



HAL
open science

Influence de paramètres acoustiques sur l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore : dispositif expérimental et étude préclinique

Tarik Iazourene, Jean-Michel Escoffre, Ayache Bouakaz

► To cite this version:

Tarik Iazourene, Jean-Michel Escoffre, Ayache Bouakaz. Influence de paramètres acoustiques sur l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore : dispositif expérimental et étude préclinique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Tours (UT), Tours, FRA, 2022. Français. NNT: . tel-04852769

HAL Id: tel-04852769

<https://inserm.hal.science/tel-04852769v1>

Submitted on 21 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm

THÈSE présentée par :
Tarik IAZOURENE

soutenue le : **30 novembre 2022**

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

**Influence de paramètres acoustiques sur
l'efficacité de la neurostimulation
ultrasonore : dispositif expérimental
et étude préclinique**

THÈSE dirigée par :

Mr BOUAKAZ Ayache

Directeur de recherche, Inserm, Université de Tours

Co-dirigée par :

Mr ESCOFFRE Jean-Michel

Chargé de recherche, Inserm, HDR, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mr BOU MATAR Olivier

Professeur, Ecole Centrale de Lille

Mr N'DJIN William Apoutou

Chargé de recherche, Inserm, HDR, Université Lyon 1

PRESIDENT DU JURY :

Mr LIEBGOTT Hervé

Professeur, Université Lyon 1

JURY :

Mr BOUAKAZ Ayache

Directeur de recherche, Inserm, Université de Tours

Mr ESCOFFRE Jean-Michel

Chargé de recherche, Inserm, HDR, Université de Tours

Mr BOU MATAR Olivier

Professeur, Ecole Centrale de Lille

Mr N'DJIN William Apoutou

Chargé de recherche, Inserm, HDR, Université Lyon 1

Mme CHAILLOU Elodie

Chargée de recherche, INRAE, HDR, Université de Tours

Mr LIEBGOTT Hervé

Professeur, Université Lyon 1

*A mes grands-parents (que Le Tout-Miséricordieux les accueille en Son vaste Paradis).
A mes parents, mon frère, ainsi que toute ma chère famille.*

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Ayache Bouakaz, ainsi que mon co-directeur de thèse, Jean-Michel Escoffre, pour m'avoir offert cette opportunité de travailler sur un sujet de thèse aussi intéressant. Je les remercie également pour leur encadrement de qualité, ainsi que pour les divers conseils qu'ils m'ont prodigué tout au long de cette thèse. Sous leur supervision, j'ai notamment pu réaliser plusieurs communications scientifiques écrites et orales, et je leur en suis très reconnaissant.

Ensuite, je remercie vivement Mr Hervé Liebgott, professeur à l'IUT Lyon 1, pour avoir présidé le jury évaluant mes travaux de thèse. J'adresse également mes sincères remerciements à Mr Olivier Bou Matar, professeur à l'École Centrale de Lille, et à Mr William Apoutou N'DJIN, chargé de recherche au LabTau (Lyon), pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit de thèse, ainsi que pour leurs remarques pertinentes pour améliorer la qualité de ce document. Aussi, je suis très reconnaissant envers Mme Elodie Chaillou, chargée de recherche à l'INRAE de Nouzilly, d'avoir accepté de faire partie de ce même jury.

D'autre part, je remercie chaleureusement Jean-Marc Grégoire et Jean-Yves Tartu, pour leur grand apport technique tout au long de mes travaux de thèse. Ils ont notamment été d'une grande aide dans la mise en place puis l'utilisation des différents dispositifs expérimentaux, en n'hésitant pas, parfois, à laisser leur travail de côté. Je retiens également les nombreuses discussions passionnantes et enrichissantes, sur divers sujets, que j'ai pu avoir avec eux, mais également l'humour fin dont ils faisaient preuve, et je les en remercie.

Je remercie également Stéphanie Lepaire pour son soutien pendant cette thèse, sa bonne humeur, pour les multiples discussions intéressantes que l'on a échangées, mais aussi les heures supplémentaires de travail qu'elle a dû endurer plusieurs fois pour s'assurer du bon déroulement des diverses démarches administratives. J'en profite aussi pour remercier Géraldine Brohan pour son excellent travail et sa disponibilité. Toujours dans le domaine administratif, j'adresse mes remerciements à Christelle Gauthier, Valérie Hété et Sandra Hémon, ainsi qu'à tous les membres de l'antenne financière du laboratoire.

Je tiens à remercier particulièrement Hanaa Malloul et Rasha Noureddine, avec qui j'ai effectué une grande partie des travaux expérimentaux de ma thèse et aux côtés de qui j'ai beaucoup appris. De même, je remercie, Edward Oujagir et Antoine Pisset pour leur aide décisive lors de ces expérimentations. Je remercie également Jérôme Montharu, Valérie Schubnel ainsi que tout le personnel de l'animalerie du site de la faculté de médecine, mais aussi Anne-Marie Le Guisquet et tout le personnel de l'animalerie de la faculté des sciences.

Par ailleurs, dans le cadre de mes expérimentations, j'ai travaillé avec différentes personnes de l'équipe Psychiatrie neuro-fonctionnelle de notre laboratoire. A ce titre, je remercie grandement Yassine Mofid, pour son amitié sincère, son soutien sans faille aussi bien dans le travail qu'en dehors, et pour l'opportunité qu'il m'a offert d'effectuer des

enseignements à l'IUT de Blois. Je remercie vivement Bruno Brizard, Alexandre Surget, Marc Legrand, Pascal Barone et Arnaud Cressant pour leur précieux apport, notamment lors de mes premières expérimentations animales. Je n'oublie pas de remercier Georgine Acrombessi, Hoda Eliwa, Barbara Planchez, et Yuki Sakai, ainsi que tout le personnel de l'équipe que j'ai pu côtoyer au sein de cette équipe.

Je tiens par ailleurs à remercier mes collègues de bureau, Guillaume Lacoïn et Sean Toffessi Siewe, pour la bonne humeur qu'ils ont pu mettre dans notre bureau, pour les discussions philosophiques interminables mais, néanmoins, intéressantes, et pour leur humour légendaire. Je remercie évidemment mes collègues ou ex-collègues, Aline Banquart, Antoine Presset, Corentin Alix, Pierre Fatou, Amine Bouayyad ainsi que tous ceux que j'ai pu côtoyer. J'adresse un remerciement particulier à Dapeng Li, qui m'a marqué par ses connaissances et sa curiosité scientifique et, surtout, par sa grande gentillesse. Enfin, je remercie grandement Jean-Pierre Remenieras, Serge Dos Santos et Abdeldjalil Ouahabi pour leurs conseils avisés et leurs encouragements. Bien-sûr, je n'oublie pas de remercier mes compatriotes algériens Amel Cherfi et Samir Khoufache, des universités de Blida et Béjaïa, respectivement, avec qui j'ai eu de franches rigolades et passé de très bons moments au laboratoire. Un grand merci également à Nabil Benoudjit, de l'Université de Batna (Algérie), pour ses multiples conseils sur le déroulement de la thèse et ses encouragements.

D'autre part, je tiens à remercier chaleureusement les membres du bureau des étudiants, pour leur organisation des conférences « méridiennes ». Je remercie plus particulièrement ceux aux côtés de qui j'ai travaillé au sein de ce bureau, à savoir Rudolf Hergesheimer, Barbara Planchez et Maria Rosa Bufo. Je remercie également Catherine Belzung, la directrice de notre laboratoire, ainsi que Ayache Bouakaz et Géraldine Brohan pour leur encadrement du bureau des étudiants.

J'ai également été heureux de travailler aux côtés d'Abdelaziz Aliat durant mes premières années de thèse. Je suis aussi content d'avoir connu des personnes telles que Charles Sennoga, Emma Kanbar, Laurent Auboire, Anthony Novell, Michiel Postema et Damien Fouan, qui m'ont tous aidé, chacun à sa manière, durant mes premiers mois de thèse.

Je remercie aussi Laurent Colin et Samuel Callé, du GREMAN, pour leur aide technique et leur gentillesse. Je tiens, d'autre part, à remercier Elodie Chaillou et Mélody Morisse, de l'INRAE de Nouzilly, pour leur précieux apport sur la partie concernant la neurostimulation ultrasonore sur la brebis, ainsi qu'Alan Lelièvre (encadré par Maryse Meurisse), dont le rapport de stage m'a beaucoup aidé à clarifier les études d'histologie et d'immunohistochimie réalisées. Je tiens, par ailleurs, à remercier le personnel de l'INRAE de Nouzilly, qui nous a mis dans de bonnes conditions de travail, ainsi que les personnes ayant travaillé sur le projet STIMUS, notamment Ilyess Zemmoura et Christophe Destrieux.

Sur le plan personnel, je tiens à remercier mes amis proches, Yanis Mehdi Benane, Abderrahmane Loukkal, Mourad Ghazi (à qui je souhaite un prompt rétablissement), Mehdi Larif et Sami Merabti pour m'avoir épaulé durant ces années de thèse, et bien au-delà.

Enfin, le meilleur pour la fin, je ne remercierai jamais assez mes parents, qui ont réalisé d'énormes sacrifices pour ma réussite et celle de mon frère. Leur apport est inestimable, et de simples mots ne suffiraient pas pour les remercier. Mon souhait est de les rendre fiers, et qu'ils puissent être les heureux témoins du fruit de leur dévouement et de leur patience. Je remercie aussi beaucoup mon frère Aghiles pour son soutien indéfectible, sincère et, tout simplement, fraternel. Evidemment, je remercie aussi toute ma famille, en particulier mes chers oncles, tantes, cousins et cousines d'Algérie, de France et du Canada, qui me soutiennent en toutes circonstances.

Résumé

Les maladies neuropsychiatriques, neurodéveloppementales et neurodégénératives constituent un problème de santé publique majeur de nos jours. En effet, pour plusieurs de ces affections, les thérapies, notamment médicamenteuses, sont soit inexistantes, soit inefficaces car confrontées à des taux de résistance élevés. C'est pourquoi la recherche s'est tournée vers des techniques de stimulation cérébrale (électrique ou magnétique). Celles-ci ont démontré des résultats encourageants, mais présentent de sérieuses limitations (faible pouvoir de pénétration, faible résolution spatiale et/ou invasivité), qui font que leur utilisation n'est pas optimale. C'est ainsi que la neurostimulation ultrasonore, qui est dénuée de ces limitations, se présente comme une alternative crédible et prometteuse. Cependant, étant encore au stade de la recherche et du développement, cette technique n'est pas encore entièrement maîtrisée. En effet, les mécanismes qui sous-tendent son fonctionnement ne sont pas encore totalement compris, et une optimisation des paramètres acoustiques à utiliser reste requise. Aussi, l'innocuité de cette technique reste à confirmer.

Dans ce contexte, cette thèse s'est proposée d'étudier l'influence de paramètres acoustiques sur l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore. A cet effet, le cortex moteur primaire (M1) de souris a été ciblé avec des ultrasons, à différentes fréquences (0,5 à 2,25 MHz), pics négatifs de pression (PNP ; 55 à 1460 kPa), durées d'impulsion ultrasonore (DI ; 53,3 à 320 ms) et diamètres de tâche focale (2,2 et 3 mm). L'efficacité de la technique a été évaluée en détectant, visuellement et à l'aide de l'électromyographie, les réponses motrices ainsi générées, et en mesurant le taux de succès (taux de réponses) correspondant. En outre, une étude immunohistochimique, par marquage de la protéine c-Fos, a permis d'évaluer l'impact de la stimulation sur l'activation neurale. Les résultats ont démontré une augmentation sigmoïdale du taux de succès en fonction du PNP, avec des valeurs maximales pouvant atteindre 100 %. Ils ont également mis en lumière l'influence conjuguée de la fréquence, du diamètre de la tâche focale et du PNP appliqué, sur l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore, ainsi que sur l'activation neurale induite par la stimulation. Ainsi, il apparaît que le choix de la fréquence et des caractéristiques géométriques de la sonde, dont dépendent les dimensions de la tâche focale, ont un impact décisif sur l'efficacité de la technique. Aussi, ces résultats ont permis d'observer une potentielle saturation de l'efficacité de la technique lors de l'utilisation de longues DI, avec un taux de succès qui n'est pas nécessairement amélioré au-delà d'une certaine DI (160 ms). D'autre part, les résultats concernant les caractéristiques (amplitude, latence et durée) des réponses motrices ont permis de déterminer que les basses fréquences (0,5 MHz) et les longues DI (320 ms) permettaient d'obtenir des réponses plus robustes. Néanmoins, il ressort de ces différents résultats que le choix des paramètres optimaux requiert un compromis entre l'efficacité, l'innocuité, et l'utilisation souhaitée de la technique. Par ailleurs, une étude de faisabilité de la neurostimulation ultrasonore chez le gros animal (brebis) a été réalisée, posant les bases de futures études d'optimisation et de validation à ce sujet. Ainsi, ces travaux de thèse ont permis d'affiner l'optimisation des

paramètres acoustiques à utiliser pour la neurostimulation ultrasonore, tout en ouvrant des axes de recherche pour de futures études sur le sujet.

Abstract

Neuropsychiatric, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders constitute a major public health issue nowadays. Indeed, many of these diseases lack an efficient treatment, or show high levels of resistance to drug therapies. For this reason, research investigated brain stimulation techniques (electrical or magnetic). These latter showed encouraging results, but suffer, however, from serious limitations (low penetration depth, low spatial resolution and/or invasiveness), which hamper their clinical use. Thus, ultrasound neurostimulation technique (USNS), which does not suffer those limitations, appears to be a credible and promising alternative. Nevertheless, this technique is still under investigation and development. Indeed, the mechanisms underlying USNS are not fully understood, and, on another hand, an optimization of the acoustic parameters to be used is still required. Also, the safety of this technique must be confirmed.

In this context, the objective of this thesis is to study the influence of acoustic parameters on the efficacy of USNS. To do so, the primary motor cortex of mice (M1) was targeted with ultrasound, at different frequencies (0.5 to 2.25 MHz), peak negative pressures (PNP; 55 to 1460 kPa), pulse durations (53.3 to 320 ms) and focal spot diameters (2.2 and 3 mm). The efficacy of the technique was evaluated by assessing, visually and with electromyography, the elicited motor responses, and by measuring the corresponding success rate (response rate). Moreover, immunohistochemistry, labelling c-Fos protein, was used to determine the impact of USNS on neural activation. The results showed a sigmoidal increase of the success rate with PNP, with maximum values that could reach 100 %. They also highlighted the combined influence of the frequency, the focal spot diameter and the applied PNP on the efficacy of USNS, and on the neural activation elicited by the stimulation. Thus, it appears that the choice of the frequency and the geometrical features of the ultrasonic probe has a determining impact on the efficacy of USNS. Also, the results showed a potential saturation of this efficacy when using long pulse durations, with a success rate that is not necessarily improved beyond a certain pulse duration (160 ms). Furthermore, the results concerning the characteristics of the motor responses (amplitude, latency, and duration) showed that the use of low frequencies (0.5 MHz) and long pulse durations (320 ms) induced robust responses. In addition, a feasibility study of USNS in a large animal model (sheep) was conducted, laying the foundations of future optimization and validation studies on this subject.

Finally, this thesis work allowed to fine tune the optimization of acoustic parameters to use for USNS, and defined perspectives for future studies on this subject. Particularly, it becomes clearer that the search for the optimal acoustic parameters to be used for USNS must be done by trying to find a compromise between efficiency, safety, and the desired use of the technique.

Table des matières

Remerciements.....	5
Résumé	9
Abstract.....	11
Table des matières.....	13
Liste des figures	17
Liste des tableaux	22
Liste des acronymes.....	23
Introduction générale.....	25
I. Contexte.....	27
II. Techniques de neuromodulation cérébrale	28
1. Stimulation cérébrale profonde.....	28
2. Stimulation transcrânienne à courant continu	29
3. Stimulation magnétique transcrânienne	30
4. Neurostimulation ultrasonore	31
III. Objectifs.....	32
Références bibliographiques	34
Chapitre 1 : Etat de l'art - Neurostimulation ultrasonore	37
I. Principe	37
II. Bioeffets et Mécanismes de la neuromodulation ultrasonore	38
1. Effets mécaniques.....	38
a. La cavitation	38
b. La force de radiation acoustique (ARF)	38
c. Rôle des effets mécaniques des ultrasons dans le processus de neurostimulation	39
2. Effets thermiques.....	39
3. Mécanismes biophysiques de la neurostimulation ultrasonore.....	41
a. Effets mécaniques	41
b. Effets thermiques	45

III. Efficacité	45
1. Influence de/sur l'anesthésie.....	45
2. Influence du crâne	46
3. Influence des paramètres acoustiques	47
a. Définition des paramètres acoustiques.....	47
b. Bioeffets des paramètres acoustiques : de l'ex vivo à l'animal de rente	51
4. Résolution spatiale, spécificité/sélectivité.....	54
IV. Innocuité.....	62
V. Applications	64
1. Etudes précliniques sur des modèles de pathologies cérébrales	64
2. Etudes cliniques	66
VI. Conclusions	70
Références bibliographiques	71

Chapitre 2 : Mesures ultrasonores préalables aux expériences de neurostimulation 79

Première partie : Caractérisation des sondes ultrasonores utilisées pour la neurostimulation
79

I. Description générale et dispositif expérimental.....	79
1. Description générale.....	79
2. Dispositif expérimental.....	80
II. Caractéristiques acoustiques des sondes ultrasonores utilisées.....	81
III. Simulations à l'aide de Field II	82
1. Simulations en 1D	83
2. Détermination des caractéristiques géométriques des sondes	84
3. Simulations en 2D	89
4. Profils de pression <i>in vivo</i> théoriques	92
IV. Mesures expérimentales pour les expériences <i>in vivo</i>	95
1. Effets du cône	95
2. Mesures expérimentales utilisées lors des expériences <i>in vivo</i>	98

Deuxième partie : Influence du crâne sur le faisceau ultrasonore 100

I. Dispositif et méthode de mesure des effets du crâne.....	100
1. Dispositif expérimental.....	100

2. Méthodes de mesure et de calcul	102
a. Atténuation	102
b. Distorsion.....	103
II. Mesures sur des crânes de souris.....	104
III. Mesures sur des crânes de rats	108
IV. Conclusions	111

Chapitre 3 : Neurostimulation ultrasonore chez la souris : impact des paramètres ultrasonores et des propriétés du faisceau acoustique 113

I. Résumé étendu de l'article original.....	113
1. Objet de l'étude	113
2. Matériel et méthodes	114
3. Résultats et Discussion	116
4. Conclusions	117
II. Article original.....	118

Chapitre 4 : Influence des paramètres acoustiques sur les réponses motrices dues à la neurostimulation ultrasonore : Une étude électromyographique 131

I. Influence du PNP et de la fréquence ultrasonore sur les caractéristiques des réponses motrices	131
1. Influence du PNP à fréquence donnée	131
2. Influence de la fréquence à PNP équivalent	134
II. Influence de la durée de l'impulsion ultrasonore sur les caractéristiques des réponses motrices	136
1. Influence du PNP à durée d'impulsion ultrasonore (DI) donnée	136
2. Influence de la durée d'impulsion ultrasonore (DI) à PNP constant.....	138
III. Conclusions	138
Références bibliographiques	140

Chapitre 5 : Faisabilité de la neurostimulation ultrasonore chez la brebis..... 141

I. Matériel et méthodes	142
II. Résultats	147
1. Résultats obtenus avec la sonde ultrasonore Ultran GS200.....	147

2. Résultats obtenus avec la sonde ultrasonore Ultran GPS350.....	151
3. Résultats concernant l'innocuité de la neurostimulation ultrasonore / électrique ...	154
III. Conclusions	156
Références bibliographiques	159
Conclusions et perspectives.....	161
Annexes	167
Annexe 1 : Neurostimulation ultrasonore chez la souris.....	169
I. Dispositif expérimental.....	169
II. Positionnement de la sonde ultrasonore sur le crâne de souris	172
III. Anesthésie	173
IV. Analyse des données électromyographiques	174
V. Ajustement des courbes de taux de succès.....	176
Références bibliographiques	177
Annexe 2 : Communications scientifiques / Enseignements dispensés	179
Annexe 3 : Premier article en tant que co-auteur	181
Annexe 4 : Second article en tant que co-auteur	199

Liste des figures

Introduction générale

Figure 1 : Stimulation cérébrale profonde	29
Figure 2 : Stimulation transcrânienne à courant continu	30
Figure 3 : Stimulation magnétique transcrânienne	31

Chapitre 1

Figure 1.1 : Les différents mécanismes sous-jacents à la neurostimulation ultrasonore envisagés à ce jour.....	41
Figure 1.2 : Comparaison de la résolution spatiale théorique du faisceau ultrasonore utilisé pour la neurostimulation à des fréquences de 1 MHz et 5 MHz, dans le cerveau de souris...	47
Figure 1.3 : Résumé des principaux paramètres acoustiques utilisés pour la neurostimulation ultrasonore	49
Figure 1.4 : L'IRM fonctionnelle réalisée sur le cerveau de macaque révèle une activation similaire lors de la stimulation ultrasonore de la région 3a/3b de l'hémisphère droit et lors de la présentation d'un stimulus tactile	58
Figure 1.5 : Régions cérébrales ciblées par la neurostimulation ultrasonore dans les différentes études menées chez l'humain et chez le singe	59
Figure 1.6 : Application d'ultrasons focalisés sur le cortex somatosensoriel primaire (S1) humain, mettant en avant la résolution spatiale élevée de cette modalité.....	59
Figure 1.7 : Images d'IRM fonctionnelle montrant les zones cérébrales activées lors de la stimulation ultrasonore ou photique du cortex visuel primaire (V1) humain.....	61

Chapitre 2

Figure 2.1 : Dispositif expérimental utilisé pour la caractérisation des sondes ultrasonores utilisées pour les expériences <i>in vivo</i>	80
Figure 2.2 : Interface graphique du logiciel utilisé pour l'acquisition des signaux captés par l'hydrophone	81
Figure 2.3 : Profil axial de pression simulé pour la sonde Imasonic – 0,5 MHz, représenté en kPa et en dB	84
Figure 2.4 : Profil latéral de pression simulé pour la sonde Imasonic – 0,5 MHz, représenté en dB	84
Figure 2.5 : Superposition des profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la détermination des caractéristiques géométriques de la sonde Imasonic – 0,5 MHz.....	85
Figure 2.6 : Superposition des profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la détermination des caractéristiques géométriques de la sonde Sonic Concepts (utilisée à 0,5 MHz)	86

Figure 2.7 : Superposition des profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la détermination des caractéristiques géométriques de la sonde de 1 MHz.....	87
Figure 2.8 : Superposition des profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la détermination des caractéristiques géométriques de la sonde Sonic Concepts (utilisée à 1,6 MHz)	88
Figure 2.9 : Superposition des profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la détermination des caractéristiques géométriques de la sonde de 2,25 MHz.....	89
Figure 2.10 : Tâche focale délimitée à -3 dB du pic négatif de pression (PNP) maximal, simulée dans le plan XZ et le plan focal XY, pour la sonde Imasonic	90
Figure 2.11 : Tâche focale délimitée à -3 dB du pic négatif de pression (PNP) maximal, simulée dans le plan XZ et le plan focal XY, pour la sonde Sonic Concepts utilisée à une fréquence de 0,5 MHz.....	90
Figure 2.12 : Tâche focale délimitée à -3 dB du pic négatif de pression (PNP) maximal, simulée dans le plan XZ et le plan focal XY, pour la sonde de 1 MHz	91
Figure 2.13 : Tâche focale délimitée à -3 dB du pic négatif de pression (PNP) maximal, simulée dans le plan XZ et le plan focal XY, pour la sonde Sonic Concepts utilisée à une fréquence de 1,5 MHz.....	91
Figure 2.14 : Tâche focale délimitée à -3 dB du pic négatif de pression (PNP) maximal, simulée dans le plan XZ et le plan focal XY, pour la sonde de 2,25 MHz	91
Figure 2.15 : Tâche focale théorique (à -3 dB) de la sonde Imasonic, superposée à l'illustration du cerveau de souris (en coupe coronale)	92
Figure 2.16 : Tâche focale théorique (à -3 dB) de la sonde Sonic Concepts utilisée à 0,5 MHz, superposée à l'illustration du cerveau de souris (en coupe coronale).....	93
Figure 2.17 : Tâche focale théorique (à -3 dB) de la sonde de 1 MHz, superposée à l'illustration du cerveau de souris (en coupe coronale).....	93
Figure 2.18 : Tâche focale théorique (à -3 dB) de la sonde Sonic Concepts utilisée à 1,5 MHz, superposée à l'illustration du cerveau de souris (en coupe coronale).....	94
Figure 2.19 : Tâche focale théorique (à -3 dB) de la sonde de 2,25 MHz, superposée à l'illustration du cerveau de souris (en coupe coronale)	94
Figure 2.20 : Photographies des sondes utilisées, munies de leur cône respectif	96
Figure 2.21 : Profils de pression axiaux et latéraux, mesurés pour la sonde Imasonic sans et avec cône	97
Figure 2.22 : Profils de pression latéraux mesurés à la focale ($z = 52,5$ mm) pour la sonde de 1 MHz, sans et avec cône, présentés en pression relative et absolue	98
Figure 2.23 : Profils latéraux de pression des différentes sondes utilisées, munies de leur cône respectif	99
Figure 2.24 : Dispositif de fixation des crânes de souris, pour la mesure de l'atténuation occasionnée par ceux-ci sur les ondes ultrasonores	101

Figure 2.25 : Second dispositif utilisé pour la mesure de l’atténuation ultrasonore causée par le crâne102

Figure 2.26 : Exemples de signaux mesurés en présence et en absence du crâne de souris, pour la sonde Sonic Concepts utilisée à 1,5 MHz. Les signaux temporels et leurs spectres respectifs sont représentés103

Figure 2.27 : Exemple de profils latéraux de pression réalisés en présence et en absence de crânes de souris, à une fréquence de 0,5 MHz (sonde Imasonic), afin d’évaluer la distorsion causée par les crânes.....105

Figure 2.28 : Profils latéraux de pression réalisés dans la direction x et la direction y, en présence et en absence de crâne de souris, à une fréquence de 0,5 MHz (sonde Imasonic)106

Figure 2.29 : Profils latéraux de pression réalisés dans la direction x et la direction y, en présence et en absence de crâne de souris, à une fréquence de 1 MHz107

Figure 2.30 : Profils latéraux de pression réalisés dans la direction x et la direction y, en présence et en absence de crâne de souris, à une fréquence de 2 MHz108

Chapitre 3 (Article original)

Figure 1 : (a) Schematic of the cone associated with the ultrasonic probe during USNS experiments. (b) Measured radial pressure profiles of the single element transducers, at the corresponding focal lengths.....123

Figure 2 : Success rate assessed visually versus peak negative pressure (PNP)—(a) or spatial-peak temporal-average intensity (I_{SPTA})—(b), for different frequencies, at 160 ms fixed pulse duration.....124

Figure 3 : Success rate assessed by electromyography versus PNP, for different frequencies, at 160 ms fixed pulse duration.....124

Figure 4 : Success rate assessed visually versus PNP, for different pulse durations (*i.e.*, number of cycles: c.), at 1.5 MHz frequency.....124

Figure 5 : Success rate assessed visually versus PNP, at 0.5 MHz fixed frequency and using two probes of different diameters.....125

Figure 6 : Neuronal activity in the M1 following different USNS frequencies at a fixed pulse duration of 160 ms.....126

Figure 7 : Neuronal activity in the M1 following different USNS pulse durations at a fixed frequency of 1.5 MHz.....127

Figure 8 : Combined representation of density of c-Fos+ cells in the M1, consequently to USNS, versus frequency (at 160 ms fixed pulse duration), focal spot diameters, and PNP, at maximum success rate.....127

Chapitre 4

Figure 4.1 : Amplitude des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes fréquences utilisées (DI fixe de 160 ms)132

Figure 4.2 : Latence des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes fréquences utilisées (DI fixe de 160 ms)133

Figure 4.3 : Durée des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes fréquences utilisées (DI fixe de 160 ms)134

Figure 4.4 : Amplitude, latence et durée des réponses motrices en fonction de la fréquence utilisée (DI fixe de 160 ms)135

Figure 4.5 : Amplitude des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes DI utilisées (à une fréquence fixe de 1,5 MHz)136

Figure 4.6 : Latence des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes DI utilisées (à une fréquence fixe de 1,5 MHz)137

Figure 4.7 : Durée des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes DI utilisées (à une fréquence fixe de 1,5 MHz)137

Figure 4.8 : Amplitude, latence et durée des réponses motrices en fonction de la DI utilisée (à fréquence fixe de 1,5 MHz).....138

Chapitre 5

Figure 5.1 : Dispositif expérimental utilisé pour la fixation de la brebis.....142

Figure 5.2 : Craniotomie réalisée sur une des brebis, au niveau des coordonnées du cortex moteur143

Figure 5.3 : Sonde utilisée pour l'application de la stimulation électrique143

Figure 5.4 : Sondes ultrasonores Ultrason utilisées lors des expériences de neurostimulation sur la brebis144

Figure 5.5 : Profils de pression axiaux et latéraux simulés et mesurés expérimentalement, pour la sonde Ultrason GS200.....145

Figure 5.6 : Taux de succès observé chez la brebis, en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué, à une fréquence ultrasonore de 220 kHz (sonde Ultrason GS200)148

Figure 5.7 : Amplitude des réponses motrices observées chez la brebis, en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué, à une fréquence ultrasonore de 220 kHz (sonde Ultrason GS200).....149

Figure 5.8 : Latence des réponses motrices observées chez la brebis, en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué, à une fréquence ultrasonore de 220 kHz (sonde Ultrason GS200)149

Figure 5.9 : Durée des réponses motrices observées chez la brebis, en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué, à une fréquence ultrasonore de 220 kHz (sonde Ultrason GS200)150

Figure 5.10 : Taux de succès observés chez la brebis, à une fréquence ultrasonore de 350 kHz (sonde Ultrason GPS350) et un PNP de 350 kPa151

Figure 5.11 : Amplitude des réponses motrices observées chez la brebis, à une fréquence ultrasonore de 350 kHz (sonde Ultrason GPS350) et un PNP de 350 kPa.....152

Figure 5.12 : Latence des réponses motrices observées chez la brebis, à une fréquence ultrasonore de 350 kHz (sonde Ultrason GPS350) et un PNP de 350 kPa.....152

Figure 5.13 : Durée des réponses motrices observées chez la brebis, à une fréquence ultrasonore de 350 kHz (sonde Ultrason GPS350) et un PNP de 350 kPa.....153
Figure 5.14 : Exemple de dommages cérébraux observés sur un cerveau de brebis après stimulation155

Annexe 1

Figure A.1 : Dispositif expérimental utilisé pour les expériences *in vivo* de neurostimulation ultrasonore sur souris.....169
Figure A.2 : Electromyographe utilisé pour l'acquisition de signaux, mais aussi pour piloter le générateur de fonctions171
Figure A.3 : Utilisation de l'électromyographie pour la détection des mouvements de patte de la souris171
Figure A.4 : Photographie d'un crâne de souris (vue de haut). Y sont indiqués les points de repère classiques (Bregma et Lambda), ainsi que le repère visuel que nous avons utilisé lors de nos expériences *in vivo* (crête occipitale)172
Figure A.5 : Taux de succès, évalué visuellement, en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué à une souris. La neurostimulation a été réalisée à une fréquence de 0,5 MHz (sonde Imasonic), avec une durée d'impulsion de 160 ms (80 000 cycles) et à deux concentrations d'anesthésie différentes : 0,25% et 0,5%174
Figure A.6 : Exemple de signal électromyographique (EMG) acquis. L'analyse du signal traité permet d'extraire les caractéristiques principales de la réponse motrice175
Figure A.7 : Ajustement sigmoïdal d'une courbe de taux de succès176

Liste des tableaux

Introduction générale

Tableau 1 : Caractéristiques des méthodes de neurostimulation.	28
---	----

Chapitre 1

Tableau 1.1 : Etendue des paramètres utilisés dans les études sur la neurostimulation ultrasonore	50
---	----

Chapitre 2

Tableau 2.1 : Principales caractéristiques des sondes ultrasonores utilisées pour les expériences <i>in vivo</i>	82
--	----

Tableau 2.2 : Diamètre de la tâche focale (à -3 dB) de chaque sonde utilisée dans les expériences <i>in vivo</i> , comparé à la largeur du cerveau de souris et de la zone ciblée, <i>i.e.</i> , le cortex moteur primaire (M1), à la coordonnée antéropostérieure Bregma + 0,5 mm	95
--	----

Tableau 2.3 : Mesures d'atténuation effectuées sur des crânes de souris	104
---	-----

Tableau 2.4 : Mesures d'atténuation effectuées à une fréquence de 0,5 MHz (sonde Imasonic associée à son cône) sur des crânes de rats	109
---	-----

Tableau 2.5 : Mesures d'atténuation effectuées à une fréquence de 1 MHz (sonde utilisée avec le cône correspondant) sur des crânes issus de rats mâles et femelles	110
--	-----

Chapitre 3 (Article original)

Table 1 : Specifications of the transducers that were used for the experiments.....	121
---	-----

Chapitre 5

Tableau 5.1 : Paramètres acoustiques testés pour les expériences de neurostimulation ultrasonore chez la brebis	146
---	-----

Liste des acronymes

AP : Potentiel d'action (*Action Potential*, en anglais).

ARF : Force de radiation acoustique (*Acoustic Radiation Force*, en anglais).

BDC : Rapport de cycle du train d'ondes (*Burst Duty Cycle*, en anglais).

BI : Intervalle de temps entre les trains d'ondes (*Burst Interval*, en anglais).

DBS : Stimulation cérébrale profonde (*Deep Brain Stimulation*, en anglais).

DI : Durée de l'impulsion ultrasonore.

DS : Durée de sonication.

DT : Durée totale d'insonification.

f : Fréquence ultrasonore.

FDA : Instance américaine de pharmacovigilance (*Food and Drug Administration*, en anglais).

FR : Fréquence de répétition de l'impulsion ultrasonore.

FUS : Ultrasons focalisés (*Focused Ultrasound*, en anglais).

FWHM : Largeur totale du faisceau ultrasonore à la moitié du maximum d'intensité (*Full Width at Half Maximum*, en anglais).

HD-tDCS : Stimulation transcrânienne à courant continu de haute définition (*High Defined Transcranial Direct Current Stimulation*, en anglais).

II : Intégrale de l'intensité (calculée sur la durée DI).

IHC : Immunohistochimie.

IIS : Intervalle inter-stimulus.

IM : Index mécanique.

I_{SPPA} : intensité acoustique maximale dans l'espace, moyennée sur la durée de l'impulsion ultrasonore (*Spatial-Peak Pulse-Average intensity*, en anglais).

I_{SPTA} : intensité acoustique maximale dans l'espace, moyennée sur la durée 1/FR (*Spatial-Peak Temporal-Average intensity*, en anglais).

IT : Index thermique.

MEP : Potentiel évoqué moteur (*Motor Evoked Potential*, en anglais).

PD : Durée d'impulsion ultrasonore (*Pulse Duration*, en anglais).

PNP : Pic négatif de pression.

P_p : Pic de pression.

RC : Rapport cyclique.

rTMS : Stimulation magnétique transcrânienne répétitive (*repetitive Transcranial Magnetic Stimulation*, en anglais).

TDA/H : Trouble du Déficit de l'Attention avec/sans Hyperactivité.

tDCS : Stimulation transcrânienne à courant continu (*transcranial Direct Current Stimulation*, en anglais).

TOC : Troubles Obsessionnels Compulsifs.

USNS : Neurostimulation ultrasonore (*Ultrasound Neurostimulation*, en anglais).

Introduction générale

I. Contexte

Les **neuropathologies** constituent un problème de santé publique majeur, du fait de leur prévalence et leurs traitements inefficaces, voire inexistants. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 6,8 millions le nombre de personnes décédant chaque année, dans le monde, de ces neuropathologies. Ce constat concerne plus particulièrement les maladies neuropsychiatriques et neurodégénératives. En effet, nous pouvons citer plusieurs exemples, comme **la dépression**, pour laquelle on estime qu'en France, 5 à 15 % de la population a connu un épisode dépressif au cours de sa vie [1]; les **Troubles Obsessionnels Compulsifs (TOC)**, dont la prévalence est de 2 à 3 % au sein de la population française [2]; ou encore **les troubles du spectre autistique**, dont la prévalence est de 1 % en France [3]. Les maladies neurodégénératives, comme la **maladie d'Alzheimer** et la **maladie de Parkinson**, sont aussi très répandues, en particulier chez les personnes âgées. Ainsi, la maladie d'Alzheimer est la maladie la plus fréquente chez les personnes âgées, sa prévalence étant, en France, de 5 % chez les plus de 65 ans et de plus de 25 % chez les plus de 85 ans. Environ 225 000 nouveaux cas sont ainsi diagnostiqués chaque année, pour un total de 900 000 personnes atteintes aujourd'hui [4]. La maladie de Parkinson, quant à elle, affecte plus de 150 000 personnes en France, avec une prévalence de 2 % chez les plus de 80 ans [5]. Enfin, des troubles neurologiques ne faisant pas partie des deux catégories de pathologies mentionnées précédemment méritent également une attention particulière. Nous pouvons ainsi citer **l'épilepsie**, qui affecte pas moins de 600 000 personnes en France, soit environ 1/100^e de la population [6], ou encore le **tremblement essentiel**, dont plus de 300 000 personnes sont atteintes en France, soit environ 0,5 % de la population [7].

Au cours des dernières décennies, de nombreuses avancées et innovations dans le domaine de la recherche biomédicale ont permis d'améliorer la prise en charge thérapeutique de ces patients. Néanmoins, un certain nombre de traitements pharmacologiques disponibles aujourd'hui sont inefficaces, soit en raison de l'absence de délivrance ciblée de ces médicaments, soit en raison du développement de mécanismes de résistance à ces derniers. Nous pouvons citer, par exemple, la dépression, où le taux de résistance aux antidépresseurs peut atteindre 50 % selon les données de littérature [8], [9]. Notons que d'autres neuropathologies, comme la maladie d'Alzheimer, ne disposent pas de traitement à ce jour. Dans ce contexte, des thérapies alternatives ont vu le jour à partir des années 1980, parmi lesquelles les techniques de stimulation cérébrale (Tableau 1). Le principe général de ces techniques repose sur l'exposition d'une région cérébrale à un stimulus électrique (Stimulation Cérébrale Profonde, Stimulation Transcrânienne à Courant Continu) ou magnétique (Stimulation Magnétique Transcrânienne) qui induit une modulation (stimulation ou inhibition) de l'activité des neurones ciblés et des réseaux qu'ils forment.

Technique	Stimulation	Avantages	Limitations	Applications cliniques
Stimulation transcrânienne à courant continu	Electrique (I = 1 à 4 mA)	Non-invasive	Faible résolution spatiale (améliorée avec la HD-tDCS)	Dépression Maladie d'Alzheimer Schizophrénie Addictions
Stimulation cérébrale profonde	Électrique (impulsions)	Bonne résolution spatiale (quelques mm)	Invasive	Maladie de Parkinson Tremblement essentiel Dystonie Dépression Epilepsie Troubles obsessionnels compulsifs
Stimulation magnétique transcrânienne	Magnétique	Non-invasive	Résolution spatiale limitée (1-2 cm) - Faible pouvoir de pénétration dans le cerveau	Fibromyalgies Douleurs neuropathiques Dépression Schizophrénie Troubles obsessionnels compulsifs

Tableau 1 : Caractéristiques des méthodes de neurostimulation.

