

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**DE LA MODÉLISATION À LA QUANTIFICATION
PAR ULTRASONNS DE L'AGRÉGATION
ÉRYTHROCYTAIRE**

par

ALI TRAORÉ-DUBUIS

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

FACULTÉ DE MÉDECINE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
GÉNIE BIOMÉDICAL

JUIN 2013

© ALI TRAORÉ-DUBUIS, 2013.

Résumé

Plusieurs études ont démontré une association entre l'agrégation érythrocytaire du milieu sanguin et plusieurs anomalies hémorhéologiques. Cette agrégation peut être quantifiée à l'aide du coefficient de rétrodiffusion ultrasonore. Pour décrire l'interaction entre l'onde ultrasonore et les tissus biologiques, on se sert de modèles. Ainsi, le modèle de facteur de structure (MFS) est utilisé pour évaluer le coefficient de rétrodiffusion des globules rouges agrégés. Toutefois, ce modèle numérique ne permet pas des mesures en temps réel du niveau d'agrégation et n'informe pas sur la structure du milieu sanguin comme par exemple la taille de l'agrégat. Pour pallier à ces difficultés, nous proposons un modèle où la théorie du milieu effectif est combinée au modèle de facteur de structure. Tout en permettant une mesure en temps réel de l'agrégation, ce modèle nommé TMEMFS fournit en plus deux indices structuraux de l'agrégation: le rayon de l'agrégat ainsi que sa compacité. Par le biais de simulations numériques en 3D, on a comparé le coefficient de rétrodiffusion suivant les modèles MFS et TMEMFS. Ceci dans le but de vérifier que dans la solution du problème direct, les propriétés acoustiques des globules rouges et les propriétés structurales du milieu agrégeant correspondaient à la réalité. Pour simuler des agrégats de globules rouges, une disposition hexagonale compacte a été utilisée. Les effets du rayon et de la compacité sur le coefficient de rétrodiffusion ont été étudiés. Basé sur la microstructure sanguine considérée, les résultats obtenus avec le modèle TMEMFS sont semblables à ceux du modèle MFS. Ce travail constitue un support théorique pour une mesure quantitative *in vivo* de l'agrégation érythrocytaire à des fins diagnostics.

Mots-clés: sang, agrégation, ultrasons, simulation

Abstract

Many studies have reported that an enhanced level of red blood cell aggregation is associated with the presence of hemorheological disorders. Pathological aggregation has been characterized by quantitative ultrasound based on the backscattering coefficient. In order to describe the interaction between the incident ultrasound and the interrogated biological tissues, mathematical models are used. Mathematical modeling is known to be the optimal way to describe the interaction occurring between ultrasound and tissues at the cellular level. The structure factor model (SFM), considered as the exact scattering model has been developed to predict the backscattering coefficient from blood. However, the numerical SFM cannot be applied in real time for practical measurements and does not provide aggregate size to assess the level of aggregation. Therefore, we come up with a new model based on the effective medium theory in order to tackle this difficulty. The effective medium theory combined with the structure factor model (EMTSFM) can be applied in real time and contrary to the SFM provides two indices of the aggregate state *in vivo*: aggregate size and compactness. Based on a 3D simulation study, the backscattering coefficients (BSCs) predicted by the effective medium theory combined with the Structure Factor Model (EMTSFM) are compared to the BSCs computed with SFM. Our aim here is to assess the accuracy of the EMTSFM against the SFM by comparing their BSC in the framework of a forward problem, i.e., the calculation of the BSC from the known acoustic and structure aggregate parameters. This was done in order to validate the proposed model. To simulate aggregates, RBCs are stacked following a hexagonal close packing scheme. The influences of the aggregate radius and compactness on the BSC are studied as well. The results showed good agreement between the SFM and the EMTSFM based on our simulated microstructure of RBC aggregates. Our work provides thus the theoretical background to assess locally the aggregation level for diagnosis purposes.

Keywords : blood, aggregation, ultrasound, simulation

Table des matières

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : AGRÉGATION ET ULTRASONS	6
1- LE SANG	6
2- AGRÉGATION ET DÉFORMABILITÉ DES GLOBULES ROUGES	9
3- PATHOPHYSIOLOGIE DE L'HÉMORHÉOLOGIE	11
4- TECHNIQUES DE MESURE EN HÉMORHÉOLOGIE	14
5- QUANTIFICATION PAR ULTRASONS DE L'AGRÉGATION	15
a) <i>L'imagerie conventionnelle par ultrasons (US)</i>	15
b) <i>Agrégation érythrocytaire et imagerie conventionnelle ultrasonore</i>	17
c) <i>Signaux RF et description quantitative des tissus</i>	19
d) <i>Signaux RF et description quantitative de l'agrégation des globules rouges</i>	20
CHAPITRE 2 : MODÉLISATION DU COEFFICIENT DE RÉTRODIF-FUSION ULTRASONORE DU SANG	24
2.1 MODÉLISATION DE LA SECTION EFFICACE D'UN GLOBULE ROUGE	25
2.2 SECTION EFFICACE DE RÉTRODIFFUSION D'UN GLOBULE ROUGE DANS LES CONDITIONS NON-RAYLEIGH	28
2.3 COEFFICIENT DE RÉTRODIFFUSION PAR UNE SUSPENSION DE GLOBULES ROUGES DÉSAGRÉGÉS	30
2.3.1. <i>Cas d'un milieu dilué ($H < 6\%$)</i>	31
2.3.2. <i>Cas d'un milieu dense ($H > 6\%$)</i>	32
2.4 COEFFICIENT DE RÉTRODIFFUSION PAR DES GLOBULES ROUGES AGRÉGÉS	36
2.5 THÉORIE DU MILIEU EFFECTIF COMBINÉ AU MODÈLE DU FACTEUR DE STRUCTURE : UNE MEILLEURE	
APPROXIMATION DU MODÈLE DE FACTEUR DE STRUCTURE	44
CHAPITRE 3 : ÉTUDE <i>IN SILICO</i> DE L'AGRÉGATION EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES	50
3.1 ARRANGEMENT HEXAGONAL COMPACT : UN MODÈLE D'AGRÉGAT	50
3.2 VARIATION DE LA COMPACTITÉ	61
3.3 CALCUL DU FACTEUR DE STRUCTURE S DES GLOBULES ROUGES	63
CHAPITRE 4: APPLICATION DE LA THÉORIE DU MILIEU EFFECTIF ET VALIDATION NUMÉRIQUE POUR LA MESURE DE L'AGRÉGATION	67
ABSTRACT	68
INTRODUCTION:	69
METHODS	71

<i>a) Theoretical Modelling</i>	71
<i>b) Simulation of aggregated Red Blood Cells (RBCs)</i>	75
RESULTS	79
DISCUSSION.....	85
CONCLUSION	89
CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE	91
5.1 LIMITATION DE LA MÉTHODE DE SIMULATION.....	91
5.2 APPROXIMATION DU MODÈLE.....	92
5.3 LIMITES D'APPLICABILITÉ DU MODÈLE.....	92
5.4 PENTES SPECTRALES	93
5.5 LIMITES DU MODÈLE EMTSFM	93
5.6 POTENTIELLES APPLICATIONS BIOMÉDICALES.....	94
CONCLUSION.....	96
RÉFÉRENCES	97

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition du sang [29].	7
Tableau 2 : Différentes pathologies associées à l'agrégation par des facteurs plasmatiques ou/et cellulaires. (Tiré de [1]).	13
Tableau 3 : Propriétés acoustiques des diffuseurs principaux présents dans le sang. On note la faible différence de contraste entre le plasma et le globule rouge.	26
Tableau 4 : Propriétés structurales du milieu de simulation à un hémocrite 20%.	56
Tableau 5 : Propriétés structurales du milieu de simulation à un hémocrite 30%.	57
Tableau 6 : Propriétés structurales du milieu de simulation à un hémocrite 40%.	58
Tableau 7 : Relation entre la compacité H_{int} , l'hémocrite systémique H et la densité volumique des particules effectives H_{ag} .	62
Tableau 8 : Structural properties of the simulated medium at 20% hematocrit.	76
Tableau 9 : Structural properties of the simulated medium at 30% hematocrit.	77
Tableau 10 : Structural properties of the simulated medium at 40% hematocrit.	78

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un globule rouge. Tirée de Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.	8
Figure 2 : Différents comportements visqueux d'un fluide. γ est le taux de cisaillement, τ la contrainte et η la viscosité. A: comportement d'un fluide Newtonien. B: comportement non-newtonien du sang. On remarque que la viscosité ne varie pas linéairement en-deçà d'un seuil de cisaillement. Tirée de la thèse de Julien Tripette.9	9
Figure 3 : Lien entre pathologie et agrégation <i>in vitro</i> . Les images à gauche et au centre ont été obtenues par microscopie par Schmid-Schonbein (Tirée de [8, 32]). L'image à droite est une micrographie. Tirée de [27]......	10
Figure 4 : Effets de l'agrégation et déformation sur la viscosité sanguine en fonction du taux de cisaillement, tirée de [24].	11
Figure 5 : Images par microscopie optique d'échantillons sanguins. À gauche, sang d'un sujet sain et à droite sang d'un patient ayant eu un infarctus myocardique. Tirée de [1]......	12
Figure 6 : Techniques de mesure de l'agrégation des globules rouges. Tirée de la présentation de thèse de Savéry David [24]......	15
Figure 7 : Variation de l'échogénicité avec l'agrégation, tirée de [11].	18
Figure 8: Différences entre les effets de l'hématocrite et de l'agrégation érythrocytaire, tirée de [61].	21
Figure 9 : Évolution du facteur d'entassement W en fonction de l'hématocrite (H) pour des sphères de volume équivalent au globule rouge.	35

Figure 10 : Mesure expérimentale de la puissance rétrodiffusée par le sang normal d'origine bovine (a) et par une suspension saline de globules rouges (b) à différents taux de cisaillements SR (Shear Rates). En augmentant le taux de cisaillement, le processus de désagrégation s'entame, d'où une diminution de l'amplitude observée. Tirée de [2] 36

Figure 11 : Principe de calcul de la fonction de distribution radiale ou fonction de corrélation de paires. On désigne une particule au centre puis on cherche le nombre de paires discrétisé dans les sphères successives lorsqu'on est en 3 dimensions. Le choix de la particule au centre n'est pas important car on fait un moyennage d'ensemble pour obtenir la distribution radiale. En l'absence de recouvrement, les particules se situent à des multiples de r ($2r, 4r, \dots$). Le nombre de particules, donc de globules ici, dans la couronne délimitée par r et dr est simplement $\frac{N}{V}(4\pi r^2 dr)g(r)$. Tirée de [75]..... 40

Figure 12 : Facteurs de structure d'un solide (a), liquide (b) et gaz (c). Un agrégat de globules rouges est plutôt structuré comme un solide (a). Les pics réguliers observés pour un solide montrent la grande régularité de la disposition des diffuseurs en fonction de la distance. Dans un gaz, il n'y a aucun arrangement entre les molécules et la distribution est complètement uniforme. Les liquides ont, quant à eux, un comportement entre les deux. Le premier pic renseigne sur la taille du diffuseur. Le début de la courbe RDF à courte distance informe sur la présence ou non de recouvrement entre les particules. Un agrégat se rapprochera plus de la RDF d'un solide vu l'ordre des globules rouges internes à un agrégat surtout s'il est compacté. Tirée de [76]..... 42

Figure 13 : Comparaison du coefficient de rétrodiffusion par des agrégats simulés (les cercles noirs) et l'estimation par le modèle SFSE (en bleu), tirée de [59]. La courbe rouge suit la prédiction de Rayleigh avec une pente égale à 4. La pente de 6.5 décrit mieux la variation du coefficient de rétrodiffusion au-delà de 10MHz..... 43

Figure 14: Illustration de l'approximation utilisée dans la théorie du milieu effectif, tirée de [63].	45
Figure 15: Analogie entre expérience numérique et conditions physiologiques. Le sang d'un diabétique présente des agrégats de forme plutôt sphérique comparé au sang normal dans la macrocirculation où les agrégats sont des rouleaux. La flèche indique l'augmentation du niveau de l'agrégation. On remarque au passage que le diamètre ainsi que la compacité sont des indices du niveau d'agrégation, tirée en partie de [32].	47
Figure 16: Effets de l'hématocrite sur le facteur de structure $S(k)$.	49
Figure 17 : Représentation d'une particule effective obtenue par simulation numérique de globules rouges disposés selon l'organisation hexagonale compacte. La particule effective est représentée par le cercle noir contenant les globules rouges agrégés. ...	53
Figure 18: a) Illustration de globules rouges agrégés en hexagonal compact. La figure b montre la périodisation des globules rouges dans les 3 dimensions. On voit aux bords du volume de simulation un agrégat coupé. Les globules agrégés et localisés aux bouts, sur la plus grande dimension X, sont complémentaires. Les dimensions sont réduites ici pour une meilleure visualisation de la microstructure simulée (Reproduite de Saha et coll.[3]).	55
Figure 19 : Variation du nombre de particules effectives périodisées en fonction du rayon de l'agrégat pour les 15 rayons étudiés. L'hématocrite dans le milieu est 20%.	56
Figure 20: Variation du nombre de particules effectives périodisées en fonction du rayon de l'agrégat pour les 15 rayons étudiés. L'hématocrite dans le milieu est 30%.	58
Figure 21: Variation du nombre de particules effectives périodisées en fonction du rayon de l'agrégat pour les 15 rayons étudiés. L'hématocrite dans le milieu est 40%.	59

Figure 22 : Variation de la compacité. La particule effective à droite donne la compacité maximale. En allant vers la gauche, on réduit la compacité (par élimination de quelques globules rouges) de la particule effective qui garde le même rayon. 62

Figure 23: Allure du facteur de structure des globules rouges, disposés en hexagonal compact, en fonction de la fréquence. L'hématocrite systémique est de 20 %. 65

Figure 24: Allure du facteur de structure des particules effectives (c'est-à-dire agrégats) en fonction de la fréquence. L'hématocrite systémique est de 40 %. H_{real} reflète le facteur de structure réel incluant les particules effectives périodisées et non périodisées. L'hématocrite systémique H_R égal à 23 % comprend exclusivement les particules effectives non périodisées. Dans les 2 cas, le rayon de la particule effective est de $R_{ag}=5.80a$ où a est le rayon du globule rouge ($a=2.75\mu m$) et la compacité H_{int} est de 72%. 66

Figure 25: Variation of the number of effective particles under periodic boundary conditions as a function of aggregate size at 30% hematocrit. This plot gathers all the results from the 15 aggregates sizes simulated. 77

Figure 26: Variation of the number of effective particles under periodic boundary conditions as a function of aggregate size at 30% hematocrit. This plot gathers all the results from the 15 aggregates sizes simulated. 78

Figure 27: Variation of the number of effective particles under periodic boundary conditions as a function of aggregate size at 40% hematocrit. This plot gathers all the results from the 15 aggregates sizes simulated. 79

Figure 28 : Comparison of the numerical structure factor of effective particles with the analytical solution at 3 aggregate sizes. The compactness is assumed to be constant. 80

Figure 29 : Frequency dependent backscattering coefficient of the EMTSFM compared to SFM at 40% hematocrit for 3 aggregate sizes. The symbols represent the SFM while

the line stands for the EMTSFM. The figure on the top takes into account all aggregated RBCs while the bottom figure displays the backscattering from aggregated RBCs not under periodic boundary conditions. 82

Figure 30 : Corresponding relative error for the backscattering coefficient from the EMTSFM model at reduced hematocrit H_R 83

Figure 31: Quantitative comparison between the SFM and the EMTSFM models to characterize RBC hyperaggregation. The red line represents the frequency limit $freq_{lim}$ at 0.4 absolute errors as a function of aggregate radius. The blue line represents the product of the limit wavenumber k_{lim} and the effective particle size R_{ag} as a function of aggregate size. 84

Figure 32: Influence of the compactness on the backscattering coefficient. The markers represent the backscattering coefficient based on the SFM. The circles refer to H_R the reduced hematocrit from the initial at 20% hematocrit.. The triangle and the addition symbols represent the backscattering from the RBCs not under periodic boundary conditions. The lines represent the backscattering coefficient given by the EMTSFM model. Each compactness corresponds to a specific color. 85

Figure 33: Variation of spectral slope due to the imposed periodicity. The blue curve stands for the backscattering coefficient from SFM model as performed by Saha et al. The hematocrit is 20%.The blue line represents the backscattering coefficient from the SFM model taken into account non periodic RBCs. The hematocrit is reduced to H_R . The red line corresponds to the EMTSFM theory based on structural parameters of the simulated medium (R_{ag} Aggregate size and H_{int} Compactness). ... 88

Figure 34 : Coefficients de rétrodiffusion selon la procédure de Saha et coll. (en rouge), H_{real} et en supprimant les particules effectives périodisées (en vert), H_R 95

Figure 35: Courbes d'erreur absolue entre le modèle TMEFMS et le modèle MFS calculé selon la procédure de Saha et coll. (en rouge), Hreal et après avoir supprimé les particules périodisées (en vert), H_R..... 95

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur de cette thèse, le professeur Guy Cloutier, pour m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais en septembre 2010 sur la simulation et la modélisation. Je le remercie aussi pour m'avoir enseigné l'autonomie et surtout pour son soutien financier durant ma maîtrise.

Mes remerciements vont également à Dr Emilie Franceschini pour sa patience manifestée à mon égard durant ce travail de maîtrise, pour son aide dans la programmation et pour son hospitalité durant mon séjour au laboratoire de mécanique acoustique à Marseille.

Les professeurs Santiago Constantino et Pierre Mathieu ont accepté d'être membre de mon jury et président rapporteur respectivement, je les en remercie. Je remercie Dr Louise Allard pour les nombreuses remarques en vue d'améliorer la qualité de ce mémoire. Je lui adresse toutes mes reconnaissances.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à tous les étudiants de maîtrise, doctorants, post doctorants, associés de recherche que j'ai eus le plaisir de côtoyer durant ces années au laboratoire de Biorhéologie et d'Ultrasonographie Médicale.

Ce fut un plaisir d'être passé par ce laboratoire.

MERCI À TOUS

«L'enseignement devrait être ainsi : celui qui le reçoit le recueille comme un don inestimable mais jamais comme une contrainte pénible.»

Albert Einstein, Comment je vois le monde

Introduction

Lorsqu'on regarde des globules rouges (GR) aussi appelés érythrocytes ou hématies durant un écoulement ou sur un frottis, on observe un agencement sous forme d'une structure en rouleaux. Ce phénomène qui est réversible s'appelle l'agrégation [4, 5]. Parfois, il y a un niveau anormalement élevé d'agrégation des GR et cette hyperagrégation, s'accompagne d'une hyperviscosité [6].

Une hyperagrégation est associée à des pathologies telles que le diabète, l'hypertension, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance vasculaire cérébrale et la thrombose veineuse [7-9]. L'agrégation est donc un paramètre important pour la compréhension des propriétés rhéologiques du sang car la structure prise par les GR peut causer une diminution de la vitesse d'écoulement dans les veinules post capillaires, une augmentation des résistances périphériques et une diminution de leur nombre dans les capillaires [1]. Caractériser l'agrégation érythrocytaire est une étape essentielle à la compréhension de l'étiologie de ces maladies et, éventuellement, pour la mise en place de solutions préventives.

En clinique, il existe divers instruments de mesure de l'agrégation tel le rhéomètre, la sédimentation, l'agrégamètre laser. Comme tous ces appareils fonctionnent à partir d'un échantillon sanguin, ils ne peuvent pas tenir compte de la dynamique du flot sanguin et il en résulte une mesure incomplète. Par contre, la mesure ultrasonore permet une caractérisation non invasive de l'agrégation érythrocytaire *in vivo* et *in situ* [10, 11]. Cette nouvelle méthode appelée caractérisation tissulaire par ultrasons (CTU) est différente de l'imagerie ultrasonore conventionnelle.

L'imagerie ultrasonore consiste à sonder la région d'intérêt à l'aide d'une onde ultrasonore envoyée par un transducteur et à enregistrer les échos réémis par les inhomogénéités présentes. L'enveloppe du signal rétrodiffusé, appelé aussi ligne A, est extraite et ensuite traduite en images codées en niveaux de gris (ou couleurs) en fonction de l'intensité du signal. Ce traitement de signal, bien qu'efficace, prend en compte

exclusivement l'amplitude au détriment du contenu fréquentiel des signaux et les informations obtenues sont donc limitées. Par contre la CTU utilise les signaux radio fréquentiels bruts pour en extraire plus d'informations, notamment la taille des diffuseurs biologiques. Cette analyse est parfois appelée méthode spectrale d'estimation de taille [12].

La rétrodiffusion ultrasonore par le sang est causée par la densité des GR dans le plasma. Kitamura [11] et Shung [13] ont montré expérimentalement que l'échogénicité ultrasonore (i.e. la texture de l'image ou speckle) dépend qualitativement du niveau d'agrégation des globules rouges: plus l'agrégation est élevée, plus grande est l'échogénicité. Le défi est de passer du qualitatif au quantitatif pour évaluer localement le degré d'agrégation [1].

Pour Mo et Cobbold [14], la modélisation mathématique du contenu spectral des signaux rétrodiffusés par le sang est la meilleure approche pour une évaluation quantitative de la taille et de la structure des agrégats. La grandeur physique décrivant l'échogénicité à modéliser est le coefficient de rétrodiffusion [12] et est défini comme la puissance ultrasonore interceptée par le détecteur dans une direction donnée. Une minimisation des erreurs entre le coefficient de rétrodiffusion mesuré et celui prédit par un modèle adéquat permet d'obtenir des informations sur le diamètre du diffuseur, sa forme, son impédance acoustique ainsi que sur l'organisation spatiale des diffuseurs [15].

La modélisation du coefficient de rétrodiffusion ultrasonore du sang agrégé date de plusieurs décennies. Twersky [16] fut le premier à introduire un facteur de structure emprunté à la mécanique pour modéliser les interférences destructives et constructives. Appelé modèle de facteur de structure (MFS), il est considéré comme un modèle exact de rétrodiffusion des GR, agrégés ou pas. L'élément clé de ce modèle est le facteur de structure qui décrit l'organisation spatiale des GR dans le domaine fréquentiel [17, 18]. MFS est donc un modèle numérique où la résolution du problème inverse, consiste à extraire les paramètres microstructuraux ce qui est d'autant plus laborieux que la densité des GR est élevée. Pour résoudre ce problème inverse en temps réel, des modèles

analytiques approximant le facteur de structure en basses fréquences ont donc été proposés [19, 20] et où le facteur d'entassement W évalue l'ordre spatial dans lequel sont disposés les GR dans le sang [12]. Théoriquement, ce facteur d'entassement représente la rétrodiffusion par des globules rouges en l'absence de tout facteur agrégeant. Pour des GR en suspension dans un milieu salin (et donc sans agrégation), les résultats expérimentaux sont en accord avec le modèle de Twersky [13]. Toutefois avec cette théorie, le coefficient de rétrodiffusion est en erreur lorsqu'il s'agit de globules rouges agrégés [21, 22] car avec cette théorie, il y a une dépendance de la fréquence ultrasonore à la puissance 4 sans oublier que W dépend exclusivement de l'hématocrite (pas de dépendance fréquentielle). Or, l'agrégation est un phénomène qui modifie la dépendance fréquentielle due à des phénomènes d'interférence. Savéry, Yu et Cloutier [6, 23] ont proposé une approximation au second ordre du facteur de structure basée sur les séries de Taylor. Ce nouveau modèle appelé SFSE (Structure Factor Size Estimator) permet l'estimation de 2 paramètres structuraux : le diamètre de l'agrégat D et le facteur d'entassement W . Considérant des applications cliniques, Franceschini et coll. [24] ont ajouté à ce modèle un coefficient d'atténuation qui prend en compte la présence de tissus intermédiaires (i.e. le tissu épithélial) entre le sang et la sonde, renommant ainsi le modèle SFSAE (Structure Factor Size Attenuation Estimator). Les données structurales fournies par le modèle SFSE ont été comparées avec des mesures de taille obtenues par des techniques optiques sur des globules rouges désagrégés à un faible hématocrite de 6%. Avec les 2 méthodes, la grandeur de la taille de diffuseurs est essentiellement du même ordre. Un coefficient de corrélation $r^2=0.76$ a été obtenu entre les diamètres obtenus par méthode optique et ultrasonore [6]. À cause de l'opacité des globules rouges à fort hématocrite aux mesures optiques, la simulation numérique a été utilisée pour valider les techniques ultrasonores utilisées en CTU. Saha et coll. [3] ont simulé des agrégats numériques de différentes tailles et utilisé le modèle SFSE pour « fitter » les coefficients de rétrodiffusion afin de retrouver les valeurs des diamètres d'agrégats. D'après cette validation numérique, le modèle SFSE est incapable de décrire le coefficient de rétrodiffusion basé sur le modèle MFS en hautes fréquences [3]. Les tentatives d'approximer le facteur de structure par une fonction plus simple pour une inversion analytique semblent donc laborieuses.

Les limitations de ces modèles de rétrodiffusion pour la quantification de l'agrégation ont amené Franceschini et coll. [25] à développer une nouvelle théorie qui a été validée par des simulations numériques bidimensionnelles sur des agrégats de globules rouges en comparaison avec le modèle exact de facteur de structure MFS. Ce nouveau modèle de diffusion appelé la Théorie de Milieu Effectif combinée au Modèle de Facteur de Structure (TMEMFS) apparie la théorie du milieu effectif au Modèle du Facteur de Structure (MFS). Cependant, dans l'article en question, la validation est réalisée dans une configuration 2D tandis que la présente étude vise une comparaison dans une configuration 3D plus réaliste. L'aspect novateur de la théorie TMEMFS réside dans la modélisation analytique du coefficient de rétrodiffusion en fonction de trois variables pertinentes pour la caractérisation de l'agrégation érythrocytaire. Ces variables sont: le rayon de l'agrégat, l'hématocrite systémique et la compacité de l'agrégat. Cette dernière représente la concentration de globules rouges à l'intérieur de l'agrégat et dépend de plusieurs facteurs dont le taux de cisaillement et l'énergie d'adhésion des cellules. Aucune technique actuelle ne permet de mesurer ce paramètre structural pour différencier l'agrégation normale de l'hyperagrégation anormale trouvée chez les patients présentant des troubles vasculaires. Ce nouveau modèle de rétrodiffusion ultrasonore établit un lien clair entre la microstructure sanguine et le spectre fréquentiel du coefficient de rétrodiffusion ultrasonore.

L'objectif de ce mémoire est de comparer, dans le problème direct, le modèle analytique TMEMFS avec le modèle numérique MFS. Dans cette configuration du problème direct, les paramètres microstructuraux (propriétés acoustiques du globule rouge, rayon de l'agrégat, hématocrite et compacité) simulés numériquement sont connus et leur effet sur le coefficient de rétrodiffusion est analysé. En proposant un modèle analytique validé pour prédire le coefficient de rétrodiffusion, nous ouvrons la voie vers une mesure clinique de l'agrégation en temps réel.

Ce mémoire débute par une description des propriétés rhéologiques du sang, de la pathophysiologie de l'agrégation et des techniques de mesure existantes. Puis, nous

présenterons la technique ultrasonore et l'intérêt de cette mesure pour évaluer l'agrégation.

Le deuxième chapitre est consacré à une revue de la littérature des modèles acoustiques destinés à prédire la rétrodiffusion des globules rouges en conditions de désagrégation puis en conditions d'agrégation. Cette section nous permettra d'introduire le nouveau modèle TMEMFS.

Le troisième chapitre s'intéresse à la description de la méthode de simulation de l'hyperagrégation. L'algorithme menant à la reproduction d'agrégats compacts, les propriétés structurales des globules rouges agrégés et les étapes du calcul numérique du facteur de structure y sont présentés.

L'article portant sur l'étude de problème direct en 3D du nouveau modèle TMEMFS constitue le quatrième chapitre. Les résultats de la validation y sont présentés et discutés à la lumière des publications.

Le cinquième chapitre est une discussion générale où nous évaluons les objectifs du projet. Le domaine de validité du modèle TMEMFS et la limitation de la méthode de simulation y sont notamment abordés. Enfin, nous proposons des solutions pour surmonter ces limitations avant de conclure ce mémoire.

Chapitre 1 : Agrégation et ultrasons

1- Le sang

Le sang est l'élément vital qui assure des échanges entre l'environnement extérieur et les organes du corps à travers le transport de l'oxygène (des poumons vers les tissus) et des substances absorbées par l'intestin (vers le foie). Le système vasculaire assure aussi l'élimination des dérivés biochimiques provenant du métabolisme [25].

