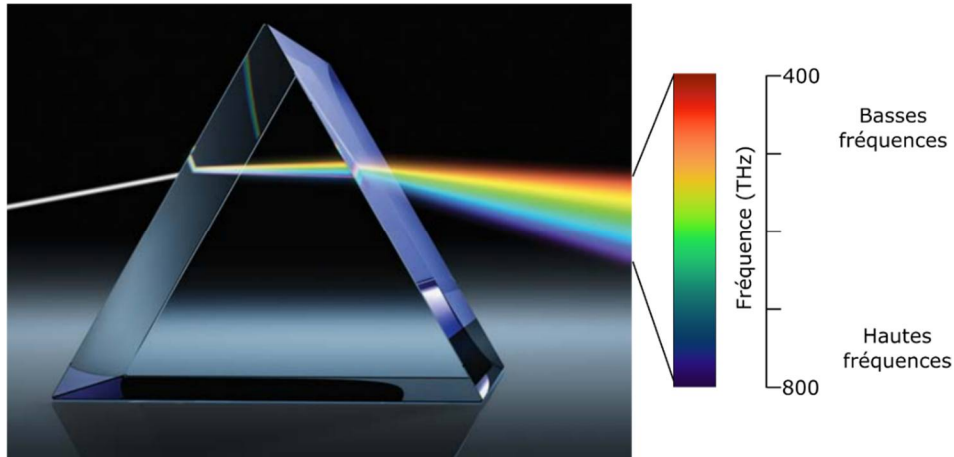
Chapitre 3 Ultrasons quantitatifs

Le Chapitre 2 a introduit la physique derrière l'imagerie ultrasonore et l'instrumentation qui lui est associée. Ce chapitre aborde une fois de plus les mêmes notions dans le contexte d'analyse spectrale. Pour cela, on présente les implications de chacun de ces phénomènes d'un point de vue de traitement de signal. Finalement, on utilise ces notions pour introduire la caractérisation des tissus à partir d'un composant appelé le coefficient de rétrodiffusion.

3.1. Analyse spectrale

3.1.1. Notions de l'analyse spectrale

Le mot spectre provient du mot latin *spectrum* qui signifie fantôme. Ce terme a été introduit en physique au siècle XVII par Isaac Newton lorsqu'il étudiait comment la lumière blanche du soleil était décomposée en plusieurs bandes de couleur quand elle passait à travers un prisme (Newton 1672). Il trouvait ce phénomène tellement inhabituel qu'il l'a décrit comme une apparition fantasmagorique. Dans le même siècle, Christiaan Huygens a proposé une théorie selon laquelle la lumière est une onde (Huygens 1690). Dans cette théorie, validée par Tomas Young (Young 1804), c'est la fréquence de l'onde lumineuse, ou similairement sa longueur d'onde, qui détermine sa couleur. Par exemple, la lumière bleue a une fréquence autour de 640 THz et la lumière rouge autour de 440 THz. Finalement, l'effet du prisme montre que la lumière blanche est composée d'une combinaison de plusieurs couleurs et, en conséquence, elle est composée de plusieurs ondes oscillant à fréquences différentes (Figure 3.1).



*Figure 3.1 Décomposition de la lumière blanche en son spectre par la réfraction d'un prisme.
(Image adaptée de <https://www.britannica.com>)*

Dans le cas de la lumière, l'effet du prisme est causé par un phénomène de réfraction similaire à celui décrit pour le son (Section 2.2.3). Dans ce cas, les différentes couleurs voyagent à différentes vitesses et en conséquence, sont diffractées avec des angles différents. Ceci produit la bande spectrale avec les couleurs de l'arc-en-ciel (Figure 3.1). Également, la lumière expérimente la diffusion lorsqu'elle interagit avec des particules de taille plus petite que sa longueur d'onde. Un exemple fascinant de ceci est donné par le ciel bleu ou rouge, lors du coucher du soleil. C'est Lord Rayleigh (né sous le nom de John Strutt) qui a expliqué pour la première fois ce phénomène (Strutt 1871). Rayleigh a décrit que quand les particules diffusantes sont beaucoup plus petites que la longueur d'onde (en relation d'au moins 1 à 10), la diffusion est proportionnelle à la quatrième puissance de sa fréquence. Autrement dit, les fréquences les plus hautes sont diffusées plus intensément que les basses. Lors du passage d'un rayon de soleil par l'atmosphère, les particules de l'air diffusent la lumière différemment dépendamment de sa fréquence. Les rayons de hautes fréquences comme le bleu sont diffusés plus intensément et dominant la couleur visible, ce qui donne la couleur bleuâtre du ciel à midi. Néanmoins, plus de diffusion implique aussi plus d'atténuation. Lors de son coucher, le soleil se trouve sur l'horizon, ce qui suppose que les rayons doivent traverser une couche d'air beaucoup plus grande que celle traversée pendant le reste de la journée. Les rayons de haute fréquence, comme les bleus et un peu moins les verts, sont très atténués et ils arrivent à destination avec une faible amplitude, voire nulle. Cependant, les couleurs de plus basse fréquence comme les oranges et les rouges

sont moins atténuées et dominant la couleur visible résultante. Ceci crée la couleur rougeâtre caractéristique des couchers de soleil.

De la même façon que dans le cas de la lumière, une onde ultrasonore peut être décomposée en ondes de plusieurs fréquences. L'ensemble de fréquences contenues dans une onde s'appelle la bande passante. De la même façon que notre cerveau interprète les fréquences électromagnétiques comme de couleurs, il interprète les fréquences des ondes acoustiques comme les tons. Comme la lumière, les sons (et les ultrasons) subissent la diffusion lorsqu'ils trouvent des diffuseurs plus petits que leur longueur d'onde. C'est ainsi que différentes fréquences sont retournées selon le trajet de l'onde et les propriétés du milieu de propagation. Les tissus biologiques sont composés de millions de cellules de tailles qui oscillent entre un et plusieurs dizaines de microns. Ainsi, les tissus biologiques génèrent une forte diffusion qui dépend de l'organisation et de la taille des cellules qui le composent.

Le terme analyse spectrale fait référence à l'analyse des composants fréquentiels d'un signal. En général, cette analyse s'intéresse à savoir quelles sont les fréquences et les amplitudes contenues dans le signal d'intérêt. Ainsi, la dominance d'une fréquence, comme dans le cas du ciel bleu, ou l'absence d'une autre peut informer sur la nature du phénomène qui est à l'origine. Les applications de ceci sont vastes. En astronomie, par exemple, la composition chimique des atmosphères de planètes lointaines peut être décelée en analysant les franges noires du spectre de la lumière reçue. En ultrasons médicaux, la taille et la concentration des diffuseurs acoustiques peuvent être estimées en comparant ses compositions spectrales à celles de modèles physiques. Ceci est à la base de découverte de maladies qui impliquent l'augmentation de taille de cellules ou sa formation d'agrégats. En particulier, dans le cas de cette thèse, on s'intéresse à la taille des agrégats d'érythrocytes. Comme on l'a mentionné précédemment, celle-ci peut servir comme un marqueur indirect de la présence de protéines inflammatoires.

3.1.2. Analyse spectrale des signaux ultrasonores

Contrairement au cas de la lumière, on n'utilise pas des prismes pour détecter la composition fréquentielle de l'onde ultrasonore. On se base plutôt sur des outils mathématiques et de traitement de signal pour faire l'analyse spectrale. À ce propos, une approche classique pour trouver le contenu fréquentiel d'un signal temporel, tel quel le signal RF (Section 2.3.3),

est la transformée de Fourier. Mathématiquement, la transformée de Fourier d'un signal temporel $g(t)$ s'exprime comme \hat{g} , ainsi

$$\hat{g}(f) = \int_{-\infty}^{\infty} g(t)e^{-2\pi itf} dt \quad (3.1)$$

où t représente le temps et i l'unité imaginaire. Une notion empirique de la transformée de Fourier peut se faire à partir de la Figure 3.2. Le résultat de la transformée de Fourier est une fonction avec des valeurs complexes, où la valeur absolue de ceci représente la magnitude d'une fréquence présente dans le signal temporel et l'argument complexe est la phase. Une description plus complète des propriétés de la transformée de Fourier se trouve en (Oran Brigham 1988).

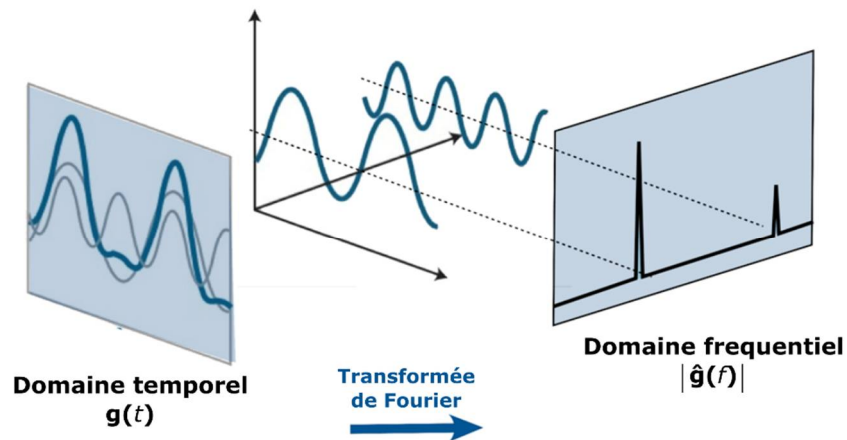


Figure 3.2 Interprétation visuelle de la transformée de Fourier (Image adaptée de <https://irenevigueguix.wordpress.com>)

En traitement de signal, la définition (3.1) n'est pas très utile, car on ne connaît pas une infinité de termes du signal. En plus, la fonction g n'est pas normalement ni déterministe ni périodique. Il est alors nécessaire de développer une approche statistique pour estimer quelles fréquences contiennent la puissance du signal. En conséquence, au lieu d'utiliser directement la transformée de Fourier, on utilise le spectre de puissance. En anglais, ce concept est connu avec plusieurs expressions toutes équivalentes : power spectrum, power-density, spectral-density et power-spectral-density. Le spectre de puissance, S , est calculé comme suit :

$$S(f) = \frac{|\hat{g}(f)|^2}{n}, \quad (3.2)$$

où n est le largueur du signal finit g . En traitement de signal, la transformée de Fourier est calculée à l'aide de l'algorithme FFT (*Fast Fourier Transform*), disponible sur la plupart de plateformes de traitement de signal, comme Matlab.

Le traitement d'une image échographique se fait en analysant de sections de lignes RF de quelques longueurs d'onde (typiquement entre 7 et 15). Notez que les signaux ultrasonores en Mode-A et les images en Mode-B ne sont pas adéquats pour l'analyse spectrale parce que le contenu fréquentiel a été effacé pendant la détection de l'enveloppe. Pour l'extraction de segments du signal RF, l'image est découpée en sections rectangulaires identiques appelés PER (par l'expression anglaises *parameter estimation region*) qui couvrent plusieurs lignes. Après le calcul du spectre de puissance de chaque ligne, ils sont moyennés et une seule estimation spectrale est gardée par PER.

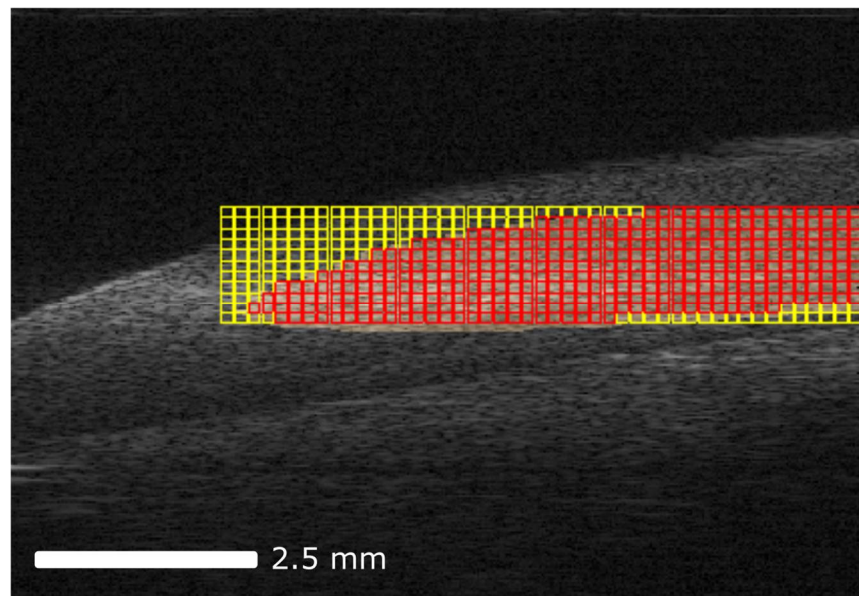


Figure 3.3 Image échographique d'une veine fémorale de porc. La grille représente l'ensemble de cellules (PER) dans une région rectangulaire de l'image. Les PERs en rouge montrent la région d'intérêt qui est conservée pour l'analyse spectrale, tandis que les PERs jaunes ne sont pas pris en considération. Les lignes RF qui ont donné lieu à l'image seront découpées et analysées individuellement par chaque PER.

3.2. Composants du spectre

Comme décrit dans les sections 2.2 et 2.3, le processus de formation d'une image ultrasonore suppose l'interaction de plusieurs éléments électroniques et phénomènes acoustiques, en partant de l'impulsion électrique pour stimuler le transducteur, passant par la rétrodiffusion du tissu, jusqu'à la conversion de la vibration du transducteur en signal électrique et en image (Figure 3.4). Chaque composante modifie le signal reçu d'une façon particulière et unique. Dit en termes de traitement de signal, chaque élément applique un filtrage particulier au signal. Ce filtrage est modélisé comme la fonction de transfert de l'élément électronique ou du phénomène acoustique. De façon intuitive, la fonction de transfert de l'élément décrit le signal résultant, si l'on applique une impulsion individuellement à tel élément.

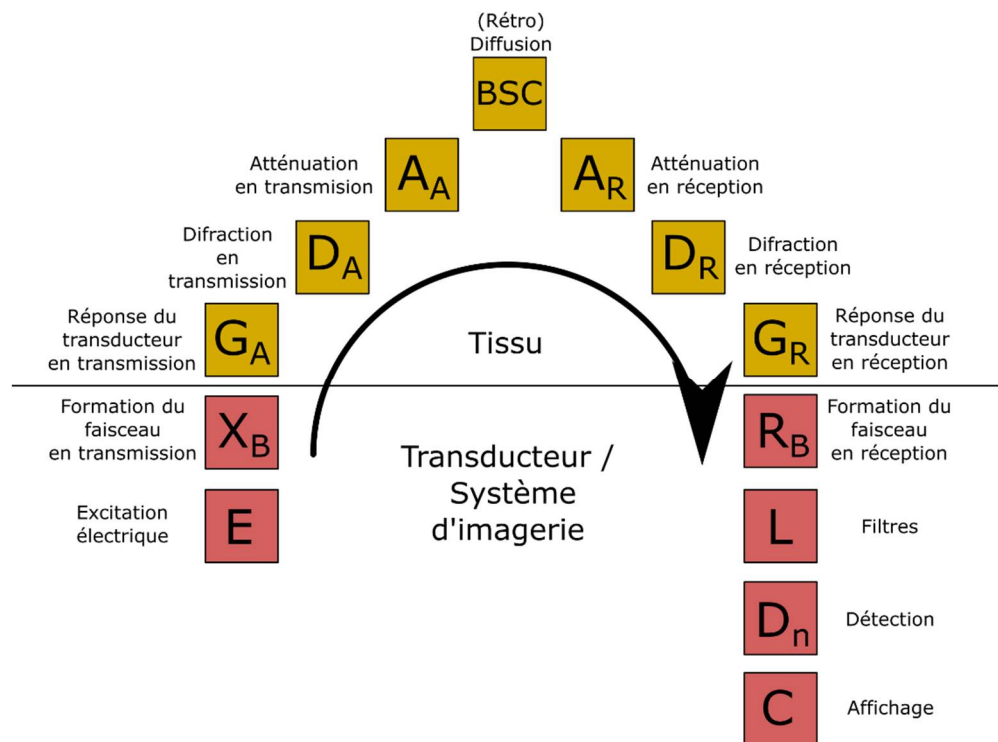


Figure 3.4 Processus de création d'une image ultrasonore décrite par ses composantes. Les carrés rouges représentent des processus électriques à l'intérieur du transducteur et du système d'imagerie. Les carrés jaunes représentent les processus acoustiques qui se produisent dans le tissu.

Bien que la fonction de transfert puisse s'exprimer en termes temporels, la modélisation de l'interaction entre différentes composantes résulte en l'application d'une fonction de convolution, ce qui rend le calcul mathématique difficile. De manière équivalente, la fonction de transfert peut être modélisée en termes spectraux. L'avantage de la modélisation par une fonction de transfert spectrale est d'utiliser la multiplication pour décrire l'interaction de processus continus, à la place de la convolution.

Pour décrire le spectre résultant après la formation du faisceau en réception dans la Figure 3.4, il suffit d'écrire

$$S(f) = E \cdot X_B \cdot G_A \cdot D_A \cdot A_A \cdot BSC \cdot A_R \cdot D_R \cdot G_R \cdot R_B \quad (3.3)$$

Notez, cependant, que les composantes qui sont liées au transducteur sont en générale invariables (s'il n'y a pas d'ajustement d'opérateur) et peuvent être résumés dans une seule variable qu'on identifie comme d'instrumentation, I .

$$I(f) = E \cdot X_B \cdot G_A \cdot D_R \cdot G_R \cdot R_B \quad (3.4)$$

Pour obtenir une équation (3.3) simplifiée équivalente :

$$S(f) = I \cdot D_A \cdot A_A \cdot BSC \cdot A_R \cdot D_R \quad (3.5)$$

Dans la caractérisation tissulaire, l'objectif est d'extraire les composantes associées au tissu, ainsi les composantes de l'instrumentation sont considérées comme des variables confondantes qui doivent être simplifiées. En pratique, les composants de l'instrumentation ne sont pas calculés explicitement, sauf pour des simulations en logiciels comme Field II. Pour simplifier ces variables, plusieurs techniques sont proposées. En particulier, la technique du réflecteur plan a été très utilisée pour l'utilisation avec des transducteurs monoélément. Cependant, la technique du fantôme de référence est l'option de choix pour la plupart des cas, car elle permet de compenser à la fois les effets de l'instrumentation et de la diffusion. Ces techniques sont discutées plus en profondeur dans la section 7.4. La technique du fantôme de référence est décrite en détail dans les sections 5.5.1.

Les composantes restantes de l'équation (3.3) sont des variables intrinsèques au tissu et sont *a priori* des inconnues. On a introduit les processus d'atténuation et de la diffraction dans la section 2.2.3 du point de vue du phénomène acoustique. Le BSC, quant à lui, est la composante de la formation d'image qui modélise la rétrodiffusion causée par le tissu. Dans les sections suivantes, ces concepts seront décrits à nouveau d'un point de vue traitement de signal.

3.2.1. L'atténuation

L'atténuation fait référence à la perte de signal causée par l'absorption (transformation de l'énergie acoustique en chaleur) et la diffusion. L'atténuation est incrémentée selon la distance parcourue par l'onde. Cependant, il est accepté que les termes A_A et A_R de l'équation (3.3) sont identiques en tissus mous comme le sang.

Dans l'exemple de la Figure 3.5, deux signaux acquis à deux temps différents sont superposés. Le signal noir correspond à un réflecteur plan submergé dans l'eau. Le signal rouge correspond au même réflecteur, mais l'onde ultrasonore est atténuée parce qu'elle est passée à travers d'un fantôme. Le décalage temporel vers la gauche du signal rouge est dû à la vitesse du son du fantôme qui est légèrement plus élevée que celle de l'eau, de sorte qu'elle est reçue quelques instants avant l'autre.

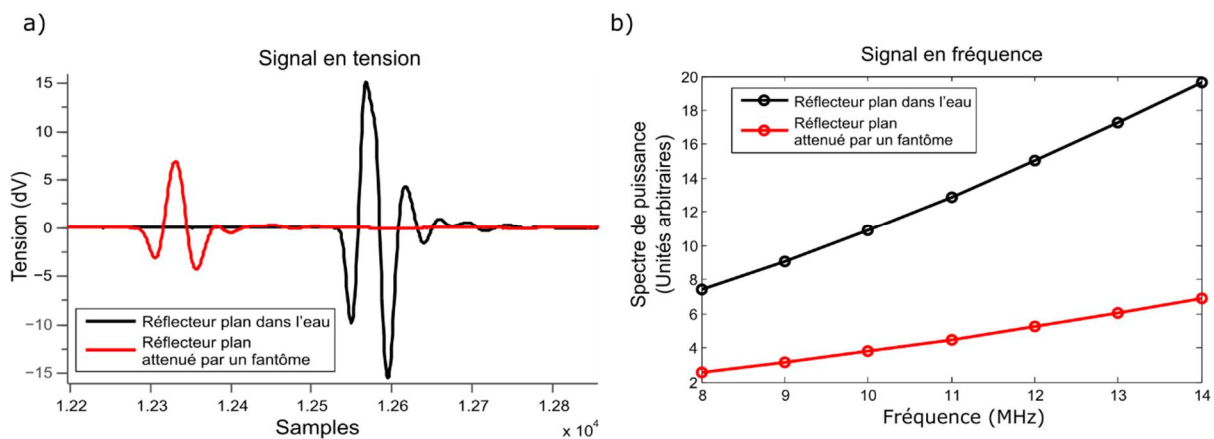


Figure 3.5 Atténuation d'un signal d'un réflecteur plan représenté en a) tension et b) en spectre de puissance. Les courbes en noir représentent le signal acquis dans l'eau, pour laquelle l'atténuation est négligeable. Les courbes en rouge représentent le même signal atténué par un fantôme placé dans le trajet de l'onde.

Dans la même figure, le phénomène d'atténuation est apprécié comme une perte d'amplitude (tension). Cependant, il est aussi notable que les oscillations plus petites à la fin de l'impulsion sont affaiblies. Ceci suggère que l'atténuation a également causé un filtrage fréquentiel. Pour corroborer cette affirmation, on analyse la perte d'amplitude dans le domaine de Fourier (Figure 3.5 b). Cette figure montre que les fréquences plus basses sont atténuées moins que les hautes. Ceci confirme le filtrage de type passe-bas de l'atténuation.

La mesure de l'atténuation effective consiste à calculer la différence des spectres sans et avec l'influence de l'atténuation du tissu en question. Le développement expérimental nécessaire pour mesurer l'atténuation est présenté dans l'Annexe 1 du Chapitre 7. Pour mesurer l'atténuation, il est admis que l'atténuation de l'eau est négligeable, ce qui est juste pour les faibles distances parcourues. L'atténuation à différentes fréquences diffère de plusieurs ordres de magnitude, alors il est nécessaire d'utiliser une unité de mesure qui soit capable d'exprimer différentes amplitudes dans la même échelle. À cet effet, les unités logarithmiques sont les mesures de choix, comme décrit à continuation.

Unités de mesure de l'atténuation

Ils existent deux unités courantes pour la mesure de l'atténuation : les décibels et les Nepers. Les deux mesures correspondent à de mesures logarithmiques du ratio (le quotient) des deux mesures. Cependant la base du logarithme change : le décibel s'exprime en base 10 et le Neper en base naturelle (ou du numéro d'Euler). Une autre différence entre les deux unités est que le Neper a été originalement conçu pour comparer des quantités de champs (comme l'amplitude du voltage ou la pression acoustique), tandis que le décibel a été conçu pour comparer des unités de puissance. Cependant, selon la loi de Joule, la puissance est proportionnelle au carré de l'amplitude. Ainsi, les deux mesures sont comparables selon:

$$20 \log_{10} m = 10 \log_{10} M \quad (3.6)$$

où m mesure une quantité de champ et M une unité de puissance. Avec cette transformation un décibel est comparable à un Neper selon l'équation.

$$1 \text{ Np} = 20 \log_{10} e \text{ dB} \approx 8.686 \text{ dB}. \quad (3.7)$$

Pour comparer en décibels les amplitudes des deux spectres de puissance, on écrit

$$a(f) = 10 \log_{10} \frac{S(f)}{S_0(f)} \text{ dB} \quad (3.8)$$

où a est l'atténuation totale du tissu mesuré en dB, S et S_0 sont les spectres de puissance atténués et non atténués, respectivement. L'atténuation totale décrit combien d'énergie acoustique a été perdue en aller-retour, mais elle ne caractérise pas le tissu. Pour décrire l'atténuation propre au tissu, on introduit la notion de coefficient d'atténuation α . Ce concept

dépend, en plus, de la distance parcourue par l'onde dans le tissu et de la fréquence à laquelle l'acquisition s'est faite:

$$\alpha(f) = \frac{\alpha(f)}{2 \cdot d \cdot f} \quad (3.9)$$

où, d représente la largeur du tissu et le 2 est indiqué pour l'aller-retour de l'onde. Il est courant de trouver le coefficient d'atténuation exprimé en dB/cm avec une référence à la fréquence d'acquisition (normalement à 1 MHz); autres auteurs préfèrent de l'exprimer en dB/cm/MHz. Cependant, comme on verra, cette dernière unité suppose que la relation entre l'atténuation et la fréquence est linéaire.

Compensation de l'atténuation

Pour retrouver le spectre du signal non atténué, il est nécessaire de compenser pour l'effet de l'atténuation en connaissant le coefficient d'atténuation. Un terme de compensation se dérive à partir de l'équation (3.8) pour la notation en décibels:

$$S_0 = S 10^{\frac{2 \cdot \alpha(f) \cdot d \cdot f}{10}} \quad (3.10)$$

Ou de façon équivalente, quand le coefficient d'atténuation est exprimé en Nepers

$$S_0 = S e^{4 \cdot \alpha_{Np} \cdot d \cdot f} \quad (3.11)$$

Où $\alpha_{Np} = \frac{\alpha}{8.686}$. Dans l'équation (3.11) le facteur 4 correspond d'abord à l'aller-retour (facteur 2) de l'onde et aussi à la transformation de l'amplitude d'une quantité de puissance à une quantité de champ requis par les Nepers (facteur 2).

D'autres méthodes ont été proposées (Oelze and O'Brien Jr 2002), mais sa valeur clinique et expérimentale n'a pas été validée pour le cas du sang.

Modélisation du coefficient d'atténuation

Au lieu d'exprimer la différence d'amplitude à chaque fréquence, il est pratique d'exprimer $\alpha(f)$ comme une fonction analytique. Un modèle courant de l'atténuation est la loi de puissance, décrite comme :

$$\alpha(f) = a_{\alpha} f^b \quad (3.12)$$

Où a_{α} et b sont les coefficients d'amplitude et de relation avec la fréquence, respectivement. Pour les tissus mous, la plupart des auteurs supposent que la dépendance en fréquence de l'atténuation est linéaire. Cependant, en réalité b est souvent un peu plus grand que 1. Par exemple, dans le tissu du foie, b est de 1.12 (Prince and Links 2006).

3.2.2. La diffraction

Lorsqu'un transducteur circulaire émet une onde acoustique, l'intuition nous indiquerait qu'il formerait un faisceau cylindrique. Cependant, la forme du faisceau est plutôt conique et les pressions acoustiques qui s'y trouvent varient d'une position à l'autre. La Figure 3.6 montre le motif de pression créé par un transducteur plan. Près du transducteur, communément appelé le champ proche, le champ de pression varie amplement et forme plusieurs lobes. En s'éloignant de la source, le faisceau converge et présente un motif plus ordonné. Ces caractéristiques du faisceau sont produites par la diffraction ultrasonore.

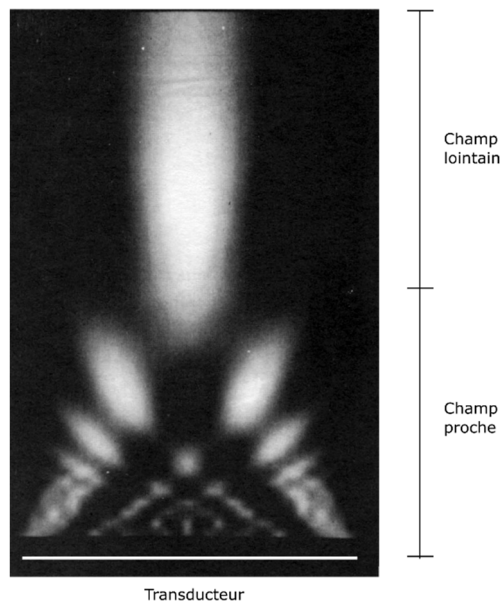


Figure 3.6 Diffraction du faisceau ultrasonore. Adapté de (Szabo 2004)

La diffraction du faisceau est modélisée et étudiée amplement pour le design de transducteurs. En particulier, ce domaine se propose de réduire la formation de lobes secondaires (en particulier les lobes de réseau). Cependant, en caractérisation tissulaire, on s'intéresse à modéliser et réduire son effet. La méthode du fantôme de référence consiste à diviser le spectre de puissance du tissu par celui d'un fantôme connu afin de simplifier l'effet de la diffraction, lors d'une division de ses spectres de puissance. Cette technique sera détaillée dans le Chapitre 5.

Il est à noter que les analyses spectrales doivent se faire dans le champ lointain à cause de l'homogénéité de la pression acoustique. La variabilité de la caractérisation dans le champ proche ne permet pas de créer des spectres représentatifs du tissu.

3.2.3. Le coefficient de rétrodiffusion

Le coefficient de rétrodiffusion, (ou BSC par l'expression anglaise *backscatter coefficient*), fait référence à la fonction de transfert du tissu. Intuitivement, le BSC indique combien de pression acoustique le tissu est capable de retourner à la source par l'effet de la diffusion. Ainsi, le BSC est une propriété discriminante de la matière, au même niveau que le poids, la masse volumique ou la vitesse du son. Comme introduit dans le Chapitre 2, le niveau de diffusion, et alors du BSC, dépend des propriétés acoustiques des diffuseurs : la masse volumique, la compressibilité, la densité de nombre, la taille et l'organisation spatiale. Par exemple, pour deux solutions de gouttelettes d'huile et de microsphères de graphite, on peut prédire que, sous conditions similaires, le BSC du graphite sera plus élevé à toutes les fréquences que celui de l'huile. Ceci est dû à la masse volumique du graphite qui est plus grande que celle de l'huile.

En ce qui concerne le traitement du signal, le coefficient de rétrodiffusion s'exprime par l'amplitude rétrodiffusée, mesurée en $1/\text{cm}^2/\text{sr}$, en fonction de la fréquence. Alors, il est souvent représenté par une courbe exprimée en échelle log-log. Un aspect intéressant du BSC est que lorsque les diffuseurs sont de la même taille (c.-à-d., monodisperses), et ont une organisation spatiale pas complètement aléatoire, il aura des interférences constructives et destructives à certaines fréquences. Ceci donne lieu à des pics et à des vallées dans le spectre de puissance

(Figure 3.7a) et dans le coefficient de rétrodiffusion (Figure 3.7b), dans les cas constructifs et destructifs, respectivement.

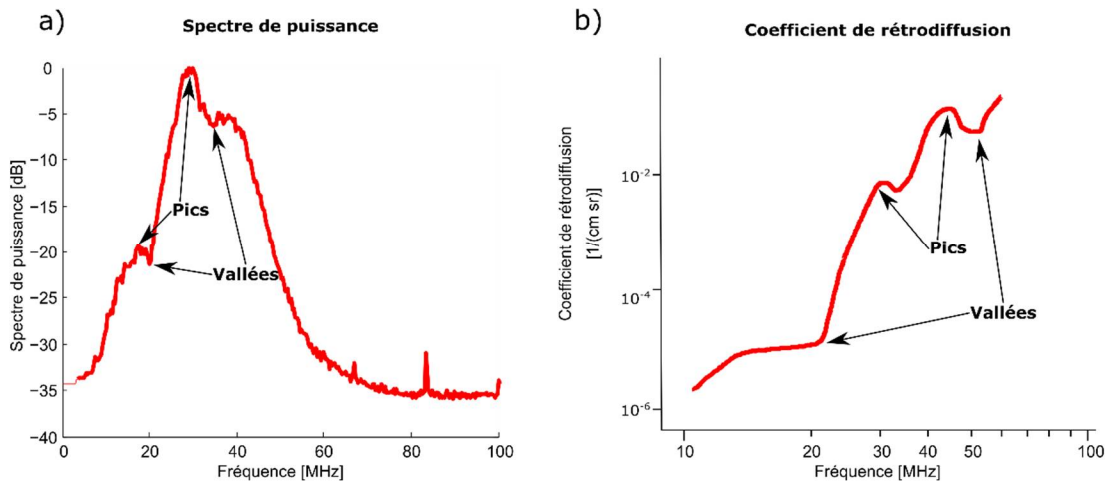


Figure 3.7 Analyse spectrale d'un fantôme de gélatine avec des microbilles de polystyrène de $10.7 \mu\text{m}$ de rayon. Des pics et des vallées sont uniques à chaque taille et permettent la caractérisation du milieu. a) Spectre de puissance b) Coefficient de rétrodiffusion

La forme de la courbe du BSC est caractéristique de chaque tissu. Il est alors possible de l'utiliser pour décrire ses propriétés. Cependant, pour pouvoir interpréter la forme du BSC à partir de sa représentation graphique, il serait nécessaire d'avoir une panoplie d'exemples couvrant toutes les possibilités de ses paramètres acoustiques. Une approche parallèle pour l'interprétation du BSC beaucoup plus populaire dans la communauté des ultrasons est d'utiliser un modèle physique. Le terme modèle fait souvent référence à une équation mathématique qui dépend des paramètres acoustiques décrits précédemment. Certains de ces paramètres sont connus à l'avance et peuvent être injectés dans l'équation directement. Par exemple, pour le cas du sang, la masse volumique et la compressibilité de globules rouges et du plasma sont connus et varient peu d'un sujet à l'autre. Cependant, d'autres paramètres comme la taille de l'agrégat sont variables et sont des inconnues *a priori*. Ce sont ces paramètres qui sont utilisés dans la caractérisation du tissu, mais pour pouvoir les déduire à partir de la courbe expérimentale, il est nécessaire d'ajuster la courbe au modèle, ce qui est le domaine de la minimisation ou de l'optimisation.

3.3. Interprétation du coefficient de rétrodiffusion

Plusieurs modèles de la diffusion acoustique du sang ont été proposés pour assister en l'interprétation des courbes du BSC (Mo and Cobbold 1993). Les prochaines sections font un survol de la littérature pour la caractérisation de la rétrodiffusion du sang. Une explication plus rigoureuse et appliquée à des cas réels des modèles plus populaires est présentée dans le Chapitre 5.

3.3.1. Modèles théoriques de la diffusion du sang

L'intérêt d'avoir un modèle théorique de diffusion de sang est de l'utiliser dans le cadre d'un problème inverse pour connaître les paramètres qui ont donné lieu à la courbe observée expérimentalement. Dans la plupart des modèles, il y a de paramètres récurrents, notamment la concentration, l'organisation et les tailles des diffuseurs (*e.g.*, des globules rouges ou de l'agrégat en tant que tel). De façon pratique, ceci implique qu'en mesurant directement le BSC d'un vaisseau du patient, et en l'ajustant au modèle de diffusion, on serait capable d'estimer la taille et la concentration d'agrégats d'érythrocytes. Ces deux mesures sont importantes cliniquement parce qu'elles se corrèlent avec l'hématocrite et la force d'attraction entre les érythrocytes, mesures qui changent pendant le processus inflammatoire. En plus, à partir de ces deux paramètres, il serait possible de dériver d'autres marqueurs de signification clinique comme la cinétique d'agrégation (le temps requis pour la formation d'agrégats).

Un des modèles classiques de diffusion acoustique parmi les plus connus remonte à 1951 dans l'article « *Sound scattering by solid cylinders and spheres* » (Faran Jr 1951). L'auteur dérive l'équation de diffusion à partir des propriétés physiques des diffuseurs supposés identiques, comme la taille, la vitesse du son et le contraste d'impédance avec son milieu, en suivant la façon de Morse (Morse et al. 1948). Cependant, les caractéristiques particulières du sang font échouer le modèle de Faran pour représenter sa diffusion acoustique.

Une première difficulté d'une formulation précise du BSC du sang apparaît avec les interférences causées par l'interaction de millions d'érythrocytes. Quand il n'y a pas d'agrégation et la concentration de globules rouges est faible (en bas de 6%), tous les modèles prédisent une dépendance de la rétrodiffusion à la quatrième puissance de la fréquence d'insonification. Cependant, avec des concentrations plus élevées (notamment celles trouvées

dans des conditions physiologiques, soit 40%) l'effet de groupe génère des interférences tant constructives que destructives (selon la fréquence observée) qui font que les modèles échouent dans leurs prédictions (Savéry and Cloutier 2001).

En addition aux problèmes de concentration, le caractère agrégeant du sang impose un deuxième défi. En effet, le changement de taille du diffuseur fait que le milieu devient polydisperse (de diffuseurs de différentes tailles soient présents), ainsi les modèles ne sont pas en mesure de prédire correctement le niveau de rétrodiffusion. En plus, l'agrégation d'érythrocytes implique la capture du plasma à l'intérieur de l'agrégat, ce qui modifie l'impédance acoustique du diffuseur (Yu and Cloutier 2007).

Pour résoudre la problématique de l'interférence interérythrocytaire, plusieurs formulations sont apparues. D'abord, Twersky a proposé un facteur de correction basé sur la concentration d'érythrocytes non agrégés, appelé le *Packing factor* (Twersky 1987); néanmoins, ce paramètre ne modélise pas la dépendance de la fréquence observée expérimentalement. Après, en 2005, Savéry a apporté une solution généralisée pour compenser les interférences basée sur la fréquence d'insonification en addition à la concentration (Savéry and Cloutier 2005). Notamment, il a appliqué des notions de mécanique statistique couramment utilisées en cristallographie au cas de la diffusion acoustique du sang. Ainsi, il a dérivé la notion du facteur de structure comme le facteur de correction du problème d'interférence. L'élégance de cette solution est qu'elle est harmonisée avec le développement de Twersky, car quand la fréquence tend vers l'infini, le facteur de structure est égal au *packing factor*. Cependant, la solution apportée implique la connaissance de la position exacte des diffuseurs, ce qui rend la solution analytique peu pratique. Savéry a aussi proposé une approximation du facteur de structure par séries de Taylor du troisième ordre. Quelques années après, Yu l'a développée et a proposé l'estimateur du facteur de structure et de la taille (SFSE). Finalement, il les a appliquées pour suivre le stade de facteurs thrombotiques dans un modèle animal (Yu and Cloutier 2007).

Malgré les avantages pratiques offerts par le développement de Taylor en SFSE, il a été prouvé être une approximation grossière du facteur de structure théorique. En effet, une approximation de Taylor du troisième ordre n'est pas capable de prédire que le premier pic d'interférences constructives observées en plusieurs simulations de globules rouges sphériques monodisperses. Dans des cas de simulations, son utilisation implique que les interférences destructives soient mal estimées dans les fréquences plus hautes (Saha et al. 2011). Malgré les

limitations théoriques signalées par ces simulations, le SFSE continue à être un modèle empirique valide pour la caractérisation expérimentale du sang. Les études expérimentales présentées dans le Chapitre 6 montrent que le niveau d'agrégation érythrocytaire prédit par le modèle se corrèle bien avec des mesures benchmark obtenues avec des appareils rhéologiques.

En abordant l'inexactitude de l'approximation de Taylor et les variations d'impédance des milieux agrégés, Franceschini a proposé une modification au modèle de rétrodiffusion (Franceschini et al. 2011). En général, les auteurs proposent que le diffuseur ne soit plus le globule rouge, mais l'agrégat lui-même. En changeant cette définition, ils modélisent la variation du contraste d'impédance due à l'emprisonnement du plasma à l'intérieur de l'agrégat, ce que les auteurs appellent le milieu effectif. Ainsi, ce modèle a été appelé l'estimateur du milieu effectif et du facteur de structure (EMTSFM). Avec des forces d'attraction plus élevées, moins d'espace est libre pour enfermer du plasma. Dans ce modèle cette force d'attraction est appelée la compacité de l'agrégat et modélise la force inter érythrocytaire. En plus, le modèle propose une solution exacte du facteur de structure analytique pour des sphères compactes de la même taille (Wertheim 1963). Cette représentation modélise les deux types d'interférences, constructives ou destructives, mais suppose que l'agrégat est sphérique, ce qui est une approximation grossière de la vraie forme d'un agrégat. Ainsi, ce modèle donne accès à trois paramètres : la taille de l'agrégat, l'hématocrite et la compacité de l'agrégat. Encore, la plus grande critique du modèle est que les agrégats de globules rouges ne sont pas monodisperses. Cette dernière contrainte impose de variations de forme du BSC qui ne sont pas observés expérimentalement dans les bandes passantes prédites.

Pour surmonter cette difficulté, De Monchy et Franceschini ont proposé un modèle théorique qui tient compte de la polydispersité des agrégats de globules rouges (de Monchy et al. 2016a). Ils modélisent la distribution de tailles des agrégats comme une fonction gamma et estiment l'interférence entre chaque pair de groupes d'une même taille.