II. Techniques de neuromodulation cérébrale

1. Stimulation cérébrale profonde

La stimulation cérébrale profonde repose sur l'implantation chirurgicale d'électrodes millimétriques dans la région cérébrale d'intérêt et d'un neurostimulateur sous la peau, au niveau de la clavicule (Figure 1). Les électrodes et le neurostimulateur sont reliés à l'aide d'extensions sous-cutanées allant de la poitrine au cerveau. Le neurostimulateur émet des impulsions électriques qui sont délivrées à la région cérébrale d'intérêt grâce à ces électrodes [10], [11]. Cette technique permet une stimulation précise des zones cérébrales cibles, puisque la taille de la région stimulée ne dépasse généralement pas quelques millimètres. Certaines configurations d'électrodes permettent même de cibler une région d'intérêt sans affecter les zones adjacentes [12].

La stimulation cérébrale profonde a été cliniquement approuvée en 1997 par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de la maladie de Parkinson et du tremblement essentiel. Dans ces deux applications, la neurostimulation de la région cérébrale appelée thalamus induit une réduction significative des tremblements chez les patients [11], [13]. Cette technique a également été validée par la FDA pour le traitement de la dystonie [10] et a été évaluée avec succès dans le traitement de l'épilepsie [14]. D'ailleurs, l'Union Européenne a approuvé une stratégie de traitement de l'épilepsie réfractaire, qui consiste à appliquer la

stimulation cérébrale profonde au niveau du noyau antérieur du thalamus [10]. Par ailleurs, des résultats encourageants ont été obtenus pour le traitement des TOC et de la dépression [15]. Cependant, malgré des performances prometteuses [10], le recours à cette technique reste assez limité, essentiellement en raison de son caractère hautement invasif. En effet, les actes chirurgicaux qu'elle nécessite peuvent s'accompagner d'effets indésirables, comme des hémorragies cérébrales ou des infections, menant même à la mort du patient implanté dans certains cas [16].

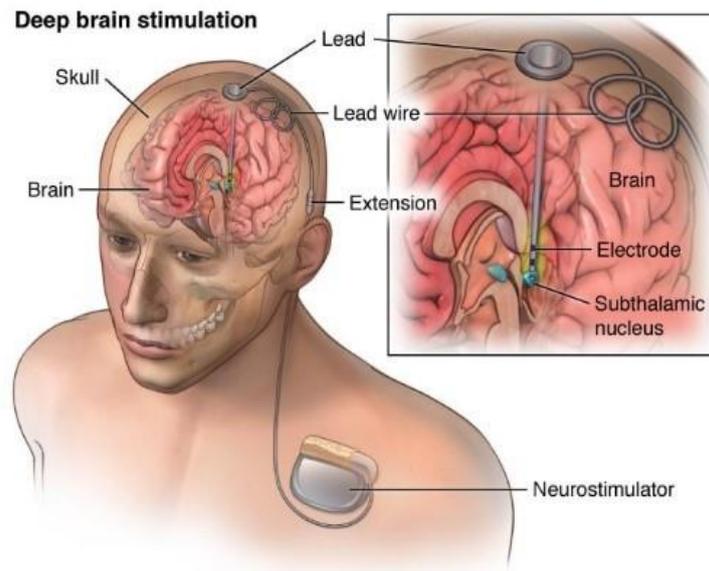


Figure 1 : Stimulation cérébrale profonde. Source : <https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Deep-Brain-Stimulation>.

2. Stimulation transcrânienne à courant continu

La stimulation transcrânienne à courant continu est une méthode non-invasive d'électrostimulation du cerveau, utilisant deux électrodes (de dimensions 5 x 5 cm² ou 5 x 7 cm²), positionnées de manière variable en fonction des régions cérébrales d'intérêt (Figure 2). Elle permet de moduler l'excitabilité corticospinale. Les électrodes (anode dite excitatrice et cathode dite inhibitrice) délivrent des courants électriques continus de faible intensité (1 à 4 mA) pendant une trentaine de minutes en moyenne, qui passent de l'anode vers la cathode à travers les tissus. L'anode cause une hyperexcitabilité des neurones alors que la cathode induit une hypoexcitabilité de ces derniers [17]. Deux types de stimulation sont utilisés : (1) bilatérale – les électrodes sont positionnées sur les deux régions homologues des hémisphères droit et gauche. L'effet excitateur de l'anode et l'effet inhibiteur de la cathode sont alors amplifiés en suivant le principe d'inhibition interhémisphérique ; (2) unilatérale – une des deux électrodes est positionnée sur la région d'intérêt et la deuxième est positionnée sur une région neutre du côté controlatéral (e.g., cou, épaule) pour ne pas moduler l'activité d'autres régions cérébrales.

La stimulation transcrânienne à courant continu est une technique simple, non-invasive et peu coûteuse. Sa faible résolution spatiale permet une diffusion du courant électrique et donc une stimulation dans une large région du cortex. Cependant, cet avantage devient rapidement une limitation de la technique, lorsqu'il est nécessaire de stimuler une région spécifique du cerveau sans affecter les régions cérébrales adjacentes. Pour surmonter cette limitation, une nouvelle technique de stimulation transcrânienne à courant continu, dite de haute définition (HD-tDCS), permet d'améliorer sensiblement la résolution spatiale, en utilisant plusieurs petites électrodes circulaires (1,2 cm de diamètre) [18]. De plus, le faible pouvoir de pénétration des courants électriques dans le cerveau limite ses effets aux zones corticales du cerveau. Cependant, de récentes études montrent qu'elle pourrait générer des effets sur les structures profondes, comme le thalamus ou les noyaux sous-thalamiques [18], [19]. Par ailleurs, cette technique est également limitée par la perte de 40 à 60 % de l'influx au niveau du cuir chevelu.

De nombreuses études ont décrit le bénéfice thérapeutique de cette technique de neurostimulation dans le traitement de maladies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington), de maladies neuropsychiatriques (dépression, schizophrénie), de maladies neurodéveloppementales (autisme, TDA/H), de maladies neuromusculaires (fibromyalgie, parésie) et des troubles du langage (aphasie) [20], [21].



Figure 2 : Stimulation transcrânienne à courant continu. Source : <https://neuromtl.com/technology/transcranial-direct-current-stimulation-tDCS/>

3. Stimulation magnétique transcrânienne

La stimulation magnétique transcrânienne consiste à émettre une impulsion magnétique sur le cortex cérébral, de manière non-invasive, au moyen d'une sonde magnétique extracorporelle (Figure 3). La modification rapide du flux magnétique provoque l'apparition d'un champ électrique qui module l'activité des neurones situés dans le champ magnétique. À partir d'un certain d'un seuil d'intensité électrique, ce champ induit localement une dépolarisation des neurones. Cette dépolarisation se propage le long des axones de ces

derniers, puis par l'intermédiaire des synapses, jusqu'à son atténuation. La stimulation magnétique transcrânienne répétitive vise à appliquer une série d'impulsions pendant un intervalle de temps donné de façon à moduler durablement l'activité cérébrale de la région cible [22]–[24]. L'efficacité de la neurostimulation dépend des paramètres de la stimulation (intensité, nombre, fréquence et durée des trains d'impulsions) et de la région cérébrale ciblée.

Le principal avantage de cette technique est son caractère non-invasif alors que sa principale limitation est sa faible résolution spatiale (environ 1-2 cm) [25]. Par ailleurs, la stimulation magnétique transcrânienne ne permet pas de stimuler des zones cérébrales situées sous le cortex ; dans le meilleur des cas, elle permet d'atteindre la matière blanche immédiatement sous-jacente au cortex [22].

La stimulation magnétique transcrânienne répétitive a démontré un bénéfice thérapeutique dans le traitement de pathologies neurologiques (fibromyalgies, douleurs neuropathiques, *etc.*) ou psychiatriques (dépression, schizophrénie, TOC, *etc.*) [23]. En 2008, la FDA a cliniquement approuvé l'usage de la stimulation magnétique transcrânienne répétitive pour le traitement de la dépression [26].

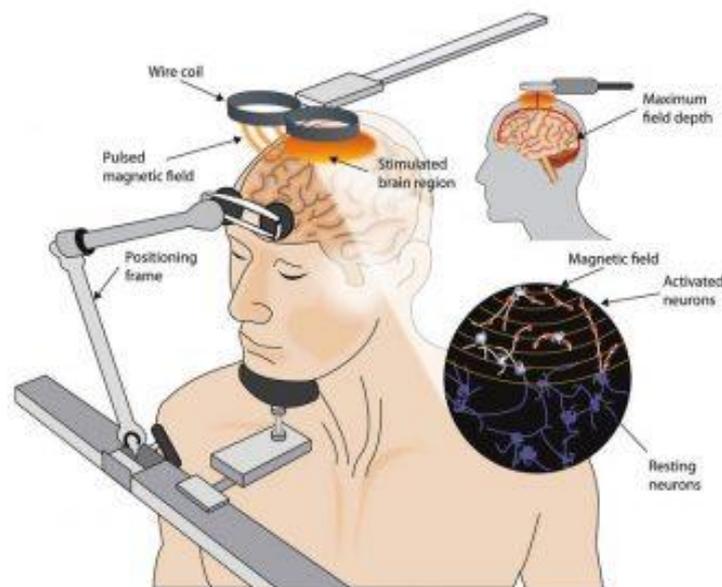


Figure 3 : Stimulation magnétique transcrânienne. Source : <https://thebrainstimulator.net/brain-stimulation-comparison/>

4. Neurostimulation ultrasonore

La neurostimulation ultrasonore repose sur la transmission d'un faisceau ultrasonore focalisé, à travers l'os du crâne, qui permet de moduler l'activité neuronale d'une région cérébrale donnée. Ainsi, Fry *et al.*, ont réussi à supprimer, de manière réversible, des potentiels d'actions générés dans le cortex visuel du chat, conséquemment à des stimuli visuels [27]. D'autres études ont montré la possibilité de stimuler, avec des ultrasons focalisés, des structures

nerveuses chez l'être humain, modifiant ainsi la sensation du toucher, de chaleur ou de douleur, sans induire de dommages corporels [28], [29].

La neurostimulation ultrasonore est une méthode non-invasive qui dispose d'une résolution spatiale appréciable, de l'ordre de quelques millimètres (2 mm à une fréquence de seulement 0,35 MHz [30]); elle permet également d'atteindre des structures cérébrales situées à plusieurs centimètres de profondeur. La principale limitation vient de la propagation des ultrasons à travers l'os du crâne. En effet, si la faible épaisseur et densité des crânes des petits animaux permettent la transmission des ondes ultrasonores à travers le crâne, chez les gros animaux (singe, mouton, *etc.*) ou chez l'être humain, le crâne est bien plus épais et présente une structure hétérogène et poreuse au milieu de l'os du crâne, entourée d'une structure dense et homogène. Ce type de crâne génère des aberrations au niveau du faisceau ultrasonore qui le traverse (distorsion de phase et atténuation d'amplitude). Ces phénomènes sont en général associés à un important dépôt d'énergie à la surface du crâne et à un décalage et/ou un étalement de la tâche focale. Afin de surmonter cette limitation, plusieurs techniques de correction de ces aberrations, aussi bien numériques [31] qu'expérimentales, ont été développées, utilisant des sondes ultrasonores multiéléments [32] ou mono-élément équipées d'une lentille acoustique adaptée [33]. Ainsi, la précision et l'innocuité de la neurostimulation ultrasonore transcrânienne s'en trouvent grandement améliorées [32], [34], [35]. Bien que cette méthode présente un potentiel thérapeutique pour le traitement des nombreuses neuropathologies et constitue une alternative sérieuse aux autres méthodes de neurostimulation, son efficacité, son innocuité ainsi que les mécanismes qui lui sont sous-jacents sont mal maîtrisés à ce jour.

III. Objectifs

Le développement de techniques de neuromodulation représente un enjeu majeur pour la conception de protocoles thérapeutiques pour le traitement de nombreuses maladies du cerveau. La stimulation efficace et sûre d'une région cérébrale donnée apparaît comme un élément essentiel de cette approche. De nombreuses techniques ont été développées pour la modulation de l'activité neuronale dans une région spécifique du cerveau. Les techniques de neurostimulation électrique et magnétique restent aujourd'hui des méthodes de choix pour la majorité des essais cliniques, malgré leurs limitations et les risques associés. Ainsi, le développement de techniques alternatives de neurostimulation demeure indispensable. La neurostimulation ultrasonore présente de grandes potentialités d'applications en neurologie et en neuropsychiatrie. Cependant, son utilisation rationnelle nécessite la conception de dispositif ultrasonore dédié, la maîtrise des paramètres acoustiques et la parfaite connaissance des mécanismes biologiques qui lui sont inhérents.

Dans ce contexte, les travaux présentés dans ce travail de thèse ont pour objectif l'étude, chez la souris saine adulte, de l'influence de la fréquence centrale, de la pression acoustique,

de la durée des impulsions ultrasonores et du diamètre de la tâche focale sur l'efficacité de la neurostimulation.

Ce mémoire de thèse s'organise en quatre parties principales :

La première partie de ce travail est une étude de l'état de l'art de nos connaissances sur la neurostimulation ultrasonore.

La seconde partie est consacrée aux travaux expérimentaux et de simulations qui ont permis la caractérisation des sondes utilisées pour les expériences de neurostimulation.

La troisième partie porte sur l'influence de l'os du crâne de rongeurs et d'humain sur le faisceau ultrasonore.

La quatrième partie traite de l'influence des paramètres acoustiques, à savoir la fréquence centrale, la pression acoustique, la durée des impulsions ultrasonores et le diamètre de la tâche focale, sur l'efficacité de la neurostimulation chez la souris saine adulte.

La cinquième et dernière partie de ce mémoire est composée d'une discussion et d'une conclusion générale.

Références bibliographiques

- [1] « Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière. » <https://institutducerveau-icm.org/fr/depression/>
- [2] « Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière. » <https://institutducerveau-icm.org/fr/toc/>
- [3] « Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière. » <https://institutducerveau-icm.org/fr/autisme/>
- [4] « Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière. » <https://institutducerveau-icm.org/fr/alzheimer/>
- [5] « Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière. » <https://institutducerveau-icm.org/fr/parkinson/>
- [6] « Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière. » <https://institutducerveau-icm.org/fr/epilepsie/>
- [7] « Fédération pour la Recherche sur le Cerveau. » <https://www.frcneurodon.org/comprendre-le-cerveau/le-cerveau-malade-et-ses-maladies-neurologiques/le-tremblement-essentiel/>
- [8] M. H. Trivedi *et al.*, « Evaluation of Outcomes With Citalopram for Depression Using Measurement-Based Care in STAR*D: Implications for Clinical Practice », *Am. J. Psychiatry*, vol. 163, n° 1, p. 28-40, janv. 2006, doi: 10.1176/appi.ajp.163.1.28.
- [9] M. Fava *et al.*, « Difference in Treatment Outcome in Outpatients With Anxious Versus Nonanxious Depression: A STAR*D Report », *Am. J. Psychiatry*, vol. 165, n° 3, p. 342-351, mars 2008, doi: 10.1176/appi.ajp.2007.06111868.
- [10] M. K. Lyons, « Deep Brain Stimulation: Current and Future Clinical Applications », *Mayo Clin. Proc.*, vol. 86, n° 7, p. 662-672, juill. 2011, doi: 10.4065/mcp.2011.0045.
- [11] S. Miocinovic, S. Somayajula, S. Chitnis, et J. L. Vitek, « History, Applications, and Mechanisms of Deep Brain Stimulation », *JAMA Neurol.*, vol. 70, n° 2, p. 163, févr. 2013, doi: 10.1001/2013.jamaneurol.45.
- [12] C. R. Butson et C. C. McIntyre, « Role of electrode design on the volume of tissue activated during deep brain stimulation », *J. Neural Eng.*, vol. 3, n° 1, p. 1-8, mars 2006, doi: 10.1088/1741-2560/3/1/001.
- [13] A. L. Benabid, « Deep brain stimulation for Parkinson's disease », *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 13, n° 6, p. 696-706, déc. 2003, doi: 10.1016/j.conb.2003.11.001.
- [14] R. Fisher *et al.*, « Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy: Deep Brain Stimulation of Anterior Thalamus for Epilepsy », *Epilepsia*, vol. 51, n° 5, p. 899-908, mai 2010, doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02536.x.
- [15] P. E. Holtzheimer et H. S. Mayberg, « Deep Brain Stimulation for Psychiatric Disorders », *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 34, n° 1, p. 289-307, juill. 2011, doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113638.

- [16] J. M. Bronstein *et al.*, « Deep Brain Stimulation for Parkinson Disease: An Expert Consensus and Review of Key Issues », *Arch. Neurol.*, vol. 68, n° 2, févr. 2011, doi: 10.1001/archneurol.2010.260.
- [17] H. Thair, A. L. Holloway, R. Newport, et A. D. Smith, « Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS): A Beginner's Guide for Design and Implementation », *Front. Neurosci.*, vol. 11, p. 641, nov. 2017, doi: 10.3389/fnins.2017.00641.
- [18] A. F. DaSilva, D. Q. Truong, M. F. DosSantos, R. L. Toback, A. Datta, et M. Bikson, « State-of-art neuroanatomical target analysis of high-definition and conventional tDCS montages used for migraine and pain control », *Front. Neuroanat.*, vol. 9, juill. 2015, doi: 10.3389/fnana.2015.00089.
- [19] P. Y. Chhatbar *et al.*, « Evidence of transcranial direct current stimulation-generated electric fields at subthalamic level in human brain in vivo », *Brain Stimulat.*, vol. 11, n° 4, p. 727-733, juill. 2018, doi: 10.1016/j.brs.2018.03.006.
- [20] H. Zhao *et al.*, « Modulation of Brain Activity with Noninvasive Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS): Clinical Applications and Safety Concerns », *Front. Psychol.*, vol. 8, p. 685, mai 2017, doi: 10.3389/fpsyg.2017.00685.
- [21] U. Palm, S. S. Ayache, F. Padberg, et J.-P. Lefaucheur, « La stimulation transcrânienne à courant continu (tDCS) dans la dépression : bilan de près d'une décennie de recherche clinique », *L'Encéphale*, vol. 42, n° 1, p. 39-47, févr. 2016, doi: 10.1016/j.encep.2015.06.003.
- [22] E. M. Wassermann et S. H. Lisanby, « Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation: a review », *Clin. Neurophysiol.*, vol. 112, n° 8, p. 1367-1377, août 2001, doi: 10.1016/S1388-2457(01)00585-5.
- [23] J.-P. Lefaucheur *et al.*, « Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) », *Clin. Neurophysiol.*, vol. 125, n° 11, p. 2150-2206, nov. 2014, doi: 10.1016/j.clinph.2014.05.021.
- [24] C. K. Loo et P. B. Mitchell, « A review of the efficacy of transcranial magnetic stimulation (TMS) treatment for depression, and current and future strategies to optimize efficacy », *J. Affect. Disord.*, vol. 88, n° 3, p. 255-267, nov. 2005, doi: 10.1016/j.jad.2005.08.001.
- [25] N. Sollmann *et al.*, « Results on the spatial resolution of repetitive transcranial magnetic stimulation for cortical language mapping during object naming in healthy subjects », *BMC Neurosci.*, vol. 17, n° 1, p. 67, déc. 2016, doi: 10.1186/s12868-016-0305-4.
- [26] « International Neuromodulation Society. » <https://www.neuromodulation.com/TMS>
- [27] F. J. Fry, H. W. Ades, et W. J. Fry, « Production of Reversible Changes in the Central Nervous System by Ultrasound », *Science*, vol. 127, n° 3289, p. 83-84, janv. 1958, doi: 10.1126/science.127.3289.83.
- [28] L. R. Gavrilov, G. V. Gersuni, O. B. Ilyinski, E. M. Tsurulnikov, et E. E. Shchekanov, « A study of reception with the use of focused ultrasound. I. Effects on the skin and deep

- receptor structures in man », *Brain Res.*, vol. 135, n° 2, p. 265-277, oct. 1977, doi: 10.1016/0006-8993(77)91030-7.
- [29] L. R. Gavrilov, « Use of focused ultrasound for stimulation of nerve structures », *Ultrasonics*, vol. 22, n° 3, p. 132-138, mai 1984, doi: 10.1016/0041-624x(84)90008-8.
- [30] Y. Tufail *et al.*, « Transcranial Pulsed Ultrasound Stimulates Intact Brain Circuits », *Neuron*, vol. 66, p. 681-694, juin 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.008.
- [31] S. Almquist, D. L. Parker, et D. A. Christensen, « Rapid full-wave phase aberration correction method for transcranial high-intensity focused ultrasound therapies », *J. Ther. Ultrasound*, vol. 4, n° 1, p. 30, déc. 2016, doi: 10.1186/s40349-016-0074-7.
- [32] A. Kyriakou, E. Neufeld, B. Werner, M. M. Paulides, G. Szekely, et N. Kuster, « A review of numerical and experimental compensation techniques for skull-induced phase aberrations in transcranial focused ultrasound », *Int. J. Hyperthermia*, vol. 30, n° 1, p. 36-46, févr. 2014, doi: 10.3109/02656736.2013.861519.
- [33] G. Maimbourg, A. Houdouin, T. Deffieux, M. Tanter, et J.-F. Aubry, « 3D-printed adaptive acoustic lens as a disruptive technology for transcranial ultrasound therapy using single-element transducers », *Phys. Med. Biol.*, vol. 63, n° 2, p. 025026, janv. 2018, doi: 10.1088/1361-6560/aaa037.
- [34] J. Blackmore, S. Shrivastava, J. Sallet, C. R. Butler, et R. O. Cleveland, « Ultrasound Neuromodulation: A Review of Results, Mechanisms and Safety », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 45, n° 7, p. 1509-1536, juill. 2019, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.015.
- [35] C. Pasquinelli, L. G. Hanson, H. R. Siebner, H. J. Lee, et A. Thielscher, « Safety of transcranial focused ultrasound stimulation: A systematic review of the state of knowledge from both human and animal studies », *Brain Stimulat.*, vol. 12, n° 6, p. 1367-1380, nov. 2019, doi: 10.1016/j.brs.2019.07.024.

Chapitre 1 : Etat de l'art - Neurostimulation ultrasonore

I. Principe

Tel que nous l'avons vu précédemment, le potentiel des ultrasons pour la neurostimulation a été démontré dès les années 1950, avec des études montrant leur interaction avec les cellules et les structures du système nerveux, aussi bien chez l'animal que chez l'être humain [1]–[3]. De manière plus générale, il est question de neuromodulation plutôt que de neurostimulation, car les ultrasons peuvent également avoir un effet inhibiteur sur les neurones et les structures nerveuses. En effet, Fry *et al.*, ont démontré que l'application d'ultrasons focalisés sur le corps géniculé latéral (thalamus) du chat induisait une inhibition réversible des potentiels évoqués visuels [1]. Quelques décennies plus tard, Yoo *et al.*, ont mis en évidence que l'exposition du cortex visuel de lapins à des ondes ultrasonores induisait la suppression des potentiels évoqués visuels générés par des signaux lumineux. En revanche, l'application de ces mêmes ondes sur le cortex moteur provoquait une neurostimulation de cette région cérébrale [4]. En résumé, les ultrasons ont la capacité de stimuler ou d'inhiber les réseaux neuronaux, aussi bien dans des régions cérébrales superficielles (cortex) qu'au niveau de zones profondes (thalamus, hippocampe, *etc.*).

Par ailleurs, les mécanismes biophysiques précis qui sous-tendent la neurostimulation ultrasonore demeurent, à ce jour, mal connus. De manière analogue, les différents éléments pouvant influencer sur l'efficacité ou l'innocuité de cette technique, comme les paramètres acoustiques par exemple, ne sont pas totalement maîtrisés à l'heure actuelle. Ainsi, cette situation constitue, à ce jour, un frein pour les études cliniques. Néanmoins et malgré ce contexte, de plus en plus d'équipes cherchent à démontrer la faisabilité de l'application clinique de cette technique et à identifier les verrous technologiques liés à sa transposition de l'animal à l'Homme. En ce qui concerne les études précliniques, celles-ci ont essentiellement été menées sur le petit animal, notamment les rongeurs, qui offrent de multiples facilités expérimentales et comptent de nombreux modèles de neuropathologies. Cependant, l'utilisation de gros animaux (brebis, singes, porcs) n'est pas en reste, puisque plusieurs études en ont fait l'objet de leur recherche.

Dans les parties qui suivent, nous nous attelons à faire une synthèse des études qui mettent en lumière les différents aspects cités ci-dessus. En particulier, la fin du chapitre est dédiée aux études qui rendent compte des applications thérapeutiques de la neurostimulation ultrasonore, aussi bien en préclinique qu'en clinique.

II. Bioeffets et Mécanismes de la neuromodulation ultrasonore

Les ondes ultrasonores, lorsqu'elles se propagent dans un milieu, interagissent avec celui-ci. Ces interactions sont de type mécanique et/ou thermique, suivant les paramètres ultrasonores appliqués et le milieu biologique traversé. Ces deux effets sont donc potentiellement au cœur des mécanismes de la neurostimulation ultrasonore, à travers lesquels celle-ci s'exerce et influence le fonctionnement des neurones.

1. Effets mécaniques

En plus de l'oscillation des particules du milieu traversé, les ultrasons peuvent induire un stimulus mécanique grâce à deux processus : 1) la cavitation et 2) la force de radiation acoustique (ARF : *Acoustic Radiation Force*, en anglais).

a. La cavitation

La cavitation est un phénomène physique qui prend naissance lors des phases de raréfaction liées à la propagation de l'onde ultrasonore (pics négatifs de pression) dans un fluide. Elle se caractérise par la formation de bulles, par suite de la précipitation de gaz dissout dans le milieu, puis leur oscillation sous l'effet de la variation sinusoïdale de la pression. On parle de cavitation stable lorsque cette oscillation est stable. Mais lorsque les bulles générées sont soumises à des pics de pression élevés, elles peuvent alors osciller de manière non-linéaire jusqu'à imploser, étant ainsi à l'origine d'une onde de choc ; la cavitation est alors dite instable (ou inertielle). La cavitation peut également affecter des bulles déjà présentes dans le milieu (comme celles d'un agent de contraste), qui peuvent alors osciller de manière stable ou instable, tel que décrit précédemment.

Afin de quantifier ce phénomène, on utilise l'index mécanique (IM), qui indique la capacité d'une onde à générer cet effet dans un milieu biologique, et s'exprime comme suit : $IM = \frac{PNP}{\sqrt{f}}$, PNP étant le pic négatif de pression (en MPa), et f la fréquence ultrasonore (en MHz). Le phénomène de cavitation est donc plus important lorsque la fréquence diminue et la pression augmente.

b. La force de radiation acoustique (ARF)

L'ARF est une force générée lors de la propagation d'une onde ultrasonore et qui est liée à l'atténuation progressive de cette dernière durant son parcours. En effet, cette atténuation s'accompagne de la formation d'un gradient de pression et de la force qui y est associée : la force de radiation acoustique. La norme F de celle-ci s'exprime comme suit : $F = \frac{2\alpha I}{c}$, α étant le coefficient d'atténuation du milieu (en Np/m), I l'intensité acoustique moyenne temporelle (en W/m²), et c la célérité des ondes dans le milieu (en m/s). Ainsi, l'ARF augmente avec l'atténuation, qui augmente elle-même avec la fréquence ultrasonore. Le phénomène est

donc plus visible lorsque la fréquence croît, et les intensités acoustiques nécessaires pour avoir la même force sont donc de moins en moins élevées.

c. Rôle des effets mécaniques des ultrasons dans le processus de neurostimulation

A ce jour, la question de la prédominance de la cavitation ou de l'ARF lors du processus de neurostimulation ultrasonore est toujours sujette à débat. Ainsi, King *et al.*, sur la base de leurs résultats démontrant une baisse d'efficacité de la neurostimulation ultrasonore lorsque la fréquence augmente (entre 0,25 et 0,6 MHz), ont affirmé que le phénomène de cavitation était prédominant sur celui de l'ARF [5]. Ye *et al.*, ont confirmé cette conclusion, en indiquant que l'index de cavitation était fortement corrélé avec le taux de succès¹ de la neurostimulation, contrairement à l'ARF [6]. A l'inverse, Menz *et al.*, qui ont mis en évidence que la neurostimulation ultrasonore induisait des déplacements de l'ordre du micromètre au niveau du tissu ciblé, ont observé que l'amplitude de cet effet augmentait avec la fréquence (de 0,5 à 43 MHz), suggérant ainsi que l'ARF joue un rôle majeur dans ce processus [7].

Ainsi, il semblerait que les deux phénomènes soient présents lors du processus de neurostimulation, avec une prédominance de la cavitation pour des fréquences relativement basses (inférieures à 1 MHz) et une prédominance de l'ARF pour des fréquences supérieures.

2. Effets thermiques

Il a été établi qu'une élévation de température de l'ordre de 40 à 50 °C peut moduler l'activité de canaux ioniques thermosensibles [8]. L'amplitude et la durée des potentiels d'action, les seuils d'activation neuronale, l'activité électrique des neurones ou encore la cinétique de la phase de post-hyperpolarisation peuvent également être affectés par un changement de température [9]. Par ailleurs, dans une étude réalisée sur des rats, Darrow *et al.*, ont ciblé le thalamus avec des ultrasons, pendant qu'ils généraient des potentiels évoqués somatosensoriels à l'aide d'une stimulation électrique du nerf tibial (fréquence ultrasonore de 3,2 MHz modulée par une basse fréquence de 50 kHz ; fréquence de répétition de 500 Hz, avec un rapport de cycle² de 10 à 70 % ; intensité acoustique entre 0,01 et 88 W/cm²). Ils ont observé une suppression réversible de ces potentiels due à l'application d'ultrasons, mais également une élévation de température (de 2 °C environ) au niveau de la zone insonifiée, corrélée à cette suppression. Ils ont ainsi conclu que l'effet thermique des ultrasons est le mécanisme majeur par lequel leur effet neuroinhibiteur a lieu [10]. Abondant dans le même sens, Prieto *et al.*, ont ciblé des neurones pyramidaux CA1 d'hippocampe de rats et ont conclu que l'élévation de température due aux ultrasons (1,3 °C, calculée par simulation ; fréquence de 43 MHz ; I_{SPPA} ³ = 50 W/cm²) était à l'origine de la modulation de l'activité neuronale

¹ Grandeur permettant d'évaluer l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore, exprimée en %, et évaluée comme le nombre de stimulations réussies sur 10 essais de stimulation ultrasonore.

² Rapport entre la durée pendant laquelle l'amplitude de l'impulsion ultrasonore est non nulle (signal « émis ») et la durée incluant la partie où l'amplitude est nulle (signal « émis » + signal « éteint »).

³ *Spatial-Peak Pulse-Average intensity* : désigne, en anglais, l'intensité acoustique maximale dans l'espace, moyennée sur la durée de l'impulsion ultrasonore.

observée. Cependant, les auteurs n'ont pas exclu une contribution des effets mécaniques des ultrasons dans cette modulation [11]. Récemment, Baek *et al.*, sur des souris, ont démontré que les effets thermiques des ultrasons (associés à des effets mécaniques) pouvaient influencer les réponses motrices observées, notamment au niveau de la latence de leur survenue. Ainsi, le groupe de souris soumis uniquement à des effets mécaniques (fréquence de 1 MHz ; 10 stimulations espacées de 5 s, composées chacune d'impulsions de 50 ms répétées à fréquence de 10 Hz durant 300 ms ; $I_{SPPA} = 4,1$ à $22,7$ W/cm²) avait des latences de réponses comprises entre 0,03 et 0,1 s, alors que le groupe soumis aux effets mécano-thermiques (impulsions répétées durant 15 s au lieu de 300 ms ; 10 stimulations espacées de 80 s au lieu de 5 s) démontrait à la fois des latences de réponses courtes (0,2 à 1,4 s) et longues (8,7 à 13 s) [12]. Ces résultats suggèrent donc qu'un stimulus thermique induit par ultrasons pourrait potentiellement influencer l'activité neuronale.

Cependant, plusieurs études ont démontré qu'en raison des paramètres acoustiques qui sont généralement utilisés pour la neurostimulation, la contribution des effets thermiques des ultrasons tend à être négligeable par rapport à leurs effets mécaniques. Ainsi, King *et al.*, ont déterminé qu'une neurostimulation ultrasonore (à une fréquence de 0,5 MHz, avec des impulsions de durée 80 ms et d'amplitude en pression 0,51 MPa) induit une augmentation de température de 0,01 °C chez la souris. Un si faible incrément thermique ne peut être à l'origine d'une activation cérébrale [5]. Kim *et al.*, ont déterminé qu'une intensité acoustique I_{SPPA} de 189 W/cm² était requise pour induire une élévation de température de 1 °C (à une fréquence de 0,35 MHz, avec des impulsions durant 300 ms et ayant un rapport de cycle de 70 %). Cette intensité acoustique est largement supérieure à la plus grande valeur utilisée pour la neurostimulation ultrasonore dans cette étude, *i.e.*, 22,4 W/cm², pour laquelle l'élévation de température serait de l'ordre de 0,09 °C⁴ [13]. En outre, Constans *et al.*, à l'aide de simulations numériques, ont évalué l'élévation en température causée par la neurostimulation ultrasonore, au sein du cerveau, dans différentes études. Ils ont ainsi observé que pour sept ensembles de paramètres parmi les huit testés, l'élévation de température était négligeable (0,002 à 0,8 °C). Néanmoins, pour une des études⁵, l'élévation de température simulée était de 1,3 °C au niveau de la tâche focale et de 7 °C pour des zones près du crâne (en raison, notamment, de l'échauffement de celui-ci). Pour ce dernier cas, les auteurs n'excluent pas que les effets thermiques aient joué un rôle dans le processus de neuromodulation [14]. Enfin, Mueller *et al.*, ont établi, à l'aide d'un modèle de simulation sur crâne et cerveau humains, qu'une durée d'insonification de 500 ms (500 impulsions de fréquence 0,5 MHz et de durée 360 µs chacune, générées avec une fréquence de répétition de 1 kHz ; I_{SPPA} de l'ordre de 6 W/cm² *in situ*) induisait une élévation de température négligeable de $4,27 \times 10^{-3}$ °C au niveau de la matière blanche du cerveau [15].

⁴ Calcul réalisé sur la base de la formule et des paramètres indiqués dans l'étude.

⁵ Kamimura *et al.* 2019 : les paramètres qui y ont été utilisés, en particulier le rapport de cycle et la durée totale d'insonification, expliquent probablement cette élévation de température (fréquence de 1,9 MHz ; impulsions de 0,5 ms avec un rapport de cycle de 50 %, durant 1 s ; schéma répété toutes les 2 s durant 20 s).

Ainsi, tous ces éléments suggèrent que, de manière générale, les effets thermiques ne sont pas prépondérants lors du processus de neurostimulation, et que ce sont essentiellement les effets mécaniques qui interviennent dans son fonctionnement. En effet, une élévation de température relativement importante (au moins 1 à 2 °C), et peu commune dans les travaux sur la neurostimulation ultrasonore, semble requise pour que l'influence des effets thermiques soit conséquente.

3. Mécanismes biophysiques de la neurostimulation ultrasonore

Les mécanismes biophysiques par lesquels les ultrasons modulent l'activité neuronale ont fait l'objet de nombreuses études et, à ce jour, plusieurs hypothèses sont envisagées (Fig. 1.1).

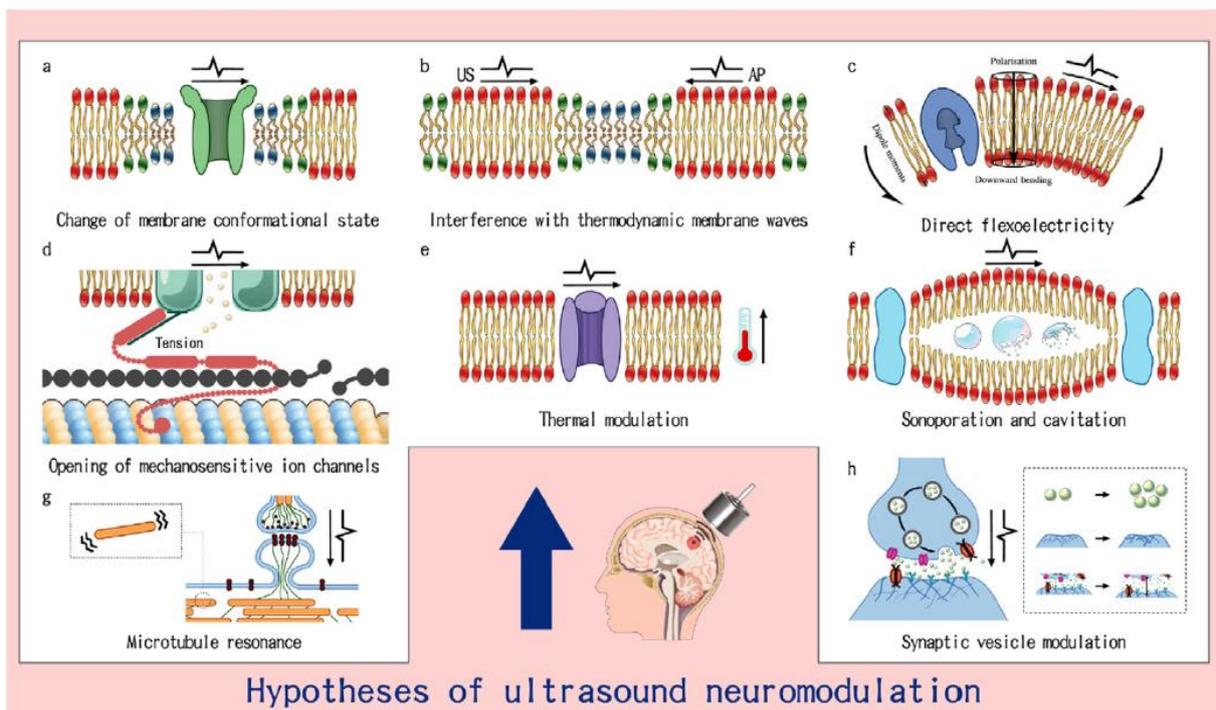


Figure 1.1 : Les différents mécanismes sous-jacents à la neurostimulation ultrasonore envisagés à ce jour (le mécanisme correspondant à l'activation du système auditif n'est pas inclus dans la figure) : (a) Changement de conformation de la membrane plasmique/des phospholipides et protéines membranaires ; (b) Modèle du soliton ; (c) Flexoélectricité ; (d) Activation de canaux ioniques ; (e) Effets thermiques ; (f) Sonoporation et cavitation intramembranaire ; (g) Résonance des microtubules ; (h) Modulation des synapses. Source : adapté de Jerusalem et al., 2019.

a. Effets mécaniques

Au niveau de la membrane plasmique

▪ Sonoporation

Au niveau de la membrane plasmique, des mécanismes liés à la cavitation ont été décrits, où celle-ci peut être à l'origine du phénomène de sonoporation, c'est-à-dire la formation de pores dans la bicouche lipidique des cellules, ce qui favorise la formation de courants ioniques [9],

[16]. Ceux-ci peuvent modifier la polarisation de la membrane et, ainsi, générer des potentiels d'action qui modulent l'activité neuronale.