Les propriétés structurales du sang sont complexes en comparaison à celles de certains fluides tels que l'eau, le glycérol et l'acétone. Ceci vient du fait que le sang est une suspension colloïdale de 3 types de particules micrométriques: les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes sanguines qui baignent dans le plasma (Tableau 1). Cette complexité vient aussi de la déformabilité intrinsèque des globules rouges ainsi que de leur faculté à s'agréger [1].

Le plasma est un liquide jaunâtre d'aspect transparent composé de 92% d'eau, 7% de macromolécules et 1% d'hormones et de sels minéraux. L'ensemble de ces protéines permet de stabiliser le volume des cellules sanguines par maintien de la pression osmotique. Parmi ces protéines, le fibrinogène est la plus importante d'un point de vue fonctionnel, de par son rôle primordial dans le processus de coagulation. De plus, lorsque le sang coule à de faibles taux de cisaillement, le fibrinogène est responsable des propriétés électrostatiques à l'origine de l'agrégation érythrocytaire.

D'un point de vue structural (Figure 1), les globules rouges, en l'absence de toute contrainte, se présentent sous la forme de disques biconcaves de 7.5 μm de diamètre et de 2 μm d'épaisseur. La membrane consiste en une fine couche bilipidique comportant des protéines transmembranaires chargées négativement [26] telles que le glycocalyx. Le cytosquelette responsable de cette forme caractéristique du GR est très flexible. Le module élastique de cisaillement de la membrane est de $6 \cdot 10^{-3}$ dyn/cm tandis que le module de courbure est d'environ $1.8 \cdot 10^{-12}$ dyn cm [27]. Ceci confère au globule rouge une forte déformabilité, signe de sa vitalité [28].

Tableau 1 : Composition du sang [28].

Cellule	Densité (g/mL)	Teneur dans sang (#/uL)	Volume (fL)	Dimensions (μm)
Erythrocytes	1.09			
Mature		$5 \cdot 10^6$	87	58.5*2
Reticulocyte		30000	300	8.5*5
Leucocytes	1.07			
Neutrophile		4200	440	9.4
Éosinophile		170	440	9.4
Basophile		50	440	9.4
Lymphocyte		2200	210	7.4
Monocytes		460	460	9.5
Plaquettes	1.03	$3 \cdot 10^5$	15	3

Chez une personne en santé, on trouve ~5 millions de globules rouges par mm^3 de sang [25] et ils demeurent en circulation durant 120 jours environ. Lorsque devenus peu déformables, ils sont remplacés par de nouveaux globules très déformables. Une réduction du tiers leur diamètre permet aux nouveaux GR de franchir les petits capillaires de la rate au détriment des vieux globules rouges rigides qui sont éliminés par les macrophages.

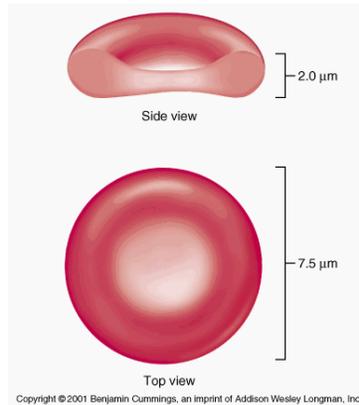


Figure 1 : Structure d'un globule rouge. Tirée de Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

L'hématocrite (Hct), représente le volume occupé par les globules rouges dans le sang; il est d'environ 40-50% pour les hommes et 36-46% pour les femmes. Quant aux globules blancs et aux plaquettes, ils n'occupent que 1% du volume sanguin. Le pourcentage restant (~ 55%) correspond à la portion plasmatique [1]. Les GR contiennent dans leur cytoplasme une molécule d'hémoglobine, qui peut se charger d'oxygène dans les poumons et le donner aux cellules qui en ont de besoin; une fois libéré de l'oxygène, l'hémoglobine se charge de dioxyde de carbone produit par l'activité cellulaire et le libère dans l'atmosphère via les poumons. Les globules rouges sont donc les principaux acteurs dans la respiration.

Appartiennent au système immunitaire, les globules blancs (ou leucocytes) nous protègent contre les agents pathogènes [29]. De forme sphérique (~7 μm de diamètre), ces cellules sont peu déformables. L'effet des leucocytes sur le coefficient de rétrodiffusion ultrasonore est négligeable car ils sont 1000 fois moins nombreux que les GR. Leur présence est donc ignorée dans les études portant sur la microstructure sanguine [28, 29]. Les plaquettes sanguines (ou thrombocytes) et les macromolécules plasmatiques, contribuent à la coagulation sanguine. Les plaquettes se présentent sous la forme de

disques ronds de $2\mu\text{m}$ diamètre. Moins nombreux et plus petits que les globules rouges, ils sont aussi ignorés dans l'analyse structurale de la composition sanguine [28, 29] .

2- Agrégation et déformabilité des globules rouges

L'hémorhéologie est la science qui porte sur les différentes propriétés rhéologiques du sang et de ses composantes ainsi que sur ses propriétés visqueuses [1]. La viscosité est la résistance d'un fluide à s'écouler et provient des forces de frottement exercées les unes sur les autres par les particules composant le fluide (i.e. GR pour le sang). La viscosité est le rapport entre la pression appliquée (c.-à-d. la contrainte) sur le gradient de cisaillement [1]. Si la viscosité est constante quelle que soit la vitesse de cisaillement imposée, le fluide est qualifié de newtonien sinon il est non-newtonien. La viscosité du plasma est de 1.2 centi-Poiseuille (cP) à 37°C et c'est un fluide newtonien alors que le sang est non-Newtonien [1, 29]. On divise les fluides non-newtoniens en rhéofluidifiants ou en rhéoépaississants (Fig. 2). La rhéofluidification définit les fluides dont la viscosité diminue lorsque les vitesses de cisaillement augmentent. C'est le cas du sang. Par contre, si la viscosité augmente lorsque les vitesses de cisaillement augmentent, le fluide est dit rhéoépaississant [1, 30].

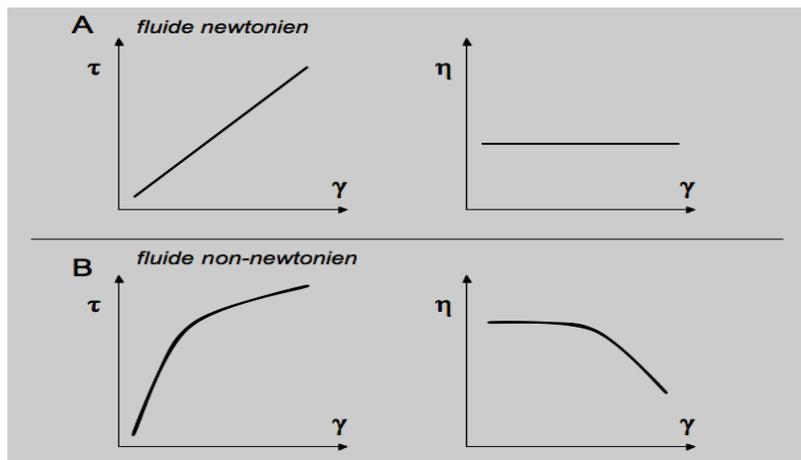


Figure 2 : Différents comportements visqueux d'un fluide. γ est le taux de cisaillement, τ la contrainte et η la viscosité. A: comportement d'un fluide Newtonien. B: comportement non-newtonien du sang. On remarque que la viscosité ne varie pas linéairement en-deçà d'un seuil de cisaillement. Tirée de la thèse de Julien Tripette.

Hormis la température, la viscosité du sang dépend de quatre facteurs: 1) la viscosité plasmatique, 2) l'hématocrite, 3) l'agrégation des globules rouges, 4) leur déformabilité [1].

Le phénomène d'agrégation des globules rouges a été découvert en 1921 par Fahraeus [1]. Ainsi, sur la Fig. 3, on observe un alignement des globules rouges qui forme une structure en rouleaux. Dans les veines et veinules où le taux de cisaillement est généralement faible, l'agrégation des globules est le principal facteur déterminant la viscosité. Dans les artères et artérioles où le taux de cisaillement est élevé, la déformabilité des GR détermine la viscosité. À la Fig.4 on résume cette observation expérimentale [23].

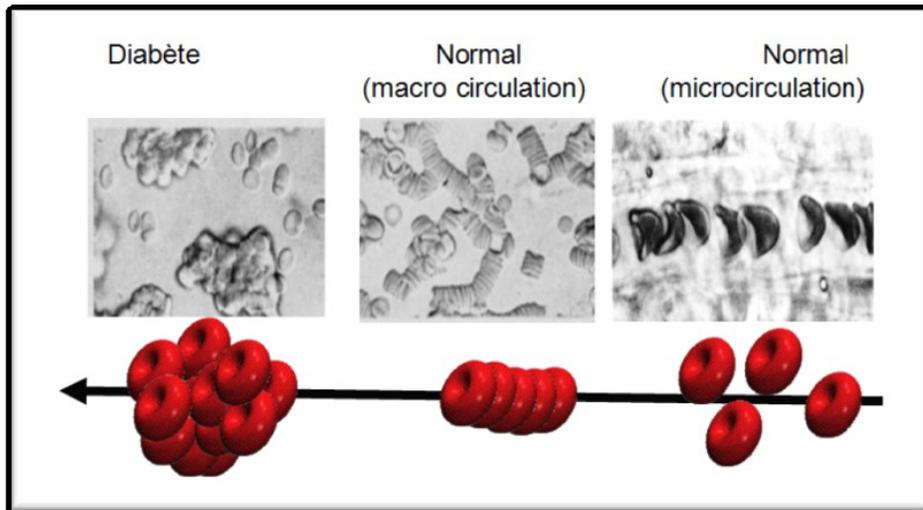


Figure 3 : Lien entre pathologie et agrégation *in vitro*. Les images à gauche et au centre ont été obtenues par microscopie par Schmid-Schonbein (Tirée de [8, 31]). L'image à droite est une micrographie. Tirée de [26].

Une pression minimale ("yield stress") doit être exercée par le cœur pour produire un écoulement du sang et cette pression dépend de la viscosité sanguine. Ceci explique l'association de l'hyperagrégation avec les maladies cardiovasculaires [30]. La vitesse de cisaillement et la contrainte varient à l'intérieur d'une artère. Le gradient de cisaillement favorise l'accumulation de globules rouges au centre des vaisseaux (phénomène de

migration) Il a été démontré que cette interaction cellulaire lors de la migration joue un rôle dans la cinétique de formation des agrégats [32, 33].

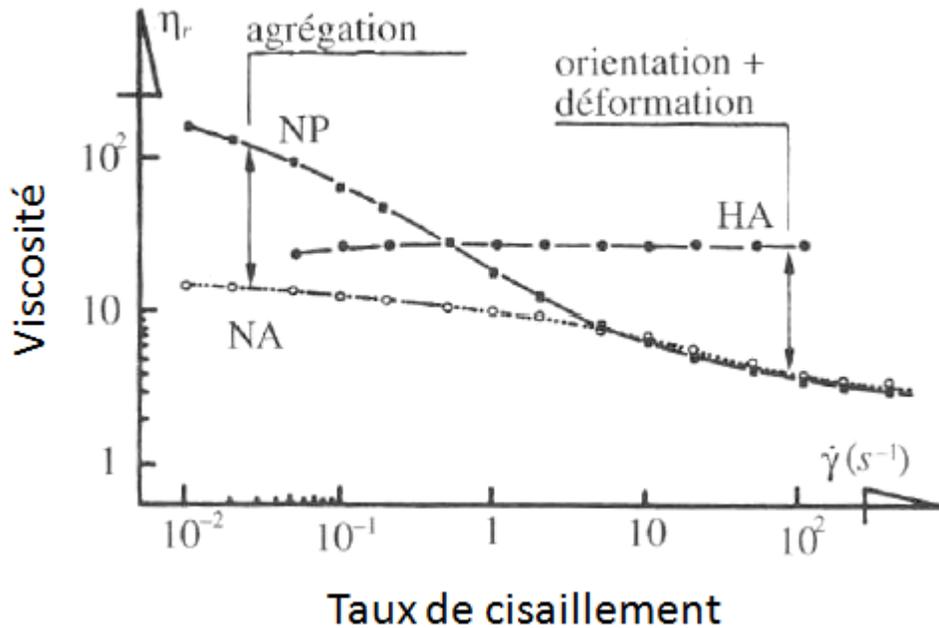


Figure 4 : Effets de l'agrégation et déformation sur la viscosité sanguine en fonction du taux de cisaillement, tirée de [23].

3- Pathophysiologie de l'hémorhéologie

L'intérêt clinique de quantifier le niveau d'agrégation apparaît de plus en plus important dans plusieurs maladies cardiovasculaires [1] car une agrégation pathologique est caractérisée par la formation d'agrégats tridimensionnels très compacts qui modifie la viscosité du sang et peut donc causer des désordres micro-circulatoires. La présence d'une hyperagrégation a été démontrée dans plusieurs pathologies dont entre autre le diabète, l'hypertension, l'athérosclérose, la thrombose et l'hyperlipidémie.

Un niveau élevé d'agrégation érythrocytaire entraîne une augmentation de la viscosité qui réduit la vitesse de l'écoulement [1]. Il s'en suit une acidose et une agrégation plaquettaire,

causant ainsi des dommages sur les cellules endothéliales [34]. La formation d'un thrombus dans les veines et veinules dépend donc indirectement de l'agrégation des GR. Parmi les médicaments pour prévenir la formation d'un thrombus, mentionnons les bêtabloquants et les inhibiteurs des ponts calcium, tel que la ticoplidine [35]. Plusieurs études cliniques démontrent une association entre d'autres pathologies hémorhéologiques et le degré d'agrégation érythrocytaire chez ces patients. On a mesuré un niveau anormalement élevé d'agrégation des GR chez les patients diabétiques [36] et donc une augmentation de la viscosité [37]. Chez les diabétiques on a aussi noté une faible déformabilité des GR et un hémocrite élevé [37]. Demiroglu et coll. [38] ont trouvé une hyperagrégation des globules rouges chez les patients diabétiques atteints de néphropathie. Une hyper agrégation a aussi été trouvée chez des patients atteints de maladies coronariennes [34, 38]. À la Fig. 5 on illustre la présence d'une hyperagrégation chez un patient atteint de maladie cardiaque comparé à un sujet sain [1].

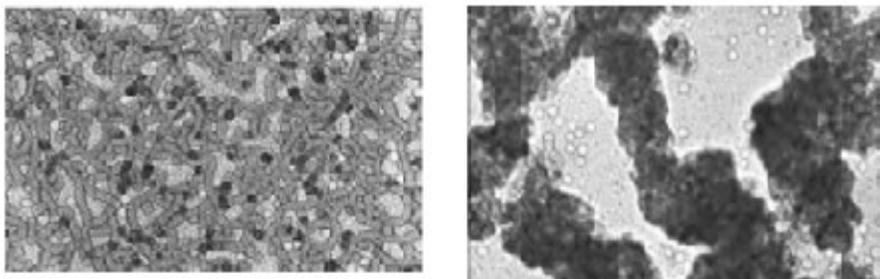


Figure 5 : Images par microscopie optique d'échantillons sanguins. À gauche, sang d'un sujet sain et à droite sang d'un patient ayant eu un infarctus myocardique. Tirée de [1].

Au Tableau 2, on fait des liens entre maladies et agrégation érythrocytaire. On y différencie les effets de l'agrégation par altération de la composition en protéines plasmatiques (« agrégation ») et l'agrégation par altération des propriétés intrinsèques des globules rouges (« agrégabilité »). Le polymère agrégeant utilisé, le Dextran à 70kDa ou 500kDa de poids moléculaire, joue le rôle du fibrinogène en conditions physiologiques [1]. On déduit de ce tableau qu'une corrélation forte existe entre l'agrégation et certaines pathologies vasculaires.

Tableau 2 : Différentes pathologies associées à l'agrégation par des facteurs plasmatiques ou/et cellulaires. (Tiré de [1]).

Pathologies	Spécificités	Polymère agrégeant	Résultats: Plasma ou globule rouge?
Diabète	Type II, sévère	3% Dextran, 70kDa	Agrégation et Agrégabilité[39]
Ischémie Cardiaque	Myocardie aiguë	0.5% Dextran, 500kDa	Agrégation [40]
Lipidémie	Low Density Lipoproteins (LDL)	0.5% Dextran, 500kDa	Agrégation [41]
Hypertension	Modèle Rénal de rat	0.5% Dextran, 500kDa	Agrégation [42]
Hémoglobinopathies	Beta-Thalassémie	0.5% Dextran, 500kDa	Agrégabilité [43]

4- Techniques de mesure en hémorhéologie

Plusieurs appareils de mesures sont disponibles (Fig. 6) [44]. La simplicité de l'ancienne méthode de la mesure du taux de sédimentation fait qu'elle est toujours utilisée comme test complémentaire pour diagnostiquer un syndrome inflammatoire. Elle consiste à suspendre verticalement pendant 1 heure un tube contenant l'échantillon sanguin pour ensuite mesurer la hauteur de la colonne qui varie en fonction du rayon hydrodynamique des agrégats. Une augmentation de la vitesse de sédimentation est synonyme d'augmentation des protéines dans le plasma (fibrinogène, Protéine C Réactive ou CRP). Une autre méthode consiste à utiliser des index géométriques obtenus sur des images de microscopie optique mais cette technique n'est valide que pour des hématokrites <10%. Il y a aussi le viscosimètre où on fait le rapport entre contrainte et cisaillement. C'est une mesure indirecte de l'agrégation mais c'est le déterminant majeur de la viscosité sanguine dans la macrocirculation.

On peut aussi enregistrer les ondes rétrodiffusées sous l'incidence du faisceau laser. L'échantillon sanguin est soumis à des séries de taux de cisaillement pour étudier la cinétique d'agrégation. Cette technique permet de mesurer un indice d'agrégation lié à la structure 3D des agrégats ainsi qu'un indice de déformabilité des GR. Comme toutes les méthodes précédentes, cette technique requiert un échantillon sanguin et est donc une mesure *ex vivo*. L'intérêt d'une mesure *in vivo* réside dans le fait que l'agrégation des GR après prélèvement sanguin ne reflète pas nécessairement la même signification qu'une mesure obtenue par une sonde en intra- ou extra-vasculaire. Il convient donc de différencier l'agrégation mesurée par des techniques *in vitro* et la méthode ultrasonore opérée *in vivo*.



Optique

Laser

Rhéomètre

Viscosimètre

Figure 6 : Techniques de mesure de l'agrégation des globules rouges. Tirée de la présentation de thèse de Savéry David [23].

5- Quantification par ultrasons de l'agrégation

a) L'imagerie conventionnelle par ultrasons (US)

En milieu hospitalier, l'imagerie échographique occupe 25% des modalités d'imagerie [45]. Toutefois, l'imagerie paramétrique par US est une nouvelle voie permettant de mesurer le niveau d'agrégation des globules rouges *in vivo*. En se basant sur les propriétés ultrasonores des tissus, la Caractérisation Tissulaire par Ultrasons (CTU) ou "Quantitative Ultra-Sonore" (QUS) on tente d'évaluer l'état pathophysiologique d'un patient [46] en utilisant l'aspect fréquentiel des signaux qu'on néglige en imagerie conventionnelle. Le lien entre les propriétés ultrasonores et une pathologie reste à être élucidée [13].

Les images US sont formées par interaction des tissus avec l'émission d'ondes mécaniques dont la fréquence se situe généralement entre 1 et 12 MHz en médecine [47]. Les principaux paramètres caractérisant une onde US sont sa puissance, sa vitesse de propagation et sa fréquence. La vitesse de propagation varie selon le milieu où elle se propage. Dans un milieu donné, la vitesse est reliée à la fréquence f par la relation $\lambda = \frac{v}{f}$ où v est la vitesse des ultrasons dans le milieu et λ la longueur d'onde. À une interface

séparant 2 milieux ayant des propriétés ultrasonores différentes, une partie de l'onde incidente est réfléchi vers la source de l'onde et l'autre partie est transmise dans le second milieu.

Une classification a été faite sur l'interaction entre tissus et ultrasons selon le produit ka où $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ est le nombre d'ondes et a est le rayon du diffuseur [48, 49]. La classe 0 correspond à la diffusion des ultrasons liée à l'absorption à l'échelle moléculaire soit une échelle de l'ordre de 10^4 Å. L'absorption est le phénomène par lequel les ondes US se transforment localement en énergie dissipative. La classe 1 concerne la diffusion provenant des cellules et des fibres baignant dans le milieu, $ka \ll 1$. La rétrodiffusion (i.e. diffusion à 180°) est à l'origine du phénomène de speckle ou la texture granuleuse bien connue en imagerie échographique. Compte tenu du fait que les échos sont renvoyés dans de nombreuses directions, les tissus peuvent donc être assimilés à de multiples diffuseurs distribués de manière aléatoire et entraînant la formation d'un ensemble d'ondelettes ultrasonores interférant entre elles. Ces interférences peuvent être constructives ou destructives (augmentation ou diminution de la pression ultrasonore). La classe 2 vient de la diffraction des structures tissulaires résolues spatialement et correspond à l'échelle $\lambda \approx a$, c.-à-d. $ka \approx 1$. La classe 3 concerne la réflexion spéculaire provenant des structures délimitant les tissus. Cette réflexion est à l'origine de l'imagerie conventionnelle de type anatomique. Ce phénomène prédomine à l'échelle $ka \gg 1$ et obéit aux lois de Snell-Descartes connues en optique. La classe 4 prend en compte le facteur temporel du fluide biologique par exemple le flux sanguin. L'imagerie Doppler est l'application la plus courante de l'étude de diffuseurs en mouvement.

En imagerie conventionnelle, seules les classes 3 et 4 sont exploitées à des fins diagnostics tandis que la CTU profite des diffuseurs de la classe 2 pour proposer une meilleure caractérisation des tissus et une détection précoce de pathologies.

b) Agrégation érythrocytaire et imagerie conventionnelle ultrasonore

L'image US conventionnelle est formée à partir de l'enveloppe des signaux radiofréquentiels (RF). Ces signaux RF proviennent de la diffusion par les particules biologiques composant le tissu. La diffusion US a lieu lorsque des objets d'impédances ultrasonores différentes et de taille très petite comparativement à λ sont présents dans le milieu. Les interactions entre les ondes US et les GR agrégés forment, en mode B, des images texturées, ou du speckle, dont l'intensité varie avec le niveau de l'agrégation.

La première image en mode B sur le sang *in vivo* a été réalisée par Sigel et coll. sur des chiens [13]. Kitamura et coll. [11] ont ensuite montré expérimentalement que la texture sur les images échographiques était corrélée à la concentration plasmatique en fibrinogène à la concentration sérique de cholestérol et des triglycérides. Donc finalement à l'agrégation. Ces mêmes auteurs ont réalisé l'expérience illustrée à la Fig. 7:

- Imagerie mode B en circulation normale dans la veine sous-cutanée
- Imagerie mode B lorsqu'un garrot est apposé en aval et en amont de la veine sous-cutanée

La présence du garrot ralentit la circulation, entraînant une agrégation sanguine et une augmentation de l'intensité mesurée.

In vivo

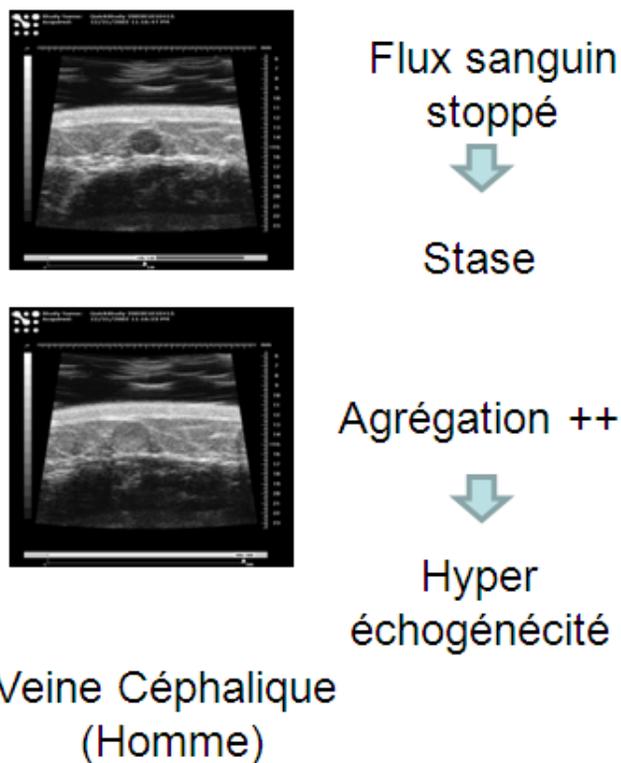


Figure 7 : Variation de l'échogénéicité avec l'agrégation, tirée de [11].

La dépendance de l'échogénéicité en fonction de l'hématocrite, du taux de cisaillement, de la turbulence, du débit sanguin et de la viscosité plasmatique a été aussi largement étudiée *in vitro*. Tous ces paramètres affectent à un certain degré le coefficient de rétrodiffusion, le paramètre quantifiant l'échogénéicité [10, 50]. Toutefois, cette analyse de l'agrégation demeure empirique et qualitative. En procédant par une description physique de l'interaction entre les US et globules rouges, nous visons une approche quantitative de ces phénomènes.

c) Signaux RF et description quantitative des tissus

La CTU est une mesure quantitative de certaines caractéristiques des tissus biologiques. On se sert des signaux RF bruts [12] car ils contiennent de l'information sur la taille, la densité, l'impédance et la microstructure du tissu sondé [12].

Dans le domaine fréquentiel, les signaux sont décrits par la formule suivante [51]:

$$E(f, z) = P^2(f)D^2(f, z)T^2(f, z)S(f)$$

Où E est le spectre radio-fréquentiel des signaux rétrodiffusés par le tissu (RF), P est la fonction de transfert de l'échographe, D tient compte de la diffraction de l'onde causée par l'ouverture finie du transducteur, T modélise l'atténuation des tissus interposés entre la sonde et le milieu étudié et S représente la puissance spectrale provenant de la région d'intérêt c.-à-d. le tissu sanguin. C'est cette dernière qui nous intéresse.

Le spectre S contient des informations sur les propriétés ultrasonores du tissu (la densité de diffuseur, la disposition spatiale des diffuseurs, l'impédance acoustique, la taille des diffuseurs) que l'on tente d'extraire par des méthodes dites d'analyse spectrale. Vu que la position de ces particules fluides est inconnue, généralement on assume un caractère aléatoire de ces diffuseurs.

Lizzi a proposé une méthode standard d'analyse du spectre du signal rétrodiffusé pour caractériser la microstructure tissulaire [15]. Pour ce faire, une régression linéaire est appliquée sur le spectre normalisé (une normalisation par le spectre d'une cible de référence comme un quartz plat en général ou un volume dilué de diffuseurs) afin d'obtenir le coefficient de rétrodiffusion (ou Backscattering Coefficient, BSC).

À partir du coefficient de rétrodiffusion, on extrait la pente spectrale et l'énergie moyenne du spectre. La pente spectrale ("Spectral Slope", SS) est définie comme la pente du coefficient de rétrodiffusion en fonction de la fréquence représentée sur une échelle logarithmique. Cette pente spectrale est corrélée à la taille du diffuseur a . L'énergie

moyenne du spectre ("ou MidBand Fit") est la valeur du coefficient de rétrodiffusion toujours représenté en fonction de la fréquence sur une échelle logarithmique à la fréquence centrale.

Cette technique de caractérisation a été validée avec succès sur différents tissus (l'œil, le foie, le rein, l'os, la prostate et le sein) en comparaison avec l'histologie [15, 52].

d) Signaux RF et description quantitative de l'agrégation des globules rouges

Pour extraire des paramètres structuraux quantitatifs du coefficient de rétrodiffusion du sang, on utilise très souvent la modélisation [17, 18, 53-59]. Vu la complexité de modéliser le coefficient de rétrodiffusion du sang agrégé, les premières tentatives ont été développées principalement pour prédire le coefficient de rétrodiffusion du sang désagrégé, et ce quel que soit l'hématocrite.