Le modèle De Monchy-Franceschini représente l'état de l'art en diffusion acoustique du sang. Il donne accès à quatre paramètres : la distribution de tailles, la taille moyenne, l'hématocrite et la compacité de l'agrégat (la quantité relative d'érythrocytes à l'intérieur de l'agrégat). Cependant, l'étude du problème inverse de ce modèle en conditions *in vivo* n'a pas été abordée. Ainsi, la pertinence clinique du modèle pour la caractérisation de l'agrégation érythrocytaire n'a jamais été prouvée jusqu'à présent. Ceci est la question de recherche adressée

dans le Chapitre 5 de cette thèse. On aborde le sujet comme une comparaison de ce modèle à d'autres précédents.

Chapitre 4 Objectifs et plan de thèse

Le Laboratoire de Biorhéologie et d'Ultrasonographie Médicale (LBUM) travaille depuis les années 90 pour améliorer la compréhension de la diffusion ultrasonore du sang. Ces premiers travaux ont servi à décrire théoriquement et expérimentalement la difficulté de la caractérisation d'un tissu comme le sang qui présente une très haute densité de diffuseurs agrégeant. Les travaux pionniers d'Isabelle Fontaine (Fontaine et al. 1999) et de David Savéry (Savéry and Cloutier 2001, Savéry and Cloutier 2005;) ont montré que les approches quantitatives par méthode spectrale sont la méthode de choix pour décrire la rétrodiffusion d'un tissu de telle complexité. Des travaux subséquents, notamment ceux de François Yu et d'Émilie Franceschini (Franceschini et al. 2011; Yu et al. 2005), ont permis de décrire le niveau d'agrégation des échantillons de sang à l'aide de modèles physiques du spectre de rétrodiffusion.

La vision de notre laboratoire est le transfert de ces technologies vers la clinique. Tel que mentionné dans la section 1.6, puisque l'inflammation affecte le degré d'agrégation des globules rouges, la description de son état s'avère pertinente pour décrire l'état inflammatoire d'un patient. En outre, il peut également être un marqueur du risque de développement de thrombose veineuse (Yu et al. 2011). En 2013, le LBUM a publié les premières études précliniques chez le porc pour démontrer la faisabilité du suivi de l'inflammation par des méthodes échographiques grâce aux travaux de Julien Tripette et al (Tripette et al. 2013). Cette étude a montré l'intérêt de la technique pour l'évaluation en temps réel de l'inflammation. Cependant, l'étude soulevait de nouvelles questions par rapport à l'applicabilité de la méthode chez l'humain, particulièrement par son aspect invasif.

En l'actualité, le LBUM travaille en collaboration avec le Laboratoire de Mécanique Acoustique (LMA) de Marseille (France), pour développer sa vision. Notamment, le LMA développe de modèles physiques plus précis pour la description du BSC du sang. Le LBUM conçoit et réalise les études de validation avec des cas *ex vivo*, précliniques et cliniques. En plus, le LBUM développe l'instrumentation nécessaire pour l'utilisation en clinique de ces méthodes.

L'objectif général de cette thèse est alors de développer et d'évaluer une technique échographique pour l'évaluation de l'agrégation érythrocytaire chez l'humain, afin de s'approcher du suivi des patients susceptibles de présenter une inflammation aiguë.

Pour atteindre cet objectif, cette thèse reprend les travaux de Julien Tripette chez le porc et propose de répondre à trois questions: 1) Quel est le modèle de diffusion acoustique du sang le plus approprié pour évaluer le sang hyper-agrégant d'un patient en état inflammatoire? 2) Comment effectuer la mesure de l'agrégation érythrocytaire chez l'homme de façon non invasive? 3) Est-il possible d'adapter le protocole de mesure à l'instrumentation échographique utilisée en clinique?

La première question provient des développements récents de modèles de diffusion acoustique du sang. En effet, les travaux chez le porc proposaient une version avancée du modèle SFSE comme le marqueur de choix pour la détection acoustique de l'inflammation. Il est donc question de savoir si les nouveaux modèles décriront de façon plus exacte l'état inflammatoire du patient. Également, des modèles classiques, comme le gaussien (Insana and Brown 1993), étaient aussi des candidats intéressants pour cette analyse, mais, ils n'ont pas été étudiés dans le contexte expérimental du sang, jusqu'à présent. Ainsi, le Chapitre 5 de cette thèse propose d'évaluer la pertinence clinique de cinq modèles de diffusion, incluant de modèles classiques et récents. Concrètement, on évalue la capacité du modèle pour décrire l'état hyper-agrégant du patient. Pour ceci, on propose des conditions expérimentales contrôlées émulant celles trouvées chez l'homme, notamment le flux tubulaire à faible vitesse et à température contrôlée. Également, on évalue la performance de ces techniques en données *in vivo*, dans le cadre de chirurgie cardiaque de porcs pour induire l'inflammation. Cette partie est abordée dans un article scientifique reproduit dans le Chapitre 5.

La deuxième question sur le protocole de mesure chez l'humain provient de la nécessité d'appliquer une méthode échographique non-invasive chez un patient et applicable dans divers contextes inflammatoires (p. ex. soins intensifs, chirurgie cardiaque, urgence, etc.). Dans l'étude de Tripette chez le porc (Tripette et al. 2013), une incision dans l'aîne était nécessaire pour atteindre la veine fémorale afin de contrôler le flux sanguin et de réduire l'atténuation du signal. Ici, nous proposons une mesure non invasive sur la veine antébrachiale médiane (dans l'avant-bras du patient) et le contrôle du flux sanguin à l'aide d'un brassard superficiel. On effectue une étude pilote sur onze volontaires pour évaluer la corrélation de la mesure acoustique acquise

avec cette technique et les valeurs de l'agrégation érythrocytaire mesurée *ex vivo*. Ces travaux sont issus d'un deuxième article scientifique reproduit dans le Chapitre 6.

La troisième question porte sur l'utilisation d'appareils échographiques cliniques pour la mesure de l'agrégation érythrocytaire. Pour l'étude réalisée chez le porc (Tripette et al. 2013), le transducteur utilisé pour l'acquisition ultrasonore était un monoélément avec un seul point focal. Ce type de transducteur est utilisé couramment en recherche fondamentale pour l'évaluation des spectres de puissance. Cependant, les transducteurs communément utilisés en clinique sont de barrettes linéaires composées d'une centaine d'éléments qui permettent la formation dynamique du faisceau ultrasonore (voir la section 2.3.3). En plus, les transducteurs cliniques ont normalement une bande passante de plus basse fréquence (entre 5 et 14 MHz). Cependant, de nouveaux appareils médicaux permettent aussi d'atteindre des fréquences allant jusqu'à 71 MHz (Visualsonics MD, transducteurs UHF70). On se propose d'évaluer la répétabilité des mesures échographiques de l'agrégation érythrocytaire avec les deux types de transducteurs (de recherche et clinique) et, dans le cas de barrettes, avec deux types de formation de faisceaux, particulièrement les ondes planes. En plus de présenter une validation de la technique d'évaluation de l'agrégation érythrocytaire, ces travaux contribuent au domaine des ultrasons quantitatifs, en validant l'analyse spectrale par coefficient de rétrodiffusion à des cadences « ultrarapides ». Les résultats de ces travaux sont consignés dans un troisième article scientifique reproduit dans le Chapitre 7

Chapitre 5 Sensitivity of five models of acoustic backscatter coefficient of blood to describe varying erythrocyte aggregation levels

5.1. Avant propos

Ce chapitre reproduit le contenu de l'article « *Sensitivity of five models of acoustic backscatter coefficient of blood to describe varying erythrocyte aggregation levels* » soumis pour son évaluation en décembre de 2017 dans le journal « *IEEE Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* » avec la permission de ses auteurs : Julian Garcia-Duitama, François Destrempe, Arnaud Louvet, Louise Allard, Boris Chayer, Émilie Franceschini, Yves Goussard et Guy Cloutier.

Contributions :

En tant qu'auteur principal de cet article, Julian Garcia-Duitama a conçu et réalisé les expérimentations *ex vivo*, a développé le cadre théorique d'évaluation des modèles, mis au point et implémenté les programmes informatiques correspondants, a effectué une partie du post-traitement des données et a rédigé l'article. Le Dr François Destrempe a effectué une partie du post-traitement de données, a validé les programmes informatiques, a supervisé le développement théorique de l'article et a contribué à sa rédaction. Arnaud Louvet a contribué dans à la conception et la réalisation des expériences *ex vivo*. Louise Allard et Boris Chayer ont développée et réalisé le protocole expérimental *in vivo*. La Dr Émilie Franceschini a développé deux des cinq modèles théoriques de la diffusion acoustique et a fourni le code pour l'évaluation. Les Dr Yves Goussard et Guy Cloutier ont contribué à l'interprétation des résultats et à la révision et la correction du manuscrit. Ce travail a été effectué sous la supervision du Dr Guy Cloutier, directeur du projet de recherche.

5.2. Résumé

L'agrégation érythrocytaire est un marqueur commun de l'inflammation qui peut être surveillé en temps réel par ultrasons. La technique acoustique est basée sur l'analyse du

coefficient de rétrodiffusion (BSC) du sang. Pour fournir des biomarqueurs physiques, le BSC est couramment ajusté à un modèle spectral de la diffusion à partir duquel les paramètres des agrégats érythrocytaires (RBC) sont estimés. Cependant, il n'est pas clair quel modèle est le plus approprié pour évaluer l'agrégation des globules rouges lorsqu'il est mesuré *in situ* dans le système vasculaire en conditions normales et inflammatoires. Dans cette étude, on a comparé cinq modèles de diffusion sanguine: le modèle de loi de puissance, le modèle gaussien, l'estimateur de taille de facteur de structure (SFSE) et deux versions de la théorie du milieu efficace combinées avec le modèle de facteur de structure (EMTSFM). Deux ensembles de données expérimentales ont été utilisés pour l'analyse: du sang porcine circulant dans un fantôme veineux, avec une agrégation variant de normale à élevée, et un modèle porcine d'inflammation aiguë (ce qui induit une forte agrégation). Les paramètres estimés à partir du modèle ont été comparés aux mesures de laboratoire d'inflammation et d'agrégation des érythrocytes. Tous les modèles ont décrit correctement la tendance d'agrégation lorsque des niveaux élevés d'agrégation étaient présents. Cependant, seulement certains paramètres des modèles SFSE, Gaussien et EMTSFM monodisperse ont montré un contraste élevé pour décrire le phénomène dans les cas d'agrégation des globules rouges modérée et augmentée. Cette étude motive futurs tests de cette technique chez des patients atteints de maladies inflammatoires aiguës.

5.3. Abstract

Erythrocyte aggregation is a common marker of inflammation that can be monitored in real time by ultrasound. The acoustic technique is based on the analysis of the backscatter coefficient (BSC) of blood. To provide physical biomarkers, the BSC is commonly fitted to a spectral scattering model from which parameters describing red blood cell (RBC) aggregates are estimated. However, it is not clear which model is the most appropriate to assess RBC aggregation when measured *in situ* within the vascular system under normal and pathological inflammatory conditions. In this study, we compared five models of blood scattering: the power law model, the Gaussian model, the structure factor size estimator (SFSE) and two versions (monodisperse or polydisperse distribution of aggregate sizes) of the effective medium theory combined with the structure factor model (EMTSFM). Two experimental datasets were used in the analysis: *ex vivo* normal-to-high aggregating porcine blood circulating in a venous phantom and an *in vivo* porcine model of acute inflammation. The estimated model parameters were

compared to laboratory measurements of inflammation and erythrocyte aggregation. All models correlated with the aggregation tendency when high levels of aggregation were present. However, only parameters of the Gaussian, SFSE, and EMTSFM polydisperse models showed improved contrast to describe both moderate and high RBC aggregation tendencies. This study motivates future tests of this technique in patients with acute inflammatory conditions.

5.4. Introduction

Mammal blood increases its echogenicity under stagnation or reduction of flow (Sigel et al. 1983). This behavior is caused by the reversible tendency of red blood cells (RBCs) to aggregate under low levels of shear rate. The level of erythrocyte aggregation, and hence indirectly that of the echogenicity, correlates well with the concentration of high molecular weight acute-phase proteins, such as fibrinogen, C-reactive protein or haptoglobin (Weng et al. 1996a). As the production of these proteins is enhanced during an inflammatory reaction, ultrasound has been proposed as a technique to assess *in vivo* the time evolution of inflammation (Tripette et al. 2013). The real-time feedback offered by this technique is especially appealing for inflammation monitoring during critical surgeries or in intensive care medicine.

Among several quantitative techniques to evaluate blood echogenicity, spectral analysis of the radio frequency (RF) signals has been widely accepted (Franceschini and Cloutier 2013). These techniques are based on the study of the backscatter coefficient (BSC), a spectral measure of the ability of a tissue to return acoustic energy to the probe. A common practice is to fit the measured BSC to a scattering model, in the framework of an inverse problem. The estimated parameters can give some insight on the underlying insonified tissue, such as size, concentration and organization of scatterers (*e.g.*, erythrocyte aggregates).

Several tissue scattering models have been proposed within the last 30 years (Insana and Brown 1993). However, most studies of these models were designed to evaluate the precision of the estimation of physical properties of scatterers, such as the particle size and concentration (Franceschini et al. 2013; Lavarello and Oelze 2011; Lavarello and Oelze 2012; Yu and Cloutier 2007). Likewise, other studies on erythrocyte aggregation characterization with ultrasound have used either flowing non-physiological or non-pathological conditions (*i.e.*, Couette flow, normal aggregation or low hematocrit) (Franceschini et al. 2010; Nguyen et al. 2008; Yu and Cloutier 2007), which are not necessarily relevant for the clinical context.

The aim of this study was to evaluate the interpretability of model parameters from clinical and hemorheological points of view. In other words, we studied in which degree these parameters can assess an acute increase of RBC aggregation when measured under physiological conditions (*i.e.*, venous flow and a normal hematocrit). Three criteria were used to evaluate the models: first, their accuracy fitting to the experimental BSC; second, the correlation of extracted parameters with laboratory tests of RBC aggregation; and third, their parameter contrast when assessing increasing RBC aggregation.

In Section II, the theoretical framework of the BSC inverse problem is presented and the various models analyzed and their parameters introduced. Then, in section III, the two datasets used in this study are described. The results are then presented in section IV and discussed in section V.

5.5. Theory

5.5.1. General framework for BSC and attenuation estimation

In this study, the approach adopted to measure the BSC is based on the reference phantom technique for spectral analysis (Yao et al. 1990; Wang and Shung 1997). In this context, the region of interest (ROI) of the image is divided in several rectangular cells named parameter estimation regions (PER). These PERs are composed of short segments of radio frequency (RF) lines. The power spectrum of each PER, PS , is calculated as the average of power spectra of the lines contained in it and can be approximated by

$$PS_s(f, z) = I(f) * T_s(f, z) * BSC_s(f) * A_s(f, z), \quad (5.1)$$

where f is the frequency (MHz) and z is the average depth (cm) of the PER; subscript s refers to variables of the tissue sample; I represents the filter effect due to the instrumentation, T describes the diffraction pattern produced by the tissue, BSC is the backscatter coefficient of the sample, and A is the total attenuation function. The latter function is typically approximated by a phenomenological model, expressed as (O'Donnell and Miller 1981; Oelze and O'Brien Jr 2002; Prince and Links 2006):

$$A = e^{-4 \cdot \alpha \cdot f \cdot z}, \quad (5.2)$$

where α represents the attenuation coefficient of the medium (Np/cm/MHz).

To remove factors I and T_s from (5.1), a second acquisition is required with the same acquisition settings on a reference phantom with known BSC_r and A_r and whose speed of sound is close to that of the scanned tissue. Similarly, the power spectrum of the reference phantom is then summarized by the expression:

$$PS_r(f, z) = I(f) \cdot T_r(f, z) \cdot BSC_r(f) \cdot A_r(f, z), \quad (5.3)$$

where subscript r indicates variables of the reference phantom. Having assumed that the speed of sound in both media is the same, the diffraction patterns, T_s and T_r , are then equivalent in (5.1) and (5.3). Thus, dividing (5.1) by (5.3), and then multiplying by BSC_r , one derives the attenuated BSC, expressed as

$$BSC_{att} \triangleq \frac{PS_s}{PS_r} \cdot BSC_r = BSC_s \cdot e^{4 \cdot (\alpha_r - \alpha_s) \cdot f \cdot z}. \quad (5.4)$$

The left-hand-side of (5.4) is practical because it can be experimentally derived with a well characterized reference phantom. The right-hand-side of (5.4) is useful to extract descriptive parameters of the sampled tissue by using a scattering model, as described in the next section.

5.5.2. Formulation of the inverse problem

The inverse problem was formulated by estimating simultaneously the BSC and the attenuation of the blood sample from experimental measurements, by using a standard least squares cost function:

$$\operatorname{argmin}_{\{\theta, \alpha_s\}} \sum_F \left\| \frac{PS_s(f)}{PS_r(f)} \cdot BSC_r(f) - BSC_{s,model}(f, \vec{\theta}) \cdot e^{4 \cdot (\alpha_r - \alpha_s) \cdot f \cdot z} \right\|^2. \quad (5.5)$$

In (5.5), F is the usable bandwidth of the transducer, and $BSC_{s,model}$ is an analytical BSC that is predicted by a particular model (Table 5.1). Also, $\vec{\theta}$ is the vector of parameters required to describe the selected BSC model. Note that the expressions $\frac{PS_s}{PS_r} \cdot BSC_r$ and $BSC_{s,model} \cdot e^{4 \cdot (\alpha_r - \alpha_s) \cdot f \cdot z}$ in (5.5), have the same form as the left-hand-side and right-hand-side of (5.4), respectively.

5.5.3. Scattering models

Models predicting the experimental BSC can be based on an empirical description (Nam et al. 2011) or on an acoustic theory (de Monchy 2016; Insana and Brown 1993; Savéry and Cloutier 2005; Yu et al. 2009). In the latter case, the BSC is generally modeled by analyzing the overall response of a group of scatterers, as follows:

$$BSC = m \cdot \sigma \cdot S. \quad (5.6)$$

In (5.6), m denotes the number density of scatterers, *i.e.*, the number of scatterers per unit volume; σ represents the backscattering cross section, which measures how much acoustic energy is returned by a single scatterer; and S is the structure factor, that accounts for the interference effect due to the spatial organization of scatterers. Usually, σ is defined as the product of a point scatterer, σ_0 , and a form factor that characterizes the shape and size of a single scatterer (Insana and Brown 1993). Each model studied in this manuscript (Table 5.1) makes different assumptions on these parameters and predicts different BSC behavior (Figure 5.1).

Table 5.1 Assumptions of scattering models based on empirical description or an acoustic theory

Model	Scattering unit	Form factor	Structure factor	Parameters
<i>Power law</i> (Nam et al. 2011; Nam et al. 2013)	None	None	None	BSC amplitude (b) Spectral slope (n)
<i>Gaussian</i> (Insana and Brown 1993)	Aggregate	Gaussian	None	Hematocrit (h) Aggregate size (a)
<i>SFSE</i> (Yu and Cloutier 2007)	Red blood cell	Fluid sphere	Approximated by a Taylor expansion	Hematocrit (h) Aggregate size (D) Packing factor (W)
<i>mono-disperse EMTSFM</i> (Franceschini et al. 2011)	Aggregate	Fluid sphere	Analytical (based on Wertheim (Wertheim 1963))	Hematocrit (h) Aggregate size (a) Compactness (h_i)
<i>polydisperse EMTSFM</i> (de Monchy et al. 2016a)	Aggregate	Fluid sphere	Analytical (based on Griffith et al. (Griffith et al. 1987))	Hematocrit (h) Mean aggregate size (a) Compactness (h_i) Gamma width factor (Z)

In general, when there is no erythrocyte aggregation, models predict, in a log-log scale, that the BSC has a spectral slope of four (Figure 5.1a). This slope corresponds to Rayleigh scattering conditions that was experimentally observed for non-aggregating RBCs to persist at least up to 37 MHz (Garcia-Duitama et al. Dec 2017; Shung et al. 1976). Else, when erythrocyte aggregation occurs, the BSC amplitude is increased and the linear behavior of the logarithmically described BSC does not hold anymore (Figure 5.1b and c).

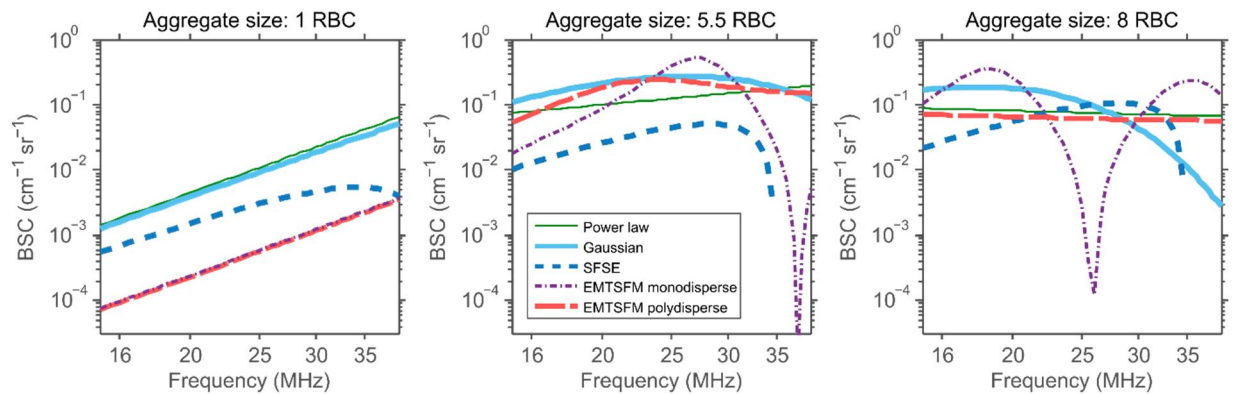


Figure 5.1 Backscatter coefficient (BSC) of blood as predicted by five scattering models. A physiological hematocrit (i.e., 40%) was simulated with increasing aggregate sizes. a), b), c) correspond to aggregate sizes of 1 (no aggregation), 5.5 and 8 red blood cells. W was estimated as equal to D^2 as observed by others (Yu and Cloutier 2007). h_i was fixed at 99% as recommended in (de Monchy et al. 2016a). Z was fixed to be 199, 50 and 20, respectively, to simulate higher polydispersity in bigger aggregates. Values of b and n were found empirically to follow the trend of other models.

Power law model

Based on the linear log-log spectral nature of the blood BSC that can be observed *in vivo* in some circumstances (Garcia-Duitama et al. Dec 2017), the BSC can be approximated by a power law of the form (Nam et al. 2011; Nam et al. 2013):

$$BSC_{pow} = bf^n. \quad (5.7)$$

In (5.7), the coefficient b represents the BSC amplitude and the exponent n models the spectral slope, analyzed in a log-log scale. This is an empirical descriptive model for which parameters do not have a direct physical interpretation. However, it has been successfully

employed in quantitative studies of breast cancer (Nam et al. 2011; Nam et al. 2013). On one hand, this model describes an absence of erythrocyte aggregation by a spectral slope equal to 4. On the other hand, when erythrocyte aggregation is present, the BSC amplitude is increasing in the lower frequency range, but starts decreasing at high frequencies, as depicted in Figure 5.1. This results in a reduction of the slope with the possibility of observing a negative value.

Gaussian model

The Gaussian model describes in general terms acoustic scattering of tissues and has been empirically validated (Insana and Brown 1993). Thus, it was not specifically conceived to model blood scattering. The Gaussian model assumes that the tissue is a continuous medium, with random fluctuations in acoustic impedance due to scatterers (*e.g.*, erythrocyte aggregates in blood) (Insana and Brown 1993; Oelze and Mamou 2016). Even if the concept of scattering particles is not present, it is possible to determine an effective scatterer diameter by computing the correlation distance of the corresponding fluctuations, when assuming that a scatterer is isotropic. In particular, the Gaussian model does not account for a structure factor and is limited to the characterization of sparse media. In this study, we hypothesized that the scattering unit is an aggregate of erythrocytes. Thus, in the case of blood, the Gaussian model can be expressed as:

$$BSC_{Gauss} = \left[\frac{h}{V_{agg}} \right] \cdot \left[\frac{4 k^4 \gamma_z^2 a_{agg}^6}{9} \cdot e^{-0.82 a_{agg}^2 k^2} \right], \quad (5.8)$$

where h represents the hematocrit; V_{agg} is the volume of an aggregate of erythrocytes; k denotes the wave number, which is proportional to the insonification frequency; γ_z is the contrast in acoustic impedance between a scatterer and its surrounding medium (*i.e.*, the aggregate and the plasma). In our implementation of this model, we assumed that the acoustic impedance contrast between an aggregate and plasma was equal to that of a single erythrocyte (*i.e.*, approximately 0.11) (Shung 1982). In (5.8), a_{agg} is the radius of an aggregate.

Structure factor size estimator (SFSE)

The SFSE is the first model of blood scattering accounting for a structure factor in a practical way (Yu and Cloutier 2007). The SFSE assumes that the scattering source is the erythrocyte, which is modeled as a sphere of equivalent volume (radius equal to 2.82 μm) (Yu

and Cloutier 2007). Therefore, the applied form factor corresponds to a fluid sphere and the backscatter cross section of an erythrocyte is constant. This model proposes an approximation of the structure factor based on the first three terms of its Taylor expansion around the zero frequency (see Eqs (5.8) and (5.9) in (Yu and Cloutier 2007)). The first of these terms corresponds to the low-frequency limit of the structure factor, known as the packing factor. The second term is zero by parity, and the last term is a quadratic function of the wave number. Applying these considerations, the model can be written as [9]:

$$BSC_{SFSE} = \left[\frac{h}{V_s} \right] \cdot \left[\frac{k^4 V_s^2 \gamma_z^2}{4\pi^2} \cdot \left(3 \frac{\sin(2ka) - 2ka \cos(2ka)}{(2ka)^3} \right)^2 \right] \cdot \left[W - \frac{12}{5} (kaD)^2 \right], \quad (5.9)$$

where V_s is the volume of a unit scatterer (RBC), a represents its radius, and W is the packing factor, a concept introduced to consider wave interferences for a high number density of randomly positioned scatterers (Twersky 1987). This parameter correlates positively with the spatial organization of aggregates. As introduced earlier, W does not depend on the insonifying frequency. In (5.9), D is the gyration radius of an aggregate, expressed as the ratio of the radius of one aggregate to that of a single erythrocyte.

The BSC predicted by the SFSE can be described by different frequency regimes. At low frequencies, there is a linear behavior with a spectral slope (on a log-log scale) close to four. At intermediate frequencies, a change of the BSC slope and a single modal maximum (rupture point) are predicted. This is followed by an amplitude drop of the BSC at higher frequencies (Figure 5.1a, b, c). The frequency at which the rupture point occurs depends on the aggregate size. Higher values of D induce a shift of the rupture point towards lower frequencies and an overall increase of the BSC amplitude (Figure 5.1). An expansion of this model to consider tissue attenuation has been described as the structure factor size and attenuation estimator (SFSAE) [10].

Effective medium theory considering a structure factor (EMTSFM)

The effective medium theory combined with the structure factor model (EMTSFM) is the second model proposed to consider erythrocyte aggregation and concentrated media (Franceschini et al. 2011; Franceschini et al. 2013). First, aggregates rather than erythrocytes are considered as the source of scattering, and aggregates of erythrocytes are treated as

individual homogeneous scatterers. Second, an analytical form of the structure factor has been introduced to consider the interference effect caused by the spatial correlation between aggregates. To model scattering of erythrocytes within an aggregate, the differential backscattering cross-section of an aggregate was decomposed into two components (de Monchy et al. 2016b): the coherent component that corresponds to the average wave emerging from the effective scatterer, and the incoherent component that describes the fluctuation of the scattering wave around its average within the effective scatterer. The EMTSFM uses the concept of *compactness* h_i of an aggregate, defined as the volume fraction of erythrocytes within an aggregate. In particular, if an aggregate compactness is equal to 1, its acoustical properties are those of a single erythrocyte.

Two generations of this family of models have been proposed. In the first generation (Franceschini et al. 2011), the structure factor was described under the assumption of a monodisperse medium (*i.e.*, assuming that all aggregates have a fixed size). The second generation described a polydisperse medium where the size of aggregates is distributed according to a gamma probability distribution. The monodisperse version of the model is expressed as

$$\begin{aligned}
 & BSC_{EMTSFM_mono} \\
 &= \left[\frac{h}{h_i \cdot V_s} \right] \\
 & \cdot \left[\frac{k^4 V_{agg}^2 \gamma_{z_agg}^2}{4\pi^2} \cdot \left(3 \frac{\sin(2ka_{agg}) - 2ka_{agg} \cos(2ka_{agg})}{(2ka_{agg})^3} \right)^2 \right] \\
 & \cdot \left[\frac{1}{1 - m_{agg} \cdot C(k)} \right]
 \end{aligned} \tag{5.10}$$

where the subscript *agg* makes reference to variables of aggregates instead of those of RBCs. In (5.10), $C(k)$ is the direct correlation function as developed by Wertheim (Wertheim 1963). A detailed derivation of this model can be found in (Franceschini et al. 2011; Franceschini et al. 2013).

The polydisperse version of the model considers the interaction between pairs of aggregates of variable sizes as:

$$BSC_{EMTSFM_{poly}} = m_{agg} \cdot \int |\Phi(k, r)|^2 p(r, Z) dr + m_{agg} \cdot \iint_0^\infty \Phi(k, r_1) \Phi(k, r_2) p(r_1, Z) p(r_2, Z) H_{12}(k) dr_1 dr_2, \quad (5.11)$$

where Φ is the scattering amplitude, a probabilistic formulation of the backscatter cross section of an aggregate σ_{agg} ; p is the gamma probability density function, with gamma width factor Z , that an aggregate has radius r ; and H_{12} is the structure function between aggregates of radii r_1 and r_2 . An analytical solution of the polydisperse structure function with a gamma probability density function was proposed in (Griffith et al. 1987) in the context of small-angle scattering. This model was introduced and validated in the context of acoustic scattering by blood in (de Monchy 2016; de Monchy et al. 2016a).

As the gamma width factor Z tends to infinity, one recovers the monodisperse model. In the current work, we analyzed the standard deviation, expressed as $a/(Z+1)^{1/2}$, of the size distribution, as it is easier to interpret than parameter Z itself. A higher value of the standard deviation implies a higher distribution of erythrocyte aggregate sizes. In the high frequency regime, the monodisperse model predicts an initial increase of the spectral slope followed by prominent peaks and null values (Figure 5.1 b and c). Increasing the aggregate size induces a downshifting in frequency of the whole spectrum. When the size homogeneity decreases (*i.e.*, the size distribution of aggregates is spread), the peaks are smoothed and can possibly disappear.

5.6. Materials and methods

Datasets from two porcine cohorts were analyzed in this study. Cohort 1 corresponds to an *ex vivo* experiment, where RBC aggregation of porcine blood was synthetically increased. Cohort 2 comes from an *in vivo* experimental study in pigs experiencing an open-heart surgery, where RBC aggregation was increased by induced inflammation.

5.6.1. Blood preparation for *ex vivo* experiments

Six porcine blood samples of 300 mL were collected from a local slaughter house. This blood model was chosen because its degree of erythrocyte aggregation is comparable to that of human controls (Baskurt et al. 2011e; Weng et al. 1996b; Windberger et al. 2003). Blood was anticoagulated by using 3 g/L of ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA). Blood components were separated by centrifugation at 1400g (3200 rpm). The hematocrit was adjusted at human

physiological level (*i.e.*, 40%) using autologous plasma. The buffy coat was conserved to better simulate *in vivo* conditions. All blood manipulations were done during the first 10 hours after collection.

To obtain samples with gradually increased levels of erythrocyte aggregation, high molecular mass dextran (from leuconostoc 450-650 kDa, Sigma Chemical, Darmstadt, Germany) was added to the whole blood samples at different concentrations. Erythrocyte aggregation was increased proportionally to the concentration of dextran. First, a dextran stock solution was prepared by dissolving 1.8 g of dextran in 9 mL of phosphate buffered saline (PBS). Seven aliquots of 14 mL of each blood sample were centrifuged to separate the plasma. Then, a measured volume of plasma was replaced by the same volume of the dextran stock solution. Substituted volumes corresponded to 0.14 to 0.98 mL with steps of 0.14 mL. Final concentrations of dextran thus ranged from 0.2 to 1.4 g/dL with steps of 0.2 g/dL. This plasma substitution procedure guaranteed that the adjusted hematocrit was unaffected. The maximum dextran concentration (1.4 g/dL) was reported to generate a very high level of erythrocyte aggregation (Baskurt et al. 2011d).

5.6.2. Assessment of increased erythrocyte aggregation

Increased erythrocyte aggregation for the *ex vivo* cohort was confirmed by low and high shear viscometry (model LS300, Prorheo, Althengstett, Germany), as well as laser aggregometry (Regulest, Florange, France). For laser aggregometry, the index s_{10} was used for RBC aggregation assessment. For viscometry, we employed the index proposed in (Baskurt et al. 2011c), which considers both plasmatic (*i.e.*, high shear viscosity or η_H) and RBC mediated viscosity (*i.e.*, low shear viscosity or η_L). The aggregation viscosity index, v_i was calculated as

$$v_i = \frac{\eta_L - \eta_H}{\eta_H}. \quad (5.12)$$

For both indices (*i.e.*, v_i and s_{10}), higher values indicate a higher level of erythrocyte aggregation.

5.6.3. *Ex vivo* experimental setup

A recent study (Garcia-Duitama et al. Dec 2017) recommended to acquire ultrasound data for RBC aggregation measurements from the antebrachial vein (*i.e.*, in the forearm) at reduced blood flow (*i.e.*, a median shear rate of $\approx 3 \text{ s}^{-1}$). These conditions were simulated in a specially designed tube flow setup shown in Figure 5.2. Each prepared blood sample was driven by a syringe pump (model PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) through a tubing system passing by a distilled water tank into a reservoir. To simulate physiological temperature, the water in the tank was kept at 37°C with a heating circulating system (model Y6, Grant Instruments, Barrington, England). Moreover, blood samples were incubated at 37° from preparation until measurement. A polyvinyl alcohol (PVA) tube was used as acoustic window. It had an inner diameter of 2.3 mm and a wall thickness of 1 mm. The tube was built following three cycles of freezing-thawing, as described in (Fromageau et al. 2007). Blood samples were pumped at $0.77 \text{ cm}^3/\text{min}$ to create a median shear rate of 3 s^{-1} . To have a fully developed laminar flow, blood was allowed to circulate for one minute before acquisition, and the entrance length was sufficient to avoid tube tapering effect. To reduce the impact of sedimentation, the syringe was flipped several times before pumping the blood into the circuit. To prevent contamination of consecutive samples, the circuit was flushed after each acquisition with a sequence of 120 mL of distilled water, 120 mL of air, 20 mL of PBS, and 120 mL of air again.

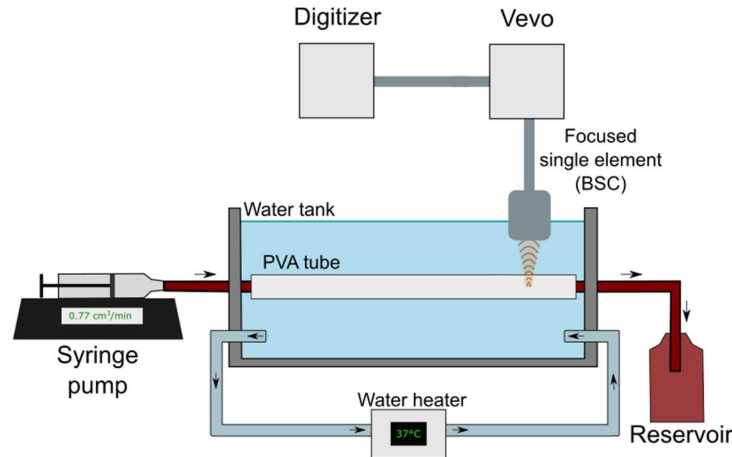


Figure 5.2 Experimental setup for the ex vivo experiments (Cohort 1). It aimed simulating blood flow conditions (i.e., vessel size, flow speed and temperature) within a human antebrachial vein.

5.6.4. Ultrasound acquisitions

For BSC measurements, a high-frequency scanner (model Vevo 770, Visualsonics, Toronto, ON, Canada) was used at a frame rate of 26 images per second. The scanner was equipped with an oscillatory single element probe (model RMV-703), with a nominal central frequency of 35 MHz and a -15 dB bandwidth of 22.5-52.5 MHz. RF signals were bandpass filtered between 3 and 50 MHz, amplified by a pulse receiver system (model 5900 PR, Panametrics, Waltham, MA, USA), and digitized at 250 MHz by an acquisition card (model CS12501 of 12 bits, GageScope, Montreal, QC, Canada). The focal distance of the transducer (1 cm) was set close to the central axis of the PVA tube. The probe was placed at a distance of 7 cm from the tank entrance and positioned along the tube to acquire a longitudinal view of the vessel.

5.6.5. *In vivo* dataset

The *in vivo* dataset was taken from a previous porcine study, where a generalized inflammatory reaction was induced by a cardio-pulmonary bypass (CPB) surgery. Details of this procedure can be obtained in (Tripette et al. 2013). Briefly, we collected RF signals from a cohort of five pigs that underwent a 90 min CPB followed by an off-pump reperfusion of 120 min. Those pigs were primed with an injection of lipopolysaccharide (LPS) to increase the

likelihood of developing an inflammatory response. They were monitored by blood sampling and ultrasound during bypass and reperfusion. In this work, analysis was performed on ultrasound data acquired 30, 90, 120 and 210 min after the beginning of CPB. Ultrasound monitoring was done with a Vevo 770 scanner and a RMV-707B probe, with a nominal central frequency of 30 MHz and a -15 dB bandwidth of 10-45 MHz. For this procedure, the femoral vein was exposed and partially clamped to reduce blood flow to approximately 1.5 mm/s (computed mean shear rates $\approx 0.5 \text{ s}^{-1}$) (Tripette et al. 2013). The leg cavity was filled with a saline solution and the ultrasound probe was immersed in it. A longitudinal view of the vein was acquired. To confirm the inflammatory reaction, blood samples were titrated for interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 concentrations, which are pro- and anti-inflammatory cytokines, respectively. The erythrocyte aggregation level was also monitored by laser aggregometry (S_{10} parameter), but not by viscometry that was not available.

5.6.6. BSC measurements

The BSC was estimated using the reference phantom technique, as described in Section 5.5.1. The reference phantom consisted of an erythrocyte solution in PBS at a low volume concentration (4% and 6% for *ex vivo* and *in vivo* experiments, respectively). This medium impedes erythrocyte aggregation and is not affected by wave interference observed at higher hematocrits. For *ex vivo* experiments, the reference solution was flowed in the same tube setup, while for *in vivo* experiments, it was placed in a beaker in which the probe was immersed. The theoretical reference BSC_r in (5.5) was calculated by applying the spherical packing factor proposed in (Twersky 1987) and applied to blood experiments in (Yu and Cloutier 2007). Attenuation of the PBS suspended RBCs (reference phantom, A_r in (5.5)) was obtained from (Wang and Shung 1997).

In all experiments, the region of interest (ROI) to compute the BSC corresponded to half the vessel lumen; *i.e.*, within half of its radius around the central axis. The ROI was divided into PERs of size 0.08 mm, in lateral and axial directions with an overlapping of 75% in both dimensions. The analyzed bandwidth was 15-37 MHz for both *ex vivo* and *in vivo* datasets, which was within the -15 dB frequency band of either transducer. This bandwidth was at least 20 dB above the noise floor. For each PER, an inverse problem was solved to obtain model

parameters. Each parameter was averaged over the entire collection of PERs to obtain reported values, as detailed elsewhere (Garcia-Duitama et al. Dec 2017; Garcia-Duitama et al. 2015).

5.6.7. Optimization algorithms

Due to variable model complexity, it was required to adjust the optimization algorithm utilized to solve the inverse problem corresponding to each BSC model. When applicable, direct methods were preferred to iterative ones. To simplify the inverse problem, the hematocrit was considered as known (*i.e.*, measured by microcentrifugation) and hence, was not included in the set of variables to estimate. It was found convenient to express an aggregate radius relative to a single erythrocyte radius (considered at $2.34\ \mu\text{m}$ for a sphere of the same volume as a porcine RBC (Windberger et al. 2003)). When applicable, the solution domain of each inverse problem was bounded to find normalized scatterer radii ranging from 0.1 to 10 times the RBC radius (a or D in Table 1), and to find blood attenuation values within the range of 0.01 to 0.8 dB/cm/MHz (A_s in (5.5)).

The inverse problems of the power law (5.7) and Gaussian (5.8) models were solved by the trust region method for nonlinear minimization (*i.e.*, Matlab function “*fmincon*” with the algorithm SQP). Parameters b and n were bounded between 10^{-8} and 10^{-5} , and 0 and 5, respectively. These boundaries were found empirically. For the Gaussian model, a was bounded between 0.1 and 10 RBC, as mentioned earlier.