▪ **Déformation membranaire et changement de conformation des phospholipides et des protéines membranaires**

○ *Cavitation intramembranaire*

Un autre modèle impliquant la cavitation a également été proposé, le modèle BLS (*Bilayer Sonophore*, en anglais), qui explique la stimulation neuronale par un phénomène de cavitation intramembranaire [17]. En effet, les ultrasons induiraient la formation et l'oscillation de cavités/bulles entre les deux feuilletts phospholipidiques de la membrane plasmique des neurones. Ce phénomène modifierait des caractéristiques structurales et fonctionnelles de la membrane plasmique, comme sa capacitance, modulant ainsi l'activité neuronale [16], [18]. Une théorie basée sur ce modèle, désignée sous le nom de modèle NICE (*Neuronal Intramembrane Cavitation Excitation*, en anglais), a été simulée numériquement sur des types de neurones spécifiques (neurones corticaux excitateurs ou inhibiteurs, et neurones thalamiques). Les résultats obtenus ont permis d'explicitier l'influence sélective de certains paramètres acoustiques (intensité acoustique, rapport de cycle, modes continu et pulsé) sur l'activation de canaux ioniques et la modulation des neurones. C'est ainsi que les auteurs de cette étude ont pu expliquer les effets d'activation ou d'inhibition observés dans plusieurs travaux publiés auparavant [19].

○ *Changement de conformation des phospholipides et des protéines membranaires*

La capacitance de la membrane plasmique des neurones est influencée par les mouvements qui ont lieu au sein de celle-ci. Néanmoins, il existe d'autres situations où cette capacitance peut être modifiée. En effet, elle peut être directement affectée lors d'un changement de conformation des phospholipides et des protéines membranaires, à la suite du passage d'une onde ultrasonore, étant ainsi à l'origine d'une modulation neuronale [9], [16].

○ *Flexoélectricité*

La propagation d'une onde ultrasonore peut aussi provoquer des déformations membranaires, modifiant ainsi le potentiel transmembranaire. Ce phénomène, connu sous le nom de flexoélectricité, peut générer des potentiels d'action [9], [16], [18].

○ *Soliton*

Un autre effet pouvant affecter la membrane plasmique est décrit dans le modèle du soliton. Ce dernier, qui est une perturbation dans la densité de la membrane née du passage de l'onde ultrasonore, se propage tel une onde mécanique, générant ainsi des potentiels d'actions ou interférant avec des potentiels d'action préexistants [16], [18].

○ *Activation directe des canaux ioniques*

Il a été établi que les ultrasons pouvaient activer des canaux ioniques, en particulier les canaux mécanosensibles (famille des canaux potassiques à deux pores ; canaux Piezo1 et Piezo2), les canaux voltage-dépendants Na^+ et Ca^{2+} , ou encore les canaux TRPA1 dans les astrocytes [16],

[18], [20]. Ainsi, Tyler *et al.*, ont démontré que l'application d'ondes ultrasonores sur des coupes d'hippocampe de souris activait des canaux ioniques voltage-dépendants Ca^{2+} et Na^{+} , modulant ainsi l'activité neuronale et la transmission synaptique [21]. En outre, dans une étude réalisée sur *C. Elegans*, Xian *et al.*, ont abondé dans le même sens en mettant en évidence, par imagerie calcique, une augmentation de l'influx calcique et de l'activité neuronale après l'application de la neurostimulation ultrasonore, aussi bien au niveau de la tête que de l'intestin des nématodes [22]. De plus, il a également été rapporté que les canaux ioniques peuvent être l'objet d'un phénomène de piézoélectricité, où les changements de conformation spatiale des canaux induiraient des déséquilibres de charges et, par conséquent, un courant ionique [20].

Au niveau du cytosquelette

L'un des mécanismes envisagés propose une action directe des ondes ultrasonores sur le cytosquelette des neurones, en particulier sur les microtubules. En effet, ces derniers auraient une fréquence de résonance de l'ordre du mégahertz, qui serait donc du même ordre que les fréquences généralement utilisées pour la neurostimulation ultrasonore. Ainsi, les microtubules subirait des vibrations de manière synchrone lors du processus de neurostimulation ultrasonore. Ces oscillations seraient transmises à la membrane plasmique des neurones, modulant ainsi leur activité [16]. Par ailleurs, ces vibrations pourraient avoir un effet sur les synapses, les microtubules étant impliqués dans la plasticité synaptique, via leur connexion aux filaments d'actine contenus dans les dendrites [16], [23].

Au niveau des synapses

Par ailleurs, il a été mis en évidence que les ultrasons pouvaient agir au niveau des synapses en augmentant la libération de neurotransmetteurs, en élargissant la fente synaptique ou en modifiant les densités pré- et post-synaptiques. Ainsi, ces effets sont envisagés comme des mécanismes potentiels de la neurostimulation ultrasonore [16]. Parmi les études ayant porté sur cet aspect, celle de Min *et al.*, a ciblé des zones du thalamus chez le rat et a montré que la neurostimulation ultrasonore était à l'origine d'une élévation des taux de dopamine et de sérotonine dans le milieu extracellulaire⁶ [24]. De manière analogue et en ciblant également le thalamus du rat, Yang *et al.*, ont mis en évidence qu'une neurostimulation ultrasonore induisait une baisse des taux de GABA⁷ dans le milieu extracellulaire, tandis que les taux de glutamate⁸ restaient inchangés par rapport au groupe contrôle [25].

⁶ Le milieu extracellulaire est recueilli par microdialyse, puis les neurotransmetteurs sont dosés par chromatographie liquide haute performance.

⁷ Acide γ -aminobutyrique : neurotransmetteur ayant un effet inhibiteur.

⁸ Neurotransmetteur ayant un effet excitateur.

Au niveau du système auditif

D'autre part, certains travaux se sont récemment intéressés au fonctionnement de la neurostimulation ultrasonore à l'échelle des organes et des systèmes, plutôt qu'au niveau cellulaire, énonçant des hypothèses de mécanismes qui vont à contre-courant des idées qui prévalaient au sein de la communauté scientifique jusqu'alors. En effet, Sato *et al.*, dans une étude réalisée chez la souris, ont mis en évidence une action mécanique indirecte des ultrasons lors du processus de neurostimulation, à travers l'activation du système auditif des animaux et, notamment, la stimulation de la cochlée. Ce mécanisme viendrait s'ajouter à une potentielle action directe des ultrasons au niveau de la zone insonifiée [26]. Guo *et al.*, ont confirmé ces travaux chez le cochon d'Inde. En effet, ils ont démontré que la vibration des fluides cochléaires sous l'effet de la neurostimulation ultrasonore était à l'origine de l'activation de structures autres que celles du système auditif, comme le cortex somatosensoriel primaire (S1). En outre, ils ont observé que les effets de la neurostimulation disparaissaient lorsque des structures auditives (fluides cochléaires et nerfs auditifs) étaient supprimées, remettant ainsi en cause le processus direct de la neurostimulation (au niveau du site d'insonification) [27]. Par ailleurs, l'étude de Braun *et al.*, réalisée chez l'humain, a rapporté que les participants pouvaient entendre des sons durant la stimulation ultrasonore, et distinguer les périodes de stimulation et de non-stimulation, ce qui a été confirmé par électroencéphalographie. Des mesures réalisées sur un crâne *ex vivo* ont par ailleurs montré que le son se propageait à travers celui-ci. Aussi, les auteurs de cette étude ont montré que cet effet auditif était réduit, voire supprimé avec l'application d'un masque auditif, consistant en un son émis dans les oreilles des participants, à travers des écouteurs, durant la stimulation ultrasonore [28].

D'autre part, les récents travaux de Mohammadjavadi *et al.*, ont apporté plus de précisions sur cet aspect auditif. En effet, ils ont démontré que l'activation du système auditif périphérique de souris, durant la neurostimulation ultrasonore, était causée par la forme rectangulaire des signaux utilisés, dont les bords abrupts sont à l'origine de composantes fréquentielles larges bandes. Ainsi, ils ont montré que l'utilisation de signaux lissés sur les bords éliminait cette activation. Aussi, et contrairement aux observations de Guo *et al.* [27], ils ont montré que les réponses motrices, conséquentes à la neurostimulation ultrasonore, n'étaient pas affectées par le système auditif. En effet, les taux de succès de réponses motrices obtenus chez des souris saines était identique à celui observé chez des souris génétiquement assourdis, et ce, indépendamment de la forme d'onde utilisée [29].

Tous ces travaux démontrent qu'à ce jour, la présence et/ou l'importance de ces effets auditifs ne sont pas encore complètement maîtrisés. C'est ainsi que de plus en plus d'études sur la neurostimulation ultrasonore misent sur la prudence en ce qui concerne cet aspect. En effet, depuis la publication de tous ces résultats, plusieurs études ont commencé à prendre en considération ce potentiel effet auditif. A cet effet, certaines études précliniques prennent le soin d'inclure des animaux dont tout ou partie du système auditif est inactivé, afin de

s'assurer que cet éventuel processus de stimulation n'interfère pas dans les résultats observés.

b. Effets thermiques

Dans une récente étude, Yang *et al.* ont réussi à stimuler des neurones de manière sélective, en utilisant des souris génétiquement modifiées, dont certains types de neurones expriment à leur surface des canaux ioniques thermosensibles (TRPV1), les rendant ainsi sensibles aux effets thermiques générés par les ultrasons [30]. D'autre part, Collins *et al.*, ont montré, sur des motoneurones isolés à partir de sangsues, que les ultrasons avaient un effet inhibiteur de l'activité neuronale à travers leurs effets thermiques. En effet, ils ont observé qu'une élévation de température de 2 à 3 °C, due à une insonification relativement longue (500 impulsions de durée 300 µs, répétées toutes les 1 ms ; le train d'ondes de 500 ms était répété toutes les 1 s durant 30 s ; fréquence de 0,96 MHz ; $I_{SPPA} = 14,52 \text{ W/cm}^2$) était responsable de cette inhibition. Afin de confirmer cet état de fait, ils ont réalisé une expérience au cours de laquelle l'élévation de température était limitée à 0,3 °C, et ils ont observé que 80 % des motoneurones testés (20 parmi 25) avaient une activité électrique normale. De plus, en reproduisant l'élévation de température générée par les ultrasons à l'aide d'un laser ou d'un fil chauffant, ils ont observé des effets d'inhibition comparables à ceux obtenus en utilisant les ultrasons [31]. Ainsi, ces études confirment que, sous des conditions expérimentales particulières, les effets thermiques des ultrasons peuvent intervenir dans le processus de neurostimulation.

III. Efficacité

1. Influence de/sur l'anesthésie

Dans une étude réalisée chez le rat, Younan *et al.*, ont exploré l'influence de l'anesthésie (injection intrapéritonéale de Kétamine à 66 mg/kg et de Xylazine à 13 mg/kg) sur les réponses motrices générées par neurostimulation ultrasonore. Ils ont établi que le seuil de pression acoustique pour l'obtention de ces réponses (au niveau des membres inférieurs et supérieurs, de la queue, des yeux et des vibrisses) était plus faible lorsque les animaux étaient dans un état d'anesthésie léger (en fin d'expérience) par rapport à un état d'anesthésie profond (en début d'expérience ; $0,61 \pm 0,03 \text{ MPa}$ contre $0,77 \pm 0,04 \text{ MPa}$, respectivement, à une fréquence de 0,32 MHz ; les impulsions duraient 230 µs et étaient répétées à une fréquence de 2 kHz, pendant 250 ms) [32]. Dans le but de démontrer une application potentielle de la neurostimulation ultrasonore en anesthésiologie, Yoo *et al.*, ont ciblé le thalamus de rats (impulsions ultrasonores de fréquence 0,65 MHz, de durée 0,5 ms, répétées à une fréquence de 0,1 kHz durant 20 min ; $I_{SPPA} = 6 \text{ W/cm}^2 \text{ in situ}$). Ils ont démontré qu'il était possible d'utiliser la neurostimulation ultrasonore afin de réduire le temps de réveil de 20 min suite à une anesthésie (injection intrapéritonéale d'un mélange de Kétamine/Xylazine 80/10 mg/kg) [33]. En outre, dans de récents travaux, Bian *et al.*, ont étudié l'application de la neurostimulation ultrasonore au niveau de l'aire tegmentale ventrale (impulsions de fréquence 3,3 MHz, de

durée 1 ms, répétées à une fréquence de 0,5 kHz durant 1 s ; schéma répété toutes les 3 s ; pressions acoustiques *in situ* de 166, 270 et 349 kPa environ) à des souris profondément endormies (anesthésie gazeuse, *i.e.*, Isoflurane : 0,2 à 2 % du mélange avec l'air). Ils ont ainsi montré que les souris traitées aux ultrasons durant 30 min avant l'induction d'anesthésie mettaient plus de temps à s'endormir que les souris non-traitées ($17,88 \pm 0,64$ min, contre $12,0 \pm 0,6$ min, respectivement). De plus, la concentration d'anesthésie pour laquelle 50 % des animaux perdaient leur réflexe de redressement était plus élevée chez les souris traitées aux ultrasons (0,7 %, contre 0,6 % pour les souris non-traitées). Aussi, durant l'anesthésie, les souris traitées recouvraient leur réflexe de redressement tandis que les souris non-traitées restaient endormies. Enfin, les souris traitées mettaient beaucoup moins de temps à se réveiller après l'anesthésie ($1,5 \pm 0,19$ min, contre $13,63 \pm 0,53$ min pour les souris non-traitées) [34].

2. Influence du crâne

L'utilisation de petits animaux (souris, rat, cochon d'Inde) pour l'étude de la neuromodulation ultrasonore, qui demeure la plus répandue à ce jour, présente de nombreux avantages mais comporte également certaines limites. En effet, les crânes des petits animaux, du fait de leur faible épaisseur (quelques dixièmes de millimètres), atténuent relativement faiblement les ondes ultrasonores (environ 20 % à 1 MHz pour les souris et 50 % pour les rats), qui gardent alors une amplitude assez élevée pour pouvoir générer des réverbérations. Ces dernières sont dues aux multiples réflexions des ultrasons au niveau des parois du crâne, mais également à l'interaction des ondes réfléchies entre elles et avec le faisceau ultrasonore émis par la sonde. Par conséquent, les conditions initiales d'insonification peuvent s'en trouver sensiblement modifiées, impactant par là-même le processus de neuromodulation et les mesures qui en sont faites. Aussi, l'apparition de ce phénomène est facilitée lorsque la fréquence ultrasonore utilisée est relativement basse (en particulier en-dessous de 1 MHz). En effet, plus la fréquence diminue, plus la longueur d'onde et la longueur du train d'onde associé augmentent, augmentant ainsi la probabilité d'interactions entre les ondes émises et réfléchies. Ainsi, Younan *et al.*, ont mis en évidence, à une fréquence ultrasonore de 0,32 MHz (impulsions de durée 230 μ s, répétées à une fréquence de 2 kHz, pendant 250 ms), un phénomène non négligeable de réverbérations des ondes ultrasonores au travers du crâne chez le rat (ondes stationnaires). En effet, ils ont établi que cela était à l'origine d'intensités acoustiques deux fois plus élevées dans le tissu cérébral que celles mesurées dans l'eau. Par conséquent, la valeur seuil de pression acoustique pour avoir des réponses motrices, initialement déterminée à 0,7 MPa sans prendre en compte le phénomène, devait être corrigée à $1,2 \pm 0,2$ MPa [32]. Par ailleurs, la taille des zones ciblées chez le petit animal peut s'avérer être inférieure à la largeur du faisceau ultrasonore, rendant difficile, voire parfois impossible, une neurostimulation ultrasonore sélective. Pour ces raisons et dans le but ultime d'implémenter cette technique chez l'Homme, l'utilisation de gros animaux (*e.g.*, ovins) s'impose comme une évidence. En effet, en plus de disposer d'un cerveau plus large, avec des

structures neuroanatomiques distinctes, ces animaux possèdent généralement un crâne assez comparable à celui de l'Homme en termes de propriétés anatomiques (taille, épaisseur, courbure) [35]. Ainsi, ces propriétés peuvent permettre, par exemple, de s'affranchir des artéfacts observés chez les rongeurs et cités précédemment (réverbérations des ondes ultrasonores à l'intérieur de la cavité crânienne et formation d'ondes stationnaires) [20], [35].

3. Influence des paramètres acoustiques

a. Définition des paramètres acoustiques

Une séquence ultrasonore pour la neurostimulation comprend plusieurs paramètres acoustiques.

La **fréquence ultrasonore (f)** : Ce paramètre influe directement sur la résolution spatiale et l'atténuation de l'onde ultrasonore par le crâne. En effet, l'augmentation de la fréquence a pour effet de diminuer la taille du faisceau ultrasonore, assurant ainsi une meilleure résolution spatiale, et, par conséquent, une neurostimulation plus précise et sélective (Fig. 1.2).

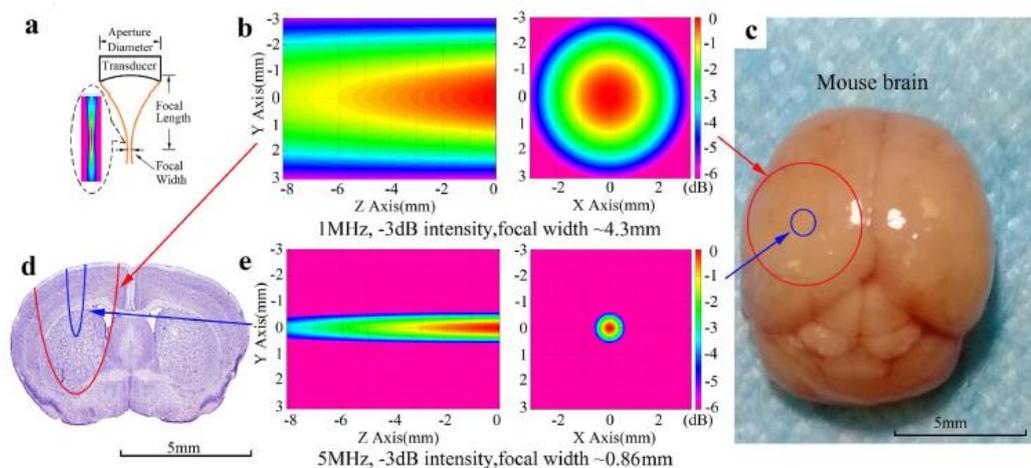


Figure 1.2 : Comparaison de la résolution spatiale théorique du faisceau ultrasonore utilisé pour la neurostimulation à des fréquences de 1 MHz (b) et 5 MHz (e), dans le cerveau de souris. Ce dernier est représenté vu de haut (c) et en coupe coronale (d) ; les cercles rouge et bleu représentés en (c) et (d) correspondent à la limite du faisceau à -3 dB d'intensité, à 1 et 5 MHz, respectivement. La figure en (a) explicite les caractéristiques du transducteur (diamètre et longueur focale) ainsi que la largeur de la tâche focale. Source : Adapté de Li et al. 2016.

Cependant, cette augmentation de la fréquence s'accompagne d'effets d'atténuation plus importants. En effet, une onde ultrasonore, qui traverse le crâne, subit divers phénomènes liés à la structure hétérogène et l'épaisseur irrégulière de celui-ci. Ces phénomènes sont de nature mécanique (réflexion, réfraction, diffraction, réflexions multiples) ou thermique (absorption). Leur combinaison résulte en une atténuation de l'onde émise, qui s'intensifie lorsque la fréquence augmente. Aussi, des aberrations apparaissent au niveau de la phase de l'onde ultrasonore, dégradant ainsi la focalisation acoustique. Pour surmonter ces limitations, la quasi-totalité des études précliniques et cliniques recommandent l'utilisation de fréquences

inférieures à 0,7 MHz [20], bien que de nombreuses autres études aient été réalisées à des fréquences supérieures [36]. En revanche, pour les travaux *in vitro* et *ex vivo*, comme les ondes ultrasonores ne traversent aucune structure avant d'atteindre les neurones, les effets de fréquences bien plus hautes sur l'efficacité de la neurostimulation ont pu être explorées (jusqu'à 43 MHz) [7].

La **durée de sonication (DS)** est un paramètre déterminant, puisqu'elle influe sur les effets générés par les ultrasons au niveau des tissus. En effet, l'utilisation d'une impulsion longue favoriserait des effets d'inhibition neuronale, alors que l'application d'impulsions courtes favoriserait une action excitatrice des ultrasons sur les neurones [20], [37]. Ainsi, Kim *et al.*, ont observé qu'une DS de 300 ms requiert des intensités acoustiques seuils plus faibles qu'une DS de 400 ms pour générer des mouvements de queue chez le rat (valeurs moyennes d' I_{SPPA} seuils entre 5 et 7 W/cm² environ et entre 8 et 10 W/cm² environ, respectivement, pour différentes valeurs de durée d'impulsion comprises entre 0,25 ms et 5 ms ; période de répétition de l'impulsion = 2 × durée d'impulsion ; f = 0,35 MHz). Ainsi, ils ont émis l'hypothèse que l'utilisation de DS élevées conduisait au recrutement de circuits neuronaux inhibiteurs, augmentant ainsi la valeur seuil d'intensité acoustique permettant d'observer des réponses motrices [13]. L'utilisation d'une durée d'impulsion inférieure à 500 ms est généralement décrite dans la littérature.

Mode pulsé versus mode continu : le mode pulsé consiste à émettre un train de brèves impulsions ultrasonores de durée **DI (Durée d'Impulsion)** à une certaine **fréquence de répétition (FR)**, tout au long de la durée DS – le **rapport cyclique (RC)** étant défini comme le produit DI × FR. Le mode continu consiste à émettre un train d'ondes ultrasonore en continu, tout au long de la durée DS. Ainsi, dans le cas du mode continu, le RC est de 100 % et DI = DS. L'émission de durée DS est ensuite répétée plusieurs fois pendant la **durée totale d'insonification (DT)**. Le temps séparant le début d'un train d'onde du début du suivant est appelé **intervalle inter-stimulus⁹ (IIS)** ; cet intervalle représente donc la période de répétition du stimulus. Kim *et al.*, par exemple, ont réalisé des travaux où ils ont exploré l'effet de ce paramètre sur la neurostimulation ultrasonore. Ainsi, à une fréquence de 0,35 MHz, ils ont comparé le mode pulsé (DI = 2 ms ; RC = 50 % ; DS = 300 ms) et son équivalent en mode continu (DS = 150 ms). Ils ont alors observé une meilleure efficacité en utilisant le mode pulsé, avec une intensité acoustique nécessaire pour générer des réponses motrices inférieure à celle requise pour le mode continu ($I_{SPPA} = 4,91 \pm 0,46$ W/cm², contre $7,73 \pm 0,83$ W/cm², respectivement) [13].

La **pression acoustique** : Le choix de la pression acoustique, en particulier du **pic négatif de pression (PNP)**, détermine la survenue ou non d'effets mécaniques induits par des ondes ultrasonores. L'**index mécanique (IM)**, qui permet d'évaluer la capacité d'une onde à générer

⁹ Dans certaines publications, contrairement à la définition donnée ci-dessus, l'intervalle inter-stimulus est défini comme le temps séparant la fin d'un stimulus ultrasonore du début du stimulus suivant, ce qui peut engendrer une confusion. Ainsi, dans ces publications, cet intervalle correspond à un temps de repos entre les moments de stimulation.

de la cavitation, est un paramètre qui peut également être utilisé. Par ailleurs, la pression acoustique est souvent associée à l'**intensité acoustique**, qui est définie comme le rapport du carré de la pression et de l'impédance acoustique Z du milieu ($Z = \rho c$, avec ρ la masse volumique du milieu traversé par l'onde et c la célérité de l'onde dans ce milieu). Les intensités les plus utilisées sont l' I_{SPPA} (*Spatial-Peak Pulse-Average Intensity*, en anglais) et l' I_{SPTA} (*Spatial-Peak Temporal-Average Intensity*, en anglais). La première représente le pic spatial d'intensité moyenné sur la durée DI alors que la seconde représente le pic spatial d'intensité moyenné sur la durée $1/FR$. Elles sont définies comme suit :

- $I_{SPPA} = \frac{II}{DI}$, II étant l'intégrale de l'intensité calculée sur la durée DI ; pour un signal sinusoïdal, l' I_{SPPA} est également définie comme le rapport $\frac{P_p^2}{2Z}$, où P_p est le pic de pression (positif ou négatif).
- $I_{SPTA} = II \times FR$.

Enfin, l'**index thermique (IT)** permet de quantifier les effets thermiques des ultrasons. Il est défini comme le rapport de la puissance acoustique (= intensité acoustique \times surface de tissu insonifiée) et de la puissance nécessaire pour élever la température du tissu de $1^\circ C$.

Un schéma décrivant les principaux paramètres intervenant dans une étude de neurostimulation ultrasonore est présenté en Fig. 1.3. Aussi, le tableau 1.1 donne une vue d'ensemble des valeurs de ces paramètres utilisées dans les principales études sur cette technique.

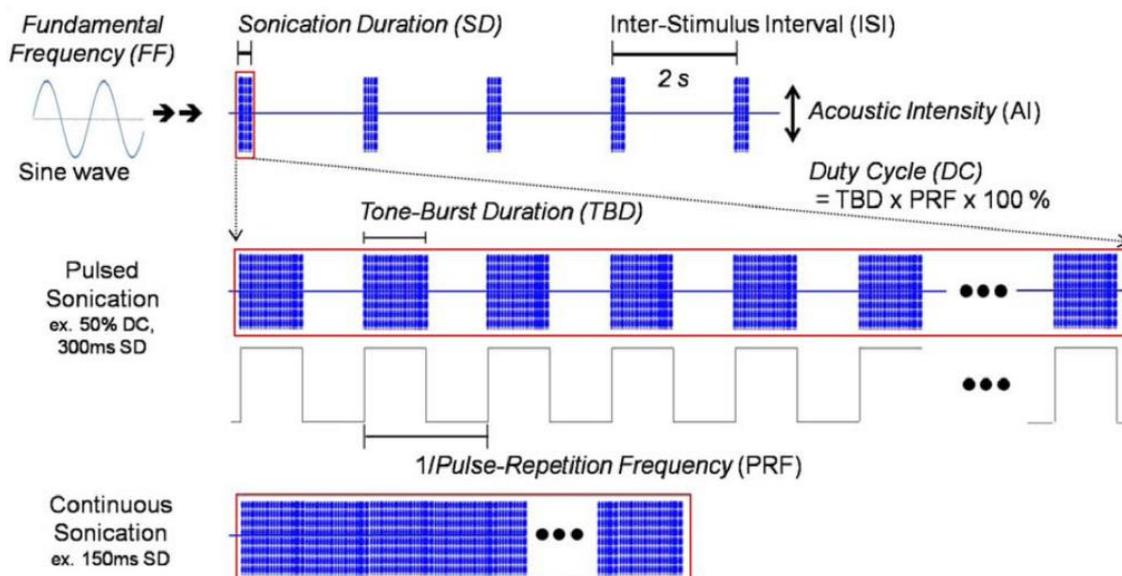


Figure 1.3 : Résumé des principaux paramètres acoustiques utilisés pour la neurostimulation ultrasonore. Notations : f = fréquence (f) ; TBD = durée d'impulsion (DI) ; DC = rapport de cycle (RC) ; PRF = fréquence de répétition (FR) ; SD = durée de sonication (DS) ; ISI = intervalle inter-stimulus (IIS) ; AI = intensité acoustique. La valeur d'IIS indiquée (2 s) est celle utilisée dans l'étude dont est extrait le schéma ; elle n'est donc pas fixe et peut être modifiée. Source : adapté de Kim et al., 2014.

(a)

	f	FR	RC
Etudes précliniques	0,23 – 5 MHz <i>Plusieurs études à $f \leq 0,7$ MHz ; jusqu'à 43 MHz en ex vivo – in vitro</i>	50 Hz – 8 kHz <i>Plusieurs études entre 0,1 et 2 kHz ; jusqu'à 200 kHz en in vitro</i>	0,2 - 86 % (100 % pour le mode continu) <i>Plusieurs études entre 0,2 et 50, voire 70 %</i>
Etudes cliniques	0,21 – 8 MHz <i>Majorité des études à $f \leq 0,65$ MHz</i>	1 Hz – 3 kHz <i>Majorité des études à 0,5 et 1 kHz</i>	0,26 – 50 % <i>Majorité des études à 36 et 50 %</i>

(b)

	DI	DS	IIS	DT
Etudes précliniques	0,05 – 100 ms <i>Plusieurs études entre 0,25 et 1 ms</i>	0,5 ms – 20 min <i>Plusieurs études entre 50 et 400 ms</i>	100 ms – plus de 30 s <i>Plusieurs études entre 2 et 10 s</i>	20 s – 20 min <i>Plusieurs études entre 30 s et 2 min, et plusieurs autres entre 5 et 30 min</i>
Etudes cliniques	0,065 – 5 ms <i>Majorité des études entre 0,36 et 1 ms</i>	0,36 ms – 30 s <i>Majorité des études à 300 ou 500 ms</i>	3 – 60 s <i>Majorité des études entre 3 et 10 s</i>	0,5 s – 20 min <i>Plusieurs études à moins de 3 min</i>

(c)

	I _{SPPA}	I _{SPTA}	IM
Etudes précliniques	0,74 mW/cm ² – 90,7 W/cm ² <i>Plusieurs études entre 0,1 et 40 W/cm² ; jusqu'à 280 W/cm² en in vitro</i>	0,013 – 15,3 W/cm ²	0,08 – 3,1 <i>Plusieurs études entre 0,08 et 1,8</i>
Etudes cliniques	2,5 – 35 W/cm ² <i>Majorité des études en-dessous de 18 W/cm²</i>	0,1 – 8,6 W/cm ² <i>Majorité des études en-dessous de 6 W/cm²</i>	0,62 – 1,2

Tableau 1.1 : Etendue des paramètres utilisés dans les études sur la neurostimulation ultrasonore : (a) f = fréquence ; FR = fréquence de répétition ; RC = rapport de cycle ; (b) DI = durée d'impulsion ; DS = durée de sonication ; IIS = intervalle inter-stimulus ; DT = durée totale d'insonification ; dans certaines études, DS = DT ; (c) IM = index mécanique ; certaines études ont renseigné des valeurs d'I_{SPPA}/I_{SPTA}/IM dans l'eau, c'est-à-dire sans prendre en considération l'atténuation du crâne. Références ayant aidé à réaliser le tableau : revues de Zhang et al., 2021, Pasquinelli et al., 2019 et Baek et al., 2017.

b. Bioeffets des paramètres acoustiques : de l'*ex vivo* à l'animal de rente

Etudes *ex vivo* et chez les nématodes

Dans une étude sur des coupes de cultures cellulaires d'hippocampe de rat, Kim *et al.*, ont montré que des ondes ultrasonores de faible intensité acoustique ($f = 0,5$ MHz ; $DS = 2,097$ μ s ; $FR = 1,16$ kHz ; $DT = 3$ min ; $I_{SPPA} = 780$ μ W/cm² ; non focalisées) pouvaient augmenter l'activité électrique spontanée des neurones, jusqu'à au moins 3 min après la fin de la stimulation [38].

D'autre part, Menz *et al.*, utilisant des ultrasons de haute fréquence ($f = 43$ MHz ; diamètre de tâche focale à -3 dB d'environ 90 μ m ; impulsions répétées à une FR de 0,5 à 15 Hz ; $DS = 1$ s ; $IIS = 2$ s ; $DT = 1$ à 5 min ; $I_{TA}^{10} = 30$ W/cm²), ont observé que l'exposition *ex vivo* de cellules ganglionnaires de la rétine de salamandre à ces ondes induisait des réponses neuronales équivalentes à celles causées par des stimuli visuels, mais avec des latences plus courtes ($98 \pm 4,5$ ms, contre $139 \pm 3,3$ ms, respectivement). Par ailleurs, en comparant le mode continu (voir paramètres ci-dessus) au mode pulsé (une fréquence de répétition supplémentaire, pour des valeurs testées allant de 10 Hz à 1 MHz, était introduite dans les impulsions du mode continu ; RC fixe de 50 %), ils ont observé que les neurones présentaient une activité similaire [39].

Enfin, chez *C. Elegans*, Xian *et al.*, ont montré que des vers exposés à des ultrasons durant 20 min ($f = 1$ MHz ; 200 impulsions de 200 μ s, répétées à une FR de 1 kHz ; pression maximale de 0,37 MPa à la focale) voient leur vitesse de déplacement augmenter significativement durant les cinq premières minutes d'insonification, avant de baisser à un niveau basal, traduisant un effet d'adaptation à la neurostimulation. Durant cette stimulation et jusqu'à 1 min après, une augmentation des mouvements rotatifs des vers était également observée [22].

Etudes chez la souris

Jusqu'à présent, la neurostimulation ultrasonore a principalement été étudiée sur le petit animal et, en particulier chez la souris. Ainsi, Tufail *et al.*, ont montré que l'application d'ondes ultrasonores focalisées sur l'hippocampe et le cortex moteur de souris générait des potentiels évoqués. Ils ont observé que de faibles intensités acoustiques ($21 \leq I_{SPTA} \leq 163$ mW/cm²) et fréquences ultrasonores (0,25 et 0,5 MHz) étaient à l'origine de réponses motrices de grandes amplitudes. En revanche, l'augmentation de la fréquence de répétition des impulsions ultrasonores (de 0,5 à 5 Hz) rendait difficile l'induction de réponses motrices [40]. King *et al.*, ont confirmé que l'exposition du cortex moteur à des ondes ultrasonores générait des réponses motrices. Dans cette étude, les auteurs ont étudié l'influence de différents paramètres ultrasonores, notamment la fréquence (0,25 à 0,6 MHz), l'intensité acoustique

¹⁰ *Temporal Average intensity* : désigne, en anglais, la valeur moyenne de l'intensité acoustique sur une période de répétition d'une impulsion, *i.e.*, $1/FR$.

(0,01 à 79 W/cm² pic à pic), la durée d'impulsion (20 à 480 ms) et la fréquence de répétition des impulsions (11 Hz à 3 kHz) sur l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore. Ils ont démontré que ces paramètres avaient un impact déterminant sur cette efficacité et sur les caractéristiques des réponses motrices. Ainsi, ils ont établi que le taux de succès augmentait de manière sigmoïdale avec l'intensité acoustique ($f = 0,5$ MHz ; DS = 80 ms). En revanche, à intensité constante, ce taux diminuait lorsque la fréquence augmentait de 0,25 à 0,5 MHz. Une augmentation significative de l'intensité acoustique (de 0,06 à 10 W/cm², soit un facteur 160 environ) était nécessaire pour maintenir un taux de succès constant (égal à 85 %) entre les deux fréquences. De plus, les auteurs ont noté que le taux de succès augmentait avec la durée des impulsions ultrasonores, et saturait à une valeur de 80 % pour les impulsions de plus de 80 ms ($f = 0,5$ MHz ; $I = 4,2$ W/cm²). Par ailleurs, ils ont mis en évidence que le taux de succès dépendait du produit de l'intensité acoustique et de la durée des impulsions ultrasonores. Ils ont ainsi statué que le paramètre déterminant pour induire une neurostimulation efficace pourrait être l'intégrale de l'intensité sur un intervalle de temps de 50 à 150 ms. Aussi, cette étude a montré qu'une neurostimulation avec des impulsions ultrasonores continues (soit un rapport cyclique de 100 %) était plus efficace qu'une neurostimulation en mode pulsé (rapport cyclique < 100 %) [5]. Ye *et al.*, ont également observé que l'efficacité de la neurostimulation est dépendante de la fréquence et de l'intensité acoustique, mais sur une plage de fréquences ultrasonores bien plus large (0,3 à 2,9 MHz). Les auteurs ont testé différentes tailles de tâche focale (entre 4,39 et 27,58 mm², avec des transducteurs plans et focalisés ; $f = 0,3$ à 0,6 MHz), afin de déterminer si ce paramètre, qui varie significativement lorsque la fréquence change, exerçait une influence sur l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore. Ils ont ainsi établi que cette dernière serait impactée par la variation de la fréquence elle-même, plutôt que par la variation de taille de la tâche focale qui en découle [6]. Enfin, dans une étude sur les effets de plus hautes fréquences ultrasonores, Li *et al.*, ont comparé les résultats obtenus à 1 et 5 MHz (DI = 1 ms ; RC = 50 % ; DS = 300 ms ; IIS = 3 s ; DT = 1 min ; $I_{SPTA} = 130 - 230$ mW/cm²). Ils ont observé que l'augmentation de fréquence s'accompagnait d'une diminution significative de la latence des réponses motrices (208 ± 111 ms *versus* 45 ± 31 ms) [36].

Etudes chez le rat

Dans une étude ciblant le cortex moteur de rats, Kim *et al.*, ont confirmé que l'efficacité de la neurostimulation dépendait de divers paramètres ultrasonores. En effet, ils ont démontré que l'utilisation d'une fréquence de 0,35 MHz nécessitait de plus faibles intensités qu'une fréquence de 0,65 MHz pour l'induction de réponses motrices, démontrant ainsi une plus grande efficacité ($I_{SPPA} \approx 5 - 7$ W/cm² et $7 - 10$ W/cm², respectivement ; DI = 0,25 à 5 ms ; RC = 50 % ; DS = 300 ms ; IIS = 2 s) [13]. Dans une étude postérieure, la même équipe a décrit qu'en fonction des valeurs de durée d'impulsion et d'intensité acoustique utilisées, des effets d'inhibition ($f = 0,35$ MHz ; DI = 0,5 ms ; RC = 5 %, soit FR = 0,1 kHz ; DS = 150 s ; $I_{SPPA} = 3$ W/cm²) ou de stimulation (RC = 8,3 % et $I_{SPPA} = 3$ W/cm² ou RC = 5 % et $I_{SPPA} = 5$ W/cm²) pouvaient être observés sur des potentiels évoqués visuels [41]. Lu *et al.*, ont confirmé ces résultats en

observant des réponses neuronales après avoir ciblé le cortex visuel de rats normaux et de rats aveugles ($f = 0,5$ MHz ; mode continu : DS = 2 ou 15 ms). Chez ces derniers, les réponses étaient significativement plus grandes en amplitude que chez les rats normaux. Les auteurs ont notamment établi que l'insonification en mode pulsé du cortex visuel (DI = 0,5 – 5 ms ; FR = 0,1 – 0,5 kHz ; DS = 30 ms ; $I_{SPPA} = 115,8$ W/cm², mesurée dans l'eau) donnait des réponses neuronales basse fréquence plus longues qu'en mode continu (durée des réponses de l'ordre de 20 ms, contre 5 ms environ, respectivement). De plus, ils ont montré que le choix de certains paramètres ultrasonores (durée, fréquence de répétition et rapport cyclique de l'impulsion) avait un impact direct sur le type de réponse neuronale obtenu. En particulier, ils ont mis en évidence une valeur seuil de la fréquence de répétition de l'impulsion de 0,1 kHz, en-dessous de laquelle aucune réponse neuronale n'était observée [42].

En revanche, des effets inhibiteurs ont été décrits par Daniels *et al.*, qui, en ciblant le colliculus inférieur chez le rat avec des ondes ultrasonores ($f = 0,23$ MHz ; DS = 100 ms ; IIS = 3 s ; DT = 52 s), ont réussi à supprimer des potentiels évoqués auditifs de manière transitoire. Les auteurs ont également mis en évidence que cet effet était plus marqué lorsque l' I_{SPPA} augmentait (de 2,3 à 4,6 W/cm² ; soit, en pression, de 39,7 à 79,3 kPa). Ils ont observé que tous les rats traités à faible intensité montraient à nouveau des potentiels auditifs 24 h à une semaine après la neurostimulation, alors que seuls 50 % des rats traités à plus haute intensité récupéraient ces potentiels, avec une période de récupération pouvant aller jusqu'à un mois. En particulier, les rats n'ayant pas complètement récupéré de la neurostimulation étaient ceux qui avaient subi une suppression de potentiels évoqués auditifs plus marquée lorsque l'intensité était augmentée [43].