Twersky [16] propose le modèle de facteur de structure (MFS) numérique qui est une notion empruntée à la mécanique statistique. Avec ce modèle, on modélise les interférences et on peut prédire le coefficient de rétrodiffusion à condition de connaître la position des globules rouges. Dans le domaine fréquentiel, ce modèle fait le produit de la densité des globules rouges (la sensibilité des ultrasons à la microstructure sanguine) avec leur section efficace et un facteur de structure ce dernier étant la transformée de Fourier de la position des globules rouges rétrodiffusants. Malheureusement, trouver la disposition spatiale des globules, dans le contexte d'une application clinique, c.-à-d. du problème inverse, nécessite d'examiner toutes les possibilités de distributions spatiales, ce qui implique un temps de calcul important pour retrouver la solution optimale correspondant à la structure tissulaire. Le modèle MFS ne peut donc pas être appliqué de manière pratique sans approximer le facteur de structure numérique ce que Twersky a fait. Sa démarche fut à l'origine d'une solution analytique, du coefficient de rétrodiffusion à basses fréquences en substituant le facteur de structure par un facteur d'entassement W [16]. Ce facteur W dépend seulement de l'hématocrite et évalue le degré d'organisation dans lequel les GR

sont disposés. $W=1$ lorsque leur disposition est aléatoire i.e. lorsque le milieu est dilué. À fort hématoците, lorsque la corrélation spatiale des globules rouges augmente, W tend vers 0. Cette approximation a permis d'expliquer la non-linéarité du coefficient de rétrodiffusion en fonction de l'hématoците observée expérimentalement par Shung et coll. sur du sang désagrégé [13]. Dans ce cas spécifique, les résultats expérimentaux concordent en basses fréquences avec la théorie de Twersky [2].

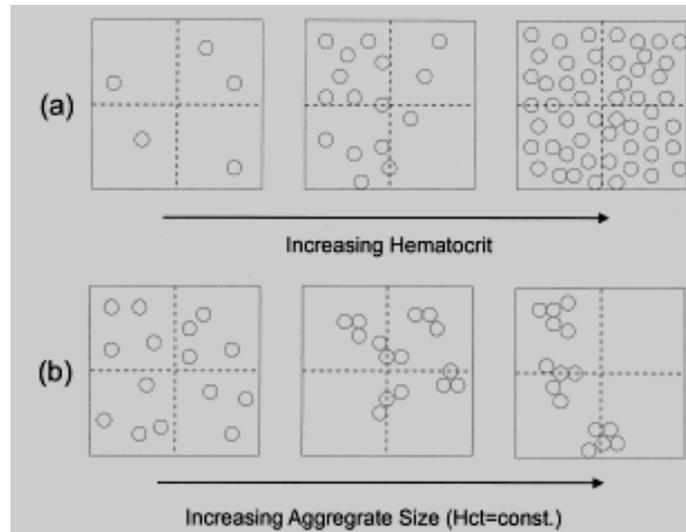


Figure 8: Différences entre les effets de l'hématoците et de l'agrégation érythrocytaire, tirée de [60].

Comme le coefficient de rétrodiffusion du sang agrégé ne dépend pas seulement de l'hématoците mais aussi des différents types d'agrégations (Fig.8), les résultats expérimentaux et numériques en conditions agrégantes n'ont pu être interprétés avec le modèle de Twersky. C'est pourquoi Savéry, Yu et Cloutier [23, 61] ont proposé un développement au second ordre du facteur de structure numérique. Appelé SFSE ce modèle permet l'estimation de 2 paramètres structuraux : le diamètre fractal de l'agrégat (D) et le facteur d'empaquetage (W). Franceschini et coll. [62] ont ajouté à ce modèle un coefficient d'atténuation qui prend en compte la présence d'obstacles (peau) entre le sang

total et la sonde, renommant ainsi le modèle SFSAE. Les méthodes optique et acoustique fournissent des résultats similaires.

Comme les globules rouges à fort hématoците forment un milieu opaque en microscopie optique, la simulation est devenue une approche très utilisée. Pour valider le modèle SFSE, Saha et coll. [3] ont utilisé la simulation pour reproduire une situation où les globules rouges sont hyperagrégés. Avec l'algorithme Hexagonal Compact il est possible de former des agrégats numériques de densité interne de ~74%. Les résultats obtenus indiquent que le modèle SFSE présente des incohérences avec le modèle MFS pour des hautes fréquences qui offrent une meilleure résolution et sont plus sensibles aux arrangements structuraux des agrégats. Ces hautes fréquences pourraient être très utiles pour mesurer le niveau d'agrégation dans les capillaires. Toutefois, elles ont l'inconvénient de s'atténuer plus rapidement que les basses fréquences qui détectent mieux les agrégats mais ne fournissent pas assez d'information sur la microstructure du tissu sanguin. À cela s'ajoute le fait que W et D obéissent à une relation quadratique [6] qui fait qu'ils sont dépendants.

Compte tenu des limitations de ces modèles, Franceschini et coll. [62] ont proposé le modèle dénommé théorie du milieu effectif combiné au modèle de facteur de structure (TMEMFS). Ce modèle a été validé avec des agrégats 2D et comparé avec le modèle MFS. L'aspect novateur du modèle TMEMFS réside dans la modélisation du coefficient de rétrodiffusion en fonction de trois variables permettant de mieux évaluer l'agrégation: 1) le rayon de l'agrégat, 2) sa compacité et 3) l'hématoците systémique. Nous allons utiliser ce modèle dans notre travail.

Le premier objectif de notre travail sera d'implanter et de valider en 3D le modèle TMEMFS. Expérimentalement, il est difficile de contrôler plusieurs paramètres tels: la disposition spatiale des globules rouges, les forces d'attraction et de répulsion, le flot pulsé ou continu, la viscosité du milieu environnant, la forme des globules et des agrégats. C'est pourquoi la modélisation sera notre outil de travail. Notre second objectif sera de quantifier l'agrégation par 3 paramètres (rayon, compacité de l'agrégat, hématoците)

systemique). D'un point de clinique, l'extraction de ces informations structurales pourra se faire par inversion analytique du modèle TMEMFS en utilisant la solution analytique exacte de Wertheim et al. [63] pour prédire le facteur de structure des agrégats.

Chapitre 2 : Modélisation du coefficient de rétrodiffusion ultrasonore du sang

Dans des conditions physiologiques normales, les GR s'agrègent de manière réversible sous forme de structures linéaires appelées rouleaux [1]. Toutefois, certaines maladies caractérisées par une hyperviscosité du sang modifient la teneur ou la composition plasmatique ainsi que les propriétés physico-chimiques des globules rouges. Ces conditions pathologiques augmentent le degré d'agrégation : c'est l'hyperagrégation [1]. Ce processus d'hyperagrégation conduit à la formation de larges structures tridimensionnelles caractérisées par une forte attraction entre les globules rouges. Ces processus anormaux entraînent la création d'agrégats de forme plutôt sphériques [31].

L'approche ultrasonore est une méthode d'investigation prometteuse qui permet de mesurer localement les propriétés acoustiques du sang en profondeur et de manière non invasive [5]. Toutefois, la modélisation s'avère une étape *sine qua none* pour quantifier l'agrégation érythrocytaire *in vivo* [14].

Plusieurs expériences ont démontré qu'en imagerie ultrasonore, l'échogénicité, définie comme la faculté d'un tissu à générer des échos, varie selon l'agrégation, donc la disposition spatiale des GR. Par conséquent, les ultrasons se présentent comme un nouvel outil de caractérisation non invasive du sang dans un intérêt biomédical. Le meilleur moyen pour passer de la description qualitative du milieu sanguin, c'est-à-dire basée sur l'échogénicité, à une description quantitative consiste à proposer un modèle théorique décrivant l'interaction physique des ultrasons incidents et la dense population de globules rouges résidant dans le plasma. C'est la procédure optimale pour extraire rigoureusement des paramètres structuraux des signaux ultrasonores détectés. Nous allons d'abord présenter le paramètre à modéliser qui quantifie cette échogénicité observée au moniteur.

En effet, en caractérisation tissulaire par ultrasons, il existe plusieurs caractéristiques acoustiques pour étudier le tissu sondé dont l'atténuation, la vitesse du son, la distribution d'impédance, le rapport signal sur bruit et la puissance spectrale [64]. Dans notre présente

étude, nous voulons développer une méthode d'analyse générale quantifiant l'échogénicité de façon précise. Pour ce faire, nous choisissons de modéliser le coefficient de rétrodiffusion qui est une mesure de l'échogénicité dans le domaine fréquentiel [33]. C'est une mesure globale de la puissance rétrodiffusée indépendante (après calibration) des caractéristiques de l'appareil échographique telles que le bruit électromécanique et les limites de la dimension du transducteur. Cette méthode spectroscopique présente plusieurs avantages : C'est une technique aisément transférable sur les échographes et c'est une méthode d'analyse qui permet de repousser plus loin les limites de l'imagerie échographique actuelle [65].

Ce chapitre s'intéresse à la modélisation théorique du coefficient de rétrodiffusion par des globules rouges agrégés ou désagrégés. Nous y présentons une revue de la littérature des modèles de rétrodiffusion ultrasonore par les globules rouges. Pour des raisons de simplicité et pour mettre en avant la démarche scientifique ayant mené à la compréhension de l'interaction entre les globules rouges et les ultrasons, nous débutons par la description de la théorie sous-jacente à l'interaction entre les ultrasons et un seul globule rouge. Ensuite, nous traitons de la rétrodiffusion par des globules rouges désagrégés dans deux conditions : dilués (hématocrite faible) et concentrés (hématocrite élevé). Finalement, nous présentons le modèle exact de rétrodiffusion par une suspension colloïdale dense quel que soit le degré d'agrégation. Ce chapitre nous permettra d'introduire notre nouvelle approche théorique sur laquelle repose l'essentiel de nos travaux de recherche.

2.1 Modélisation de la section efficace d'un globule rouge

Lorsque les ondes ultrasonores interagissent avec une suspension de particules ou d'agrégats de particules, elles sont diffusées dans toutes les directions de l'espace. Le transducteur est alors émetteur et récepteur des ondes ultrasonores, c'est-à-dire que l'angle de détection de la diffusion est de 180° ; il s'agit d'une rétrodiffusion ultrasonore. Ces signaux rétrodiffusés renseignent sur les propriétés structurales de la suspension. Les propriétés acoustiques du globule rouge et du plasma environnant sont différentes, d'où la

rétrodiffusion ultrasonore propre au GR (Tableau 3). Ces propriétés acoustiques sont la compressibilité κ et la densité ρ , parfois regroupées sous le terme d'impédance acoustique en raison de l'égalité suivante valide quand le contraste d'impédance est faible [12] : $\gamma_\rho(\vec{r}) - \gamma_\kappa(\vec{r}) \approx 2\gamma_z(\vec{r})$

$\gamma_\kappa(\vec{r}) = \frac{\kappa_{GR}(\vec{r}) - \kappa_{plasma}}{\kappa_{plasma}}$ représente le contraste de compressibilité entre le diffuseur et le

plasma environnant. $\gamma_\rho(\vec{r}) = \frac{\rho_{GR}(\vec{r}) - \rho_{plasma}}{\rho_{GR}(\vec{r})}$ représente le contraste de densité entre le

diffuseur et le plasma environnant. $\gamma_z(\vec{r}) = \frac{z_{GR}(\vec{r}) - z_{plasma}}{z_{plasma}}$ est le contraste d'impédance

acoustique et dépend de la localisation spatiale des diffuseurs. Ce contraste d'impédance entre le globule rouge et le plasma est faible et vaut approximativement: 11.4%.

Tableau 3 : Propriétés acoustiques des diffuseurs principaux présents dans le sang. On note la faible différence de contraste entre le plasma et le globule rouge.

	Densité ρ	Compressibilité κ	Impédance z
Unités	kg.m ⁻³	Pa ⁻¹	MRayl
Globule Rouge	1092	3.41 *10 ⁻¹⁰	1.766
Plasma	1021	4.09*10 ⁻¹⁰	1.580

La faculté d'une particule à réémettre une onde ultrasonore est quantifiée par la section efficace σ_b définie comme la puissance rétrodiffusée par une particule par unité

d'intensité incidente et par unité d'angle solide. Dans l'hypothèse où l'effet de l'épaisseur de la membrane et la viscosité intracellulaire du globule rouge sont négligés, Rayleigh propose un modèle théorique de la section efficace moyennant une longueur d'onde ultrasonore incidente supérieure à la taille du globule rouge [12].

Bien que plus proche d'un aspect torique, le globule rouge est souvent approximé par une sphère de volume équivalent [66]. Cette approximation se justifie car pour un volume corpusculaire moyen de $87 \mu\text{m}^3$, le rayon de la sphère équivalente est $2.75 \mu\text{m}$. Comme les fréquences ultrasonores utilisées en clinique vont généralement de 4 à 30 MHz, soit des longueurs d'onde de $50 \mu\text{m}$ à $300 \mu\text{m}$, le rayon du globule est donc très petit devant la longueur d'onde. Dans ces conditions, l'effet de la forme du diffuseur n'intervient pas dans le champ rétrodiffusé [66].

Théoriquement, la section efficace de Rayleigh d'un tel diffuseur appliqué au globule rouge s'écrit comme suit [66]:

$$\sigma_b(-2\vec{k}) = \frac{k^4 V_{GR}^2}{16\pi^2} \left(\gamma_\kappa - \frac{\gamma_\rho}{1 - \frac{\gamma_\rho}{3}} \right)^2$$

avec $k = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{2\pi f}{c}$ le nombre d'onde où λ est la longueur d'onde ultrasonore, f la fréquence et c la vitesse des ultrasons, $V_{GR} = 87 \mu\text{m}^3$ le volume de la sphère équivalente, γ_κ le contraste de compressibilité et γ_ρ le contraste de densité.

Sous l'approximation d'une faible diffusion ($\gamma_z \approx 11\%$), la section efficace de Rayleigh s'écrit après substitution [66] :

$$\sigma_b(-2\vec{k}) = \frac{k^4 V_{GR}^2}{4\pi^2} \gamma_z^2$$

La rétrodiffusion Rayleigh est donc proportionnelle au carré du volume du globule rouge (ou rayon à la puissance 6), à la fréquence ultrasonore élevée à la puissance 4 et au contraste d'impédance au carré.

Notons que cette expression ne dépend pas de la forme du diffuseur. Avant de passer à la rétrodiffusion par une suspension de globules rouges, nous allons étudier dans quelle mesure la forme du diffuseur altère la section efficace de rétrodiffusion. À ce propos, Ishimaru [67] suggère qu'une limite acceptable de la diffusion Rayleigh serait l'égalité suivante : $ka = \frac{\pi}{10}$. Au-delà, un facteur correctif devrait être inclus pour prendre en compte l'influence de la forme du diffuseur.

2.2 Section efficace de rétrodiffusion d'un globule rouge dans les conditions non-Rayleigh

L'approximation de Born émet l'hypothèse que le champ total diffusé, $p_{tot}(\vec{r}) = p_i(\vec{r}) + p_s(\vec{r})$, peut être simplifié par $p_{tot}(\vec{r}) \approx p_i(\vec{r})$ car le champ diffusé $p_s(\vec{r})$ est faible [12]: $p_i(\vec{r}) \gg p_s(\vec{r})$. Cette approximation n'est valide que pour des contrastes d'impédance très faibles, typiquement le fluide sanguin pour lequel $\gamma_z \approx 11\%$.

Cette approximation permet d'établir une relation explicite entre la section efficace et le contraste d'impédance du globule rouge. La probabilité de diffusion d'une particule dépend des transformées de Fourier spatiales des inhomogénéités présentes dans le volume \mathcal{V} sondé.

En faisant ressortir le facteur de forme $F(-2\vec{k})$, un facteur correctif dépendant de la forme du diffuseur, la section efficace de rétrodiffusion dans les conditions non-Rayleigh s'écrit de la manière suivante [12, 66]:

$$\sigma_b(-2k) = \frac{k^4 V_{GR}^2 \gamma_z^2}{4\pi^2} F(-2\vec{k})$$

avec

$$F(-2\vec{k}) = \frac{1}{\gamma_z^2 V_{GR}^2} \left| \int_{V_{GR}} \gamma_z(\vec{r}) e^{2i\vec{k} \cdot \vec{r}} d^3r \right|^2$$

Il convient de souligner que cette formulation est en conformité avec la théorie de Rayleigh. Lorsque la taille de la particule diffusante est très petite comparée à la longueur d'onde, le terme $e^{2i\vec{k} \cdot \vec{r}}$ tend vers 1 et on retrouve la section efficace de Rayleigh. Le facteur de forme permet de prendre en compte la géométrie du diffuseur quelle que soit la fréquence d'insonification.

En assimilant le globule rouge à une sphère de volume équivalent, le facteur de forme se calcule suivant la relation [12]:

$$F(-2\vec{k}) = 9 \left(\frac{\sin(2ka) - 2ka \cos(2ka)}{(2ka)^3} \right)^2$$

Avant de conclure cette section, il est informatif d'explorer les limites de cette approximation géométrique du globule rouge de forme biconcave par une forme simple sphérique. Savéry et Cloutier [66] ont comparé la section efficace de rétrodiffusion de plusieurs géométries : biconcave, sphérique, cylindrique et elliptique. Les résultats, basés sur des expériences *in silico*, ne révèlent aucune différence entre les sections de rétrodiffusion ultrasonore d'une sphère et du GR de forme biconcave pour des fréquences allant jusqu'à 21MHz. Au-delà de cette limite, l'effet de la forme entraîne des écarts entre les sections efficaces des 2 géométries. Toutefois, des expériences menées sur une suspension sanguine en l'absence d'agrégation montrent une dépendance en fréquence de l'ordre de la puissance 4. Il est donc raisonnable de repousser la limite fréquentielle prédite par simulation numérique par Savéry et coll. à des fréquences plus élevées car, en réalité, les GR sont orientés aléatoirement dans un vaisseau sanguin entraînant un effet de

compensation. Pour résumer, dans un contexte clinique, l'approximation du globule rouge par une sphère de volume équivalent est tout à fait valide.

Après avoir présenté la rétrodiffusion par un seul globule, nous passons ici à la modélisation de la rétrodiffusion par une suspension de globules rouges désagrégés. Nous nous intéressons dans un premier temps à l'interaction entre les ultrasons et une suspension de globules rouges désagrégés diluée ($H < 3\%$) puis à l'interaction entre les ultrasons et une suspension de globules rouges désagrégés concentrée à un hématoците physiologique ($H = 40\%$).

2.3 Coefficient de rétrodiffusion par une suspension de globules rouges désagrégés

Plusieurs approches existent pour aborder la modélisation de l'interaction entre les ultrasons et un milieu dense de globules rouges [68]: l'approche particulaire, l'approche continue et l'approche hybride.

Dans l'approche particulaire, les globules rouges sont modélisés par des diffuseurs discrets dans l'espace. L'amplitude de la pression rétrodiffusée est alors obtenue en faisant la somme de l'amplitude de l'onde réémise par chaque globule rouge et en modélisant l'interaction entre les GR par un facteur d'entassement. Twersky [19, 20, 69] utilise cette approche particulaire pour modéliser le comportement du coefficient de rétrodiffusion par le sang. À noter que dans cette approche, la compressibilité et la densité (de façon équivalente, l'impédance pour un milieu faiblement diffusant) sont des constantes ne dépendant pas de la position spatiale.

Dans l'approche continue, l'amplitude de la pression rétrodiffusée est calculée par sommation sur tous les points de l'espace des fluctuations de compressibilité et de densité du sang, considéré comme un milieu continu. Dans cette approche, les fluctuations en densité et compressibilité sont des variables dépendant de la position. Angelsen [53] fut le premier à appliquer l'approche continue à la rétrodiffusion ultrasonore par le sang.

Mo et Cobbold [12] ont proposé l'approche hybride qui combine les atouts des approches précédentes. Sachant que deux globules séparés par une distance inférieure à $\frac{\lambda}{20}$ ne sont pas distinguables par le transducteur, l'unité de base de diffusion est approximée par un volume élémentaire, le voxel. Pour une vitesse de propagation de 1570m/s et une fréquence de 5MHz, le voxel est d'un volume égal à $4096 \mu\text{m}^3$ ($16*16*16$ avec $\lambda(=\frac{1570}{5e6}) \approx 16$). L'amplitude totale reçue est la sommation de la contribution de chaque voxel. Dans notre étude, nous optons pour l'approche particulière étant donné que les sources acoustiques dans le sang sont les globules rouges, des diffuseurs spatialement définis.

2.3.1. Cas d'un milieu dilué (H<6%)

Considérons une suspension de GR dilués dont l'hématocrite est inférieur à 6% et une onde plane incidente sur ce milieu. La différence entre les impédances acoustiques des globules rouges et le milieu environnant va engendrer une réflexion de l'onde incidente. L'émetteur et le détecteur étant confondus, nous mesurons le coefficient de rétrodiffusion.

Dans une telle configuration, tous les globules rouges contribuent de manière égale à la rétrodiffusion. Le coefficient de rétrodiffusion provenant d'un tel milieu satisfait la loi d'additivité telle que:

$$BSC(-2\vec{k}) = \frac{(\sigma_b(-2\vec{k}) + \sigma_b(-2\vec{k}) + \sigma_b(-2\vec{k}) + \dots + \sigma_b(-2\vec{k}))}{V_{tot}} = m\sigma_b(-2\vec{k})$$

avec $m = \frac{N}{V_{tot}}$ la densité de globule rouges dans le volume sondé en mm^{-3} où N est le nombre de globules rouges et V_{tot} le volume sondé. σ_b représente la section efficace de

rétrodiffusion d'un seul GR. Cette modélisation s'applique parfaitement tant qu'il n'y a aucune corrélation spatiale entre les diffuseurs.

Cette expression du coefficient de rétrodiffusion suppose des globules rouges disposés de telle sorte que les ondes rétrodiffusées par chacun d'eux n'interfèrent pas avec les autres [54]. On dit qu'il y a absence de corrélation et la rétrodiffusion incohérente se calcule par additivité des sections efficaces de rétrodiffusion.

En optique, on retrouve ce phénomène sous le terme d'illumination incohérente car l'intensité totale est la somme des intensités des diffuseurs. Cette relation appropriée pour un milieu faiblement dense n'est plus valide lorsqu'on s'approche des conditions physiologiques où l'hématocrite systémique est d'environ 40%. En effet, à une telle densité volumique, les interférences deviennent importantes et l'hypothèse de non-corrélation entre les positions spatiales des globules rouges est invalide.

2.3.2. Cas d'un milieu dense ($H > 6\%$)

L'équation du coefficient de rétrodiffusion (ou BSC) présentée juste avant s'applique pour des hématocrites inférieurs à 6% environ. Au-delà, la position d'un GR dépend de la position du globule voisin. Dans les conditions physiologiques, l'hématocrite est de l'ordre de 40%, réduisant *de facto* les distances entre eux. Modéliser le coefficient de rétrodiffusion d'un tel milieu revient à prendre en compte la corrélation spatiale entre les diffuseurs que sont les globules rouges.

D'un point de vue statistique, la probabilité de distribution des distances entre les globules pour un fort hématocrite s'éloigne de la distribution uniforme. Celle-ci représente l'absence de corrélation des milieux dilués étudiés dans la section précédente. Ainsi, il faut modéliser cette distribution non uniforme afin de mieux comprendre l'effet de la disposition spatiale des globules rouges sur le coefficient de rétrodiffusion. Un facteur correctif mesurant l'écart du coefficient de rétrodiffusion de la distribution uniforme a été introduit par le mathématicien Twersky.

Twersky introduit dans les années 1980 le facteur de structure inter-particule $S(-2\vec{k})$ [16], dérivé de la mécanique statistique et largement utilisé dans la caractérisation des matériaux par rayons X [70]. Ce paramètre permet de modéliser la disposition spatiale des globules rouges dans le sang à des conditions physiologiques. Le facteur de structure s'écrit pour un milieu monodisperse, typiquement le cas du sang composé majoritairement de globules rouges, comme suit [66]:

$$S(-2\vec{k}) = E \left[\frac{1}{N} \left| \sum_{i=1}^N e^{-i2\vec{k} \cdot \vec{r}_i} \right|^2 \right]$$

N est le nombre de globules rouges et r_i est la position spatiale de chaque globule rouge. E représente la moyenne d'ensemble. En traitement du signal, le facteur de structure se définit, au regard de son expression mathématique, comme la transformée de Fourier 3D des centres des diffuseurs. Ce facteur de structure dépend de la fréquence d'insonification et de l'arrangement spatial des globules rouges dans notre contexte d'application biomédicale.

Le facteur de structure est aussi la transformée de Fourier de la fonction de distribution radiale $g(r)$, c'est-à-dire. fonction de corrélation de paires pour des diffuseurs sphériques, et s'écrit [13]:

$$S(-2\vec{k}) = 1 + m \int [g(r) - 1] e^{-i2\vec{k} \cdot \vec{r}} dr$$

Où m est la densité volumique de diffuseurs. Notons au passage que $g(r) - 1$ est appelée la fonction de corrélation totale.

Mathématiquement, résoudre cette équation implique la connaissance de la fonction de distribution radiale, donc de la loi de probabilité qui régit l'emplacement des diffuseurs, ce qui n'est pas connu a priori pour le sang physiologique. Dans le cas d'un milieu très dilué, $g(r)$ est une distribution uniforme.

En examinant le facteur de structure en basses fréquences, Twersky introduit la notion de facteur d'entassement W [16] :

$$W = S(k \rightarrow 0) = 1 + m \int (g(r) - 1) dr$$

Ainsi, le coefficient de rétrodiffusion s'écrit [16]:

$$BSC(-2\vec{k}) = m\sigma_b(-2\vec{k})W$$

Cette équation est en conformité avec le modèle du coefficient de rétrodiffusion proposé avant pour un milieu dilué. En l'absence de corrélation entre les globules rouges, $g(r)$ est égal à 1 et donc W tend vers l'unité [13]. W est un facteur de correction qui mesure la corrélation spatiale entre les diffuseurs dans le domaine fréquentiel.

Ce facteur d'entassement, contrairement au facteur de structure, peut se calculer sur la base d'équation analytique. En 3 dimensions, pour des particules sphériques non pénétrables, le facteur d'entassement s'écrit [16]:

$$S(0) = W_{sphere} = \frac{(1-H)^4}{(1+2H)^2}$$

et en 2 dimensions, pour des cylindres non pénétrables:

$$S(0) = W_{cylindre} = \frac{(1-H)^3}{(1+H)}$$

où H représente l'hématocrite systémique.

Le facteur d'entassement ne dépend que de l'hématocrite. En guise d'illustration, nous avons représenté dans la figure 9 le comportement de $H*W$ en fonction de l'hématocrite.

Yuan et Shung [21, 22] ont mesuré le coefficient de rétrodiffusion provenant d'un sang peu agrégeant d'origine bovine. Les résultats expérimentaux concordent

sensiblement avec les résultats théoriques prévus par le facteur d'entassement. Le pic caractéristique à environ 13% prévu par la théorie de Twersky a été confirmé par les études expérimentales (Figures 9 et 10).

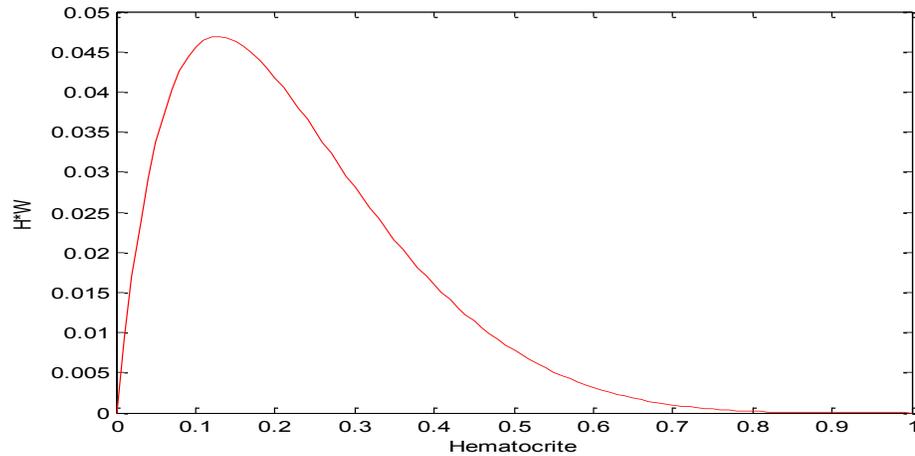


Figure 9 : Évolution du facteur d'entassement W en fonction de l'hématocrite (H) pour des sphères de volume équivalent au globule rouge.