The inverse SFSE problem of (5.9) was solved by pseudo-inverse matrix for unbounded W and D , and by exhaustive search for the attenuation of (5.5), as detailed in (Franceschini et al. 2010). Briefly, A_s was iterated between attenuation boundaries; at each iteration, A_s was fixed and an inverse problem for W and D was solved. The parameters recovering the lower cost for all iterations were retained as the solution of the inverse problem.

To keep execution time tenable for the inverse problem in the case of the EMTSFM model family (5.10) and (5.11), the aggregate compactness was assumed to be known *a priori* (equal to 0.99) and a heuristic approach of exhaustive search over a lookup table was used; *i.e.*, a lookup table of BSC was pre-computed on a mesh of the parameters’ domain (Table 5.2). During the minimization procedure, the known acquisition parameters (*i.e.*, hematocrit and depth) were approximated to the closest neighbor in the parameters’ domain and fixed. Then,

the set of remaining parameters that approximated best the experimental BSC was found by an exhaustive search in the lookup table. In the case of the monodisperse version, we considered the BSC model of (5.11) with the gamma width factor Z fixed at 200.

Table 5.2 Range and step size of model parameters used for pre-computing the lookup table of EMTSFM models. Hematocrit and depth were considered known and were thus fixed during the exhaustive search in the inverse problem. Both parameters were nevertheless allowed to vary within pre-defined ranges when computing the lookup table

Parameter	Range	Step size
Hematocrit	20 - 40%	2%
Depth	0.8 – 2.0 cm	0.001 cm
Aggregate size	0.1 - 10 RBC	0.1 RBC
Attenuation coefficient	0.01 – 0.8 dB/cm/MHz	0.01 dB/cm/MHz
Gamma width factor Z	1 - 199	0.01 (in $2^{1/2}/(Z+1)^{1/2}$ scale)

5.6.8. Assessment criteria for BSC modeling

Three criteria were used to assess the sensitivity of each model to detect variations in erythrocyte aggregation. First, the quality of BSC and attenuation model fittings was evaluated by the R^2 statistic, as computed in (Oelze and O'Brien Jr 2006):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_F \|BSC_{att}(f) - BSC_{s,model}(f, \theta) \cdot e^{4 \cdot (\alpha_r - \alpha_s) \cdot f \cdot z}\|^2}{\sum_F \|BSC_{att}(f) - E[BSC_{att}(f)]\|^2}, \quad (5.13)$$

where E denotes the average operator. Higher R^2 values (*i.e.*, closer to 1) indicate a better fit to the experimental measurements. With this definition of R^2 , the quantity $1 - R^2$ is interpreted as the ratio of the unexplained ‘variation’ to the total ‘variation’ of data (here, $BSC_{att}(f)$ is considered as data). Negative values indicate poor fit (Nagelkerke 1991).

Second, the rheological interpretability of BSC model parameters was assessed using Pearson correlations of estimated parameters with benchmark measurements of RBC aggregation (*i.e.*,

the viscometer in Cohort 1, and the laser aggregometer in Cohort 2), together with corresponding p -values.

Third, we evaluated the contrast offered by all parameters of each model, and by blood attenuation As , when comparing different levels of erythrocyte aggregation. The contrast is a measure of *intra-subject* variation of erythrocyte aggregation within selected PERs. It was obtained by normalizing each parameter with respect to its value at the lowest level of RBC aggregation. Based on the notion of Fisher criterion (Bishop 1995), the contrast was calculated as:

$$\Delta \theta(i) = \frac{E[\theta_i] - E[\theta_0]}{\sqrt{\text{Var}[\theta_i] + \text{Var}[\theta_0]}}, \quad (5.14)$$

where θ_i represents the evaluated parameter of a model at state i , and E and Var denote the mean and variance, respectively, of a random variable along the PERs. In Cohort 1, the state refers to the dextran concentration, whereas in Cohort 2 it represents the time after the beginning of CPB.

To also evaluate statistical significance of changes in erythrocyte aggregation within the groups, we applied a test of variance (ANOVA) over *inter-subject* raw parameters, and to the contrast $\Delta \theta$ itself, for the two datasets. When data failed the normality test, an ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis) was applied. In this context, statistical significance was defined as a p -value below 0.05.

5.7. Results

5.7.1. Confirmation of an increase in erythrocyte aggregation

In both datasets, an increase in erythrocyte aggregation occurred. In Cohort 1 (*ex vivo*, Figure 5.3), the laser aggregometer index s_{10} showed a saturation at concentrations higher than 0.6 g/dL. This saturation behavior attributed to light reflection artifacts has been reported in other studies, but at higher dextran concentrations (Baskurt et al. 2011d). For this reason, viscometry was considered the *ex vivo* benchmark method. As seen in Figure 5.3, v_i confirmed that RBC aggregation increased progressively with the addition of dextran.

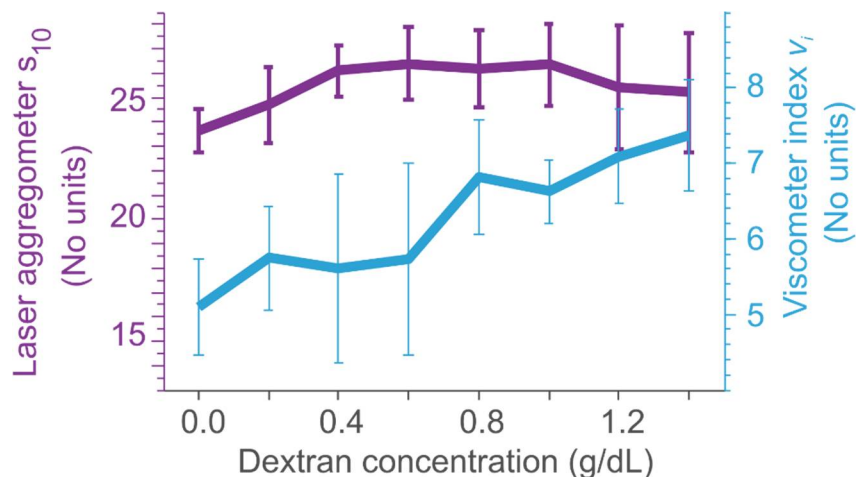


Figure 5.3 Confirmation by laboratory tests of an increase in RBC aggregation in Cohort 1.

The increase in dextran 450-650 kDa concentration induces an increase in erythrocyte aggregation. Laser aggregometry showed saturation after attaining 0.6 g/dL. However, except for a few dextran concentrations, a progressive increase of the viscometry index is observed.

In Cohort 2 (*in vivo*), a progressive increment in erythrocyte aggregation caused by the inflammatory reaction was confirmed by laser aggregometry and cytokine assessments (Figure 5.4). The reduction of IL-10 after 120 min of CPB aimed to counterbalance the inflammatory reaction reflected by IL-6 levels. All biomarkers suggest a reduction of inflammation at the end of the monitoring period. Erythrocyte aggregation monitored by laser aggregometry showed very similar behavior as cytokine levels IL-6 (Figure 5.4, Pearson correlation coefficient $R = 0.90$, $p\text{-value} = 0.04$). Based on s_{10} , blood samples of the *in vivo* cohort showed lower erythrocyte aggregation than those of the *ex vivo* tube experiments (Figure 5.3 and Figure 5.4a).

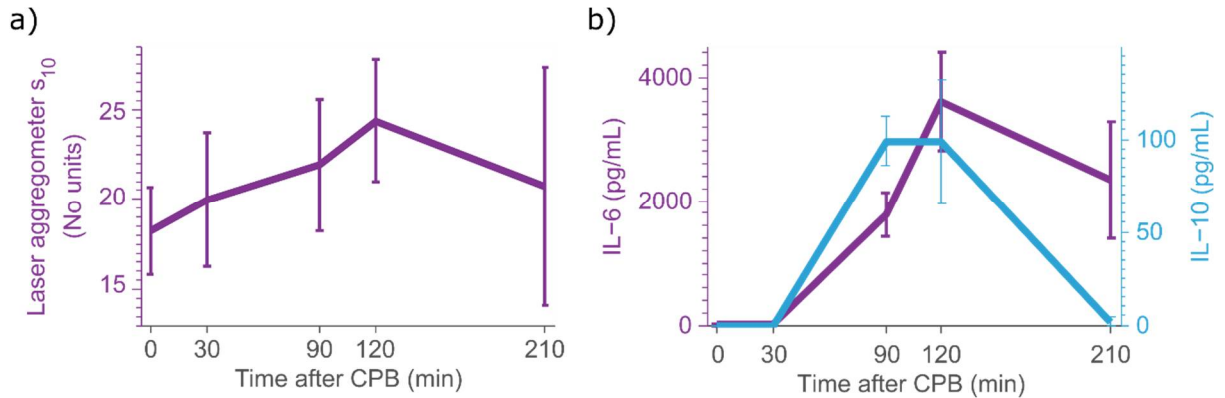


Figure 5.4 Confirmation by laboratory tests of an increase in RBC aggregation caused by an inflammatory condition in Cohort 2. The inflammatory reaction occurred during the first 120 min after the beginning of CPB surgery and was reduced afterwards. a) RBC aggregation evaluated by the laser aggregometry index s_{10} . b) Cytokines analysis: IL-6 and IL-10 are markers of pro-inflammatory and anti-inflammatory processes, respectively.

Attenuated BSCs (5.4) also presented variations with increasing erythrocyte aggregation (Figure 5.5). In Cohort 1 (*ex vivo*, Figure 5.5a), rupture points are observed beyond which a change in spectral slope occurred at higher dextran concentrations. This behavior was previously reported as an indication of the presence of large aggregates (Garcia-Duitama et al. Dec 2017).

In contrast, attenuated BSCs in Cohort 2 (*in vivo*, Figure 5.5b) showed lower amplitudes than the *ex vivo* counterpart, and no clear rupture points. This is explained by lower aggregation in this cohort.

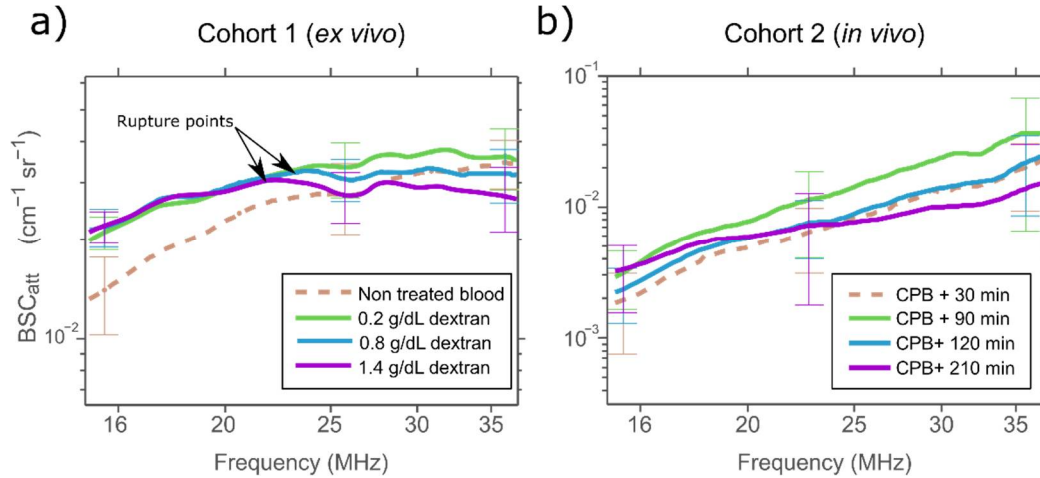


Figure 5.5 Evolution of attenuated BSCs (i.e., BSCs not compensated for attenuation) with increasing erythrocyte aggregation. a) Ex vivo porcine blood samples. Rupture points corresponding to a change in spectral slope are observed indicating a strong erythrocyte aggregation. b) In vivo measurements in pigs experiencing a CPB surgery.

5.7.2. BSC model fitting assessment

Figure 5.6 shows an example of the fitting to experimental *ex vivo* data of the five scattering models. With the exception of EMTSFM monodisperse, all models fitted well the experimental data. When considering the whole datasets of both cohorts, and the goodness-of-fit R^2 metric, we observed that all models better fitted the *in vivo* than the *ex vivo* data (Figure 5.7). This could be explained by the relatively low spectral complexity of the attenuated BSC curves in the case of *in vivo* data (Figure 5.5b). With the exception of the model EMTSFM monodisperse, all models showed comparable R^2 values (Figure 5.7). Moreover, no clear relationships could be established between R^2 and the level of RBC aggregation. Consequently, the spectral fitting criterion did not offer a good contrast to compare the different models.

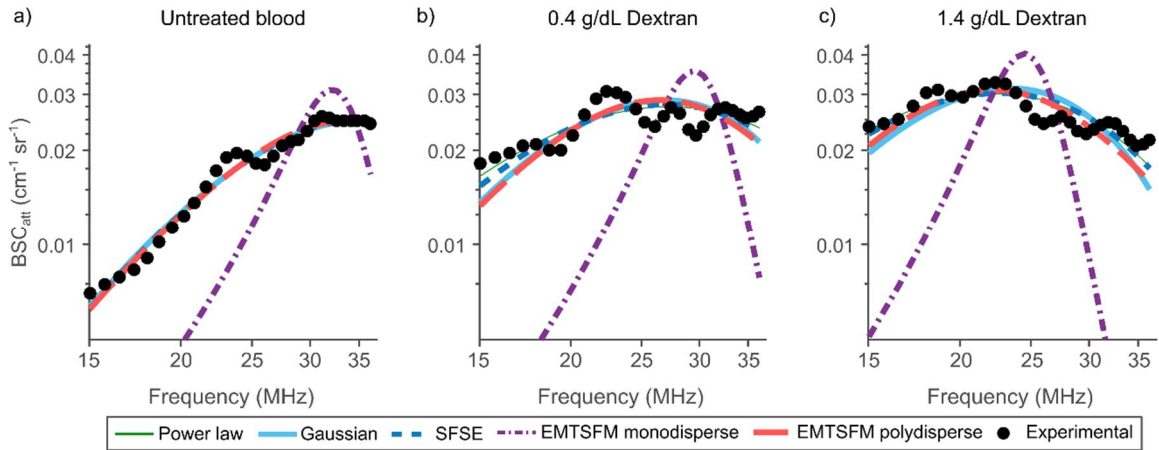


Figure 5.6 Examples of model fitting in Cohort 1 (*ex vivo* porcine blood experiments). With the exception of EMTSFM monodisperse, all models described correctly experimental BSC spectra at all erythrocyte aggregation levels.

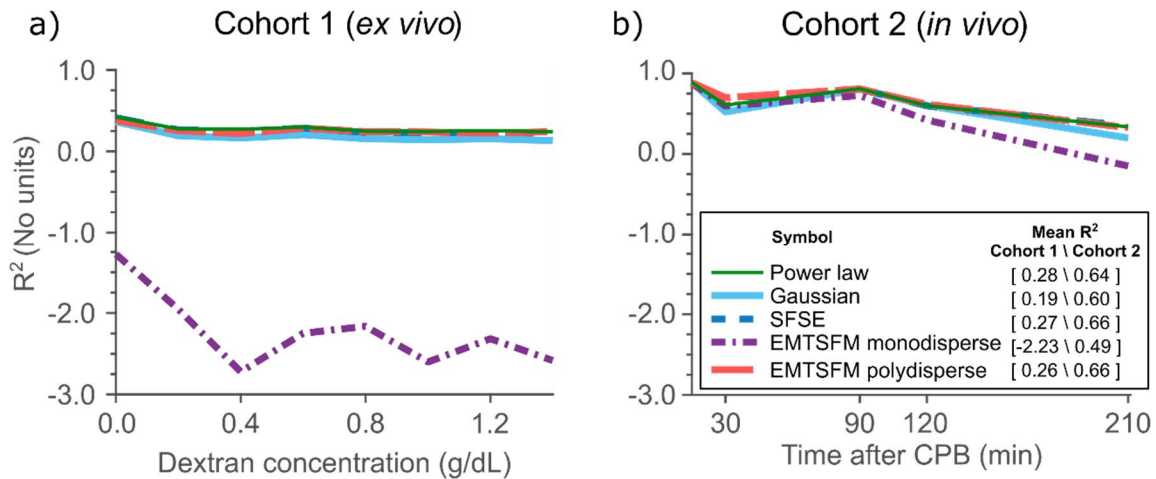


Figure 5.7 Spectral BSC model fitting assessment. Mean R^2 values as a function of the dextran concentration and time after CPB (standard deviations are not shown for clarity). Reported mean R^2 in parenthesis were averaged over the whole dataset of each cohort.

5.7.3. Correlation of model parameters with benchmark laboratory tests

With the *ex vivo* dataset, all parameters correlated significantly with viscometry tests for different concentrations of dextran (

Table 5.3), except for parameter n of the power law model. The strongest correlation coefficients were observed with parameters W of SFSE and a of the monodisperse and polydisperse EMTSFM models.

On the other hand, with the *in vivo* dataset, none of the models showed significant correlations with laser aggregometer tests. In particular, neither the increase of inflammation up to time 120 min, nor its reduction at time 210 min, as observed by both cytokines (*i.e.*, IL-6 and IL-10) and laser aggregometry s_{10} , could be detected by any of the model parameters.

Table 5.3 Pearson correlation coefficient, R^2 , of BSC model parameters with benchmark laboratory tests of RBC aggregation; i.e., with viscosity in Cohort 1 and laser aggregometry in Cohort 2. P-values in bold are statistically significant

	Cohort 1		Cohort 2	
	R^2	p-value	R^2	p-value
Power Law (b)	0.72	0.045	0.57	0.32
Power Law (n)	0.62	0.10	-0.48	0.42
Gaussian (a)	0.76	0.03	0.25	0.68
SFSE (W)	0.85	0.007	0.41	0.50
SFSE (D)	0.79	0.019	0.17	0.79
EMTSFM monodisperse (a)	0.85	0.007	0.26	0.68
EMTSFM polydisperse (a)	0.80	0.017	-0.66	0.23
EMTSFM polydisperse $a/(Z+1)^{1/2}$	0.76	0.03	0.38	0.53

5.7.4. Contrast of model parameters with enhancement of erythrocyte aggregation

For the intra-subject analysis, the parameters that showed the highest contrast in both cohorts were a of the Gaussian model and W of the SFSE model (Figure 5.8a and b). In the case of Cohort 2, the parameter $a/(Z+1)^{1/2}$ of EMTSFM polydisperse also showed a good contrast (Figure 5.8b). However, none of parameter contrast were significant different between the various levels of erythrocyte aggregation, in the two cohorts. The increase in contrast at the end of the *in vivo* experiment is caused by a decrease in estimation variances within the different PERs (data not shown).

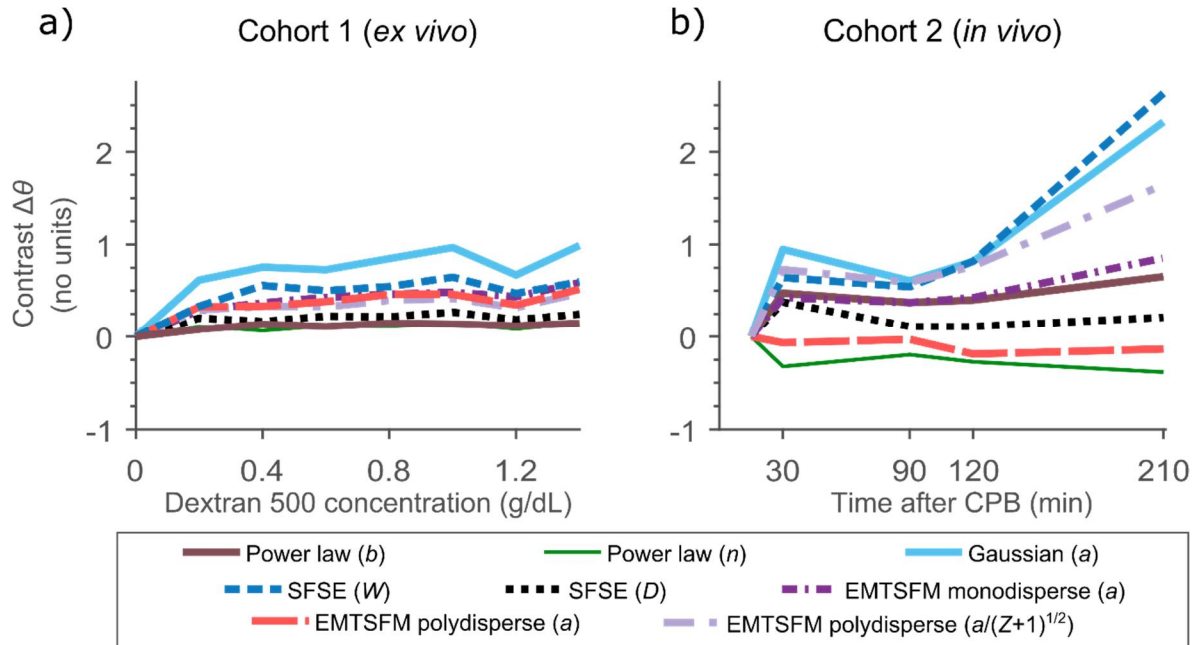


Figure 5.8 Mean values of the model contrast compared with intra-subject value before increasing of erythrocyte aggregation (standard deviations are not shown for clarity).

Parameters a of Gaussian and W of SFSE showed the best contrast in both cohorts, but results

In the inter-subject analysis, most parameters showed a significant difference (p -value < 0.001) for the different dextran concentration in the *ex vivo* cohort. Exceptions of this were n and b of the power law model and D of SFSE (Figure 5.9a and c). However, none of the parameters detected significant differences for the set of surgery times in the *in vivo* cohort (Figure 5.9b and d).

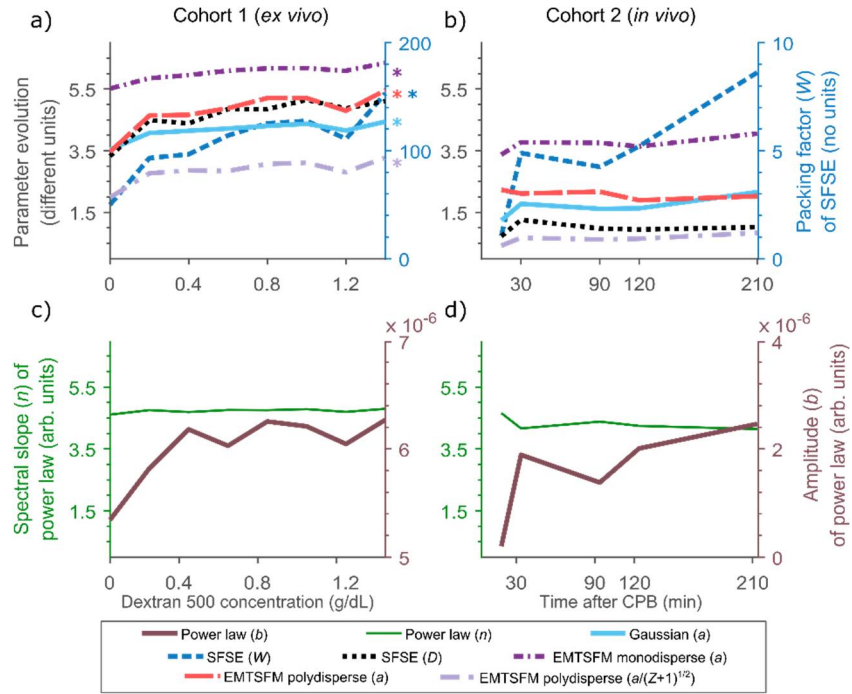


Figure 5.9 Mean values of model parameters (standard deviations are not shown for clarity). In a) and b) the units for parameter a (aggregate size) of Gaussian, EMTSFM monodisperse and polydisperse, and D of SFSE are the number of red blood cells. c) and d) parameters of the power law model with a different numerical scale. Parameters marked with a star showed significant differences in the group ANOVA tests.

5.7.5. Contrast of blood attenuation

The best attenuation contrast in both cohorts was shown by the Gaussian and SFSE models (Figure 5.10a and b). In Cohort 1, the contrast showed by the power law was also good (Figure 5.10a). However, standard deviations of these 3 model contrasts were high (not shown), and results were not statistically significant. The only attenuation contrast with significant differences between the various levels of RBC aggregation was with the EMTSFM monodisperse in the *ex vivo* cohort (p -value < 0.001, Figure 5.10a).

In general, most models estimated lower attenuation for the *in vivo* than *ex vivo* cohorts (Figure 5.10c and d). Exceptions of this are the two EMTSFM models. This tendency was expected, as the hematocrit of pigs in the *in vivo* cohort was lower (between 20-34%) due to the dilution inherent to the CPB surgery, which is associated with lower attenuation (Wang and

Shung 1997). All models reported the same range of attenuations *in vivo*, but discrepancies were observed for *ex vivo* samples (Figure 5.10c and d). SFSE and Gaussian models reported attenuations in the same range of values as found in the literature for blood (Franceschini et al. 2010; Wang and Shung 1997).

Attenuation of blood increased with enhanced erythrocyte aggregation, as reported in (Franceschini et al. 2010). The power law and SFSE models were able to describe this tendency in the group ANOVA tests (p -value < 0.001). However, none of the models described this trend in the *in vivo* cohort (Figure 5.10b).

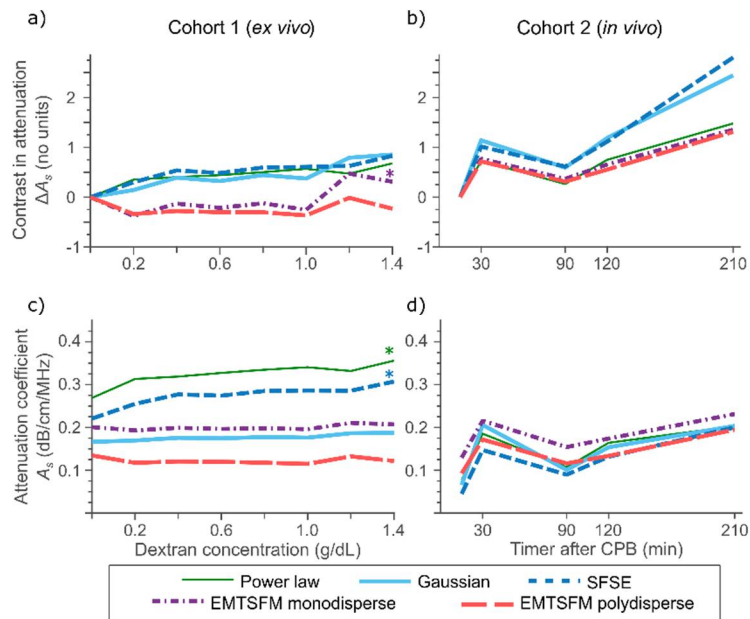


Figure 5.10 Estimated contrast and mean attenuation coefficients (standard deviations are not shown for clarity). Higher erythrocyte aggregation causes an increase in blood attenuation. a) and b) Mean attenuation contrast, compared with the same subject before incre

5.8. Discussion

To simplify the analysis, we first exclude some model parameters using the three criteria. First, the fitting of EMTSFM monodisperse in Cohort 1 was poor and thus, its parameter a was excluded (Figure 5.6 and Figure 5.7). Parameter n of the power law model was also excluded,

as it did not correlate significantly with benchmark rheology tests in any cohort (Table 5.3). Parameter a of EMTSFM polydisperse was discarded because it showed a slight decrease over time following CPB in Cohort 2 (Figure 5.9b). Although D of SFSE showed significant correlation with benchmark rheology tests in Cohort 1 (Table 5.3), its contrast was poor (Figure 5.8). For the same reason, the amplitude b of the power law model was excluded.

The set of parameters that could best describe the erythrocyte aggregation variations is then reduced to the packing factor W of SFSE, the particle size a of the Gaussian model and parameter $a/(Z+1)^{1/2}$ of the EMTSFM polydisperse. These parameters showed good fitting, good correlations with laboratory markers of RBC aggregation in Cohort 1, they provided good contrast in both cohorts, and they were discriminant according to the inter-subject ANOVA tests.

Even if a reliable description of RBC aggregation was observed in the *ex vivo* dataset, the *in vivo* cohort did not show significant correlations with laboratory tests or group effects observed by the ANOVA. This can result from several factors affecting measurements, such as the lower aggregation, lower hematocrit, lack of precision in the control of blood flow, or intra-subject and inter-subject variabilities. To completely assess the clinical relevance of these parameters, it would be necessary to conduct research in human cohorts including patients with acute inflammatory syndrome.

Another possible reason why models were inaccurate in describing Cohort 2 (*in vivo*) is the lack of spectral peaks (rupture points) in the BSC in the studied bandwidth. Despite confirmed inflammatory reactions, BSC_{att} presented a linear dependency with frequency (Figure 5.5b), which can be roughly described by only two parameters (*i.e.*, the spectral slope and the y-intercept). Most recent models predict occurrence of peaks and use several variables to model the phenomenon. To fit models with more parameters, the presence of spectral peaks is required in the BSC or it would be necessary to add constraints to the model based on prior knowledge to reduce the solution domain.

As observed in Cohort 1, important RBC aggregation induces rupture points in the observed bandwidth (Figure 5.5a). Thus, models allowing a non-linear relationship of the BSC on a log-log scale (*e.g.*, SFSE, Gaussian or EMTSFM polydisperse, see Figure 5.1) are more

prone to be effective in describing clinical cases of severe aggregation, such as sepsis or systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Despite considerable research efforts (Kaukonen et al. 2015; Warltier et al. 2002a), it is still an open question which biological marker (*e.g.*, biochemical or rheological) would improve the diagnosis of these clinical situations. If the BSC of blood is validated as a discriminating marker of these conditions, suggested BSC models could play a major role in risk stratification of those patients.

The large differences in attenuation and packing factor (W) values between *ex vivo* and *in vivo* experiments (Figure 5.10c and d and Figure 5.9a and b, respectively) can be explained by the following observation. The mean hematocrit in the *in vivo* cohort varied between 20-34%, while it was at 40% for the *ex vivo* measurements. Higher hematocrits promote the formation of bigger and more complex structures of erythrocytes (Baskurt et al. 2011d). This effect increases attenuation and reduces randomness in spatial organization of RBCs, described by W , which may thus explain the difference.

When assessing the relevance of models for clinical applications, the feasibility of solving the inverse problem in real time should also be considered. The use of specialized models could imply that more parameters are needed or that its execution time could be prohibitive. An example of this is the inverse problem of the EMTSFM models, for which our implementation was time consuming. As an iterative optimization algorithm calls its model function thousands of times during the minimization process, the time required to fit a single BSC curve with this method varied between 16 to 24 s with a 3.6 GHz single CPU (results not presented). Thus, the analysis of a single image, which involves several hundreds of BSC curves, can be impractical for clinical purposes. This motivated us to use pre-computed values in a lookup table instead of the iterative inverse problem strategy (*i.e.*, *fmincon* of Matlab). Although the computation of the lookup table is time consuming, it is done off-line and only once. With the lookup table, the inverse problem could be resolved in less than a second per image.

Although this study gives some insight on the application of blood scattering models in a clinic context, it presents some limitations. First, our measurements are not done in patients, where the attenuation of the skin is higher than the one of our experiments. Also, there is no guaranty that the erythrocyte aggregation level that we obtained in the porcine model or with synthetic methods *ex vivo* represent levels found in rheological human diseases. These two

reasons show the need of acquisitions in human pathological cases for future research projects. In addition to suggested parameters W of SFSE, a of the Gaussian model, and $a/(Z+1)^{1/2}$ of the EMTSFM polydisperse, Figure 5.10 suggests that proper estimation of total attenuation may have some discriminating values to assess RBC aggregation. This may also deserve to be tested with an *in vivo* human cohort.

5.9. Conclusion

The conditions imposed by the *in vivo* assessment of erythrocyte aggregation are suboptimal. Factors such as varying shear rates, unknown hematocrit and attenuation make challenging the extraction of quantitative parameters in the frame of an inverse problem of the BSC. Nevertheless, the BSC of blood presents characteristics that allow discerning the erythrocyte aggregation level. In this study, simpler models, such as SFSE or Gaussian, as well as the more complex model EMTSFM polydisperse were sufficient to detect a wide spectrum of normal and pathological levels of RBC aggregation. Namely, overall, it was the packing factor W extracted from the SFSE model, the aggregate radius a of the Gaussian model, and parameter $a/(Z+1)^{1/2}$ of the EMTSFM polydisperse that offered discriminating performance, and improved rheological interpretability in the cases of high aggregating blood samples. These results motivate future studies in patients with acute inflammatory syndrome.

5.10. Annexe 1 Traitement du signal

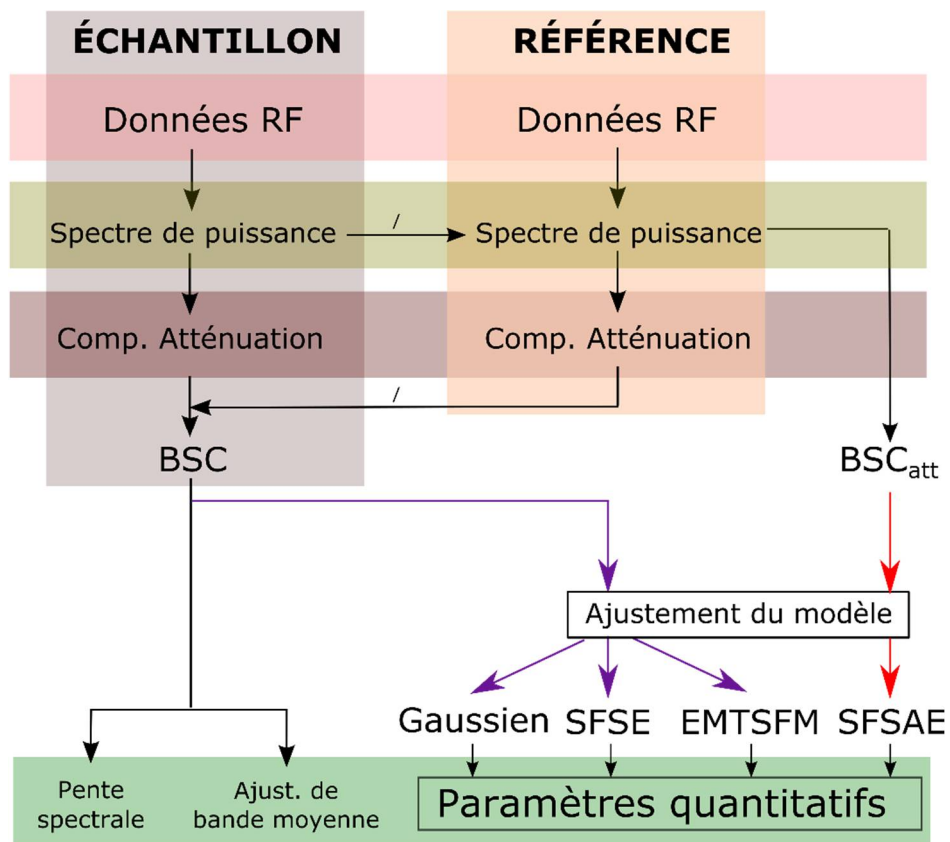


Figure 5.11 Composantes requises pour l'obtention du BSC ou BSC_{att}

Chapitre 6 Protocol for robust *in vivo* measurements of erythrocyte aggregation using ultrasound spectroscopy

6.1. Avant-propos

Ce chapitre reproduit le contenu de l'article « *Protocol for robust in vivo measurements of erythrocyte aggregation using ultrasound spectroscopy* » publié en 2017 dans le journal « *Ultrasound in medicine & biology* » par Julian Garcia-Duitama, Boris Chayer, Damien Garcia, Yves Goussard et Guy Cloutier après évaluation par comité de pairs.

Contributions :

En tant qu'auteur principal de cet article, Julian Garcia-Duitama a conçu et réalisé les expérimentations, mis au point et implémenté les programmes informatiques correspondants, a effectué le post-traitement des données, a rédigé l'article et l'a défendu auprès des réviseurs du journal. Boris Chayer a participé à l'élaboration et la réalisation du protocole expérimental *in vivo*. Le Dr Damien Garcia a contribué avec le code pour l'estimation du flux sanguin et au développement théorique de la rhéologie du sang. Les Dr Yves Goussard et Guy Cloutier ont contribué à l'interprétation des résultats et à la révision et la correction du manuscrit. Ce travail a été effectué sous la supervision du Dr Guy Cloutier, directeur du projet de recherche.

6.2. Résumé

L'agrégation érythrocytaire est un marqueur non spécifique de l'inflammation aiguë et chronique. Bien qu'il soit habituel d'évaluer ce phénomène dans le laboratoire à partir d'échantillons sanguins, il est possible de l'évaluer *in vivo* et en temps réel avec des techniques spectrales ultrasonores. Cependant, la variabilité du débit sanguin peut affecter l'interprétation de cette mesure acoustique. Ainsi, une normalisation du flux est requise. Cette étude évalue la robustesse de la technique ultrasonore aux différentes conditions d'écoulement. D'abord, deux techniques de standardisation du flux ont été évaluées avec des échantillons porcins et équins en écoulement de Couette. Ces techniques consistaient soit à arrêter le flux, soit à le réduire.

Ensuite, la sensibilité et la répétabilité de la méthode retenue ont été évaluées chez onze volontaires humains. On a observé que l'arrêt du flux compromettait l'interprétation et la répétabilité de la mesure. Contrairement, le maintien d'un débit faible a fourni des mesures répétables et a permis de faire la distinction entre des concentrations normales et élevées d'agrégation érythrocytaire. On a observé une excellente correspondance entre les mesures *in vivo* et *ex vivo* du phénomène ($R^2 = 82,7\%$, $p\text{-value} < 0,0001$). Ces résultats confirment la faisabilité de l'évaluation *in vivo* de l'agrégation des érythrocytes chez l'homme par des moyens ultrasonores quantitatifs.

6.3. Abstract

Erythrocyte aggregation is a non-specific marker of acute and chronic inflammation. Although it is usual to evaluate this phenomenon from blood samples in the laboratory, *in vivo*, real time assessment of erythrocyte aggregation is possible with spectral ultrasound techniques. However, variable blood flow can affect the interpretation of the acoustic measure. Therefore, a flow standardization is required. This study assesses the robustness of the ultrasound technique to different flow conditions. First, two techniques of standardization of the flow were evaluated with porcine and equine samples in Couette flow. These techniques consisted in either stopping the flow or reducing it. Then, the sensibility and repeatability of the retained method was evaluated in eleven human subjects. We observed that stopping the flow compromised interpretation and repeatability. Conversely, maintaining a low flow provided repeatable measures and could distinguish between normal and high extents of erythrocyte aggregation. Excellent agreement was observed between *in vivo* and *ex vivo* measures of the phenomenon ($R^2 = 82.7\%$, $p\text{-value} < 0.0001$). These results support the feasibility of assessing *in vivo* erythrocyte aggregation in humans by quantitative ultrasound means.

Keywords: Quantitative ultrasound, backscatter coefficient, spectral analysis, erythrocyte aggregation, flow phantom study, *in vivo* measures, reliability.

6.4. Introduction

Erythrocyte aggregation refers to the reversible tendency of mammalian red blood cells (RBC) to associate under low blood-flow or stagnation conditions (Baskurt et al. 2011a). RBC hyper-aggregation has been extensively reported in various pathophysiological conditions, such as cancers, diabetes mellitus and cardiovascular diseases. In particular, hyper-aggregation is often associated with inflammatory disorders, as some proteins released in the blood stream, notably fibrinogen, enhance inter-RBC attraction forces (Weng et al. 1996a). Consequently, indicators of erythrocyte aggregation are commonly used in clinical research as a surrogate marker of inflammation (Berliner et al. 2005; Reggiori et al. 2009).

Several techniques have been proposed for the quantitative measurement of erythrocyte aggregation. In general, the measure relies on laboratory-based instruments requiring blood sampling and the use of anticoagulant. Indices based on erythrocyte sedimentation rate (Fåhræus 1929), blood viscosity (Chien et al. 1967), or light transmission and scattering (Baskurt et al. 1998) are used as indicators of the degree of RBC aggregation. Particularly, the laser aggregometer is still the most accepted instrument for RBC aggregation measurements (Baskurt et al. 2009; Zhao et al. 1999). The key advantage of this instrument is that the measure is done under well controlled conditions, thus reducing the effect of confounding factors (*i.e.*, shear rate, hematocrit, sedimentation and temperature).

In vivo assessment of RBC aggregation has also been proposed, mostly using ultrasound approaches (Rouffiac et al. 2004; Tripette et al. 2013; Tripette et al. 2015). The main aim of *in vivo* measurements is to continuously monitor the acute inflammation response in patients under critical care evaluation, notably those at risk of septicemia (Fernandes Jr 2013; Tripette et al. 2013). The most used ultrasound technique is based on the measurement of a fundamental acoustic property of blood: the backscatter coefficient (BSC). The BSC is a quantitative value that reflects the capacity of a tissue to return acoustic energy at a certain frequency (Shung 2005). At any physiological hematocrit, the BSC of blood increases in amplitude as a result of erythrocyte aggregation (Foster et al. 1994; Yu and Cloutier 2007; Yuan and Shung 1988). The main advantage of the BSC is that it is independent of the ultrasound system characteristics, so reported values can be compared between laboratories (Anderson et al. 2010). It is a common practice to summarize the frequency-dependent BSC with descriptive parameters, which is

usually represented by a spectral curve fitted to scattering models (Franceschini et al. 2008; Yu and Cloutier 2007) or by taking the slope of the curve (Scheipers 2009). Other ultrasound techniques, such as power Doppler (Cloutier and Shung 1992) and envelope statistics (Destrempes et al. 2016), have also been proposed to quantify RBC aggregation.