Etudes sur des modèles ovins et porcins

Lee *et al.*, ont reproduit partiellement les résultats obtenus sur les rongeurs en stimulant l'aire somatomotrice primaire et le cortex visuel primaire de la brebis ($f = 0,25$ MHz ; DI = 1 ms ; FR = 0,5 kHz ; DS = 300 ms ; IIS = 1 ou 5 s ; I_{SPPA} allant jusqu'à 14,3 W/cm²). En effet, ils ont mis en évidence un seuil d'intensité acoustique spécifique à chaque animal pour induire des réponses motrices et des potentiels évoqués visuels [35]. Dans une autre étude, la même équipe a étudié l'influence de différents paramètres acoustiques sur l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore pour l'activation de l'aire somatomotrice primaire de la brebis ($f = 0,25$ MHz ; mode pulsé : DI = 0,25 – 3 ms ; FR = 0,1 – 1,4 kHz ; RC = 30 – 70 % ; DS = 200 ms ; IIS = 5 s ; $I_{SPPA} = 15,8$ – 18,2 W/cm² *in situ* ; mode continu : DS = 60 – 140 ms ; RC = 100 %). Leurs résultats ont montré que le taux de réponse motrice augmentait lorsque le RC augmentait jusqu'à 70 %, avant de diminuer significativement lorsque le RC était de 100 %, démontrant ainsi une plus grande efficacité du mode pulsé (RC < 100 %) par rapport au mode continu (RC = 100 %). En revanche, le taux de réponse diminuait lorsque le DI ou l'intensité augmentaient. Néanmoins, concernant cette étude, la fiabilité des conclusions qu'elle présente peut être mise en doute. En effet, les taux de succès rapportés étaient particulièrement faibles ($\leq 12,4$ %), en raison, d'après les conjectures des auteurs, de l'anesthésie appliquée, de l'influence

des paramètres ultrasonores utilisés et/ou des mouvements de l'animal lors de sa respiration. En effet, ces mouvements peuvent influencer sur l'alignement du faisceau ultrasonore avec la région cérébrale ciblée, ayant ainsi de probables conséquences sur les résultats observés. Afin d'obtenir des résultats plus fiables, ce genre d'études devrait donc inclure un protocole, incluant des techniques d'immunohistochimie par exemple, qui permet de vérifier si les zones ciblées ont été correctement insonifiées. D'autre part, la même étude a rapporté une suppression temporaire de potentiels évoqués somatosensoriels, mesurés à l'EEG, lorsque des valeurs particulières de certains paramètres acoustiques étaient choisies ($DI = 0,5 \text{ ms}$; $RC = 3$ et 5% ; $I_{SPPA} = 5,4 \text{ W/cm}^2$) [44]. Enfin, Daniels *et al.*, utilisant les mêmes paramètres ultrasonores que pour leur expérimentation sur les rats ($f = 0,23 \text{ MHz}$; $DS = 100 \text{ ms}$; $IIS = 3 \text{ s}$; $DT = 52 \text{ s}$; $I_{SPPA} = 4,6 \text{ W/cm}^2$), ont ciblé le cortex auditif du porc et ont observé une inhibition des potentiels évoqués auditifs, confirmant ainsi leurs résultats obtenus chez le rat. Chez deux des sept porcs utilisés pour l'étude, le temps de récupération pour avoir à nouveau des potentiels auditifs se situait entre une et trois heures après la neurostimulation, tandis que le reste de la cohorte n'avait toujours pas récupéré au bout de trois heures [43].

Les différentes études paramétriques réalisées sur la neurostimulation ultrasonore ont donc mis en lumière un large panel d'effets observés, aussi bien excitateurs qu'inhibiteurs. Mais elles révèlent également une assez grande variété dans les valeurs de paramètres utilisées (Tableau 1.1), mettant ainsi en évidence la difficulté de trouver, à ce jour, un consensus à ce sujet. Néanmoins, au fil des différents travaux, des tendances de plus en plus nettes commencent à se dégager concernant ces paramètres, et les plages de valeurs utilisées se resserrent au fur et à mesure. Des études supplémentaires restent, cependant, nécessaires pour aider à mieux clarifier cet aspect.

4. Résolution spatiale, spécificité/sélectivité

Etudes précliniques chez le petit animal

Dans une étude réalisée chez la souris, Kamimura *et al.*, ont induit des mouvements des pattes arrière en ciblant le cortex sensorimoteur ipsilatéral et controlatéral avec des ondes ultrasonores de fréquence $1,9 \text{ MHz}$ (950 impulsions répétées à une FR de 1 kHz ; $DS = 1 \text{ s}$; $IIS = 2 \text{ s}$; schéma répété 10 fois, soit $DT = 19 \text{ s}$, pour chaque zone ciblée), démontrant ainsi une meilleure résolution spatiale (1 mm) et une spécificité accrue (réponses motrices distinctes des pattes arrières en ipsilatéral et controlatéral), en comparaison des études réalisées à plus basse fréquence. De plus, ils ont observé des mouvements des globes oculaires et une dilatation des pupilles lorsque des structures cérébrales plus profondes, comme le colliculus supérieur, le noyau prétectal ou le thalamus, étaient la cible de la neurostimulation ultrasonore. Ils ont ainsi démontré que cette technique peut potentiellement être utilisée comme un outil de cartographie fonctionnelle du cerveau [45]. King *et al.* ont démontré qu'une tâche focale de 3 mm de diamètre (à -6 dB), à une fréquence de $0,5 \text{ MHz}$ (mode continu, avec des impulsions de durée 80 ms et d'intensité 3 W/cm^2), pouvait stimuler

différentes régions du cortex moteur de la souris de manière sélective [46]. Dans l'étude de Mehic *et al.*, différentes réponses motrices ont été générées en ciblant différentes régions anatomiques du cerveau, séparées de seulement 1 mm. Ils ont utilisé, pour cela, des ondes ultrasonores de fréquence 0,5 MHz, ou ont associé deux fréquences de 1,75 et 2 MHz, afin d'avoir un signal sinusoïdal de 2 MHz modulé par une enveloppe de 0,5 MHz (DI = 200 μ s ; FR = 1,5 kHz ; 88 impulsions, soit DS = 58,7 ms ; IIS = 1 s ; DT = 10 s) [47].

Récemment, Aurup *et al.*, ont abondé dans le même sens puisqu'en neurostimulant des zones de cerveau de souris séparées de 1 mm ou plus, ils ont observé des différences significatives au niveau des réponses motrices obtenues. En effet, en ciblant des zones moyennes au niveau du cortex moteur et au sein de régions postérieures du cerveau à l'aide d'ultrasons ($f = 2$ MHz ; DI = 0,5 ms ; FR = 1 kHz ; DS = 300 ms ; IIS = 5 s ; $I_{SPPA} = 97$ W/cm²), ils ont observé des réponses motrices significativement différentes au niveau des différentes pattes des souris. Les réponses étaient comparées en termes de latence, de durée et de puissance. Aussi, ils ont noté que ces caractéristiques de réponses étaient significativement différentes suivant la région cérébrale ciblée. En outre, ils ont déterminé que les réponses motrices controlatérales étaient significativement plus puissantes au niveau des pattes arrière et de la patte avant gauche des animaux, tandis que la patte avant droite présentait de plus fortes réponses ipsilatérales [48]. D'autre part, Li *et al.*, ont montré que la spécificité était grandement améliorée en augmentant significativement la fréquence, le diamètre de la région stimulée passant de $0,83 \pm 0,11$ mm à 1 MHz à $0,29 \pm 0,08$ mm à 5 MHz (DI = 1 ms ; RC = 50 % ; DS = 300 ms ; IIS = 3 s ; DT = 1 min ; $I_{SPTA} = 130 - 230$ mW/cm²) [36]. Enfin, Kim *et al.*, utilisant également une haute fréquence de 5 MHz, ont testé une méthode novatrice et simple pour améliorer la résolution spatiale du faisceau ultrasonore, notamment dans la direction axiale. En effet, ils ont croisé les faisceaux de deux transducteurs ultrasonores, placés en vis-à-vis (à un angle de 90° ; $f = 5$ MHz), au niveau de leurs focales respectives, obtenant ainsi des résolutions axiale et latérale de 1 mm. Ainsi, à l'aide de cette technique, ils ont ciblé le cortex moteur de souris ($f = 5$ MHz ; DI = 0,5 ms ; FR = 1 kHz ; DS = 400 ms ; $I_{SPPA} \approx 130$ mW/cm² *in situ*) et ont observé une activation neuronale (par immunohistochimie – détection de la protéine c-Fos) plus localisée au niveau la région ciblée en comparaison d'un transducteur utilisé seul. Par ailleurs, en ciblant l'habenula (de dimensions 1×1 mm² environ, dans le plan incluant les directions axiale et latérale du faisceau ultrasonore), les auteurs ont noté une plus grande activation neuronale comparativement à une stimulation en dehors de la zone cible, confirmant ainsi la haute résolution de cette technique [49].

D'autre part, certaines études ont mis l'accent sur la résolution spatiale des techniques d'imagerie et de localisation de l'activité neuronale lorsque la neurostimulation ultrasonore était appliquée. En effet, ces techniques pourraient constituer un outil précieux aidant à évaluer la résolution spatiale de la neurostimulation ultrasonore. Ainsi, dans une étude réalisée chez le rat, Yu *et al.*, ont utilisé la technique d'imagerie des sources électrophysiologiques qui, à travers l'enregistrement de différents signaux d'électroencéphalographie, permet de remonter aux sources de ces signaux afin de les

localiser. Ainsi, en appliquant des ultrasons sur des zones corticales du cerveau du rat ($f = 0,5$ MHz ; unique impulsion de durée $70 \mu\text{s}$; $\text{FR} = 2$ kHz ; $\text{DS} = 5 - 200$ ms ; $\text{IIS} = 3$ s ; $\text{I}_{\text{SPPA}} = 0,74 - 4,6$ mW/cm^2 *in situ*), ils ont démontré la possibilité d'établir un profil spatio-temporel de l'activation cérébrale générée par la neurostimulation. Les résultats de l'étude indiquaient que l'activation neuronale avait d'abord lieu au niveau du site d'insonification avant de se propager aux zones cérébrales voisines [50]. Dans le même esprit, et également chez le rat, Darvas *et al.*, ont associé l'encéphalographie non-invasive (électrodes externes) et la neurostimulation ultrasonore ($f = 2$ MHz ; $\text{DI} = 200 \mu\text{s}$; $\text{FR} = 1,05$ kHz ; $\text{DS} = 1$ s ; $\text{IIS} = 2$ s ; $\text{DT} = 200$ s ; $\text{I}_{\text{SPTA}} = 1,4$ W/cm^2 *in situ*) pour la détection et la localisation précises de l'activité de zones cérébrales profondes. Cette modalité permettrait, dans un avenir proche, de cartographier l'activité électrophysiologique du cerveau, ce qui est impossible à réaliser en utilisant l'encéphalographie non-invasive seule. En effet, cette dernière dispose d'une résolution spatiale limitée ($6-9$ cm ; $2-3$ cm après application de la CSD¹¹ [51]) et détecte uniquement l'activité cérébrale des zones superficielles [52].

Etudes précliniques chez les gros animaux (porc et macaque)

Chez le porc, Dallapiazza *et al.*, ont appliqué des ondes ultrasonores ($f = 1,14$ MHz ; $\text{DS} = 43,7$ ms ; $\text{IIS} = 100$ ms ; $\text{DT} = 40$ s ; $\text{I}_{\text{SA}}^{12} = 25 - 30$ W/cm^2 ; des fréquences de $0,22$ et $0,65$ MHz ont également été utilisées) sur le thalamus somatosensoriel et ont inhibé des potentiels évoqués somatosensoriels. Ils ont induit des inhibitions sélectives de noyaux thalamiques mitoyens, mettant ainsi en évidence une résolution spatiale de la technique de l'ordre de 2 mm [53].

Dans un autre modèle animal, à savoir celui du macaque, des études ont également mis en exergue la sélectivité de la neurostimulation ultrasonore. Ainsi, Deffieux *et al.*, ont fait réaliser à des macaques rhésus des tâches d'anti-saccade¹³ en alternant des phases de stimulation ultrasonore et de non-stimulation du champ oculaire frontal, une zone du cortex frontal impliquée dans les mouvements de saccade et le contrôle de l'activité visuelle. Ainsi, ils ont constaté que la neurostimulation ultrasonore ($f = 0,32$ MHz ; $\text{DS} = 100$ ms ; impulsions délivrées 100 ms après l'apparition des stimuli visuels) augmentait significativement la latence des tâches d'anti-saccade, en particulier pour celles réalisées en ipsilatéral [54]. Au sein de la même équipe de recherche, Wattiez *et al.*, ont démontré que l'application de la neurostimulation ultrasonore sur le champ oculaire frontal pouvait induire une activation ou une inhibition de l'activité neuronale d'une autre zone cérébrale, le champ oculaire supplémentaire, connecté au champ oculaire frontal ($f = 0,32$ MHz ; $\text{DS} = 100$ ms ; impulsions

¹¹ *Current Source Density*, en anglais : méthode d'analyse des signaux issus de l'électroencéphalographie.

¹² *Spatial Average intensity* : désigne, en anglais, la valeur moyenne spatiale de l'intensité acoustique.

¹³ Les saccades sont des mouvements oculaires rapides et simultanés des yeux, qui séparent des phases de fixation d'un objet ou d'une image. Une tâche d'anti-saccade consiste à ce que le sujet détourne son regard pour ne pas suivre le mouvement d'un objet, allant ainsi à l'encontre du réflexe de saccade. Cela permet notamment d'évaluer le contrôle cognitif du sujet.

délivrées 100 ms après l'apparition des stimuli visuels ; $I_{SPPA} = 5,6 \pm 0,2 \text{ W/cm}^2$ et $1,9 \pm 0,2 \text{ W/cm}^2$ *in situ*, pour le premier et le deuxième animal utilisés, respectivement) [55].

Plus récemment, Kubanek *et al.*, ont mis en évidence que la neurostimulation ultrasonore ($f = 0,27 \text{ MHz}$; $DI = 1 \text{ ms}$; $FR = 0,5 \text{ kHz}$; $DS = 300 \text{ ms}$; $IIS = 3 \text{ s}$; durée = 30 s ; pression maximale entre 0,32 et 0,46 MPa *in situ* ; stimulation délivrée 100 ms avant l'apparition de la première cible visuelle) permettait de contrôler le choix visuel du macaque. En effet, suivant le champ oculaire frontal ciblé (droit ou gauche), ils ont observé que la neurostimulation orientait significativement le choix visuel de l'animal vers le champ visuel controlatéral [56]. Dans le même esprit, Downs *et al.*, ont réalisé une étude sur des macaques en appliquant la neurostimulation ultrasonore ($f = 0,5 \text{ MHz}$; $DI = 10 \text{ ms}$; $FR = 2 \text{ Hz}$; $DS = 120 \text{ s}$; pression de 0,4 MPa) sur une région cérébrale plus profonde, le putamen, impliquée dans la cognition, la récompense et le contrôle des mouvements. Ils ont ainsi observé que la neurostimulation améliorait la rapidité et la précision de la réponse des animaux lors de tâches visuomotrices [57]. Enfin, Yang *et al.*, ont détecté des changements hémodynamiques dans le cerveau de macaques par IRM fonctionnelle, lorsque les aires 3a/3b du cortex somatosensoriel faisaient l'objet d'une neurostimulation ultrasonore ($f = 0,25 \text{ MHz}$; $DI = 252 \mu\text{s}$; $FR = 2 \text{ kHz}$; $DS = 300 \text{ ms}$; $IIS = 3 \text{ s}$; durée = 30 s ; $I_{SPPA} = 9,9 \text{ W/cm}^2$ *in situ*). Ces changements étaient comparables à ceux observés avec un stimulus tactile naturel (Fig. 1.4), à la différence près qu'ils présentaient une latence plus courte [58].

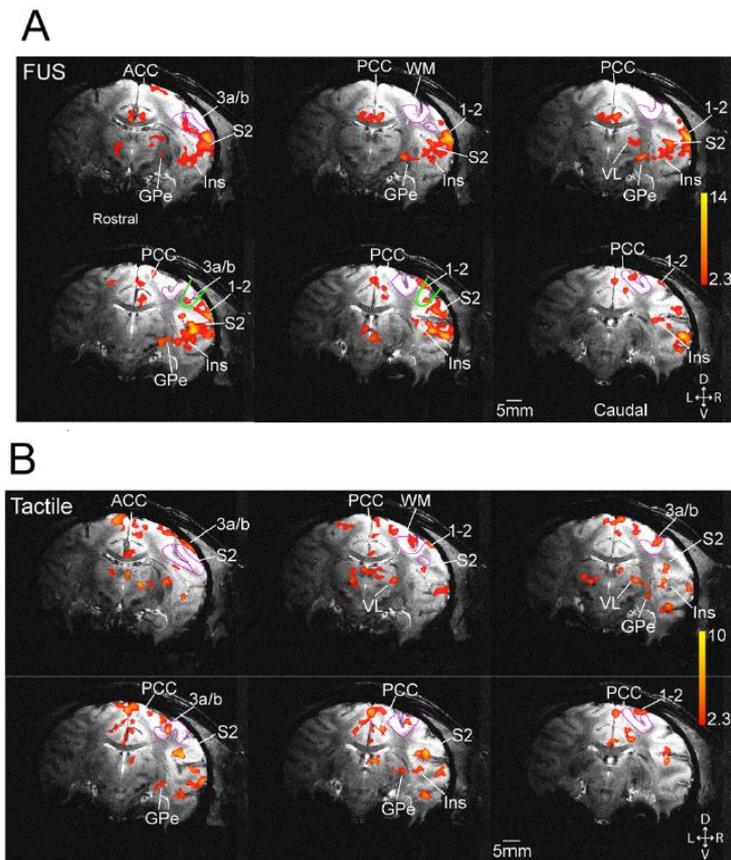


Figure 1.4 : L'IRM fonctionnelle réalisée sur le cerveau de macaque révèle une activation similaire lors de la stimulation ultrasonore de la région 3a/3b de l'hémisphère droit (A) et lors de la présentation d'un stimulus tactile (B). Source : d'après Yang et al., 2018.

Etudes cliniques

Plusieurs équipes de recherches ont travaillé sur l'application de la neurostimulation ultrasonore sur des zones cibles du cerveau humain (Fig. 1.5). En particulier, et comparablement aux études précliniques citées précédemment, ces différentes études cliniques ont ciblé des zones cérébrales localisées, générant ainsi des effets spécifiques de ces régions insonifiées. Ces travaux ont ainsi participé à mettre en lumière la résolution spatiale et la sélectivité satisfaisantes de cette technique.

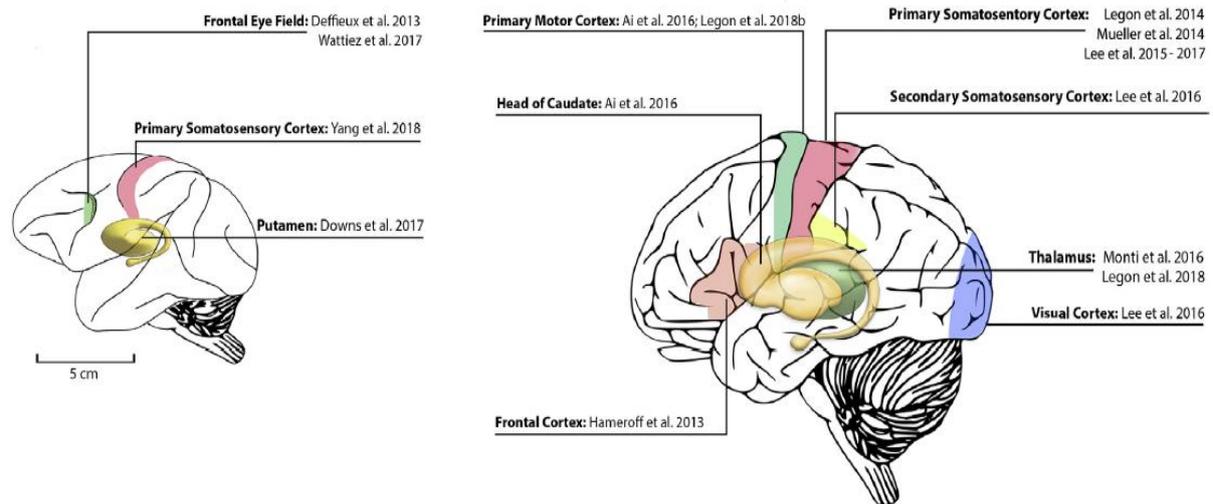


Figure 1.5 : Régions cérébrales ciblées par la neurostimulation ultrasonore dans les différentes études menées chez l'humain (à droite) et chez le singe. Source : d'après Fomenko et al., 2018.

Ainsi, Legon *et al.*, ont appliqué des ultrasons focalisés ($f = 0,5$ MHz ; $DS = 360 \mu s$; $FR = 1$ kHz ; $DT = 500$ ms ; $I_{SPPA} = 23,87$ W/cm² dans l'eau, l'atténuation du crâne étant d'environ 75 % en intensité) sur le cortex somatosensoriel primaire (S1 ; Fig. 1.6) de volontaires sains. Ils ont observé une diminution significative de l'amplitude des potentiels évoqués sensoriels, ainsi qu'une nette amélioration de leurs capacités sensorielles sur les tâches de discrimination sensorielle. Par ailleurs, ils ont noté que cet effet disparaissait lorsque le faisceau ultrasonore était focalisé à ± 1 cm du S1 dans la direction axiale, démontrant ainsi une résolution spatiale de la neurostimulation ultrasonore de l'ordre du centimètre [59].

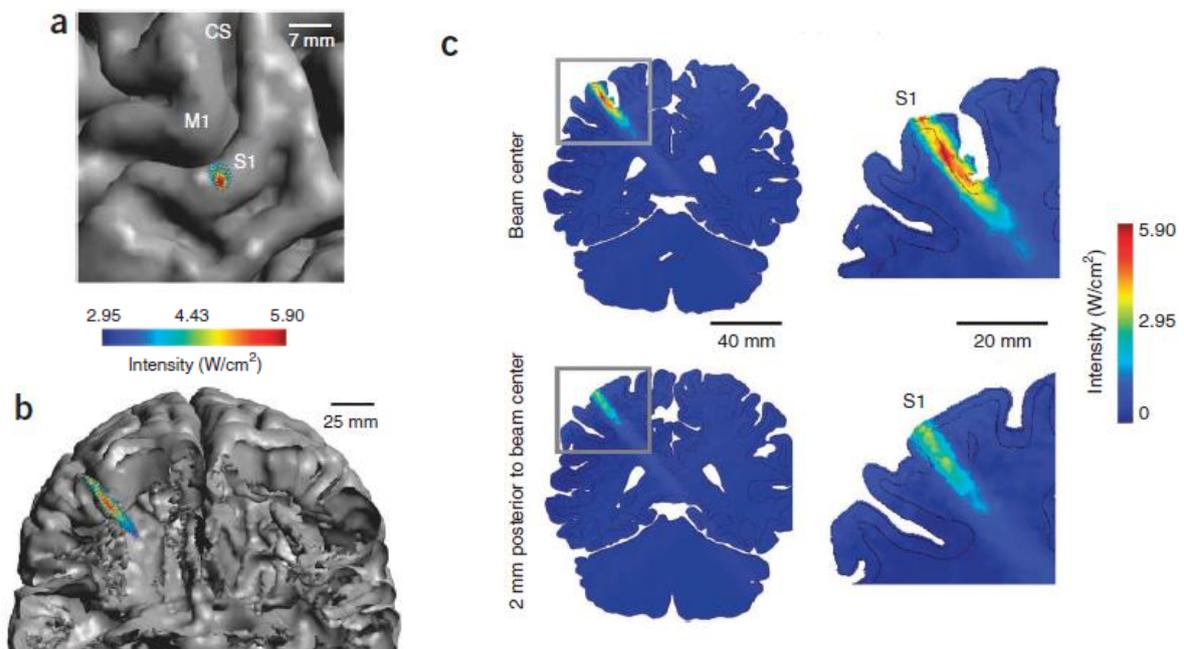


Figure 1.6 : Application d'ultrasons focalisés sur le cortex somatosensoriel primaire (S1) humain, mettant en avant la résolution spatiale élevée de cette modalité. (a,b) Vue de haut (a) et coupe coronale (b) d'un modèle de cerveau basé sur des images IRM, sur lequel est superposé le champ d'intensité acoustique du faisceau ultrasonore utilisé. (c) Coupes coronales d'images IRM réalisées au niveau du centre du faisceau ultrasonore (images du haut) et 2 mm derrière le centre (images du

bas), suivant l'axe antéro-postérieur ; l'intensité acoustique du faisceau est superposée sur les images. On observe ainsi une baisse drastique de l'intensité à 2 mm seulement du centre faisceau, ce qui démontre une résolution spatiale élevée des ultrasons focalisés. CS désigne le sillon central (Central Sulcus, en anglais) et M1 le cortex moteur primaire. Source : adapté de Legon et al., 2014.

Dans une autre étude, la même équipe a appliqué des ultrasons sur le noyau ventro-postéro-latéral (VPL) du thalamus ($f = 0,5$ MHz ; $DI = 360 \mu\text{s}$; $FR = 1$ kHz ; $DS = 500$ ms ; schéma répété 300 fois, avec $IIS^{14} = 4$ s ; $I_{SPPA} = 7,03$ W/cm² après transmission à travers la fenêtre temporale du crâne). L'analyse des résultats a révélé une suppression de la composante P14 des potentiels évoqués sensoriels, ainsi qu'une baisse des performances des sujets lors de tâches de discrimination sensorielle réalisées sous neurostimulation ultrasonore [60]. Par ailleurs, le même groupe a étudié l'application combinée de la stimulation magnétique transcrânienne et de la neurostimulation ultrasonore ($f = 0,5$ MHz ; $DI = 360 \mu\text{s}$; $FR = 1$ kHz ; $DS = 500$ ms ; schéma répété 10 fois, avec $IIS = 10$ s ; $I_{SPPA} = 17,12$ W/cm² mesurée dans l'eau) sur le cortex moteur primaire (M1) de volontaires sains. Les résultats ont montré que les ultrasons diminuaient significativement l'amplitude des réponses motrices générées par la stimulation magnétique transcrânienne. En outre les sujets traités avec des ultrasons au niveau du M1, durant la réalisation de tâches motrices simples, démontraient un temps de réaction plus rapide comparativement à des sujets non stimulés ou stimulés dans une zone différente du M1 (au niveau du vertex) [61].

De plus, Ai et al., ont appliqué, de manière concomitante, l'IRM fonctionnelle (IRMf) et la neurostimulation ultrasonore (pour l'IRMf à 3T/7T, respectivement : $f = 0,5$ MHz/0,86 MHz ; $DI = 360 \mu\text{s}/488 \mu\text{s}$; $FR = 1$ kHz ; $DS = 500$ ms ; schéma répété 5 fois, tous les 6 à 7 TR¹⁵ ; $I_{SPPA} = 6$ W/cm² après transmission à travers l'os pariétal du crâne), au niveau de zones corticales (M1/S1 ; IRMf à 3T) et subcorticales (noyau caudé ; IRMf à 7T). Ainsi, ils ont pu observer que l'insonification des zones ciblées y induisait des variations du niveau d'oxygénation du sang [62]. Lee et al., ont également imagé les effets de la neurostimulation ultrasonore par IRM fonctionnelle. Ainsi, ils ont démontré que l'insonification ($f = 0,27$ MHz ; $DI = 1$ ms ; $FR = 0,5$ kHz ; $DS = 300$ ms ; schéma répété 50 fois, avec $IIS = 13$ s ; $I_{SPPA} = 16,6$ W/cm²) du cortex visuel primaire (V1) entraînait une activation de ce dernier et d'autres régions cérébrales impliquées dans la vision (e.g., les corps géniculés latéraux du thalamus ; Fig. 1.7). Les résultats d'électroencéphalographie (EEG) ont révélé une modulation des potentiels évoqués visuels à la suite de cette neurostimulation ($IIS = 2.5$ s pour l'EEG). Par ailleurs, les patients ont décrit la perception de phosphènes¹⁶ conséquemment à cette stimulation [63]. Ces auteurs ont également étudié les effets d'une neurostimulation ultrasonore sur le système somatosensoriel en ciblant la région cérébrale S1 ($f = 0,25$ MHz ; $DI = 1$ ms ; $FR = 0,5$ kHz ; $DS = 300$ ms ; schéma répété environ 200 fois, avec $IIS = 3$ s ; $I_{SPPA} = 3$ W/cm², atténuation du

¹⁴ Ici, l'IIS désigne l'intervalle de temps entre la fin d'un stimulus ultrasonore et le début du suivant, contrairement à la définition vue précédemment.

¹⁵ Temps de répétition du signal d'émission de l'IRM. TR = 2 s à 3T et TR = 0,6 s à 7T.

¹⁶ Sensations devant l'œil d'éclairs lumineux, bleutés ou blancs, mieux visibles la nuit et qui se répètent souvent au même endroit (définition extraite du Larousse médical).

crâne non comprise). Une telle stimulation a généré des sensations tactiles au niveau des mains controlatérales à la zone visée, avec une spécificité anatomique telle que les sensations ont pu être ressenties au niveau d'un seul doigt seulement [64]. Dans une autre étude, la même équipe a stimulé le cortex somatosensoriel primaire (S1) et secondaire (S2) de manière séparée ou simultanément ($f = 0,21$ MHz ; $DI = 1$ ms ; $FR = 0,5$ kHz ; $DS = 500$ ms ; schéma répété 20 fois, avec $IIS = 7$ s ; $I_{SPPA} = 35$ W/cm², atténuation du crâne non comprise), démontrant que cela induisait, chez les sujets testés, diverses sensations au niveau de la main telles que le chaud, le froid, des sensations de pression ou encore vibrotactiles. Les auteurs ont ainsi conclu que la neurostimulation ultrasonore, de par sa capacité à stimuler des zones spatialement restreintes, pourrait être utilisée pour des études neurofonctionnelles du cerveau [65].

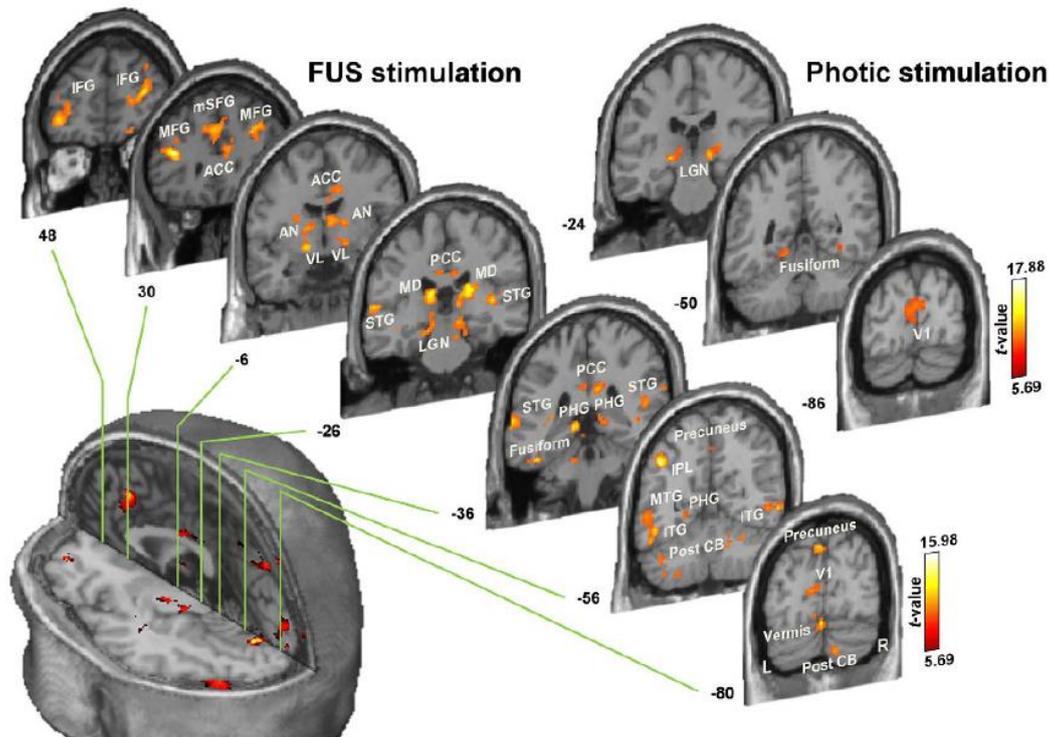


Figure 1.7 : Images d'IRM fonctionnelle montrant les zones cérébrales activées lors de la stimulation ultrasonore (images de gauche) ou photique (images de droite) du cortex visuel primaire (V1) humain. La signification des initiales est comme suit (en anglais) : L, left; R, right; IFG, inferior frontal gyrus; MFG, middle frontal gyrus; mSFG, medial superior frontal gyrus; ACC, anterior cingulate cortex; PCC, posterior cingulate cortex; AN, anterior nucleus of thalamus; VL, ventral lateral nucleus of thalamus; MD, mediodorsal nucleus of thalamus; LGN, lateral geniculate nucleus of thalamus; PHG, parahippocampal gyrus; STG, superior temporal gyrus; MTG, middle temporal gyrus; ITG, inferior temporal gyrus; IPL, inferior parietal lobule; Post CB, posterior lobe of cerebellum. Source : d'après Lee et al., 2016.

La neurostimulation ultrasonore est une technique qui a donc démontré, aussi bien chez l'animal que chez l'Homme, une très bonne résolution spatiale. En effet, elle permet de cibler de manière sélective la plupart des zones cérébrales, à l'ordre du millimètre chez le petit animal et du centimètre chez les gros animaux et l'humain. Chez ceux-ci, l'utilisation de basses fréquences (≤ 1 MHz) en raison de l'influence du crâne limite la résolution, mais l'apport des

techniques de correction d'aberrations pourrait permettre d'utiliser de plus grandes fréquences et, ainsi, améliorer cette résolution.

La neurostimulation ultrasonore s'affirme donc comme une modalité thérapeutique sérieuse et prometteuse. Par ailleurs, son association à des techniques d'imagerie du cerveau, idéalement en temps réel, pourrait lui apporter une grande plus-value et en faire une technique de choix.

IV. Innocuité

Dans ses recommandations pour l'usage d'ultrasons en imagerie, la FDA a fixé des valeurs seuils maximales pour la sécurité sanitaire de cette modalité, à savoir 190 W/cm^2 pour l' I_{SPPA} , 720 mW/cm^2 pour l' I_{SPTA} , 1,9 pour l'IM et 6 pour l'IT [9], [66]. Plus récemment, en 2017, la FDA a préconisé des valeurs de 190 W/cm^2 pour l' I_{SPPA} et de 94 mW/cm^2 pour l' I_{SPTA} lors de l'application thérapeutique des ultrasons au niveau du cerveau [20]. De plus, le standard 60601-2-5 de la Commission Electrotechnique Internationale (*IEC: International Electrotechnical Commission*, en anglais) suggère un seuil maximal de 3 W/cm^2 pour l'intensité acoustique effective¹⁷ [20], [66]. La société britannique des ultrasons médicaux (*British Medical Ultrasound Society*, en anglais) a également émis des directives concernant l'IT, qui doit être inférieur ou égal à 0,7 pour une utilisation des ultrasons non limitée dans le temps, ou inférieur à 3 pour une utilisation de moins d'une minute [9]. Enfin, l'IM doit être inférieur à 0,7 lorsque des agents de contraste sont utilisés, à cause du risque de cavitation existant à des valeurs d'IM plus élevées [9], [67].

Parmi les études réalisées sur la neurostimulation ultrasonore, plusieurs dépassent significativement certaines des valeurs indiquées ci-dessus, en particulier concernant l'IM et l' I_{SPTA} . En effet, dans une revue axée sur la sécurité sanitaire de la neurostimulation ultrasonore, Pasquinelli *et al.*, ont listé deux études qui dépassaient la valeur seuil d'IM fixée par la FDA, ainsi que quatorze études réalisées avec des I_{SPTA} au-delà de la limite préconisée par la même instance [68]. Malgré cela, peu d'effets indésirables conséquents à l'application de la neurostimulation ultrasonore ont été décrits. En effet, sur trente-trois études listées dans cette revue, seules deux ont mentionné la présence de microhémorragies, chez une partie des animaux (un rat dans l'étude de Kim *et al.*, 2014 ; 4 brebis sur 8 dans l'étude de Lee *et al.*, 2016). Dans les deux cas, les I_{SPTA} utilisées étaient largement supérieures à la valeur limite de la FDA ($11,2 \text{ W/cm}^2$ durant une courte période, et $\geq 3,3 \text{ W/cm}^2$ durant 500 impulsions ou plus, répétées toutes les secondes). Une autre étude a mentionné une ouverture de la barrière hémato-encéphalique, ainsi que des dommages neuronaux lorsque les paramètres utilisés étaient intentionnellement fixés à des valeurs supérieures aux valeurs limites [68]. Ainsi, le reste des études listées, au nombre de trente, n'ont décrit aucun effet indésirable à la suite de l'application de la neurostimulation ultrasonore, renforçant l'idée que cette

¹⁷ Rapport de la puissance acoustique totale émise et de l'aire d'émission (Duck *et al.*, 2007).

technique est sûre d'un point de vue sanitaire. Néanmoins, des études complémentaires sur cette innocuité restent requises pour en avoir confirmation [68].

D'autre part, chez l'humain, Stern *et al.*, ont réalisé une étude de l'innocuité de la neurostimulation ultrasonore chez des patients souffrant d'épilepsie du lobe temporal et devant subir une résection chirurgicale de cette région cérébrale. Ainsi, ils ont administré des ultrasons ($f = 0,65$ MHz ; $DI = 0,5$ ms / 2 ms ; $FR = 0,1$ kHz / 0,25 kHz ; $DS = 500$ ms / 30 s ; $DT = 4$ s / 1 min ; $I_{SPPA} = 0,5 - 115,2$ W/cm² *in situ* ; $I_{SPTA} = 250 - 5760$ mW/cm² *in situ*) au niveau de la partie antérieure du lobe temporal des sujets. L'analyse histologique réalisée n'a alors révélé aucune lésion chez sept des huit patients traités, tandis que les résultats relatifs au huitième patient ont démontré la présence de dommages cérébraux. Néanmoins, le lien de ces dommages avec le traitement ultrasonore n'a pas été clairement établi. En effet, des lésions au niveau de zones cérébrales non insonifiées, dues à la résection chirurgicale, ont également été observées chez ce même patient [37]. En outre, Spivak *et al.*, ont récemment mené une analyse histologique sur des cerveaux de patients épileptiques ayant subi une chirurgie ou de cadavres récents (décès remontant à moins de 24 h). Ils ont appliqué des ondes ultrasonores ($f = 0,65$ MHz ; $DI = 0,5/50$ ms ; $FR = 0,01/0,1$ kHz ; $DT = 1$ min ; mode pulsé ou continu ; $I_{SPTA} = 1159 - 78660$ mW/cm² *in situ*) sur les tissus cérébraux, et n'ont observé aucun dommage tissulaire ou mort cellulaire pour des intensités I_{SPTA} *in situ* inférieures ou égales à 11,8 W/cm². Néanmoins, les auteurs précisent que la durée entre l'insonification et la fixation des tissus était trop courte pour que l'apoptose des cellules ait lieu [69]. Enfin, dans une récente étude, Legon *et al.*, ont compilé les résultats de sept études cliniques sur la neurostimulation ultrasonore (I_{SPPA} allant de 11,56 à 17,12 W/cm²) et ont émis des observations qui corroborent ce qui a été dit précédemment. En effet, sur les 64 patients ayant répondu au questionnaire relatif aux symptômes, seuls 7 ont décrit des symptômes légers à modérés. Ceux-ci incluaient des douleurs au cou, des problèmes d'attention, des contractions musculaires ainsi que de l'anxiété. Ces symptômes ont été classés comme possiblement ou probablement liés au traitement ultrasonore. Par ailleurs, aucun patient n'a rapporté d'effets indésirables sévères [70].