Récemment, Wang et Shung [2] ont confirmé à nouveau expérimentalement la validité du modèle d'approximation en basse fréquence de Twersky. Ces résultats obtenus à l'aide d'un cathéter destiné à des applications intravasculaires sont reportés dans la figure 10. Toutefois, ce modèle approximant le facteur de structure, proposé par Twersky, ne peut pas être appliqué dans le contexte de globules rouges agrégés et hyperagrégés.

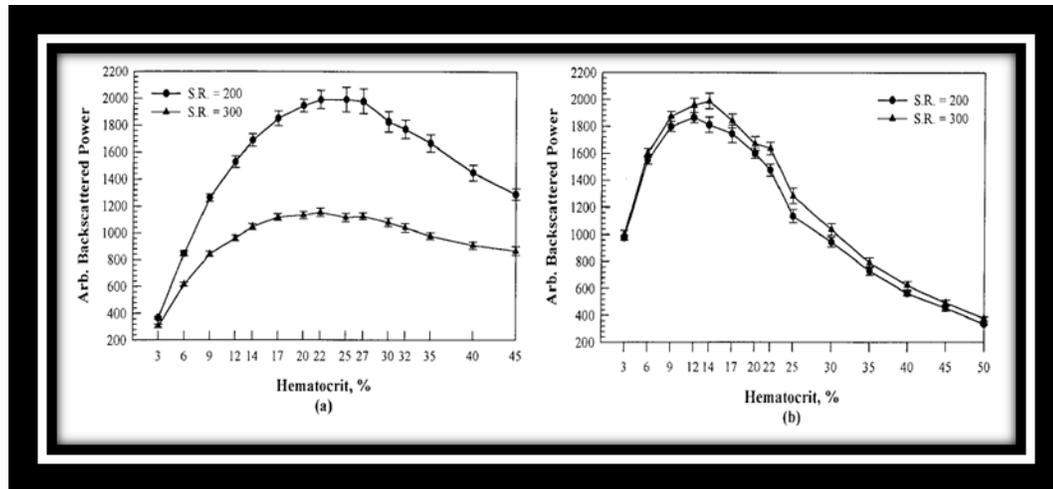


Figure 10 : Mesure expérimentale de la puissance rétrodiffusée par le sang normal d'origine bovine (a) et par une suspension saline de globules rouges (b) à différents taux de cisaillements SR (Shear Rates). En augmentant le taux de cisaillement, le processus de désagrégation s'entame, d'où une diminution de l'amplitude observée. Tirée de [2]

2.4 Coefficient de rétrodiffusion par des globules rouges agrégés

La modélisation du coefficient de rétrodiffusion d'un milieu dense est complexe *a fortiori* dans les conditions favorisant l'agrégation. Dans ce contexte, la modélisation requiert de prendre en compte les forces d'interaction entre les globules rouges notamment lorsque leur densité est élevée. En effet, l'énergie d'interaction dicte la

position spatiale des globules rouges responsables de la rétrodiffusion. Dans ce contexte, Twersky et coll. [16], Fontaine et coll.[4, 71] et Savéry et coll.[18] ont introduit et appliqué le facteur de structure pour une caractérisation de l'agrégation par ultrasons. Le facteur de structure est une notion mathématique qui modélise la disposition spatiale des particules dans le sang quel que soit le type d'écoulement. Contrairement au facteur d'entassement W présenté dans la section précédente, le facteur de structure dépend de la fréquence. Rappelons que W est une approximation basse fréquence du facteur de structure.

Le coefficient de rétrodiffusion exact du sang total, quel que soit son degré d'agrégation, est donné par le Modèle du Facteur de Structure, MFS, et s'écrit [16, 71, 72]:

$$BSC_{MFS}(-2\vec{k}) = m\sigma_b S(-2\vec{k})$$

Où m est la densité de globules rouges, σ_b la section efficace de rétrodiffusion et $S(-2\vec{k})$ le facteur de structure.

D'un point de vue numérique, le facteur de structure se calcule aisément connaissant la matrice densité $D(\vec{r})$ des globules rouges [18, 62]:

$$S(-2\vec{k}) = E \left[\frac{1}{N} \left| \int D(\vec{r}) e^{-i2\vec{k}\vec{r}} \right|^2 \right]$$

Cette matrice de densité est une fonction de pics de Dirac, donc un ensemble de 1 et 0 indiquant la présence ou l'absence de diffuseurs, telle que:

$$D(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N \delta(\vec{r} - \vec{r}_i)$$

Avec r indiquant la position de chaque agrégat i . Lors de nos simulations basées sur le modèle de facteur de structure, nous calculons le facteur de structure en passant par la programmation de la matrice densité.

$S(-2\vec{k})$ est un terme fréquence-dépendant. Il contient l'information sur l'arrangement spatial des globules rouges, donc l'information requise pour caractériser l'agrégation. De ce point de vue, le facteur de structure nécessite de notre part une plus grande attention afin de tirer bénéfice des renseignements qu'il contient. Nous allons donc nous attarder sur le facteur de structure afin de mettre en exergue sa pertinence dans notre étude par ultrasons de l'agrégation.

Le facteur de structure peut se réécrire en fonction de la fonction de distribution radiale (ou fonction de corrélation de paires) sous la forme suivante [54].

$$S(-2\vec{k}) = 1 + m \int [g(r) - 1] e^{-i2\vec{k}\vec{r}} dr$$

où m est la densité volumique de diffuseurs. La fonction de distribution radiale, est définie comme [73]:

$$g(\vec{r}) = \frac{dN/dV(\vec{r})}{N/V}$$

Où N et dN sont respectivement le nombre de particules dans le volume V et le petit volume dV situé à la distance r . En faisant quelques manipulations, indiquées ci-dessous, on peut redéfinir la fonction de distribution radiale comme une mesure locale nous disant de combien notre distribution de globules rouges, dN , est proche d'une distribution uniforme:

$$g(\vec{r}) = \frac{dN/N}{dV/V} = \frac{P}{dV/V}$$

$$h(\vec{r}) = g(\vec{r}) - 1$$

P est la probabilité de trouver une particule, le globule rouge, à une distance r dans un petit élément de volume dV . La fonction $g(r)$ est importante car elle renseigne, selon la théorie de la mécanique statistique et de la thermodynamique, sur :

- 1) la disposition spatiale des particules, donc des globules rouges dans notre cas
- 2) la nature du potentiel d'interaction entre les globules rouges.

Notons que la fonction de distribution radiale modifiée, $h(\vec{r})$ ou la fonction de corrélation totale, permet une meilleure visibilité de la déviation de notre distribution de particules du comportement asymptotique de la fonction $g(r)$ aux grandes distances (c'est-à-dire. la distribution uniforme).

À titre d'exemple, et comme indiqué sur la figure 11, la fonction de distribution radiale est calculée de manière suivante où $\rho(\vec{r}) = N(\vec{r})/2\pi r dr$ est la densité de probabilité avec $N(r)$, le nombre globules rouges moyens dans une couronne de rayon r et de surface $2\pi r dr$. La fonction de distribution radiale est calculée simplement en faisant le rapport suivant $g(\vec{r}) = \rho(\vec{r}) / \rho$ où le dénominateur est la densité surfacique moyenne de globules. En 3D, l'aire de la couronne est remplacée par le volume $4\pi.r^2 dr$. La fonction de distribution radiale $g(\vec{r})$ est nulle en dessous d'une certaine distance correspondant au rayon effectif du globule. Le premier pic intense correspond aux premières distances inter globules. Le non-recouvrement se manifeste dans les minimums qui suivent les pics intenses. Quand r augmente, $g(\vec{r})$ tend vers 1; il y a une perte de la corrélation entre paires des globules rouges baignant dans le plasma liquidien. Cette fonction permet donc de connaître les distances entre diffuseurs, paramètre pertinent pour l'agrégation.

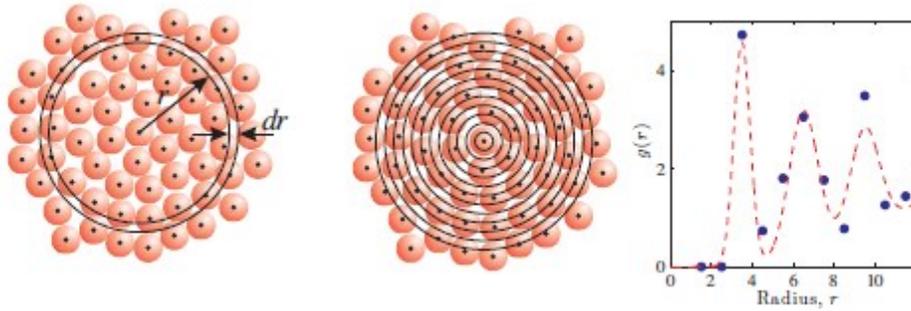


Figure 11 : Principe de calcul de la fonction de distribution radiale ou fonction de corrélation de paires. On désigne une particule au centre puis on cherche le nombre de paires discrétisé dans les sphères successives lorsqu'on est en 3 dimensions. Le choix de la particule au centre n'est pas important car on fait un moyennage d'ensemble pour obtenir la distribution radiale. En l'absence de recouvrement, les particules se situent à des multiples de r ($2r, 4r, \dots$). Le nombre de particules, donc de globules ici, dans la

couronne délimitée par r et dr est simplement $\frac{N}{V}(4\pi r^2 dr)g(r)$. Tirée de [74].

Afin de mieux comprendre l'intérêt et l'apport du facteur de structure d'un point de vue expérimental, nous présentons un exemple emprunté à la physique atomique (Figure 12). En caractérisation des matériaux (par rayons X ou neutrons), on remarque expérimentalement que les solides présentent une distribution discrète et structurée de leurs composants élémentaires tandis que les gaz ont plutôt une distribution uniforme de leurs particules, dues au caractère aléatoire de leur localisation dans l'espace.

Les liquides tels que le sang se situent entre les 2. En effet, les liquides ont un ordre local qui se perd au fur et à mesure qu'on s'éloigne de la particule choisie comme origine pour calculer la fonction de distribution radiale. La fonction de distribution radiale et le facteur de structure sont liés par une paire de transformée de Fourier. Par conséquent, le facteur de structure permet donc d'extraire les informations sur la distribution spatiale des

globules. Notons que dans un agrégat, les globules seront plutôt structurés comme dans un solide, vu l'ordre spatial des globules rouges internes à cet agrégat et la forte compacité.

Le modèle de facteur de structure nécessite la connaissance *a priori* de la disposition des globules rouges. Cette information est contenue dans la matrice densité. Lors de l'inversion du modèle exact de rétrodiffusion, le modèle de facteur de structure, la résolution nécessitera un temps de calcul très important pour essayer plusieurs distributions spatiales afin de trouver la solution optimale. Rappelons au passage que pour 1 mm^3 de volume sanguin, il faut prévoir la présence de 5 millions de globules rouges. Le temps requis pour résoudre le problème inverse lors d'une expérience *in vivo* constitue un inconvénient notable car l'atout de la mesure ultrasonore en temps réel disparaît si on envisage d'utiliser ce modèle numérique.

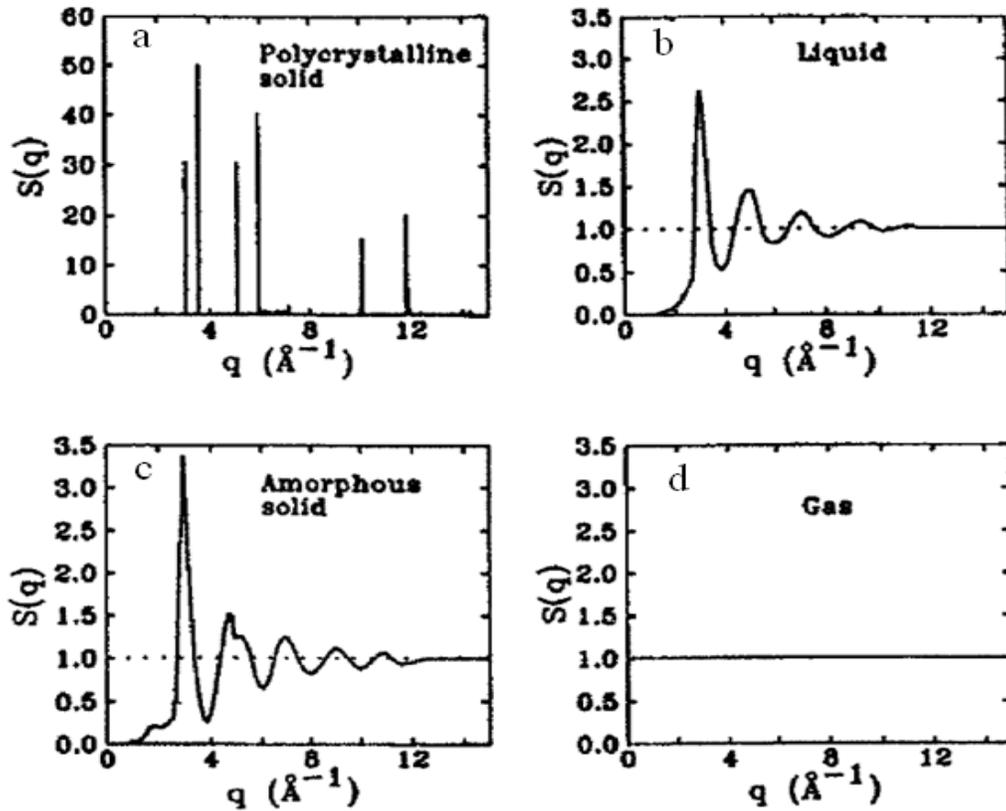


Figure 12 : Facteurs de structure d'un solide (a), liquide (b) et gaz (c). Un agrégat de globules rouges est plutôt structuré comme un solide (a). Les pics réguliers observés pour un solide montrent la grande régularité de la disposition des diffuseurs en fonction de la distance. Dans un gaz, il n'y a aucun arrangement entre les molécules et la distribution est complètement uniforme. Les liquides ont, quant à eux, un comportement entre les deux. Le premier pic renseigne sur la taille du diffuseur. Le début de la courbe RDF à courte distance informe sur la présence ou non de recouvrement entre les particules. Un agrégat se rapprochera plus de la RDF d'un solide vu l'ordre des globules rouges internes à un agrégat surtout s'il est compacté. Tirée de [75].

Pour cette raison, Savéry D. et Cloutier G.[23], puis Yu F. et Cloutier G.[6], ont introduit une approximation du facteur de structure basé sur son expansion par des séries de Taylor. Le développement est effectué comme suit :

$$S(-2\vec{k}) = C_0 + (-2\vec{k})C_1 + (-2\vec{k})C_2$$

$$C_1 = 0$$

$$S(-2\vec{k}) = W - 4Rg^2k^2$$

C_0 est le facteur d'empaquetage, W . Dans l'hypothèse d'une isotropie des agrégats, C_1 est nul. Par analyse dimensionnelle, C_2 est une surface, soit le rayon de giration d'une sphère au carré. Notons que le rayon de giration de la sphère est donné par

$$[33] Rg = R\sqrt{\frac{3}{5}}.$$

Cette expression permet une inversion analytique du facteur de structure. De plus, bien que limité au second ordre, ce modèle appelé Structure Factor Size Estimation, fournit 2 paramètres quantitatifs intéressants: le facteur d'entassement W et le diamètre de l'agrégat D [61].

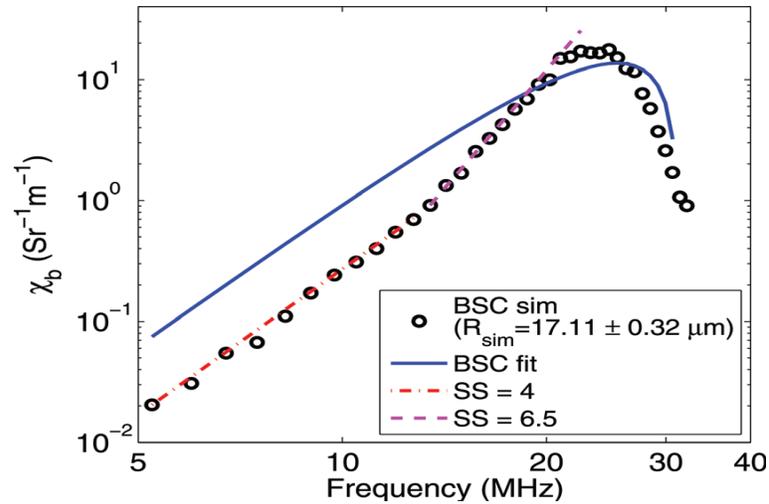


Figure 13 : Comparaison du coefficient de rétrodiffusion par des agrégats simulés (les cercles noirs) et l'estimation par le modèle SFSE (en bleu), tirée de[58]. La courbe rouge suit la prédiction de Rayleigh avec une pente égale à 4. La pente de 6.5 décrit mieux la variation du coefficient de rétrodiffusion au-delà de 10MHz.

D'après la validation numérique menée par Saha et coll.[3], le modèle SFSE présente des limitations en hautes fréquences. Ce modèle ne prend pas en compte les oscillations caractéristiques de la microstructure sanguine. En effet, le modèle SFSE est une équation du second ordre, et par conséquent, ne modélise pas ces multiples rebonds observés en hautes fréquences.

Dans la courbe de la figure 13, le modèle SFSE est ajusté au coefficient de rétrodiffusion d'agrégats de rayons égaux à $17.11 \mu m$. La pente spectrale du coefficient de rétrodiffusion est de 6.5 entre 13 et 25MhZ alors qu'elle stagne à 4 MhZ avec le modèle SFSE. Cette variation de la pente n'est pas prise en compte par le modèle SFSE (noté BSC fit sur la figure 13) contrairement à la courbe expérimentale (noté BSCsim). Le modèle SFSE est donc insuffisant pour décrire la dépendance fréquentielle pour la quantification de l'agrégation du sang.

Ces résultats ont amené Franceschini et coll. [62] à proposer un nouveau modèle approximant d'une autre manière le modèle de facteur de structure. Cette modélisation vise une meilleure caractérisation de l'agrégation érythrocytaire. Nous montrons que cette approche permet de mesurer 3 paramètres structuraux pertinents pour quantifier l'agrégation : le rayon de l'agrégat, l'hématocrite systémique de même que l'hématocrite interne ou la compacité. Pour la première fois, en CTU, cette information à propos de la compacité peut être extraite du coefficient de rétrodiffusion.

2.5 Théorie du milieu effectif combiné au modèle du facteur de structure : Une meilleure approximation du modèle de facteur de structure

Le calcul exact du champ rétrodiffusé par un ensemble de globules rouges requiert un temps de calcul conséquent pour des hématocrites élevés car elle nécessite de connaître la

position de chaque globule. La théorie du milieu effectif contourne cette difficulté en estimant les propriétés effectives des agrégats de globules en fonction des propriétés ultrasonores de ses constituants.

Cette section présente la nouvelle théorie basée sur l'approche particulaire développée par Franceschini et coll. en 2011. Ce modèle a été appelé Théorie de Milieu Effectif combinée au Modèle de Facteur de Structure ou TMEMFS [62].

La première hypothèse de ce modèle consiste à assimiler les globules rouges agrégés à des particules effectives homogènes. Les propriétés acoustiques de ces particules effectives se calculent en appliquant la théorie du milieu effectif. Cette théorie a été développée par Kuster Guy et Toskoz Nafi pour des applications en sismologie [62, 76]. La deuxième approximation consiste à dire que l'agrégat, ou la particule effective, est sphérique (condition d'isotropie) comme représenté sur la figure ci-dessous (Figures 14 et 15).

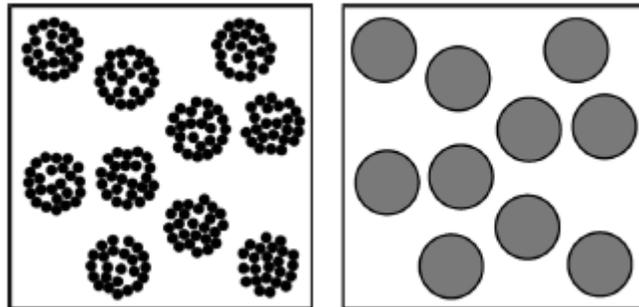


Figure 14: Illustration de l'approximation utilisée dans la théorie du milieu effectif, tirée de [62].

Cette approche nécessite de connaître la concentration volumique interne des GR à l'intérieur de l'agrégat, c'est-à-dire la compacité, en plus des propriétés acoustiques du plasma et du globule rouge. D'un point de vue de la biophysique, la compacité, est à relier à l'énergie d'adhésion causant l'agglutination des globules rouges. Ce nouveau facteur est important car il est quantifie la faculté des globules rouges à s'agglomérer.

Soit ρ_{GR} et ρ_{plasma} les densités du globule rouge et du plasma et κ_{GR} et κ_{plasma} les compressibilités du globule rouge et du plasma respectivement. Alors la densité ρ_{ag} et la compressibilité κ_{ag} de l'agrégat sont, selon la théorie du milieu effectif, donnés par [77]:

$$\begin{aligned}\rho_{ag} &= \phi_{int} \rho_{GR} + (1 - \phi_{int}) \rho_{plasma} \\ \kappa_{ag}^{-1} &= \phi_{int} \kappa_{GR}^{-1} + (1 - \phi_{int}) \kappa_{plasma}^{-1}\end{aligned}$$

L'impédance acoustique z_{ag} de l'agrégat assimilé à la particule effective est:

$$z_{ag} = \sqrt{\frac{\rho_{ag}}{\kappa_{ag}}}$$

Donc le contraste d'impédance $\gamma_{z_{ag}}$ correspondant est:

$$\gamma_{z_{ag}} = \frac{z_{ag} - z_{plasma}}{z_{plasma}}$$

Par cette méthode, on contourne donc le calcul des interférences entre les globules rouges inscrits dans un agrégat. En effet, tant que nous sommes intéressés par la caractérisation des conditions pathologiques du sang, alors l'approximation de l'agrégat par une particule effective de forme sphérique s'avérera une approximation assez valide (Voir figure 3). Dans ce contexte, le facteur de forme utilisé pour modéliser les effets géométriques de la particule effective est le modèle de sphère fluide:

$$FF_{ag}(-2\vec{k}) = \left[3 \frac{\sin(2kRag) - Rag \cos(2kRag)}{(2kRag)^3} \right]^2$$

k est le nombre d'onde et Rag est le rayon de la particule effective.

d'exploration de cette taille, on peut supposer que les agrégats sont identiques. N'oublions pas cependant que l'effet de la polydispersité (présence d'une distribution de tailles) peut être significatif dans certaines configurations [78].

Le milieu est considéré monodisperse (un seul type de diffuseur) dans la région d'intérêt insonifiée où s'effectue le calcul du coefficient de rétrodiffusion. Pour une fréquence de 25MHz, et pour une vitesse des ultrasons dans le fluide plasmatique de 1540 m.s^{-1} , la longueur de la fenêtre (souvent rectangulaire ou de type hamming) locale étudiée est d'environ $400 \mu\text{m}$, soit 7 fois la longueur d'onde. Dans une fenêtre

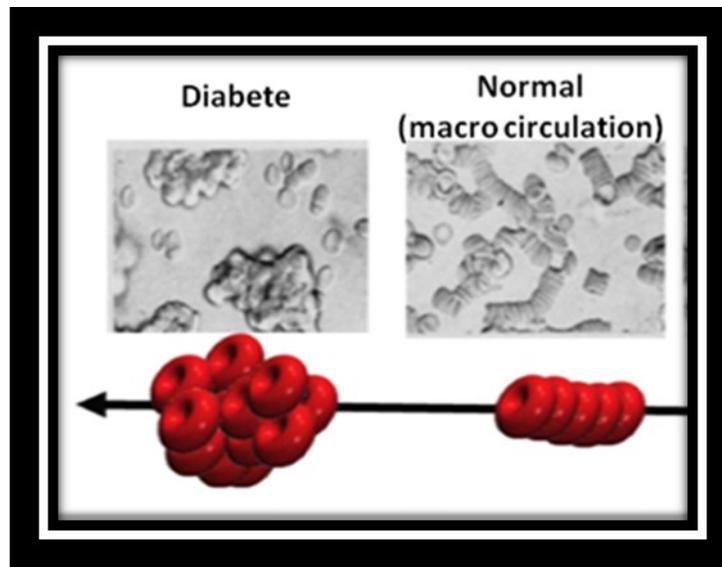


Figure 15: Analogie entre expérience numérique et conditions physiologiques. Le sang d'un diabétique présente des agrégats de forme plutôt sphérique comparé au sang normal dans la macrocirculation où les agrégats sont des rouleaux. La flèche indique l'augmentation du niveau de l'agrégation. On remarque au passage que le diamètre ainsi que la compacité sont des indices du niveau d'agrégation, tirée en partie de [31].

Dans le cas monodisperse, alors le coefficient rétrodiffusion basé sur le modèle TMEFMS est donné par [77]:

$$BSC_{TMEFMS}(-2\vec{k}) = m_{ag} * \sigma_{ag}(-2\vec{k}) * S_{ag}(-2\vec{k})$$

avec

$$\sigma_{ag}(-2\vec{k}) = \frac{k^4 \gamma_{z_{ag}}^2}{4\pi^2} FF_{ag}(-2\vec{k})$$

La densité d'agrégats m_{ag} se calcule par :

$$m_{ag} = \frac{\phi_{ag}}{V_{ag}} = \frac{N_{ag}}{V_{tot}}$$

ϕ_{ag} est la densité volumique d'agrégats, V_{ag} est le volume d'un agrégat, N_{ag} est le nombre d'agrégats dans le volume sondé V_{tot} .

Le facteur de structure modifié S_{ag} décrit la disposition spatiale des agrégats et non des globules rouges comme précédemment dans le modèle de facteur de structure et s'écrit dorénavant :

$$S_{ag}(-2\vec{k}) = E \left[\frac{1}{N_{ag}} \left| \sum_{i=1}^{N_{ag}} e^{-i2\vec{k}\vec{r}_i} \right|^2 \right]$$

N_{ag} est le nombre de globules rouges et r_i est la position spatiale de chaque agrégat. E représente la moyenne d'ensemble.

La matrice densité des agrégats est donnée par [77] :

$$D_{ag}(\vec{r}) = \sum_{i=1}^{N_{ag}} \delta(\vec{r}' - \vec{r}_i')$$

avec i désignant la particule effective et r' leur position dans l'espace.

Wertheim [63] proposa dans les années 1960 un facteur de structure analytique ainsi que la fonction de distribution radiale correspondante pour des particules sphériques dures (en anglais hard spheres ou HS). En utilisant l'expression de Wertheim, nous avons

représenté à titre explicatif sur la figure 16, l'effet de l'hématocrite sur le facteur de structure.

Ceci complète le chapitre portant sur la modélisation du coefficient de rétrodiffusion.

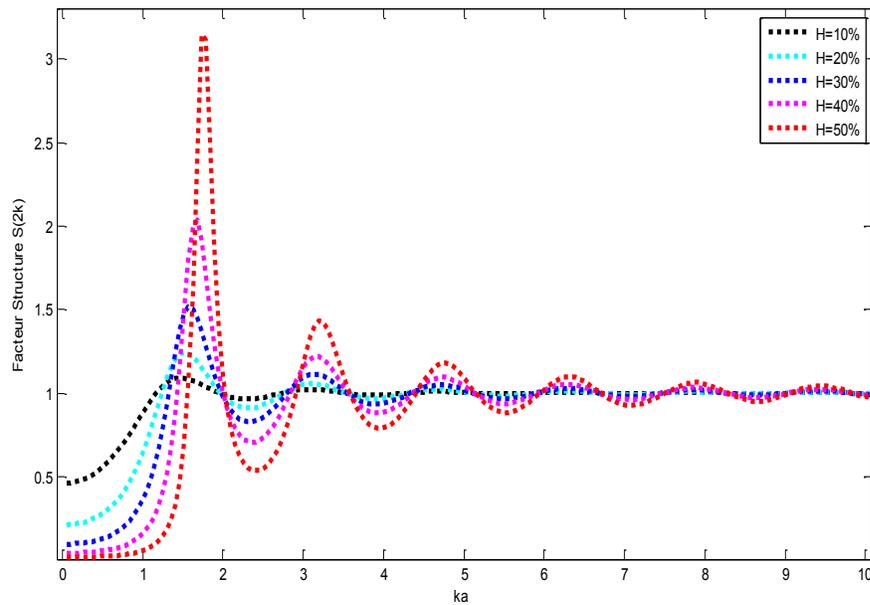


Figure 16: Effets de l'hématocrite sur le facteur de structure $S(k)$.

L'objectif des 2 prochaines sections est d'évaluer en trois dimensions, qualitativement et quantitativement, la validité de l'approximation du modèle TMEMFS comparé au modèle numérique de référence, soit le Modèle de Facteur de Structure (MFS).