Despite several efforts, there are still a few challenges for *in vivo* measurements by ultrasound. In contrast to laboratory-based *ex vivo* techniques, *in vivo* measurements imply a lack of control over factors such as the blood temperature, hematocrit, and flow shear rate. Most authors implicitly consider that changes in body temperature are minimal and neglect this effect, which is acceptable under changes up to a few Celsius degrees (Baskurt et al. 2011b; Neumann et al. 1987). On the other hand, hematocrit changes can cause significant differences in measurements and it is usually corrected for or considered constant unless a hemorrhagic condition prevails.

The main confounding factor for *in vivo* assessment of RBC aggregation is the flow shear rate. Shearing forces are created by flowing blood traveling at different velocities depending on the position in the vessel. RBC aggregation typically occurs at shear rates between 0.0001 s^{-1} and 100 s^{-1} , with more aggregation present at the lowest range (Chien et al. 1967). In conditions such as diabetes mellitus, shear rates above 100 s^{-1} may be necessary to disrupt pathological RBC aggregates (Cloutier et al. 2008). At high shears nearby the vessel wall, aggregates partially or totally dissociate (Figure 6.1). Conversely, low shear rates can be found close to the longitudinal axis of a vessel or in recirculation zones, which enhance RBC aggregation.

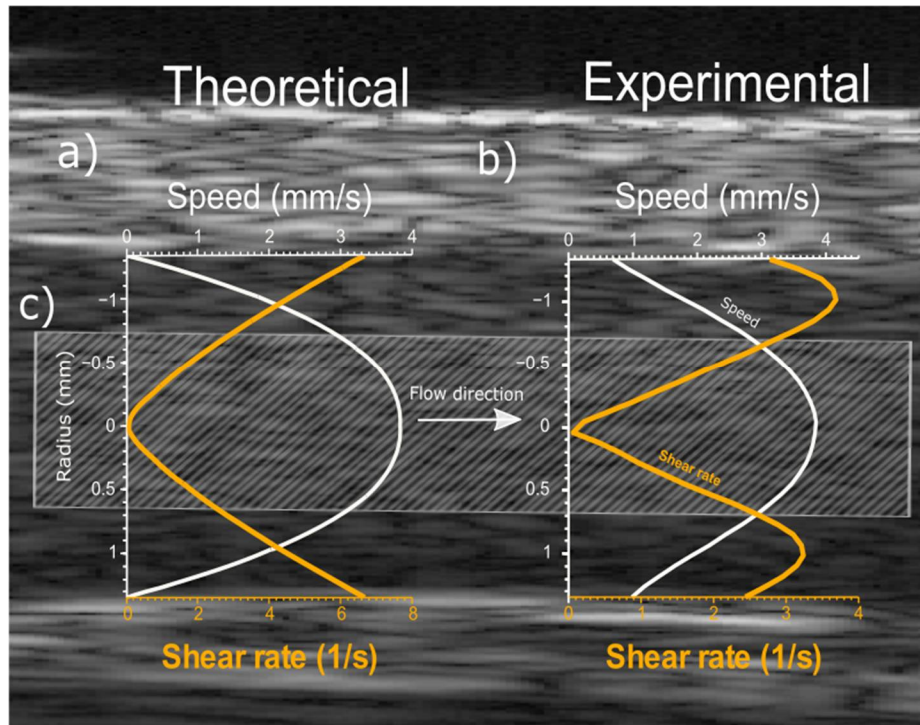


Figure 6.1 Examples of *in vivo* velocity and shear rate profiles in vein flow. (a) Theory predicts a blunted parabolic velocity profile created by the non-Newtonian behavior of blood. Shear rate is zero at the central axis of the vein and maximum at the wall. (b) Experimental flow profile calculated with the particle image velocimetry method (see details below). Artifacts close to the wall are caused by the lack of precision of the estimation under 1 mm/s because of the use of a spatial filter. (c) Region of interest for spectral analysis (see details below). This area contains a median shear rate of about 3 s^{-1} .

A minimum shear rate is necessary to promote aggregation as collision efficiency between RBCs is reduced under flow stagnation (Shehada et al. 1993). Flow pulsatility in arteries can also modulate the level of aggregation (Cloutier and Shung 1992; De Kroon et al. 1991). With *ex vivo* Couette systems made of concentric cylinders, as typically used in rheology studies, steady or pulsatile flow can be obtained and shearing forces can be precisely controlled. Couette devices allow following the time course of RBC aggregation from a disaggregated state at a high shear rate (*i.e.*, at a high relative rotation speed of concentric cylinders), or permit evaluating the impact of a specific shear rate on the aggregate size (Nguyen et al. 2008). Two approaches have been proposed for shear rate adjustment in *in vivo* RBC aggregation measures with ultrasound: either reducing the blood flow by clamping the vessel or no control

at all (*i.e.*, natural flow). In porcine experiments (Rouffiac et al. 2004; Tripette et al. 2013), an adjustable clamp was applied downstream of the ultrasound transducer to reduce the blood flow. Low velocity profiles could give a relatively narrow dispersion of shear rates. In those studies, ultrasound acquisitions were done during the first minute after stabilization of the flow. In human (Tripette et al. 2015) and rabbit (Yu et al. 2011) studies, the venous flow was not controlled but the maximum velocity was measured to estimate the mean shear rate assuming Poiseuille flow.

The objective of this study was to describe an ultrasound protocol to assess the erythrocyte aggregation level *in vivo* that can be used in a clinical context. This manuscript presents the impact of reduced flow and flow stoppage on ultrasound measurements of RBC aggregation based on the BSC, and describes its performance in detecting biological variability of the phenomenon. This study was divided into two stages: 1) evaluation and selection of shear-control methods *ex vivo* and 2) *in vivo* evaluation of the shear-control method retained from the first stage.

6.5. Materials and Methods

6.5.1. Blood preparation for *ex vivo* experiments

Five porcine and three equine blood samples of 500 mL were collected from local slaughterhouses, as these species present levels of RBC aggregation close to normal and elevated abnormal ones in humans, respectively (Weng et al. 1996b; Windberger et al. 2003). The samples were anticoagulated with 1.5 mg/mL of ethylene-diamine-tetra-acetic-acid (EDTA) (Baskurt et al. 2009), stored at room temperature, and used within 13 hours of collection. To better simulate clinical measurement conditions, white blood cells and platelets were conserved and the hematocrit was adjusted to 40% by adding/removing autologous plasma after 10 minutes of centrifugation at 1400 g (3200 rpm). With the aim of degassing the sample, blood preparations were gently stirred for at least 15 minutes before ultrasound and laser aggregometer measurements.

6.5.2. Apparatuses for *ex vivo* assessment of erythrocyte aggregation

Erythrocyte aggregation of all samples was assessed by laser aggregometry (Regulest, Florange, France). This method constitutes an accepted reference in hemorheological practice (Baskurt et al. 2009; Baskurt et al. 2011c). This apparatus employs a Couette system to shear blood samples of 1 mL to disaggregate erythrocytes, and then to monitor the intensity of scattered light as aggregates are formed during two minutes of monitoring. Aggregation indices at 10 s and 60 s were measured; they are labeled S_{10} and S_{60} , respectively. Higher values of these indices indicate a higher level of RBC aggregation. All measurements were performed in a thermostatic chamber with blood samples pre-incubated at 37°C.

All *ex vivo* ultrasound experiments were conducted at room temperature in a self-designed Couette system. This instrument was not conceptualized to be used with a thermostatic chamber. The apparatus consists of two concentric cylinders of 8 and 8.2 cm of radius, as detailed elsewhere (Nguyen et al. 2008). Approximately 100 mL of blood was put in the 2 mm gap and subjected to the desired shear rate. An acoustic window with a cylindrical geometry was moulded into the Couette system with agar gelatin at 2% in distilled water (w/w).

6.5.3. *Ex-vivo* ultrasound protocol

The shearing protocol using the Couette system consisted of three consecutive stages: disaggregation, stabilisation and ultrasound data acquisition (Figure 6.2). During the disaggregation stage, an initial shear rate of 300 s^{-1} was applied to the blood for 10 s to induce the complete disaggregation of the erythrocytes. This shear rate is lower than that used by laser aggregometry and does not cause hemolysis of the sample (Arwatz and Smits 2013). During the stabilisation stage, a predefined shear rate was applied for 30 s to simulate an *in vivo* premeasuring flowing condition. The stabilization shears repeated in all experiments were 75, 50, 25, 10, 5 and 1 s^{-1} (Figure 6.2 shows values of 75 and 25 s^{-1}). Then, during the acquisition stage, the two shear control methods were tested as follows. For stopped flow experiments, the rotating cylinder of the Couette system was abruptly stopped. For residual flow experiments, the shear rate was suddenly changed to 5 s^{-1} . In both cases, the ultrasound acquisition started for 120 s recording two frames per second.

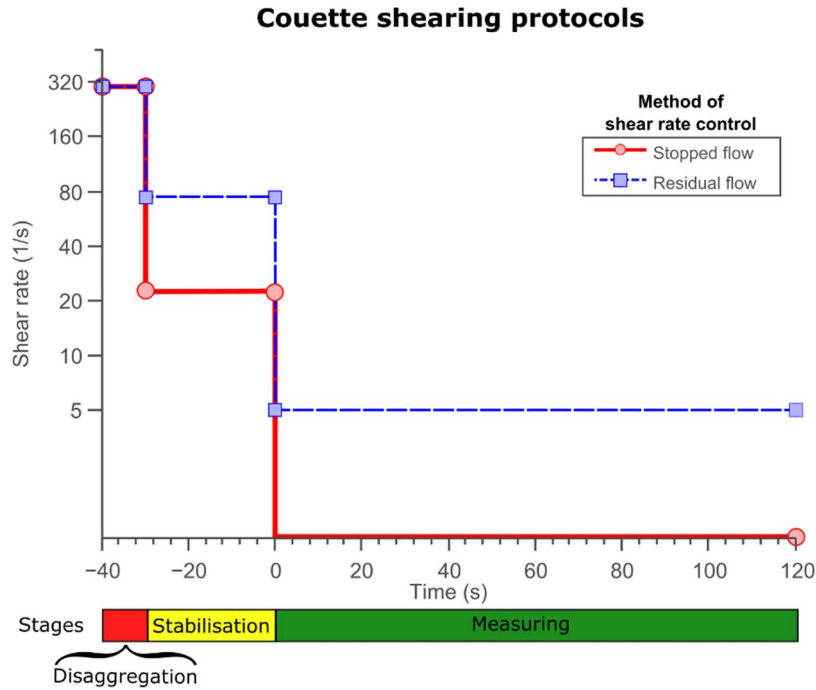


Figure 6.2 Couette shearing protocol. During the disaggregation stage, blood was sheared at 300 s^{-1} to dissociate any aggregate. During the stabilization stage, blood was sheared at several transitional levels (shear rates of 75, 50, 25, 10, 5 and 1 s^{-1} were employed). During the measuring stage, ultrasound images were acquired for spectral analysis in post-processing.

6.5.4. *In vivo* ultrasound protocol

To validate the feasibility of the retained protocol in a clinical context, eleven subjects between 22 and 52 years old participated in this study. The protocol was approved by the human ethic committee of the University of Montreal Hospital Research Center. All volunteers provided a written informed consent for blood sampling and ultrasound data recording. No particular exclusion criteria were applied, as no group differentiation was intended for this study. In particular, two subjects declared to have a pro-aggregating disease of cardiovascular or metabolic origin (*i.e.*, aortic aneurysm and diabetes mellitus, respectively). The hematocrit was measured by micro centrifugation on EDTA anticoagulated blood samples. The laser aggregometry method was used to measure parameters S_{10} and S_{60} .

Only the reduced flow protocol pre-tested *ex vivo* was retained as it turned out to be more repeatable. Ultrasound acquisitions were performed over the medial antebrachial vein of the left

arm with subjects in the supine position and the arm being in resting horizontal position. Venous recordings were preferred over arterial ones to reduce the confounding impact of pulsatile flow. The ultrasound transducer was fixed to the arm using a support to produce a longitudinal view of the vein. Then, a hydraulic tourniquet was placed downstream of the transducer to control the flow velocity, increasing gradually the pressure until the desired shear rate was attained.

A median shear rate of 5 s^{-1} was targeted. However, pre-testing on a few volunteers did not always allow obtaining high enough blood velocity to reach this value. A residual shear rate of 3 s^{-1} was then preferred. To estimate the median shear rate, it was necessary to obtain a velocity map. As Doppler ultrasound is not precise enough for the required speeds, we employed a particle image velocimetry (PIV) algorithm (Garcia 2011), as previously employed in the context of the present study (Garcia-Duitama et al. 2016). Briefly, the algorithm estimated a displacement map by phase correlation for each pair of radiofrequency (RF) images. Then, the displacements were divided by the frame rate to obtain an instantaneous velocity map. A spatial derivative of the radial velocity was used to obtain the instantaneous shear rate profile (see Figure 6.1). The steadiness of the blood velocity and shear rate was monitored during data acquisition using the same PIV algorithm. Ultrasound data for BSC estimation were taken after one minute of flow stabilization.

6.5.5. Evaluation of the variability and sensitivity of the *in vivo* technique

To evaluate the intra-assay variability of *in vivo* measurements, ten repeated ultrasound measures were done on a single volunteer. Afterwards, the coefficient of variation (CV) was computed for each ultrasound spectral parameter, as recommended in the guidelines of hemorheological techniques (Baskurt et al. 2009). Formally, $CV = \sigma/\mu$, where σ and μ represent the standard deviation and the mean value of repeated measures, respectively.

The sensitivity of the technique to detect biological inter-subject variations in RBC aggregation was evaluated by correlating BSC parameters with the laser aggregometer indices S_{10} and S_{60} . The coefficient of determination (R^2) was calculated between the *in vivo* and *ex vivo* indices.

6.5.6. Ultrasound acquisitions

Ultrasound data were acquired with a high-frequency scanner (model Vevo 770, Visualsonics, Toronto, ON, Canada) at an imaging rate of 26 frames per second. The scanner was equipped with an oscillatory single element transducer (model RMV-703), with a nominal central frequency of 35 MHz and a -15 dB bandwidth of 22.5-52.5 MHz. RF signals were amplified by a pulse receiver system (model 5900 PR, Panametrics, Waltham, MA, USA) and digitized at 250 MHz by a 12 bits acquisition card (model CS12501, GageScope, Montreal, QC, Canada). To follow the RBC aggregation kinetics, a waveform generator (model 33250A, Agilent, Santa Clara, CA, USA) triggered the recording of the first two frames at each second.

6.5.7. Regions of interest in ultrasound images

For *ex vivo* measurements in the Couette system, the region of interest (ROI) included the whole gap between the two cylinders. In this case, we assumed a homogeneous aggregation as the Couette system applies a constant shear rate in the entire sample. In contrast, for *in vivo* experiments, the ROI consisted in half of the lumen, going from $\frac{1}{4}$ to $\frac{3}{4}$ of the diameter in longitudinal view, thus avoiding the regions close to the walls at highest shear rates (Figure 6.1c). ROIs were manually segmented in both *ex vivo* and *in vivo* images.

6.5.8. BSC estimation

The blood BSC was estimated using the reference phantom technique, as detailed in (Garcia-Duitama et al. 2015). The reference medium consisted of a phosphate buffered saline (PBS) solution of porcine erythrocytes at a volume concentration (*i.e.*, the hematocrit) of 4%. This medium constitutes a reproducible reference that can be modeled analytically, as it inhibits erythrocyte aggregation and presents reduced scattering interference (Wang and Shung 1997). For *ex vivo* experiments, this solution was sheared in the same Couette apparatus at 5 s^{-1} to acquire ultrasound reference data. For reference *in vivo* measures, the solution was placed in a plastic beaker where the probe was immersed. To avoid sedimentation, it was gently agitated with a magnetic stirrer for 30 s and then stopped for 5 s before the acquisition.

The theoretical BSC of the reference medium, BSC_R , was analytically calculated using the adaptation of (Franceschini et al. 2011):

$$BSC_R(f) = m \cdot \theta(f, s, \gamma_z) \cdot S(h, f, s). \quad (6.1)$$

In equation 6.1, f is theinsonification frequency; m is the number density of erythrocytes in the medium, corresponding to the hematocrit divided by the volume of a single erythrocyte; θ is the backscatter cross section of a single erythrocyte, as defined in (Franceschini and Cloutier 2013); s is the radius of a erythrocyte, γ_z is the acoustic impedance contrast of an erythrocyte within the PBS solution; S is the structure function for rigid spheres (Wertheim 1963), which compensates in frequency the intercellular scattering interference, as applied in (Garcia-Duitama et al. 2015); and h is the hematocrit.

The BSC spectral analysis was based on the 1D power spectrum of the RF data in the ROI using the Welch method (Welch 1967). For this, the RF image was split up with windows of 0.37 by 0.07 mm in lateral and axial directions, respectively. Adjacent windows were overlapped by 50%. This technique allowed to average at least 220 windows per frame *in vivo* and more than a thousand ones *ex vivo*. For each segment, a Hann window was applied and its periodogram was computed. The average of the squared magnitude periodogram was considered as the power spectrum of the window. Then, the BSC of the sample, BSC_S , was estimated using

$$BSC_S(f) = \frac{1}{|I|} \sum_{i \in I} \frac{S_S(i, f) 10^{\frac{2 \cdot \alpha_S \cdot d_i \cdot f}{10}}}{S_R(i, f) 10^{\frac{2 \cdot \alpha_R \cdot d_i \cdot f}{10}}} BSC_R(f), \quad (6.2)$$

where I is the collection of windows dividing the ROI and $|\cdot|$ the cardinality function (*i.e.*, it returns the number of elements of the parameter); S_S and S_R are the power spectra of a window i taken within the sample and the reference medium, respectively; α_S and α_R are the total ultrasound attenuation coefficients of the latter media, respectively; and d_i is the average depth of a window.

The speed of sound and attenuation coefficient of whole blood and of the erythrocyte reference solution were assumed to be 1580 m/s for both media (Bushberg et al. 2002), and 0.23 dB/cm/MHz and 0.014 dB/cm/MHz, respectively (Wang and Shung 1997). The radius of a porcine erythrocyte was approximated to 2.34 μm as derived from the mean corpuscular volume of a spherical RBC of 54 fL (*i.e.*, 10^{-15} L) (Windberger et al. 2003). The acoustic impedance contrast of erythrocytes within PBS was estimated at 0.11 (Shung 1982). For *ex vivo* experiments, the attenuation of the agar gel coupling was estimated using a standard substitution

method (Shung 2005). Agar attenuation was evaluated at 0.08 dB/cm/MHz. For *in vivo* measurements, the total attenuation coefficient was estimated using the spectral fit algorithm (Bigelow and O'Brien 2005). Briefly, this algorithm estimates simultaneously the BSC and the attenuation, assuming a Gaussian form factor for the BSC (Insana and Brown 1993). Note that we only kept the total attenuation coefficient of the spectral fit algorithm. The reference phantom required for this algorithm was the solution of erythrocytes in PBS at 4% hematocrit, as also employed during the BSC_R estimation.

6.5.9. Parameterization of the BSC

The BSC spectrum was estimated and parameterized by its log-log slope (*i.e.*, spectral slope) and by its amplitude at 25 MHz (named mid-band amplitude). The spectral slope was estimated by fitting to a line the BSC vs frequency in the whole useable bandwidth (*i.e.*, between 15 and 39 MHz), and keeping the slope of the line. A slope of 4 is indicative of Rayleigh scattering and corresponds to disaggregated RBCs (Shung et al. 1976).

6.6. Results

6.6.1. *Ex vivo* assessment of erythrocyte aggregation using laser aggregometry

Equine blood presented the highest levels of RBC aggregation after 10 and 60 s of aggregation, when evaluated by laser aggregometry (Table 6.1). On average, porcine RBC aggregation was higher than that of human subjects. The S₁₀ index was in the same range as other studies in the literature (Weng et al. 1996a; Weng et al. 1996b). This suggests that porcine and equine bloods can be used as models of enhanced human RBC aggregation.

Table 6.1 Averaged erythrocyte aggregation in three species as assessed by laser aggregometry. Parameters S_{10} and S_{60} represent the aggregometer measurements after 10 s and 60 s after stoppage of shearing, respectively. Indices are expressed as mean \pm std.

	Human	Pig	Horse
S_{10} (no units)	21.8 \pm 4.3	27.9 \pm 3.9	32.3 \pm 2.1
S_{60} (no units)	32.2 \pm 3.0	34.2 \pm 5.1	36.9 \pm 2.4
Number of subjects	11	5	3

6.6.2. Considerations for evaluating the RBC aggregation with ultrasounds

Either when stopping the flow or applying a residual shear rate, the RBC aggregation generally stabilized at a characteristic steady state within the 120 s of monitoring (Figure 6.3 and Figure 6.4). A rapid aggregation, characterized by enhanced mid-band amplitude or lower spectral slope, was observed in the first 10 to 20 s. In the analysis of the following sections, we considered the ultrasound parameters at the steady state (*i.e.*, at 120 s) to characterize the erythrocyte aggregation of a given blood sample.

6.6.3. *Ex vivo* kinetics of RBC aggregation with stopped flow

The stopped flow technique lacked repeatability because the steady state of the BSC was dependent on the initial shear rate imposed by the Couette system (Figure 6.3). Although there are certain exceptions, the mid-band amplitude at the steady state was inversely proportional to the initial shear rate, especially in the porcine case. On the contrary, the slope at the steady state was proportional to the initial shear rate, although also with certain exceptions.

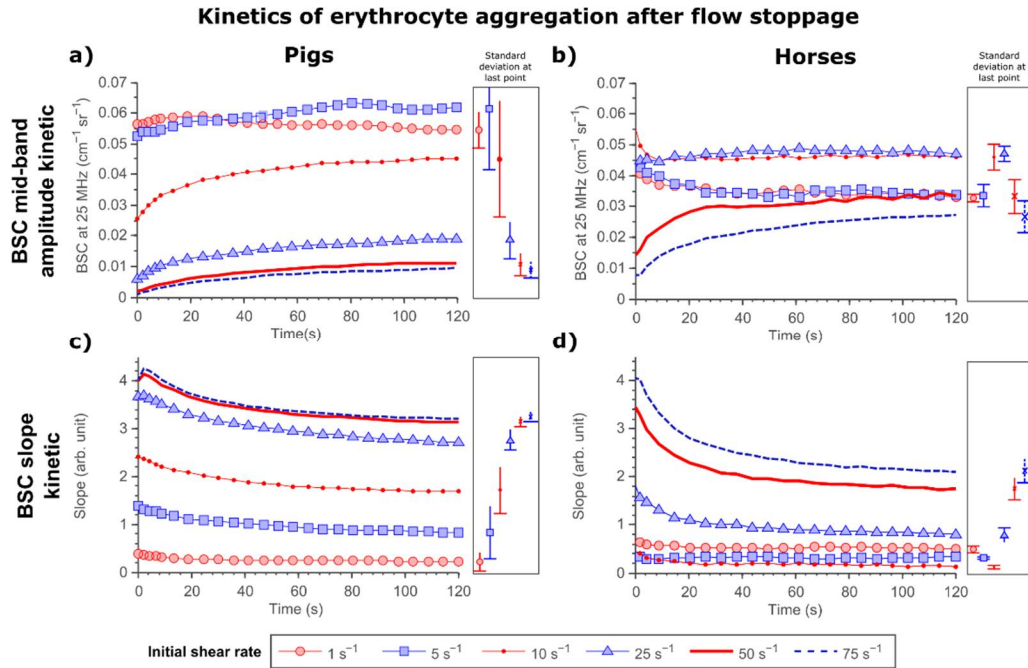


Figure 6.3 Average kinetics of erythrocyte aggregation after flow stoppage, monitored by the midband amplitude (a, b) and by the spectral slope (c, d). Comparison of porcine (a, c) and equine (b, d) blood samples. By application of different initial shear rates, amplitude and slope of the backscattering coefficient do not converge to the same values. This causes a lack of repeatability for the flow stoppage technique.

With porcine blood, highest shear rates (*i.e.*, 75 and 50 s^{-1}) induced complete disaggregation at $t = 0$ s, as exemplified by the slope close to 4 and the mid-band amplitude close to zero (Figure 6.3a,c). Conversely, with equine blood, a shear rate of 50 s^{-1} was insufficient to obtain the same level of disaggregation as at 75 s^{-1} , as showed by the slope lower than 4 (Figure 6.3b,d).

6.6.4. *Ex vivo* kinetics of RBC aggregation with low flow

When a residual shear rate of 5 s^{-1} was applied, the BSC of blood reached a reproducible steady state with a single mid-band amplitude and slope, independently of the initial state of aggregation (Figure 6.4). However, RBC aggregation kinetics were different depending on the starting level of aggregation: high shear rates induced starting points at $t = 0$ s with low mid-band amplitudes and high slopes (Figure 6.4).

Kinetics of erythrocyte aggregation with a residual shear (5 s^{-1})

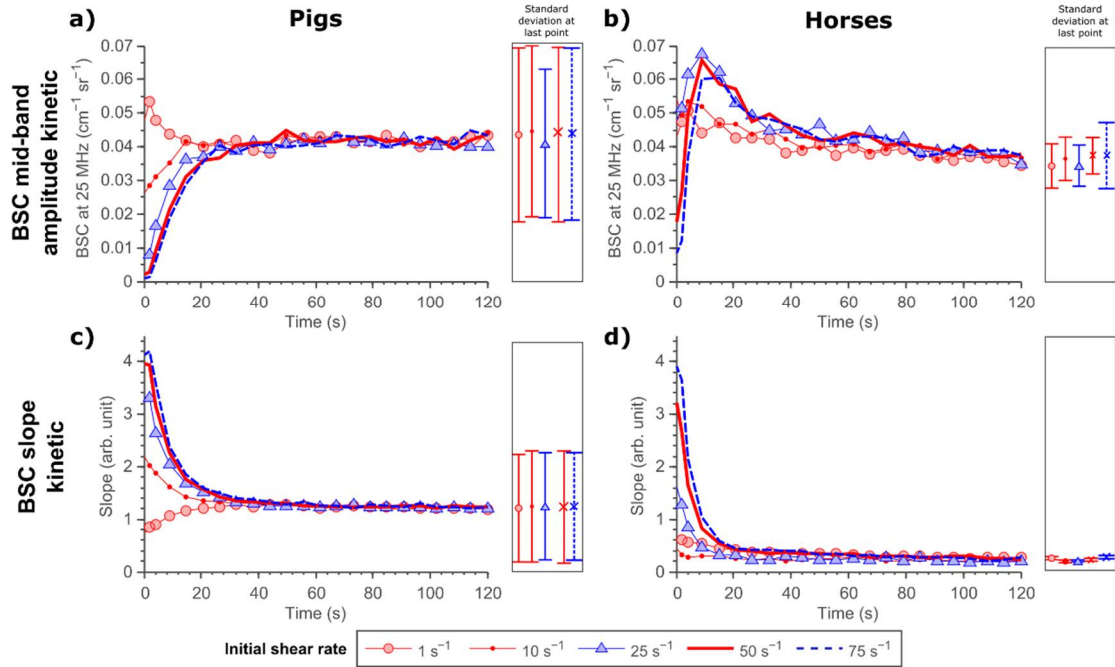


Figure 6.4 Average kinetics of erythrocyte aggregation with a residual shear at 5 s^{-1} , monitored by the midband amplitude (a, b) and the spectral slope (c, d). Comparison of porcine (a, c) and equine (b, d) blood samples. The amplitude and slope of the backscattering coefficient converge to the same mean value whatever the initial shear rate applied. This suggests a better repeatability for this technique of shear rate control.

The mid-band amplitude converged to the same mean value in porcine and equine samples (around $0.04 \text{ cm}^{-1}\text{sr}^{-1}$ in Figure 6.4a,b), though the BSC evolution was completely different in both cases. Conversely, the spectral slope allowed differentiation of the two species, showing the different nature of RBC aggregation of each one.

A different kinetic behavior of the mid-band amplitude occurred in equine blood when using stabilisation shears of 75, 50 and 25 s^{-1} (Figure 6.4b). Contrary to the smooth increase observed in pig experiments, peaks of the mid-band amplitude appeared during the first 18 s of aggregation, then it decreased to the same steady state as other shears. Spectral slope kinetics did not follow the same behavior.

6.6.5. Intra-assay variability of *in vivo* measurements

During the ten repeated acquisitions on a volunteer, the median shear rate in the vein was stable with an average of $2.2 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$ (Figure 6.5a). Note that only the low flow technique was evaluated *in vivo*, as the stopped flow approach lacked reproducibility *ex vivo*.

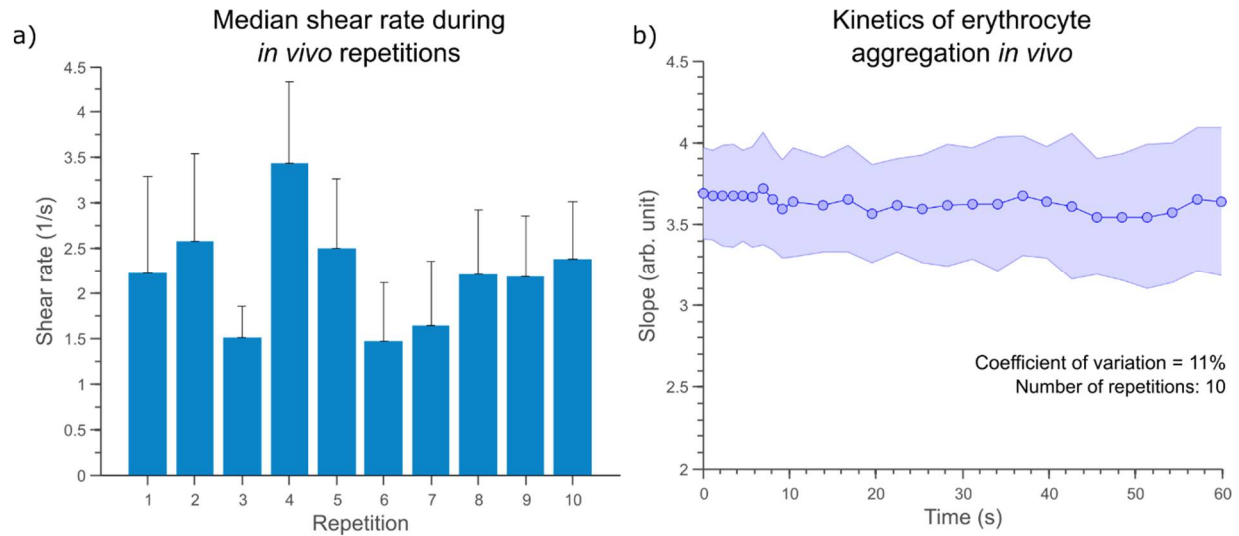


Figure 6.5 (a) Evaluation of the control flow method during the ultrasound acquisitions *in vivo*. Each bar represents the average median shear rate during the 60 s of acquisitions for a single repetition. Measured median shear rate was close to the targeted value of 3 s^{-1} . (b) Aggregation kinetics monitored *in vivo* for 1 min using the spectral slope. The slope is quite stable during the whole ultrasound acquisition period.

The spectral slope was repeatable with a coefficient of variation of 11% for the measures performed over 60 s (Figure 6.5b). The mid-band amplitude showed the same stable kinetic but presented more variability (coefficient of variation of 33%). Contrary to the *ex vivo* acquisitions, the erythrocyte aggregation did not show an ascending kinetic during the first 60 s (exemplified by an increase in mid-band amplitude and a decrease in spectral slope).

6.6.6. Sensitivity of the ultrasound technique to biological inter-subject variations

A strong linear correlation ($R^2 = 82.7\%$, $p\text{-value} < 0.0001$) was found between the *ex vivo* index S_{10} and the spectral slope from *in vivo* acquisitions after 60 s of controlled flow (Figure 6.6). It is to notice that the native hematocrit of participants was $46.6 \pm 3.5\%$ (range of

42 to 52%). As mentioned earlier, it was adjusted to 40% for laser aggregometry measurements. The difference in hematocrit between *ex vivo* and *in vivo* results had little impact, as noticed by the good correlation nevertheless obtained. Also note that the two patients who disclosed pro-aggregating diseases (*i.e.*, diabetes mellitus and aortic aneurysm) scored the highest indexes with both techniques (Figure 6.6).

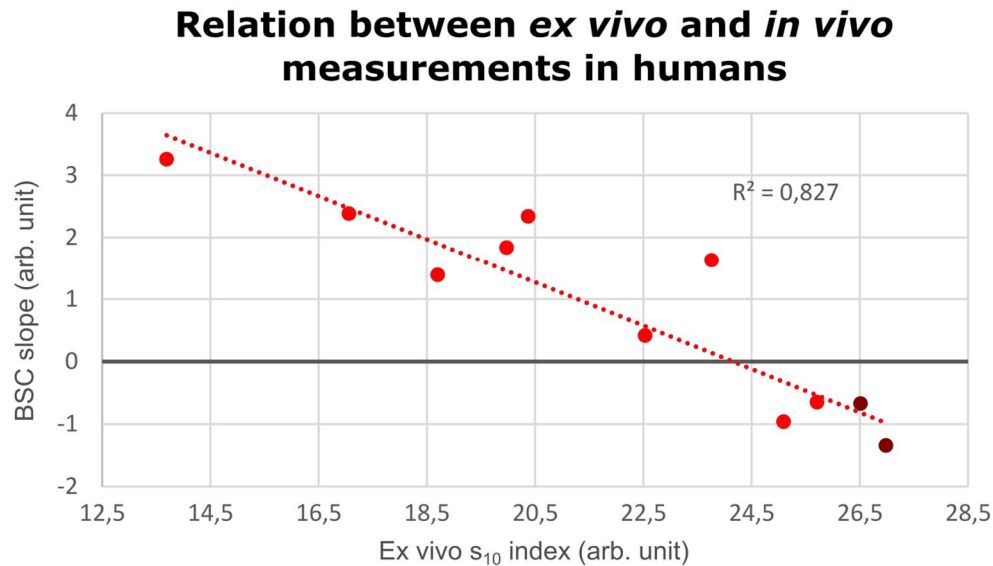


Figure 6.6 Correlation between ex vivo index S_{10} and the backscatter coefficient spectral slope after 60 s of reduced flow in vivo. The dark red points represent two participants with chronic inflammatory conditions. They scored the highest values with both acoustic and laboratory techniques.

The correlation between the index S_{10} and the mid-band amplitude was not significant ($R^2 = 17.8\%$, p-value = 0.21). The other laser aggregometry index S_{60} also showed a significant correlation with the spectral slope, although R^2 was lower than that with the index S_{10} ($R^2 = 64.7\%$, p-value = 0.001). The correlation between S_{60} and the mid-band amplitude was not significant ($R^2 = 24.3\%$, p-value = 0.103).

6.7. Discussion

6.7.1. Techniques for controlling the flow shear rate

The low flow technique for shear rate control permitted the distinction between different levels of RBC aggregation, both *in vivo* and *ex vivo*. This study is the first to show a correlation between *ex vivo* and *in vivo* measurements of erythrocyte aggregation in humans using ultrasound, which encourages future studies in patients with acute inflammatory conditions. The spectral slope parameter was more discriminating than the simple BSC amplitude at 25 MHz: in *ex vivo* experiments, porcine and equine samples shared the same mid-band amplitude and in *in vivo* experiments, this last parameter did not correlate well with laser aggregometry. However, overall results suggest that the raw BSC present distinguishable characteristics to allow differentiation of RBC aggregation levels.

Yet, the low flow technique for *in vivo* measurements uses a different paradigm in two senses when compared to *ex vivo* assessments. First, the *in vivo* technique employs a residual low shear rate which promotes a steady state of RBC aggregation after one minute. The native shear rate before flow reduction and ultrasound acquisition is not easily controllable physiologically. On the contrary, the *ex vivo* technique uses completely disaggregated state as starting point, followed by aggregate build-up after stopping the Couette rotation. Second, the proposed *in vivo* method employs a single measuring time point after the stabilisation of the aggregation, instead of using the weighted sum of multiple points acquired during the aggregation kinetic, as done *ex vivo* by the laser aggregometer.

The method of simply stopping the flow with a tourniquet for *in vivo* applications is not optimum due to the lack of repeatability when the initial shear rate within the vein cannot be enhanced to disrupt RBC aggregates. The observed repeatability deficiency could be the result of the reduction of interaction between erythrocytes when the flow is abruptly stopped. Erythrocytes elongate while sheared and when shearing stops, RBCs return to their normal shape creating a cell-free layer around them (Dobbe et al. 2003). As the attraction force depends on inter-erythrocyte distances, some of the red cells would not have close neighbours to associate with (Shehada et al. 1993). Conversely, the application of a low shear rate, as 3 or 5 s

¹, brings closer the erythrocytes and promotes their association, while not being high enough to completely dissociate already formed aggregates (Qin et al. 1998).

The similarity in the aggregation kinetics of porcine blood at 50 and 75 s⁻¹ (Figure 6.3a,c) suggests that the stopped flow could be repeatable if a complete disaggregation would be induced at the beginning of the acquisition. As introduced earlier, most commercial erythro-aggregometers use the complete disaggregation approach, driven by Couette or by plate-to-plate rheometry systems, to assure repeatability (Baskurt et al. 2011c). Some authors suggested the application of shakers over the vein to dissociate RBCs (Yu et al. 2005). However, there is no evidence that the disaggregation was complete in control subjects and that it could be effective in patients with enhanced RBC aggregation (*i.e.*, RBCs with stronger binding energy).

6.7.2. Clinical relevance of results

An intended aim of the ultrasound protocol is to propose an inflammatory marker for monitoring postoperative complications. Knowing the existence of a strong inflammatory reaction can help the clinician to guide its treatment. An appealing characteristic of the ultrasound method is that it can be implemented for continuous monitoring, in real-time and at the bedside. On the contrary, laboratory tests of inflammation or of erythrocyte aggregation require blood sampling and at least one hour for processing. Considering that a strong inflammatory reaction may occur during the first two hours after a cardio-pulmonary bypass surgery (Tripette et al. 2013), laboratory tests are thus not optimum in this context.

Besides, the proposed ultrasound technique can be used in other contexts requiring immediate assessment of the inflammatory condition. Examples of this include assessment of sepsis in emergency units (Reggiori et al. 2009), hyper-viscosity syndrome (Lacerda et al. 2017), and selection of graft donors (Avlonitis et al. 2005). Beyond inflammation detection, erythrocyte aggregation is also a prognostic determinant of thrombus formation (Yu et al. 2011). In this context, the ultrasound protocol may allow the assessment of blood hyper-viscosity caused by high RBC aggregation, one of the factors of Virchow's triad of thromboembolism.

[Although it is possible to include in clinical echographs the signal processing required for the assessment of erythrocyte aggregation (Garcia-Duitama et al. 2015), other alternatives to facilitate transition to medical practice is to employ dedicated hardware. In this context, our

laboratory has started the validation of ultrasound catheters in a non-invasive fashion for BSC estimation of blood, with promising results. This and other alternatives are discussed in the section 8.3.1 of this thesis manuscript.]

6.7.3. Behavior of the backscattering coefficient during the kinetic of RBC aggregation

A drawback of summarizing the backscattering coefficient with parameters is that this method hides some important characteristics of the frequency behavior of the BSC during RBC aggregation. Figure 6.7 shows *ex vivo* BSCs measured in Couette flow over a period of 120 s for the initial shear rate of 75 s^{-1} . In close to disaggregated states ($t = 0 \text{ s}$), lower frequencies were less scattered than the higher ones, giving rise to a spectral slope close to 4, which is characteristic of Rayleigh scattering (see also Figure 6.3c,d and Figure 6.4c,d). This result has been observed several times in previous studies (Shung et al. 1976; Yu and Cloutier 2007). However, when some RBC aggregates were present, differences in scattering amplitude between low and high frequency ranges diminished, as evidenced by lower spectral slopes (Figure 6.7b,d). Notably, in the highest aggregating conditions with horse blood, the slopes were close to zero (see the stabilization at 40 s in Figure 6.4d), indicating a quasi-specular backscattering. Other researchers have observed the same behaviour with whole blood (Foster et al. 1994; van der Heiden et al. 1995). However, parameterizing the BSC with single mid-band amplitude or spectral slope may be inappropriate under strong aggregation. Indeed, such conditions promote changes in the spectral slope over the measured bandwidth (e.g., in Figure 6.7b,d toward the end of the aggregation kinetics). Rupture points between the low and high frequency regimes are typified in Figure 6.7b. Higher RBC aggregation promotes a shift of the rupture point towards lower frequencies. Thus, a better BSC parametrization would be necessary under these conditions.