En définitive, la neurostimulation ultrasonore a démontré son innocuité dans la plupart des travaux qui s'y sont intéressés. Néanmoins, cette technique étant relativement nouvelle, un certain flou demeure en ce qui concerne la réglementation qui l'entoure. En effet, les valeurs limites des différents paramètres influant sur cette innocuité ne sont pas encore arrêtés, et, à défaut, ce sont les valeurs seuils du domaine de l'imagerie ultrasonore qui sont utilisées [71]. Ces dernières peuvent vite se révéler inadaptées aux études sur la neurostimulation ultrasonore. Il devient donc nécessaire que les instances de pharmacovigilance statuent sur cet aspect, d'autant que les études sur le sujet sont de plus en plus nombreuses.

V. Applications

1. Etudes précliniques sur des modèles de pathologies cérébrales

Modèles d'épilepsie

Dans une démarche de preuve de concept, Hakimova *et al.*, ont cherché à déterminer le bénéfice thérapeutique de la neurostimulation ultrasonore pour le traitement de l'épilepsie du lobe temporal. Pour modéliser cette pathologie, ils ont injecté du kaïnate¹⁸ chez des souris, provoquant ainsi des crises convulsives suivies d'un état de *status epilepticus*¹⁹, dans les heures suivant l'injection. Puis une phase chronique de la pathologie survient plusieurs jours après l'injection. Elle se caractérise par des crises spontanées et récurrentes. Ainsi, ils ont observé que la neurostimulation ultrasonore ($f = 0,2$ MHz ; $DI = 1$ ms ; $FR = 0,5$ kHz ; $DS = 30$ s ; intensité utilisée non renseignée), appliquée à ces souris, inhibait les crises durant la période aiguë de la pathologie, retardait l'apparition du *status epilepticus* ou le supprimait complètement, et réduisait le nombre de crises durant la période chronique. Par ailleurs, durant cette dernière, les souris malades traitées avec des ultrasons démontraient des performances accrues dans les tests comportementaux évaluant la sociabilité et la dépression, comparativement aux souris non traitées [72]. De plus, Min *et al.*, ont observé, dans un modèle d'épilepsie aiguë chez le rat induit par une injection de pentylènetétrazole (PTZ), que la neurostimulation ultrasonore de régions thalamiques du cerveau ($f = 0,69$ MHz ; $DI = 0,5$ ms ; $FR = 0,1$ kHz ; $I_{SPTA} = 130$ mW/cm² ; deux doses d'ultrasons de durée 3 min chacune, séparées d'une durée de 10 min) pouvait induire une réduction ou une suppression de l'activité épileptique. En particulier, une diminution significative des signaux d'électroencéphalographie (EEG) épileptiques a été décrite après le traitement aux ultrasons, comparativement à l'état avant l'insonification. Aussi, les animaux traités par ultrasons ont montré un comportement épileptique significativement moins sévère que les non-traités [73].

Plus récemment, Chen *et al.*, ont obtenu des résultats comparables dans ce même modèle d'épilepsie. En particulier, ils ont réalisé une analyse immunohistochimique (c-Fos²⁰ et GAD65²¹), qui a démontré qu'une désactivation des cellules excitatrices et une activation des synapses GABAergiques avaient lieu, conséquemment à la neurostimulation ultrasonore. Par ailleurs, ils ont testé différents paramètres acoustiques lors de ce traitement ($f = 0,5$ MHz ; $RC = 8$ ou 30 % ; $FR = 0,1$ kHz ; $I_{SPTA} = 0,703$ - $2,812$ W/cm² ; $IM = 0,375$ - $0,75$; $DT = 100$ ou 600 s), mettant ainsi en évidence des valeurs optimales d'IM (0,75) et de durée totale d'exposition

¹⁸ Agoniste imitant l'effet du glutamate.

¹⁹ Crise épileptique prolongée (ou plusieurs crises sans temps de récupération entre-elles) durant 5 min ou plus.

²⁰ Protéine qui, lorsqu'elle est exprimée, indique la présence d'une activité neuronale.

²¹ *Glutamic Acid Decarboxylase*, en anglais : enzyme intervenant dans la synthèse du GABA (déf. : voir plus haut). Le nombre 65 indique le poids moléculaire, en kDa, de la protéine (pour la différencier de GAD67, une autre isoforme pesant 67 kDa).

(600 s). Ils ont également montré que le RC n'avait aucune influence sur l'efficacité du traitement [74].

D'autre part, Lin *et al.*, ont mené des travaux sur un modèle d'épilepsie chez le macaque, induit par injection de pénicilline. Les résultats ont montré que la neurostimulation ultrasonore ($f = 0,75$ MHz ; $DI = 300$ μ s ; $FR = 1$ kHz ; $DS = 200$ ms ; $IIS = 5$ s ; $DT = 30$ min ; $I_{SPPA} = 2,02$ W/cm²) appliquée au niveau du site d'injection de pénicilline (lobe frontal) réduisait significativement l'activité épileptique. En effet, lorsque les macaques étaient traités, ils démontraient, de manière significative, une activité neuronale moins intense et une plus faible fréquence de crises épileptiques ($9,6 \pm 1,5$ contre $15,6 \pm 1,2$ crises par heure, respectivement) que dans l'état non-traité. De plus, les crises rapportées étaient beaucoup moins nombreuses ($66,0 \pm 7,9$, contre $107,7 \pm 1,2$, respectivement, sur une période d'observation de 16 h) et duraient moins longtemps (40 s contre 70 s environ, respectivement) lorsque les animaux étaient traités [75]. Par ailleurs, Zou *et al.*, ont réalisé le même type d'étude sur des macaques rhésus et ils ont obtenu des résultats comparables [76].

Modèles de maladies neurodégénératives

La neurostimulation ultrasonore a également été testée sur des modèles de démence cérébrale et de la maladie d'Alzheimer. Par exemple, Lin *et al.*, ont mis en évidence un effet protecteur du traitement ultrasonore dans un modèle de la maladie d'Alzheimer chez le rat, induit par administration de chlorure d'aluminium (AlCl₃). Ainsi, en ciblant l'hippocampe avec des ultrasons ($f = 1$ MHz ; $DS = 50$ ms ; $IIS = 1$ s ; durée d'insonification de 5 min ; schéma répété trois fois à intervalles de 5 min, pour chaque hémisphère cérébral ; $I_{SPTA} = 528$ W/cm²) avant et pendant l'administration de AlCl₃ (1 et 6 semaines, respectivement), les auteurs ont observé des améliorations significatives au niveau du maintien de la mémoire des animaux [77].

De manière analogue et en utilisant des paramètres ultrasonores identiques, Huang *et al.*, ont rapporté des effets protecteurs de la neurostimulation ultrasonore dans un modèle de démence vasculaire chez le rat. En effet, en appliquant le traitement durant 14 jours, ils ont noté une protection contre les lésions cérébrales au niveau de l'hippocampe et du corps calleux des rats atteints de démence vasculaire [78].

Par ailleurs, Wang *et al.*, ont appliqué la neurostimulation ultrasonore sur un modèle de la maladie de Parkinson chez la souris, induit par injection de MPTP²². Ainsi, il a été rapporté que l'administration d'ultrasons au niveau du noyau sous-thalamique ($f = 0,5$ MHz ; $DI = 50$ μ s ; $FR = 1$ kHz ; $DS = 50$ ms ; $IIS = 1$ s ; $DT = 5$ min ; $I_{SPPA} = 5,1$ W/cm²) réduisait significativement l'activité cérébrale caractéristique de la maladie de Parkinson [79].

²² 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine : neurotoxine.

Modèles de dépression

Legrand *et al.*, ont étudié les effets de la neurostimulation ultrasonore sur un modèle murin de dépression, le modèle UCMS²³. Ils ont ainsi montré que l'application répétée d'une neurostimulation ultrasonore ($f = 0,5$ MHz ; DS = 160 ms ; IIS = 10 s ; DT = 10 min, soit 60 impulsions ultrasonores ; traitement répété durant 5 jours consécutifs) sur le cortex préfrontal réduisait les comportements anxieux des animaux. Le traitement ultrasonore a ainsi démontré de meilleurs résultats que le traitement à la fluoxétine²⁴ sur certains tests évaluant le bien-être ou l'anxiété. En outre, une activation de régions préfrontales du cerveau, observée par imagerie TEP, était accompagnée d'un changement du métabolome de ces régions et de régions distantes de la zone traitée (notamment l'hippocampe dorsal). Ainsi, les auteurs suggèrent que les effets de la neurostimulation pourraient s'être exercés à travers la connectivité des régions concernées, ce qui pourrait expliquer les effets thérapeutiques du traitement ultrasonore observés. En effet, la communication entre l'hippocampe et le cortex préfrontal est considérée comme étant cruciale dans le processus de la dépression majeure [80]. Par ailleurs, Zhang *et al.*, ont récemment mené une étude comparable sur un modèle de dépression chez le rat, également généré par un modèle de stress chronique imprédictible, mais avec un traitement plus long (4 semaines). Ils ont ainsi montré que l'application de la neurostimulation ultrasonore ($f = 0,8$ MHz ; DI = 0,2 ms ; FR = 0,2 kHz ; DS = 1 s ; IIS = 3 s ; DT = 20 min ; $I_{SPPA} = 3,84$ W/cm²) au niveau du cortex préfrontal ventromédian améliorait nettement le comportement dépressif des rongeurs [81].

Modèle de troubles de la conscience

Dans une récente étude (décrite précédemment à la section III-1), Bian *et al.*, ont étudié les effets de la neurostimulation ultrasonore sur les troubles de la conscience, modélisés par l'application d'une anesthésie profonde à des souris. Ainsi, il a été observé que le traitement aux ultrasons améliorait significativement l'état d'éveil et de conscience. En effet, les animaux traités démontraient une plus grande résistance à l'anesthésie (temps d'induction plus long et concentration à laquelle 50 % des animaux perdaient leur réflexe de redressement plus élevée), une capacité à recouvrer leurs réflexes durant l'anesthésie ainsi qu'un temps de réveil après anesthésie plus court [34].

2. Etudes cliniques

Quelques études pilotes ont eu pour objectif d'évaluer le potentiel thérapeutique de la neurostimulation ultrasonore chez l'Homme.

²³ *Unpredictable Chronic Mild Stress*, en anglais.

²⁴ Médicament antidépresseur.

Application chez des patients atteints d'épilepsie

Bystritsky *et al.*, ont initié une étude de faisabilité et d'innocuité de la neurostimulation ultrasonore chez des patients souffrant d'épilepsie du lobe temporal [82]. Dans la continuité de cette étude, Stern *et al.*, du même groupe de recherche, ont récemment publié des travaux sur le volet de l'innocuité (décrits précédemment dans la partie IV) [37]. En outre, Brinker *et al.*, ont développé une plateforme expérimentale permettant d'étudier la neurostimulation de l'hippocampe chez l'humain, en particulier dans le but de traiter l'épilepsie du lobe temporal. Cet appareillage se distingue notamment par l'usage d'un transducteur monoélément, couplé au crâne humain avec une poche d'eau, ce qui en fait un système relativement simple à mettre en place et utiliser. Le test du prototype, réalisé sur un seul patient ($f = 0,548$ MHz ; $DI = 0,72 - 1$ ms ; $FR = 0,5$ kHz ; $DS = 0,5$ s ; $IIS = 7$ s ; $DT = 140$ s ; $I_{SPPA} \leq 2,25$ W/cm² dans l'eau ; traitement répété deux fois par semaines durant trois semaines), n'a pas révélé d'effets indésirables. Concernant l'effet thérapeutique de la technique, les auteurs précisent qu'une étude à ce sujet, utilisant la même plateforme expérimentale, est en cours [83].

Application aux maladies neurodégénératives

En ce qui concerne la maladie d'Alzheimer, Beisteiner *et al.*, ont récemment réalisé un essai clinique en utilisant une méthode originale. En effet, contrairement à la majorité, ces auteurs ont choisi de travailler avec des impulsions ultracourtes, de durée 3 μ s, composées d'un seul pic d'amplitude (et non d'une sinusoïde avec plusieurs cycles). Le choix de ces impulsions ultracourtes était motivé par la volonté des auteurs de limiter au maximum les effets secondaires potentiels des ultrasons, à savoir l'augmentation de la température des tissus ciblés ainsi que l'apparition de maxima locaux d'intensité en dehors de la zone ciblée (favorisée par l'utilisation de trains d'ondes longs). L'étude a été menée sur deux groupes de sujets (35 patients au total), chaque groupe étant traité d'une manière différente. En effet, chez le premier groupe, le cortex préfrontal dorsolatéral (région d'intérêt habituellement traitée par stimulation pour la maladie d'Alzheimer), des zones cérébrales liées à la mémoire ainsi que des réseaux du langage ont été ciblés par le traitement ultrasonore, qui consistait à délivrer 400 à 800 impulsions ultracourtes à une fréquence de 5 Hz (soit toutes les 200 ms durant 80 à 160 s ; 6000 impulsions au total). Ce traitement a été répété deux fois par session (sur chaque région d'intérêt de chaque hémisphère cérébral), à raison de trois sessions par semaine durant deux à quatre semaines. L'autre groupe de sujets, en revanche, a été traité à l'aide de 6000 impulsions délivrées à une fréquence de 5 Hz (soit toutes les 200 ms durant 20 min ; durée de traitement de deux semaines), et réparties sur la totalité des régions cérébrales accessibles, au lieu de régions d'intérêt particulières (la sonde était déplacée sur la totalité du scalp du crâne). Ainsi, il a été observé une amélioration significative des scores neuropsychologiques (évaluant l'état cognitif, la mémoire ou encore le traitement verbal, entre autres) durant une période allant jusqu'à trois mois après le traitement. Par ailleurs,

cette amélioration était corrélée avec une régulation positive du réseau de la mémoire, mise en évidence par IRM fonctionnelle. Enfin, les auteurs ont décrit une baisse du score évaluant la performance du traitement visuospatial chez le premier groupe de patients, sachant que ce dernier n'avait pas été traité au niveau du cortex pariéto-occipital, une zone impliquée de manière importante dans le traitement visuospatial. Ce résultat démontre donc une spécificité du traitement ultrasonore, puisque les effets thérapeutiques étaient visibles sur les seules régions traitées [84].

D'autre part, Nicodemus *et al.*, ont étudié le bénéfice de la neurostimulation ultrasonore chez des patients souffrant des maladies d'Alzheimer (n = 11) ou de Parkinson (n = 11). Le traitement a consisté à cibler l'hippocampe ou la substance noire, respectivement, à l'aide d'ultrasons (f = 2 MHz ; I = 520 mW/cm²), durant 1 h une fois par semaine, et durant huit semaines consécutives. Les résultats ont démontré, chez 62,5 % des patients, une amélioration d'au moins un score parmi ceux utilisés pour évaluer les capacités cognitives. De même, les scores évaluant les capacités motrices ont montré une stabilisation ou une amélioration chez 87 % des patients [85].

Application à la dépression et à l'anxiété

Reznik *et al.*, ont entrepris une étude pilote sur l'application de la neurostimulation ultrasonore chez des malades atteints de dépression. Ils ont ainsi administré un traitement ultrasonore (f = 0,5 MHz ; DT = 30 s ; I_{SPPA} = 14 W/cm² ; I_{SPTA} = 71 mW/cm² ; IM = 0,9 ; IT = 6.0 ; traitement répété sur cinq jours) ou un placebo à un panel de 24 patients. Les résultats n'ont pas montré d'amélioration significative des scores de dépression. Néanmoins, les différents tests réalisés ont révélé que les patients traités démontraient moins d'inquiétude et plus de joie par rapport aux patients ayant reçu un placebo. Par ailleurs, les auteurs ont souligné le fait que, par précaution, ils ont utilisé des niveaux d'intensité relativement faibles dans cette étude. Ainsi, ces faibles valeurs d'intensité ont pu influencer les résultats, et l'utilisation d'intensités plus élevées pourrait améliorer les résultats [86].

D'autre part, Mahdavi *et al.*, ont réalisé une étude pilote traitant des effets de la neurostimulation ultrasonore sur le trouble anxieux généralisé pharmaco-résistant. A cet effet, ils ont ciblé, à l'aide d'ultrasons administrés durant 10 min²⁵, de manière hebdomadaire et durant huit semaines consécutives, l'amygdale droite de huit patients atteints de ce trouble. Ils ont ainsi observé une amélioration notable des symptômes de l'anxiété et de la dépression chez ces patients [87].

²⁵ Les autres paramètres ultrasonores n'ont pas été indiqués par les auteurs.

Application aux troubles de la conscience

Monti *et al.*, ont réalisé une étude de cas sur un patient souffrant de contusions cérébrales, à la suite d'un accident de voiture, qui lui causaient des troubles de la conscience. Dix trains d'impulsions ultrasonores ($f = 0,65$ MHz ; $DI = 0,5$ ms ; $FR = 0,1$ kHz ; $DS = 30$ s ; $IIS = 60$ s ; $I_{SPTA} \approx 720$ mW/cm²) lui ont été délivrées sur une seule séance, au niveau du thalamus. Vingt-quatre heures après la stimulation ultrasonore, le score du patient sur l'échelle CRS-R²⁶ s'est amélioré, passant de 14 à 17. Dans les jours qui ont suivi le traitement, le patient a progressivement retrouvé l'usage de la parole et sa motricité. Néanmoins, les auteurs précisent qu'étant donnée l'absence de sujets contrôles dans cette étude, il est impossible de s'assurer que les améliorations observées sont bien dues à la neurostimulation ultrasonore [88]. Récemment, Cain *et al.*, du même groupe de recherche, ont abondé dans le même sens. En effet, les auteurs ont appliqué des ultrasons ($f = 0,65$ MHz ; $DI = 0,5$ ms ; $FR = 0,1$ kHz ; $DS = 30$ s ; $IIS = 60$ s ; $DT = 10$ min ; $I_{SPPA} = 14,39$ W/cm² *in situ* ; traitement appliqué deux fois à une semaine d'intervalle) au niveau du thalamus de patients atteints de troubles de la conscience. Chez deux des trois patients traités, les scores de l'échelle CRS-R ont révélé une amélioration significative de leur réactivité comparativement à leur état basal, *i.e.*, avant le traitement. Un de ces deux patients ayant montré des signes d'amélioration a régressé vers son état basal, mais seulement trois à six mois après le traitement [89].

Applications relatives à la douleur et à l'humeur

Hameroff *et al.*, ont appliqué à l'aide d'une sonde ultrasonore clinique des ondes non focalisées ($f = 8$ MHz ; $I_{SPTA} = 152$ mW/cm² ; $DS = 15$ s) sur le cortex préfrontal postérieur de patients souffrant de douleurs chroniques. Une nette amélioration de l'humeur des patients a été observée jusqu'à 40 min après la neurostimulation. De plus, les auteurs ont décrit une amélioration non significative des scores de douleur [23]. Sanguinetti *et al.*, ont également rapporté, dans une étude plus récente, des effets positifs de la neurostimulation ultrasonore sur l'humeur. En effet, ils ont appliqué des ondes ultrasonores ($f = 0,5$ MHz ; $DI = 65$ μ s / 125 μ s ; $PRF = 40$ Hz ; $DS = 30$ s / 2 min ; $I_{SPPA} \leq 16,2$ W/cm² *in situ*) sur le gyrus frontal inférieur droit de sujets sains et ont noté une amélioration significative de l'humeur comparativement à un état basal, *i.e.*, avant la stimulation. Par ailleurs, ils ont observé, à l'aide de l'IRM fonctionnelle, une modulation des réseaux cérébraux liés à la zone stimulée et impliqués dans la régulation de l'humeur. Les effets de cette modulation pouvaient durer jusqu'à 20 min après l'insonification [90].

²⁶ *Coma Recovery Scale-Revised*, en anglais : Echelle servant à évaluer l'état de récupération d'un patient ayant subi un coma (évaluation de l'éveil, des fonctions visuelle, auditive et verbale, de la communication et de la motricité). Source : <https://www.coma.uliege.be/wp-content/uploads/2020/10/crsr-fr.pdf>.

VI. Conclusions

La neurostimulation ultrasonore s'avère donc être une modalité thérapeutique prometteuse. En effet, sa très bonne résolution spatiale en fait une technique fiable. Cette fiabilité est d'autant plus grande lorsque la technique est accompagnée de méthodes de correction des aberrations dues au crâne, dans le cas de son application à l'humain ou aux grands animaux. D'un point de vue sanitaire, de nombreux travaux ont démontré son innocuité, bien que des investigations supplémentaires soient requises à ce sujet. D'autant que les valeurs limites des paramètres ultrasonores utilisés, permettant une utilisation sûre de la technique, ne sont pas encore définies par les instances de pharmacovigilance. D'un point de vue de l'efficacité de cette technique, les valeurs de paramètres ultrasonores utilisées dans les différentes études ne font, pour l'instant, pas l'objet d'un consensus. Néanmoins, les nombreux travaux sur le sujet participent, petit à petit, à éclaircir cet aspect et à aider à mieux choisir ces valeurs. Par ailleurs, il a été mis en évidence que cette efficacité de la technique pouvait également être influencée par d'autres éléments, comme l'anesthésie appliquée durant les expériences. En effet, il a été observé qu'un effet plus marqué de l'anesthésie diminuait sensiblement l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore.

D'autre part, en ce qui concerne la compréhension des mécanismes qui sous-tendent le fonctionnement de la neurostimulation ultrasonore, des avancées notables ont été réalisées. Ainsi, il a été mis en évidence que, de manière générale et au vu des valeurs de paramètres acoustiques utilisées, ce sont les effets mécaniques des ondes ultrasonores qui prédominent. En effet, les effets thermiques de ces ondes ne semblent intervenir que de manière résiduelle, ou alors de manière importante lorsque les paramètres acoustiques utilisés permettent une élévation de température d'au moins 1 à 2 °C au sein de la région ciblée. Par ailleurs, les différentes théories avancées expliquent que les effets mécaniques s'appliquent au niveau du cytosquelette, de la membrane plasmique, des canaux ioniques des neurones et/ou des synapses, à travers la cavitation et/ou la force de radiation acoustique. Ces effets sont, pour la plupart, à l'origine d'une modification de la distribution des charges électriques en présence, générant ainsi des potentiels d'action qui modulent, de manière excitatrice ou inhibitrice, l'activité neuronale.

Enfin, la neurostimulation ultrasonore a été testée pour le traitement de différentes pathologies cérébrales. Des études précliniques sur des modèles de pathologies neuropsychiatriques, neurologiques et neurodégénératives ont donné des résultats prometteurs. Les études cliniques, menées sur les mêmes pathologies, ont également démontré des résultats encourageants. De plus, chez l'humain, des effets positifs de la neurostimulation ultrasonore sur l'humeur et la douleur ont été observés. Cette technique démontre ainsi un gros potentiel thérapeutique mais nécessite encore, pour l'instant, d'être mise au point pour une utilisation sûre et efficace.

Références bibliographiques

- [1] F. J. Fry, H. W. Ades, et W. J. Fry, « Production of Reversible Changes in the Central Nervous System by Ultrasound », *Science*, vol. 127, n° 3289, p. 83-84, janv. 1958, doi: 10.1126/science.127.3289.83.
- [2] L. R. Gavrilov, G. V. Gersuni, O. B. Ilyinski, E. M. Tsurulnikov, et E. E. Shchekanov, « A study of reception with the use of focused ultrasound. I. Effects on the skin and deep receptor structures in man », *Brain Res.*, vol. 135, n° 2, p. 265-277, oct. 1977, doi: 10.1016/0006-8993(77)91030-7.
- [3] L. R. Gavrilov, « Use of focused ultrasound for stimulation of nerve structures », *Ultrasonics*, vol. 22, n° 3, p. 132-138, mai 1984, doi: 10.1016/0041-624x(84)90008-8.
- [4] S.-S. Yoo *et al.*, « Focused ultrasound modulates region-specific brain activity », *NeuroImage*, vol. 56, n° 3, p. 1267-1275, juin 2011, doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.02.058.
- [5] R. L. King, J. R. Brown, W. T. Newsome, et K. B. Pauly, « Effective Parameters for Ultrasound-Induced In Vivo Neurostimulation », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 39, n° 2, p. 312-331, févr. 2013, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.09.009.
- [6] P. P. Ye, J. R. Brown, et K. B. Pauly, « Frequency Dependence of Ultrasound Neurostimulation in the Mouse Brain », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 42, n° 7, p. 1512-1530, juill. 2016, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.02.012.
- [7] M. D. Menz *et al.*, « Radiation Force as a Physical Mechanism for Ultrasonic Neurostimulation of the *Ex Vivo* Retina », *J. Neurosci.*, vol. 39, n° 32, p. 6251-6264, août 2019, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2394-18.2019.
- [8] P. Cesare, A. Moriondo, V. Vellani, et P. A. McNaughton, « Ion channels gated by heat », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, n° 14, p. 7658-7663, juill. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.14.7658.
- [9] J. Blackmore, S. Shrivastava, J. Sallet, C. R. Butler, et R. O. Cleveland, « Ultrasound Neuromodulation: A Review of Results, Mechanisms and Safety », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 45, n° 7, p. 1509-1536, juill. 2019, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.015.
- [10] D. P. Darrow, P. O'Brien, T. J. Richner, T. I. Netoff, et E. S. Ebbini, « Reversible neuroinhibition by focused ultrasound is mediated by a thermal mechanism », *Brain Stimulat.*, vol. 12, n° 6, p. 1439-1447, nov. 2019, doi: 10.1016/j.brs.2019.07.015.
- [11] M. L. Prieto, K. Firouzi, B. T. Khuri-Yakub, D. V. Madison, et M. Maduke, « Spike frequency-dependent inhibition and excitation of neural activity by high-frequency ultrasound », *J. Gen. Physiol.*, vol. 152, n° 11, p. e202012672, nov. 2020, doi: 10.1085/jgp.202012672.
- [12] H. Baek *et al.*, « Mechanical and mechanothermal effects of focused ultrasound elicited distinct electromyographic responses in mice », *Phys. Med. Biol.*, vol. 66, n° 13, p. 135005, juill. 2021, doi: 10.1088/1361-6560/ac08b1.

- [13] H. Kim, A. Chiu, S. D. Lee, K. Fischer, et S.-S. Yoo, « Focused Ultrasound-mediated Non-invasive Brain Stimulation: Examination of Sonication Parameters », *Brain Stimulat.*, vol. 7, n° 5, p. 748-756, sept. 2014, doi: 10.1016/j.brs.2014.06.011.
- [14] C. Constans, P. Mateo, M. Tanter, et J.-F. Aubry, « Potential impact of thermal effects during ultrasonic neurostimulation: retrospective numerical estimation of temperature elevation in seven rodent setups », *Phys. Med. Biol.*, vol. 63, n° 2, p. 025003, janv. 2018, doi: 10.1088/1361-6560/aaa15c.
- [15] J. K. Mueller, L. Ai, P. Bansal, et W. Legon, « Computational exploration of wave propagation and heating from transcranial focused ultrasound for neuromodulation », *J. Neural Eng.*, vol. 13, n° 5, p. 056002, oct. 2016, doi: 10.1088/1741-2560/13/5/056002.
- [16] A. Jerusalem *et al.*, « Electrophysiological-mechanical coupling in the neuronal membrane and its role in ultrasound neuromodulation and general anaesthesia », *Acta Biomater.*, vol. 97, p. 116-140, oct. 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2019.07.041.
- [17] B. Krasovitski, V. Frenkel, S. Shoham, et E. Kimmel, « Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 8, p. 3258-3263, févr. 2011, doi: 10.1073/pnas.1015771108.
- [18] H. A. S. Kamimura, A. Conti, N. Toschi, et E. E. Konofagou, « Ultrasound Neuromodulation: Mechanisms and the Potential of Multimodal Stimulation for Neuronal Function Assessment », *Front. Phys.*, vol. 8, p. 150, mai 2020, doi: 10.3389/fphy.2020.00150.
- [19] M. Plaksin, E. Kimmel, et S. Shoham, « Cell-Type-Selective Effects of Intramembrane Cavitation as a Unifying Theoretical Framework for Ultrasonic Neuromodulation », *eneuro*, vol. 3, n° 3, p. ENEURO.0136-15.2016, mai 2016, doi: 10.1523/ENEURO.0136-15.2016.
- [20] A. Fomenko, C. Neudorfer, R. F. Dallapiazza, S. K. Kalia, et A. M. Lozano, « Low-intensity ultrasound neuromodulation: An overview of mechanisms and emerging human applications », *Brain Stimulat.*, vol. 11, n° 6, p. 1209-1217, nov. 2018, doi: 10.1016/j.brs.2018.08.013.
- [21] W. J. Tyler, Y. Tufail, M. Finsterwald, M. L. Tauchmann, E. J. Olson, et C. Majestic, « Remote Excitation of Neuronal Circuits Using Low- Intensity, Low-Frequency Ultrasound », *PLoS ONE*, vol. 3, n° 10, p. 11, 2008.
- [22] Q. Xian, Z. Qiu, S. Kala, K. F. Wong, J. Guo, et L. Sun, « Behavioral and Functional Assessment of Ultrasound Neuromodulation on *Caenorhabditis Elegans* », *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 68, n° 6, p. 2150-2154, juin 2021, doi: 10.1109/TUFFC.2021.3057873.
- [23] S. Hameroff *et al.*, « Transcranial Ultrasound (TUS) Effects on Mental States: A Pilot Study », *Brain Stimulat.*, vol. 6, n° 3, p. 409-415, mai 2013, doi: 10.1016/j.brs.2012.05.002.
- [24] B.-K. Min *et al.*, « Focused ultrasound modulates the level of cortical neurotransmitters: Potential as a new functional brain mapping technique », *Int. J. Imaging Syst. Technol.*, vol. 21, n° 2, p. 232-240, juin 2011, doi: 10.1002/ima.20284.

- [25] P. S. Yang *et al.*, « Transcranial Focused Ultrasound to the Thalamus Is Associated with Reduced Extracellular GABA Levels in Rats », *Neuropsychobiology*, vol. 65, n° 3, p. 153-160, 2012, doi: 10.1159/000336001.
- [26] T. Sato, M. G. Shapiro, et D. Y. Tsao, « Ultrasonic Neuromodulation Causes Widespread Cortical Activation via an Indirect Auditory Mechanism », *Neuron*, vol. 98, n° 5, p. 1031-1041.e5, juin 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.009.
- [27] H. Guo *et al.*, « Ultrasound Produces Extensive Brain Activation via a Cochlear Pathway », *Neuron*, vol. 98, n° 5, p. 1020-1030.e4, juin 2018, doi: 10.1016/j.neuron.2018.04.036.
- [28] V. Braun, J. Blackmore, R. O. Cleveland, et C. R. Butler, « Transcranial ultrasound stimulation in humans is associated with an auditory confound that can be effectively masked », *Brain Stimulat.*, vol. 13, n° 6, p. 1527-1534, nov. 2020, doi: 10.1016/j.brs.2020.08.014.
- [29] M. Mohammadjavad, P. P. Ye, A. Xia, J. Brown, G. Popelka, et K. B. Pauly, « Elimination of peripheral auditory pathway activation does not affect motor responses from ultrasound neuromodulation », *Brain Stimulat.*, vol. 12, n° 4, p. 901-910, juill. 2019, doi: 10.1016/j.brs.2019.03.005.
- [30] Y. Yang *et al.*, « Sonothermogenetics for noninvasive and cell-type specific deep brain neuromodulation », *Brain Stimulat.*, vol. 14, n° 4, p. 790-800, juill. 2021, doi: 10.1016/j.brs.2021.04.021.
- [31] M. N. Collins, W. Legon, et K. A. Mesce, « The Inhibitory Thermal Effects of Focused Ultrasound on an Identified, Single Motoneuron », *eneuro*, vol. 8, n° 2, p. ENEURO.0514-20.2021, mars 2021, doi: 10.1523/ENEURO.0514-20.2021.
- [32] Y. Younan, T. Deffieux, B. Larrat, M. Fink, M. Tanter, et J.-F. Aubry, « Influence of the pressure field distribution in transcranial ultrasonic neurostimulation: Influence of pressure distribution in transcranial ultrasonic neurostimulation », *Med. Phys.*, vol. 40, n° 8, p. 082902, juill. 2013, doi: 10.1118/1.4812423.
- [33] S.-S. Yoo, H. Kim, B.-K. Min, E. Franck, et S. Park, « Transcranial focused ultrasound to the thalamus alters anesthesia time in rats », *NeuroReport*, vol. 22, n° 15, p. 783-787, oct. 2011, doi: 10.1097/WNR.0b013e32834b2957.
- [34] T. Bian *et al.*, « Noninvasive Ultrasound Stimulation of Ventral Tegmental Area Induces Reanimation from General Anaesthesia in Mice », *Research*, vol. 2021, p. 1-13, avr. 2021, doi: 10.34133/2021/2674692.
- [35] W. Lee *et al.*, « Image-Guided Focused Ultrasound-Mediated Regional Brain Stimulation in Sheep », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 42, n° 2, p. 459-470, févr. 2016, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2015.10.001.
- [36] G.-F. Li *et al.*, « Improved Anatomical Specificity of Non-invasive Neuro-stimulation by High Frequency (5 MHz) Ultrasound », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 1, p. 24738, juill. 2016, doi: 10.1038/srep24738.
- [37] J. M. Stern, « Safety of focused ultrasound neuromodulation in humans with temporal lobe epilepsy », *Brain Stimulat.*, p. 10, 2021.

- [38] H.-B. Kim *et al.*, « Prolonged stimulation with low-intensity ultrasound induces delayed increases in spontaneous hippocampal culture spiking activity: Low-Intensity Ultrasound and Hippocampal Culture Spiking », *J. Neurosci. Res.*, vol. 95, n° 3, p. 885-896, mars 2017, doi: 10.1002/jnr.23845.
- [39] M. D. Menz, O. Oralkan, P. T. Khuri-Yakub, et S. A. Baccus, « Precise Neural Stimulation in the Retina Using Focused Ultrasound », *J. Neurosci.*, vol. 33, n° 10, p. 4550-4560, mars 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3521-12.2013.
- [40] Y. Tufail *et al.*, « Transcranial Pulsed Ultrasound Stimulates Intact Brain Circuits », *Neuron*, vol. 66, p. 681-694, juin 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.008.
- [41] H. Kim, M. Y. Park, S. D. Lee, W. Lee, A. Chiu, et S.-S. Yoo, « Suppression of EEG visual-evoked potentials in rats through neuromodulatory focused ultrasound », *NeuroReport*, vol. 26, n° 4, p. 211-215, mars 2015, doi: 10.1097/WNR.0000000000000330.
- [42] G. Lu *et al.*, « Transcranial Focused Ultrasound for Noninvasive Neuromodulation of the Visual Cortex », *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 68, n° 1, p. 21-28, janv. 2021, doi: 10.1109/TUFFC.2020.3005670.
- [43] D. Daniels *et al.*, « Focused Ultrasound-Induced Suppression of Auditory Evoked Potentials in Vivo », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 44, n° 5, p. 1022-1030, mai 2018, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.01.010.
- [44] K. Yoon *et al.*, « Effects of sonication parameters on transcranial focused ultrasound brain stimulation in an ovine model », *PLOS ONE*, vol. 14, n° 10, p. e0224311, oct. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0224311.
- [45] H. A. S. Kamimura *et al.*, « Focused ultrasound neuromodulation of cortical and subcortical brain structures using 1.9 MHz: FUS neuromodulation of cortical/subcortical brain structures », *Med. Phys.*, vol. 43, n° 10, p. 5730-5735, sept. 2016, doi: 10.1118/1.4963208.
- [46] R. L. King, J. R. Brown, et K. B. Pauly, « Localization of Ultrasound-Induced In Vivo Neurostimulation in the Mouse Model », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 40, n° 7, p. 1512-1522, juill. 2014, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2014.01.020.
- [47] E. Mehić, J. M. Xu, C. J. Caler, N. K. Coulson, C. T. Moritz, et P. D. Mourad, « Increased Anatomical Specificity of Neuromodulation via Modulated Focused Ultrasound », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 2, p. e86939, févr. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0086939.
- [48] C. Aurup, H. A. S. Kamimura, et E. E. Konofagou, « High-Resolution Focused Ultrasound Neuromodulation Induces Limb-Specific Motor Responses in Mice in Vivo », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 47, n° 4, p. 998-1013, avr. 2021, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.12.013.
- [49] S. Kim *et al.*, « Transcranial focused ultrasound stimulation with high spatial resolution », *Brain Stimulat.*, vol. 14, n° 2, p. 290-300, mars 2021, doi: 10.1016/j.brs.2021.01.002.
- [50] K. Yu, A. Sohrabpour, et B. He, « Electrophysiological Source Imaging of Brain Networks Perturbed by Low-Intensity Transcranial Focused Ultrasound », *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 63, n° 9, p. 1787-1794, sept. 2016, doi: 10.1109/TBME.2016.2591924.

- [51] B. Burle, L. Spieser, C. Roger, L. Casini, T. Hasbroucq, et F. Vidal, « Spatial and temporal resolutions of EEG: Is it really black and white? A scalp current density view », *Int. J. Psychophysiol.*, vol. 97, n° 3, p. 210-220, sept. 2015, doi: 10.1016/j.ijpsycho.2015.05.004.
- [52] F. Darvas, E. Mehić, C. J. Caler, J. G. Ojemann, et P. D. Mourad, « Toward Deep Brain Monitoring with Superficial EEG Sensors Plus Neuromodulatory Focused Ultrasound », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 42, n° 8, p. 1834-1847, août 2016, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.02.020.
- [53] R. F. Dallapiazza *et al.*, « Noninvasive neuromodulation and thalamic mapping with low-intensity focused ultrasound », *J. Neurosurg.*, vol. 128, n° 3, p. 875-884, mars 2018, doi: 10.3171/2016.11.JNS16976.
- [54] T. Deffieux, Y. Younan, N. Wattiez, M. Tanter, P. Pouget, et J.-F. Aubry, « Low-Intensity Focused Ultrasound Modulates Monkey Visuomotor Behavior », *Curr. Biol.*, vol. 23, n° 23, p. 2430-2433, déc. 2013, doi: 10.1016/j.cub.2013.10.029.
- [55] N. Wattiez *et al.*, « Transcranial ultrasonic stimulation modulates single-neuron discharge in macaques performing an antisaccade task », *Brain Stimulat.*, vol. 10, n° 6, p. 1024-1031, nov. 2017, doi: 10.1016/j.brs.2017.07.007.
- [56] J. Kubanek, J. Brown, P. Ye, K. B. Pauly, T. Moore, et W. Newsome, « Remote, brain region-specific control of choice behavior with ultrasonic waves », *Sci. Adv.*, vol. 6, n° 21, p. eaaz4193, mai 2020, doi: 10.1126/sciadv.aaz4193.
- [57] M. E. Downs *et al.*, « Toward a Cognitive Neural Prosthesis Using Focused Ultrasound », *Front. Neurosci.*, vol. 11, p. 607, nov. 2017, doi: 10.3389/fnins.2017.00607.
- [58] P.-F. Yang *et al.*, « Neuromodulation of sensory networks in monkey brain by focused ultrasound with MRI guidance and detection », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 7993, déc. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-26287-7.
- [59] W. Legon *et al.*, « Transcranial focused ultrasound modulates the activity of primary somatosensory cortex in humans », *Nat. Neurosci.*, vol. 17, n° 2, p. 322-329, févr. 2014, doi: 10.1038/nn.3620.
- [60] W. Legon, L. Ai, P. Bansal, et J. K. Mueller, « Neuromodulation with single-element transcranial focused ultrasound in human thalamus », *Hum. Brain Mapp.*, vol. 39, n° 5, p. 1995-2006, mai 2018, doi: 10.1002/hbm.23981.
- [61] W. Legon, P. Bansal, R. Tyshynsky, L. Ai, et J. K. Mueller, « Transcranial focused ultrasound neuromodulation of the human primary motor cortex », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 10007, déc. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-28320-1.
- [62] L. Ai, J. K. Mueller, A. Grant, Y. Eryaman, et W. Legon, « Transcranial focused ultrasound for BOLD fMRI signal modulation in humans », in *2016 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, Orlando, FL, USA, août 2016, p. 1758-1761. doi: 10.1109/EMBC.2016.7591057.
- [63] W. Lee *et al.*, « Transcranial focused ultrasound stimulation of human primary visual cortex », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 1, p. 34026, sept. 2016, doi: 10.1038/srep34026.