Chapitre 3 : Étude *in silico* de l'agrégation en conditions pathologiques

Nous décrivons, dans ce chapitre, la méthode numérique pour générer des globules rouges agrégés en condition pathologique. Ce milieu de simulation servira de support expérimental pour évaluer notre modèle de caractérisation tissulaire par ultrasons. Ensuite, les résultats du problème direct, c'est-à-dire la comparaison entre les coefficients de rétrodiffusion fournis par les modèles MFS et TMEFMS, seront présentés sous la forme d'une publication dans le chapitre suivant.

3.1 Arrangement hexagonal compact : un modèle d'agrégat

Notre but est de reproduire numériquement la microstructure sanguine en condition d'hyperagrégation susceptible d'être observée dans certaines situations pathologiques caractérisées par une hyperviscosité [66, 79]. Cette hyperagrégation résulte d'une forte agglutination des globules rouges en réponse à une augmentation de l'énergie de liaison. En général, cette énergie de cohésion intercellulaire provient soit d'une augmentation de la teneur en macromolécules plasmatiques telle que le fibrinogène, soit de l'altération des propriétés des globules rouges telle que le potentiel membranaire, soit d'une combinaison des deux [80]. Ceci entraîne la formation d'agrégats de globules rouges pouvant s'assimiler à des sphères pleines en opposition aux structures en rouleaux rencontrées chez un patient sain (Figures 3 et 14). Notre objectif est d'utiliser cette différence structurale comme moyen de prévention des maladies présentant une hyperagrégation érythrocytaire. Dans notre étude, nous évaluons numériquement les paramètres structuraux des globules rouges hyperagrégés dont la connaissance est requise pour valider dans le problème direct le coefficient de rétrodiffusion prédit par le modèle analytique TMEFMS en comparaison avec le modèle numérique MFS.

Afin de contrôler parfaitement les paramètres structuraux lors de nos expériences, nous optons pour la simulation numérique d'agrégats. En utilisant cette approche, nous avons une connaissance parfaite (sauf erreurs numériques) du milieu rétrodiffusant d'un

point de vue structural. L'expérience sur du sang prélevé ne permet pas une connaissance aussi précise de la position des globules dont la densité est d'environ 5 millions par mm^3 [6]. Ainsi pour la validation du modèle TMEFMS, il nous est apparu judicieux et justifié de mener plutôt une expérience numérique. Par ce biais, nous pouvons clarifier le rôle joué par chaque paramètre structural, notamment le rayon et la compacité, sur le coefficient de rétrodiffusion.

Plusieurs approches ont été entreprises pour proposer une simulation représentative du sang agrégé dans le contexte de l'imagerie quantitative ultrasonore. Routh et coll. [81] ont réalisé une simulation de globules rouges pour étudier l'effet de l'hématocrite. La limitation majeure de ces travaux était que les globules rouges ont été étudiés en une seule dimension. Les globules rouges y sont assimilés à des tubes d'épaisseur constante. Seule la distance entre les diffuseurs varie en fonction de l'hématocrite. Lim et coll. [82], en simulant des globules rouges disposés uniformément dans l'espace avec une contrainte de non-recouvrement, ont étudié numériquement l'effet de l'agrégation et de la compacité sur la puissance spectrale. Les agrégats sont représentés par une chaîne de diffuseurs (cercles en 2D et sphères en 3D) alignés bout en bout tandis que la compacité y constitue simplement une mesure localisée dans l'espace de la concentration volumique des globules rouges. Fontaine et coll. [71] ont utilisé une approche de dynamique moléculaire. La technique de simulation de la dynamique moléculaire est une approche déterministe basée sur les lois classiques de la mécanique newtonienne. Elle nécessite *a priori* la connaissance des lois gouvernant l'interaction entre les particules. Nous entendons par là l'énergie potentielle et l'énergie cinétique. Ensuite, les forces puis les déplacements sont déduits par le calcul des intégrales suivant des techniques robustes comme l'intégration numérique de Verlet ou Leapfrog [83]. Malheureusement, dans l'article de Fontaine, les forces d'interaction utilisées sont empiriques et l'énergie cinétique utilisée se basait sur un écoulement de vitesse constante de type Couette. Ces limitations ont mené Savéry et coll. [18] à proposer une autre alternative : la simulation Monte-Carlo de l'agrégation en 2D. Cette technique est basée sur une loi universelle dite de Boltzmann gouvernant l'énergie potentielle des particules. La simulation Monte Carlo ne prend pas en compte l'énergie

cinétique des globules rouges. Ces 2 méthodes de simulations précitées sont ergodiques. En d'autres termes, les résultats produits par la simulation Monte-Carlo sont identiques à la Dynamique Moléculaire à condition que le temps utilisé dans cette dernière soit suffisamment grand pour tendre vers l'équilibre du milieu simulé. Savéry et Cloutier [84] ont utilisé cette approche pour étudier l'influence de l'agrégation sur le modèle MFS. Contrairement à la dynamique moléculaire, Monte-Carlo est une approche basée sur l'utilisation excessive de variables aléatoires et donc ne nécessite absolument pas la connaissance *a priori* des lois régissant l'interaction inter globules rouges. Saha et Cloutier [85] ont appliqué cette technique Monte-Carlo, mais cette fois-ci, en 3 dimensions, pour avoir une configuration plus proche de la réalité. Les forces d'adhésion ne permettent pas d'obtenir une forte compacité représentative des conditions pathologiques. Ainsi, Saha et coll. [3], pour la première fois, proposent d'appliquer l'arrangement hexagonal compact (ou HCP pour High Close Packing) pour simuler l'hyperagrégation. L'arrangement HCP est l'organisation spatiale optimale de sphères dures (ici les globules rouges agrégés) pour obtenir une densité maximale à l'intérieur d'une sphère, plus large, les englobant que nous appellerons la particule effective (Figure 17). Dans notre contexte, cette particule effective (ou agrégat) est définie par la concentration locale de globules rouges et par le rayon de l'agrégat. En suivant cette organisation HCP, les globules rouges peuvent être agencés à l'intérieur de la particule effective de façon à obtenir la compacité maximale de 74 %. Théoriquement il a été démontré que cette limite est la compacité maximale pour des sphères dures agrégées. En supposant que la déformabilité n'est pas modifiée lors de l'agrégation, les globules rouges peuvent être assimilés à des sphères dures de volume équivalent. Cette approche permet de reproduire des agrégats numériques comparables à ceux observés en conditions pathologiques.

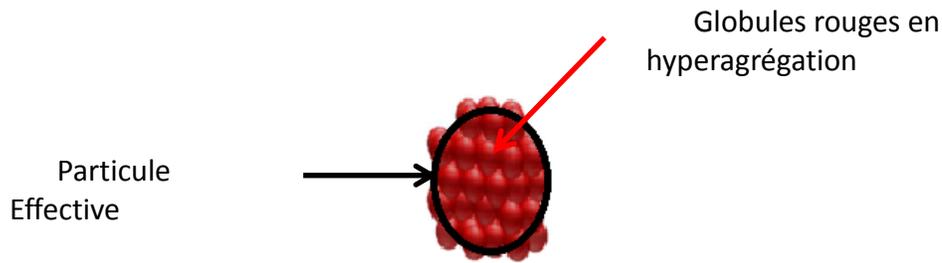


Figure 17 : Représentation d'une particule effective obtenue par simulation numérique de globules rouges disposés selon l'organisation hexagonale compacte. La particule effective est représentée par le cercle

Dans la section suivante, nous décrivons la méthode de simulation des globules rouges disposés selon l'arrangement hexagonal compact. On entend par arrangement compact la disposition spatiale des sphères non déformables, c'est-à-dire l'absence de tout recouvrement, permettant d'avoir la plus grande compacité interne à la particule effective.

La compacité est la fraction volumique occupée par les globules rouges, c'est le contraire de la porosité (Fig. 17). C'est une notion rhéologique couramment utilisée pour la caractérisation des matériaux granulaires spécialement en génie civil, en cristallographie (empilement des atomes), en agroalimentaire et dans l'industrie pharmaceutique, pour le contrôle qualité. Cette notion de compacité présente un intérêt biomédical pour la caractérisation de matériaux biologiques. En effet, les cellules s'agglomèrent dans certaines conditions pathologiques. Tel est le cas des cellules cancéreuses dans un sarcome par exemple [78]. Les globules rouges de patients atteints de diabète, d'hypertension ou de thrombose, entre autre, exhibent une forte agrégation par rapport à la normale [1]. Ainsi, mesurer la compacité d'un agrégat de cellules révèle une pertinence d'un point de vue clinique pour comprendre l'étiologie et prévenir la pathologie. Cette compacité, que le modèle TMEFMS permet de quantifier, est en effet une description macroscopique des forces de liaison intercellulaires.

Pour étudier numériquement la validité de notre modèle, nous simulons l'hyperagrégation de globules rouges et nous déterminons par la suite le couple,

compacité et rayon de la particule effective, agissant comme index structural de l'agrégat. Nous commençons cette section par décrire la méthode de simulation.

Le volume de simulation est un parallélépipède rectangle de dimension en micromètres égales à : $V_{tot} = 1000 * 125 * 125 \mu m$. Le choix d'un parallélépipède n'est pas commun mais présente certains avantages. D'une part, ce choix permet de réduire le temps de calcul par rapport à un cube de dimension $1000 * 1000 * 1000 \mu m$ tout en gardant une configuration assez simple. D'autre part, la plus grande dimension, soit $1000 \mu m$, permet de bénéficier d'une très bonne résolution fréquentielle lors du passage par transformée de Fourier dans le domaine fréquentiel. Cet atout nous permet de modéliser le milieu agrégeant rétrodiffusant dans les hautes fréquences tout en restant fidèles aux détails de la microstructure.

Ce volume de simulation est assimilé à une région d'intérêt prise dans un vaisseau sanguin et interrogée par des ondes ultrasonores. On suppose que les globules rouges sont les principaux diffuseurs. Une fois donc la taille de la région d'intérêt définie, nous spécifions le nombre de globules rouges à positionner en fonction de l'hématocrite à étudier. Pour un hématocrite systémique H donné, le nombre de globules rouges dans la région d'intérêt est:

$$N = \frac{H * V_{tot}}{(4/3) * \pi * a^3}$$

avec a le rayon d'une sphère de volume équivalant au volume du globule rouge de $87 \mu m^3$.

Nous avons étudié 3 hématocrites afin de vérifier la convergence des observations quelle que soit la densité volumique. Pour les hématocrites de 20, 30 et 40 %, le nombre de globules rouges total N est respectivement de 35919, 53879 et 71839.

Afin de procéder à la simulation d'agrégats HCP, nous spécifions au préalable le rayon de la particule effective R_{ag} dans laquelle seront inscrits les globules rouges disposés en hexagonal compact. Dans notre étude, nous avons étudié 15 tailles différentes

dans un souci de reproductibilité et de significativité des résultats. Ces particules effectives sont placées dans la région d'intérêt avec 2 contraintes : l'absence de recouvrement et l'application de conditions périodiques aux limites du domaine de simulation (en anglais Periodic Boundary Condition, PBC). L'absence de recouvrement est synonyme de particules effectives de nature indéformables tandis que l'application de la périodisation PBC permet d'éviter les effets de bords pouvant altérer les mesures. En effet, certaines particules effectives vont se trouver aux bords du parallélépipède lors de la simulation, en raison de la dimension finie de la région d'intérêt. Ceci entraîne une coupure des particules effectives donc une dissociation des globules rouges agrégés.

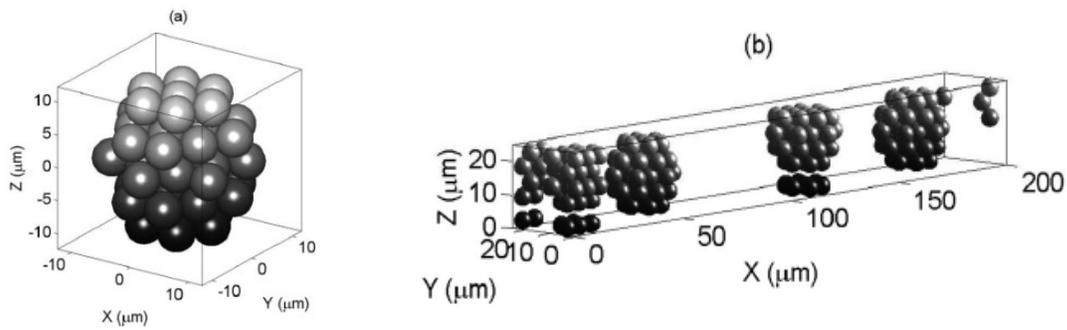


Figure 18: a) Illustration de globules rouges agrégés en hexagonal compact. La figure b montre la périodisation des globules rouges dans les 3 dimensions. On voit aux bords du volume de simulation un agrégat coupé. Les globules agrégés et localisés aux bouts, sur la plus grande dimension X, sont complémentaires. Les dimensions sont réduites ici pour une meilleure visualisation de la microstructure simulée (Reproduite de Saha et coll.[3]).

La figure 18b illustre bien cet évènement. Nous avons donc estimé pour chaque simulation le nombre de particules effectives périodisées, de globules périodisés (sous PBC) et non périodisés (pas sous PBC) pour toutes les tailles de particules effectives et ce, pour les 3 hématocrites. Les tableaux 4, 5 et 6 récapitulent les propriétés structurales du milieu expérimental. Les figures 19, 20 et 21 donnent une vue d'ensemble de

l'évolution du nombre de particules effectives sous PBC en fonction du rayon de la particule effective, et ce, pour les 15 tailles d'agrégats.

Tableau 4 : Propriétés structurales du milieu de simulation à un hémocrite 20%.

R_{ag} Aggregate size (in RBC unit)	3.90	4.35	4.64	4.90	5.60	6.07	6.80
Number of RBCs under PBC	13387	8454	7081	7306	4885	4039	2947
Total number of aggregates	940	584	472	388	229	171	112
Number of aggregates under PBC	267	169	142	146	98	81	59
H_R hémocrite réduite (%)	14.30	14.21	14.00	12.47	11.47	10.55	9.48

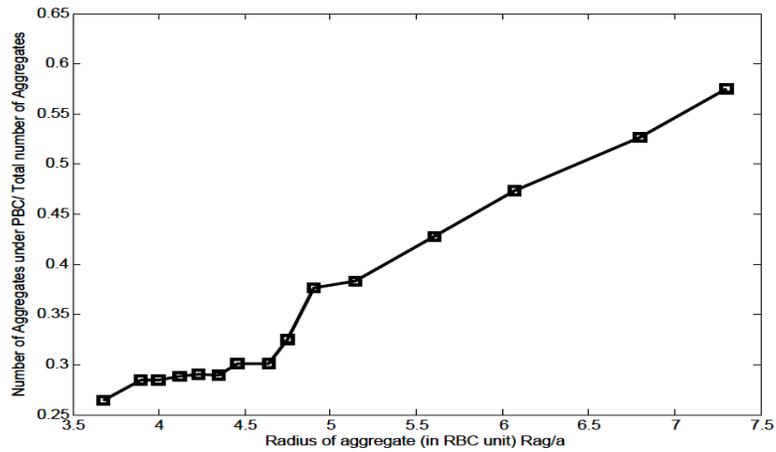


Figure 19 : Variation du nombre de particules effectives périodisées en fonction du rayon de l'agrégat pour les 15 rayons étudiés. L'hémocrite dans le milieu est 20%.

Tableau 5 : Propriétés structurales du milieu de simulation à un hémocrite 30%.

R_{ag} Aggregate size (in RBC unit)	4.24	4.85	5.13	5.39	6.27	6.80	7.67
Number of RBCs under PBC	13631	10908	9163	7932	5687	4447	3371
Total number of aggregates	939	584	472	388	229	171	112
Number of aggregates under PBC	273	218	183	159	114	89	67
H_R hémocrite réduite (%)	21.29	18.79	18.35	17.70	15.10	14.40	11.94

Comme illustrés sur la figure 18a, les globules rouges sont superposés en 3 plans A-B-A. Chaque globule a 3 voisins au-dessus et 3 voisins en dessous. Dans le plan d'un de ces globules rouges, on compte 6 voisins. Au final, le nombre de coordinations est de 6+3+3, soit 12. Tous les globules rouges du milieu simulé sont arrangés suivant ce mode. Les coordonnées en 3 dimensions de tous les globules rouges en fonction du centre de la région d'intérêt sont enregistrées dans un tableau. En fonction des coordonnées du centre de la particule effective de rayon R_{ag} , on estime le nombre de globules rouges de rayon a requis pour constituer un agrégat. Ainsi, chaque particule effective comporte une densité volumique maximale de globules rouges.

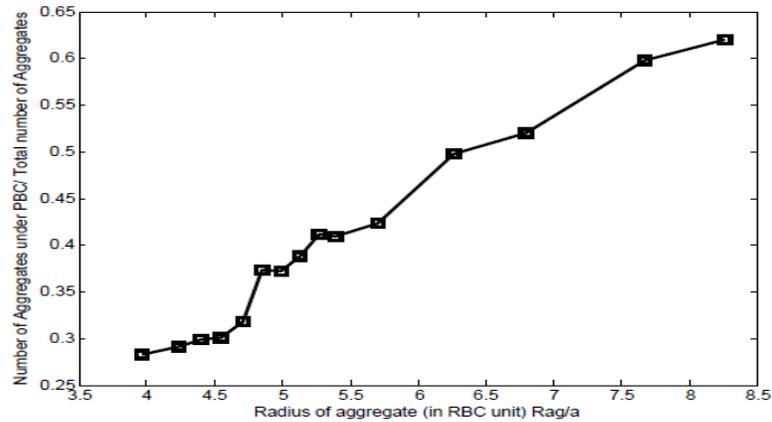


Figure 20: Variation du nombre de particules effectives périodisées en fonction du rayon de l'agrégat pour les 15 rayons étudiés. L'hématocrite dans le milieu est 30%.

Tableau 6 : Propriétés structurales du milieu de simulation à un hématocrite 40%.

R_{ag} Aggregate size (in RBC unit)	4.54	5.18	5.49	5.80	6.71	7.32	8.33
Number of RBCs under PBC	14109	11803	9811	8177	5990	4928	3545
Total number of aggregates	939	584	473	388	230	171	112
Number of aggregates under PBC	282	236	196	164	120	99	71
H_R hématocrite réduite (%)	27.98	23.83	23.41	23.14	19.17	16.95	14.68

Pour estimer le volume exact de tous les globules rouges dans la particule effective nécessaire au calcul de la compacité, nous avons dû calculer les zones d'intersection entre les globules rouges et la bordure de la particule effective (Figure 18b). La compacité est maximale lorsque la porosité est la plus faible, en d'autres termes, lorsque le maximum de globules, entiers ou pas, sont à l'intérieur de la particule effective, comme représenté par le cercle de couleur noire sur la figure 18.

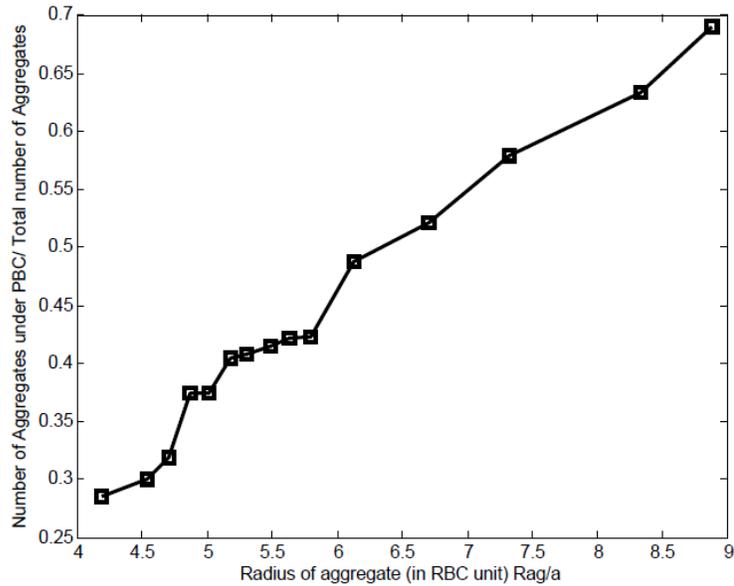


Figure 21: Variation du nombre de particules effectives périodisées en fonction du rayon de l'agrégat pour les 15 rayons étudiés. L'hématocrite dans le milieu est 40%.

Connaissant les coordonnées des globules rouges par rapport à l'origine qu'est le centre du volume de simulation, le rayon de la particule effective est estimé comme suit:

$$R_{ag} = R_g = a + \frac{1}{N_{\text{int}}} \sum_i r_i^2$$

avec r_i la distance de chaque globule rouge i agrégé par rapport au centre de la particule effective qui les contient. Ensuite pour le calcul de la compacité, nous avons implémenté la solution analytique régissant l'intersection entre 2 sphères.

Soit la particule effective de rayon R_{ag} centré en $(0,0,0)$ et le globule de rayon a centré en $(d,0,0)$, alors les équations des sphères sont:

$$\begin{aligned}x^2 + y^2 + z^2 &= R_{ag}^2 \\(x - d)^2 + y^2 + z^2 &= a^2\end{aligned}$$

En résolvant ce système, le volume exact du globule rouge intersecté et inclus dans la particule effective peut être déterminé.

Par combinaison linéaire et après substitution de la variable x , la solution de système s'écrit comme :

$$y^2 + z^2 = \frac{4d^2R^2 - (d^2 - r^2 - R^2)^2}{4d^2}$$

Ceci correspond à un cercle de rayon :

$$c = \frac{1}{2d} \sqrt{[(-d + r - R)(-d - r + R)(-d + r + R)(d + r + R)]}$$

Le volume commun entre le globule rouge et la particule effective est le volume d'une lentille dont la valeur peut s'obtenir en sommant les capes sphériques. Une cape sphérique est la région située au-dessus ou en dessous d'un plan sécant à une sphère. Si le plan passe par le milieu de la sphère alors la cape sphérique est l'hémisphère.

Les bases des capes sphériques sont de dimension suivante:

$$\begin{aligned}d_1 &= x \\d_2 &= d - x\end{aligned}$$

Et les hauteurs correspondantes sont:

$$h_1 = R - d_1 = \frac{(r - R + d)(r + R - d)}{2d}$$

$$h_2 = r - d_2 = \frac{(R - r + d)(R + r - d)}{2d}$$

La somme des volumes des 2 capes sphériques communes permet d'obtenir le volume exact de globules rouges inclus dans la particule effective. Cette sommation se traduit dans notre cas comme suit :

$$V_{inclu} = V(R_{ag}, h_1) + V(a, h_2) = \frac{\pi(R_{ag} + a - d)^2(d^2 + 2da - 3a^2 + 2da + 6aR_{ag} - 3R_{ag}^2)}{12d}$$

Cette équation finale appliquée sur tous les globules rouges à l'intérieur d'une particule effective fournit la compacité exacte. Cette compacité H_{int} est un des 3 paramètres structuraux (autre que le rayon de la particule effective R_{ag} et l'hématocrite global H) nécessaires pour estimer le coefficient de rétrodiffusion fourni par le nouveau modèle TMEMFS basé sur la théorie du milieu effectif, décrit dans le chapitre 2.

3.2 Variation de la compacité

Pour la première fois en imagerie quantitative par ultrasons, la compacité est estimée [77]. L'influence de la compacité sur le coefficient de rétrodiffusion était inconnue jusqu'à l'introduction du modèle TMEMFS. Dans cette sous-section, nous décrivons la démarche utilisée pour faire varier la compacité. Cette partie de la simulation servira à évaluer de quelle manière la compacité affecte le comportement du coefficient de rétrodiffusion prédit par le modèle numérique MFS et le modèle analytique TMEMFS.

L'empilement HCP fournit la densité volumique maximale à l'intérieur de la particule effective. Elle est notée H_{int} (pour rappeler que la compacité est simplement l'hématocrite interne à la particule effective). Cette densité maximale ne peut excéder $H_{int} = 74\%$. Nous voulons étudier différentes compacités (Figure 22). Le tableau 7 donne quelques valeurs de compacité à 20 et 40 % d'hématocrite. Sachant que l'hématocrite systémique H (le

nombre de globules rouges dans la région d'intérêt par unité de volume), la compacité H_{int} (le nombre de globules dans la particule effective de rayon R_{ag}) et la fraction volumique d'agrégat H_{ag} sont reliés par: $H = H_{ag} * H_{int}$ nous n'avons d'autres choix que d'opter pour un hémocrite systémique égal à 20 %. En effet, une compacité de 60 % à un hémocrite systémique de 40 % correspond à simuler une fraction volumique d'agrégats de 66 %. Il est impossible de simuler des agrégats sans recouvrement de façon aléatoire au-delà de 50 % d'où ce choix d'un hémocrite systémique de 20 %.

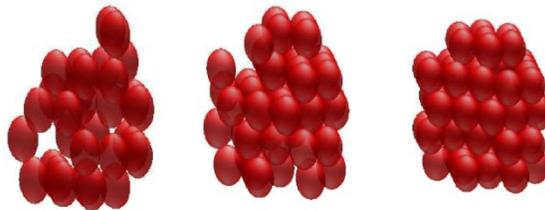


Figure 22 : Variation de la compacité. La particule effective à droite donne la compacité maximale. En allant vers la gauche, on réduit la compacité (par élimination de quelques globules rouges) de la particule effective qui garde le même rayon.

Tableau 7 : Relation entre la compacité H_{int} , l'hémocrite systémique H et la densité volumique des particules effectives H_{ag} .

Hématocrite systémique H (%)	20		40	
Compacité H_{int} (%)	40	60	40	60
Densité des agrégats H_{ag} (%)	50	33	100	66

Avant de passer aux résultats concernant le problème direct, nous devons traiter un dernier point : le calcul du facteur de structure. Le calcul des coefficients de rétrodiffusion nécessite la connaissance de la distribution spatiale des diffuseurs à travers l'expression du facteur de structure. Dans le modèle exact de rétrodiffusion, le modèle MFS, la position des diffuseurs s'agit de la position des globules rouges tandis que dans le nouveau modèle, TMEFMFS, il s'agit plutôt de la position des particules effectives englobant les globules rouges agrégés.

3.3 Calcul du facteur de structure S des globules rouges

Le facteur de structure final utilisé dans le calcul du coefficient de rétrodiffusion est une valeur moyennée sur plusieurs distributions de globules [4, 84]. Cette démarche permet d'avoir une courbe moins bruitée significativement représentative de la microstructure sondée. Afin d'estimer le facteur de structure du modèle MFS, voici la procédure utilisée. Pour chaque simulation de globules rouges agrégés, on détermine la matrice densité des globules rouges D . Cette matrice est un maillage du milieu de simulation en 1024 pixels (pour une transformée de Fourier rapide, nous choisissons $1024=2^{10}$). Ensuite, on effectue un balayage sur la grille. Le nombre de globules rouges présents dans chaque pixel est déterminé en attribuant la valeur unité lors de la détection d'un globule et en donnant la valeur nulle en l'absence de globule. Ainsi la matrice densité D est simplement une distribution spatiale d'impulsions de Dirac localisées aux centres des globules. Ensuite une transformée de Fourier 3D de cette matrice densité permet de calculer le facteur de structure. De par l'isotropie qui caractérise notre facteur structure en 3D, une estimation du facteur dans une dimension est suffisante. Cette procédure est répétée 50 fois pour effectuer une moyenne d'ensemble du facteur de structure. Dans notre estimation du coefficient de rétrodiffusion, nous avons utilisé la plus grande dimension du parallélépipède pour calculer le facteur de structure. Ceci permet d'avoir une meilleure résolution pour examiner la structure des agrégats. Le facteur de structure des globules rouges du modèle MFS obtenu sur 50 simulations est représenté en bleu sur la figure 23 ci-dessous.