Time evolution of BSC of blood after flow control

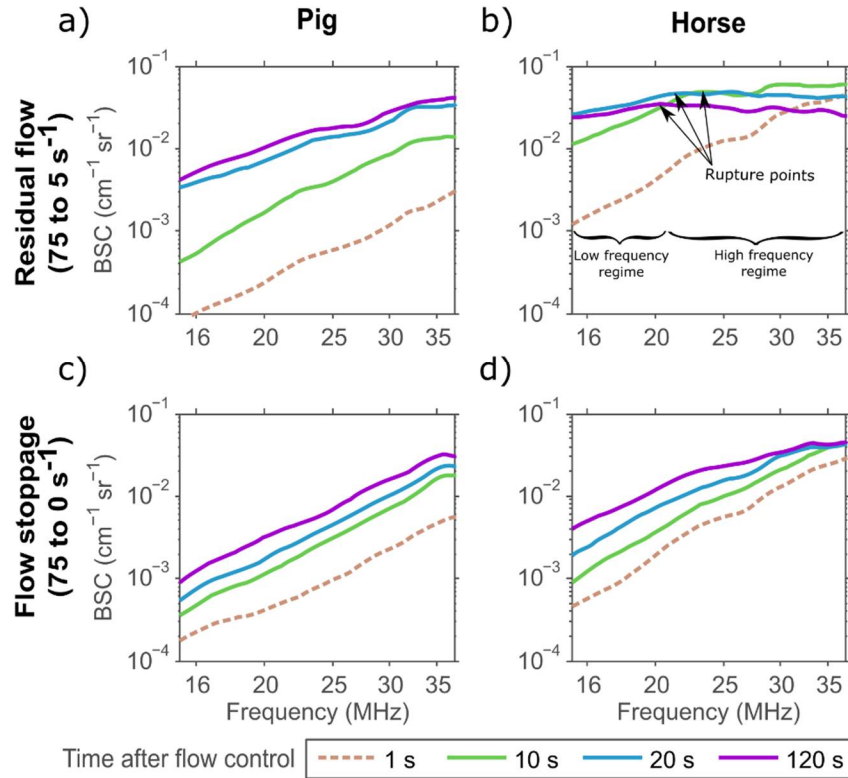


Figure 6.7 Examples of erythrocyte aggregation kinetics *ex vivo* after flow control monitored by the frequency-dependent backscatter coefficient (BSC). Under disaggregated states (dotted lines), the spectral slope on a log-log scale is close to 4, indicating Rayleigh scattering. In the presence of erythrocyte aggregation, the spectral slope is reduced. With the biggest aggregates (panel b, horse blood at a low residual shear rate), the BSC presents two regions with characteristic slopes, named here the low- and high-frequency regimes; these regimes are separated by a characteristic rupture point, which is downshifted in frequency by stronger aggregation.

In our study, the frequency behavior of the BSC was different of that predicted by recent blood scattering theories (de Monchy et al. 2016b; Franceschini et al. 2011). These theories predict that a collection of mono disperse scatterers produces constructive and destructive interferences causing peaks and valleys in the BSC at characteristic frequencies. Non-aggregating RBCs theoretically produce frequency oscillations at frequencies above 100 MHz (Fontaine et al. 1999), whereas mono disperse aggregates downshift these oscillations towards lower frequencies (Franceschini et al. 2011). Earlier modeling also assuming mono disperse

aggregates did not predict peak and valley frequency oscillations simply because the BSC was approximated by a second-order frequency-dependent Taylor expansion (Franceschini et al. 2008; Franceschini et al. 2010; Yu and Cloutier 2007). By considering polydispersity in RBC aggregate sizes (Fontaine and Cloutier 2003), simulations allowed observing frequency-dependent backscatter with a single rupture point as in our results.

Based on this discussion, it is clear that proper BSC modeling should consider the variability in RBC aggregate sizes (*i.e.*, their polydispersity). Instead of parametrizing the BSC with simple parameters as the mid-band amplitude and spectral slope, an alternative that would allow describing absence, normal and hyper-aggregating RBC conditions is to fit the BSC frequency response with a polydisperse effective medium theory considering the structure factor model, as recently proposed (de Monchy et al. 2016a). In this framework, the inverse problem allows assessment of the mean RBC aggregate size, their compactness and size distribution (*i.e.*, polydispersity). Future works should focus on assessing the robustness of this BSC parametrization for *in vivo* measurements of RBC aggregation.

6.8. Conclusion

The flow shear rate is the main confounding factor for *in vivo* measuring of erythrocyte aggregation. Stopping the flow to nullify shearing forces is not an appropriate technique as the RBC aggregation level depends on the initial flow velocity within the vessel of interest. In contrast, the technique of acquiring the data with a low residual flow is both repeatable and allows both *ex vivo* and *in vivo* detection of different levels of RBC aggregation. These results add more evidence supporting the feasibility and robustness of *in vivo* quantitative measurements of RBC aggregation with ultrasound. Because ultrasound is widely used, is low-cost and is a point-of-care imaging method, the proposed technology could become an important tool in critical care medicine for monitoring the acute phase inflammatory response (Tripette et al. 2013), and could also be of interest for predicting venous thrombotic events (Yu et al. 2011).

Chapitre 7 Experimental application of ultrafast imaging to spectral tissue characterization

7.1. Avant-propos

Ce chapitre reproduit le contenu de l'article « *Experimental application of ultrafast imaging to spectral tissue characterization* » publié en 2014 dans le journal « *Ultrasound in medicine & biology* » par Julian Garcia-Duitama, Boris Chayer, Aiguo Han, Damien Garcia, Michael Oelze et Guy Cloutier après évaluation par comité de pairs (Vol 41, PP 2506-2519 2014).

Contributions :

En tant qu'auteur principal de cet article, Julian Garcia-Duitama a conçu et réalisé les expérimentations, mis au point et implémenté les programmes informatiques correspondants, a effectué le post-traitement des données, a rédigé l'article et l'a défendu auprès des réviseurs du journal. Dr Aiguo Han et Boris Chayer ont participé à l'élaboration et réalisation du protocole expérimental *in vitro* et *in vivo*, respectivement. En plus, Dr Han a effectué de mesures expérimentales qui ont servi de référence pour la comparaison de la technique ultra-rapide. Le Dr Damien Garcia a contribué avec le code de base pour l'imagerie ultra-rapide et la formation d'image. Les Dr Michael Oelze et Guy Cloutier ont contribué au développement du protocole expérimental, à l'interprétation des résultats et à la révision et la correction du manuscrit. Ce travail a été effectué sous la supervision du Dr Guy Cloutier, directeur du projet de recherche.

7.2. Résumé

L'imagerie ultra-rapide par ultrasons (UI) permet l'acquisition de milliers d'images par seconde avec la même qualité d'image à toutes les profondeurs dans le champ de vision. Par conséquent, il serait idéalement adapté pour obtenir un bon échantillonnage des tissus à déplacement rapide en utilisant des techniques spectrales pour dériver le coefficient de

rétrodiffusion (BSC) et les paramètres quantitatifs associés. En UI, une image est construite en insonifiant le milieu avec des ondes planes orientées à angles différents, ensuite en formant l'image (*beamforming*) et en combinant les images résultantes. On s'est proposé de valider expérimentalement l'effet sur le BSC de ces techniques de formation d'image, en conditions isotropes et anisotropes. En utilisant ces techniques d'UI avec une barrette linéaire (5-14 MHz), nous avons estimé le BSC des fantômes et du sang de porc en écoulement à une profondeur de 35 mm avec une cadence d'images allant jusqu'à 514 Hz. Les données obtenues avec UI ont été comparées à celles de transducteurs monoéléments et produits par imagerie focalisée conventionnelle. Les résultats ont révélé que les images composées issus d'UI peuvent produire des estimations valides du BSC et de la taille effective des diffuseurs (erreurs inférieures à $2,2 \pm 0,8$ dB et $0,26 \pm 0,2$ dB pour le sang et les fantômes, respectivement). Ce travail présente également l'utilisation d'images UI avant de la composition (c.-à-d. des images orientées) afin d'évaluer la dépendance angulaire des globules rouges circulants. Il est conclu que les données obtenues avec UI peuvent être utilisées pour l'analyse spectrale des tissus par BSC et pour décrire l'anisotropie du tissu.

7.3. Abstract

Ultrasound ultrafast imaging (UI) allows acquisition of thousands of frames per second with a sustained image quality at any depth in the field of view. Therefore, it would be ideally suited to obtain good statistical sampling of fast moving tissues using spectral-based techniques to derive the backscatter coefficient (BSC) and associated quantitative parameters. In UI, an image is formed by insonifying the medium with plane waves steered at different angles, beamforming them and compounding resulting RF images. We aimed at validating, experimentally, the effect of these beamforming protocols on the BSC, in both isotropic and anisotropic conditions. Using UI techniques with a linear array transducer (5-14 MHz), we estimated the BSC of tissue mimicking phantoms and flowing porcine blood at a depth of up to 35 mm and with a frame rate going up to 514 Hz. UI-based data were compared to those obtained using single element transducers and conventional focusing imaging. Results revealed that UI compounded images can produce valid estimates of BSC and effective scatterer size (errors less than 2.2 ± 0.8 dB and 0.26 ± 0.2 dB for blood and phantoms, respectively). This work also

presents the use of pre-compounded UI images (*i.e.*, steered images) to assess the angular dependency of circulating red blood cells. It is concluded that UI dataset can be used for BSC spectral tissue analysis and anisotropy characterization.

Keywords: Quantitative ultrasound, backscatter coefficient, spectral analysis, plane wave imaging, reference phantom technique, planar reflector technique, erythrocyte aggregation.

7.4. Introduction

Ultrasound tissue characterization using spectral methods has been extensively studied and validated, both theoretically and experimentally, over the last 30 years (Faran Jr 1951; Insana and Brown 1993; Lizzi et al. 1983; 1988; Wagg et al. 1983). Its clinical relevance was demonstrated in studies treating the inflammatory response detection (Tripette et al. 2013), breast cancer treatment monitoring (Sadeghi-Naini et al. 2013), detection of prothrombotic factors (Yu et al. 2011) and prediction of coronary plaque composition (Nair et al. 2002).

The central quantitative parameter used for spectral tissue characterization is the backscatter coefficient (BSC). The BSC is a fundamental property of a tissue that describes how effectively it is able to return acoustic energy back to the transducer, independent of the investigated depth and of the instrumentation (Ghoshal et al. 2013; Wear et al. 2005). Formally, it is defined as the scattered intensity in the backward direction per unit solid angle per unit volume normalized by the incident wave intensity (Ghoshal et al. 2013). In practice, the BSC is related to the power spectral density (PSD) of the radio-frequency (RF) signal echo (Oelze 2013; Szabo 2004), as described by:

$$PSD(f) = A(f, d)I(f, d)BSC(f), \quad (7.1)$$

where f is the insonifying frequency; A is the signal attenuation at depth d due to absorption, scattering and transmission of ultrasound in the acoustic path; and I is the instrumentation effect that accounts for the transmitted pulse, transducer filtering and beam diffraction. With this simplified definition, the estimation of the BSC is reduced to the compensation of two main confounding factors: instrumentation properties and tissue attenuation.

Among different strategies to compensate for the instrumentation, two techniques are of interest: the planar reflector (Chen et al. 1997; Ueda and Ozawa 1985) and the reference phantom (Wang and Shung 1997; Yao et al. 1990) methods. With both approaches, instrumentation effects are cancelled out by dividing the PSD of the interrogated tissue by that of the reflector/phantom (see later Figure 7.2). In the planar reflector technique, mainly used in fundamental research using single-element transducers, the frequency response of the instrumentation is characterized by means of a smooth plate of known reflectivity (typically stainless steel, Plexiglas or quartz). The reflector surface creates a high amplitude RF echo of short duration (*i.e.*, an impulse), which is gated out and used to estimate the spectral response of the instrumentation. The main advantage of this method is that it needs no prior information other than the geometry of the transducer and the reflectivity of the planar surface. In the reference phantom technique, commonly used with clinical array transducers, a well-characterized physical medium (*i.e.*, with known attenuation, speed of sound and BSC) is insonified with the same instrumentation parameters as those used to query the tissue. This method has special requirements on acoustic properties of the reference medium. In particular, its speed of sound and attenuation have to be close to those of the interrogated tissue (Ghoshal et al. 2013).

For most scattering tissues, the BSC presents an intrinsic stochastic behavior as it depends on the random position of scatterers (Insana and Brown 1993; Insana et al. 1990; Teisseire et al. 2010) or, for spatially correlated scatterers, on the pair-correlation function describing the relative position of their structures, which is also a random process (Fontaine et al. 1999; Franceschini and Cloutier 2013; Saha and Kolios 2011; Savéry and Cloutier 2001). Likewise, the measurement of BSC is affected by electronic noise, which is also stochastic by nature. Thus, to obtain a robust estimate of the BSC, coherent image compounding was implemented by averaging decorrelated spectra from multiple locations of the investigated tissue (Chen et al. 2005), or from the same location in multiple frames with different angles of observation (Gerig et al. 2004). Another approach consisted in deforming the tissue by applying an external pressure to obtain different signatures (Herd et al. 2011). Alternatively, several decorrelated temporal frames taken over the same region of interest can be averaged to obtain a good BSC estimate in the case of fast moving tissues (*e.g.*, heart, vessel walls and flowing

blood). However, with conventional focusing imaging, this usually requires gating and averaging over several cardiac cycles because of the limited frame rate.

The reduction of the stochastic nature of the BSC and the availability of a high frame rate to improve spectral tissue characterization can be addressed using ultrafast imaging techniques. Recent hardware improvements, as graphic processing units (GPU), have enabled its use for real time applications (Tanter and Fink 2014). Theoretically, ultrafast imaging techniques can offer thousands of frames per second (Montaldo et al. 2009). Moreover, these techniques can improve the image quality in terms of lateral resolution and contrast-to-noise ratio in the full field of view (Garcia et al. 2013). These latter studies demonstrated that the image quality is comparable to that of multi-focus techniques but with an increase in effective frame rate.

One of the most common techniques for ultrafast imaging is plane wave imaging (PWI). In contrast to the traditional line-by-line formation of B-mode images using conventional focused beams, PWI uses all elements of an array transducer to emit a series of plane waves (Figure 7.1a, b) and receive resulting echoes. Plane wave imaging results in diffraction hyperbolas (Figure 7.1a), which must be collapsed in a process called migration, or beamforming (Figure 7.1b), to generate an image. Several migration techniques have been proposed, including delay-and-sum reconstruction (Montaldo et al. 2009) and spectral domain signal interpolations (Garcia et al. 2013; Lu 1997). To produce a B-mode image, migrated frames steered at different angles are averaged to improve the lateral resolution with compounding (Figure 7.1c).

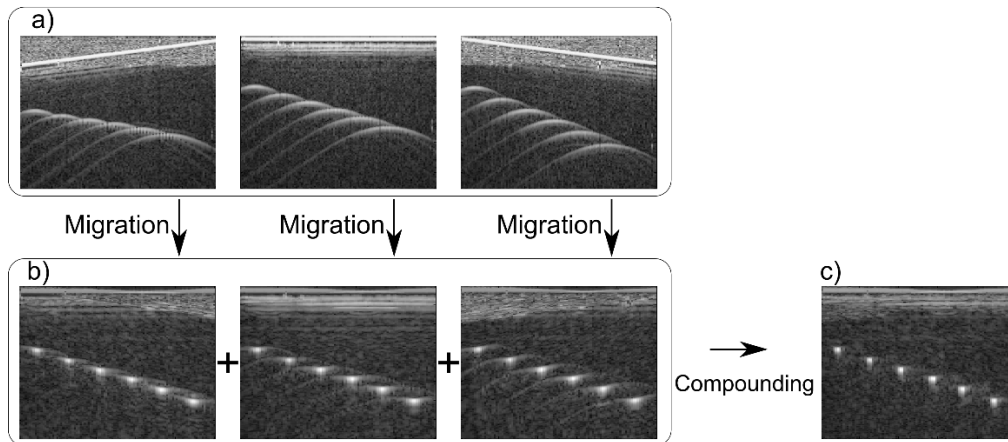


Figure 7.1 Process for formation of plane wave images. (a) Envelope-detected radiofrequency images insonified at -10° , 0° and 10° . (b) Migrated images showing a lack of lateral resolution. Note that beamforming artifacts depend on the angle of insonification after migration. (c) Compounded image with restored lateral resolution.

BSC estimation using PWI has recently been validated *in vitro* for isotropic media (*i.e.*, a tissue producing similar echoes independent of the angle of insonification) (Garcia-Duitama et al. 2014; Salles et al. 2014). However, several biological tissues present anisotropic characteristics. In such a case, compounding of images from different angles could induce a biased BSC estimation as different information is averaged. We therefore expected, in this study, to evidence a bias in the characterization of anisotropic media, caused by the directivity of scatterers.

This study thus aimed at validating experimentally the possibility of using PWI to estimate BSC in isotropic and anisotropic media. We specifically intended verifying the effect on BSC of single angle insonifications (Figure 7.1b) and of compounded images (Figure 7.1c). The validity of results was confirmed by comparing BSCs to those obtained with single-element transducers and conventional focusing imaging (FI).

7.5. Materials and Methods

7.5.1. Overview

To assess the accuracy of BSC estimated with PWI data, two sets of experiments were conducted on both isotropic and anisotropic conditions. For the isotropic case, two tissue mimicking phantoms with spherical scatterers were employed. For the anisotropic condition, porcine flowing blood in a tube circuit was used, as it can depict backscatter angular dependencies (Allard et al. 1996).

Experiments are portrayed in four sections. First, BSC estimates of both media were obtained from PWI compounded images (Figure 7.1c) and PWI single angle images (Figure 7.1b). Second, BSC estimates of both media were compared to two benchmark BSCs obtained with single element transducers and with conventional FI. Third, BSC estimates were fitted to appropriate scattering models to assess the effect of the beamforming technique on derived effective scatterer sizes. Finally, scatterer sizes from PWI single angle acquisitions were used to assess the angular independency or dependency (*i.e.*, isotropy or anisotropy) of the scanned medium. Figure 7.2 summarizes the acquired datasets and their purpose for the estimation of the BSC. Signal processing was performed using Matlab (version 2010a, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).



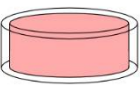
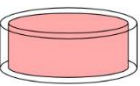
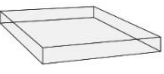

		Transducer type	
		Single element 	Linear array 
Required RF spectra	Sample (phantom/tissue)		
		S_{SS}	S_{SA}
Required RF spectra	Reference for instrumentation compensation	 Planar reflector	 Reference phantom
		S_{PS}	S_{RA}
BSC estimation		$BSC_{SS} \sim S_{SS}/S_{PS}$	$BSC_{SA} \sim S_{SA}/S_{RA} * BSC_{RS}$

Figure 7.2 Spectra required for instrumentation compensation during backscatter coefficient (BSC) estimation using different setups. The first letter of the spectrum subscripts indicates the interrogated medium (S = tested sample, P = planar reflector, R = reference medium); the second letter denotes the instrument used (S = single-element transducer, A = array transducer). Complete expressions for BSC estimation are given in eqns (7.2) and (7.4) for the reference medium and planar reflector techniques, respectively. For phantoms, BSC_{RS} was experimentally estimated using the planar reflector technique. For the erythrocyte suspension, BSC_{RS} was analytically calculated from a blood scattering model.

7.5.2. Description of phantoms

Two tissue mimicking phantoms were bought from the University of Wisconsin at Madison. They were molded using an acrylic cylindrical ring of 15 cm in diameter and 4 cm in height (Figure 7.2). A 25 μm thick Saran wrap layer acted as an acoustic window on top and bottom planar surfaces. The tissue mimicking material of both phantoms was made of agar at a mass fraction of 2%. Each phantom contained 4.5 g/L of soda lime glass spherical scatterers with a diameter of $42.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$ (Duke Fisher Catalog No. 09-980-090, Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA) or $49.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$ (Duke Fisher Catalog No. 09-980-091). In the following, these phantoms are labeled as Duke40 and Duke50, respectively.

7.5.3. Porcine blood experimental setup

Experimental conditions described by (Yuan and Shung 1988a; 1988b) were replicated in this section. Briefly, three porcine blood samples of 2.5 L each were collected from a local slaughterhouse. After centrifugation, the buffy coat was removed and the hematocrit was adjusted to 3% or 45% in autologous plasma. The blood was circulated in a steady flow system (Figure 7.3). The circuit included a nearly horizontal (inclined by 3°) polyvinyl chloride (PVC) tube (length = 130 cm; inner diameter = 2.5 cm) that ensured a fully developed laminar flow at measured speeds. An acoustic window made of agar at a mass fraction of 3% was placed 115 cm downstream from the tube entrance. The flow was controlled with a relief valve and measured with an electromagnetic flowmeter (model FM-701D, Carolina Medical Electronics, East Bend, NC, USA). Flow was adjusted to create a mean shear rate of 2 s^{-1} and 10 s^{-1} , using the definition of Yuan and Shung (1988a). Blood was pumped from the lower to the upper reservoir using a peristaltic pump (model 5000, Sarns Inc, Ann Arbor, MI, USA), to avoid erythrocyte hemolysis.

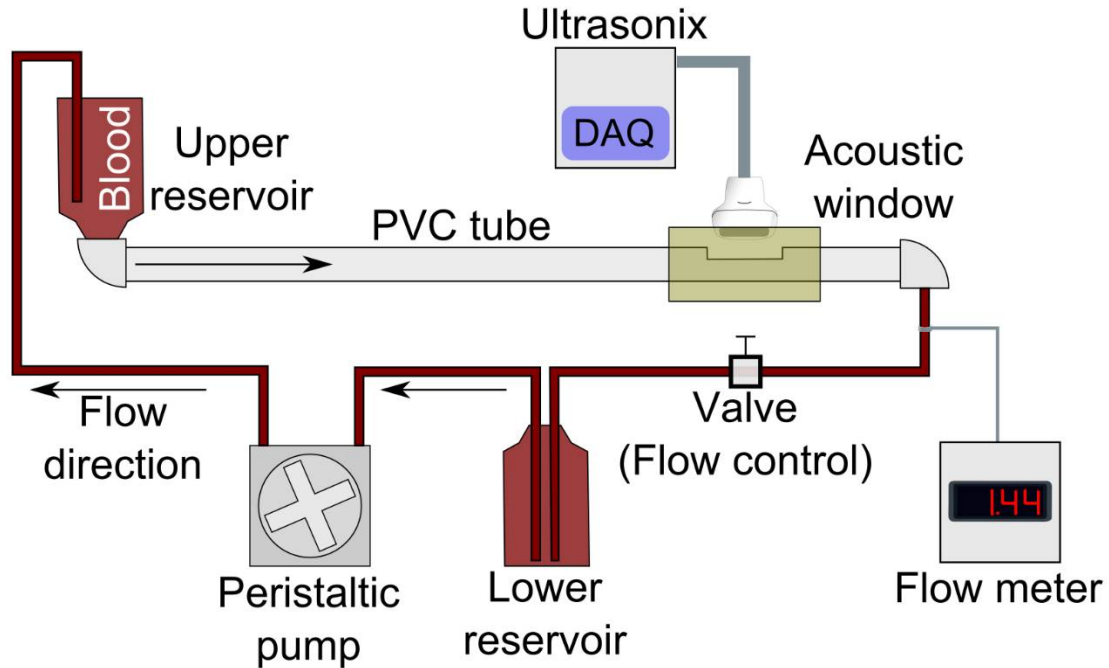


Figure 7.3 Experimental setup used for estimating backscatter coefficients of porcine flowing blood. Blood is pumped from a lower to an upper reservoir, where height differences cause a non-pulsatile flow. Ultrasound images are acquired through an acoustic window in agar placed toward the end of the tube entrance. The entrance length allowed a laminar steady flow.

7.5.4. Array transducer acquisition protocol (for FI and PWI)

Both conventional focusing and plane wave datasets were acquired with SonixRP and SonixTouch systems (Ultrasonix Medical Corporation, Analogic, Boston, MA, USA) for phantoms and blood experiments, respectively. Both systems were equipped with a L14-5/38 linear array transducer (38 mm width, 128 elements, 9.5 MHz center frequency, 5-14 MHz -6 dB bandwidth).

For phantoms, the transducer was translated in the elevation direction using ultrasound gel to acquire decorrelated signals. For blood, the transducer was put in contact with the acoustic window over the axis of the PVC tube, as represented in Figure 7.3. The same system parameters (*i.e.*, pulse shape, voltage, gain and others) were used to insonify the tested sample and the reference medium (used in the reference phantom technique of Figure 7.2).

The clinical software “Exam v6.0.7” of the Ultrasonix scanners was used to acquire the conventional FI dataset. The beam was focused at a 2.0 cm depth for phantom data and at 3.0 cm for porcine blood experiments. One hundred frames containing 128 scan lines each were acquired with an aperture varying from 16 to 32 elements, depending on the lateral position of active elements. All the images were acquired with a depth of 7 cm and with a frame rate of 33 Hz. The raw RF data were sampled at 40 MHz and recorded directly from the Exam software interface.

Plane waves were generated using the Ultrasonix beamforming library (Texo 6.0.7) for focused beams with a far focus at 30 cm. RF raw data were recorded on the SonixDAQ archiving system (Ultrasonix) and sampled at 40 MHz. For phantoms, the transmission protocol consisted in five steered plane wave insonifications at $\pm 10^\circ$, $\pm 5^\circ$ and 0° . For blood, angular insonifications were increased to $\pm 15^\circ$, $\pm 10^\circ$, $\pm 5^\circ$ and 0° (see Figure 7.4, label a) to evidence possible anisotropic effects. All the images were acquired with a depth of 7 cm and with a frame rate before compounding of 514 Hz (equivalent to 102 and 73 Hz after compounding for phantoms and blood, respectively).

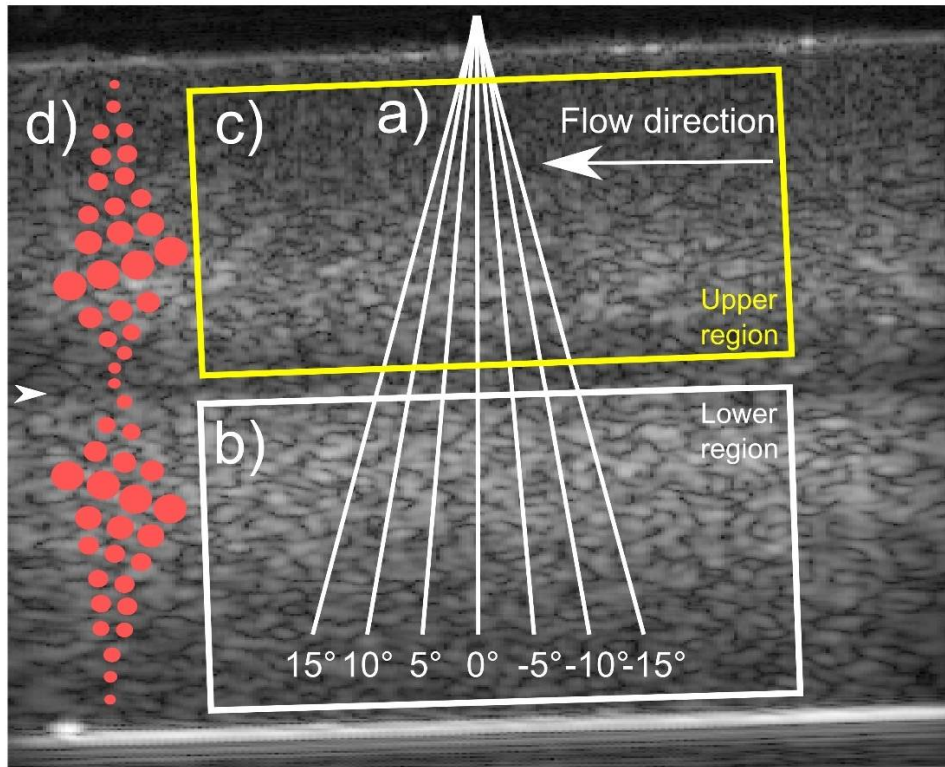


Figure 7.4 Ultrasound B-mode image of porcine blood flowing into the circuit of Figure 7.3. The arrowhead to the left indicates the focal distance used for focusing imaging. (a) Angles considered for plane-wave imaging steering of the wavefront. (b, c) Lower and upper regions of interest for backscatter coefficient analysis. (d) Schematic representation of the orientation of flowing erythrocyte aggregates, inspired by Figure 9 of Qin et al. (1998) and used to interpret the effective scatterer radius analysis of Figure 7.10.

The single angle images were beamformed using the “delay-and-sum” technique described in detail by Montaldo et al. (2009) and using a f-number of 2. Compounded images were reconstructed as the average of a complete set of migrated steered insonifications, as shown in Figure 7.1c.

7.5.5. Speed of sound and attenuation coefficient

To compute BSC with signal loss compensation, both two-way travel and signal attenuation are required. For phantoms, speed of sound and attenuation were measured experimentally using the substitution method detailed in Shung (2005). Two single-element

transducers were employed to cover the bandwidth of the array transducer used for plane wave imaging. The first single element transducer had a -6 dB bandwidth of 4.2 - 10.5 MHz (center frequency of 7.5 MHz) and a f-number of 4, whereas the second one had a -6 dB bandwidth of 10.9 - 32.3 MHz (center frequency of 20 MHz) with a f-number of 3. The attenuation coefficient α_s , expressed in dB/cm, was computed by fitting the experimental data to the power-law equation $\alpha_s = \beta f^n$, where β and n are coefficients to be estimated (Sehgal and Greenleaf 1982). This phenomenological model was selected as it is regularly used on ultrasound attenuation datasets (Prince and Links 2006). For blood, the speed of sound was assumed at 1580 m/s for all hematocrits (Bushberg et al. 2002). Blood attenuation was considered to be $0.26f$ dB/cm at 45% hematocrit, and $0.006f$ dB/cm at 3% hematocrit, where f is expressed in MHz (Wang and Shung 1997).

7.5.6. Definition of regions of interest

The region of interest (ROI) was defined as the segment of the image that was used to estimate the BSC. As local artifacts could appear in images due to different beamforming strategies, some depths and lateral regions were consistently excluded. For conventional FI and single-element transducers, regions far from the focal zone were not used due to the low signal-to-noise ratio. For PWI, artifacts appearing in lateral regions due to beam steering and grating lobes were also excluded (see later the description of Figure 7.9a and b). For phantoms, the selected ROIs were within the 12 to 35 mm image depth (*i.e.*, -6 dB focal zone), excluding 5 mm laterally on both sides of images (white box in Figure 7.9a). For blood, the ROI was positioned to reproduce that used by Yuan and Shung (1988a). It consisted in the distal half of the tube ranging from 23 to 35 mm depth, as represented by the white rectangle of Figure 7.4, label b.

7.5.7. Spectral estimation

To process the signal in the frequency domain, the Welch method for spectral smoothing was applied (Semmlow 2004; Welch 1967). Briefly, RF lines in the ROI were segmented with squared windows of 15λ of side and 75% of overlap between them. RF lines inside each window were zero padded to 128 samples and multiplied by a Hann window before computing a power spectrum. It was assumed that all RF segments inside a window shared the same acoustic

properties. The power spectra of every window inside the ROI were averaged to obtain a mean power spectrum for each sample (*e.g.*, to obtain S_{SA} or S_{RA} in Figure 7.2, for the tested sample and the reference medium, respectively).

7.5.8. Signal processing for BSC estimation using an array transducer

For conventional focusing and plane wave datasets, the BSC was calculated using the reference phantom technique, as follows

$$BSC_{SA}(f, d) = \frac{S_{SA}(f, d) 10^{\frac{\alpha_S(f, 2d)}{10}}}{\langle S_{RA}(f, d) 10^{\frac{\alpha_R(f, 2d)}{10}} \rangle_d} BSC_{RS}(f, d), \quad (7.2)$$

where S_{SA} and S_{RA} represent power spectra of the tested sample and of the reference medium, respectively; α_S and α_R are attenuation coefficients of the latter media, respectively; $\langle \cdot \rangle_d$ corresponds to the spectrum averaged from all windows found at a depth d ; and BSC_{RS} is the known BSC from the reference medium. Note that in all cases S_{RA} was acquired with the same beamforming strategy than S_{SA} . In particular, for single angle images in PWI, S_{RA} was calculated from temporal frames at the same angle of insonification than that used for the tested sample. For phantoms, BSC_{RS} was obtained experimentally with single-element transducers and the planar reflector technique, as detailed later in the section “Estimation of the BSC of phantoms with a single-element transducer”. Both Duke40 and Duke50 phantoms were used as tested sample and reference as follows: during BSC estimation of the Duke40 phantom (*i.e.*, when it was considered as the sample phantom, BSC_{SA}), the Duke50 single-element dataset was used as the well characterized reference, BSC_{RS} , and *vice versa*.

For porcine blood, the reference medium consisted of a suspension of erythrocytes in saline at a low hematocrit, as suggested by Wang and Shung (1997). We considered a suspension at 3% hematocrit flowing in the same circuit of Figure 7.2 at a mean shear rate of 2 s^{-1} . The saline medium restrains the formation of erythrocyte aggregates thus providing a reproducible reference whatever the donor. BSC_{RS} was analytically calculated employing the state-of-the-art effective medium and structure factor model (EMTSFM) for blood scattering (Franceschini and Cloutier 2013; Franceschini et al. 2011), as follows:

$$BSC_{RS_3\%}(f, s) = m(h_{agg}) \sigma(f, s, \gamma_z) S(h_{agg}, f, s), \quad (7.3)$$

where m is the number density of aggregates in the medium that depends on the volume fraction of aggregates, h_{agg} (calculated as the ratio of the hematocrit h and the volume fraction of erythrocytes into an aggregate, defined as the internal hematocrit h_i); $\sigma(f, s, \gamma_z)$ is the backscatter cross section of an aggregate that depends on the insonifying frequency, f , the effective radius of the erythrocyte aggregate, s , and the acoustic impedance contrast between the suspending medium (saline in this case) and erythrocyte aggregates, γ_z ; S is the structure factor depending on h_{agg} , the frequency and the aggregate effective radius. To model the erythrocyte saline solution (*i.e.*, the reference medium with no aggregation), the aggregate in Eq. 7.3 was considered to contain a single erythrocyte; thus, the following parameters were assumed: $h = 3\%$; $h_i = 100\%$; $s = 2.7 \mu\text{m}$ and $\gamma_z = 0.13$ (Franceschini and Cloutier 2013). The frequency range in Eq. 7.3 matched the bandwidth of the array transducer. The structure factor S was approached by an analytical solution for solid spheres (Wertheim 1963), as proposed in the original description of the EMTSFM.

7.5.9. Comparison of estimated PWI BSCs with benchmark BSCs

To validate the accuracy of BSCs estimated with PWI, they were compared to two benchmarks: the BSC estimated with a single-element transducer and that obtained with FI. For phantoms, the single-element transducer BSC was experimentally measured applying the planar reflector technique, as detailed in the next section. For porcine blood, the BSC measured with a single-element transducer was taken from the literature (Yuan and Shung 1988b). Quantitative error comparisons were done with the FI BSC datasets.

7.5.10. Estimation of the BSC of phantoms with a single-element transducer

The same single element transducers used for speed of sound and attenuation coefficient estimation were used for this experiment. The definition of the ROI and the spectral estimation method were identical to those used for BSC estimation using the linear array transducer.

To obtain S_{SS} (Figure 7.2), RF data were acquired scanning the phantoms with each transducer controlled by a 3D positioner. Phantoms were submerged in degassed water at 22° C. Each transducer was positioned perpendicular to the phantom surface and its focal point at 2 cm depth was located in the middle of the phantom. Then, the transducer was moved laterally to acquire nine spatially decorrelated images constituted of at least 61 scan lines each separated by a beam

width. The beam width was estimated as $1.02 \times \lambda \times f\text{-number}$ (Cobbold 2007), where λ is the wavelength in water at 22°C at the transducer central frequency.

To obtain S_{PS} (Figure 7.2), RF data from the planar reflector were acquired at different depths of the focal zone. The transducer was first positioned at a distance corresponding to the proximal edge of the -6 dB region. Then, it was moved axially away from the Plexiglas surface, with a step of half of a wavelength, until the Plexiglas surface coincided with the distal edge of the -6 dB focal region. At each step, a single scan line was acquired.

a. Signal processing for BSC estimation in phantoms using a single-element transducer

To obtain BSCs from phantoms with a single-element transducer, the planar reflector technique and the diffraction correction of Chen et al. (1997) were applied. The BSC of each window within a ROI was calculated as:

$$BSC_{SS}(f, d) = \frac{S_{SS}(f, d) \cdot 10^{\frac{\alpha_s(f, 2d)}{10}}}{S_{PS}(f, d)} \cdot r^2 \cdot D. \quad (7.4)$$

In Eq. 7.4, S_{SS} and S_{PS} are power spectra of the tested phantom sample and of the planar reflector at frequency f and depth d , respectively; α_s is the attenuation coefficient of the interrogated sample; r is the pressure reflection coefficient of the planar reflector, assumed at 0.37 for Plexiglas in degassed water (Han et al. 2013); and D is the beam diffraction correction function of (Chen et al. 1997) given by

$$D(f, d) = 2.174 |E(f, d)|^2 \frac{d^2}{A_0 Z}, \quad \text{with} \quad (7.5)$$

$$E(f, d) = 1 - e^{-iG_p} [J_0(G_p) + iJ_1(G_p)].$$

In the latter equations, d is the depth of the window; A_0 is the transducer active area; Z is the lateral size of the window used to gate out the RF signal; G_p is the pressure gain factor, defined as $G_p(f, d) = \frac{A_0 f}{c_s d}$, where c_s is the speed of sound; and J_0 and J_1 are the zero and first order Bessel functions of the first kind, respectively.

7.5.11. Quantitative assessment of PWI BSCs

The mean deviation between BSCs computed with PWI and FI datasets was calculated in decibels, as follow:

$$\text{Dev}(BSC_{PWI}, BSC_{FI}) = \frac{1}{\|B\|} \sum_{f \text{ in } B} \left| 10 \log_{10} \left(\frac{BSC_{PWI}(f)}{BSC_{FI}(f)} \right) \right|, \quad (7.6)$$

where B is the set of frequencies in the analyzed bandwidth; and $BSC_{PWI}(f)$ and $BSC_{FI}(f)$ are mean BSCs calculated from a set of 9 images (frames) with PWI and FI, respectively. For PWI, mean BSCs were determined from single angle images, and from steered images that were compounded in the time domain to compute a mean BSC. Deviations in Eq. 7.6 were averaged for both phantoms and for both shear rates in the case of flowing blood.

7.5.12. Derived BSC scatterer size and anisotropy assessment

To assess the effect of the beamforming technique on quantitative tissue characterization parameters, estimated BSCs were fitted to a scattering model appropriate to each medium. In this study, only the effective scatterer radius was estimated as the scatterer concentrations are known. For phantoms, the Faran model (Faran Jr 1951) was chosen as it accurately describes randomly distributed rigid spheres in a homogeneous medium. This model considers physical and mechanical properties for both scatterers and the medium (*i.e.*, mass density, speed of sound, and for scatterers, Poisson ratio, radius and number density). For soda lime glass scatterers, these properties were considered to be a mass density of 2.38 g/cm^3 , a Poisson's ratio of 0.23, a speed of sound of 5620 m/s (Ide 1937), and known number densities of 0.05 and 0.03 million scatterers / mL for Duke40 and Duke50, respectively. Speed of sound and mass density of the background medium was measured at 1530 m/s and 1.01 g/cm^3 , respectively.

For blood, the EMTSFM scattering model of Eq. 7.3 was selected as it takes into account coherent scattering caused by the high number density of red cell aggregates. We assumed spherical aggregates with an internal hematocrit h_i of 74% (*i.e.*, the maximum volume concentration of solid spheres in hexagonal close packing (Franceschini and Cloutier 2013)). The acoustic impedance contrast γ_z was again fixed at 0.13; the hematocrit was experimentally fixed at 45%, and the remaining parameter to determine was the effective aggregate radius, s . The criterion to minimize for determining the effective scatterer size was the normalized root-mean-square error between the experimental BSC_{SA} and that predicted by the scattering model:

$$\hat{s} = \arg \min_s \left\{ \sqrt{\frac{1}{\|B\|} \sum_{f \text{ in } B} \left(\frac{BSC_{SA}(f) - BSC_M(f, s)}{BSC_M(f, s)} \right)^2} \right\}. \quad (7.7)$$

In this expression, \hat{s} is the estimated effective scatterer radius; BSC_{SA} and BSC_M are backscatter coefficients obtained experimentally and by the scattering model evaluated at the radius s , respectively. Exhaustive search was employed to solve the minimization problem within the bandwidth of 5 to 14 MHz. The range of \hat{s} obtained from PWI single angle images (between -15° to 15°) was used to assess the anisotropy.

7.6. Results

7.6.1. Speed of sound and attenuation of phantoms

Speeds of sound were estimated at 1533 ± 3 m/s and 1536 ± 3 m/s for Duke40 and Duke50, respectively. Attenuation coefficients for both phantoms were identical at $\beta = 0.034 \pm 0.01$ and $n = 1.67 \pm 0.3$ in the bandwidth of 5 - 14 MHz. These values also accounted for the transmission loss between the Saran wrap layer and the phantom itself. The numerical similarity of these acoustic measures for both phantoms assures that beam diffraction was similar and that the reference phantom technique was suitable for instrumentation compensation. Because both phantoms had the same mean attenuation, estimated BSC_{SA} using the reference phantom technique was only dependent on the BSC_{RS} of the reference medium and on estimated power spectra S_{SA} and S_{RA} (see Eq. 7.2).