- [64] W. Lee, H. Kim, Y. Jung, I.-U. Song, Y. A. Chung, et S.-S. Yoo, « Image-Guided Transcranial Focused Ultrasound Stimulates Human Primary Somatosensory Cortex », *Sci. Rep.*, vol. 5, n° 1, p. 8743, août 2015, doi: 10.1038/srep08743.
- [65] W. Lee, Y. A. Chung, Y. Jung, I.-U. Song, et S.-S. Yoo, « Simultaneous acoustic stimulation of human primary and secondary somatosensory cortices using transcranial focused ultrasound », *BMC Neurosci.*, vol. 17, n° 1, p. 68, déc. 2016, doi: 10.1186/s12868-016-0303-6.
- [66] F. A. Duck, « Medical and non-medical protection standards for ultrasound and infrasound », *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 93, n° 1-3, p. 176-191, janv. 2007, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.008.
- [67] R. E. Apfel et C. K. Holland, « Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 17, n° 2, p. 179-185, janv. 1991, doi: 10.1016/0301-5629(91)90125-G.
- [68] C. Pasquinelli, L. G. Hanson, H. R. Siebner, H. J. Lee, et A. Thielscher, « Safety of transcranial focused ultrasound stimulation: A systematic review of the state of knowledge from both human and animal studies », *Brain Stimulat.*, vol. 12, n° 6, p. 1367-1380, nov. 2019, doi: 10.1016/j.brs.2019.07.024.
- [69] N. M. Spivak *et al.*, « Histological examination of focused ultrasound effects on human brain tissue », *Brain Stimulat.*, vol. 14, n° 6, p. 1486-1488, nov. 2021, doi: 10.1016/j.brs.2021.09.015.
- [70] W. Legon *et al.*, « A retrospective qualitative report of symptoms and safety from transcranial focused ultrasound for neuromodulation in humans », *Sci. Rep.*, vol. 10, n° 1, p. 5573, déc. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-62265-8.
- [71] G. Darmani *et al.*, « Non-invasive transcranial ultrasound stimulation for neuromodulation », *Clin. Neurophysiol.*, vol. 135, p. 51-73, mars 2022, doi: 10.1016/j.clinph.2021.12.010.
- [72] H. Hakimova, S. Kim, K. Chu, S. K. Lee, B. Jeong, et D. Jeon, « Ultrasound stimulation inhibits recurrent seizures and improves behavioral outcome in an experimental model of mesial temporal lobe epilepsy », *Epilepsy Behav.*, vol. 49, p. 26-32, août 2015, doi: 10.1016/j.yebeh.2015.04.008.
- [73] B.-K. Min *et al.*, « Focused ultrasound-mediated suppression of chemically-induced acute epileptic EEG activity », *BMC Neurosci.*, vol. 12, n° 1, p. 23, 2011, doi: 10.1186/1471-2202-12-23.
- [74] S.-G. Chen *et al.*, « Transcranial focused ultrasound pulsation suppresses pentylentetrazol induced epilepsy in vivo », *Brain Stimulat.*, vol. 13, n° 1, p. 35-46, janv. 2020, doi: 10.1016/j.brs.2019.09.011.
- [75] Z. Lin *et al.*, « Non-invasive ultrasonic neuromodulation of neuronal excitability for treatment of epilepsy », *Theranostics*, vol. 10, n° 12, p. 5514-5526, 2020, doi: 10.7150/thno.40520.
- [76] J. Zou *et al.*, « Ultrasound Neuromodulation Inhibits Seizures in Acute Epileptic Monkeys », *iScience*, vol. 23, n° 5, p. 101066, mai 2020, doi: 10.1016/j.isci.2020.101066.

- [77] W.-T. Lin, R.-C. Chen, W.-W. Lu, S.-H. Liu, et F.-Y. Yang, « Protective effects of low-intensity pulsed ultrasound on aluminum-induced cerebral damage in Alzheimer's disease rat model », *Sci. Rep.*, vol. 5, n° 1, p. 9671, sept. 2015, doi: 10.1038/srep09671.
- [78] S.-L. Huang, C.-W. Chang, Y.-H. Lee, et F.-Y. Yang, « Protective Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Memory Impairment and Brain Damage in a Rat Model of Vascular Dementia », *Radiology*, vol. 282, n° 1, p. 113-122, janv. 2017, doi: 10.1148/radiol.2016160095.
- [79] Z. Wang, J. Yan, X. Wang, Y. Yuan, et X. Li, « Transcranial Ultrasound Stimulation Directly Influences the Cortical Excitability of the Motor Cortex in Parkinsonian Mice », *Mov. Disord.*, vol. 35, n° 4, p. 693-698, avr. 2020, doi: 10.1002/mds.27952.
- [80] M. Legrand *et al.*, « Efficacy of chronic ultrasound neurostimulation on behaviors and distributed brain metabolism in depressive-like mice », *BioRxiv*, oct. 2019, doi: 10.1101/813006.
- [81] J. Zhang *et al.*, « Low-intensity pulsed ultrasound ameliorates depression-like behaviors in a rat model of chronic unpredictable stress », *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 27, n° 2, p. 233-243, févr. 2021, doi: 10.1111/cns.13463.
- [82] A. Bystritsky, A. Korb, J. Stern, et M. Cohen, « Safety and feasibility of focused ultrasound neuromodulation in temporal lobe epilepsy », *J. Ther. Ultrasound*, vol. 3, n° S1, p. O27, déc. 2015, doi: 10.1186/2050-5736-3-S1-O27.
- [83] S. T. Brinker, F. Preiswerk, P. J. White, T. Y. Mariano, N. J. McDannold, et E. J. Bubrick, « Focused Ultrasound Platform for Investigating Therapeutic Neuromodulation Across the Human Hippocampus », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 46, n° 5, p. 1270-1274, mai 2020, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.01.007.
- [84] R. Beisteiner *et al.*, « Transcranial Pulse Stimulation with Ultrasound in Alzheimer's Disease—A New Navigated Focal Brain Therapy », *Adv. Sci.*, vol. 7, n° 3, p. 1902583, févr. 2020, doi: 10.1002/advs.201902583.
- [85] N. E. Nicodemus *et al.*, « Focused transcranial ultrasound for treatment of neurodegenerative dementia », *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.*, vol. 5, n° 1, p. 374-381, janv. 2019, doi: 10.1016/j.trci.2019.06.007.
- [86] S. J. Reznik, « A double-blind pilot study of transcranial ultrasound (TUS) as a five-day intervention_ TUS mitigates worry among depressed participants », p. 7, 2020.
- [87] K. Mahdavi *et al.*, « A pilot study of low-intensity focused ultrasound for treatment-resistant generalized anxiety disorder », *Brain Stimulat.*, vol. 14, n° 6, p. 1627, nov. 2021, doi: 10.1016/j.brs.2021.10.559.
- [88] M. M. Monti, C. Schnakers, A. S. Korb, A. Bystritsky, et P. M. Vespa, « Non-Invasive Ultrasonic Thalamic Stimulation in Disorders of Consciousness after Severe Brain Injury: A First-in-Man Report », *Brain Stimulat.*, vol. 9, n° 6, p. 940-941, nov. 2016, doi: 10.1016/j.brs.2016.07.008.
- [89] J. A. Cain *et al.*, « Ultrasonic thalamic stimulation in chronic disorders of consciousness », *Brain Stimulat.*, vol. 14, n° 2, p. 301-303, mars 2021, doi: 10.1016/j.brs.2021.01.008.

- [90] J. L. Sanguinetti, « Transcranial Focused Ultrasound to the Right Prefrontal Cortex Improves Mood and Alters Functional Connectivity in Humans », *Front. Hum. Neurosci.*, vol. 14, p. 13, 2020.

Chapitre 2 : Mesures ultrasonores préalables aux expériences de neurostimulation

Première partie : Caractérisation des sondes ultrasonores utilisées pour la neurostimulation

Les différentes études menées sur la neurostimulation ultrasonore décrites précédemment ont confirmé l'importance et la nécessité d'explorer l'influence des paramètres acoustiques sur l'efficacité de cette méthode. Les travaux de thèse présentement rapportés se sont ainsi concentrés sur cet aspect, en le mettant en pratique chez la souris. Pour ce faire, des transducteurs ultrasonores mono-élément focalisés ont été caractérisés puis utilisés *in vivo*. Ainsi, l'objet de ce chapitre est de décrire la caractérisation de ces derniers.

I. Description générale et dispositif expérimental

1. Description générale

La caractérisation des transducteurs ultrasonores consiste en la mesure des caractéristiques du faisceau ultrasonore émis, et en particulier celles de la tâche focale. En effet, cette dernière est la zone privilégiée pour cibler le cerveau des animaux lors des expériences *in vivo*, étant donné qu'elle concentre l'essentiel de l'énergie acoustique du faisceau au sein d'un espace restreint. Ainsi, les caractéristiques de cette tâche focale comprennent ses dimensions spatiales, à savoir sa longueur dans la direction axiale²⁷ et son diamètre dans la direction latérale²⁸, ainsi que le champ de pression régnant à cet endroit (ou l'intensité/l'énergie acoustiques associées).

De manière concrète, on réalise donc des profils de pression (en pic négatif de pression) dans les directions axiale et latérale, afin de déterminer la position, la longueur et la largeur de la tâche focale. En outre, pour différentes valeurs de la tension d'entrée, des mesures de pression sont réalisées à l'endroit où le pic négatif de pression est maximal (en valeur absolue). Une courbe, dite de sensibilité, liant ces deux grandeurs, est alors tracée.

²⁷ Direction de propagation des ondes ultrasonores ; aussi appelée profondeur.

²⁸ Direction parallèle au diamètre de la sonde. Dans le cas d'une sonde circulaire, comme celles utilisées dans nos expériences, elle est aussi appelée direction radiale. Pour ces sondes circulaires, il existe une symétrie circulaire qui implique une invariance du profil de pression quelle que soit la direction latérale choisie.

2. Dispositif expérimental

Afin de réaliser les mesures évoquées précédemment, un dispositif expérimental classique de mesures ultrasonores a été utilisé (Fig. 2.1). Ce dispositif est composé d'une cuve d'eau dégazée²⁹ (ce milieu servant à l'adaptation d'impédance de la sonde ultrasonore, afin de permettre la propagation des ondes émises), d'une partie dédiée à l'émission du signal, d'une autre assurant la réception du signal et, enfin, d'une partie servant à acquérir les données. La partie chargée de l'émission du signal est composée d'un générateur de fonctions (33250A ; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), d'un amplificateur de puissance (AAP-150-0.5-10-D ; ADECE, Vallauris, France) et de la sonde ultrasonore. La réception du signal est assurée par un hydrophone (HGL-0085 et HGL-0200 ; ONDA Corporation, Sunnyvale, CA, USA) équipé d'un préamplificateur. La partie consacrée à l'acquisition du signal consiste en un oscilloscope (TDS 3044B ; Tektronix, Beaverton, OR, USA) connecté à un ordinateur, via une carte de contrôle d'instruments (GPIB-USB-HS ; National Instruments, Austin, TX, USA). L'acquisition sur l'ordinateur se fait en utilisant un logiciel développé au sein de notre laboratoire et écrit sous Matlab (version 7.5.0 (R2007b) ; MathWorks, Natick, MA, USA ; Fig. 2.2). Par ailleurs, la fixation de la sonde est assurée par une barre de fixation, dotée d'une bague pour le maintien de la sonde. L'hydrophone est monté sur un système muni de moteurs, qui permettent un déplacement en 3D dans l'espace et peuvent être pilotés manuellement ou depuis l'ordinateur.

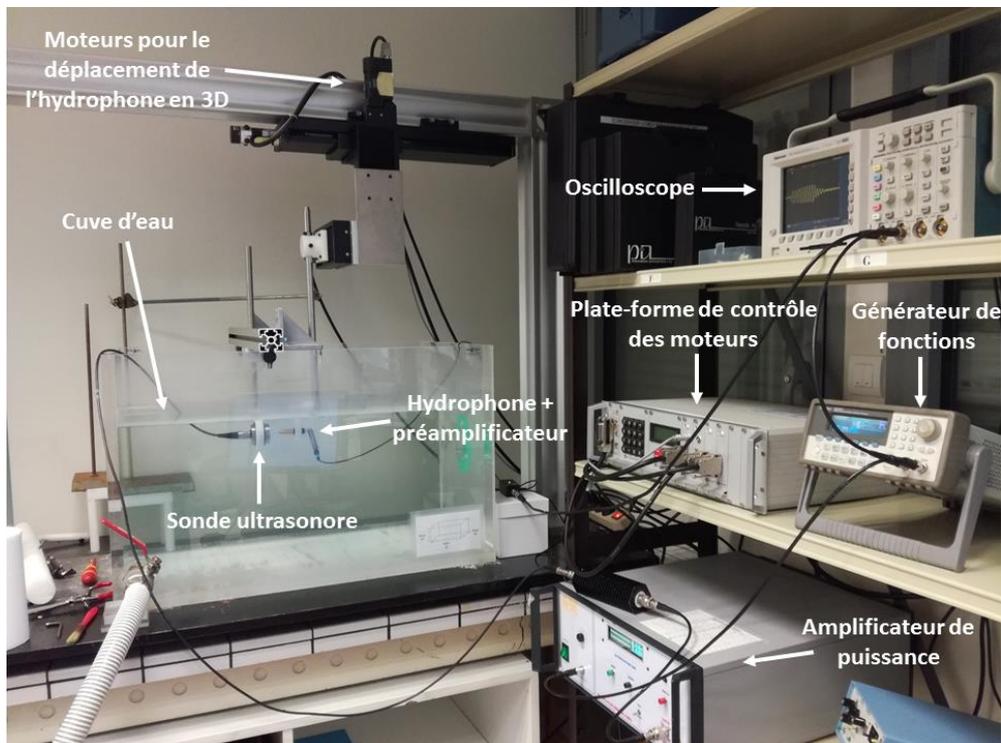


Figure 2.1 : Dispositif expérimental utilisé pour la caractérisation des sondes ultrasonores utilisées pour les expériences in vivo.

²⁹ L'eau de la cuve était laissée à dégazer, à l'air libre, durant 24 heures au moins avant les mesures, afin de limiter l'apparition de bulles. En effet, ces dernières sont susceptibles d'interférer avec le faisceau ultrasonore et d'en modifier la propagation.

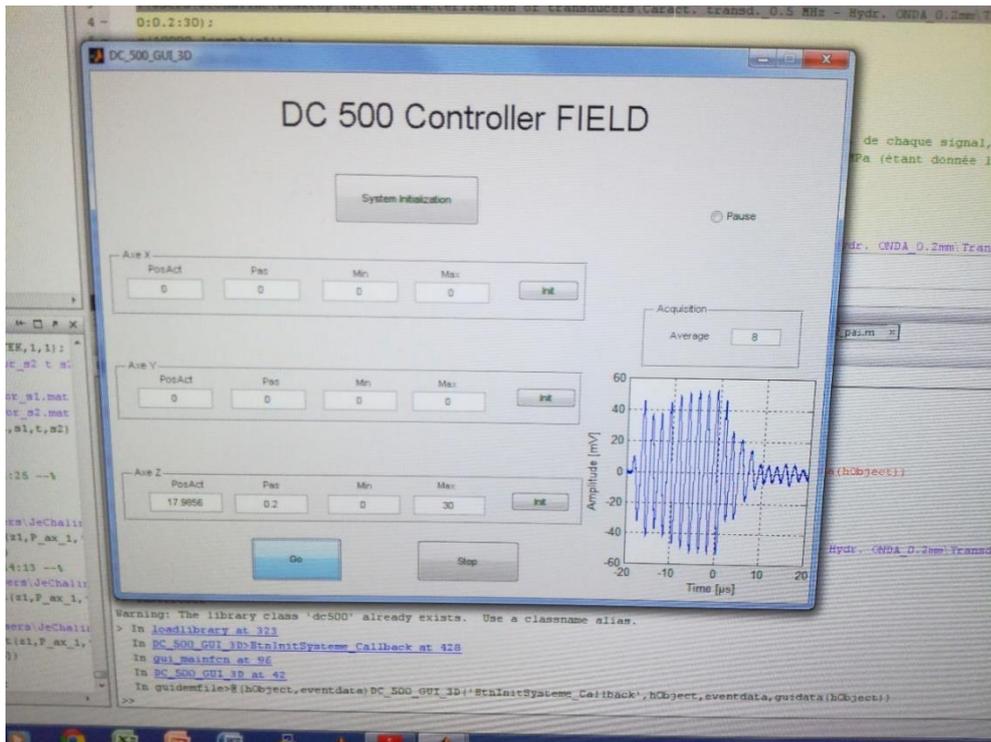


Figure 2.2 : Interface graphique du logiciel utilisé pour l'acquisition des signaux captés par l'hydrophone.

II. Caractéristiques acoustiques des sondes ultrasonores utilisées

Pour les expériences *in vivo*, quatre sondes ont été utilisées, pour des fréquences allant de 0,5 à 2,25 MHz (Tableau 2.1). Parmi ces sondes, la Sonic Concepts H-104 a été utilisée à sa fréquence fondamentale, à savoir 0,5 MHz, mais également à 1,5 MHz (troisième harmonique), grâce à un adaptateur fourni par le constructeur.

Le choix de ces différentes sondes était motivé par la volonté de tester plusieurs diamètres de tâche focale pour la neurostimulation. Ainsi, nous avons choisi des fréquences croissantes afin de réduire le diamètre de tâche focale, puisque les deux grandeurs sont inversement proportionnelles. Cependant, ce diamètre varie également avec le **f-number**³⁰, de manière proportionnelle. Il s'agit donc de maximiser la fréquence et de minimiser le f-number pour diminuer le diamètre de la tâche focale. Le cas des sondes de fréquences centrales 1,5 et 2,25 MHz permet de bien illustrer cette caractéristique. En effet, bien qu'elle opère à une plus haute fréquence, la sonde de 2,25 MHz possède une tâche focale plus large que celle de 1,5 MHz, en raison de son plus grand f-number (Tableau 2.1).

³⁰ Rapport de la longueur focale et du diamètre actif de la sonde ; ce paramètre traduit les propriétés géométriques de la sonde. Également noté *f#*, il s'exprime sans unité.

Fréquence centrale (MHz)	Diamètre effectif (mm)	Longueur focale (mm)	f-number	Diamètre de tâche focale à -3 dB (mm)	Fabricant	Photographie de la sonde
0,5	38	60	1,6	3	Imasonic, Voray sur l'Ognon, France	
0,5	63,5	63	1	2,2	Sonic Concepts, Bothell, WA, USA	
1	47,5	49	1	1,7	Fabriqué en laboratoire	
1,5	63,5	63	1	1,35	Sonic Concepts, Bothell, WA, USA	
2,25	25,4	55	2,2	1,7	Olympus NDT, Waltham, MA, USA	

Tableau 2.1 : Principales caractéristiques des sondes ultrasonores utilisées pour les expériences in vivo. Les diamètres de tâche focale ont été mesurés expérimentalement, les sondes étant munies de leur cône respectif, dont le rôle est explicité plus loin dans ce chapitre.

III. Simulations à l'aide de Field II

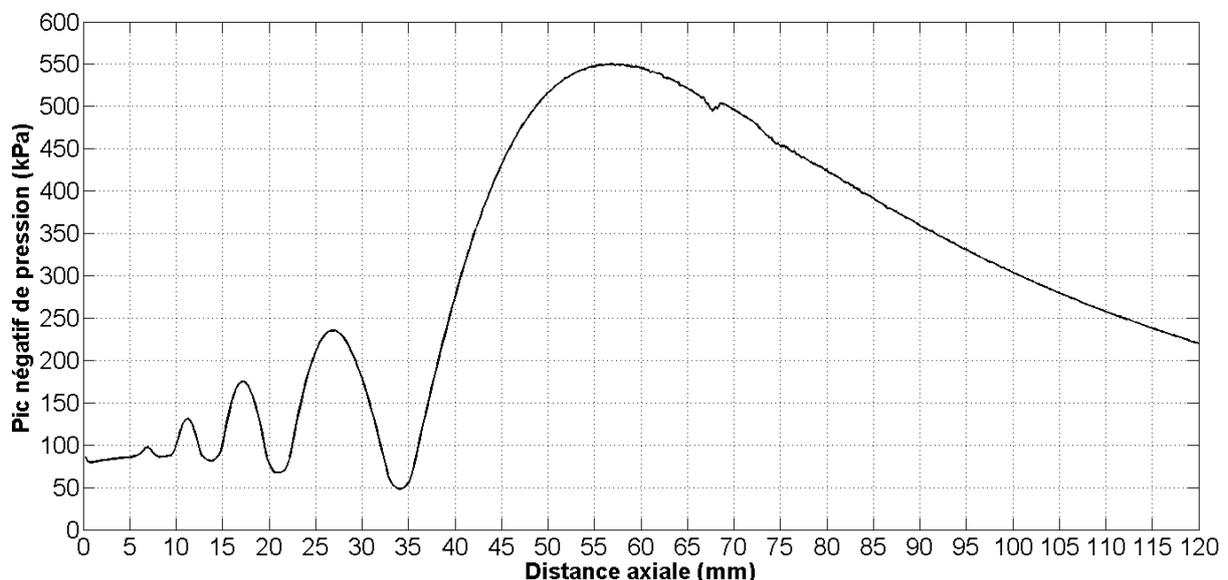
Utilisée parallèlement aux mesures expérimentales, la simulation constitue un outil important et très utile. En effet, elle permet d'anticiper, de manière assez précise, les résultats des

mesures. Aussi, cette modalité permet de déterminer des caractéristiques géométriques des sondes, dans le cas où elles sont indisponibles, ou pour vérifier les données fournies par le constructeur. A cet effet, l'outil que nous avons utilisé est Field II³¹, qui est un ensemble de fonctions et de programmes écrits et fonctionnant sous Matlab, servant à simuler la propagation d'ondes ultrasonores dans un milieu simple (milieu avec une vitesse de propagation des ultrasons et une densité uniformes).

1. Simulations en 1D

Des exemples de profils de pression simulés dans les directions axiale et latérale sont représentés ci-dessous. Ces profils, réalisés en prenant en compte le pic négatif de pression, sont représentés en pression absolue (généralement exprimée en kPa ou MPa), en pression relative³² ou en pression normalisée³³. Ils permettent de visualiser l'étendue spatiale du champ de pression, en particulier la position et l'amplitude des lobes (principal et secondaires). En outre, le profil axial permet de déterminer la longueur focale acoustique de la sonde, qui correspond au pic d'amplitude de la pression, ainsi que la longueur de la tâche focale. Quant au profil latéral, il permet la détermination du diamètre de la tâche focale. Les sondes utilisées et simulées étant circulaires, elles se caractérisent par une symétrie circulaire autour de l'axe du transducteur. Ainsi, la réalisation des profils 1D suffit à décrire l'ensemble du champ de pression, et en particulier au niveau de la tâche focale.

(a)



³¹ <https://www.field-ii.dk>

³² Exprimée en décibels (dB), et égale à $20 \times \log \left(\frac{P}{P_{\max}} \right)$, où P est la pression absolue correspondante et P_{\max} la pression absolue maximale. Les valeurs de pression relative sont donc inférieures ou égales à 0 (valeur atteinte pour P_{\max}).

³³ La normalisation se fait en divisant les valeurs de pression absolue par la pression absolue maximale, ce qui donne des valeurs entre 0 et 1, exprimées sans unité.

(b)

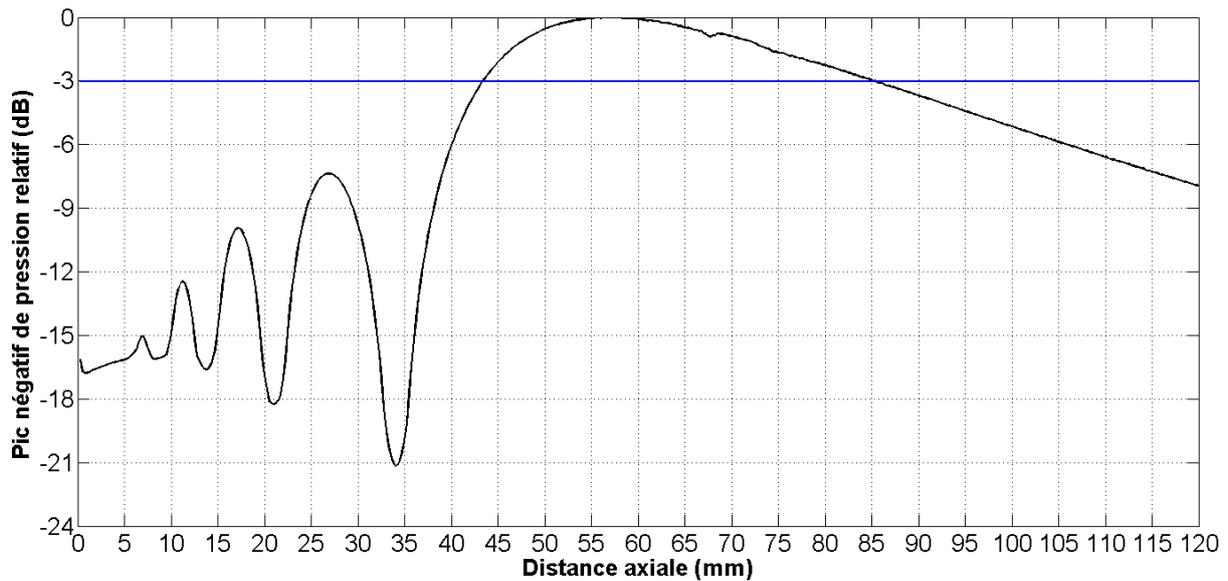


Figure 2.3 : Profil axial de pression simulé pour la sonde Imasonic – 0,5 MHz, représenté en kPa (a) et en dB (b). La représentation en pression relative en (b) est accompagnée d’une ligne bleue, tracée pour faciliter la lecture de la longueur de la tâche focale à -3 dB.

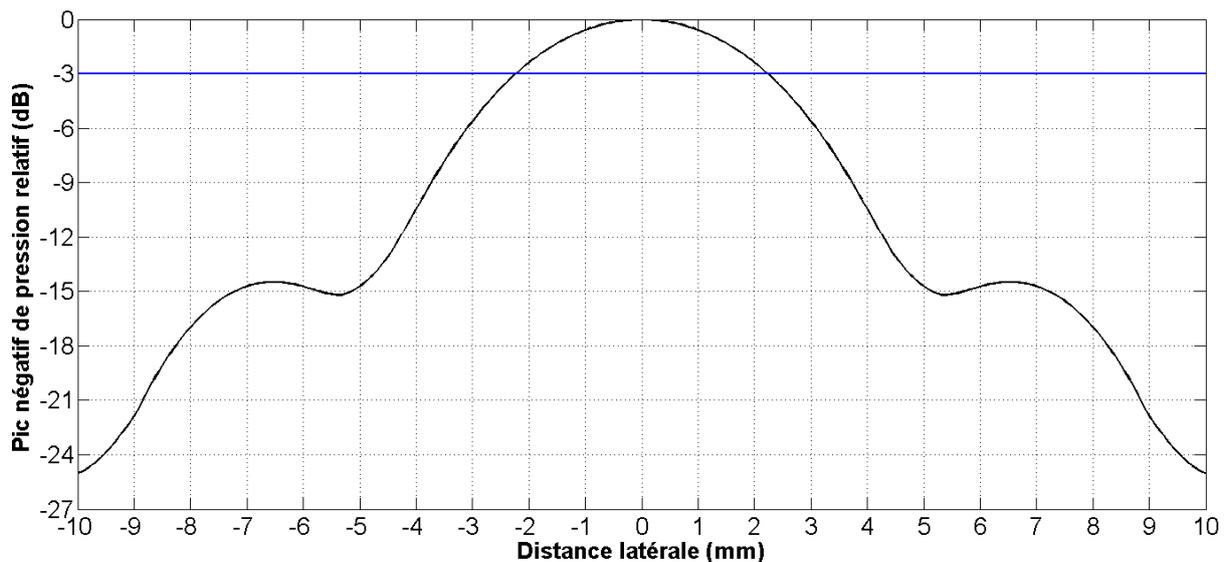


Figure 2.4 : Profil latéral de pression simulé pour la sonde Imasonic – 0,5 MHz, représenté en dB. La ligne bleue permet de faciliter la lecture du diamètre de la tâche focale à -3 dB.

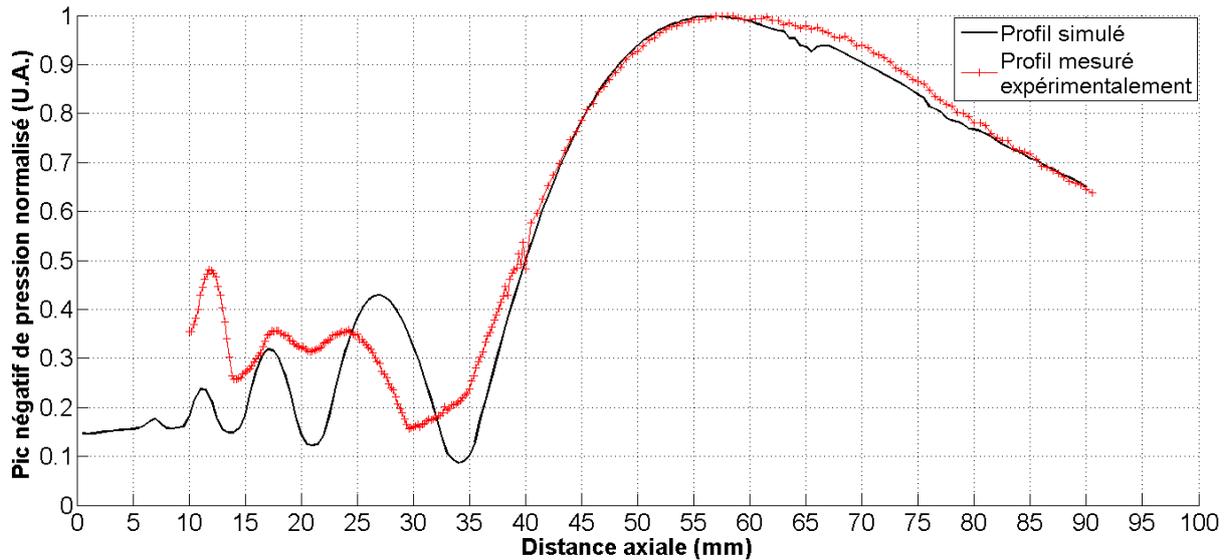
2. Détermination des caractéristiques géométriques des sondes

Pour la réalisation de simulations, les caractéristiques géométriques d’une sonde, à savoir son diamètre actif et son rayon de courbure, doivent être renseignées dans le logiciel Field II. Lorsque ces données ne sont pas disponibles ou lorsqu’on veut vérifier les données fournies par le constructeur, il est nécessaire de pouvoir les déterminer. A cet effet, la simulation s’avère très utile, car en confrontant ses résultats à ceux des mesures expérimentales, il est possible de remonter aux informations recherchées. En effet, en ajustant les valeurs du

diamètre actif et du rayon de courbure de la sonde dans le logiciel de simulation, de sorte que les profils simulés coïncident le mieux possible avec ceux mesurés expérimentalement, il est possible d'estimer ces caractéristiques géométriques. Des exemples de résultats obtenus par cette méthode, pour chacune des sondes utilisées, sont présentés ci-dessous.

Sonde Imasonic – 0,5 MHz

(a)



(b)

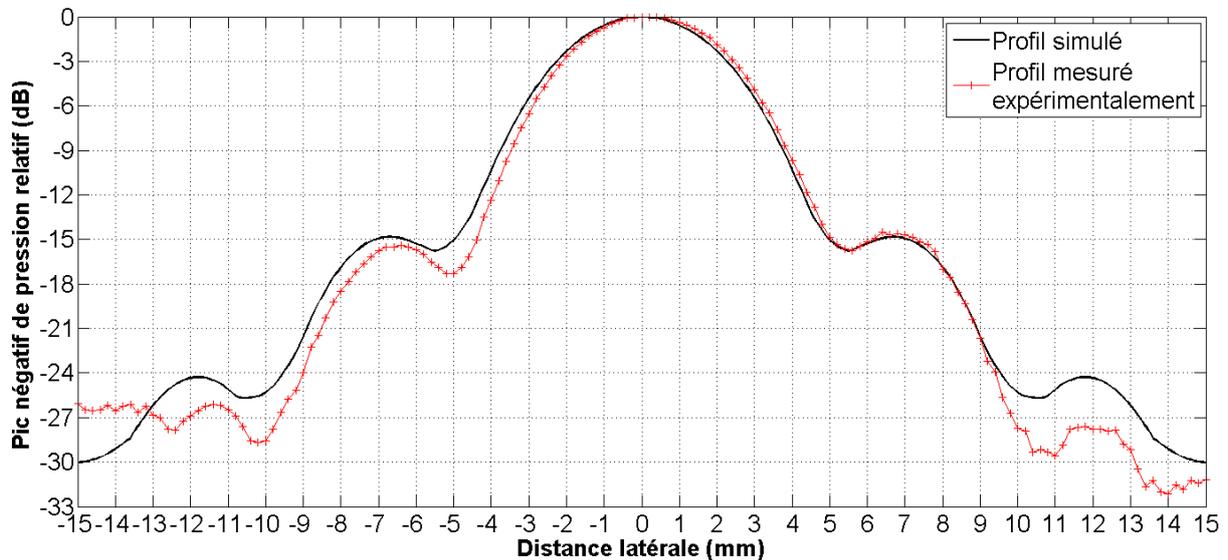
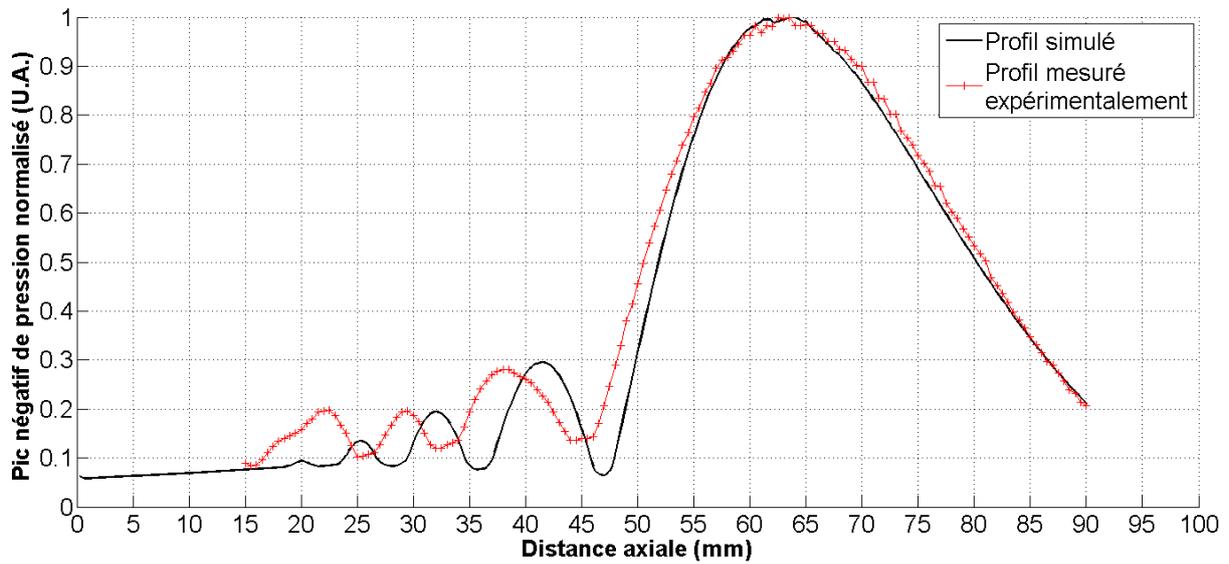


Figure 2.5 : Superposition des profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la détermination des caractéristiques géométriques de la sonde Imasonic – 0,5 MHz. La simulation a été réalisée avec un diamètre actif de 41 mm et un rayon de courbure de 71 mm.

Les résultats présentés dans la figure 2.5 montrent, en particulier, que le diamètre actif de la sonde Imasonic se rapproche plus de 41 mm que de 38 mm, tel qu'estimé initialement.