À la différence du modèle MFS, le calcul du coefficient de rétrodiffusion basé sur le modèle TMMFS requiert le calcul du facteur de structure des particules effectives S_{ag} . Le calcul numérique de S_{ag} nécessite la connaissance de la matrice densité des particules effectives D_{ag} . Les agrégats sont, dans ce nouveau modèle, considérés comme les diffuseurs principaux et sont appelés particules effectives. Leurs propriétés acoustiques sont déterminées selon la théorie du milieu effectif. Le nombre de particules effectives (c'est-à-dire agrégats) étant évidemment inférieur au nombre de globules, le calcul du facteur de structure des particules effectives S_{ag} sera bien plus rapide que le calcul du facteur de structure des globules S . Notons que les globules rouges sont, bien sûr, agrégés mais les particules effectives, elles, sont désagrégées. Et cette petite différence d'approche permet de calculer analytiquement le facteur de structure des particules effectives sans passer par la matrice densité D_{ag} . Wertheim [63] a déterminé analytiquement la solution exacte du facteur de structure de particules sphériques désagrégées. Cette expression permet le calcul instantané du facteur de structure des particules à condition de connaître la fraction volumique ϕ_{ag} et le rayon des particules effectives R_{ag} . Cette fraction volumique des agrégats est égale au rapport de l'hématocrite systémique H sur la compacité H_{int} . En guise de validation, nous avons représenté dans la figure 24, le facteur de structure obtenu par la transformée de Fourier 3D des centres des particules effectives D_{ag} et le facteur de structure analytique fonction du rayon R_{ag} et de la fraction volumique H_{ag} ($H_{ag} = H / H_{int}$).

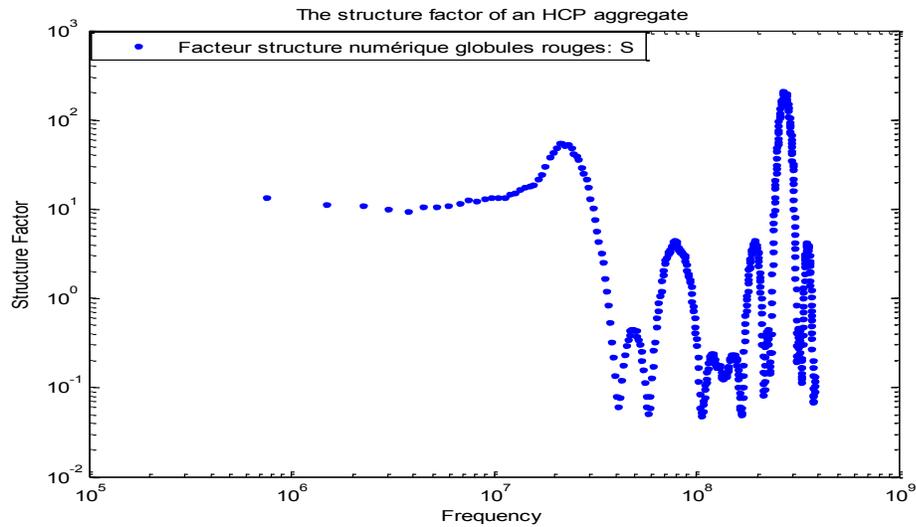


Figure 23: Allure du facteur de structure des globules rouges, disposés en hexagonal compact, en fonction de la fréquence. L'hématocrite systémique est de 20 %.

Durant nos travaux, nous avons procédé à la validation du facteur de structure analytique de Wertheim. Au départ, nous avons calculé le facteur de structure analytique des agrégats en prenant en compte toutes les particules effectives périodisées ou pas. En comparant le facteur de structure numérique calculé en faisant la transformée de Fourier de la matrice densité des particules effectives avec le facteur de structure analytique, nous avons remarqué que les courbes ne correspondaient pas (Figure 24, à gauche).

En effet, les particules effectives périodisées altèrent les interférences destructives et constructives que le modèle analytique ne tient pas en compte contrairement au facteur de structure numérique. Rappelons que le facteur de structure est par définition un descripteur de l'organisation spatiale des diffuseurs dans le domaine fréquentiel. Les coordonnées spatiales des centres des globules rouges agrégés sont modifiées en appliquant les conditions périodiques aux limites. Pour étayer cette thèse, nous avons comparé le facteur de structure numérique et le facteur de structure analytique de Wertheim en incluant exclusivement les particules dans le volume de simulation sur lesquelles aucune périodisation n'est appliquée. Cette procédure réduit bien sûr le nombre

de globules rouges agrégés et donc l'hématocrite final. Ce nouvel hématocrite, que nous appellerons H_R (pour hématocrite réduit par rapport à l'hématocrite initial), est utilisé dans le calcul analytique du facteur de structure des agrégats. La correspondance entre les courbes analytique et numérique est nettement améliorée en procédant ainsi. Sur la droite de la figure 24, nous pouvons observer cet effet de la périodisation sur le facteur de structure des particules effectives à un hématocrite.

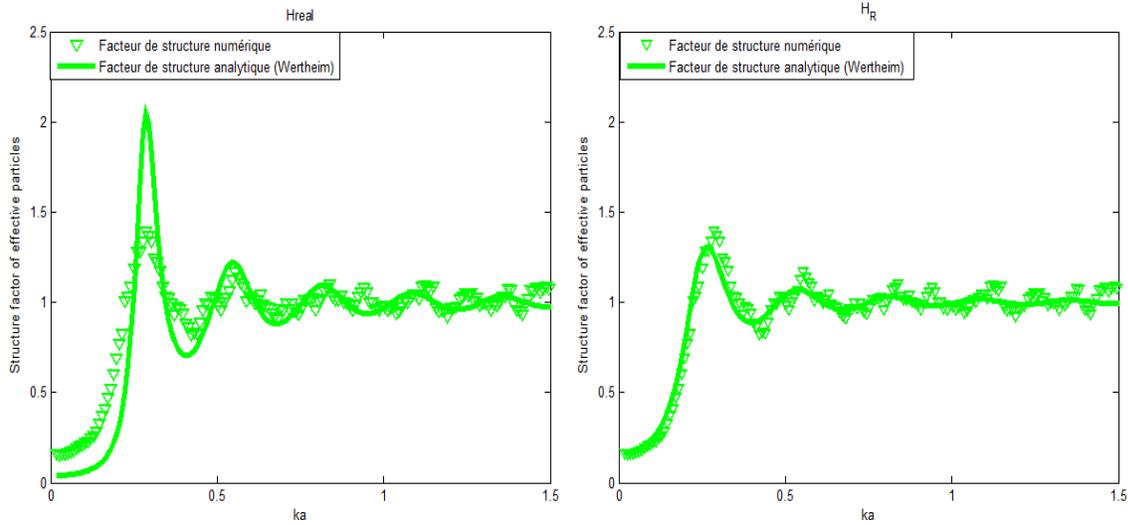


Figure 24: Allure du facteur de structure des particules effectives (c'est-à-dire agrégats) en fonction de la fréquence. L'hématocrite systémique est de 40 %. H_{real} reflète le facteur de structure réel incluant les particules effectives périodisées et non périodisées. L'hématocrite systémique H_R égal à 23 % comprend exclusivement les particules effectives non périodisées. Dans les 2 cas, le rayon de la particule effective est de $R_{ag} = 5.80a$ où a est le rayon du globule rouge ($a = 2.75 \mu m$) et la compacité H_{int} est de 72%.

Chapitre 4: Application de la théorie du milieu effectif et validation numérique pour la mesure de l'agrégation

L'article présenté ci-dessous traite de la validation du modèle TMEFMS proposé par Franceschini et coll. [77] pour mesurer le niveau de l'agrégation érythrocytaire. Nous avons employé deux outils principaux pour mener ce travail : la simulation numérique et la physique acoustique. Les résultats sont ensuite analysés et discutés à la lumière des publications. Quant aux contributions de l'article, Ali T.D. était responsable de l'implémentation des modèles et de la simulation (en langages C et Matlab), de l'analyse des résultats et de la rédaction de l'article. Emilie Franceschini a supervisé la réalisation des travaux. Ratan.K. Saha a fourni le code d'origine de simulation (en langage C). Guy Cloutier est l'investigateur principal. Cet article n'a pas été soumis au moment du dépôt du mémoire.

Validation of the Effective Medium Theory combined with the Structure Factor Model in predicting RBCs aggregation from the ultrasonic backscattering coefficient:

Ali Traoré-Dubuis¹

E. Franceschini², R.K. Saha³, G. Cloutier^{1,4}

¹ **Laboratory of Biorheology and Medical Ultrasonics, Research Center, University of Montreal Hospital, Notre-Dame Hospital, Montreal Canada**

² **Laboratory of Mechanics and Acoustics, LMA - CNRS UPR 7051, Marseille, France**

³ **Saha Institute of Nuclear Physics, 1/AF Bidhannagar, Kolkata-700064**

⁴ **Department of Radiology, Radio-Oncology and Nuclear Medicine, University of Montreal, Montreal, Canada**

Abstract

Quantitative ultrasound based on backscattering coefficient applied to blood aim to characterize RBCs (RBCs) aggregation, a biophysical phenomenon associated with hemorheological disorders. Mathematical modeling is known to be the optimal way to describe the interaction between ultrasound and tissues occurring at the cellular level. The structure factor model (SFM), considered as the exact scattering model, predicted the backscattering coefficient from blood. However, the numerical SFM cannot be applied in real time for practical measurements and does not provide structural parameter such as aggregate size to assess the level of aggregation. Therefore, a new model based on the effective medium theory was proposed in order to tackle this difficulty. The effective medium theory combined with the structure factor model (EMTSFM) can be applied in

real time and contrary to the SFM provides two indices of the aggregate state *in vivo*: the aggregate size and compactness. Our aim here is to assess the accuracy of the EMTSFM against the SFM by comparing their BSC in the framework of a forward problem, i.e., the calculation of the BSC from the known acoustic and structural aggregate parameters. Based on a 3D simulation study, the backscattering coefficients (BSCs), predicted by the effective medium theory combined with the Structure Factor Model (EMTSFM), are compared to the BSCs computed with SFM. To simulate aggregates, RBCs are stacked following a hexagonal close packing (HCP) scheme. Then, we investigated the influences of the aggregate radius and compactness on the BSC. The results showed good agreement between the SFM and the EMTSFM based on our simulated microstructure of RBC aggregates at 20, 30 and 40% hematocrit for a product kr_{ag} below 0.82, 0.84 and 1.06 respectively. Our work provides thus the theoretical background to step forward to clinical studies to assess the locally RBC aggregation level.

Introduction:

The use of ultrasound to quantitatively assess the histological state of tissue is continuously increasing. Using the ultrasonic BSC, measured after removal of the machine transfer function, researchers have shown that this the absolute parameter has the potential to differentiate between tissues and more interestingly to detect abnormal ones [12]. In this context, several experimental studies have been conducted for the characterization of different tissues: eye [86, 87], prostate [88], kidney [89], tendon [90], skin [91], heart [92], bone [93] and blood [6]. In the field of tumour therapy efficiency, Czarnota et al. [94] and Vlad et al. [95] have successfully monitored cell apoptosis induced by chemotherapy and radiotherapy using quantitative ultrasound based on the backscattering coefficient. However, to date, ultrasound spectrum analysis is still a classification method due to the lack of a rigorous description of the interaction between ultrasound and scattering sites embedded in tissue [15].

RBCs are the primary scattering sites from blood [11, 13]. But scatterers are not always identified for other tissues [96]. Therefore, blood may serve as a basis to interpret the complex interaction between biological cells and ultrasound.

Ultrasound Blood Characterization is important for many reasons among which the interpretation of ultrasound physics, the quantitative analysis of the backscattering coefficient and the prevention of hyperviscosity disorders. Hemorheological studies reveal that RBCs aggregation is a major determinant of blood viscosity in large vessels but also a marker of inflammation [9, 97]. Unlike normal blood where the reversible aggregate take the form of rouleau, RBC aggregates turn into spherical clusters in patients affected by hyperviscosity disorders such as diabete [31, 77]. This can be explained by a net increase of the binding energy between cells. In general, these aggregation forces result either from the alteration of the plasma content or from the RBCs aggregability [80]. Such a biophysical and dynamic process of flowing RBCs affect the ultrasound backscattered properties.

Mathematical modelling can help to better understand the ultrasound backscattering by RBCs as a function of the aggregation level and transmitted ultrasound frequency [14]. A consistent effort has been accomplished to predict the backscattering coefficient from blood under none and aggregating conditions. Twersky [16] first introduced the numerical structure factor model (SFM), considered so far as the exact scattering model. However, the SFM cannot be directly applied for real time measurement due to the high computational time required to solve the inverse problem. From this drawback, Yu et al. [6] have proposed the Structure Factor Size Estimator (SFSE) model which is a second order Taylor expansion of the structure factor. Meanwhile, the SFSE model was not able to predict the slope of the backscattering coefficient at 40% hematocrit between 13-25MHz [3]. Moreover, the two structural indices provided by the SFSE model, W the packing factor and D the aggregate diameter, are not independent since they are related by a quadratic law. Recently, Franceschini et al. [77] introduced the Effective Medium Theory combined with Structure Factor Model (EMTSFM) to overcome this limitation. This model aims to characterize pathological blood assuming that the aggregated RBCs

behave as effective particles. The primary scatterer is no longer the RBC but rather the effective particle. However, the validation of this model was undertaken using 2D simulation and yielded the conclusion that the EMTSFM can well approximate the SFM for a product $kr_{ag} \leq 1.32$ where k is the wavenumber and r_{ag} the aggregate size for a monodisperse scattering medium.

This paper presents the 3D numerical validation of the effective medium theory combined with the structure factor model (EMTSFM) proposed to predict the frequency dependency by aggregated RBCs. Our goal is to quantitatively assess how close the EMTSFM is to SFM model in the context of a pathological blood. We perform a 3D rather than 2D numerical simulation to mimic pathological blood in order to validate the EMTSFM for two main reasons: first, because RBCs are opaque at a physiological hematocrit of 40%-45%, using experimental rheological techniques such as optical microscope and second, to better understand the interaction between ultrasound and blood at a physiological hematocrit level in a realistic geometry (i.e. 3D). Finally, we provide a route to solve the inverse problem by substituting the numerical structure factor of aggregated RBCs to an analytical expression in the EMTSFM model, only applicable in 3D.

Methods

a) Theoretical Modelling

We remind the main assumptions made during this study: the backscattering is so weak that the Born approximation holds, the incident ultrasound waves are considered plane and finally the wavelength is greater than the scatterer size.

Based on the particle approach, the general theoretical expression predicting the differential backscattering per unit volume, also called the backscattering coefficient, is given by the SFM. The SFM takes into account the number density of scatterers, the shape of the scatterer through the form factor and the spatial organization hence the

interferences through the structure factor term. Mathematically, the backscattering coefficient based on the SFM is given by [66]:

$$BSC_{SFM}(-2\vec{k}) = m_{RBC} \sigma_{RBC}(-2\vec{k}) S_{RBC}(-2\vec{k})$$

Where is m_{RBC} the number density of RBCs (RBCs), σ_{RBC} the backscattering cross section of a single RBCs and S_{RBC} the so called structure factor. The number density is a constant given by the following relation: $m_{RBC} = \frac{H}{V_{RBC}}$ where H is the systemic hematocrit and V_{RBC} is the mean corpuscular volume of the RBC typically $87 \mu m^3$. Below 30MHz, the biconcave RBC shape can be approximated by a spherical shape with equivalent volume [66]. Under this condition, the analytical backscattering cross section for a weak scattering RBC is given by:

$$\sigma_{RBC}(-2\vec{k}) = \frac{9V_{RBC}k^4\gamma_z^2}{16\pi^2} \left(\frac{\sin 2ka - 2ka \cos 2ka}{(2ka)^3} \right)$$

Where $a = 2.75\mu m$ being the RBC radius, γ_z the impedance contrast between the RBC and the plasma, $k = 2\pi/\lambda$ being the wavenumber where λ is the incident ultrasound wavelength.

The structure factor which models the constructive and destructive interferences is given by:

$$S_{RBC}(-2\vec{k}) = \left\langle \frac{1}{N_{RBC}} \sum_{n=1}^{N_{RBC}} e^{i2\vec{k}\vec{r}_n} \right\rangle$$

Where $\langle \rangle$ represents the ensemble average, N_{RBC} the number of RBCs in the whole region of interest and \vec{r}_i refers to spatial position of the i th RBC. The structure factor is the Fourier transform of the pair correlation function of the scattering sites and can be interpreted as the reciprocal space description of the scattering medium [98]. Experimentally, the structure factor describes the backscattered intensity as a function of scattering angle.

The newly proposed EMTSFM theory focuses on the structural characterization of pathological blood. In this context, the binding energy between RBCs is high resulting in spherical like clusters. The EMTSFM assumes the aggregated RBCs to behave as spherical effective particles. Therefore, the primary scatterer is no more the RBC but rather the effective particle. The EMTSFM further hypothesized that the size of the moving window used during the processing of radiofrequency signals is sufficiently small that the local effective particles are assumed identical in size (i.e. monodisperse). Under these assumptions, the backscattering coefficient for a monodisperse media based on the EMTSFM is given by [77]:

$$BSC_{EMTSFM}(-2\vec{k}) = m_{ag} \sigma_{ag}(-2\vec{k}) S_{ag}(-2\vec{k})$$

where $m_{ag} = \frac{H_{ag}}{V_{ag}}$ stands for the effective particle number density with H_{ag} the volume concentration of aggregates and V_{ag} the effective particle volume. σ_{ag} the backscattering cross section of the effective particle is given below:

$$\sigma_{ag}(-2\vec{k}) = \frac{k^4 \gamma_{zag}^2}{4\pi^2} FF_{ag}(-2\vec{k})$$

k is the wavenumber, γ_{zag} the impedance contrast of the effective particle, and the form factor FF_{ag} being:

$$FF_{ag}(-2\vec{k}) = \left[3 \frac{\sin(2kRag) - Rag \cos(2kRag)}{(2kRag)^3} \right]^2$$

S_{ag} is the structure factor of the effective particles. Here the structure factor represents the spatial organization of the effective particles instead of the RBCs reducing the amount of time needed to estimate the backscattering coefficient. Wertheim has proposed an analytic equation to predict the structure factor from a scattering hard sphere fluid which we used here. The analytical structure factor is given by [63]:

$$S_{ag-Wertheim} = \frac{1}{1 - mC(k)}$$

$$\text{with } C(k) = 8\pi R_{ag} \int_0^1 r^2 \frac{\sin(2kr)}{2kr} c(r) dr$$

where $c(r) = c_0 + c_1 \frac{r}{d} + c_3 \left(\frac{r}{d}\right)^3$ if $r < d$ and $c(r) = 0$ otherwise. The coefficients

depend on the volume fraction of effective particles H_{ag} through the following relations:

$$c_0 = \frac{(1 + 2H_{ag})^2}{(1 - H_{ag})^4}, c_1 = \frac{-6H_{ag}(1 + \frac{H_{ag}}{2})^2}{(1 - H_{ag})^4}, c_3 = \frac{H_{ag}}{2}c_0$$

The backscattering cross section of the effective particle requires the knowledge of the acoustic properties. The effective acoustic properties are determined the effective medium theory as follows:

$$\rho_{ag} = H_{int}\rho_{RBC} + (1 - H_{int})\rho_{plasma}$$

$$\frac{1}{\kappa_{ag}} = \frac{H_{int}}{\kappa_{RBC}} + \frac{(1 - H_{int})}{\kappa_{plasma}}$$

where ρ_{RBC} , ρ_{plasma} and ρ_{ag} represent the density of the RBC, the plasma and the effective particle respectively. κ_{RBC} , κ_{plasma} and κ_{ag} represent the compressibility of the RBC, the plasma and the effective particle respectively. Finally, H_{int} is the so called compactness of the effective particle.

b) Simulation of aggregated Red Blood Cells (RBCs)

Studying the influence of hyperaggregation requires the simulation of highly packed RBCs. Savéry et al.[18] and Saha et al. [85] have applied Monte Carlo simulation respectively in 2D and 3D to model RBC aggregation in the context of quantitative ultrasound. However, the compactness of aggregated RBCs based on this technique does not provide dense packed RBCs. Moreover, these techniques are computationally intensive. In order to tackle these difficulties, Saha et al. [3] come up with the Hexagonal Close Packing (HCP) arrangement, a fast method to reproduce aggregated RBCs under pathological conditions. This clustering process allows reaching the highest level of compactness of about 74% assuming that RBCs behave as hard spheres. This 3-D HCP algorithm was used to create structures that properly represent aggregated RBCs. The reader should refer to Saha et al. [3] for a flowchart of the algorithm.

The HCP simulations were performed in a parallelepiped box of volume $V=1000*125*125 \mu m^3$ containing 71839, 53879 and 35919 RBCs corresponding to 40%, 30% and 20% hematocrit. The longest edge is used for the calculation of the backscattering coefficient to get more details in the frequency domain. The particle radius is set to 2.75 μm while the effective particle radius (i.e. aggregate size) is arbitrarily chosen. Once given, the clusters are randomly placed in the region of interest avoiding overlap between them and applying periodic boundary conditions (PBC) to remove edge effects on the measured properties. Structural properties of the simulated blood under hyperaggregated conditions are reported on tables 8, 9 and 10. The figures 25, 26 and 27 show how the hematocrit is reduced when we exclude all the effective particles under PBC.

Assuming a spherical shape, the RBCs are represented by a spherical scatterer with equivalent volume of 87 μm^3 . Due to the very low content of thrombocytes and leucocytes, only RBCs are assumed to scatter the incident ultrasonic wave. RBCs belonging to the same cluster are packed following the HCP algorithm. They are at this point considered aggregated RBCs and its compactness is significantly high to mimic the pathological blood. Finally, we compute two structural parameters based on the coordinates of both the RBCs and the effective particle: the aggregate radius and the compactness.

Tableau 8 : Structural properties of the simulated medium at 20% hematocrit

R_{ag} Aggregate size (in RBC unit)	3.90	4.35	4.64	4.90	5.60	6.07	6.80
Number of RBCs under PBC	13387	8454	7081	7306	4885	4039	2947
Total number of aggregates	940	584	472	388	229	171	112
Number of aggregates under PBC	267	169	142	146	98	81	59
H_R reduced hematocrit (%)	14.30	14.21	14.00	12.47	11.47	10.55	9.48

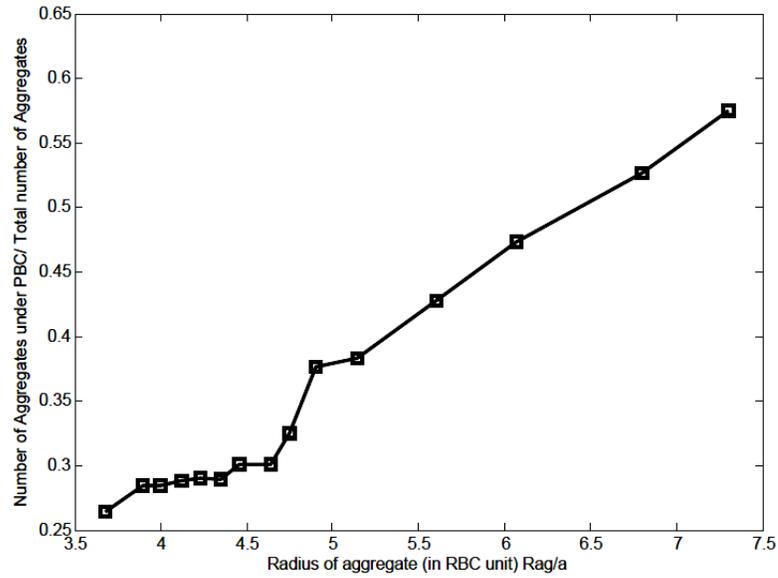


Figure 25: Variation of the number of effective particles under periodic boundary conditions as a function of aggregate size at 30% hematocrit. This plot gathers all the results from the 15 aggregates sizes simulated.

Tableau 9 : Structural properties of the simulated medium at 30% hematocrit

R_{ag} Aggregate size (in RBC unit)	4.24	4.85	5.13	5.39	6.27	6.80	7.67
Number of RBCs under PBC	13631	10908	9163	7932	5687	4447	3371
Total number of aggregates	939	584	472	388	229	171	112
Number of aggregates under PBC	273	218	183	159	114	89	67
H_R reduced hematocrit (%)	21.29	18.79	18.35	17.70	15.10	14.40	11.94

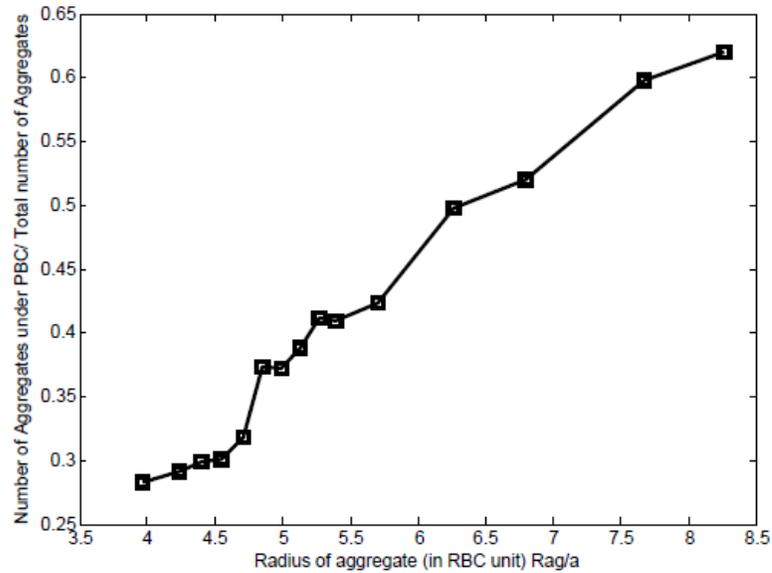


Figure 26: Variation of the number of effective particles under periodic boundary conditions as a function of aggregate size at 30% hematocrit. This plot gathers all the results from the 15 aggregates sizes simulated.

Tableau 10 : Structural properties of the simulated medium at 40% hematocrit

R_{ag} Aggregate size (in RBC unit)	4.54	5.18	5.49	5.80	6.71	7.32	8.33
Number of RBCs under PBC	14109	11803	9811	8177	5990	4928	3545
Total number of aggregates	939	584	473	388	230	171	112
Number of aggregates under PBC	282	236	196	164	120	99	71
H_R reduced hematocrit (%)	27.98	23.83	23.41	23.14	19.17	16.95	14.68

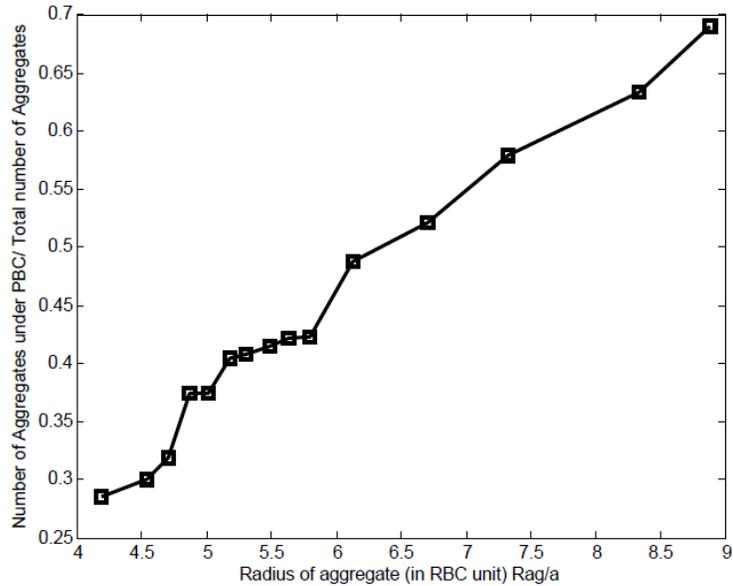


Figure 27: Variation of the number of effective particles under periodic boundary conditions as a function of aggregate size at 40% hematocrit. This plot gathers all the results from the 15 aggregates sizes simulated.

Results

The calculation of the numerical structure factor is responsible for the high computational time. For real time application, it is mandatory to evaluate the structure factor instantaneously. In order to tackle this problem, one way is to propose an analytic and equivalent structure factor. Thanks to Wertheim's resolution of the Percus -Yevick equation for disaggregated hard spheres, we can achieve this goal. Assuming that the volume fraction of aggregates and their radius are known, the calculation of the analytical structure factor is straightforward. We compare at 40% hematocrit in figure 27 the structure factor of effective particle S_{ag} obtained through the matrix density of clusters computation, represented by markers, and the analytical one for Wertheim's equation, represented by lines. In figure 28, the effects induced by both structure factors on the

backscattering coefficient are far more visible at 40% hematocrit. To find out the origin of the discrepancies between numerical and analytical data, we take into account only the effective particles inside the ROI (clusters not under PBC) in a second step. We found that both structure factor match better. This procedure reduces the initial systemic hematocrit named H_{real} to a value H_R . During the forward problem study, we consider the reduced hematocrit H_R for the calculation of backscattering coefficient based on the EMTSFM.