7.6.2. Estimated BSCs using plane wave imaging versus benchmark measures

Mean BSCs for both isotropic phantoms are shown in Figure 7.5. Standard deviations are hidden for clarity. The solid and dashed lines represent benchmark BSCs obtained with single-element transducers. The overlapping of results suggests consistency in BSC estimation for all imaging techniques.

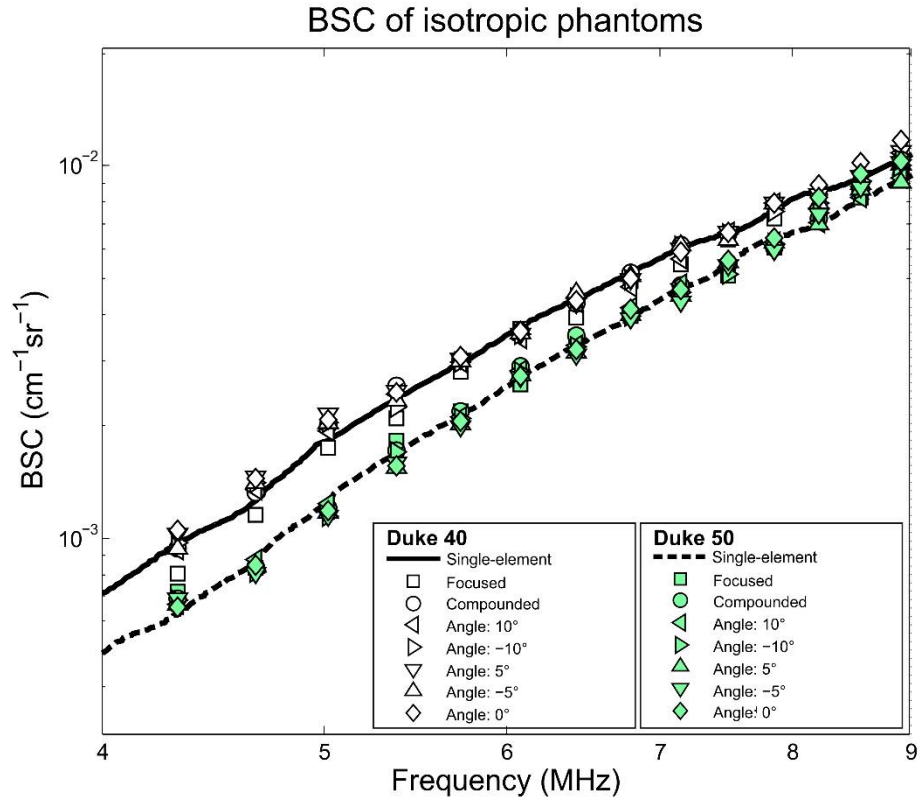


Figure 7.5 Mean backscatter coefficient (BSC) from isotropic phantoms after averaging of nine image frames. Solid and dotted lines represent benchmark BSCs measured with single element transducers. Hollow and filled markers represent BSCs estimated for focused, compounded and single-angle plane wave images for Duke40 and Duke50 phantoms, respectively. Focused and all plane wave techniques reproduced consistently benchmark BSCs. Standard deviations are hidden for clarity.

For blood experiments, samples from three swine were analyzed at two shear rates. The lower shear rate (2 s^{-1}) promoted the formation of bigger erythrocyte aggregates, which increased the BSC magnitude. BSCs are presented comparing the two benchmarks (*i.e.*, single-element transducer and FI, Figure 7.6) and, all PWI techniques versus FI (Figure 7.7). First, we observe agreement in magnitude and slope between BSCs obtained with FI and those of the literature at a normal fibrinogen concentration (Figure 7.6). This agreement validates the use of the EMTSFM to produce the reference BSC_{RS} and also confirms that attenuation and beam diffraction were correctly compensated for during the estimation process. From Figure 7.6, it is also observed that inter-individual differences were present for the three swine. BSCs from

compounded data matched well those of FI in magnitude and spectral slope in most cases (with the exception of swine #1 at 2 s^{-1} , Figure 7.7). However, the anisotropy of blood backscatter affected, as expected, the BSC magnitude at each single angle. A consistent incremental bias in BSC was observed for step changes in insonifying angles (see later the description of Figure 7.10 for a better visualization of the anisotropy).

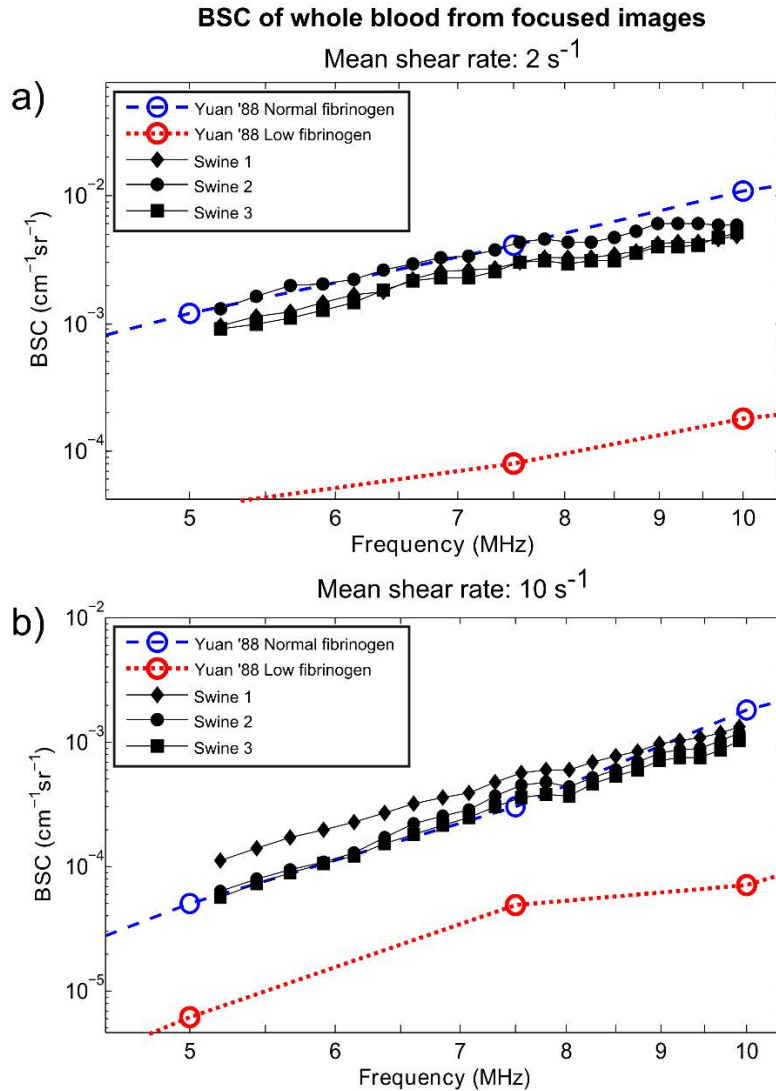


Figure 7.6 Mean backscatter coefficients (BSCs) of porcine flowing blood estimated with conventional focusing imaging at mean shear rates of 2 s^{-1} (a) and 10 s^{-1} (b). Dotted blue and red lines are BSC estimations made with a single-element transducer at normal and low plasma fibrinogen concentrations, respectively (data taken from Yuan and Shung 1988b). Less erythrocyte aggregation and smaller BSCs are obtained at a low fibrinogen level (Weng et al. 1996a, 1996b). Filled markers represent the BSCs estimated from blood samples of three swine. Quantitative comparisons of PWI BSCs to benchmark FI BSCs

Mean deviations (Eq. 7.6) of PWI beamforming techniques are shown in Figure 7.8. For phantoms, deviations below 0.26 dB on average were observed. For blood experiments, mean

deviations ranged from 1.1 to 2.2 dB. The lowest deviation was obtained with the compounded approach.

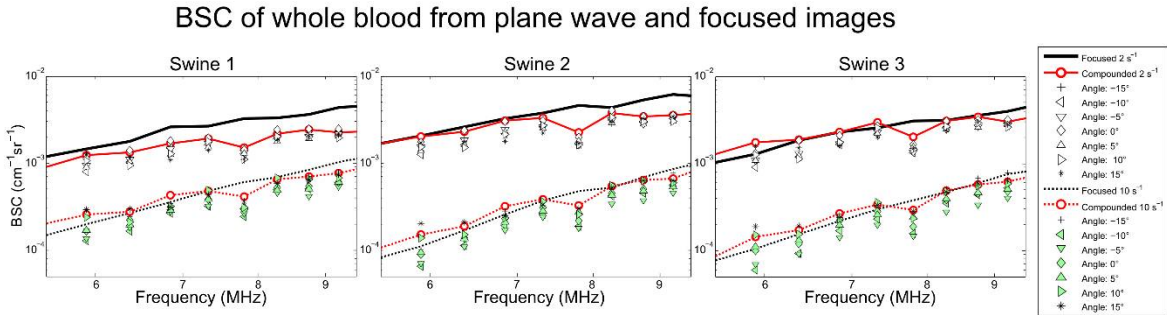


Figure 7.7 Mean backscatter coefficients (BSCs) of porcine flowing blood estimated with compounded and single-angle

b. BSC artifacts induced by the beamforming protocol

Tissue mimicking phantoms were considered to have a scatterer distribution reasonably homogeneous. Therefore, the entire analyzed volume should share similar BSCs. We used this fact to identify image regions with systematic artifacts produced by selected beamforming techniques. Figure 7.9 depicts parametric images of the mean deviation (Eq. 7.6) computed for selected PWI versus FI methods in the case of Duke50 phantom. Overall, errors were not dependent on depth, suggesting that the attenuation was correctly compensated for and that the SNR was sufficient to allow good BSC estimations. Plane wave steered images (Figure 7.9a and b) revealed, as expected, lateral artifacts due to reduced coherent acoustic energy in these regions. Remarkably, the 0° dataset also presented lateral artifacts (Figure 7.9c). These artifacts were also present in the compounded image although attenuated (Figure 7.9d). As mentioned earlier, those lateral regions were excluded from all data analyses.

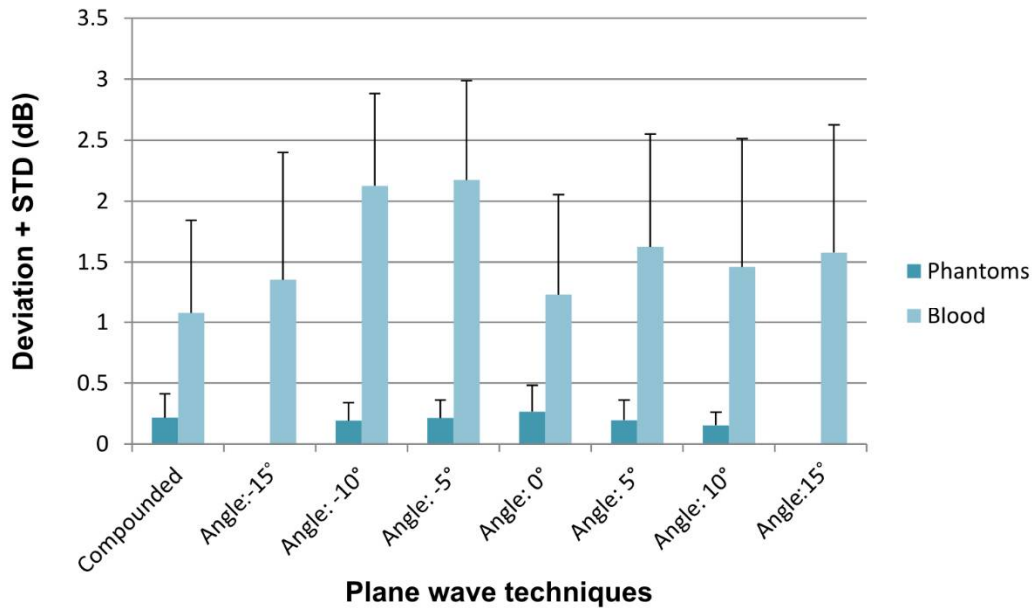


Figure 7.8 Deviation of the backscatter coefficient (BSC) in decibels

7.6.3. Derived scatterer sizes and anisotropy assessment

The effective scatterer radii derived from the model fitting of phantom and blood experiments are shown in Table 7.1. In both cases, estimates from compounded PWI were in agreement with those of FI, with deviations of less than 2.9 μm . For blood, PWI (compounded and single angles) and FI datasets revealed a maximum error of 7.5 μm when compared with single-element transducer measures from the literature (by fitting the EMTSFM model to the data of Yuan and Shung (1988b)). It is notable that radii of phantom scatterers were consistent for all single angle measures. This may be attributed to the isotropy of embedded glass particles. In contrast, radii observed for steered images in blood appeared angle dependent.

Table 7.1 Effective radius of scatterers (in mm) in phantoms (i.e., glass beads) and blood (i.e., erythrocyte aggregates) after fitting of their backscatter coefficients to appropriate scattering models

Sample	Mean shear rate	Single-element	Focused	Compounded plane waves	Single angle plane waves						
					-15°	-10°	-5°	0°	5°	10°	15°
Duke40	NA	20.4	20.1	20.2	NA	20.3	20.3	20.2	20.4	20.1	NA
Duke50	NA	23.9	23.4	23.1	NA	23.2	23.3	23.3	23.7	23.5	NA
Swine 1	2 s ⁻¹	41.4*	43.4	41.4	38.5	38.3	39.2	40.9	39.0	39.6	40.6
Swine 2			47.4	48.9	43.2	42.4	44.0	46.2	44.5	44.2	45.5
Swine 3			42.5	45.4	40.4	38.7	39.8	42.3	41.2	42.0	43.6
Swine 1	10 s ⁻¹	24.0*	25.9	26.7	24.6	22.8	23.0	24.3	24.4	25.9	26.9
Swine 2			23.4	23.8	22.8	20.5	19.8	21.5	21.4	22.8	24.1
Swine 3			22.4	22.8	22.5	19.8	18.9	21.0	21.2	22.6	23.6

NA = Non applicable or non available

For blood, backscatter coefficients from the lower region of interest of Figure 7.4 (white box) were considered. The actual radii of spheres within Duke40 and Duke50 phantoms were 21.1 and 24.5 mm, respectively. The anisotropy of blood backscatter is evidenced when estimates from single angles are compared between them.

*Data from the literature. Inter-individual differences in aggregation of erythrocytes may exist with studied porcine blood samples.

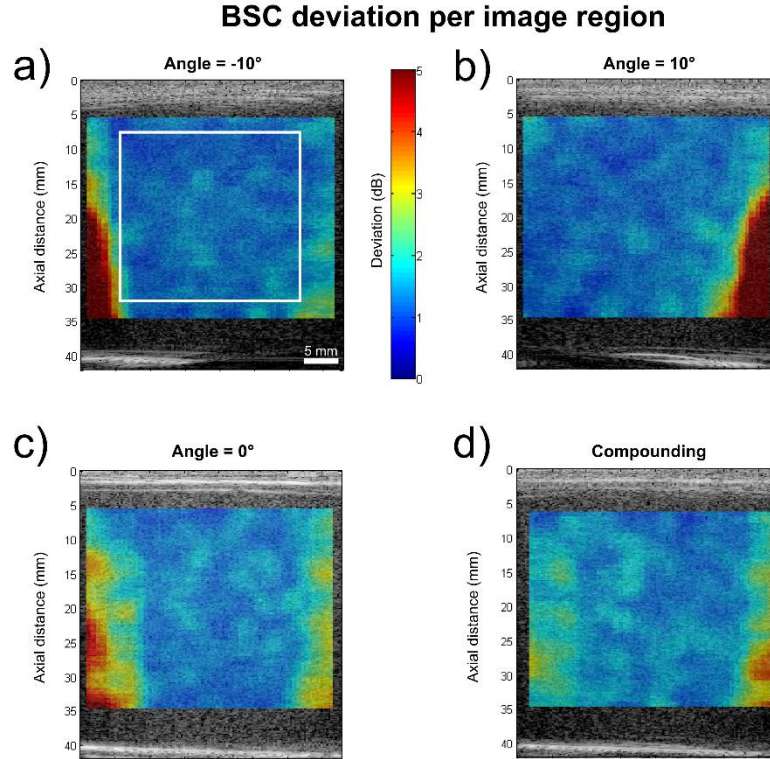


Figure 7.9 Parametric images of the mean deviation of the backscatter coefficient (in dB) reveal regions with systematic artifacts induced by the beamforming protocol. Higher values (red) indicate regions with larger deviations from the benchmark backscatter coefficient (focused images). (a–c) Single-angle plane wave insonification at -10° , 10° and 0° , respectively; lateral biases caused by the steering of the wave front are observed. (d) Image compounded from plane wave insonifications; attenuated lateral biases are still present on both sides. The white box in (a) indicates the region of interest considered for backscatter coefficient analysis.

This latter observation is better visualized in Figure 7.10. Left panels on this figure correspond to radii taken from the lower ROI of the blood vessel depicted by the white rectangle of Figure 7.4 (label b), whereas results in right panels represent measures taken in the top yellow ROI of Figure 7.4 (label c). As observed, the anisotropic behavior of scatterer radii was

consistent from pig to pig. Raising or decreasing trends were observed from measures taken at -15° to 15° depending on the position of the ROI within the tube.

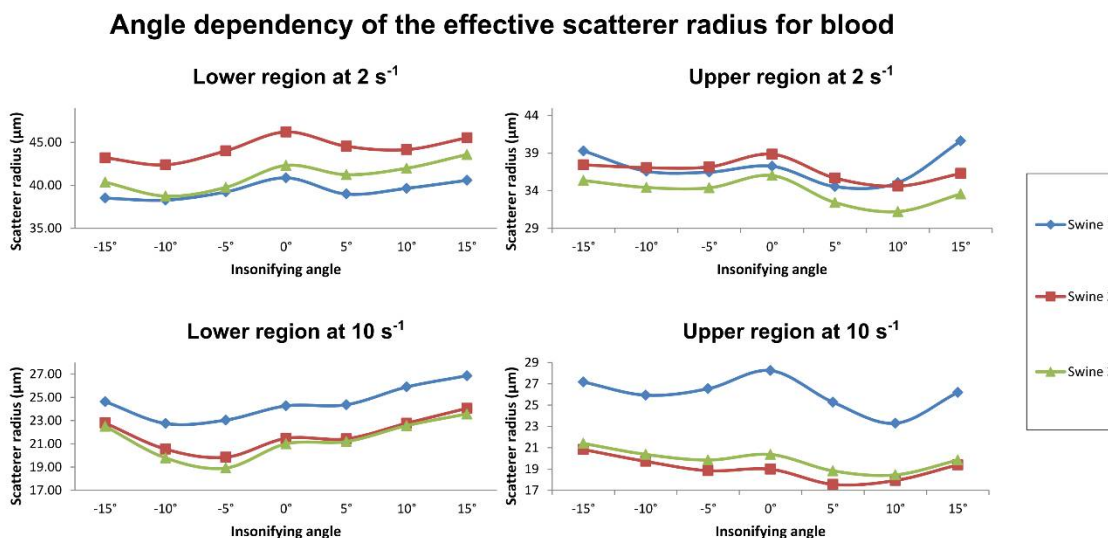


Figure 7.10 Effective scatterer radius estimated from the fitting of the backscatter coefficient to a model of blood backscatter at shear rates of 2 and 10 s^{-1} . Raising and decreasing trends in scatterer dimensions are observed when considering lower and upper regions of interest depicted in Figure 7.4.

7.7. Discussion

In this study, we estimated the BSC of two isotropic tissue-mimicking phantoms and anisotropic aggregating erythrocyte structures using two PWI strategies, *i.e.* compounded and single angle insonifications. In isotropic media, both PWI approaches provided accurate BSC estimations compared to benchmark measures. For flowing blood, even if mean deviations from benchmark BSC values were higher than with the phantom datasets (1.1 to 2.2 dB versus 0.15 to 0.26 dB), one can conclude that PWI gave satisfactory estimations of the backscatter coefficient. Indeed, observed mean differences below 2.2 dB between PWI and FI BSCs are smaller than the inter-subject variability for porcine blood (approximately 3 dB, Shung et al. (1992)) and well below changes in BSC attributed to the kinetics of red blood cell aggregation (approximately 12 dB, Yuan and Shung (1988b)).

For blood experiments, single angle PWI revealed angular dependencies of the effective scatterer size, which may be attributed to the macroscopic orientation of aggregates with flow streamlines, as postulated by Allard et al. (1996) and Qin et al. (1998). If one considers spherical aggregates, as assumed by the EMTSFM model, one should expect small aggregates near the vessel wall where the shear rate is maximum, larger aggregates near the tube center, and smaller aggregates at the tube center axis because of the well-known “black hole” phenomenon (*i.e.*, the reduction of the aggregation when the shear rate is close to zero, see Yuan and Shung (1989) and Qin et al. (1998)). This is illustrated in Figure 7.4, label d.

With this latter figure, let explain results of Figure 7.10. In the lower region of the tube (white rectangle), scatterer sizes increased from -15° to 15° insonification likely because the macroscopic structure of aggregates was more perpendicular to the plane wave front at 15° . By opposite analogy, this also applies to the upper region (yellow rectangle) where larger scatterer sizes (higher backscatter) were observed at -15° . Thus, this suggests that edges of flowing aggregates were tilted with a cone 3D shaped orientation into the cylindrical tube. An optical validation of this hypothesis has yet to be proven but current technologies make this difficult because of the opacity of blood at a normal hematocrit. However, this is consistent with previous observations of higher backscatter when perpendicular muscle fiber orientations are insonified (Recchia et al. 1995).

Even if results with compounded images were comparable to those of FI, benefits of using plane waves to calculate the BSC are threefold. First, higher frame rates allow robust spectral characterization of fast moving tissues such as the cardiac muscle, artery wall and pulsatile blood flow. This advantage may be used to characterize the BSC of transient events (*e.g.*, turbulent motion downstream of a stenosis, Cloutier et al. (1995)). This may also be advantageous to reduce the acquisition length while maintaining sufficient records of RF data to reduce the variance of BSC estimates with averaging. Second, the quality of images, evaluated by the lateral resolution and the contrast to noise ratio, had been shown by others to be comparable to multifocus imaging in the whole field of view (Garcia et al. 2013; Montaldo et al. 2009). This property may favor the use of the whole image for BSC estimation in the opposite of conventional focusing imaging where BSC estimation is expected to be better at the focus. Third, we showed that the anisotropy of tissues can be assessed using the angular data

available before compounding. This information is of medical relevance to study the myocardium (Mottley and Miller 1988), tendons (Hoffmeister et al. 1995) and aggregates of erythrocytes (Allard et al. 1996; Savéry and Cloutier 2005), to name a few examples.

However, PWI derived techniques have limitations that may impact BSC estimation. First, beam penetration may be more limited than FI because the acoustic pressure of a plane wave insonification is lower, particularly at the focus. Conversely in PWI, if the frame rate is not of particular interest for a specific application, the use of several insonification angles could lead to a slightly better SNR for compounded images, thus leading to improved penetration. Nonetheless, the number of steered angles has a limit when one is concerned by SNR improvement (Garcia et al. 2013). Other techniques coming from radar theory, like coded excitation and pulse compression (Oelze 2007), can lessen this drawback. Spectral analysis techniques have already been successfully used in conjunction with coded excitation (Kanzler and Oelze 2008; Sanchez et al. 2009).

A second drawback is the reduced lateral resolution affecting single angle PWI images due to the lack of transmit focusing. However, the compounding process achieves a synthetic focusing for each pixel in the intersection of the beams, thus restoring the resolution (Montaldo et al. 2009). Nonetheless, similar problems could be present in compounded images if the beams of pre-compounded images do not overlap. The triangular region created by intersecting beams (Figure 7.11) has been previously discussed in the context of elastography based on multiple steered beams (Hansen 2010). The depth at which beams cease to overlap, and in consequence at which the lateral resolution is diminished, is determined by the width of the transducer, m , and the maximal steering angle θ (see Figure 7.11). This depth is described by the equation:

$$d = \frac{m}{2 \tan(\theta)}. \quad (7.8)$$

In the current study, the lack of lateral resolution on single angle images had no impact as phantom and blood flow echogenicity was homogeneous in the horizontal direction with no hyperechoic regions.

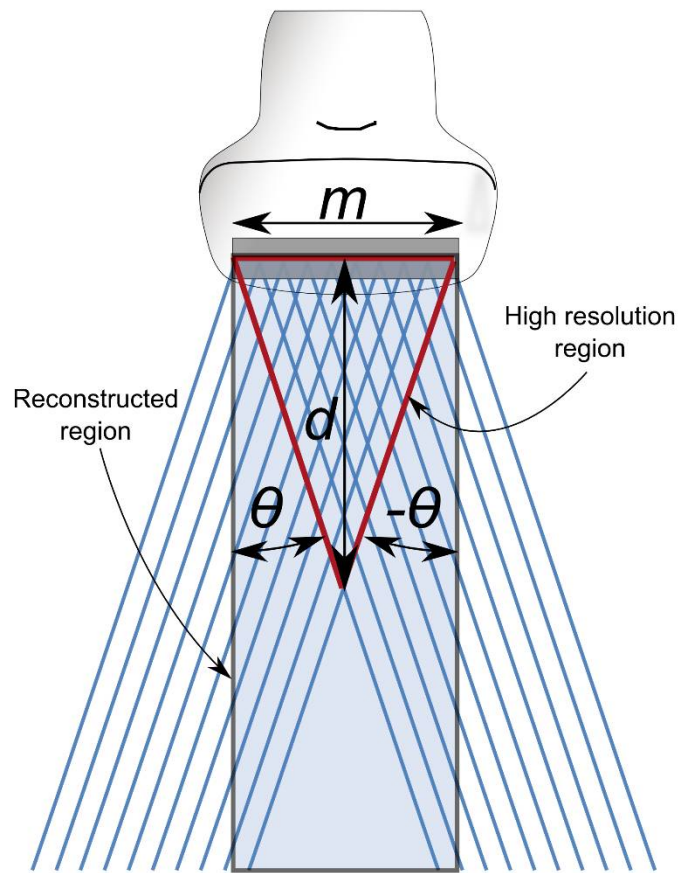


Figure 7.11 Depiction of the triangle with a higher lateral resolution for plane-wave compounded images, defined by the intersection of single-angle plane-wave images. After a distance d , the gain in lateral resolution offered by compounding is lost and the backscatter coefficient estimation quality may be affected.

A third drawback is caused by beam steering, which affects not only PWI but other beamforming techniques employing oriented beams. As shown in Figure 7.9a and b, beam steering causes regions below the lateral side of the transducer to receive less acoustic pressure than those below its center, potentially affecting the SNR of the BSC. In this study, the latter drawback was avoided by excluding lateral zones of each image as the depth scanned was far from the interception limit (corresponding to 10.8 cm for our transducer measuring $m = 38$ mm). However, for small probes (*e.g.*, arrays of 10 mm in lateral length), the resolution triangle can imply serious biases for BSC estimation even at a depth as small as 3 cm. A possible approach to counteract this problem may consist in normalizing the sample power spectrum S_{SA} in Eq. 7.2

with a set of windows in the reference medium having the same loss in acoustic energy (*i.e.*, the same position in the ROI). Nevertheless, to have a consistent estimate with the reference medium, it would be necessary to perform sufficient averaging of power spectra. With a static reference phantom this may be difficult but possible in the case of flowing blood as different time frames may be used.

One important aspect of our results is that they were obtained with a clinical scanner providing RF data and, in the case of FI, with the same software employed for patient examination. This provides more evidence on the possibility of integrating spectral tissue characterization methods into the clinical practice, even with new beamforming technologies. Historically, the implementation in clinical scanners of spectral-based quantitative ultrasound techniques has been deferred for a few reasons; in particular, the lack of access to RF signals and the absence of a consensus in the methodology of BSC estimation were early problems (Anderson et al. 2010; Madsen et al. 1999; Nam et al. 2011). Nowadays, most of these causes have been overcome. Indeed, for example, several commercial ultrasound scanners provide easy access to RF data (before or after beamforming), thus facilitating the implementation of robust BSC spectral methods. State-of-the-art BSC estimation procedures can be found in recent text books (Franceschini and Cloutier 2013; Ghoshal et al. 2013). Another issue delaying acceptance of quantitative spectral methods is the need for calibration of the backscatter signal intensity (Wear et al. 2005). For most laboratories, it is common to create its own reference medium making difficult the reproducibility of measurements (see for example, (Salles et al. 2014; Wang and Shung 1997; Wear et al. 2005)). Calibrated commercial tissue mimicking phantoms would alleviate this problem (Nam et al. 2012). Other challenges, as real-time display of parametric images are still to be overcome; nevertheless, hardware improvements, as GPU, besides experimental validation as that shown here, let us be hopeful of a future clinical scanner with spectral characterization capabilities.

7.8. Conclusion

Some evidences were given suggesting the use of plane wave imaging for the estimation of the backscatter coefficient in biological tissues. BSC estimates obtained with compounded plane wave images were equivalent to those obtained with single element transducers and

conventional focusing, in both isotropic and anisotropic media. In particular, small differences were observed between effective scatterer radii derived from either technique. Additionally, we evidenced in experiments with porcine blood that single angle PWI images (*i.e.*, before compounding) could be used to assess the anisotropy of flowing erythrocyte aggregates. These results suggest that plane wave imaging can be used for spectral tissue characterization, particularly in the case of fast moving tissues.

7.9. Annexe 1 : Calcul expérimental de l'atténuation

La vitesse du son et le coefficient d'atténuation des deux fantômes ont été estimés sur la base de la technique proposée dans (Shung 2005). Pour ceci un transducteur monoélément est utilisé pour insonifier un réflecteur plan en plexiglas avec incidence normale, à travers d'eau dégazée à une température de 22 ° C. L'excitation et l'amplification du signal d'entrée ont été générées par un pulseur / récepteur. Le signal a été numérisé avec une carte Gage, ajustant le gain pour ne pas saturer le signal. En raison du contraste élevé de l'impédance entre l'eau et la surface du réflecteur, l'impulsion réfléchie est facilement détectée par l'inspection du signal RF. Le temps de vol de l'onde vers le réflecteur en plexiglas s'estime sur le signal RF numérisé, marquant le premier changement d'amplitude au début de la plaque de plexiglas. Ensuite, le fantôme s'est placé entre le transducteur et la plaque de façon à ne pas être en contact avec le transducteur ou le réflecteur (Figure 7.1b). Les temps de vol à chacune des parois du fantôme ont été estimés en utilisant la même méthodologie. La vitesse du son a été calculée en utilisant les définitions de la (Figure 7.12) et l'équation suivante:

$$c_s = \frac{c_w [t_w - (t_s - t_b) - t_u]}{t_b - t_u} \quad (7.1)$$

où c_w est la vitesse du son dans l'eau à la température mesurée; t_w et t_s sont le temps de vol vers le réflecteur plan dans l'eau et avec le fantôme placé, respectivement; t_u et t_b sont le temps de vol vers le premier et le second surface, respectivement. Notez que la largeur du fantôme, W_s , peut être estimée acoustiquement au moyen de $W_s = c_s (t_b - t_u)$.

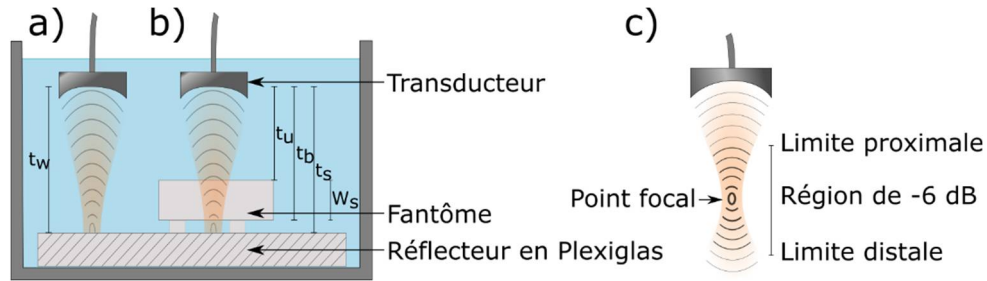


Figure 7.12 Définition des temps de vol, des distances et des régions du faisceau pour les expériences. a) et b) Transducteur sans et avec fantôme dans le trajet du faisceau, respectivement; t_w , t_u , t_b et t_s sont les temps de vol vers le réflecteur dans l'eau, vers les parois supérieure et inférieure du fantôme et vers le plexiglas avec le fantôme dans le chemin, respectivement; W_s est la largeur du fantôme; c) Région de faisceau utilisée pour l'estimation du BSC correspondant à -6 dB d'amplitude de la pression. L'amplitude maximale se produit au focus.

L'atténuation a été estimée en utilisant la même configuration expérimentale représentée sur la Figure 7.12, mais en analysant les spectres de puissance du signal synchronisé correspondant au réflecteur plan, avec et sans le fantôme dans le milieu, en utilisant l'équation suivante:

$$a(f) = \frac{10[\log S_w(f) - \log S_s(f)]}{2W_s} \quad (7.2)$$

où $a(f)$ est l'atténuation du fantôme, exprimé en dB / cm; S_w est le spectre de puissance du réflecteur plan dans l'eau; S_s et S_w sont les spectres de puissance du réflecteur plan avec et sans le fantôme dans le chemin du faisceau, respectivement. Pour interpoler l'atténuation des fréquences dans la bande passante, les données expérimentales ont été ajustées à la forme de la loi de puissance, $a = \beta f^n$, mesurée en dB / cm et exprimée en fonction de la fréquence.

Chapitre 8 Discussion et conclusion générale

8.1. Résumé général

Cette thèse a présenté, sous la forme de trois articles scientifiques, une série de travaux théoriques et expérimentaux dédiés à l'évaluation échographique de l'agrégation érythrocytaire visant la détection non invasive de l'inflammation systémique.

Dans la première étude (Chapitre 5), on a évalué les paramètres estimés à partir de cinq modèles dans le cadre d'un problème inverse de la diffusion acoustique du sang, avec le but de déterminer sa capacité à décrire une augmentation d'agrégation érythrocytaire en conditions physiologiques. On a comparé les modèles de loi de puissance, gaussien, l'estimateur du facteur de structure et de taille (SFSE) et les versions monodisperses et polydisperses du modèle de milieu effectif combiné au facteur de structure (EMTSFM). On a conclu qu'à l'exception du modèle EMTSFM monodisperse, tous ces modèles peuvent décrire l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire de normale à forte, mais qu'uniquement quelques paramètres des modèles SFSE, EMTSFM monodisperse et gaussien permettent de suivre le changement d'agrégation de faible à légèrement amplifié. Cette analyse s'est basée sur deux ensembles de données issus des expériences *ex vivo* et *in vivo*. Les tests *in vivo* incluent l'acquisition au niveau de la veine fémorale exposée de cinq porcs, lors d'une chirurgie cardiaque avant et après le déclenchement de l'inflammation. Les tests *ex vivo* ont utilisé du sang porcin pour simuler l'écoulement sanguin humain de la veine antébrachiale médiane. À cet effet, on a simulé la vitesse d'écoulement, l'hématocrite, le rayon du vaisseau et la température d'un flux veineux humain. On a simulé la réponse inflammatoire étagée en ajoutant de macromolécules qui stimulent la formation d'agrégats érythrocytaire (dextran 500) à différentes concentrations. La comparaison des modèles s'est basée sur trois critères : un bon ajustement du modèle aux valeurs expérimentales, le contraste offert entre l'état normal et inflammatoire et la corrélation avec les mesures de laboratoire de l'agrégation érythrocytaire. Nos résultats ont montré que sous conditions de moyenne à forte agrégation presque tous les paramètres des cinq modèles sont capables de décrire l'agrégation (R^2 entre 0.72 et 0.85, p-values entre 0.007 et 0.45). Également, les paramètres W de SFSE, a du modèle gaussien et $a/(1+Z)^{1/2}$ d'EMTSFM polydisperse ont

montré un bon contraste sous toutes les conditions d'agrégation. Cependant, sous conditions de faible à moyenne agrégation, il n'y pas de paramètres qui décrit de façon significative la tendance. Cette même étude a permis d'introduire le concept de « coefficient d'atténuation non compensé en atténuation » qui permet la généralisation de l'estimation conjointe de l'atténuation et des paramètres descriptifs des modèles de diffusion ultrasonore.

Dans la deuxième étude (Chapitre 6) on a proposé et évalué un protocole de mesure de l'agrégation érythrocytaire *in vivo* chez l'humain. Dans la même lignée de protocoles *in vivo* proposée dans la littérature (Rouffiac et al. 2004; Yu et al. 2005), on a tout d'abord testé les hypothèses de flux arrêté et diminué dans un dispositif de Couette. À ces fins, on a employé du sang porcine et l'on a simulé plusieurs vitesses d'écoulement plausibles en conditions physiologiques. On a observé que la dynamique d'agrégation érythrocytaire en partant à flux arrêté dépend de l'écoulement précédent à l'arrêt. Ceci joue contre la reproductibilité de la mesure, car la vitesse d'écoulement chez un patient peut varier en fonction des conditions physiologiques. À l'opposé, la dynamique d'agrégation à flux réduit est indépendante de l'écoulement précédant au contrôle du flux. En visant un protocole reproductible, on a choisi la méthode à flux contrôlé pour de tests chez l'humain. Ensuite, on a conceptualisé et fabriqué un bracelet de pression variable pour diminuer le flux sanguin de la veine antébrachiale médiane (dans l'avant-bras). Ceci a permis un contrôle plus précis et moins dérangeant pour le patient que les garrots utilisés pour mesurer la pression artérielle. Ensuite, on a procédé au test chez onze volontaires humains. En utilisant une technique de vélocimétrie par image de particules appliquée en temps réel, on a ajusté la pression du bracelet jusqu'à l'obtention d'une vitesse du flux constante qui donne lieu à un taux de cisaillement moyen de 3 s^{-1} . Comme mesure de référence, on a collecté des échantillons sanguins et on les a analysés par agrégométrie laser au laboratoire. La corrélation entre les mesures ultrasonores *in vivo* et les tests de laboratoires (index S_{10}) s'est avérée excellente ($R^2 = 82.7\%$, $p\text{-value} < 0.0001$). La reproductibilité de la technique mesurée par le coefficient de variation sous dix répétitions était de 11%. La mise en place de ce protocole a déclenché de nouvelles études en partenariat avec l'industrie privée avec des cohortes de plus grande taille.

La troisième étude constituant cette thèse (Chapitre 7) s'inscrit dans le contexte d'utilisation de l'instrumentation clinique pour l'analyse spectrale du sang. Notamment, on s'est

proposé de valider expérimentalement l'effet de la méthode de formation du faisceau sur les BSC estimés, principalement dans le cas d'imagerie par ondes planes. Pour ce faire on a contemplé deux cas, les milieux isotropes et anisotropes. Pour la validation en milieux isotropes, on a utilisé des fantômes émulant le tissu avec des inclusions sphériques. Pour les milieux anisotropes, on a choisi du sang porcine en écoulement. L'instrumentation choisie incluait un transducteur monoélément, qui a servi de mesure de référence, ainsi que les échographes cliniques Ultrasonix RP et SonixTouch. Dans les deux derniers cas, on a utilisé une barrette linéaire de 128 éléments à une fréquence centrale de 9.5 MHz et une bande passante théorique de 5 à 14 MHz. Pour la formation de faisceau on a appliqué l'imagerie conventionnelle (c.-à-d. par ondes focalisées) et l'imagerie par ondes planes à haute cadence. Pour cette dernière, on a envoyé des ondes planes à plusieurs angles (entre -15° et 15°) et on a réalisé une composition des images résultantes *a posteriori*. Les BSC obtenus avec les deux techniques de formation de faisceaux se sont avérés très similaires à ceux obtenus avec les transducteurs monoéléments (différences maximales de 0.2 et 2.2 dB pour les fantômes des tissus mous et le sang, respectivement). Cette évaluation a démontré la faisabilité de l'utilisation d'échographes cliniques pour l'analyse spectrale du BSC. Notamment, les résultats obtenus avec la technique par ondes planes supportent l'étude spectrale de tissus en mouvement rapide, tels que le muscle cardiaque. Une deuxième observation faite à partir de ces validations a été la possibilité de décrire l'anisotropie d'un tissu en utilisant les images dirigées avant la reconstruction. En ajustant les BSC résultant de ces images à des modèles de diffusion, on a observé une dépendance des paramètres en fonction de l'angle d'insonification. Ces résultats pourraient être d'intérêt pour l'étude de l'anisotropie de tissus musculaires.

8.2. Originalité des travaux

Les objectifs et les méthodes développées dans cette thèse visent l'évaluation de l'agrégation érythrocytaire par des méthodes ultrasonores afin de détecter l'inflammation systémique. L'originalité principale de ces travaux réside en la volonté d'appliquer la méthode spectrale chez l'humain, dans un cadre de transfert vers la clinique. Dans ce contexte, trois éléments d'innovation sont apportés : l'interprétation clinique et hémorhéologique des modèles de diffusion du sang, un nouveau protocole de mesure non invasif pour les humains et la

validation de la technique avec un échographe clinique. Ces points sont reflétés dans les trois papiers reproduits aux chapitres 6, 7 et 8, respectivement. Dans les sections suivantes, on développe avec plus de profondeur les points innovants de chaque contribution et on contraste les résultats avec ceux de la littérature.