Sonde Sonic Concepts utilisée à 0,5 MHz

(a)



(b)

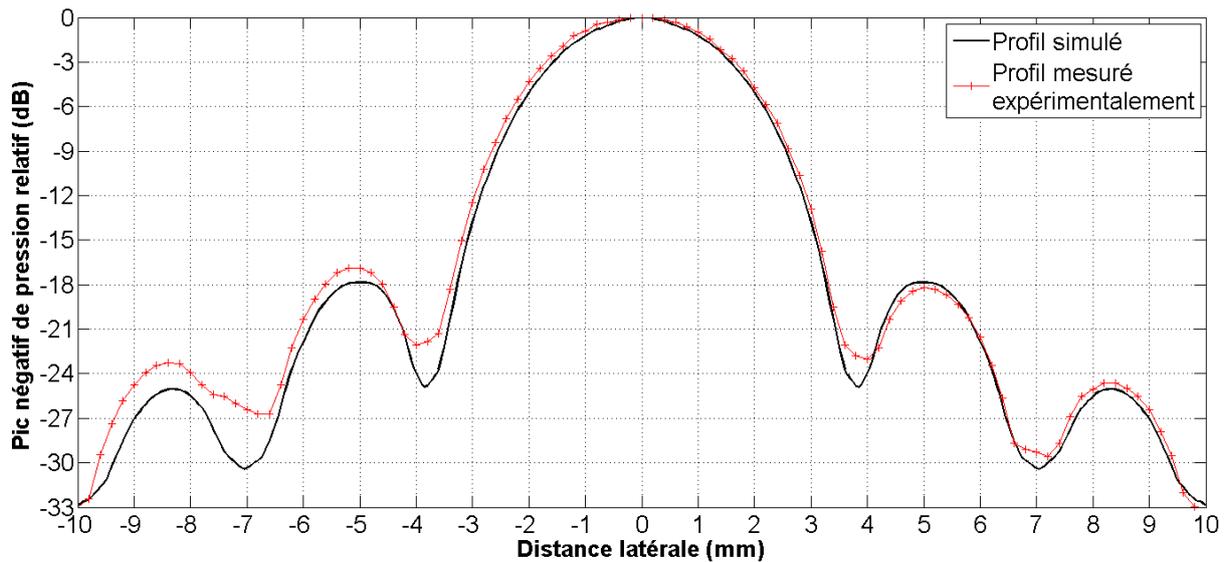
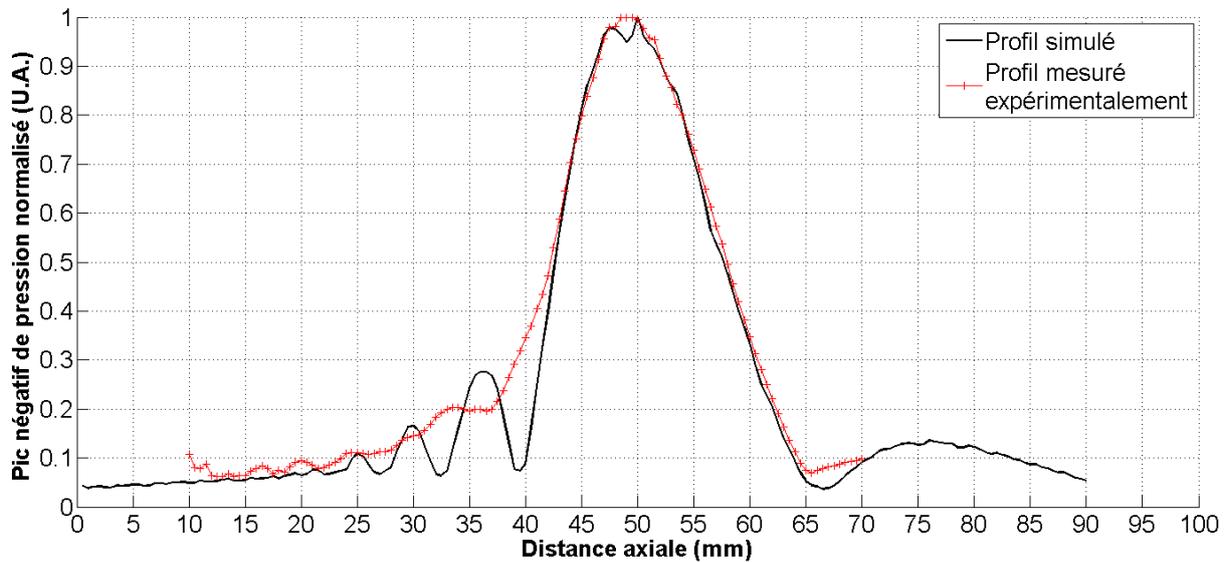


Figure 2.6 : Superposition des profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la détermination des caractéristiques géométriques de la sonde Sonic Concepts (utilisée ici à 0,5 MHz). La simulation a été réalisée avec un diamètre actif de 63,5 mm et un rayon de courbure de 65 mm.

Sonde de 1 MHz

(a)



(b)

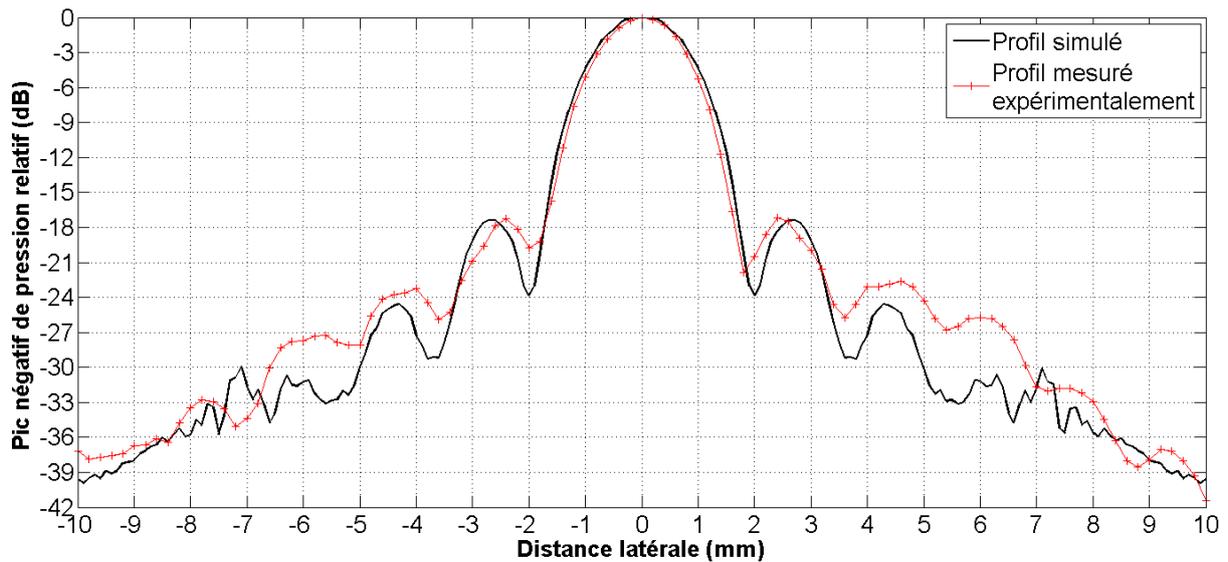


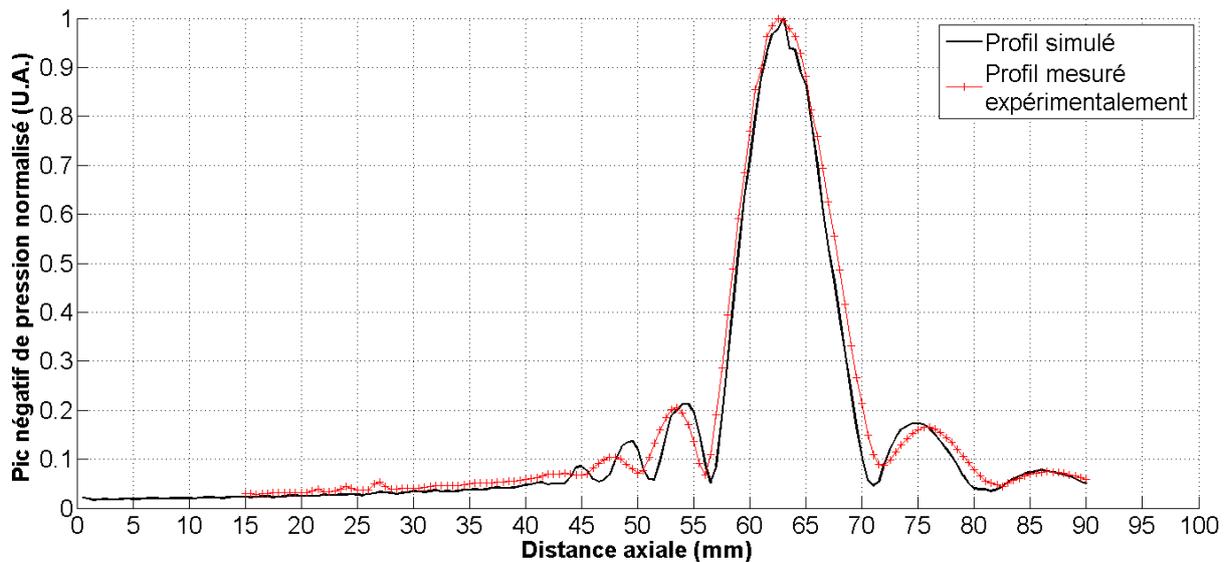
Figure 2.7 : Superposition des profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la détermination des caractéristiques géométriques de la sonde de 1 MHz. La simulation a été réalisée avec un diamètre actif de 47,5 mm et un rayon de courbure de 49,75 mm.

Sonde Sonic Concepts utilisée à 1,6 MHz

En plus de sa fréquence fondamentale de 0,5 MHz, la sonde Sonic Concepts a été utilisée durant les expériences *in vivo* à 1,5 MHz. Néanmoins, la comparaison des mesures expérimentales et de la simulation, présentée ci-dessous, a été réalisée à la fréquence voisine de 1,6 MHz, pour laquelle la sonde délivre un signal d'amplitude maximale. Les caractéristiques géométriques de la sonde étant fixes, elles ne sont pas influencées par le choix de la fréquence à laquelle elles ont été mises en évidence.

Il est à noter que le rayon de courbure utilisé dans la simulation à 1,6 MHz est légèrement différent de celui utilisé pour 0,5 MHz (63 et 65 mm, respectivement). Cette différence, qui s'explique par le fait que la focale acoustique change d'une fréquence à l'autre, n'est pourtant pas visible sur les mesures expérimentales de la sonde Sonic Concepts, car celle-ci fonctionne avec un dispositif électrique qui permet de faire coïncider les deux focales. Or, le logiciel de simulation ne prend pas en compte cette particularité. Ainsi, pour rester en accord avec les mesures expérimentales, il est nécessaire d'adapter le rayon de courbure dans le logiciel afin d'avoir une focale acoustique identique pour les deux fréquences.

(a)



(b)

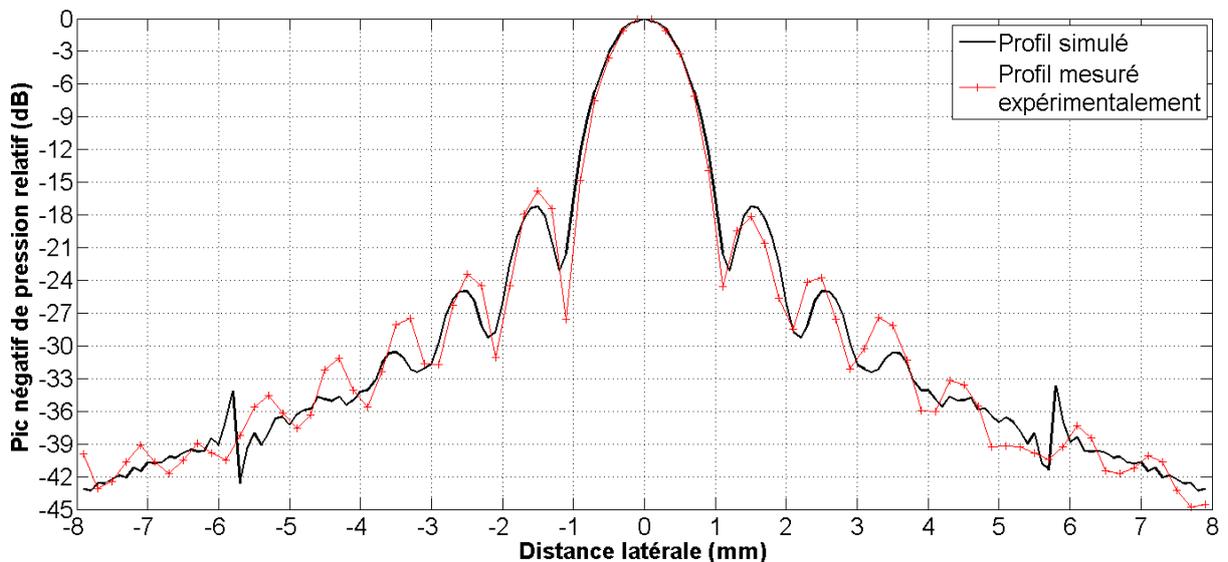
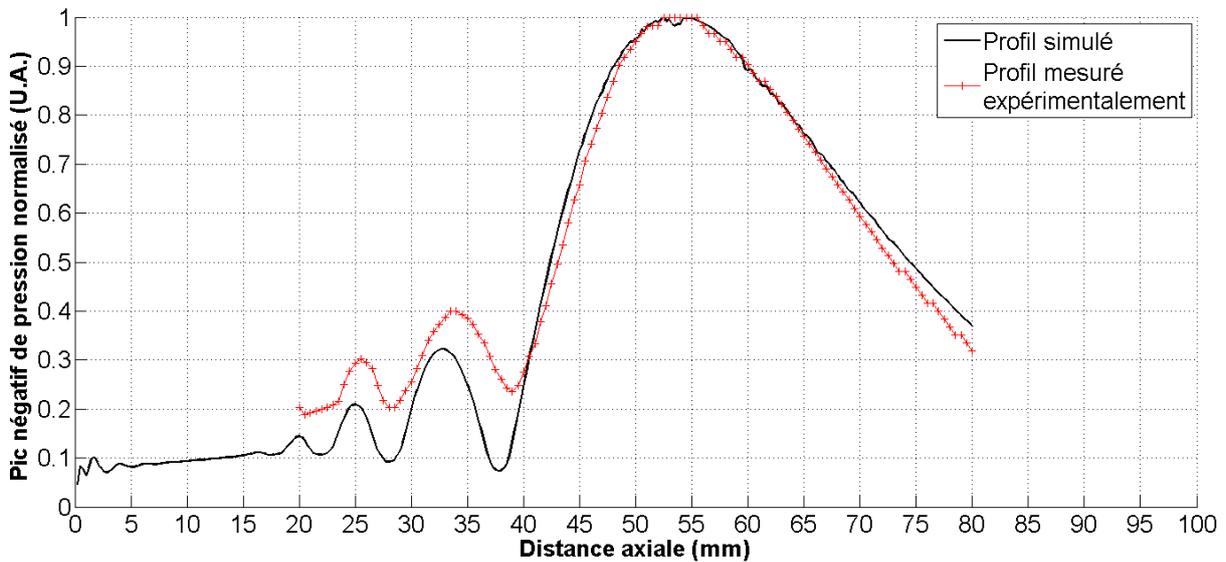


Figure 2.8 : Superposition des profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la détermination des caractéristiques géométriques de la sonde Sonic Concepts (utilisée ici à 1,6 MHz). La simulation a été réalisée avec un diamètre actif de 63,5 mm et un rayon de courbure de 63 mm.

Sonde de 2,25 MHz

(a)



(b)

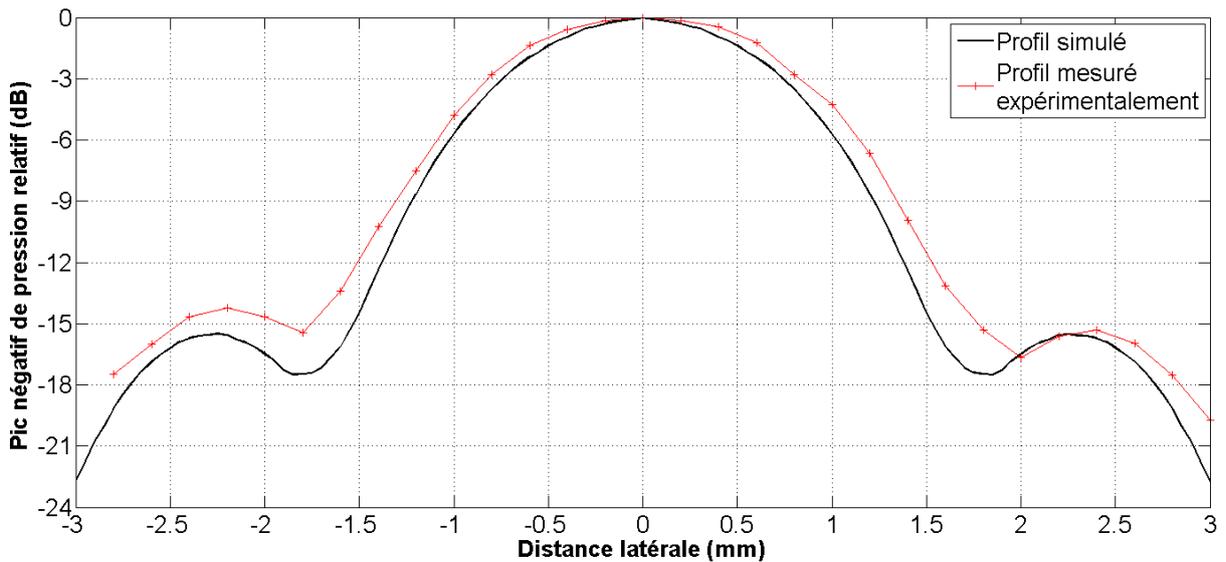


Figure 2.9 : Superposition des profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la détermination des caractéristiques géométriques de la sonde de 2,25 MHz. La simulation a été réalisée avec un diamètre actif de 25 mm et un rayon de courbure de 57 mm.

3. Simulations en 2D

Toujours avec le même logiciel, des profils de pression acoustique en 2D ont été simulés pour chaque sonde, dans les plans XY (plan focal)³⁴ et XZ³⁵. La tâche focale correspondante,

³⁴ Plan transverse à la direction de propagation des ultrasons, se situant au niveau de la tâche focale. Sur ce plan, la tâche focale est de forme circulaire, et on peut déterminer son diamètre.

³⁵ Plan englobant les directions axiale et radiale ; le faisceau ultrasonore est alors « vu de haut ». Sur ce plan, la tâche focale apparaît oblongue, et on peut déterminer sa longueur ainsi que son diamètre.

délimitée à -3 dB du pic négatif de pression maximal, est représentée ci-dessous pour chacune des sondes, dans les deux plans.

Sonde Imasonic – 0,5 MHz

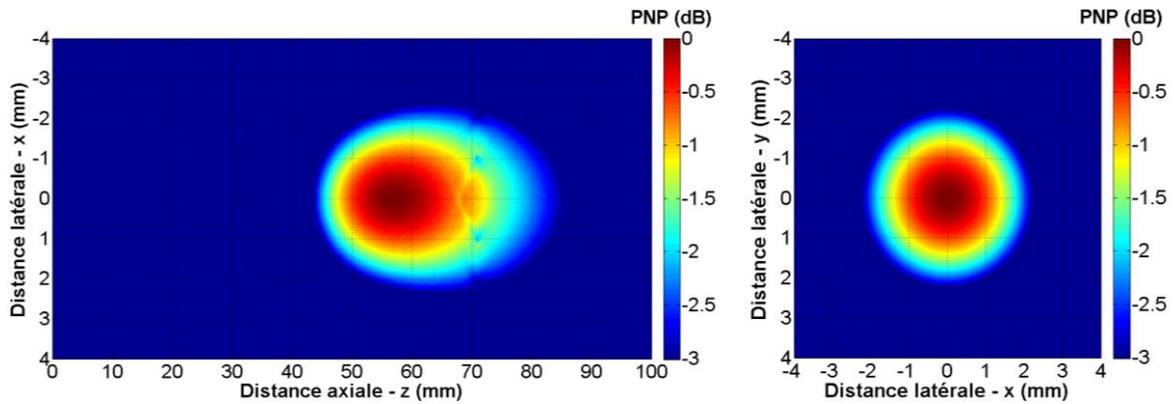


Figure 2.10 : Tâche focale délimitée à -3 dB du pic négatif de pression (PNP) maximal, simulée dans le plan XZ (à gauche) et le plan focal XY (à droite), pour la sonde Imasonic. La simulation a été réalisée à 0,5 MHz avec un diamètre effectif de la sonde de 41 mm et un rayon de courbure de 71 mm.

Sonde Sonic Concepts – 0,5 MHz

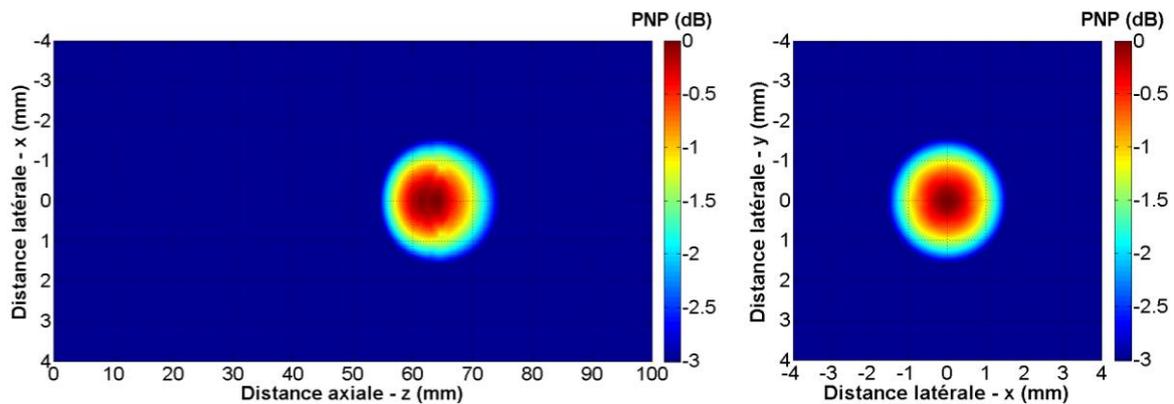


Figure 2.11 : Tâche focale délimitée à -3 dB du pic négatif de pression (PNP) maximal, simulée dans le plan XZ (à gauche) et le plan focal XY (à droite), pour la sonde Sonic Concepts utilisée à une fréquence de 0,5 MHz. La simulation a été réalisée avec un diamètre effectif de la sonde de 63,5 mm et un rayon de courbure de 65 mm.

Sonde de 1 MHz

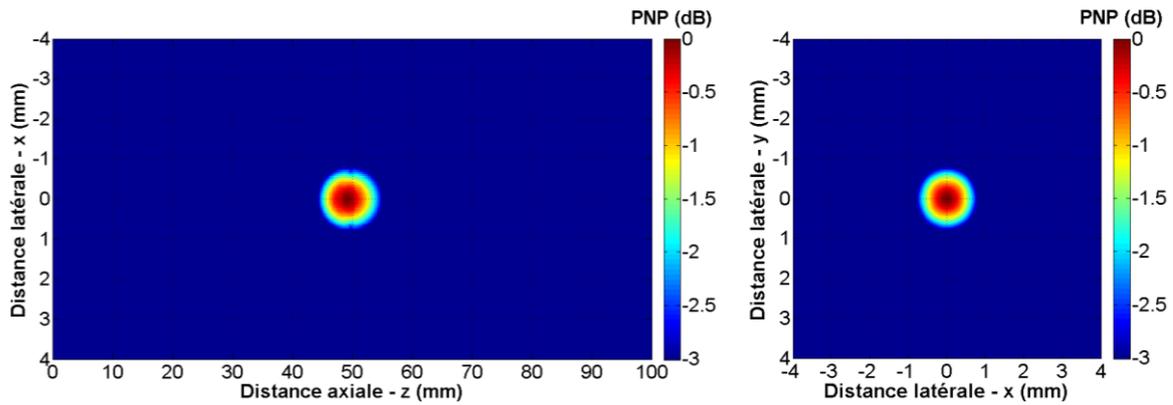


Figure 2.12 : Tâche focale délimitée à -3 dB du pic négatif de pression (PNP) maximal, simulée dans le plan XZ (à gauche) et le plan focal XY (à droite), pour la sonde de 1 MHz. La simulation a été réalisée avec un diamètre effectif de la sonde de 47,5 mm et un rayon de courbure de 49,75 mm.

Sonde Sonic Concepts – 1,5 MHz

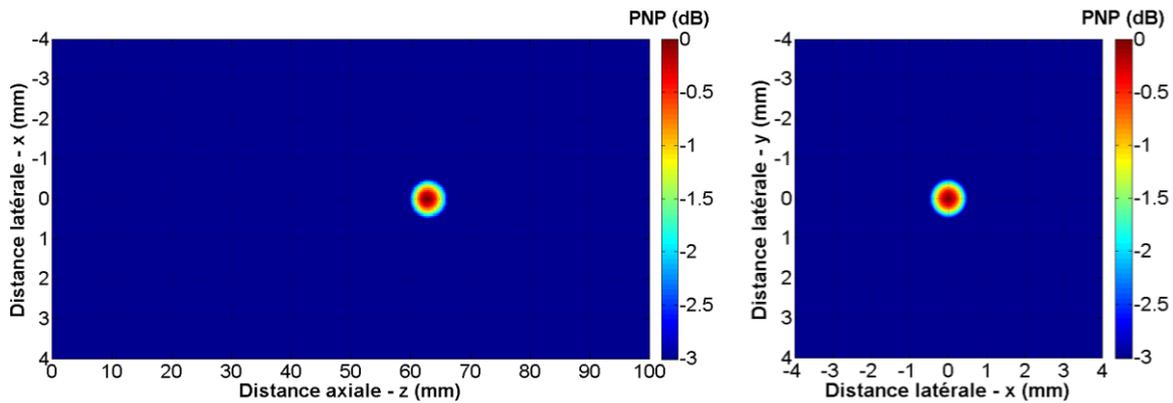


Figure 2.13 : Tâche focale délimitée à -3 dB du pic négatif de pression (PNP) maximal, simulée dans le plan XZ (à gauche) et le plan focal XY (à droite), pour la sonde Sonic Concepts utilisée à une fréquence de 1,5 MHz. La simulation a été réalisée avec un diamètre effectif de la sonde de 63,5 mm et un rayon de courbure de 63 mm.

Sonde de 2,25 MHz

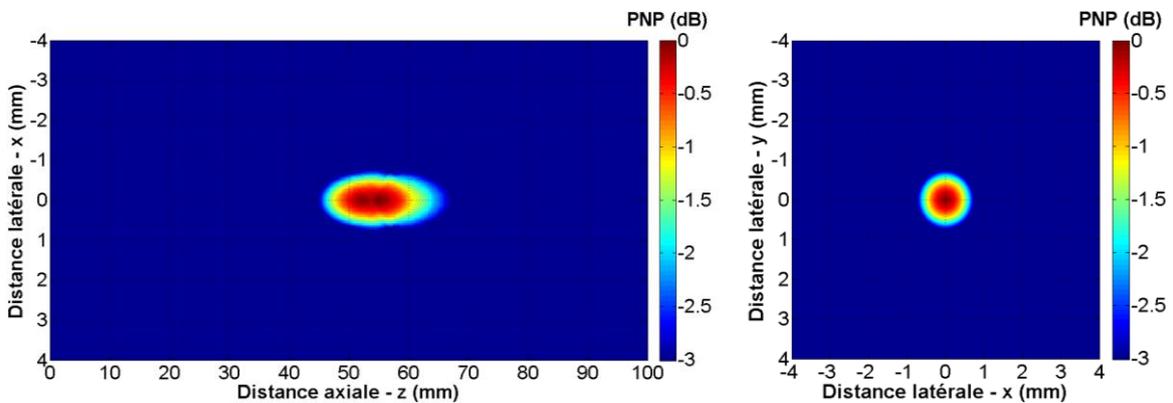


Figure 2.14 : Tâche focale délimitée à -3 dB du pic négatif de pression (PNP) maximal, simulée dans le plan XZ (à gauche) et le plan focal XY (à droite), pour la sonde de 2,25 MHz. La simulation a été réalisée avec un diamètre effectif de la sonde de 25 mm et un rayon de courbure de 57 mm.

4. Profils de pression *in vivo* théoriques

Dans la continuité des simulations en 2D vues précédemment, il est intéressant d'évaluer la taille des faisceaux ultrasonores vis à vis de celle de la zone ciblée dans le cerveau de souris. Pour cela, la tâche focale (à -3 dB) de chaque sonde, prise dans le plan XZ, est superposée, en transparence et aux dimensions correspondantes, à l'illustration d'une coupe coronale du cerveau de souris³⁶ (Figures 2.15 à 2.19). Cette illustration correspond aux coordonnées utilisées lors des expériences *in vivo* (Bregma + 0,5 mm dans la direction antéropostérieure). Ainsi, les différentes figures présentées ci-dessous permettent de mieux visualiser l'importance de la résolution du faisceau ultrasonore. Elles permettent également de mieux saisir l'intérêt d'explorer l'effet du diamètre de la tâche focale.

Sonde Imasonic – 0,5 MHz

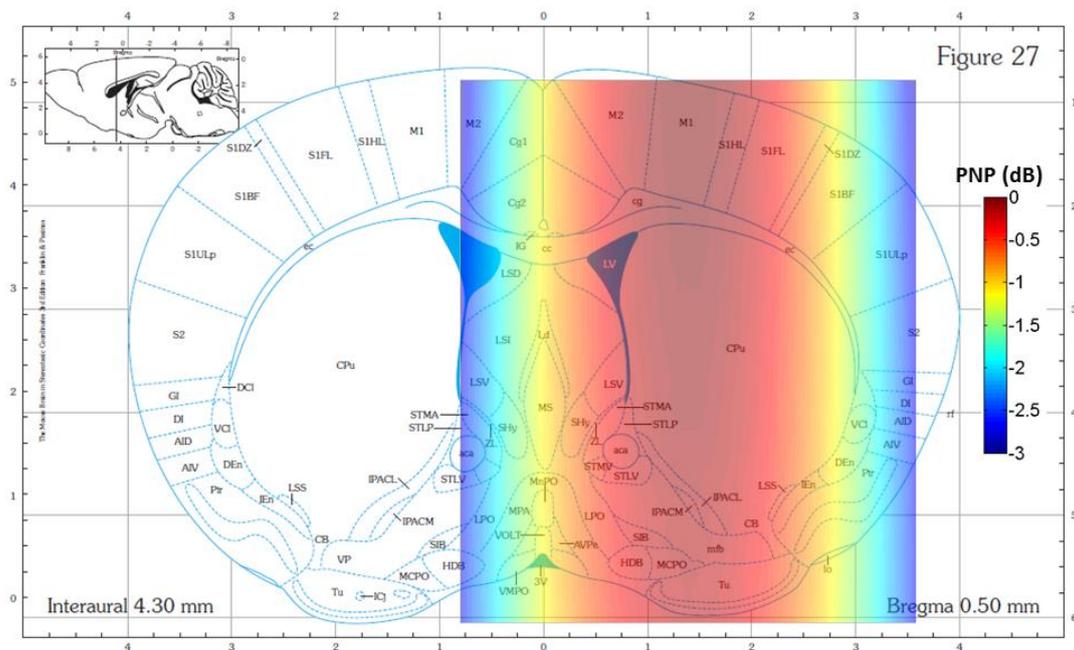


Figure 2.15 : Tâche focale théorique (à -3 dB) de la sonde Imasonic, superposée à l'illustration du cerveau de souris (coupe coronale, à Bregma + 0,5 mm dans la direction antéropostérieure). Les graduations indiquées sont en mm.

³⁶ *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 3rd Edition, K. Franklin and G. Paxinos, Academic Press, 2008.*

Sonde Sonic Concepts utilisée à 0,5 MHz

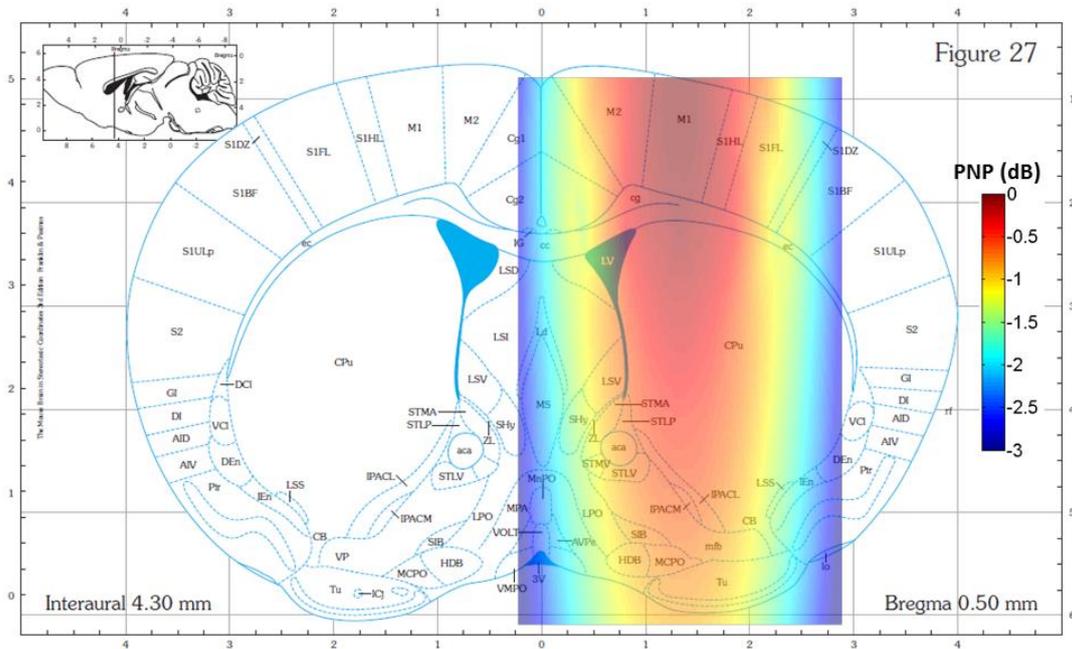


Figure 2.16 : Tâche focale théorique (à -3 dB) de la sonde Sonic Concepts utilisée à 0,5 MHz, superposée à l'illustration du cerveau de souris (coupe coronale, à Bregma + 0,5 mm dans la direction antéropostérieure). Les graduations indiquées sont en mm.

Sonde de 1 MHz

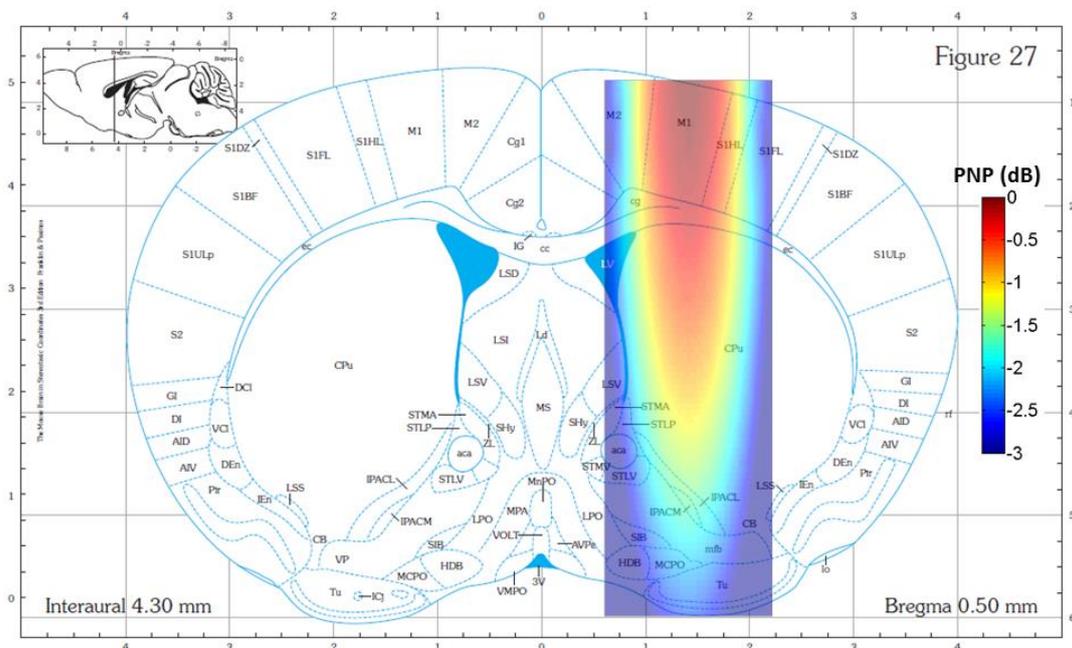


Figure 2.17 : Tâche focale théorique (à -3 dB) de la sonde de 1 MHz, superposée à l'illustration du cerveau de souris (coupe coronale, à Bregma + 0,5 mm dans la direction antéropostérieure). Les graduations indiquées sont en mm.

Sonde Sonic Concepts utilisée à 1,5 MHz

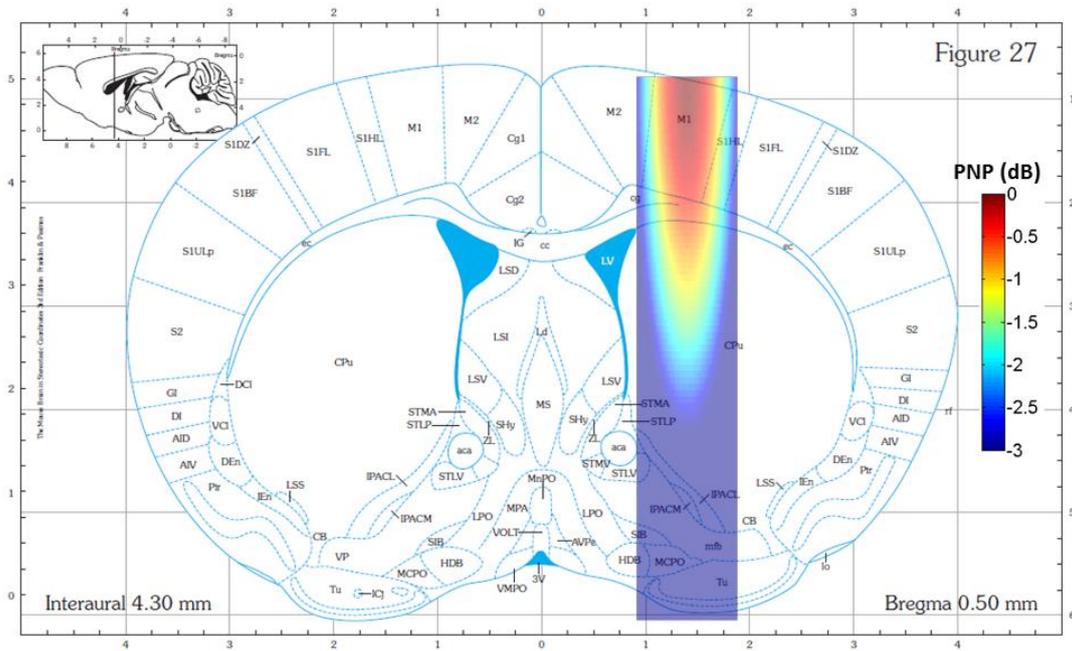


Figure 2.18 : Tâche focale théorique (à -3 dB) de la sonde Sonic Concepts utilisée à 1,5 MHz, superposée à l'illustration du cerveau de souris (coupe coronale, à Bregma + 0,5 mm dans la direction antéropostérieure). Les graduations indiquées sont en mm.

Sonde de 2,25 MHz

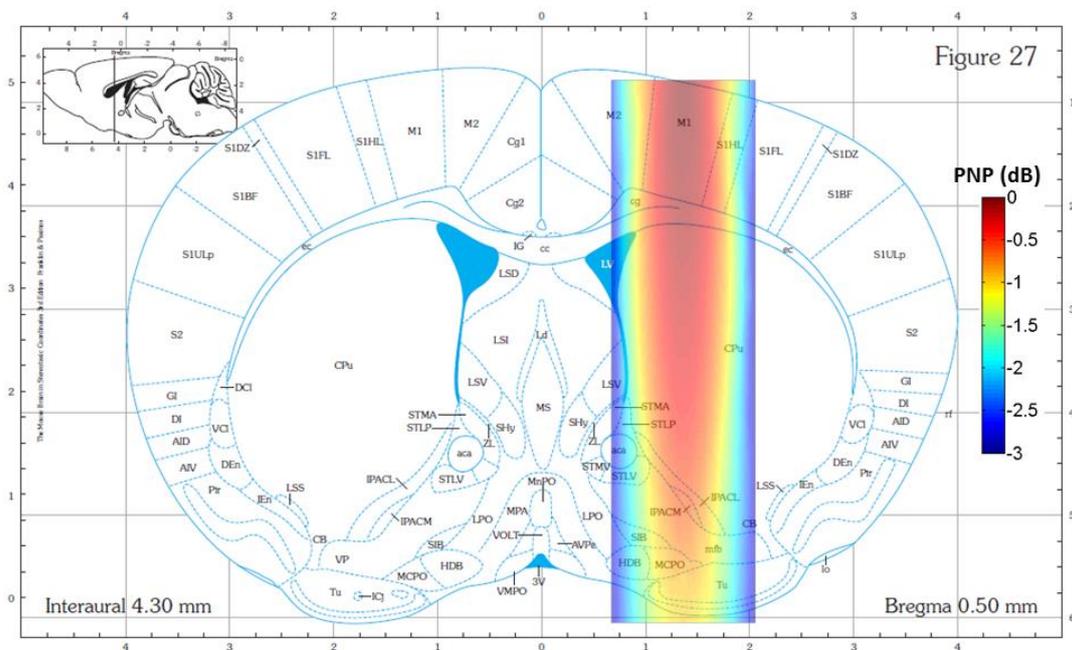


Figure 2.19 : Tâche focale théorique (à -3 dB) de la sonde de 2,25 MHz, superposée à l'illustration du cerveau de souris (coupe coronale, à Bregma + 0,5 mm dans la direction antéropostérieure). Les graduations indiquées sont en mm.