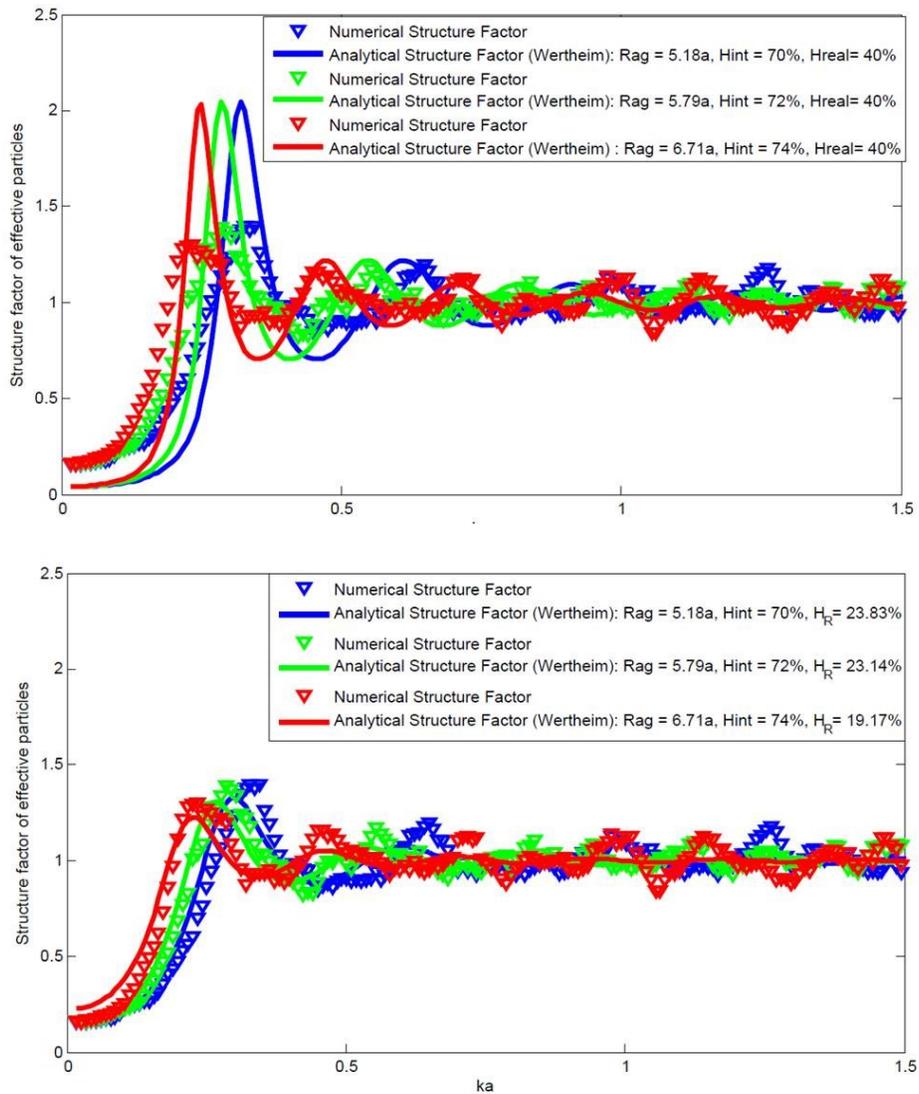


Figure 28 : Comparison of the numerical structure factor of effective particles with the analytical solution at 3 aggregate sizes. The compactness is assumed to be constant.

The effects of the aggregate size on the backscattering coefficient at 40% hematocrit are shown in figure 28. The X axis represents the frequency of ultrasound waves and the Y axis represents the backscattering coefficient. Markers stand for the structure factor model while lines represent the EMTSFM. The aggregate size is coded by the color. We study the influence of effective particle size variation at 40% hematocrit. This investigation was done from 4 to 100 MHz. For each hematocrit, we simulate 15 different aggregate sizes. But for clarity, only the backscattering coefficients from 3 sizes are shown. One can see that these curves contain three parts: a linear region located at low frequencies, the oscillations at large frequencies and finally the transition between them corresponding to the first rebound. It is clear from figure 28 that the new EMTSFM fitted well the numerical SFM over the linear region. The discrepancies between both models appear during the transition region when the first peak occurs. For a given hematocrit, changes in aggregate size appear to move the position of the first peak in the frequency axis. The bigger the aggregate size, the earlier the first rebound appears. This feature can be seen as a signature of the aggregate size.

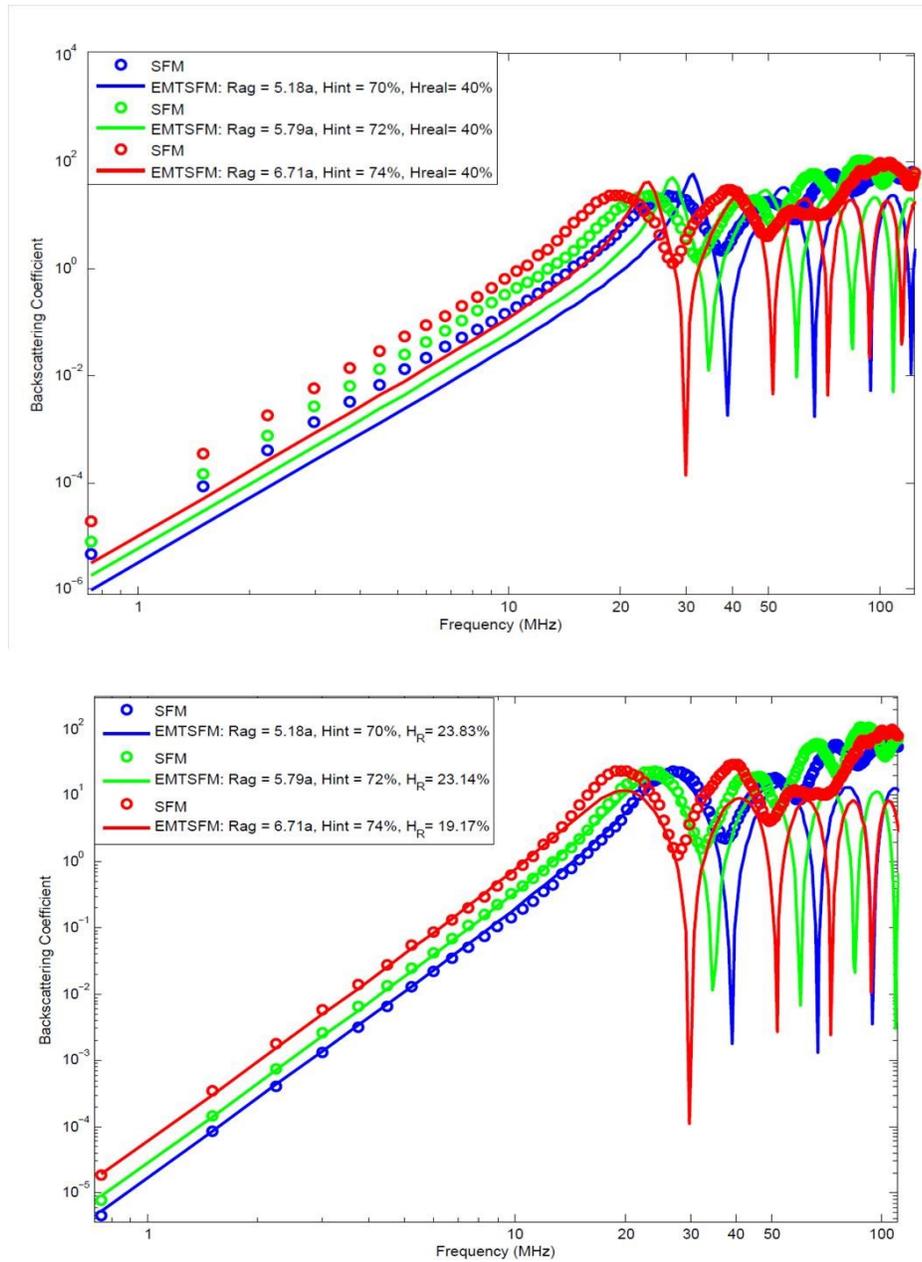


Figure 29: Frequency dependent backscattering coefficient of the EMTSFM compared to SFM at 40% hematocrit for 3 aggregate sizes. The symbols represent the SFM while the line stands for the EMTSFM. The figure on the top takes into account all aggregated RBCs while the bottom figure displays the backscattering from aggregated RBCs not under periodic boundary conditions.

We then quantitatively assess the accuracy of EMTSFM compared to the SFM in predicting the RBCs aggregate size. First, we calculate the absolute error between the SFM and EMTSFM models. We plot the absolute error as a function of frequency as shown by figure 29. We then extract the frequency limit $freq_{lim}$ at the arbitrary absolute error value of 0.4 for all 15 aggregate sizes for 20%, 30% and 40% hematocrit. Following the relation $k_{lim} = 2\pi freq_{lim} / c$, where c is the sound speed, we deduce the limit wavenumber k_{lim} . The results are plotted in figure 31 for all hematocrits. The red line represents the variation of the frequency limit where both model start to diverge as a function of the aggregate size. The blue line represents the corresponding $k_{lim} * R_{ag}$ as a function of the aggregate size. The mean value of the product at 40%, 30% and 20% hematocrits are 1.06, 0.84 and 0.82 respectively.

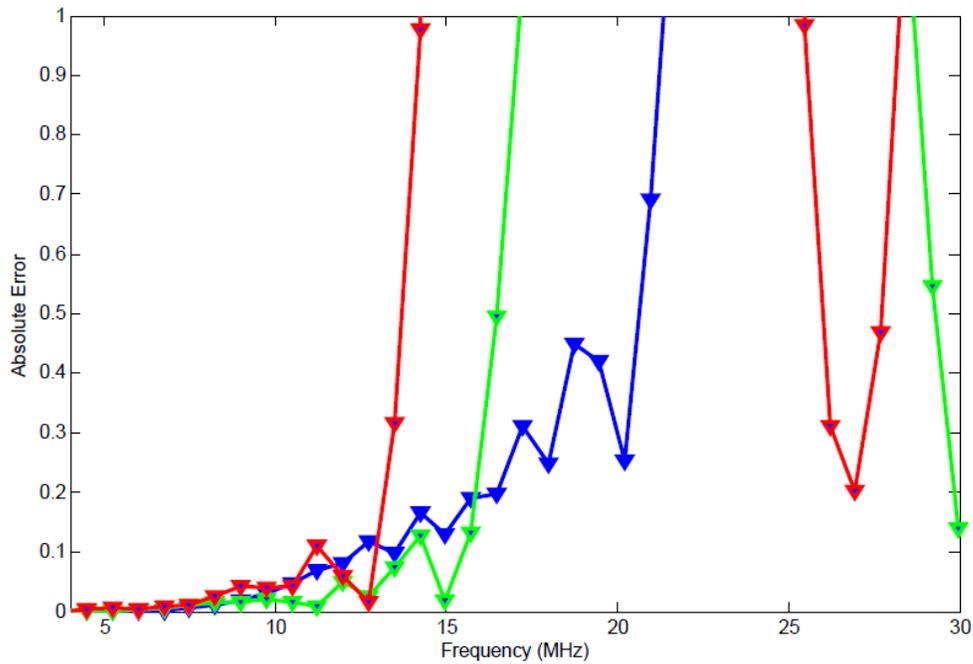


Figure 30 : Corresponding relative error for the backscattering coefficient from the EMTSFM model at reduced hematocrit H_R .

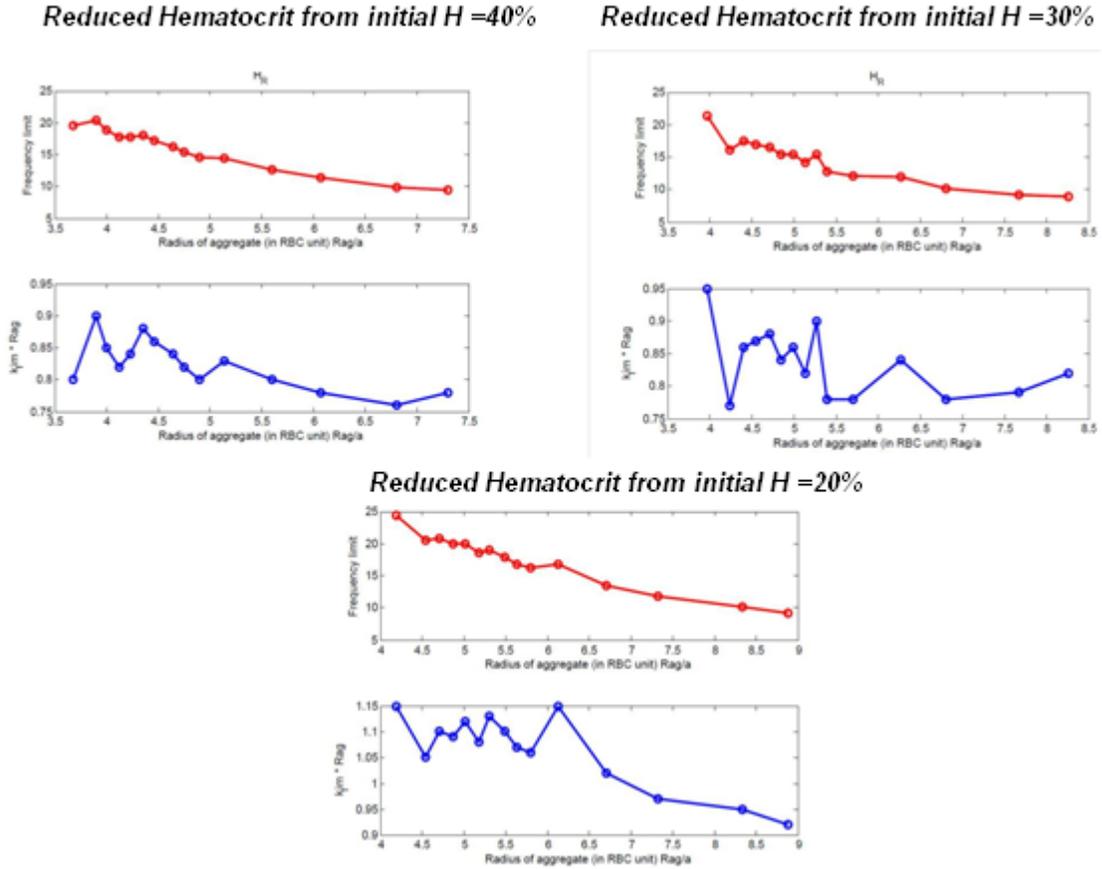


Figure 31: Quantitative comparison between the SFM and the EMTSFM models to characterize RBC hyperaggregation. The red line represents the frequency limit $freq_{lim}$ at 0.4 absolute errors as a function of aggregate radius. The blue line represents the product of the limit wavenumber k_{lim} and the effective particle size R_{ag} as a function of aggregate size.

We further study the validity of the EMTSMF in determining the aggregate compactness. The backscattering coefficients curves for five different compactness, at a systemic hematocrit of 20%, are shown in figure 32. The line plot indicates the EMTSFM while the markers indicate the SFM. The figure shows that an increase of the aggregate compactness results in the increase of the backscattering coefficient amplitude until the occurrence of the first peak. Since we kept the aggregate radius constant and vary only the internal concentration of RBCs, the first peak appears at the same frequency. This observation confirms further that the position of the first peak reflects directly effective

particle size. A reduction of the compactness, through the removal of RBCs from the effective particle, result in a decrease of amplitude of the backscattering coefficient given either by SFM and EMTSFM theories.

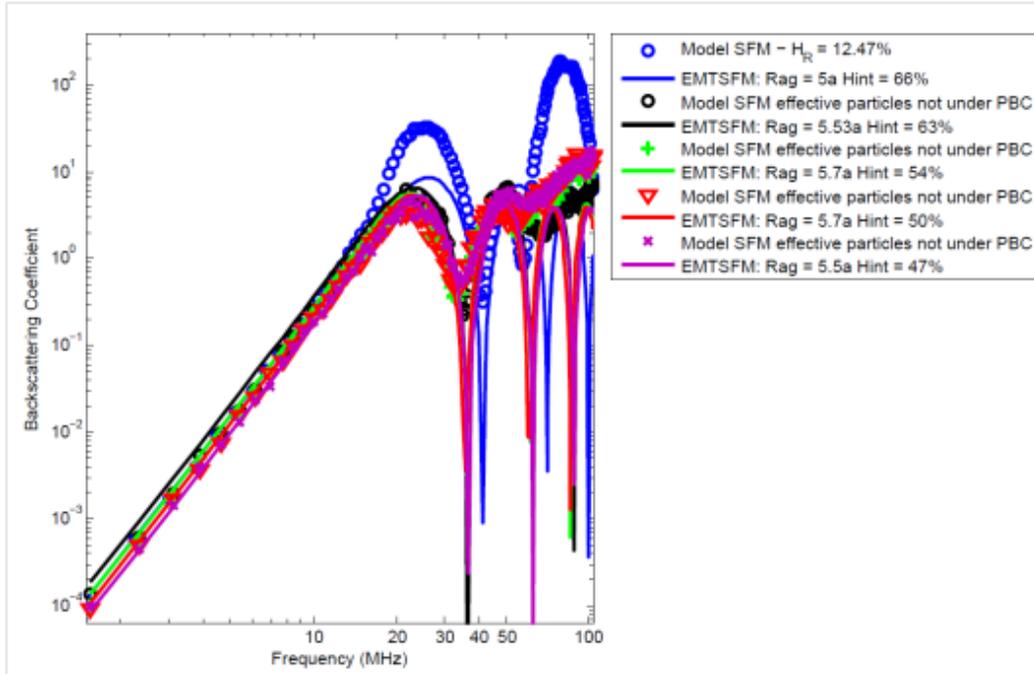


Figure 32: Influence of the compactness on the backscattering coefficient. The markers represent the backscattering coefficient based on the SFM. The circles refer to H_R the reduced hematocrit from the initial at 20% hematocrit.. The triangle and the addition symbols represent the backscattering from the RBCs not under periodic boundary conditions. The lines represent the backscattering coefficient given by the EMTSFM model. Each compactness corresponds to a specific color.

Discussion

The SFM is considered in the literature to describe the backscattering coefficient from aggregated and non aggregated RBCs [16, 66]. However, this numerical SFM cannot be applied in the framework of an inverse problem [62]. We undertake the validation of the EMTSFM in approximating the SFM which can be used on the other hand for real time measurement of RBC aggregation.

In this study, we found that the BSC increased when the aggregate size increased. Moreover, changes in the aggregate size move the position of the first peak on the backscattering coefficient curve. The higher the aggregate size the more the BSC first peak position will occur in lower frequencies. This observation agrees with previous numerical studies of RBC aggregation realized either in 2D [62] or in 3D [3].

An increase in the internal hematocrit (or compactness) leads to an increase in the amplitude of the backscattering coefficient. This dependence is explained by the volume fraction of RBC involved in the interaction with the ultrasound waves. Keeping the aggregate size constant and varying only the compactness, the position of the first peak occurs at the same frequency. This confirms further that the occurrence of the BSC first peak is an indicator of the aggregate size.

The prediction of the backscattering coefficient based on the EMTSFM approximates well the SFM. The quantitative analysis of our validation study showed that the EMTSFM is identical to the SFM at all hematocrits under certain limiting conditions. For an absolute error value of 0.4, the limits of applicability are kr_{ag} below 0.82, 0.84 and 1.06 for all aggregate sizes studied at 20, 30 and 40% hematocrit respectively. This result is consistent with the value of 1.32 found in a previous 2D validation study at 30% relative error. These differences can be explained by the fact the systemic hematocrit H was a surface ratio of RBCs within a region of interest and not a volumetric ratio. Therefore, the simulated hematocrit differs from the real hematocrit encountered in 3D.

Based on the study, the EMTSFM is sensitive to all three relevant structural parameters: the hematocrit, the compactness and the aggregate size.

The compactness is an interesting feature that might be relevant for other biomedical applications. The proliferation of cells leading to tumours appears structurally as an aggregation of cells. This observation has been made by Saha et al. [78] recently. This structural feature can be characterized *in vivo* using the EMTSFM theory to reveal the degree of compactness. Of course, an increase in cell proliferation, locally, will reflect a

higher compactness assuming the effective particle size to be the tumour size. Rayleigh theory applies for a product $k * r_{ag} < \frac{\pi}{10}$ referring to Ishimaru [12], where k is the wavenumber and r_{ag} the scatterer size. At low frequencies, spectral slope greater than 4 was found in our results. This is confirmed by Saha et al. who performed analogous numerical experiment and has been attributed to several conditions such as attenuation and/or polydispersity effects. We investigated deeper the causes of the variation in the spectral slope. In other word, we find out what is actually the contribution of the coefficient k^4 predicted by Rayleigh theory in the simulated backscattering coefficient. These slope differences where the BSC varies linearly might reduce the goodness of fit when dealing with the inverse problem. In our simulation, we did not reproduce the surrounding medium which only contributes to the attenuation through the absorption phenomena. As usually performed in numerical experiment, we applied PBC to our dense suspension of RBC aggregates. PBC results in the conservation of mass that is, if the RBC moves out from one side of the region of interest, another RBC enters in the opposite side. The periodicity effect might alter the simulated monodisperse suspension. In figure 33, the backscattering coefficients in red colors reflects the scattering from all RBCs whether they are under PBC or not. The green curve represents the backscattering coefficient from RBCs not under PBC that is, the effective particles are not cut. The spectral slope is better fitted by the EMTSFM theory when the periodic particles are excluded. These results suggest that PBC may alter the measured ultrasonic properties and should be removed during the backscattering coefficient estimation even if it decreases the initial hematocrit H_{real} to H_R .

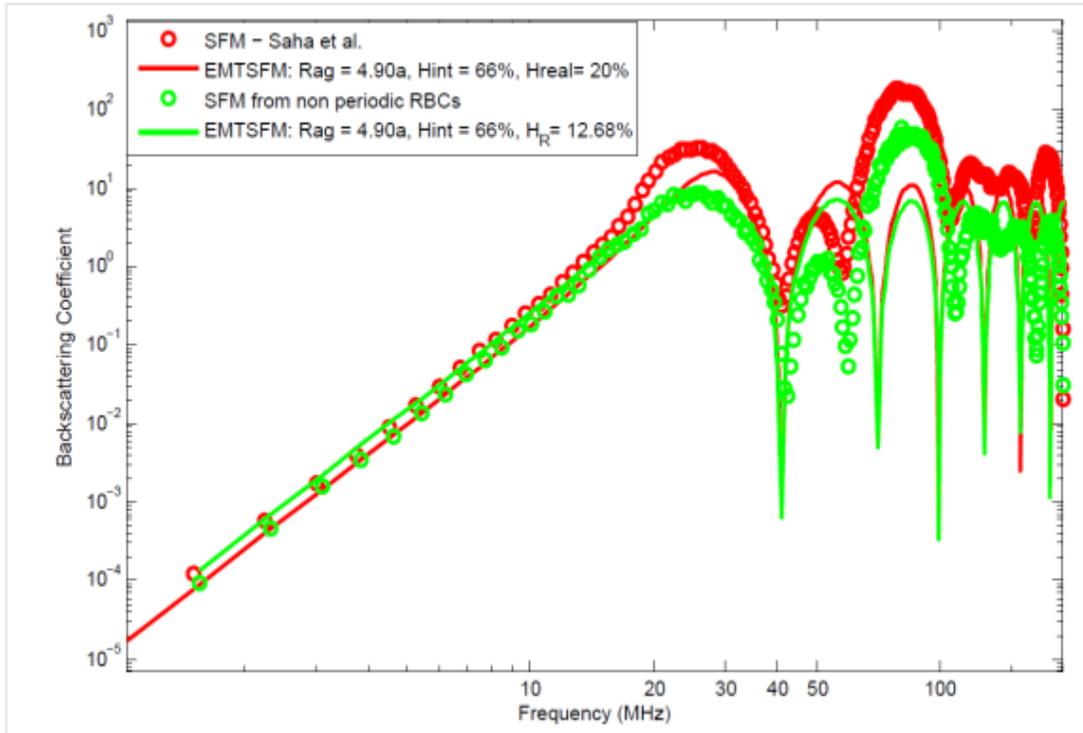


Figure 33: Variation of spectral slope due to the imposed periodicity. The blue curve stands for the backscattering coefficient from SFM model as performed by Saha et al. The hematocrit is 20%. The blue line represents the backscattering coefficient from the SFM model taken into account non periodic RBCs. The hematocrit is reduced to H_R . The red line corresponds to the EMTSFM theory based on structural parameters of the simulated medium (R_{ag} Aggregate size and H_{int} Compactness).

The goal here was to show how good the EMTSFM is compared to the SFM in the context of hyperaggregation. A fast and robust method as performed earlier by Saha and al. [3] was sufficient for that purpose. With this simple simulation method, the highest compactness for a hard sphere suspension can be achieved compared to classical methods namely Monte Carlo [85] and Molecular dynamic [71] techniques. However, these classical techniques will allow to reproduce hyperaggregation by incorporating a deformability factor of the RBC scattering unit. By this route, the aggregation level can be drastically increased. Moreover, this approach applied to Molecular Dynamic will allow

to derive measurement properties such as the viscosity which can be compared to *in vitro* data. By this way, the relationship between aggregation state and viscosity can be investigated.

The structure factor model is computationally intensive mainly because of the structure factor calculation. With the EMTSFM theoretical model, this numerical computation is no longer required. Wertheim [63] has provided an analytical equation to predict the structure factor of effective particles, applicable in 3D and not in 2D.

The exact solution of hard spheres given by Wertheim parameterized the structure factor of effective particles by the volume fraction of aggregates and their size. This relation will be useful to solve the inverse problem for real time application.

Conclusion

We investigated in 3D the validation of the EMTSFM in characterizing RBC hyperaggregation through a numerical experiment. The pathological blood state is reproduced by following the hexagonal close packing HCP scheme. This simulation method applied to RBCs provides the highest compactness as far as the RBC is considered to behave as hard sphere.

The SFM considered as the best theoretical model to predict the backscattering coefficient from blood is not applicable in an inverse problem context. In order to overcome this limitation, the EMTSFM was introduced. We investigated in 3D how good the approximation of the EMTSFM compared to the numerical SFM is. Additionally, we investigated the influences of aggregation structural features such as the compactness and the aggregate size on the frequency dependence of the backscattering coefficient. The EMTSFM was found to match the SFM for a product $kr_{ag} < 1.06$ at 40% hematocrit.

The validation of the EMTSFM discussed in this paper makes possible the quantification of RBC hyperaggregation by ultrasound. We believe that the EMTSFM can be helpful to understand and prevent hemorheological pathologies.

Chapitre 5 : Discussion Générale

Notre travail s'inscrit dans les méthodes de caractérisation tissulaire par ultrasons. Grâce à la modélisation du coefficient de rétrodiffusion dont l'amplitude et la dépendance fréquentielle sont liées à la structure cellulaire, nous avons exploré le potentiel des ultrasons à caractériser l'agrégation érythrocytaire. Nous avons validé numériquement et déterminé les limites d'applicabilité du nouveau modèle TMEFMS au cours de ces travaux. Nous avons étudié séparément l'influence des paramètres de structure que sont le rayon et la compacité des agrégats sur le coefficient de rétrodiffusion. Approximant le sang par un système de sphères dures, nous avons calculé analytiquement le facteur de structure (et donc le coefficient de rétrodiffusion) sans recourir à la connaissance de la position spatiale des agrégats (particules effectives). Nous présentons ci-dessous les limitations des outils utilisés lors de nos expériences numériques. Nous discutons ensuite l'approximation du modèle MFS par le modèle utilisé, TMEFMS ainsi que le comportement de la pente spectrale du coefficient de rétrodiffusion. En conclusion, nous évoquons un potentiel de la méthode ultrasonore pour la prévention des tumeurs localisées.

5.1 Limitation de la méthode de simulation

Différentes approches sont possibles pour simuler l'agrégation. Dans le cadre de notre étude, l'objectif était d'étudier la validité du modèle et non de reproduire de manière fiable l'agrégation observée *in vivo*. Toutefois, en biologie théorique, il existe des méthodes assez robustes ayant été validées en comparant les mesures produites par la simulation numérique et les mesures expérimentales présentes dans la littérature. Dans ce contexte, Fedosov a pu reproduire l'agrégation utilisant une variante de la dynamique moléculaire appelée Dissipative Particle Dynamics [97]. Cette méthode de simulation modélise aussi bien le milieu environnant donc le plasma et les globules rouges en reproduisant leur forme biconcave. Liu et al [99] a appliqué une procédure similaire cette

fois-ci, en utilisant une approche de dynamique moléculaire proprement dite et en utilisant des potentiels d'interaction entre les globules rouges validés. Malgré la difficulté de ces techniques de simulation à simuler des milieux denses, elles offrent cet avantage de fournir des mesures telles que la viscosité comparable à des données expérimentales. Cet avantage n'existe pas dans notre cas.