8.2.1. Interprétation clinique des modèles de diffusion acoustique du sang

Dans l'étude reproduite au Chapitre 5, on propose l'interprétation des paramètres tirés des modèles de diffusion d'un point de vue clinique. Spécifiquement, on évalue la capacité de chacun des paramètres des modèles à décrire l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire causée par une réaction inflammatoire. En contraste, les études précédentes se sont concentrées sur la capacité de prédire la taille et l'organisation spatiale des globules rouges selon différents niveaux d'agrégation, ce qui n'est pas forcément pertinent pour l'utilisation en clinique de la méthode. On démontre que la technique ultrasonore appliquée au sang en conditions d'écoulement physiologique offre un bon contraste entre des états faibles à moyens de l'agrégation érythrocytaire.

Un deuxième point d'innovation de cette étude est le développement d'un cadre théorique d'estimation conjointe de l'atténuation et des paramètres descriptifs du modèle. En clinique, l'atténuation du tissu en amont du vaisseau sanguin et à l'intérieur de celui-ci sont des *a priori* inconnues. En conséquence, les valeurs du BSC et des paramètres des modèles de diffusion sont affectées si l'on ne compense pas ce facteur confondant. L'approche d'estimation conjointe du BSC et de l'atténuation avait été proposée dans des travaux précédents (Franceschini et al. 2008; Nam et al. 2011), mais s'appliquait à des modèles particuliers. L'originalité réside ici en la généralisation du problème en introduisant le concept de « BSC non compensé en atténuation » et, postérieurement, en l'application de la technique à trois nouveaux modèles : les versions mono et poly disperses du modèle EMTSFM et le modèle gaussien appliqué au sang. En particulier, on démontre que cette approche est viable pour des modèles simples, comme le modèle SFSE ou le modèle gaussien, et que les valeurs d'atténuation obtenues sont comparables à ceux trouvés dans la littérature.

8.2.2. Protocole de mesure *in vivo* de l'agrégation érythrocytaire

Dans les travaux reproduits au Chapitre 6, nous adressons la mesure de l'agrégation érythrocytaire *in vivo* pour les humains. Des études précédentes *in vivo* chez le porc (Rouffiac et al. 2004) ont signalé le flux sanguin comme un facteur confondant qui crée des artéfacts de reproductibilité. Cependant, les rares études sur l'agrégation d'érythrocytes chez l'humain ont considéré les effets du flux comme non significatifs (Tripette et al. 2015) ou n'ont pas révélé la signification statistique des résultats (Yu et al. 2005). En contraste, on considère la reproductibilité et la signification clinique de la mesure comme des facteurs déterminants pour le transfert de la technique vers la clinique et on a abordé ces sujets dans ces travaux. Son originalité réside en la volonté de concevoir un protocole reproductible de mesure *in vivo* de l'agrégation érythrocytaire qui tient compte du facteur confondant du flux sanguin et qui peut s'appliquer de façon non invasive chez l'humain. On a démontré que le protocole à flux sanguin réduit permet de trouver des valeurs reproductibles qui corréleront significativement aux tests de laboratoire, telle que la mesure par agrégométrie laser.

Un deuxième point d'innovation est la description empirique de l'allure du BSC sanguin sous les contraintes de forte agrégation érythrocytaire. En effet, la littérature décrit le BSC du sang avec une agrégation érythrocytaire normale (Foster et al. 1994; Yu and Cloutier 2007). D'autres études se basant sur des simulations prédisaient l'apparition de pics d'interférence lorsque les agrégats sont grands, sphériques et monodisperses (Franceschini et al. 2011; Savéry and Cloutier 2005). Dans cette étude, on a décrit empiriquement pour la première fois le BSC du sang de cheval, considéré comme une des espèces animales avec l'agrégation érythrocytaire la plus forte, et de deux patients avec des cadres cliniques d'inflammation chronique. Ces trois cas présentent une agrégation érythrocytaire élevée, comme les tests de laboratoire ont confirmé. Grâce à ces observations, on a décrit pour la première fois l'apparition de ce qu'on a nommé le « point de rupture », une position spectrale où la diffusion de l'onde ne suit plus la loi de Rayleigh, et où on observe un changement de pente spectrale à l'intérieur de la bande passante du transducteur. Ces résultats ont contrasté avec les données de simulation et ont permis de poursuivre le développement de la modélisation théorique en introduisant la polydispersité dans le modèle de milieu effectif EMTSFM. On considère que des études empiriques similaires

guideront le développement de nouveaux modèles et l'application en clinique de la méthode spectrale, tel que discuté à la section 8.3.

8.2.3. Instrumentation clinique

Dans les travaux reproduits au Chapitre 7, on a abordé le sujet de l'utilisation de l'imagerie ultra rapide pour l'analyse spectrale du BSC. Ce sujet avait déjà été traité dans les travaux de (Lavarello 2013) et (Salles et al. 2014). Cependant, ces travaux avaient été développés dans le cadre de simulations et de validation avec des fantômes. L'originalité de nos travaux réside en l'application de cette technique à des tissus *ex vivo*, notamment le sang, et à l'application de la méthode ultra rapide avec un appareil clinique, tel l'Ultrasonix. Ces travaux nous ont permis de corroborer la validité de la technique du fantôme de référence pour l'estimation du BSC, peu importe la méthode d'imagerie utilisée, soit focalisé ou par ondes planes. Également, il rapproche la théorie spectrale de l'agrégation érythrocytaire à l'équipement couramment utilisé en clinique, ce qui peut faciliter le transfert de la technologie. Finalement, l'estimation du BSC avec l'imagerie à haute cadence habilite l'analyse spectrale d'évènements transitoires, par exemple, le changement temporel de structure d'un tissu lors du passage d'une onde de cisaillement, ce qui a un intérêt qui mérite d'être développé dans le futur.

Un autre point innovant de ces travaux est l'utilisation des images angulées avant la reconstruction avec la technique de « *delay and sum* » pour l'évaluation de l'anisotropie du tissu. Grâce aux expériences avec le sang, on a observé une dépendance de la taille estimée du diffuseur à l'angle d'orientation du faisceau. On a expliqué ce phénomène comme une conséquence de l'orientation des globules rouges lors de l'écoulement du sang, ce qui coïncide avec des observations précédentes de la littérature (Qin et al. 1998). La caractérisation de l'anisotropie d'un tissu va au-delà de la détection de l'agrégation érythrocytaire. Elle explique les changements d'atténuation lors de l'insonification à plusieurs angles dans les muscles et peut servir à la détection de maladies du myocarde. Sur cet aspect, grâce à la forte cadence d'acquisition, cette technique d'évaluation de l'anisotropie pourrait être considérée dans l'imagerie multimodale pour l'évaluation du tissu cardiaque

8.3. Travaux futurs

Dans cette thèse, on a proposé et validé plusieurs technologies pour la mesure de l'agrégation érythrocytaire *in vivo* qui l'approchent de l'utilisation en clinique. Cependant, il y a d'autres améliorations et défis qui sont à prévoir.

8.3.1. Vers l'application en soins intensifs et à l'urgence

Miniaturisation de l'équipement

Une première contrainte fonctionnelle pour l'implantation de la méthode en clinique est la taille de l'équipement requis dans la version actuelle. En effet, dans les salles de chirurgie, de soins intensifs ou à l'urgence, l'espace est limité. Pour cette raison uniquement l'instrumentation vitale est permise. Le montage actuel pour la mesure ultrasonore utilise deux ordinateurs, un pour l'acquisition ultrasonore et un autre pour le traitement du signal, ainsi qu'un support pour immobiliser le transducteur. En plus, il requiert qu'un avant-bras du patient soit dédié pour l'installation du garrot et la fixation de la sonde. Ainsi, dans son état actuel, l'instrumentation est trop encombrante pour pouvoir commencer une étude pilote chez des patients en milieu clinique d'urgence.

Deux stratégies de solution à la taille de l'équipement ont été envisagées au sein de notre laboratoire. La première est l'utilisation de sondes ultrasonores intraveineuses (cathéters), de façon non invasive. En appliquant ce type de sonde sur la peau, il est possible de créer une image longitudinale d'une veine superficielle (c.-à-d., la veine antébrachiale dans l'avant-bras). Le principal avantage de ce type de sonde est de permettre la mobilité du patient. Cependant, l'analyse spectrale avec cet instrument a démontré être un défi. D'abord, le rapport signal sur bruit des images avec la configuration non invasive est faible, ce qui désavantage la segmentation automatique des images et l'extraction de paramètres. Également, la fragilité de la sonde fait que la fonction de transfert de l'instrument est variable, ce qui oblige la calibration fréquente de l'appareil sur des fantômes de référence. Le coût pourrait également être un frein à cette approche (plusieurs centaines de dollar par cathéter).

Une deuxième stratégie pour réduire la taille de l'équipement est d'utiliser des transducteurs CMUT (*capacitive micromachine ultrasound transducer*) pour construire un

bracelet de mesure. Le CMUT est un type de transducteur qui ne se base pas sur l'effet piézoélectrique pour induire une onde ultrasonore, mais sur le changement de capacitance. Son principal avantage est qu'il peut être micro fabriqué sur des plaques et ainsi des centaines ou de milliers d'éléments peuvent être combinés pour former le faisceau. Cette technologie est en train de se développer par notre laboratoire en alliance avec le laboratoire du professeur Frédéric Lesage de l'École Polytechnique de Montréal.

Un bracelet d'éléments CMUT suppose plusieurs avantages pour la mesure. D'abord, il n'est plus nécessaire que le patient soit immobilisé pendant la mesure, parce que l'instrument bouge avec le cadre de référence (*c.-à-d.* le bras ou la jambe du patient). L'utilisation de plusieurs éléments permettra la formation du faisceau ce qui permettra d'améliorer la qualité de l'image à plusieurs profondeurs. En plus, la localisation de la veine, qui se faisait de façon manuelle pour la sonde intraveineuse, pourra s'automatiser en utilisant des méthodes de traitement d'image ou d'apprentissage machine. Finalement, la bande passante des transducteurs CMUT est plus large que celles des éléments piézoélectriques. Ceci permettra d'améliorer la description du BSC du sang et l'ajustement des modèles théoriques.

À plus long terme, l'utilisation des bracelets CMUT en combinaison avec des processeurs mobiles, permettra de ne pas limiter l'analyse de l'agrégation érythrocytaire à la clinique, mais de l'étendre à la science sportive. En effet, le changement de la rhéologie sanguine pendant l'exercice est un sujet de recherche très populaire dans la communauté rhéologique. Cependant, ces études se limitent à l'analyse d'échantillons après l'effort physique, ce qui néglige la dynamique *in vivo*. Un instrument de mesure portable permettrait finalement d'analyser les effets macro-rhéologiques de l'agrégation érythrocytaire.

Désagrégation *in vivo*

Au Chapitre 6, on a proposé deux approches pour garantir une mesure *in vivo* de l'agrégation érythrocytaire: soit réduire le flux sanguin à une vitesse normalisée ou bien l'arrêter pour ensuite désagréger l'échantillon, à la manière des agrégomètres laser retrouvés dans quelques laboratoires de recherche. Pour une mesure *in vivo*, la deuxième option implique l'application d'un garrot pour l'arrêt de l'écoulement et d'un stimulateur externe qui applique une contrainte mécanique à l'intérieur de la veine. Une première option pour avoir cet effet

désagrégant est d'appliquer un *secoueur* sur le bras du patient (Yu et al. 2005). Le secoueur écrase et libère la veine à plusieurs reprises. Ce mouvement crée un flux de va-et-vient de l'échantillon sanguin à l'intérieur de la veine. La vitesse de ce flux cause un fort taux de cisaillement et provoque la désagrégation de l'échantillon. Cependant, l'instrumentation requise pour le protocole de flux arrêté est double, car il requiert un garrot ou un bracelet pour arrêter le flux et un dispositif avec la puissance nécessaire pour écraser la veine. Pour cette raison, ce protocole n'a pas été inclus au Chapitre 6.

Une alternative pour appliquer le protocole à flux arrêté est d'utiliser la même sonde d'imagerie comme source d'écoulement contrôlé. Une première preuve de concept faite à notre laboratoire et utilisant une sonde monoélément et une excitation Doppler montre qu'il est possible de créer des courants de flux à l'intérieur de la veine et que ceci peut avoir un effet désagrégant. Cependant, il reste à développer un cadre théorique pour connaître la vitesse et le cisaillement requis pour une désagrégation complète selon plusieurs niveaux d'agrégation érythrocytaire et selon le diamètre de la veine. Un tel développement permettra de réduire l'instrumentation requise à un garrot et à un transducteur ultrasonore. En plus, ceci permettrait de mettre en place le protocole à flux arrêté ce qui aurait comme effet d'augmenter la répétabilité et de réduire la variabilité des mesures.

Automatisation de la mesure

Dans l'état actuel, le protocole de mesure à flux réduit requiert une lecture en temps réel de la vitesse du flux sanguin et l'ajustement manuel par un opérateur d'un bracelet de compression à haute précision pour son contrôle. Cependant, nos observations suggèrent que la pression requise pour garder une vitesse du flux constante varie avec le temps. Des facteurs comme le rythme cardiaque ou la fréquence respiratoire peuvent affecter la vitesse du flux. Pour obtenir une vitesse constante, l'opérateur doit surveiller la vitesse actuelle et ajuster la pression du garrot tout le long de la stabilisation du flux et pendant l'acquisition ultrasonore.

Une amélioration de la technique consiste à développer un mécanisme d'ajustement de la pression appliquée au bracelet pour garder une vitesse constante. Dans l'état actuel, la mesure en temps réel de la vitesse se fait en utilisant des méthodes de vélocimétrie par images de particules (PIV), comme décrit à l'Annexe A. Le contrôle se fait par une seringue de pression

avec une poignée tournante de précision. La tâche consiste à alimenter le système de la vitesse lue et d'ajuster la pression afin de conserver une vitesse ciblée par l'opérateur. Ce système aiderait à améliorer la reproductibilité des mesures et l'automatisation de la lecture pour la surveillance de patients sans l'implication d'opérateurs humains.

Atlas ultrasonore de l'agrégation érythrocytaire

Un obstacle pour le transfert technologique vers la clinique est la taille limitée des données *in vivo* disponibles pour analyse. L'analyse spectrale adoptée par notre laboratoire se base à la fois sur l'évidence empirique des changements du BSC sanguin et sur un modèle physique qui le décrit. Pour la construction des modèles, notre laboratoire a adopté l'approche analytique, en se basant sur la physique acoustique du sang. Une autre alternative est de se baser entièrement sur l'évidence empirique. Pour avoir accès aux données expérimentales, la communauté scientifique (incluant notre laboratoire) utilise des modèles animaux ou des échantillons sanguins avec une agrégation augmentée artificiellement. Cependant, on n'a pas de garanties que ces échantillons représentent les états d'agrégation qu'on retrouvera en clinique. D'une part, les globules rouges porcins, utilisés couramment, sont plus petits que ceux des humains et montrent une agrégation légèrement plus élevée que l'humaine (Windberger et al. 2003). D'autre part, les méthodes artificielles d'augmentation de l'agrégation ne répliquent pas la dynamique physiologique d'un organisme ni ne peuvent simuler toutes les variables imposées par le réseau vasculaire.

Pour s'approcher de la détection de l'inflammation, il est nécessaire de bâtir une base de données de spectres incluant à la fois des sujets sains et des sujets pathologiques à plusieurs degrés de sévérité. Le protocole de mesure non invasive proposé dans cette thèse permettra d'aller de l'avant avec la collection de données chez l'humain. La tâche extraordinaire de récolte d'information a déjà commencé : tout le long de ces travaux de thèse, on a récolté et analysé plus de 1200 échantillons sanguins venant de différentes espèces, notamment ceux de 80 volontaires humains, et en employant différents traitements et sous différentes conditions d'agrégation. En utilisant ces données déjà disponibles et celles de nouveaux volontaires sains, notre laboratoire commence cet effort de construction. Une deuxième cohorte qui peut être envisagée avec l'instrumentation actuelle est composée de patients atteints d'insuffisance

cardiaque. Ce groupe de patients a souvent des inflammations systémiques qui peuvent être caractérisées à l'aide des ultrasons. La caractéristique de cette cohorte est que ces patients ne sont pas hospitalisés. En conséquence, ils peuvent se rendre aux salles où les instruments actuels seront préinstallés. Quand l'instrumentation le permettra, des cohortes de patients avec septicémie, choc septique et ou ayant subis une chirurgie cardiaque seront ajoutées à l'atlas pour compléter le spectre d'agrégation sous l'influence d'inflammation.

Un atlas de l'agrégation permettra d'évaluer plus précisément la sensibilité et la spécificité de la méthode. En plus, l'atlas permettra d'envisager une approche alternative de modélisation de données basée sur l'utilisation d'algorithmes issus de l'apprentissage machine. Également, l'atlas guidera aussi le développement de modèles théoriques qui expliquent le BSC du sang lors de l'agrégation. Finalement, l'atlas permettra d'évaluer si la technique ultrasonore pour les mesures de l'agrégation permet une distinction de l'inflammation aseptique de celle causée par des infections (septicémie).

8.3.2. Au-delà de la détection de l'inflammation

L'augmentation de l'agrégation érythrocytaire peut causer la formation de thrombus veineux, comme l'a démontré l'étude de (Yu et al. 2011). La physiopathologie de cette correspondance peut s'expliquer par l'augmentation de la viscosité du sang fortement agrégé. Ainsi, la contrainte de cisaillement exercé par le sang augmente et peut endommager les parois vasculaires. Également, en régions du système vasculaire où le gradient de pression à l'origine du flux sanguin est bas, du sang très visqueux peut occasionner de la stase. Ces facteurs sont décrits par la triade de Virchow (Bagot and Arya 2008) comme des aspects favorisant la formation de thrombus (c.-à-d., l'hypercoagulabilité, la stase et la lésion endothéliale).

L'imagerie ultrasonore est déjà un instrument essentiel pour la détection et le diagnostic de la thrombose veineuse. Cependant, en utilisant l'évaluation ultrasonore de l'agrégation érythrocytaire, il serait possible d'ajouter la capacité de prédiction aux endroits de l'arbre vasculaire susceptibles de former des thrombus. En effet, il est théoriquement possible de corréler le niveau d'agrégation érythrocytaire au niveau de viscosité du sang. En connaissant le profil des vitesses du sang dans une veine, il est possible de calculer le taux de cisaillement subi à chaque position de la lumière vasculaire. En utilisant l'imagerie paramétrique de l'agrégation

érythrocytaire, il est possible de signaler le niveau d'agrégation à chaque position. En modélisant la viscosité comme une fonction de l'agrégation et du cisaillement, il serait théoriquement possible de trouver une relation avec les résultats de viscosimétrie.

En combinant la viscosité par position de l'image avec des techniques de PIV, pour détecter des anomalies du flux (comme les turbulences), et l'imagerie classique, pour la détection de lésions, il serait possible d'estimer un index de probabilité de formation de thrombus. Cet outil pourrait guider le traitement préventif des patients devant subir de longs alitements et ainsi améliorer leur surveillance.

8.4. Conclusion générale

La rhéologie sanguine a été utilisée pour près d'un siècle pour le diagnostic de l'inflammation. L'effet des protéines inflammatoires sur l'agrégation des érythrocytes est à la base de cette méthodologie. L'étude de la rhéologie sanguine par ultrasons ouvre la porte au diagnostic non invasif et en temps réel de l'inflammation et, plus généralement, à des thématiques de recherche qui s'intéressent aux implications de la circulation sanguine *in vivo*.

C'est avec cette perspective qu'on a proposé et validé dans cette thèse des méthodologies ultrasonores transférables en clinique pour l'évaluation de l'agrégation érythrocytaire chez l'humain. Néanmoins, il reste encore plusieurs pistes de solution et des questions à répondre sur la physique fondamentale du phénomène et l'amélioration de la répétabilité de la mesure. Les années à suivre sont sans doute une période très excitante pour la recherche expérimentale en clinique dans l'aire conjointe de la rhéologie et des ultrasons.

Bibliographie

- Anderson JJ, Herd M-T, King MR, Haak A, Hafez ZT, Song J, Oelze ML, Madsen EL, Zagzebski JA, O'Brien WD. Interlaboratory comparison of backscatter coefficient estimates for tissue-mimicking phantoms. *Ultrason. Imaging* 2010;32:48-64.
- Armstrong J, Wenby R, Meiselman H, Fisher T. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. *Biophys. J.* 2004;87:4259-70.
- Arthur J, Luciano D-S. Human physiology. The mechanisms of body function. 2000.
- Arwatz G, Smits A. A viscoelastic model of shear-induced hemolysis in laminar flow. *Biorheology* 2013;50:45-55.
- Avlonitis VS, Wigfield CH, Kirby JA, Dark JH. The hemodynamic mechanisms of lung injury and systemic inflammatory response following brain death in the transplant donor. *Am. J. Transplantation* 2005;5:684-93.
- Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: A question of attribution. *Br. J. Haematol.* 2008;143:180-90.
- Baskurt O, Boynard M, Cokelet G, Connes P, Cooke BM, Forconi S, Liao F, Hardeman M, Jung F, Meiselman H. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2009;42:75-97.
- Baskurt O, Neu B, Meiselman HJ. Red blood cell aggregation. Boca Raton: CRC Press, 2011a.
- Baskurt O, Neu B, Meiselman HJ. Effect of red blood cell aggregation on in vitro blood rheology. *Red blood cell aggregation*. Boca Raton: CRC Press, 2011b. pp. 133-54.
- Baskurt O, Neu B, Meiselman HJ. Measurement of red blood cell aggregation. *Red blood cell aggregation*. Boca Raton: CRC Press, 2011c. pp. 63-132.
- Baskurt O, Neu B, Meiselman HJ. Determinants of red cell aggregation. *Red blood cell aggregation*. Boca Raton: CRC Press, 2011d. pp. 4-30.
- Baskurt O, Neu B, Meiselman HJ. Comparative aspects of red blood cell aggregation. *Red blood cell aggregation*. Boca Raton: CRC Press, 2011e. pp. 269-88.
- Baskurt OK, Meiselman H, Kayar E. Measurement of red blood cell aggregation in a "plate-plate" shearing system by analysis of light transmission. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1998;19:307-14.
- Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW. Handbook of hemorheology and hemodynamics: IOS press, 2007.
- Baskurt OK, Uyklu M, Meiselman HJ. Time course of electrical impedance during red blood cell aggregation in a glass tube: Comparison with light transmittance. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2010;57:969-78.
- Berliner S, Rogowski O, Aharonov S, Mardi T, Tolshinsky T, Rozenblat M, Justo D, Deutsch V, Serov J, Shapira I. Erythrocyte adhesiveness/aggregation: A novel biomarker for the detection of low-grade internal inflammation in individuals with atherothrombotic risk factors and proven vascular disease. *Am. Heart J.* 2005;149:260-67.
- Bigelow TA, O'Brien WD. Evaluation of the spectral fit algorithm as functions of frequency range and $(\Delta(\kappa.A))_{eff}$. *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Control* 2005;52:2003-10.
- Bishop CM. Fisher's linear discriminant. *Neural networks for pattern recognition*. New York: Oxford university press, 1995. pp.

- Bushberg JT, Leidholdt EM, Seibert AJ, Boone JM. Ultrasound imaging. *The essential physics of medical imaging*: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. pp. 469-554.
- Chien S, Usami S, Dellenback RJ, Gregersen MI, Nanninga LB, Guest MM. Blood viscosity: Influence of erythrocyte aggregation. *Science* 1967;157:829-31.
- Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, Maeda N. Changes of rbc aggregation in oxygenation-deoxygenation: Ph dependency and cell morphology. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;284:H2335-H42.
- Cloutier G, Shung K. Study of red cell aggregation in pulsatile flow from ultrasonic doppler power measurements. *Biorheology* 1992;30:443-61.
- Cloutier G, Zimmer A, Yu FTH, Chiasson J-L. Increased shear rate resistance and fastest kinetics of erythrocyte aggregation in diabetes measured with ultrasound. *Diabetes Care* 2008;31:1400-02.
- De Kroon M, Slager C, Gussenhoven WJ, Serruys P, Roelandt J, Bom N. Cyclic changes of blood echogenicity in high-frequency ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 1991;17:723-28.
- de Monchy R. 2016 Développement et évaluation d'une théorie de milieu effectif combinée à un facteur de structure polydisperse pour la caractérisation ultrasonore de l'agrégation érythrocytaire. *Ecole doctorale Sciences pour l'ingénieur*: Université Aix-Marseille, 163.
- de Monchy R, Chayer B, Cloutier G, Franceschini E. 2016a Effective medium theory combined with a polydisperse structure factor model for characterizing red blood cell aggregation. *International Ultrasonics Symposium (IUS)*. IEEE.
- de Monchy R, Destremes F, Saha RK, Cloutier G, Franceschini E. Coherent and incoherent ultrasound backscatter from cell aggregates. *J. Acoust. Soc. Am.* 2016b;140:2173-84.
- Destremes F, Franceschini E, Yu FTH, Cloutier G. Unifying concepts of statistical and spectral quantitative ultrasound techniques. *IEEE Trans. Med. Imaging* 2016;35:488-500.
- Dobbe JG, Streekstra GJ, Strackee J, Rutten MC, Stijnen JM, Grimbergen CA. Sylllectometry: The effect of aggregometer geometry in the assessment of red blood cell shape recovery and aggregation. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2003;50:97-106.
- Epstein FH, Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 1999;340:448-54.
- Fåhræus R. The suspension stability of the blood. *Physiol. Rev.* 1929;9:241-74.
- Faran Jr JJ. Sound scattering by solid cylinders and spheres. *J. Acoust. Soc. Am.* 1951;23:405-18.
- Fernandes Jr CJ. The future has arrived. *Crit. Care Med.* 2013;41:2062-63.
- Fontaine I, Bertrand M, Cloutier G. A system-based approach to modeling the ultrasound signal backscattered by red blood cells. *Biophys. J.* 1999;77:2387-99.
- Fontaine I, Cloutier G. Modeling the frequency dependence (5–120 mhz) of ultrasound backscattering by red cell aggregates in shear flow at a normal hematocrit. *J. Acoust. Soc. Am.* 2003;113:2893.
- Foster F, Obara H, Bloomfield T, Ryan L, Lockwood G. 1994 Ultrasound backscatter from blood in the 30 to 70 mhz frequency range. *International Ultrasonics Symposium (IUS)*. IEEE, 1599-602.
- Franceschini E, Yu FTH, Cloutier G. Simultaneous estimation of attenuation and structure parameters of aggregated red blood cells from backscatter measurements. *J. Acoust. Soc. Am.* 2008;123:EL85-EL91.

- Franceschini E, Yu FTH, Destrempes F, Cloutier G. Ultrasound characterization of red blood cell aggregation with intervening attenuating tissue-mimicking phantoms. *J. Acoust. Soc. Am.* 2010;127:1104-15.
- Franceschini E, Metzger B, Cloutier G. Forward problem study of an effective medium model for ultrasound blood characterization. *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Control* 2011;58:2668-79.
- Franceschini E, Cloutier G. Modeling of ultrasound backscattering by aggregating red blood cells, In: Mamou J and Oelze ML, eds. *Quantitative ultrasound in soft tissues*. Dordrecht, Heilderlberg, New York, London: Springer, 2013. pp. 117-45.
- Franceschini E, Saha RK, Cloutier G. Comparison of three scattering models for ultrasound blood characterization. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 2013;60:2321-34.
- Fromageau J, Gennisson J-L, Schmitt C, Maurice RL, Mongrain R, Cloutier G. Estimation of polyvinyl alcohol cryogel mechanical properties with four ultrasound elastography methods and comparison with gold standard testings. *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Control* 2007;54.
- Garcia-Duitama J, Chayer B, Han A, Garcia D, Oelze ML, Cloutier G. Experimental application of ultrafast imaging to spectral tissue characterization. *Ultrasound Med. Biol.* 2015;41:2506-19.
- Garcia-Duitama J, Chayer B, Goussard Y, Cloutier G. 2016 Segmentation of blood layers with particle image velocimetry (piv) for reproducible *in vivo* characterization of erythrocyte aggregation. *International Ultrasonics Symposium (IUS)*. IEEE.
- Garcia-Duitama J, Chayer B, Garcia D, Goussard Y, Cloutier G. A protocol for robust *in vivo* measurements of erythrocyte aggregation using ultrasound spectroscopy. *Ultrasound Med. Biol.* Dec 2017;vol 43:pp 2871-81.
- Garcia D. A fast all-in-one method for automated post-processing of piv data. *Exp. Fluids* 2011;50:1247-59.
- Garcia D, Tarnec L, Muth S, Montagnon E, Cloutier G. Stolt's fk migration for plane wave ultrasound imaging. *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on* 2013;60:1853-67.
- Griffith W, Triolo R, Compere A. Analytical scattering function of a polydisperse percus-yevick fluid with schulz-(γ -) distributed diameters. *Physical Review A* 1987;35:2200.
- Hawkey C, Bennett P, Gascoyne S, Hart M, Kirkwood J. Erythrocyte size, number and haemoglobin content in vertebrates. *Br. J. Haematol.* 1991;77:392-97.
- Hirai S. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003;9:365-70.
- Huygens C. *Traité de la lumière: Ou sont expliquées les causes de ce qui luy arrive dans la reflexion, et dans la refraction et particulierement dans l'etrange refraction du cristal d'islande; avec un discours de la cause de la pesanteur*. Paris: Académie des sciences de Paris, 1690.
- Insana MF, Brown DG. Acoustic scattering theory applied to soft biological tissues, In: Shung KK and Thieme GA, eds. *Ultrasonic scattering in biological tissues*. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press, 1993. pp. 75-124.
- Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2015;372:1629-38.

- Lacerda FH, Nunes JT, Júnior JAdCM, Park M. Routine ultrasound-guided central venous access catheterization: A window to new findings! *J. Crit. Care* 2017;37:262-63.
- Lavarello R, Oelze M. Quantitative ultrasound estimates from populations of scatterers with continuous size distributions. *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on* 2011;58:744-53.
- Lavarello R, Oelze M. Quantitative ultrasound estimates from populations of scatterers with continuous size distributions: Effects of the size estimator algorithm. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control* 2012;59:2066-76.
- Lavarello RJ. 2013 Estimation of quantitative ultrasound parameters derived from backscatter coefficients using plane wave compounding—a comparative simulation study. *Ultrasonics Symposium (IUS), 2013 IEEE International*. IEEE, 421-24.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent J-L, Ramsay G. 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Intensive Care Med.* 2003;29:530-38.
- Mamou J, Rohrbach D, Saegusa-Beecorff E, Machi J. 500-mhz scanning acoustic microscopy of cancerous human lymph nodes. *J. Acoust. Soc. Am.* 2016;140:3187-87.
- Mo LY, Cobbold RS. Theoretical models of ultrasonic scattering in blood. *Ultrasonic scattering in biological tissues* 1993:125-70.
- Montaldo G, Tanter M, Bercoff J, Benech N, Fink M. Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography. *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on* 2009;56:489-506.
- Morse PM, America ASo, Physics AIo. *Vibration and sound: McGraw-Hill New York*, 1948.
- Nagelkerke NJ. A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika* 1991;78:691-92.
- Nam K, Zagzebski JA, Hall TJ. Simultaneous backscatter and attenuation estimation using a least squares method with constraints. *Ultrasound Med. Biol.* 2011;37:2096-104.
- Nam K, Zagzebski JA, Hall TJ. Quantitative assessment of *in vivo* breast masses using ultrasound attenuation and backscatter. *Ultrason. Imaging* 2013;35:146-61.
- Neumann F-J, Schmid-Schönbein H, Ohlenbusch H. Temperature-dependence of red cell aggregation. *Pflügers Archiv* 1987;408:524-30.
- Newton I. A letter of mr. Isaac newton, professor of the mathematicks in the university of cambridge; containing his new theory about light and colors: Sent by the author to the publisher from cambridge, febr. 6. 1671/72; in order to be communicated to the r. Society. *Philosophical Transactions (1665-1678)* 1672;6:3075-87.
- Nguyen LC, Yu FTH, Cloutier G. Cyclic changes in blood echogenicity under pulsatile flow are frequency dependent. *Ultrasound Med. Biol.* 2008;34:664-73.
- O'Donnell M, Miller J. Quantitative broadband ultrasonic backscatter: An approach to nondestructive evaluation in acoustically inhomogeneous materials. *Journal of Applied Physics* 1981;52:1056-65.
- Oelze ML, O'Brien Jr WD. Frequency-dependent attenuation-compensation functions for ultrasonic signals backscattered from random media. *J. Acoust. Soc. Am.* 2002;111:2308-19.
- Oelze ML, O'Brien Jr WD. Application of three scattering models to characterization of solid tumors in mice. *Ultrason. Imaging* 2006;28:83-96.

- Oelze ML, Mamou J. Review of quantitative ultrasound: Envelope statistics and backscatter coefficient imaging and contributions to diagnostic ultrasound. *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Control* 2016;63:336-51.
- Oran Brigham E. The fast fourier transform and its applications. UK: Prentice Hall 1988.
- Pop G, De Backer T, de Jong M, Struijk P, Moraru L, Chang Z, Goovaerts H, Slager C, Bogers A. On-line electrical impedance measurement for monitoring blood viscosity during on-pump heart surgery. *Eur. Surg. Res.* 2004;36:259-65.
- Pop GA, Bisschops LL, Iliev B, Struijk PC, van der Hoeven JG, Hoedemaekers CW. On-line blood viscosity monitoring *in vivo* with a central venous catheter, using electrical impedance technique. *Biosens. Bioelectron.* 2013;41:595-601.
- Porée J. Évaluation de la biomécanique cardiovasculaire par élastographie ultrasonore non-invasive. 2017.
- Prince JL, Links JM. The physics of ultrasound. *Medical imaging signals and systems*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2006. pp. 335-66.
- Qin Z, Durand L-G, Cloutier G. Kinetics of the “black hole” phenomenon in ultrasound backscattering measurements with red blood cell aggregation. *Ultrasound Med. Biol.* 1998;24:245-56.
- Raja SG, Dreyfus GD. Modulation of systemic inflammatory response after cardiac surgery. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals* 2005;13:382-95.
- Rampling MW. Compositional properties of blood, In: Baskurt O, Hardeman M, Rampling MW, and Meiselman H, eds. *Handbook of hemorheology and hemodynamics*. Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington, DC: IOS Press, 2007. pp. 11.
- Reggiori G, Occhipinti G, De Gasperi A, Vincent J-L, Piagnerelli M. Early alterations of red blood cell rheology in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 2009;37:3041-46.
- Rouffiac V, Guglielmi J-P, Barbet A, Lassau N, Peronneau P. Application of validated ultrasound indices to investigate erythrocyte aggregation in pigs. Preliminary *in vivo* results. *Ultrasound Med. Biol.* 2004;30:35-44.
- Saha RK, Franceschini E, Cloutier G. Assessment of accuracy of the structure-factor-size-estimator method in determining red blood cell aggregate size from ultrasound spectral backscatter coefficient. *J. Acoust. Soc. Am.* 2011;129:2269-77.
- Salles S, Liebgott H, Basset O, Cachard C, Vray D, Lavarello R. Experimental evaluation of spectral-based quantitative ultrasound imaging using plane wave compounding. *Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, IEEE Transactions on* 2014;61:1824-34.
- Sanchez JR, Pocci D, Oelze ML. A novel coded excitation scheme to improve spatial and contrast resolution of quantitative ultrasound imaging. *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on* 2009;56:2111-23.
- Sanchez JR. 2010 Improving ultrasonic imaging using novel coded excitation techniques: University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Savéry D, Cloutier G. Effect of red cell clustering and anisotropy on ultrasound blood backscatter: A monte carlo study. *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on* 2005;52:94-103.
- Savéry D, Cloutier G. A point process approach to assess the frequency dependence of ultrasound backscattering by aggregating red blood cells. *J. Acoust. Soc. Am.* 2001;110:3252.

- Scheipers U. Ultrasonic tissue characterization, In: Ukimura O and Gill I, eds. *Contemporary interventional ultrasonography in urology*. London: Springer London, 2009. pp. 143-77.
- Shehada R, Cobbold R, Mo L. Aggregation effects in whole blood: Influence of time and shear rate measured using ultrasound. *Biorheology* 1993;31:115-35.
- Shung KK, Sigelmann RA, Reid JM. Scattering of ultrasound by blood. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1976;460-67.
- Shung KK. On the ultrasound scattering from blood as a function of hematocrit. *IEEE Trans. Sonics Ultrason.* 1982;29:327-30.
- Shung KK. Methods for measuring speed, attenuation, absorption, and scattering. *Diagnostic ultrasound: Imaging and blood flow measurements*: CRC press, 2005. pp. 185-202.
- Sigel B, Machi J, Beitler J, Justin J. Red cell aggregation as a cause of blood-flow echogenicity. *Radiology* 1983;148:799-802.
- Strutt JW. Xv. On the light from the sky, its polarization and colour. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 1871;41:107-20.
- Szabo TL. *Diagnostic ultrasound imaging: Inside out*: Academic Press, 2004.
- Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: Systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases* 2007;7:210-17.
- Tripette J, Denault AY, Allard L, Chayer B, Perrault LP, Cloutier G. Ultrasound monitoring of rbc aggregation as a real-time marker of the inflammatory response in a cardiopulmonary bypass swine model. *Crit. Care Med.* 2013;41:e171-8.
- Tripette J, Nguyen L-C, Allard L, Robillard P, Soulez G, Cloutier G. *In vivo* venous assessment of red blood cell aggregate sizes in diabetic patients with a quantitative cellular ultrasound imaging method: Proof of concept. *PloS one* 2015;10:1-12.
- Twersky V. Low-frequency scattering by correlated distributions of randomly oriented particles. *J. Acoust. Soc. Am.* 1987;81:1609-18.
- van der Heiden MS, de Kroon MG, Bom N, Borst C. Ultrasound backscatter at 30 mhz from human blood: Influence of rouleau size affected by blood modification and shear rate. *Ultrasound Med. Biol.* 1995;21:817-26.
- Wang S-H, Shung KK. An approach for measuring ultrasonic backscattering from biological tissues with focused transducers. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1997;44:549-54.
- Wartier DC, Laffey JG, Boylan JF, Cheng DC. The systemic inflammatory response to cardiac surgery implications for the anesthesiologist. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 2002a;97:215-52.
- Wartier DC, Laffey JG, Boylan JF, Cheng DC. The systemic inflammatory response to cardiac surgery: Implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 2002b;97:215-52.
- Welch PD. The use of fast fourier transform for the estimation of power spectra: A method based on time averaging over short, modified periodograms. *IEEE Transactions on audio and electroacoustics* 1967;15:70-73.
- Weng X, Cloutier G, Beaulieu R, Roederer G. Influence of acute-phase proteins on erythrocyte aggregation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1996a;271:H2346-H52.
- Weng X, Cloutier G, Pibarot P, Durand L-G. Comparison and simulation of different levels of erythrocyte aggregation with pig, horse, sheep, calf, and normal human blood. *Biorheology* 1996b;33:365-77.

- Wertheim M. Exact solution of the percus-yevick integral equation for hard spheres. *Phys. Rev. Lett.* 1963;10:321-23.
- Windberger U, Bartholovitsch A, Plasenzotti R, Korak K, Heinze G. Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: Reference values and comparison of data. *Exp. Physiol.* 2003;88:431-40.
- Yao LX, Zagzebski JA, Madsen EL. Backscatter coefficient measurements using a reference phantom to extract depth-dependent instrumentation factors. *Ultrason. Imaging* 1990;12:58-70.
- Young T. The bakerian lecture: Experiments and calculations relative to physical optics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 1804;94:1-16.
- Yu FTH, Gennisson J-L, Cloutier G. 2005 A new method to assess the kinetics of rouleaux formation in human subcutaneous veins using high frequency parametric imaging: Preliminary results. *International Ultrasonics Symposium (IUS)*. IEEE, 870-73.
- Yu FTH, Cloutier G. Experimental ultrasound characterization of red blood cell aggregation using the structure factor size estimator. *J. Acoust. Soc. Am.* 2007;122:645-56.
- Yu FTH, Franceschini É, Chayer B, Armstrong JK, Meiselman HJ, Cloutier G. Ultrasonic parametric imaging of erythrocyte aggregation using the structure factor size estimator. *Biorheology* 2009;46:343-63.
- Yu FTH, Armstrong JK, Tripette J, Meiselman HJ, Cloutier G. A local increase in red blood cell aggregation can trigger deep vein thrombosis: Evidence based on quantitative cellular ultrasound imaging. *J. Thromb. Haemost.* 2011;9:481-8.
- Yuan Y, Shung K. Ultrasonic backscatter from flowing whole blood. I: Dependence on shear rate and hematocrit. *J. Acoust. Soc. Am.* 1988;84:52-58.
- Zhang M, Varray F, Besson A, Carrillo RE, Viallon M, Garcia D, Thiran J-P, Friboulet D, Liebgott H, Bernard O. Extension of fourier-based techniques for ultrafast imaging in ultrasound with diverging waves. *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelect., Freq. Control* 2016;63:2125-37.
- Zhao H, Wang X, Stoltz J. Comparison of three optical methods to study erythrocyte aggregation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1999;21:297-302.
- Zimmer A. 2002 Comparaison du niveau d'agrégation érythrocytaire mesuré par rétrodiffusion ultrasonore chez de sujets sains et diabétiques. *Institut de génie biomédical, Faculté de médecine*. Montreal: University of Montreal, 128.

Annexe A

Articles de conference

Experimental validation of plane wave imaging using k-space beamforming for spectral characterization of isotropic media

Julian Garcia-Duitama,^{*†} Aiguo Han,[†] Boris Chayer,^{*} Damien Garcia,^{*‡§} Michael L. Oelze,[†] Guy Cloutier^{*§}
^{*} Laboratory of Biorheology and Medical Ultrasonics, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), Montreal, Quebec, Canada; [†] Bioacoustics Research Laboratory, Department of Electrical and Computer Engineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA; [‡] Research Unit of Biomechanics & Imaging in Cardiology, CRCHUM, Montreal, Quebec, Canada; [§] Department of Radiology, Radio-Oncology and Nuclear Medicine and Institute of Biomedical Engineering, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Abstract— The central concept of spectral tissue characterization is the backscatter coefficient (BSC). Due to its stochastic characteristic, it is often necessary to employ temporal averaging to obtain a coherent estimate. Thus, the acquisition rate plays a role in the characterization of fast moving tissues, such as arterial blood and cardiac walls. Plane wave imaging (PWI) presents a means to reduce BSC variability as it allows the acquisition of thousands of frames per second with sustained image quality over the entire field of view. However, the steering needed to increase the image quality of PWI can modify the spectral content of anisotropic tissues. Therefore, during the compounding process, different spectra are combined producing a biased BSC. Nonetheless, we hypothesized that in isotropic media, this drawback can be cancelled using the instrumentation compensation method (*e.g.*, the reference phantom technique). We experimentally evaluated this hypothesis by estimating the BSC of a tissue mimicking phantom using PWI and compared it to data obtained with a single-element transducer. Our results suggest that PWI can produce accurate estimates of the BSC under isotropic conditions with percentage errors below 10%. These results indicate that the reference phantom technique effectively compensates for the effects of the compounding process in PWI for isotropic tissues.

Keywords—Quantitative ultrasound imaging, backscatter coefficient, plane wave imaging

I. INTRODUCTION

Spectral methods have been used for more than 30 years for acoustic tissue characterization. Its pertinence in clinical applications has been demonstrated several times [1-3]. The central concept which allows us to describe tissue properties is the backscatter coefficient (BSC) [4]. This value describes how much acoustic energy a tissue is able to return to the transducer. In practice, the BSC can be understood as the power spectrum component related to the signal filtering performed by the tissue. In this sense, the BSC estimation is a process that requires the compensation of the others factors affecting the power spectrum: the medium attenuation and the instrumentation effect.

The BSC presents stochastic behavior caused by the random position of the scatterers and by the electrical noise affecting the acquisition. To reduce the variability and obtain a significant signal, it is common practice to average the spectra from several temporal frames. However, when characterizing fast moving

tissues, such as cardiac walls, or tissues that change their properties with movement [5], a higher frame rate is required.

Recently, ultrafast acquisitions have been possible thanks to the adoption of techniques like plane wave imaging (PWI) and to hardware improvements (notably GPU) [6]. In PWI, all the elements of the transducer are excited with a linear delay to generate tilted or flat planar waves (Figure 1, left images). However, a beamforming process is needed to compensate for the different acoustic time of flight from a scatterer to each element of the array. This beamforming process is also known as migration in the field of seismology, where it was originally developed. Several methods have been proposed for the migration process. In particular, Montaldo [7], Lu [8] and Garcia [9] have proposed geometrical and k-space techniques. Finally, all single angle images are averaged to improve contrast and the lateral resolution (Figure 1, right image). This process is referred to as compounding.

Tilted insonifications of anisotropic media (*i.e.*, a medium that generates different echoes depending of the incident angle) will yield different spectra from each angle. During the compounding process, these different signals will be combined, potentially resulting in a biased BSC. However, we hypothesized that in isotropic media the signal averaging done during the compounding process can be cancelled out by the instrumentation compensation method (*i.e.*, the reference phantom technique [10, 11]).

In this study, validation of the BSC estimation, using PWI, is done using a macroscopically isotropic phantom.

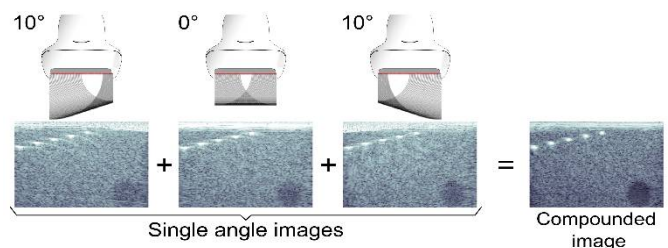


Fig. 1 Compounding process during Plane wave imaging technique. The beam is first tilted at different angles and beamformed afterwards. Resulting images are compounded to increase the lateral resolution and contrast

This work was financially supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant #MOP-84358). Mr. Garcia-Duitama was recipient of a Ph.D. scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Meditis program). He also received the Hydro-Québec scholarship award at the University of Montreal.

Specifically, we aim to verify the instrument compensation of a single angle image and also of a compounded image using the k-space migration method.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Overview

A tissue mimicking phantom with randomly distributed spherical scatterers was employed as the medium to be characterized. BSC estimates of the phantom were obtained from signals of a single element transducer (4-10 MHz) and an array transducer (4-14 MHz) using PWI. A second tissue mimicking phantom was employed as a reference medium for BSC estimation with the array transducer. The BSC estimate from the single element transducer was considered the gold standard. Comparisons between the BSC from the array transducer and the gold standard were made using the normalized mean root squared error (NRMSE).

B. Tissue mimicking phantoms

Both phantoms (*i.e.*, the sample and the reference) were molded to a cylindrical shape of 15 cm in radius and 4 cm in height. The tissue mimicking material was agar at 2% concentration by weight. Each phantom contained 9 g/L of soda lime glass with a narrow diameter distribution of $42.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$ (Duke Fisher Catalog No. 09-980-090, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and $49.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$ (Duke Fisher Catalog No. 09-980-091). The speed of sound for both phantoms was estimated at 1532 m/s. The attenuation coefficient for both phantoms was estimated by the frequency dependent relation $\alpha = \beta f^\mu$, where $\beta = 0.034$ and $\mu = 1.67$.

C. Data acquisition

The acquired data for both employed instruments is summarized in figure 2. The first letter in the subscripts of spectra correspond to the medium (S for the sample phantom, P for the planar reflector, and R for the reference phantom); the second letter corresponds to the instrument used (S for single element transducer, A for array transducer).

For acquisitions of the single element transducer, the sample and planar reflectors were placed in a degassed water container. The employed probe had a center frequency of 7.5 MHz and an f-number of 4. The probe was directed by a tridimensional positioning system controlled by a computer. The probe was initially positioned perpendicular to the sample and planar reflector surfaces. For the sample phantom, the probe was moved laterally (in the two dimensions parallel to the surface). For the planar reflector acquisition, the probe was moved axially, in order to position the plaque surface in every point of the focal area (-6dB). In both cases, a scan line was acquired at each step. Nine frames were constructed from 61 scan lines separated by a beam width.

For plane wave acquisitions, a SonixRP system (Ultrasonix, Analogic Corporation, Boston, MA, USA) was employed. The transducer was an L14-5/38 (38 mm width, 128 elements, 9.5 MHz center frequency, 5-14 MHz, -6 dB bandwidth). The transducer was translated over the phantom surface in the elevation direction to spatially decorrelate the acquired signals. Signals were registered in raw format by the SonixDAQ (Ultrasonix, Analogic Corporation, Boston, MA, USA).

The PWI protocol consisted of five angular insonifications at -10° , -5° , 0° , 5° and 10° . Signals from the reference and sample were acquired with the same transducer configuration (*e.g.*, voltage, focused, aperture, etc.). RF signals were migrated in the K-space using the method proposed in [9], because of their advantages in processing time.

D. BSC estimation for single element acquisitions

The employed planar reflector consisted of a Plexiglas plaque, whose reflectivity coefficient was 0.37. The power spectrum of the signal coming from the reflector surface, S_{PS} , was estimated by the classic Fourier approach. Then the signal was compensated for water attenuation.

The spectrum of the sample image was calculated by the Welch technique. In short, the signal was divided in square windows of 15λ . The power spectrum of each window was calculated by Fourier analysis. Then, the spectra of all the windows, in the nine frames, were averaged to obtain a single spectrum for the sample.

The BSC was estimated using the Chen diffraction correction [12] defined as

$$BSC_{SS}(f, d) = \frac{S_{SS}(f, d) \cdot 10^{\frac{\alpha_S(f, 2d)}{10}}}{S_{PS}(f, d)} \cdot r^2 \cdot D$$

$$BSC_{SS}(f, d) = \frac{S_{SS} \cdot A(\alpha, 2d)}{S_{PS}(f, d)} \cdot r^2 \cdot D, \quad (1)$$

where f is the frequency; d the depth of each window; SSS and SPS are the spectra of the sample and of the planar reflector, respectively; A is the attenuation compensation function; α is the attenuation coefficient described earlier; r is the radius of the single element transducer; and D is the diffraction correction proposed by Chen [12].

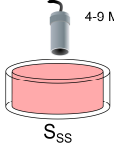
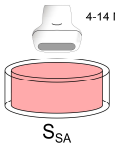
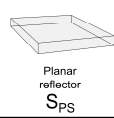
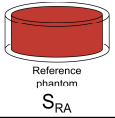
Acquired data		Transducer type	
		Single element (Gold standard)	Linear array
RF spectra	Sample (phantom/tissue)	 4-9 MHz S_{SS}	 4-14 MHz S_{SA}
	Instrumentation compensation medium	 Planar reflector S_{PS}	 Reference phantom S_{RA}
BSC		$BSC_{SS} \sim S_{SS}/S_{PS}$	$BSC_{SA} \sim S_{SA}/S_{RA} * BSC_{RS}$

Fig. 2 Acquired data for BSC estimation according to transducer type.

E. BSC estimation for array transducer acquisitions

For array transducers, the reference phantom technique is recommended for BSC estimation. To apply this technique, a well characterized phantom was scanned with the same instrument configuration. The a-priori characteristics of the reference (*i.e.* BSC and attenuation) were estimated using a single element transducer, in this case. The spectra of the sample and reference were also calculated using the Welch method as described before.

The BSC was estimated using the reference phantom method [10]:

$$BSC_{SA}(f, d) = \frac{S_{SA}(f, d) \cdot A(\alpha_S, 2d)}{\langle S_{RS}(f, d) \cdot A(\alpha_R, 2d) \rangle_d} \cdot BSC_{RS}(f, d) \quad (2)$$

where, f is the frequency; S_{SA} and S_{RS} are the spectra of the sample and the reference, respectively; A is the attenuation compensation function and α_S and α_R are the attenuation coefficients for the sample and reference, respectively; BSC_{RS} is the BSC of the reference phantom estimated with the single element transducer; operator $\langle \cdot \rangle_d$ indicates the average of all the windows found at depth d .

F. Error estimation

The normalized root mean squared error (NRMSE) was used to compare the BSC estimated with the different beamforming techniques. This measurement is defined as

$$NRMSE_{SA} = \sqrt{\frac{1}{\|B\|} \sum_{f \in B} \left(\frac{BSC_{SA}(f) - BSC_{SS}(f)}{BSC_{SS}(f)} \right)^2}, \quad (3)$$

where B represents the bandwidth analyzed, $BSC_{SA}(f)$ and $BSC_{SS}(f)$ are the BSC evaluated at frequency f of the sample estimated from the array transducer signal and from the single element transducer, respectively. Operator $\| \cdot \|$ refers to the size of the parameter.

III. RESULT

A. Estimated BSC

Figure 2 shows the mean BSC found with all the evaluated beamforming techniques (*i.e.* single angle plane waves and compounded plane waves). The solid line represents the BSC obtained with the single element transducer. Single angle insonification has a tendency to be underestimated. However, the compounded image resulted in a slightly overestimated curve. The overlapping of results suggests consistency in the BSC estimation for all beamforming techniques. The intensity for the analyzed frequencies, such as curve properties (*e.g.* mid-band intensity and slope), were consistent for all the techniques.

B. Estimation errors

The NRMSE for each beamforming technique is shown in figure 3. All imaging techniques produced NRMSE below 10%

on average. In single angle images higher errors were observed in positive angles.

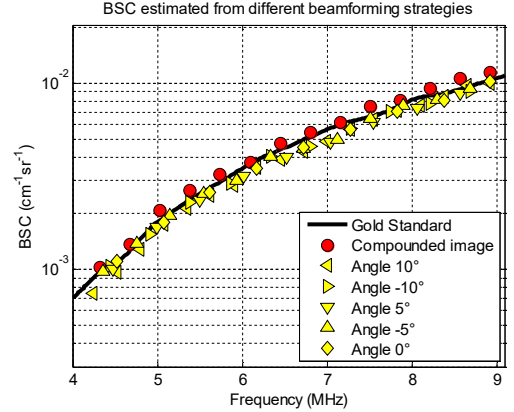


Fig. 3 Mean BSC estimated after averaging nine frames and 5000 RF windows. Solid lines represent the gold standard BSC measured with single-element transducers. Filled markers represent BSC estimated for plane wave imaging. All imaging techniques consistently reproduced BSC values found with the gold standard method.

IV. DISCUSSION

In this study, we studied the possibility of estimating the BSC of a macroscopically isotropic tissue mimicking phantom using two techniques of PWI (*i.e.* single angle insonification and compound imaging). Our results suggest that both PWI techniques can be used to estimate the BSC, as the principal curve characteristics are conserved.

The single angle insonifications usually have a lower signal to noise ratio and lower lateral resolution in comparison with compound imaging; therefore, it would be expected that lower error levels will be observed in the BSC estimate. However, we observed statistically significant errors in the lower range at -5° and -10° that counteract this theory. This behavior can be explained as an effect of the superficial depth. In fact, the acquisition depth permits us to obtain a good SNR even for single angle insonifications. On the other hand, the employed phantoms are macroscopically homogeneous; consequently, the effect of reduced lateral resolution is lessened.

Benefits of using this kind of ultrafast imaging techniques to calculate the BSC are threefold. First, the quality of images, evaluated by the lateral resolution and the contrast to noise ratio, have been shown to be comparable to multifocus imaging in the whole field of view [7]. This fact allows an increase in the useable depth of the image for BSC estimation (*i.e.*, the -6 dB focus area). Second, the statistical variability, due to the stochastic nature of the measure, is reduced thanks to higher frame rates offered by PWI. This property also allows BSC estimation of fast moving tissues such as arterial blood and cardiac muscle. Third, the characterization of anisotropic tissues (*i.e.*, those producing different echoes depending on the insonification angle) could be accomplished using the angular data available before compounding. This additional information

could be of medical relevance for studies of anisotropic tissues (e.g. myocardium, tendons and aggregates of red blood cells).

However, PWI derived techniques have some limitations that may impact BSC estimation. First, beam penetration may be reduced when compared to that of conventional focused imaging. This is due to the lack of converging waves that causes a lower acoustic pressure in plane wave insonification. Second, lateral artifacts can exist with PWI. Beam steering causes lateral regions of the transducer to receive lower acoustic pressure than those at the transducer center. Regions outside the compounded intersection region, in general, present diminished resolution.

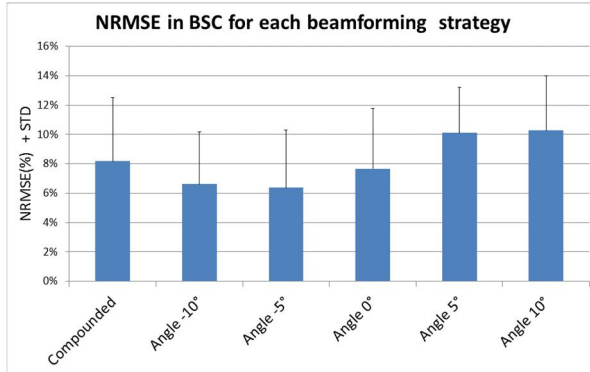


Fig. 4 Normalized root-mean-square error (NRMSE) in percent for mean BSC after averaging nine consecutive frames and 5000 RF windows. In all beamforming techniques, deviations from the gold standard BSC were below 8.5%.

V. CONCLUSION

BSC estimations with less than 10% deviation from the gold standard BSC were obtained by plane wave imaging migrated with the k-space technique for both compounded and single angle images. The instrument compensation technique (*i.e.*, that of the reference phantom) was able to correctly compensate for compounding effects when using this ultrafast technique to estimate BSCs from isotropic tissue-mimicking phantoms. These results suggest that plane wave imaging can be used in spectral characterization of isotropic tissues.

ACKNOWLEDGMENT

Authors acknowledge Mr. Jeremy Kemmerer for contributing valuable discussions.

REFERENCES

- [1] A. Nair, B. D. Kuban, E. M. Tuzcu, P. Schoenhagen, S. E. Nissen, and D. G. Vince, "Coronary plaque classification with intravascular ultrasound radiofrequency data analysis," *Circulation*, vol. 106, pp. 2200-2206, 2002.
- [2] A. Sadeghi-Naini, N. Papanicolau, O. Falou, J. Zubovits, R. Dent, S. Verma, M. Trudeau, J. F. Boileau, J. Spayne, S. Iradji, E. Sofroni, J. Lee, S. Lemon-Wong, M. Yaffé, M. Kolios C., and G. Czarnota J.,

"Quantitative Ultrasound Evaluation of Tumor Cell Death Response in Locally Advanced Breast Cancer Patients Receiving Chemotherapy," *Clinical Cancer Research*, vol. 19, pp. 2163-2174, 2013.

[3] J. Tripette, A. Y. Denault, L. Allard, B. Chayer, L. P. Perrault, and G. Cloutier, "Ultrasound monitoring of RBC aggregation as a real-time marker of the inflammatory response in a cardiopulmonary bypass swine model," *Critical care medicine*, vol. 41, pp. e171-8, Aug 2013.

[4] F. L. Lizzi, M. Greenebaum, E. J. Feleppa, M. Elbaum, and D. J. Coleman, "Theoretical framework for spectrum analysis in ultrasonic tissue characterization," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 73, pp. 1366-1373, 1983.

[5] L. Allard, G. Cloutier, and L. G. Durand, "Effect of the insonification angle on the Doppler backscattered power under red blood cell aggregation conditions," *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, vol. 43, pp. 211-219, 1996.

[6] M. Tanter and M. Fink, "Ultrafast imaging in biomedical ultrasound," *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, vol. 61, pp. 102-119, 2014.

[7] G. Montaldo, M. Tanter, J. Bercoff, N. Benech, and M. Fink, "Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography," *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, vol. 56, pp. 489-506, 2009.

[8] J.-y. Lu, "2D and 3D high frame rate imaging with limited diffraction beams," *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, vol. 44, pp. 839-856, 1997.

[9] D. Garcia, L. Tarnez, S. Muth, E. Montagnon, and G. Cloutier, "Stolt's fk migration for plane wave ultrasound imaging," *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, vol. 60, pp. 1853-67, 2013.

[10] S.-H. Wang and K. K. Shung, "An approach for measuring ultrasonic backscattering from biological tissues with focused transducers," *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 44, pp. 549-554, 1997.

[11] L. X. Yao, J. A. Zagzebski, and E. L. Madsen, "Backscatter coefficient measurements using a reference phantom to extract depth-dependent instrumentation factors," *Ultrasonic imaging*, vol. 12, pp. 58-70, 1990.

[12] X. Chen, D. Phillips, K. Q. Schwarz, J. G. Mottley, and K. J. Parker, "The measurement of backscatter coefficient from a broadband pulse-echo system: a new formulation," *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, vol. 44, pp. 515-525, 1997.

Segmentation of blood layers with particle image velocimetry (PIV) for reproducible *in vivo* characterization of erythrocyte aggregation

Julian Garcia-Duitama,^{*†} Boris Chayer,^{* Y} Yves Goussard,^{†‡} Guy Cloutier ^{*†§}

^{*} Laboratory of Biorheology and Medical Ultrasonics, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), Montreal, Quebec, Canada; [†] Institute of Biomedical Engineering, École Polytechnique of Montreal and University of Montreal, Montréal, Québec, Canada; [‡] Electrical Engineering Department, École Polytechnique of Montreal, Montréal, Québec, Canada; [§] Department of Radiology, Radio-Oncology and Nuclear Medicine and Institute of Biomedical Engineering, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Abstract—Erythrocytes have the tendency to aggregate under blood stagnation and low shear conditions. This phenomenon increases scattering and the echogenicity of blood. Increased erythrocyte aggregation (EA) has been proposed as a surrogate marker for real-time detection of acute inflammation. Therefore, it is of interest to develop a reproducible technique for *in vivo* characterization of EA. The main difficulty to achieve this goal is to evaluate the phenomenon under controlled conditions of shear rate. We propose a technique to automatically segment vascular regions of comparable shear based on the analysis of sequences of ultrasound images using particle image velocimetry (PIV). We aim to validate the feasibility and accuracy of the proposed technique, using both *in vivo* and *ex vivo* datasets. After segmentation, ultrasound images were characterized using the structure factor size and attenuation estimator based on spectral analysis. The quantitative ultrasound parameters inferred by automatic segmentation were compared to those of manual segmentation made by a human expert. No significant differences were found between the aggregate size estimated from automatic and manual segmentations. However, the attenuation parameter showed significant differences, showing the need to regularize the inverse problem. These results suggest that the algorithm is a robust alternative to expert segmentation and present the advantage of being operator independent.

Keywords—*image segmentation; erythrocyte aggregation; spectral methods; quantitative ultrasound; particle image velocimetry*

VI. INTRODUCTION

Mammal blood has the property of changing its echogenicity when is subjected to low flow or stagnation [1]. This phenomenon is explained by the reversible tendency of red blood cells to aggregate under low mechanical shear [2]. The size and compactness of the aggregate depend, among other factors, of the plasma concentration of large proteins, such as fibrinogen or haptoglobin [3]. As the concentration of these proteins is increased during inflammatory conditions, erythrocyte aggregation is typically employed as a surrogate marker of inflammation [4].

Most of the techniques to assess the level of erythrocyte aggregation require blood sampling and a certain laboratory

delay [5]. On the contrary, ultrasound measurements offer the possibility of real time, *in vivo* and *in situ* assessment of the phenomenon. These properties are especially appealing for inflammation monitoring in intensive care units and during surgical procedures [4]. Likewise, the ultrasound technique has also been used to evaluate *in vivo* the erythrocyte aggregation in other pro-aggregating diseases as diabetes [6] or to explain the formation of blood thrombus [7].

The size of the erythrocyte aggregates decreases as mechanical shear increases. Thus, the most important confounding factor for *in vivo* assessment of erythrocyte aggregation is the variable shear rate induced by the blood flow. In macro-circulation, the tube-flow-like condition creates cylindrical shear layers, with near zero shear in the center axis and maximum shear at the vessel wall. Thus, it is of interest to develop a segmentation technique to segment the blood layers with a reproducible criterion.

The most used ultrasound technique for quantitative assessment of red blood cell aggregation is based on spectral analysis of the radio frequency signal [8, 9]. This technique includes the segmentation of the vein's lumen, computation of backscattering coefficient (BSC) of blood and model fitting of the BSC which obtains characterizing parameters. It is a common practice to request a technician to manually segment the blood layers. However, as there is no clear criterion to perform this task, the segmentation is usually operator dependent and difficult to reproduce.

We propose a technique to automatically segment vascular regions of comparable shear conditions based on the analysis of sequences of ultrasound images using particle image velocimetry (PIV). The proposed method includes: 1) a reduction of the venous blood flow during acquisition to decrease the shear rate and promote aggregation, 2) the use of a PIV method for estimation of flow speed and shear rate, and 3) a binary filtering and thresholding to remove the clutter from tissues and to select regions of interest with reproducible shear rates.

In this manuscript, we aim to validate the feasibility and accuracy of the proposed technique by comparing the

quantitative ultrasound parameters derived from the segmentation of both an expert technician and the PIV technique. Two datasets, *in vivo* and *ex vivo*, were employed for the segmentation comparison.

VII. MATERIALS AND METHODS

A. *Ex vivo* experiments

We collected three samples of 500 mL of porcine blood from local slaughterhouses. The samples were anticoagulated with 1.5 g/dL of EDTA. To better mimic the conditions found *in vivo*, the buffy coat was conserved. Hematocrit was adjusted to 40% by adding or removing autologous plasma, as required by hematologic laboratory guidelines [10]. All experiments were done at room temperature and nine hours after blood collection.

Each blood sample was circulated in a tubing setup. This consisted of a syringe pump connected by PVC tubes to a blood reservoir. In this container the sample was gently mixed with a magnetic stirrer to avoid erythrocyte sedimentation artifacts. The conduit passed through a water tank where the PVC tube was substituted with a PVA one which served as an acoustic window. PVA and PVC tubes had an inner diameter of 9 mm, mimicking that of a porcine femoral vein. To reproduce the low flow required by the proposed technique, the pump extracted blood from the reservoir at a volumetric speed of 12 cm³/min, which produced a maximum theoretical velocity of 0.62 cm/s at the axis of the tube and a wall shear rate of 3.3 s⁻¹. The ultrasonic probe was placed 10 cm from the entrance of the PVA tube to acquire the data under fully developed laminar flow.

B. *In vivo* experiments

The *in vivo* dataset consisted of four ultrasonic sequences of porcine femoral veins during a cardiopulmonary bypass (CPB) surgery. Details of the surgical procedure can be found elsewhere [4]. Briefly, ten pigs underwent a 90 minutes cardiopulmonary bypass to induce an inflammatory reaction and, thus, increase the red blood cell aggregation. After the surgical procedure, pigs were monitored by ultrasound for two hours. The femoral vein was exposed and partially clamped with an adjustable hydraulic pump in order to reduce the blood flow. To acquire a longitudinal image of the vein, the cavity on the leg was filled with saline and the probe was immersed in it. This procedure was necessary since the probe penetration was not sufficient to non-invasively reach the vein and to avoid the loss of signal caused by the high attenuation of porcine skin. Blood velocity was monitored by pulsed Doppler and was maintained below 1 cm/s. For the purposes of this manuscript, the four pigs with higher aggregation were retained. For each one of them, only the acquisition recorded 90 min after the CPB were kept.

C. Ultrasound acquisitions

For all the acquisitions, a high frequency system was employed (Vevo 770, Visualsonics, ON, Canada), in order to exploit the spectral fingerprints of blood at that bandwidth. *Ex vivo* experiments were done with the RMV703 probe (central frequency of 27.5 MHz and mechanically focused at 13 mm) operated at a frame rate of 26 Hz. *In vivo* experiments were done with the RMV707B probe (central frequency of 25.5 MHz and mechanically focused at 11.5 mm) operated at 28 fps. RF signals were amplified by a pulse receiver system (Panametrics

5900 PR, Waltham, MA, USA) and digitized at 250 MHz by an acquisition card (Model CS12501, GageScope, Montreal, QC, Canada).

D. Automatic segmentation

The automatic segmentation process started by creating a velocity map of the blood flow by applying a PIV method [11] to 20 consecutive RF frames. To increase the precision, the PIV algorithm employed a two-pass process, each time with smaller interrogation windows. The first PIV step used interrogation windows of 0.4x3.2 mm and the refining step used windows of 0.16x1.08 mm in axial and lateral directions, respectively. These window sizes were empirically found to fit the flow-speed range expected during the acquisition. After, the estimated velocity map was smoothed using [12], in order to avoid gaps and outlier bias. Given the geometry of the oscillating probes, the PIV velocity map was converted from polar to Cartesian coordinates, then, from pixels to mm units, to finally calculate its magnitude and obtain the speed maps (Fig. 1a).

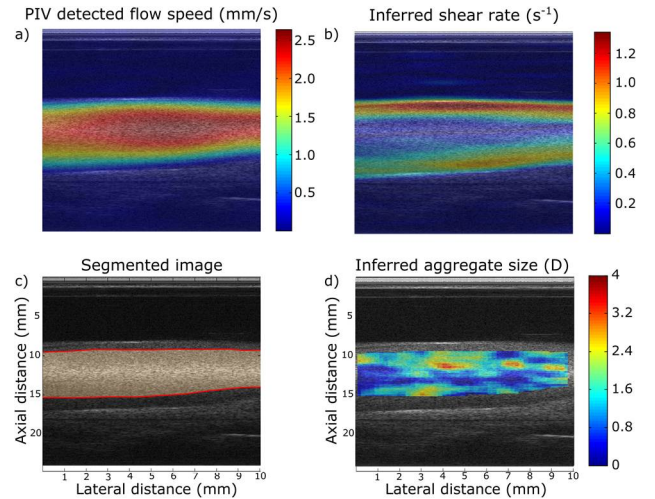


Fig. 1 Porcine femoral vein segmentation. a) Estimation of velocity map with PIV; b) Derivation of shear rate map from a); c) Segmentation by preserving higher velocities (>2 mm/s) and lower shear rates (<1 s⁻¹)

Afterward, shear rate maps were estimated by deriving the velocity maps in the radial direction of the vein (Fig 1b). Then, the algorithm selected image segments from speed and shear rate maps where the values were beyond parameterized thresholds (*i.e.*, >2 mm/s and <1 s⁻¹, respectively) (Fig 1.c). The retained region corresponded to the intersection of the masks of the two maps. When this thresholding process resulted in two or more areas (usually caused by tissue movement), the area with the largest surface was retained.

E. Quantitative ultrasound analysis

Ultrasound data was characterized by applying the technique “Structure Factor and attenuation estimator” [13]. Briefly, RF data were divided into windows of 0.31 by 0.14 mm (lateral and axial, respectively) with an overlap of 30%. The average power spectrum of each window was normalized by that of a reference medium taken at the same image position. In these experiments,

the reference medium consisted of an erythrocyte PBS solution at 4% of hematocrit. This process estimated a non-corrected-for-attenuation backscattering coefficient, BSC_{noAtt} , as follows:

$$|BSC_{noAtt}(i, f) = \frac{S_S(i, f)}{S_R(i, f)} BSC_R(f) \quad (1)$$

In (1), i is a single window dividing the segmented region. f is the excitation frequency. S_S and S_R are the average power spectrum of a window taken of the sample and the reference, respectively. BSC_R is the backscatter coefficient (BSC) of the reference medium calculated using the SFSE model [14], as follows:

$$BSC_R(f) = m \cdot \theta(f, s, \gamma_z) \cdot S(W, D^2) \quad (2)$$

In (2), m is the number density of erythrocytes in the medium. s is the radius of a erythrocyte and γ_z is the acoustic impedance contrast between an erythrocyte and plasma; h is the hematocrit; θ is the backscatter cross section of a single erythrocyte, as defined in [15]; S is the structure function accounting for intercellular interference. Notably, for the reference medium, the structure factor is known. W is the packing factor, accounting for structure of the sample, and D is the diameter of the aggregate in terms of number of erythrocytes. Higher values of W and D indicate an enhanced erythrocyte aggregation.

Afterwards, the value of (1) was fitted to the scattering model, described by the analytical formula in (2), by solving by least squares:

$$\underset{W, D, A_c}{\operatorname{argmin}} \sum_f \|BSC_{noAtt} - A_c \cdot m \cdot \theta \cdot \{W - CD^2\}\| \quad (3)$$

In (3), A_c is the attenuation correction function, which accounts conjointly for sample and reference attenuations. C is a constant affecting the structure factor in (2). Note that the values of W , D and *attenuation* (extracted from A_c) are the characterizing values used in the rest of the manuscript (see, for example, a parametric image of D at Fig. 1d).

F. Statistical analysis

The W , D , and *Attenuation* parameters estimated with the manual segmentation were compared for statistical differences to those estimated from automatic segmentation. The Mann-Whitney rank sum test was used to compare each parameter. This test was employed as the population of parameters were not distributed normally. Statistical significance was defined as a p -value of less than 0.05.

VIII. RESULTS AND DISCUSSION

A. Segmentation comparison

Manually segmented regions were smaller and usually completely contained in the automatically ones (Fig 2). *Ex vivo*, the flow was stable and the segmentation was simple. However, *in vivo*, there were benefits and disadvantages for both techniques. Notably, flow artifacts occurred *in vivo* as collateral veins caused recirculation, small vortexes or out-of-plane movements. These areas are under atypical mechanical shear and should be avoided as they can cause artificially low measurements. The PIV method detected the lack of homogeneity in the flow and the region was avoided. However,

in manual segmentation, the technician has only a static image which is insufficient to detect the flow irregularity. This suggest that manual segmentation should be done after inspection of the video sequence. On the contrary, the technician recognized and avoided shadowed zones caused by attenuation which could also mislead the analysis. In future works, these zones can be automatically detected by analysis of statistical distribution of RF amplitude.

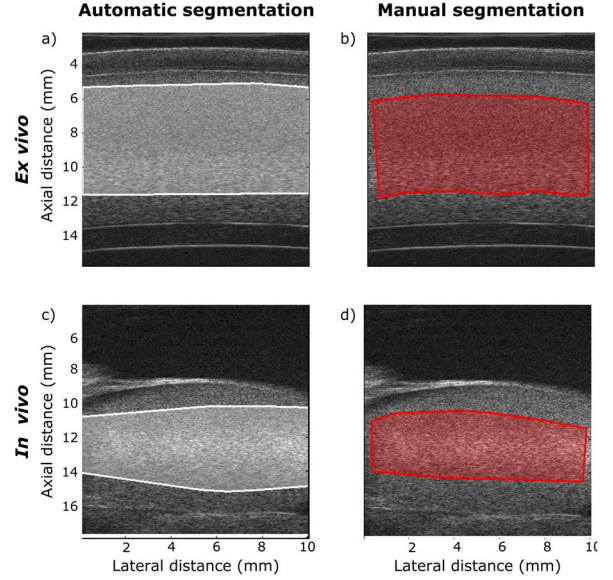


Fig. 2 Comparison of automatic and manual segmentation in typical longitudinal images. White and red areas represent automatic and manual segmentation, respectively.

B. Analysis of quantitative parameters

The value distribution of W , D and *attenuation* were clearly similar (Fig. 3). This result suggest that the blood properties of the segmented areas are comparable. Moreover, no significant differences were found for the parameter D in any condition. However, significant differences were found for the attenuation parameter in all conditions. This shows the ill-posed character of this variable and suggest that it is advisable to use regularization methods during the inverse problem solution.

The flow reduction is an important aspect in the repeatability of the measurements as it reduces the distribution of shears found in the vein. Moreover, if the acquisition is done under natural flow (*i.e.*, 5-20 cm/s), the regions with shear rates below 1 s^{-1} would be too narrow (*i.e.*, under 0.5 mm), thereby impeding effective spectral analysis.

Not surprisingly, the W and D parameters found *in vivo* were higher than those from *ex vivo* experiments (Fig. 3 a, d and b, e). This is explained by the inflammatory reaction created during the surgical intervention *in vivo*, which intensified the erythrocyte aggregation. This is additional evidence of the sensitivity of the technique for detecting biological variations of the phenomenon.

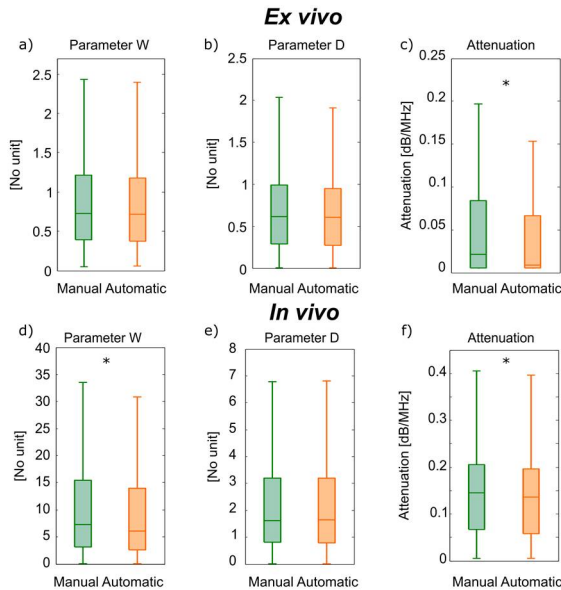


Fig. 3 Distribution of quantitative parameters derived from spectral analysis of manually and automatically segmented images. * indicates a significant difference found between the two segmentation techniques.

IX. CONCLUSION

The repeatability of a technique is of fundamental importance for its adoption in clinical practice. The segmentation technique presented here uses a physical criterion (*i.e.* the shear rate) that ensures its repeatability and is highly relevant for the measurement of erythrocyte aggregation. It also presents the advantages of being operator independent and provides results that are comparable to those produced manually by a human expert. The results of this study also support the clinical translation of the *in vivo* measurement of erythrocyte aggregation. In a near future, this technology can become an important tool for patient monitoring in intensive care medicine.

ACKNOWLEDGMENT

This work was financially supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant #MOP-84358). Mr. Garcia-Duitama was recipient of a Ph.D. scholarship from the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies.

REFERENCES

- [1] B. Sigel, J. Machi, J. C. Beitler, J. R. Justin, and J. Coelho, "Variable ultrasound echogenicity in flowing blood," *Science*, vol. 218, pp. 1321-1323, 1982.
- [2] B. Sigel, J. Machi, J. Beitler, and J. Justin, "Red cell aggregation as a cause of blood-flow echogenicity," *Radiology*, vol. 148, pp. 799-802, 1983.
- [3] X. Weng, G. Cloutier, R. Beaulieu, and G. Roederer, "Influence of acute-phase proteins on erythrocyte aggregation," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 271, pp. H2346-H2352, 1996.
- [4] J. Tripette, A. Y. Denault, L. Allard, B. Chayer, L. P. Perrault, and G. Cloutier, "Ultrasound monitoring of RBC aggregation as a real-time marker of the inflammatory response in a cardiopulmonary bypass swine model," *Critical care medicine*, vol. 41, pp. e171-8, Aug 2013.
- [5] J. G. Dobbe, G. J. Streekstra, J. Strackee, M. C. Rutten, J. M. Stijnen, and C. A. Grimbergen, "Syllectometry: the effect of aggregometer geometry in the assessment of red blood cell shape recovery and aggregation," *IEEE transactions on biomedical engineering*, vol. 50, pp. 97-106, 2003.
- [6] V. Rouffiac, J.-P. Nguyen, L. Allard, P. Robillard, G. Soulez, and G. Cloutier, "In Vivo Venous Assessment of Red Blood Cell Aggregate Sizes in Diabetic Patients with a Quantitative Cellular Ultrasound Imaging Method: Proof of Concept," *PLoS one*, vol. 10, p. e0124712, 2015.
- [7] F. T. Yu, J. K. Armstrong, J. Tripette, H. J. Meiselman, and G. Cloutier, "A local increase in red blood cell aggregation can trigger deep vein thrombosis: evidence based on quantitative cellular ultrasound imaging," *Journal of thrombosis and haemostasis*, vol. 9, pp. 481-8, Mar 2011.
- [8] V. Rouffiac, J.-P. Guglielmi, A. Barbet, N. Lassau, and P. Peronneau, "Application of validated ultrasound indices to investigate erythrocyte aggregation in pigs. preliminary *in vivo* results," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 30, pp. 35-44, 2004.
- [9] F. T. Yu, É. Franceschini, B. Chayer, J. K. Armstrong, H. J. Meiselman, and G. Cloutier, "Ultrasonic parametric imaging of erythrocyte aggregation using the structure factor size estimator," *Biorheology*, vol. 46, pp. 343-363, 2009.
- [10] O. Baskurt, M. Boynard, G. Cokelet, P. Connes, B. M. Cooke, S. Forconi, *et al.*, "New guidelines for hemorheological laboratory techniques," *Clinical hemorheology and microcirculation*, vol. 42, pp. 75-97, 2009.
- [11] D. Garcia, "A fast all-in-one method for automated post-processing of PIV data," *Experiments in fluids*, vol. 50, pp. 1247-1259, 2011.
- [12] D. Garcia, "Robust smoothing of gridded data in one and higher dimensions with missing values," *Computational statistics & data analysis*, vol. 54, pp. 1167-1178, 2010.
- [13] E. Franceschini, T. François, F. Destrempe, and G. Cloutier, "Ultrasound characterization of red blood cell aggregation with intervening attenuating tissue-mimicking phantoms," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 127, pp. 1104-1115, 2010.
- [14] F. T. Yu and G. Cloutier, "Experimental ultrasound characterization of red blood cell aggregation using the structure factor size estimator," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 122, pp. 645-56, Jul 2007.
- [15] J. Garcia-Duitama, A. Han, B. Chayer, D. Garcia, M. L. Oelze, and G. Cloutier, "Experimental validation of plane wave imaging using k-space beamforming for spectral characterization of isotropic media," in *Ultrasonics Symposium (IUS), 2014 IEEE International*, 2014, pp. 2414-241