5.2 Approximation du modèle

Le modèle TMEMFS vise à caractériser l'agrégation rencontrée chez les patients atteints de maladies présentant une hyperviscosité. Dans ces conditions, l'agrégation des globules rouges est anormalement élevée. L'énergie de liaison est si élevée que les structures en rouleau disparaissent au profit d'arrangement de globules rouges en une sphère de forte compacité. Ce modèle suppose donc que dans la région du vaisseau sanguin étudiée, tous les globules rouges sont agrégés formant des particules sphériques et que la distribution de rayon des particules effectives est monodisperse. La dimension de la ROI étudiée peut être considérée si petite que localement la monodispersité du milieu sanguin est valide. Toutefois, une preuve expérimentale permettrait de confirmer la validité de cette hypothèse en utilisant des agents agrégeants tels que le F98 ou le Dextran pour induire une forte agrégation.

5.3 Limites d'applicabilité du modèle

Le modèle TMEMFS décrit de manière adéquate l'hyperagrégation en partant du principe que le modèle de référence est le modèle numérique de facteur de structure MFS. Dans le cadre de notre simulation de l'agrégation, nous avons trouvé que le modèle TMEMFS approximait correctement le modèle MFS tant que le produit $kr_{ag} < 1.06, 0.84$ et 0.82 pour les hématocrites respectifs : 40%, 30% et 20%. Notons que ces hématocrites se réduisent de moitié environ lorsqu'on supprime tous les globules rouges périodisés. La compacité a été étudiée seulement pour un hématocrite initial de 20% dû à l'impossibilité de garder le caractère aléatoire des globules rouges suspendus dans le milieu de simulation si on désire varier la compacité à 40%. Bien qu'un

hématocrite de 20% soit irréaliste d'un point de vue physiologique, il permet d'étudier l'influence de la compacité sur le coefficient de rétrodiffusion.

5.4 Pentés Spectrales

Dans l'article de Saha et al, la variation de la pente du coefficient de rétrodiffusion prédite par le modèle MFS n'était pas constante. La pente spectrale augmente à environ 13MHz sur la figure 33. Une explication proposée dans son article à propos de cette pente supérieure à 4, comme le veut la théorie de Rayleigh, est la présence d'une certaine atténuation et/ou d'une distribution de rayons d'agrégats. Nous avons réalisé une étude supplémentaire pour étayer ces hypothèses.

La figure 34 représente le coefficient de rétrodiffusion provenant de l'ensemble des globules rouges simulés (courbe rouge) comme effectué dans Saha et coll. La variation de la pente spectrale est visible avant et après 13MHz. Le rayon de l'agrégat est ici d'environ $13.5 \mu m$. Au cours de la simulation, nous avons imposé des conditions périodiques aux limites de la région d'intérêt. Cette procédure permet à chaque fois qu'un globule rouge se retrouve en dehors du milieu de simulation, il est réintroduit du côté opposé. De cette manière, la densité des globules rouges est conservée. Malheureusement, cette procédure commune en simulation numérique n'est pas sans altérer la réponse ultrasonore du milieu de simulation. La courbe verte illustre le coefficient de rétrodiffusion des globules rouges sur lesquels aucune périodicité n'est appliquée. Ces globules sont donc entièrement à l'intérieur de la région d'intérêt formant des particules effectives pleines. La pente reste de 4 sur toute la gamme de fréquence allant de 1 à 23MHz environ. Ceci explique donc la provenance du changement de pente spectrale observée et non prédite par le modèle acoustique. Pour une comparaison quantitative, nous avons représenté l'erreur absolue dans la figure 35.

5.5 Limites du modèle EMTSFM

Le modèle EMTSFM décrit mieux le coefficient de rétrodiffusion lorsque les particules périodiques sont éliminées réduisant par cette même opération l'hématocrite. La première explication serait que le modèle EMTSFM fonctionne plutôt à faible hématocrite. Mais une seconde hypothèse peut expliquer les écarts entre la simulation et le modèle EMTSFM. En effet, la périodisation des globules rouges situés dans la particule effective pourrait engendrer une certaine polydispersité. Le modèle EMTSFM ne prenant pas en compte une distribution de tailles de particules n'est par conséquent pas appropriée pour décrire la rétrodiffusion d'un système polydisperse. Il semble plutôt qu'une élimination de ces particules périodisées revient à créer un milieu parfaitement monodisperse avec une taille unique de diffuseurs. Par cette procédure, le modèle colle mieux avec le coefficient de rétrodiffusion simulé numériquement

5.6 Potentielles applications biomédicales

Les anomalies hémorhéologiques représentent des facteurs de risques de plusieurs maladies cardio-vasculaires. L'hyperagrégation a été proposée comme marqueur de l'inflammation. Cette mesure ultrasonore de l'agrégation pourrait servir à évaluer l'agrégation in vivo. Cette mesure locale de l'agrégation est une mesure dépendant du flux sanguin contrairement aux techniques de mesure existante. La quantification par ultrasons de l'agrégation offre un intérêt dans d'autres pathologies caractérisées par l'agrégation de cellules. C'est typiquement le cas des cancers tels que le sarcome.

La compacité des tumeurs, en d'autres, termes la concentration locale des cellules tumorales sont anormalement élevés dans certaines maladies. Identifier la présence de ces structures biologiques contribuerait à leur prévention.

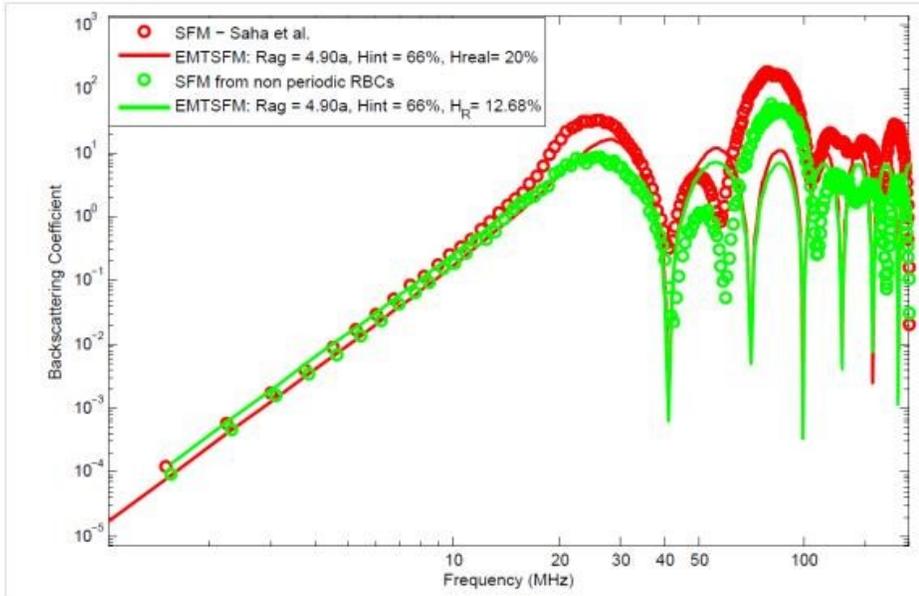


Figure 34 : Coefficients de rétrodiffusion selon la procédure de Saha et coll. (en rouge), Hreal et en supprimant les particules effectives périodisées (en vert), H_R .

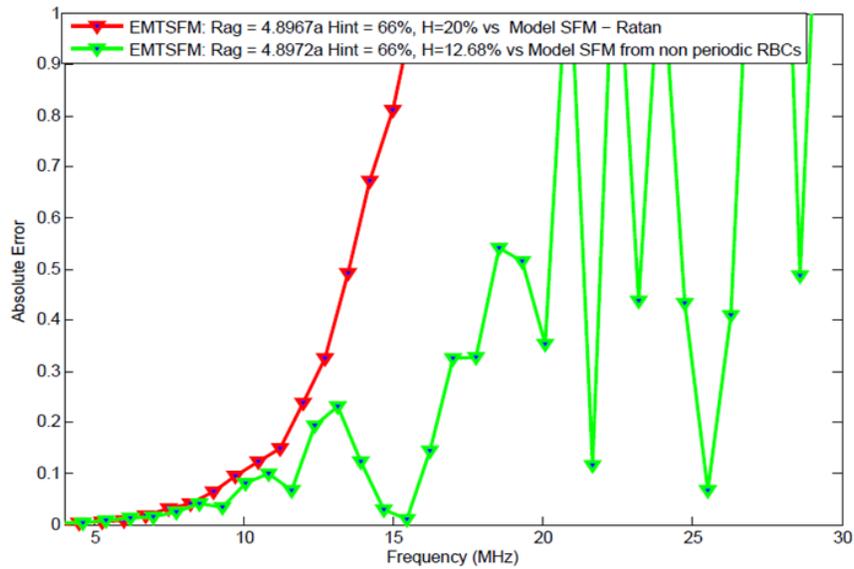


Figure 35: Courbes d'erreur absolue entre le modèle TMEMFS et le modèle MFS calculé selon la procédure de Saha et coll. (en rouge), Hreal et après avoir supprimé les particules périodisées (en vert), H_R .

Conclusion

L'objectif de ce projet était d'étudier la validité du modèle TMEFMS à prédire l'hyperagrégation érythrocytaire par le coefficient de rétrodiffusion ultrasonore. Cette étude a permis d'autre part de confirmer certains résultats tels que l'effet de la taille de l'agrégat sur le coefficient de rétrodiffusion mais aussi de proposer de nouveaux paramètres tels que la compacité afin de mieux comprendre la relation qui existe entre la réponse ultrasonore et le milieu diffusant. Dans le cadre de la validation du modèle en 3D, nous avons reproduit l'hyperagrégation numériquement afin de modéliser les agrégats en conditions pathologiques tout en évitant les effets confondants sur le coefficient de rétrodiffusion ultrasonore. Ce modèle numérique permet d'obtenir une compacité maximale pour des globules rouges agrégés en supposant que les globules rouges sont assimilables à des sphères dures. Ces outils nous ont permis de spécifier le domaine d'applicabilité du modèle TMEFMS en le comparant avec le modèle exact de rétrodiffusion mais non inversible en temps réel, le modèle MFS. Les résultats montrent que le modèle permet une quantification de l'hyperagrégation pour des hémocrites de 20, 30 et 40 % dans certaines conditions que nous avons déterminées. L'effet de la taille et de la compacité des agrégats sur le coefficient de rétrodiffusion prédit par le modèle TMEFMS a été étudié dans une bande de fréquences allant de 4 à 100 MHz. Cette étude permet une meilleure quantification ultrasonore de l'agrégation érythrocytaire par la modélisation des 3 variables que sont l'hématocrite, le rayon de l'agrégat et la compacité. Afin de procéder à des applications expérimentales, la résolution du problème inverse sera la prochaine étape. La forme analytique du coefficient de rétrodiffusion prédit par le nouveau modèle TMEFMS rend possible une application en temps réel de la mesure de l'agrégation.

Références

- [1] O. K. Baskurt, *Handbook of hemorheology and hemodynamics* vol. 69: Ios Pr Inc, 2007.
- [2] S. H. Wang and K. K. Shung, "In vivo measurements of ultrasonic backscattering in blood," *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, vol. 48, pp. 425-431, 2001.
- [3] R. K. Saha, *et al.*, "Assessment of accuracy of the structure-factor-size-estimator method in determining red blood cell aggregate size from ultrasound spectral backscatter coefficient," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 129, p. 2269, 2011.
- [4] I. Fontaine, *et al.*, "A system-based approach to modeling the ultrasound signal backscattered by red blood cells," *Biophysical journal*, vol. 77, pp. 2387-2399, 1999.
- [5] G. Cloutier and Z. Qin, "Ultrasound backscattering from non-aggregating and aggregating erythrocytes-a review," *Biorheology*, vol. 34, p. 443, 1997.
- [6] F. T. H. Yu, *et al.*, "Ultrasonic parametric imaging of erythrocyte aggregation using the structure factor size estimator," *Biorheology*, vol. 46, pp. 343-363, 2009.
- [7] J. Stoltz, "Cardiovascular diseases, risk factors and hemorheological parameters," *Clin. Hemorheol*, vol. 3, pp. 257-267, 1981.
- [8] H. Schmid-Schönbein, *et al.*, "Red cell aggregation in blood flow," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 54, pp. 159-167, 1976.
- [9] F. Yu, *et al.*, "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. 481-488, 2011.
- [10] G. Cloutier, "Characterization of erythrocyte aggregation with ultrasound," *Biorheology*, vol. 36, pp. 443-446, 1999.
- [11] H. Kitamura and S. Kawasaki, "Detection and clinical significance of red cell aggregation in the human subcutaneous vein using a high-frequency transducer (10 MHz): a preliminary report," *Ultrasound Med Biol*, vol. 23, pp. 933-938, 1997.

- [12] K. K. Shung and G. A. Thieme, *Ultrasonic scattering in biological tissues*: CRC, 1993.
- [13] K. K. Shung, *et al.*, "Scattering of ultrasound by blood," *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, pp. 460-467, 1976.
- [14] L. Y. L. Mo and R. S. C. Cobbold, "A stochastic model of the backscattered Doppler ultrasound from blood," *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, pp. 20-27, 1986.
- [15] F. L. Lizzi, *et al.*, "Ultrasonic spectrum analysis for tissue evaluation," *Pattern Recognition Letters*, vol. 24, pp. 637-658, 2003.
- [16] V. Twersky, "Low-frequency scattering by correlated distributions of randomly oriented particles," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 81, p. 1609, 1987.
- [17] I. Fontaine, *et al.*, "A system-based approach to modeling the ultrasound signal backscattered by red blood cells," *Biophys J*, vol. 77, pp. 2387-2399, Nov 1999.
- [18] D. Savéry and G. Cloutier, "Effect of red cell clustering and anisotropy on ultrasound blood backscatter: a Monte Carlo study," *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 52, pp. 94-103, Jan 2005.
- [19] V. Twersky, "Low-frequency scattering by mixtures of correlated nonspherical particles," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 84, p. 409, 1988.
- [20] N. E. Berger, *et al.*, "Polydisperse scattering theory and comparisons with data for red blood cells," *J Acoust Soc Am*, vol. 89, pp. 1394-1401, Mar 1991.
- [21] Y. Yuan and K. Shung, "Ultrasonic backscatter from flowing whole blood. I: Dependence on shear rate and hematocrit," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 84, p. 52, 1988.
- [22] Y. Yuan and K. Shung, "Ultrasonic backscatter from flowing whole blood. II: Dependence on frequency and fibrinogen concentration," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 84, p. 1195, 1988.
- [23] D. Savéry, *Modélisation de la rétrodiffusion des ultrasons par le sang: application à la mesure de l'agrégation érythrocytaire*: Université de Montréal, 2003.
- [24] E. Franceschini, *et al.*, "Simultaneous estimation of attenuation and structure parameters of aggregated red blood cells from backscatter measurements," *J Acoust Soc Am*, vol. 123, pp. EL85-91, Apr 2008.

- [25] A. J. Vander, *et al.*, *Human physiology : the mechanisms of body function*, 8th ed. Boston, Mass.: WCB McGraw-Hill, 2001.
- [26] A. C. Zimmer, "Comparaison du niveau d'agrégation érythrocytaire mesuré par rétrodiffusion ultrasonore chez des sujets sains et diabétiques," Maitrise, Institut de Génie Biomédical, Université de Montréal, Montréal, 2002.
- [27] M. Sugihara-Seki and B. M. Fu, "Blood flow and permeability in microvessels," *Fluid dynamics research*, vol. 37, pp. 82-132, 2005.
- [28] G. Cokelet, "Hemorheology and hemodynamics," in *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*, 2011, pp. 1-140.
- [29] A. S. Popel and P. C. Johnson, "Microcirculation and hemorheology," *Annual review of fluid mechanics*, vol. 37, p. 43, 2005.
- [30] J. Triplette, "Porteur du Trait Drépanocytaire et Exercice Physique: Anomalies hémorhéologiques et vasculaires," 2008.
- [31] H. Schmid-Schönbein, *et al.*, "Erythrocyte aggregation: causes, consequences and methods of assessment," *Tijdschr NVKC*, vol. 15, pp. 88-97, 1990.
- [32] O. K. Baskurt and H. J. Meiselman, "RBC aggregation: more important than RBC adhesion to endothelial cells as a determinant of in vivo blood flow in health and disease," *Microcirculation*, vol. 15, pp. 585-590, 2008.
- [33] F. T. H. Yu, "Paramétrisation de la rétrodiffusion ultrasonore érythrocytaire haute fréquence et pertinence comme facteur de risque de la thrombose veineuse," 2010.
- [34] H. Demiroğlu, "The importance of erythrocyte aggregation in blood rheology: considerations on the pathophysiology of thrombotic disorders," *Blood*, vol. 89, pp. 4236-4236, 1997.
- [35] M. Hayakawa and F. Kuzuya, "Effects of ticlopidine on erythrocyte aggregation in thrombotic disorders," *Angiology*, vol. 42, pp. 747-753, 1991.
- [36] H. Schmid-Schönbein and E. Volger, "Red-cell aggregation and red-cell deformability in diabetes," *Diabetes*, vol. 25, p. 897, 1976.
- [37] Y. I. Cho, *et al.*, "Hemorheological disorders in diabetes mellitus," *Journal of diabetes science and technology (Online)*, vol. 2, p. 1130, 2008.
- [38] D. Justo, *et al.*, "Increased erythrocyte aggregation in men with coronary artery disease and erectile dysfunction," *International journal of impotence research*, vol. 21, pp. 192-197, 2009.

- [39] B. Chong-Martinez, *et al.*, "Decreased red blood cell aggregation subsequent to improved glycaemic control in Type 2 diabetes mellitus," *Diabetic medicine*, vol. 20, pp. 301-306, 2003.
- [40] R. B. Ami, *et al.*, "Parameters of red blood cell aggregation as correlates of the inflammatory state," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 280, pp. H1982-H1988, 2001.
- [41] V. Schechner, *et al.*, "Plasma Dependent Reduction in Red Blood Cell Aggregation After Dextran Sulfate Low-density Lipoprotein Apheresis—Implications for Rheological Studies," *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, vol. 9, pp. 379-384, 2005.
- [42] G. Hacioglu, *et al.*, "Red blood cell rheological properties in various rat hypertension models," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 26, pp. 27-32, 2002.
- [43] S. Chen, *et al.*, "Enhanced aggregability of red blood cells of beta-thalassemia major patients," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 270, pp. H1951-H1956, 1996.
- [44] M. Boynard, *et al.*, "Aggregation of red blood cells studied by ultrasound backscattering," *Biorheology*, vol. 24, pp. 451-461, 1987.
- [45] M. Kolios, "Biomedical ultrasound imaging: from 1 to 1000 mhz," *Can. Acoust.*, vol. 37, pp. 35-42, 2009.
- [46] M. L. Oelze, *et al.*, "Differentiation and characterization of rat mammary fibroadenomas and 4T1 mouse carcinomas using quantitative ultrasound imaging," *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, vol. 23, pp. 764-771, 2004.
- [47] N. Bouhlef, "Caractérisation de texture d'échographie RF par champ markovien," Université René Descartes-Paris V, 2006.
- [48] T. L. Szabo, *Diagnostic ultrasound imaging : inside out*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2004.
- [49] J. F. Greenleaf and C. M. Sehgal, *Biologic system evaluation with ultrasound*: Springer-Verlag New York, Inc., 1992.
- [50] K. K. Shung, *et al.*, "The effects of hematocrit, shear rate, and turbulence on ultrasonic Doppler spectrum from blood," *IEEE Trans Biomed Eng.*, vol. 39, pp. 462-469, May 1992.

- [51] R. Romijn, *et al.*, "Estimation of scatterer size from backscattered ultrasound: a simulation study," *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, vol. 36, pp. 593-606, 1989.
- [52] F. L. Lizzi, *et al.*, "Theoretical framework for spectrum analysis in ultrasonic tissue characterization," *J Acoust Soc Am*, vol. 73, pp. 1366-1373, Apr 1983.
- [53] B. A. Angelsen, "A theoretical study of the scattering of ultrasound from blood," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 27, pp. 61-67, Feb 1980.
- [54] K. K. Shung, *et al.*, "Scattering of ultrasound by blood," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 23, pp. 460-467, Nov 1976.
- [55] V. Twersky, "Low-frequency scattering by correlated distributions of randomly oriented particles," *Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 81 pp. 1609-1618., 1987.
- [56] B. Lim, *et al.*, "Simulation of red blood cell aggregation in shear flow," *Biorheology*, vol. 34, pp. 423-441, Nov-Dec 1997.
- [57] D. Savery and G. Cloutier, "A point process approach to assess the frequency dependence of ultrasound backscattering by aggregating red blood cells," *J Acoust Soc Am*, vol. 110, pp. 3252-3262, Dec 2001.
- [58] R. K. Saha and G. Cloutier, "Monte Carlo study on ultrasound backscattering by three-dimensional distributions of red blood cells," *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, vol. 78, p. 061919, Dec 2008.
- [59] C. C. Coussios, "The significance of shape and orientation in single-particle weak-scatterer models," *J Acoust Soc Am*, vol. 112, pp. 906-15, Sep 2002.
- [60] B. Lim and R. S. Cobbold, "On the relation between aggregation, packing and the backscattered ultrasound signal for whole blood," *Ultrasound Med Biol*, vol. 25, pp. 1395-405, Nov 1999.
- [61] F. T. Yu and G. Cloutier, "Experimental ultrasound characterization of red blood cell aggregation using the structure factor size estimator," *J Acoust Soc Am*, vol. 122, pp. 645-56, Jul 2007.
- [62] B. M. Emilie Franceschini, and Guy cloutier, "Forward Problem Study of an Effective Medium Model for Ultrasound Blood Characterization," *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 58, pp. 2668-2679, 12 december 2011 2011.

- [63] M. Wertheim, "Exact solution of the Percus-Yevick integral equation for hard spheres," *Physical Review Letters*, vol. 10, pp. 321-323, 1963.
- [64] I. S. Gill and O. Ukimura, *Contemporary Interventional Ultrasonography in Urology*: Springer, 2008.
- [65] M. F. Insana, *et al.*, "Backscatter coefficient estimation using array transducers," *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, vol. 41, pp. 714-723, 1994.
- [66] D. Savéry and G. Cloutier, "High-frequency ultrasound backscattering by blood: Analytical and semianalytical models of the erythrocyte cross section," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 121, p. 3963, 2007.
- [67] A. Ishimaru, *Wave propagation and scattering in random media* vol. 2: IEEE press Piscataway, NJ, 1997.
- [68] L. Y. L. Mo and R. S. C. Cobbold, "Theoretical models of ultrasonic scattering in blood," *Ultrasonic scattering in biological tissues*, pp. 125-170, 1993.
- [69] V. Twersky, "Absorption and multiple scattering by biological suspensions," *JOSA*, vol. 60, pp. 1084-1093, 1970.
- [70] B. E. Warren, *X-ray Diffraction*: Dover publications, 1990.
- [71] I. Fontaine and G. Cloutier, "Modeling the frequency dependence (5–120 MHz) of ultrasound backscattering by red cell aggregates in shear flow at a normal hematocrit," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 113, p. 2893, 2003.
- [72] I. Fontaine, *et al.*, "Simulation of ultrasound backscattering by red cell aggregates: Effect of shear rate and anisotropy," *Biophysical Journal*, vol. 82, pp. 1696-1710, 2002.
- [73] K. Younge, *et al.*, "A model system for examining the radial distribution function," *American journal of physics*, vol. 72, p. 1247, 2004.
- [74] J. Als-Nielsen and D. McMorrow, *Elements of modern X-ray physics*: John Wiley & Sons, 2011.
- [75] V. Simonet and R. Bellissent, "La structure des liquides simples et des alliages liquides métalliques," in *Journal de Physique IV (Proceedings)*, 2003, pp. 97-124.
- [76] G. T. Kuster and M. N. Toksoz, "VELOCITY AND ATTENUATION OF SEISMIC WAVES IN TWO-PHASE MEDIA: PART II. EXPERIMENTAL RESULTS," *Geophysics*, vol. 39, pp. 607-618, 1974.

- [77] E. Franceschini, *et al.*, "Forward problem study of an effective medium model for ultrasound blood characterization," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, vol. 58, pp. 2668-2679, 2011.
- [78] R. K. Saha and M. C. Kolios, "Effects of cell spatial organization and size distribution on ultrasound backscattering," *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, vol. 58, pp. 2118-2131, 2011.
- [79] S. MacRury, *et al.*, "Increased red cell aggregation in diabetes mellitus: association with cardiovascular risk factors," *Diabetic medicine*, vol. 10, pp. 21-26, 1993.
- [80] S. Chien, "Red cell deformability and its relevance to blood flow," *Annual review of physiology*, vol. 49, pp. 177-192, 1987.
- [81] H. Routh, *et al.*, "One-dimensional computer simulation of a wave incident on randomly distributed inhomogeneities with reference to the scattering of ultrasound by blood," *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 25, pp. 667-671, 1987.
- [82] B. Lim and R. S. C. Cobbold, "On the relation between aggregation, packing and the backscattered ultrasound signal for whole blood," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 25, pp. 1395-1405, 1999.
- [83] M. P. Allen and D. J. Tildesley, *Computer simulation of liquids* vol. 18: Oxford university press, 1989.
- [84] D. Savéry and G. Cloutier, "Effect of red cell clustering and anisotropy on ultrasound blood backscatter: a Monte Carlo study," *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, vol. 52, pp. 94-103, 2005.
- [85] R. K. Saha and G. Cloutier, "Monte Carlo study on ultrasound backscattering by three-dimensional distributions of red blood cells," *Physical review E*, vol. 78, p. 061919, 2008.
- [86] E. Feleppa, *et al.*, "Diagnostic spectrum analysis in ophthalmology: A physical perspective," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 12, pp. 623-631, 1986.
- [87] T. Liu, *et al.*, "Ultrasonic tissue characterization using 2-D spectrum analysis and its application in ocular tumor diagnosis," *Medical physics*, vol. 31, p. 1032, 2004.
- [88] U. Scheipers, *et al.*, "Ultrasonic multifeature tissue characterization for prostate diagnostics," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 29, pp. 1137-1149, 2003.
- [89] T. J. Hall, *et al.*, "Ultrasonic measurement of glomerular diameters in normal adult humans," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 22, pp. 987-997, 1996.

- [90] T. Garcia, *et al.*, "On the ultrasonic properties of tendon," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 29, pp. 1787-1797, 2003.
- [91] B. I. Raju, *et al.*, "Quantitative ultrasonic methods for characterization of skin lesions< i> in vivo</i>," *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 29, pp. 825-838, 2003.
- [92] Z. Vered, *et al.*, "Ultrasound integrated backscatter tissue characterization of remote myocardial infarction in human subjects," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 13, pp. 84-91, 1989.
- [93] S. Chaffai, *et al.*, "Ultrasonic characterization of human cancellous bone using transmission and backscatter measurements: relationships to density and microstructure," *Bone*, vol. 30, p. 229, 2002.
- [94] G. Czarnota, *et al.*, "Ultrasound imaging of apoptosis: high-resolution non-invasive monitoring of programmed cell death in vitro, in situ and in vivo," *British journal of cancer*, vol. 81, p. 520, 1999.
- [95] R. M. Vlad, *et al.*, "Quantitative Ultrasound Characterization of Cancer Radiotherapy Effects< i> In Vitro</i>," *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 72, pp. 1236-1243, 2008.
- [96] A. Han, *et al.*, "Ultrasonic backscatter coefficient quantitative estimates from high-concentration Chinese hamster ovary cell pellet biophantoms," *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 130, pp. 4139-4147, 2011.
- [97] D. A. Fedosov, *et al.*, "Predicting human blood viscosity in silico," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, p. 11772, 2011.
- [98] C. Sorensen, "Light scattering by fractal aggregates: a review," *Aerosol Science & Technology*, vol. 35, pp. 648-687, 2001.
- [99] Y. Liu and W. K. Liu, "Rheology of red blood cell aggregation by computer simulation," *Journal of Computational Physics*, vol. 220, pp. 139-154, 2006.