Par ailleurs, il est à noter que les effets du cône utilisé avec chaque sonde, du crâne de souris et de la peau recouvrant ce dernier ne sont pas pris en compte dans la simulation. Des mesures de la largeur de la tâche focale réalisées en présence du cône, précédemment présentées dans le Tableau 2.1, sont comparées à la taille du cerveau et du cortex moteur primaire (M1) de souris (Tableau 2.2).

	Diamètre de la tâche focale (mm)	Largeur du cerveau de souris (mm)	Largeur du M1 (mm)
Sonde Imasonic (0,5 MHz)	3	8	≈ 0,8
Sonde Sonic Concepts à 0,5 MHz	2,2		
Sonde de 1 MHz	1,7		
Sonde Sonic Concepts à 1,5 MHz	1,35		
Sonde de 2,25 MHz	1,7		

Tableau 2.2 : Diamètre de la tâche focale (à -3 dB) de chaque sonde utilisée dans les expériences *in vivo*, comparé à la largeur du cerveau de souris et de la zone ciblée, i.e., le cortex moteur primaire (M1), à la coordonnée antéropostérieure Bregma + 0,5 mm (d'après les figures de l'atlas présentées précédemment). Le diamètre de tâche focale a été mesuré en présence du cône correspondant à chaque sonde, à la position virtuelle du centre du M1 (i.e., 2 mm après l'ouverture du sommet du cône).

IV. Mesures expérimentales pour les expériences *in vivo*

1. Effets du cône

Durant les expériences *in vivo*, chaque sonde utilisée était munie d'un cône en plexiglas³⁷ (Fig. 2.20), rempli d'eau dégazée³⁸. Ce cône servait essentiellement à s'assurer que la zone ciblée, au sein du crâne des animaux, coïncide avec la focale acoustique de la sonde utilisée.

³⁷ L'ouverture au sommet du cône est obturée par une membrane. Celle-ci consiste en un morceau de film acoustique, d'une épaisseur de quelques microns (15 à 25 µm typiquement), qui a la particularité de minimiser l'atténuation des ultrasons.

³⁸ Dégazage réalisé à l'aide d'une cloche à vide.

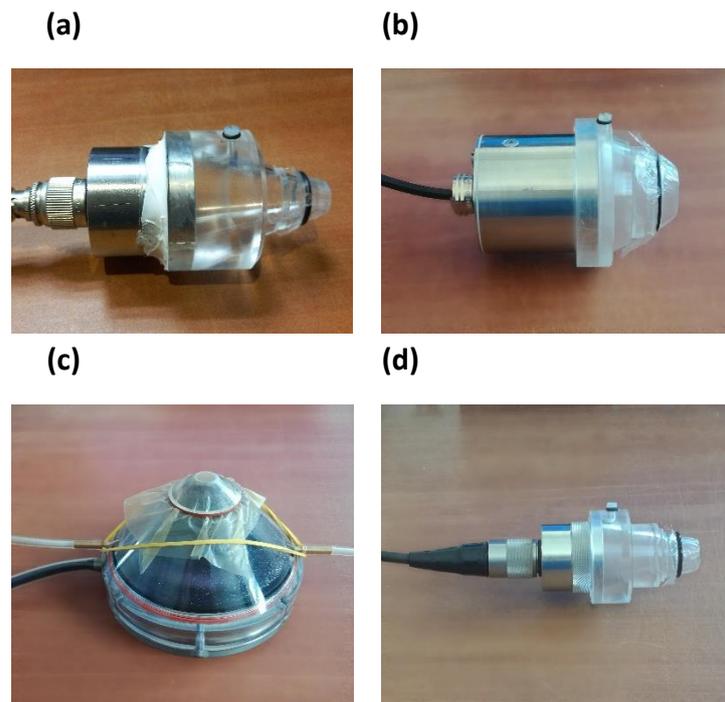


Figure 2.20 : Photographies des sondes utilisées munies de leur cône respectif ; (a) Sonde Imasonic ; (b) Sonde de 1 MHz ; (c) Sonde Sonic Concepts ; (d) Sonde de 2,25 MHz. L'ouverture au sommet du cône est recouverte d'un film acoustique de quelques microns d'épaisseur (15-25 μm typiquement), minimisant l'atténuation des ondes ultrasonores et fixé par un joint torique.

Hormis le cône de la sonde Sonic Concepts, qui a été fourni par le fabricant, les autres cônes ont été confectionnés au sein de notre laboratoire. Les dimensions de chaque cône ont été choisies de sorte que le diamètre de la base corresponde au diamètre de la sonde respective, que la longueur corresponde à la longueur focale de la sonde, et que le diamètre du sommet soit égal à au moins deux fois le diamètre de la tâche focale.

Par ailleurs, on remarque que les parois des cônes sont voisines des limites latérales du faisceau ultrasonore émis par les sondes. Il est donc important de savoir si ces parois exercent une influence sur le faisceau ultrasonore. A priori, l'influence plus ou moins grande du cône sur le faisceau dépend essentiellement de leurs dimensions respectives. En effet, plus le faisceau est large, plus il est probable qu'il interagisse avec les parois du cône. Des mesures ont donc été effectuées dans ce sens, en comparant les situations avec et sans cône. Ainsi, dans le cas de la sonde Imasonic par exemple, dont le faisceau est relativement large par rapport aux dimensions du cône qui y est associé, les mesures ont montré que le cône avait un effet de focalisation du faisceau ultrasonore. En effet, la tâche focale mesurée avec le cône apparaît plus courte, plus fine et avec une amplitude plus élevée en comparaison des mesures sans cône (Fig. 2.21). Au contraire, dans le cas de la sonde de 1 MHz, les profils de pression latéraux ont montré que le cône n'avait que très peu, voire pas d'influence sur le faisceau ultrasonore, du point de vue de la largeur de celui-ci, de la position de ses lobes et de son amplitude (Fig. 2.22).

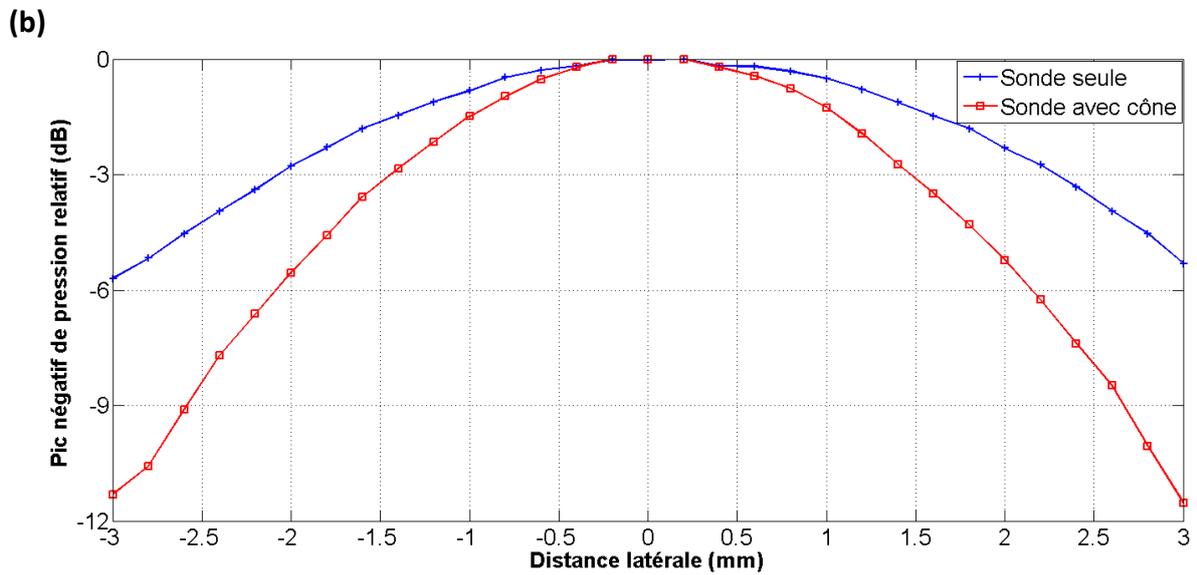
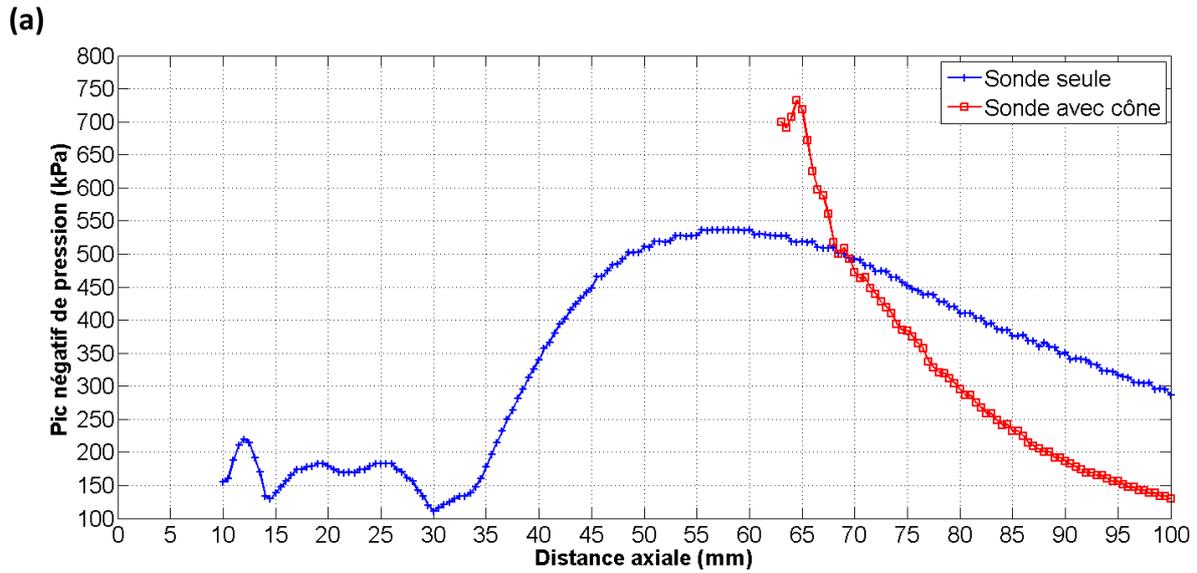
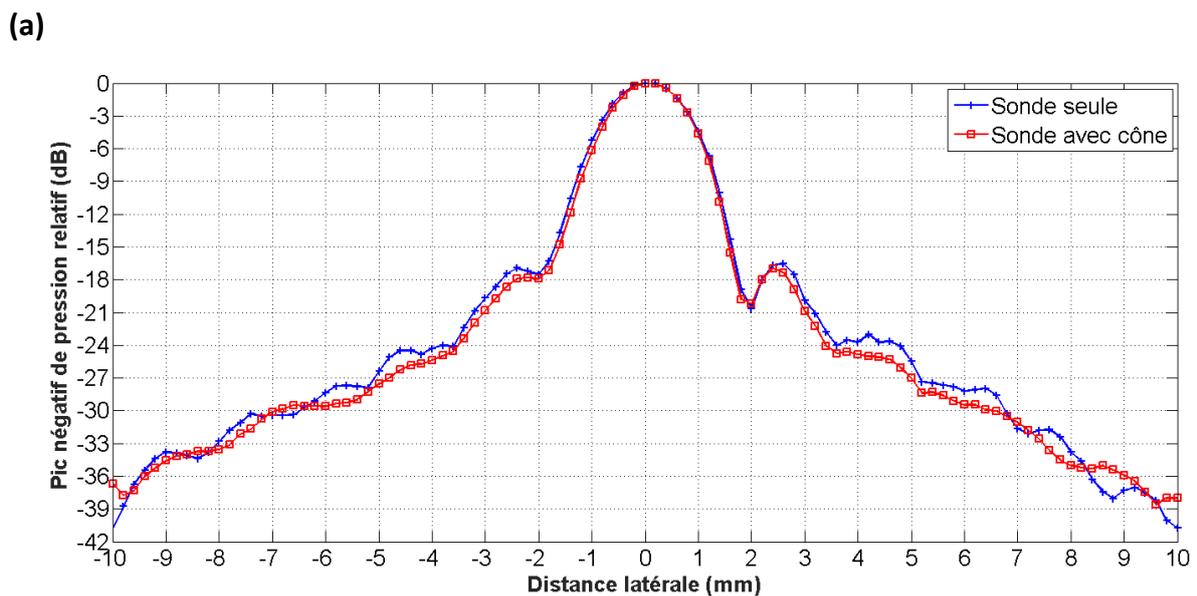


Figure 2.21 : Profils de pression axiaux (a) et latéraux (b), mesurés pour la sonde Imasonic sans et avec cône. Les profils latéraux ont été mesurés à la focale ($z = 63$ mm).



(b)

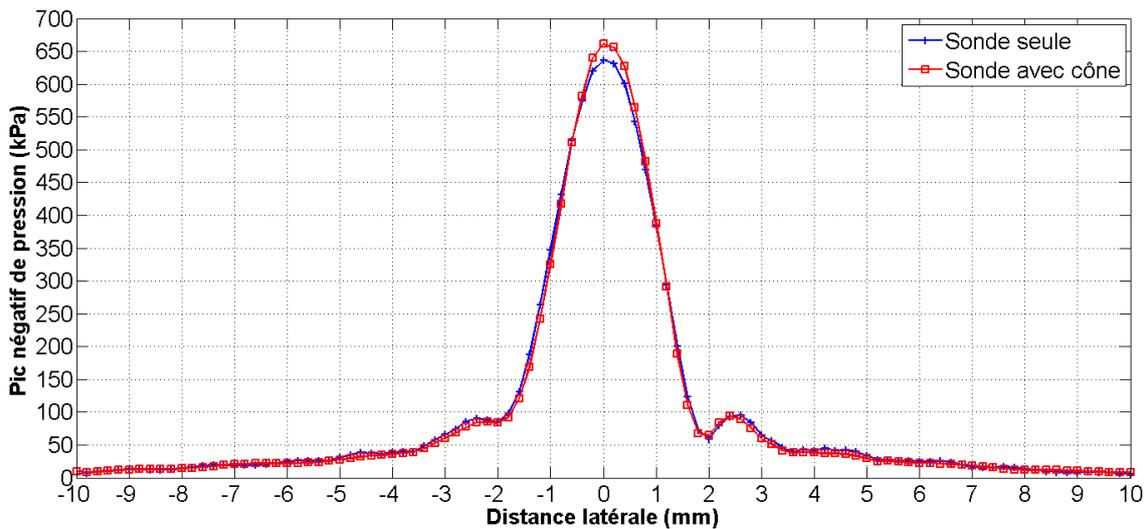


Figure 2.22 : Profils de pression latéraux mesurés à la focale ($z = 52,5$ mm) pour la sonde de 1 MHz, sans et avec cône, présentés en pression relative (a) et absolue (b).

Les mesures présentées ci-dessus ont montré que le cône pouvait avoir un effet sur le faisceau ultrasonore émis. Afin de prendre en compte cet effet potentiel, les mesures réalisées préalablement aux expériences *in vivo*, présentées dans la sous-partie qui suit, ont toutes été faites en présence du cône.

2. Mesures expérimentales utilisées lors des expériences *in vivo*

Durant les expériences *in vivo*, il est nécessaire de faire varier la pression utilisée pour stimuler le cerveau des animaux. Pour ce faire, nous avons utilisé des courbes de sensibilité, tracées pour chacune des sondes munies de leurs cônes respectifs. Pour effectuer ces mesures, l'hydrophone était positionné à une distance de 2 mm après le cône (dans la direction axiale), afin de mesurer les pressions régnant à la position virtuelle du centre du cortex moteur des souris (zone cible lors des expérimentations *in vivo*). En effet, nous avons estimé que la somme des épaisseurs du crâne de souris, de la peau qui le recouvre et du gel ultrasonore appliqué sur celle-ci durant les expériences, ajoutée à la profondeur du centre du M1, représentait 2 mm environ. Par ailleurs, les courbes de sensibilité prenaient en compte l'atténuation du crâne de souris, dont la mesure est traitée dans la partie suivante.

D'autre part, tel qu'évoqué précédemment, il est également important de connaître le diamètre de la tâche focale du faisceau ultrasonore utilisé en *in vivo*. En effet, cela permet de connaître la résolution spatiale du faisceau et de la comparer à la taille des zones cérébrales ciblées. A cet effet, les profils de pression latéraux (en pic négatif de pression), réalisés dans le plan focal situé 2 mm après le cône, sont représentés ci-dessous pour chacune des sondes (Fig. 2.23).

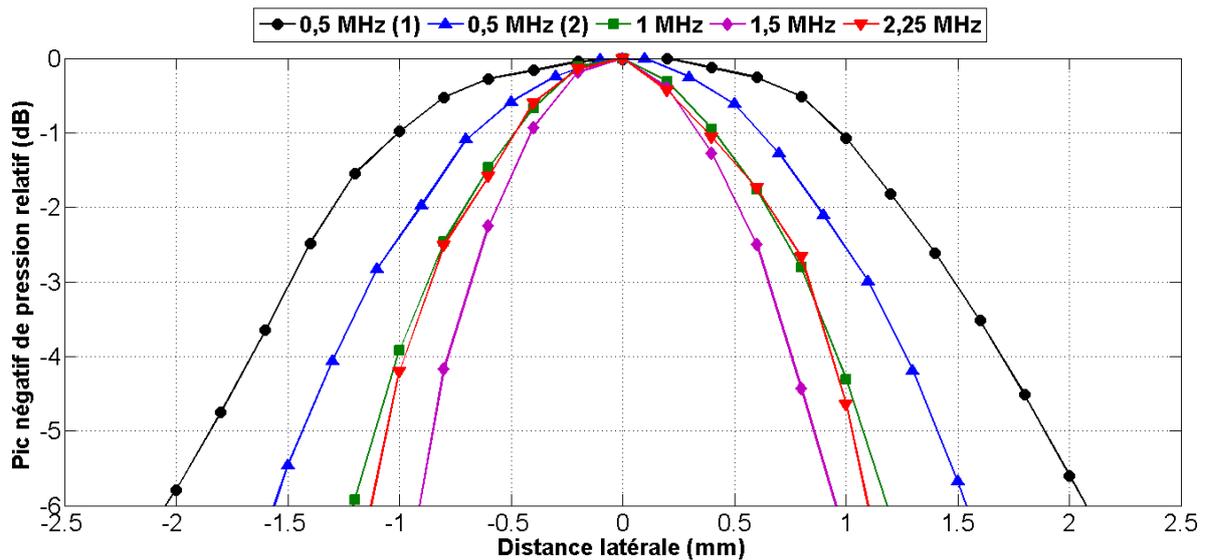


Figure 2.23 : Profils latéraux de pression des différentes sondes utilisées, munies de leur cône respectif. 0,5 MHz (1), 0,5 MHz (2) et 1,5 MHz font référence à la sonde Imasonic et la sonde Sonic Concepts, utilisée à 0,5 MHz et 1,5 MHz, respectivement. Les mesures ont été réalisées 2 mm après le cône, dans la direction axiale.

En résumé, la première partie de ce second chapitre a décrit différents outils nécessaires pour la réalisation des expériences *in vivo*. Ainsi, les différentes sondes utilisées, les méthodes mises en œuvre pour les caractériser ainsi que le dispositif expérimental utilisé à cet effet ont été détaillés. Par ailleurs, cette partie a également mis en lumière l'importance des outils de simulation pour la caractérisation des sondes ultrasonores.

D'autre part, la préparation des expériences *in vivo* nécessite de prendre en considération un autre volet important, à savoir les effets du crâne des animaux sur le faisceau ultrasonore. La partie suivante est ainsi consacrée à la description de ces effets et de leur mesure.

Deuxième partie : Influence du crâne sur le faisceau ultrasonore

Pour la stimulation transcrânienne du cerveau, la prise en compte des effets du crâne sur les propriétés du faisceau ultrasonore est essentielle. En effet, le crâne est constitué d'os qui, en fonction de son épaisseur, de sa courbure et de sa structure interne (densité, porosité, etc.), influence de manière plus ou moins importante la propagation des ondes ultrasonores. Ainsi, il convient d'anticiper ces effets, afin d'avoir une maîtrise de la technique.

L'un des effets les plus visibles est l'atténuation de l'amplitude de l'onde ultrasonore, qui augmente avec l'épaisseur du crâne traversé, mais aussi avec la fréquence ultrasonore utilisée. L'un des axes de ces travaux de thèse étant d'étudier l'influence de l'amplitude de l'onde utilisée sur la neurostimulation, il est donc primordial de maîtriser le phénomène d'atténuation. Par ailleurs, un autre effet se manifeste lors de la propagation des ultrasons à travers le crâne, à savoir la distorsion du faisceau ultrasonore. Cette dernière est essentiellement provoquée par le déphasage des ondes ultrasonores qui traversent le crâne, ce qui modifie le profil spatial de leurs interférences. Par conséquent, la répartition spatiale de l'intensité acoustique s'en trouve impactée, en comparaison de la propagation dans un milieu libre, comme l'eau par exemple.

Ainsi, cette deuxième partie du second chapitre a pour objet de présenter la mesure de ces effets du crâne, ainsi que le dispositif et la technique utilisés à cet effet. Les mesures ont principalement été réalisées sur des crânes³⁹ de souris, en amont des expériences *in vivo*. Des mesures analogues ont également été effectuées sur des crânes de rats, à l'occasion de travaux effectués en parallèle, et sont présentées à la fin de cette partie.

I. Dispositif et méthode de mesure des effets du crâne

1. Dispositif expérimental

La mesure des effets cités précédemment a été réalisée en utilisant le même dispositif expérimental que pour la caractérisation des sondes ultrasonores, avec cependant une partie supplémentaire servant à la fixation du crâne. Cette dernière permet le positionnement du crâne entre la sonde ultrasonore et l'hydrophone. Elle consiste en une tige s'insérant sur la barre de fixation de la sonde, et au bout de laquelle est collé le crâne de souris. Ce dispositif de fixation a l'avantage d'être facile à mettre en place et à utiliser. Il permet notamment de déplacer le crâne dans les directions verticale et axiale, tout en offrant la possibilité d'orienter le crâne latéralement (Fig. 2.24).

³⁹ Toutes les mesures ont été réalisées sur des calottes crâniennes.

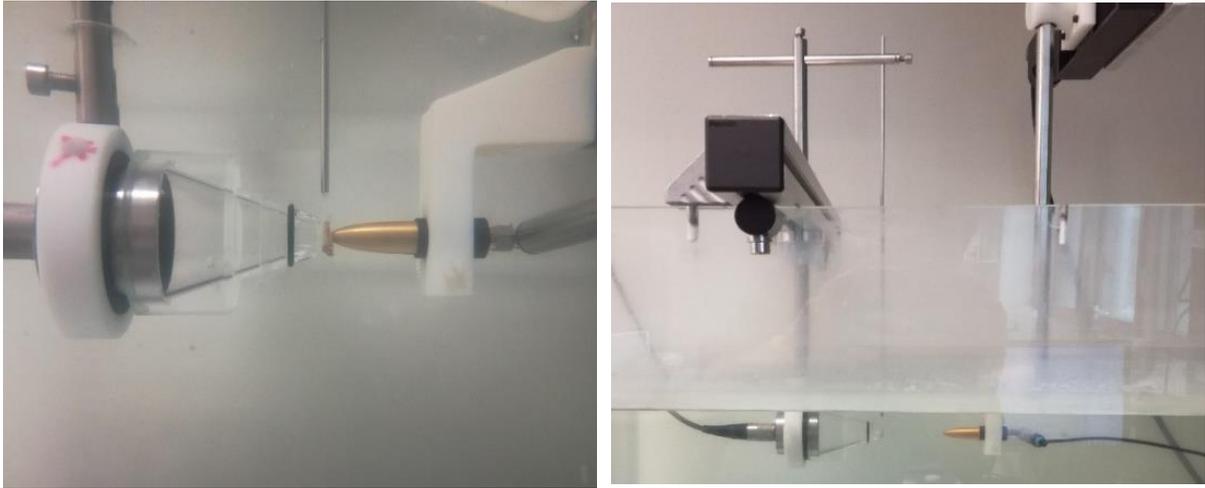


Figure 2.24 : Dispositif de fixation des crânes de souris, pour la mesure de l'atténuation occasionnée par ceux-ci sur les ondes ultrasonores. Pour ces mesures, le crâne est maintenu à l'aide d'une tige, entre la sonde ultrasonore (munie de son cône) et l'hydrophone (image de gauche). La tige s'insère dans la barre de fixation de la sonde au moyen d'une autre barre positionnée horizontalement (image de droite). Aussi, la tige peut être déplacée dans la direction axiale et de haut en bas, et peut être tournée autour de son axe pour modifier l'orientation du crâne.

Afin de pouvoir contrôler les coordonnées lors du déplacement du crâne, nous avons mis au point une seconde version de ce dispositif, où le système de fixation est associé à un ensemble de chariots de déplacement. Ces derniers, munis de vis micrométriques, permettent un déplacement précis (de l'ordre de 0,01 mm) et en 3D du crâne. Par ailleurs, ce dispositif permet la fixation et l'utilisation de tous types de crânes. En effet, il comprend un cadre, muni de cales ajustables, qui permet d'insérer et maintenir un crâne de grande taille (*e.g.*, crâne humain), si besoin. Pour les crânes de rongeurs, un orifice dans ce cadre permet d'insérer une tige à laquelle est suspendu le crâne. Cette tige comprend une partie rigide et une partie flexible, et est munie d'une pince qui permet le maintien et le positionnement du crâne (Fig. 2.25). Enfin, l'ensemble composé du cadre et des chariots de déplacement est fixé sur une barre, elle-même vissée sur les bords de la cuve d'eau.

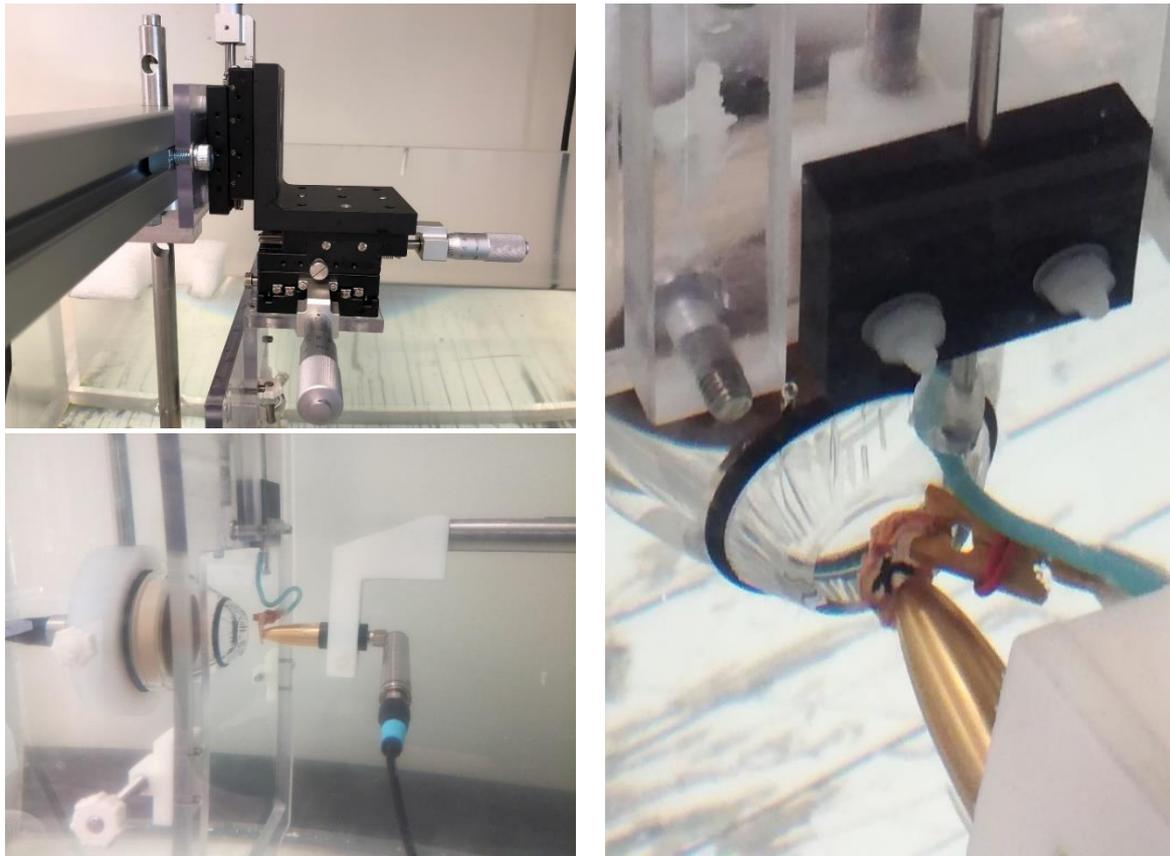


Figure 2.25 : Second dispositif utilisé pour la mesure de l'atténuation ultrasonore causée par le crâne. Le cadre en plexiglas (image de gauche, en bas) est muni de cales ajustables sur les côtés, pour le maintien de crânes de grande taille (e.g., crâne humain). Pour le maintien de crânes plus petits (e.g., crânes de rongeurs), une tige, comprenant une partie flexible (câble bleu) et une pince, s'insère dans le cadre. Les lignes tracées au marqueur indélébile sur le crâne suivent les sutures et permettent de mieux voir les points de repères (Bregma, etc. ; image de droite). L'ensemble du dispositif est suspendu à un chariot de vis micrométriques, qui permet un déplacement en 3D (image de gauche, en haut).

2. Méthodes de mesure et de calcul

a. Atténuation

Pour mesurer l'atténuation due au crâne, la technique qui a été utilisée est celle de l'insertion-substitution, qui permet de comparer le signal obtenu en présence du crâne à celui obtenu sans le crâne, au même point de mesure. Par ailleurs, dans le cas des crânes de rongeurs, la majeure partie des mesures s'est faite dans des conditions les plus proches possibles de celles rencontrées dans les expériences *in vivo*. En particulier, le crâne était placé au contact du cône et l'hydrophone était placé au plus près de la position virtuelle de la région ciblée en *in vivo* (le cortex moteur primaire pour les expériences sur souris, par exemple). Des mesures hors de cette position virtuelle ont également été réalisées.

La comparaison des signaux temporels avec et sans crâne, et/ou de leurs spectres respectifs, fournit un coefficient de transmission. Dans le cas des signaux temporels, nous calculons ce coefficient comme le rapport des pics négatifs de pression, alors que nous utilisons le rapport des amplitudes du lobe principal pour les spectres (Fig. 2.26). L'atténuation est ensuite déduite de la transmission, puisque la somme des deux coefficients vaut un.

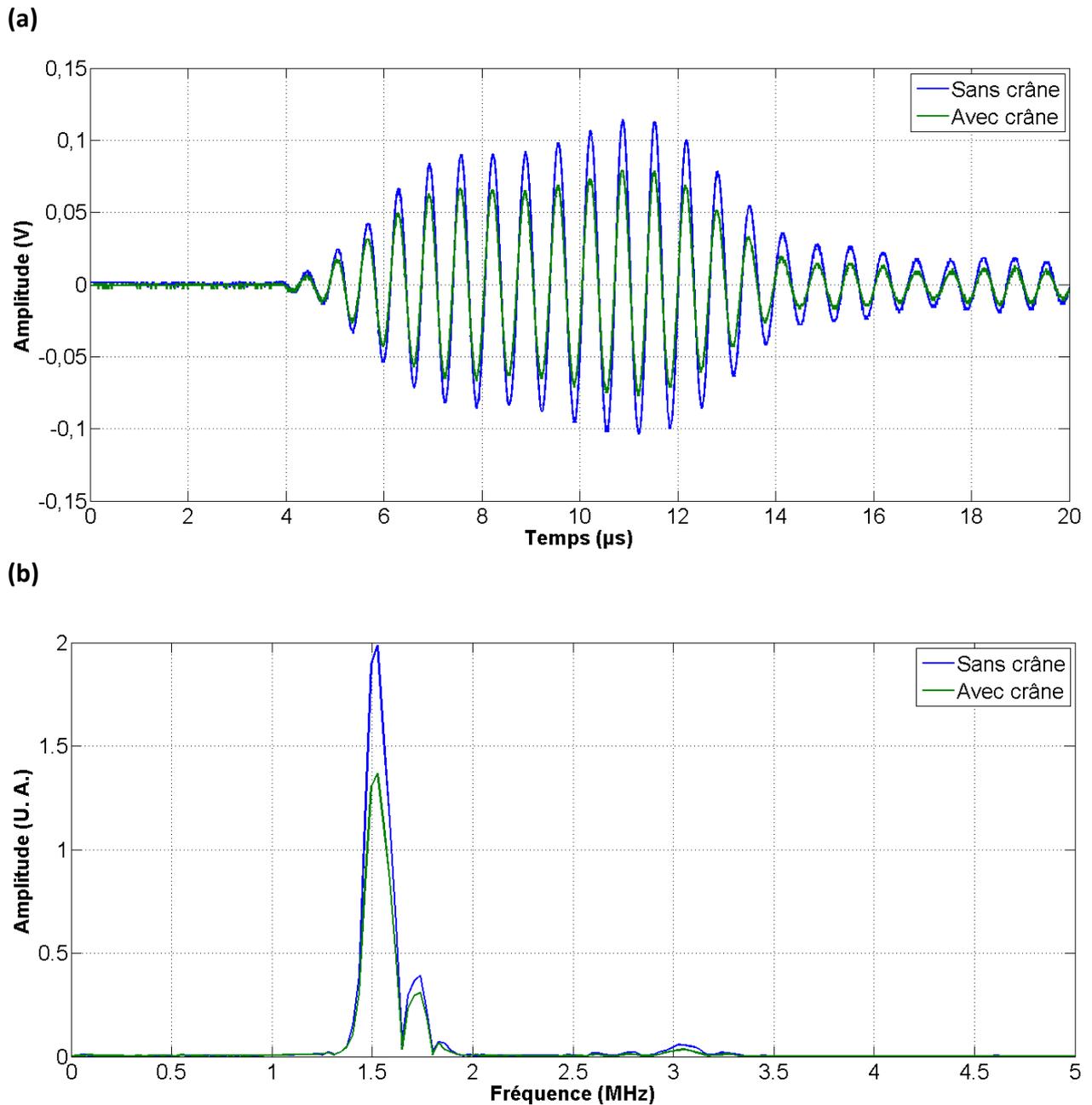


Figure 2.26 : Exemples de signaux mesurés en présence et en absence du crâne de souris, pour la sonde Sonic Concepts utilisée à 1,5 MHz. Les signaux temporels (a) et leurs spectres respectifs (b) sont représentés.

b. Distorsion

La mesure de la distorsion se fait en réalisant des profils spatiaux de pression en présence et en absence du crâne. Il s'agit alors de voir si le crâne exerce une influence sur le faisceau ultrasonore, en particulier sur la tâche focale. Dans notre cas, nous avons utilisé des profils de pression latéraux, mesurés le plus près possible de la région focale (pour les crânes de souris ; à une distance d'environ 4 mm du cône, dans la direction axiale). En effet, lors de mesures sur un crâne de souris, les parois de celui-ci sont très proches de l'hydrophone lorsque ce dernier est positionné au niveau de la focale. Ainsi, le déplacement latéral de l'hydrophone devient complexe, et il est alors préférable de l'éloigner du crâne dans la direction axiale.

II. Mesures sur des crânes de souris

Les mesures d'atténuation ultrasonore du crâne de souris ont été réalisées aux différentes fréquences utilisées dans les expériences *in vivo* (0,5, 1, 1,5 et 2,25 MHz). Des mesures supplémentaires ont également été effectuées à d'autres fréquences, pour des travaux en cours de réalisation ou en projet (Tableau 2.3). Les calottes crâniennes utilisées pour ces mesures étaient conservées à -20 °C avant les mesures, puis à 4 °C dans une solution de chlorure de sodium (NaCl ; 0,9 %) durant la période de mesures.

Fréquence (MHz)	Atténuation (%)	Ecart-type (%)
0,22	6	1
0,43	10	-
0,5	12	2
1	20	2
1,5	26	1
2	32	3
2,25	40	3
3,5	59	10
5	70	8

Tableau 2.3 : Mesures d'atténuation effectuées sur des crânes de souris ($1 \leq N \leq 5$). Les valeurs présentées sont la moyenne des mesures réalisées sur N crânes (pour 0,43 MHz, $N = 1$, en raison de contraintes expérimentales, d'où l'absence d'écart-type). La majorité des mesures a été réalisée à différents voltages, et les valeurs présentées en sont une moyenne.

Certaines des mesures se sont révélées être assez variables d'un crâne à l'autre, et même d'une mesure à l'autre sur le même crâne. L'un des éléments pouvant expliquer cette variabilité est le positionnement initial de l'hydrophone au niveau d'un point de repère du crâne (*e.g.*, Bregma). En effet, la relative grande taille de la capsule de l'hydrophone par rapport au crâne de souris limite la précision de ce positionnement, ce qui peut introduire de la variabilité dans les mesures. Un autre élément pouvant entrer en compte dans cette variabilité est l'orientation du crâne par rapport à l'axe de la sonde, car c'est un paramètre qu'il est parfois difficile de maîtriser pour des crânes aussi petits. Enfin, nous avons remarqué que le fait d'effectuer des mesures dans des zones proches de sutures du crâne augmentait notablement les valeurs d'atténuation. En effet, les sutures sont des structures susceptibles d'influencer la propagation du faisceau ultrasonore, à travers des phénomènes de diffraction

ou de diffusion par exemple. Là encore, comme les crânes de souris sont de petite taille, la probabilité que l'hydrophone mesure des effets dus à une suture est plus élevée que pour un crâne de plus grande taille.

Ainsi, afin de déterminer les valeurs d'atténuation, nous avons dû exclure certaines mesures, trop éloignées de la valeur médiane (distance de l'ordre de 10 % ou plus par rapport à cette valeur).

En ce qui concerne les mesures de distorsion, celles-ci ont été effectuées à trois fréquences différentes, à savoir 0,5, 1 et 2 MHz (valeur intermédiaire entre les fréquences 1,5 et 2,25 MHz, utilisées en *in vivo*). A cet effet, des profils latéraux dans les directions x^{40} et y^{41} ont été réalisés sur cinq calottes crâniennes différentes (Fig. 2.27).

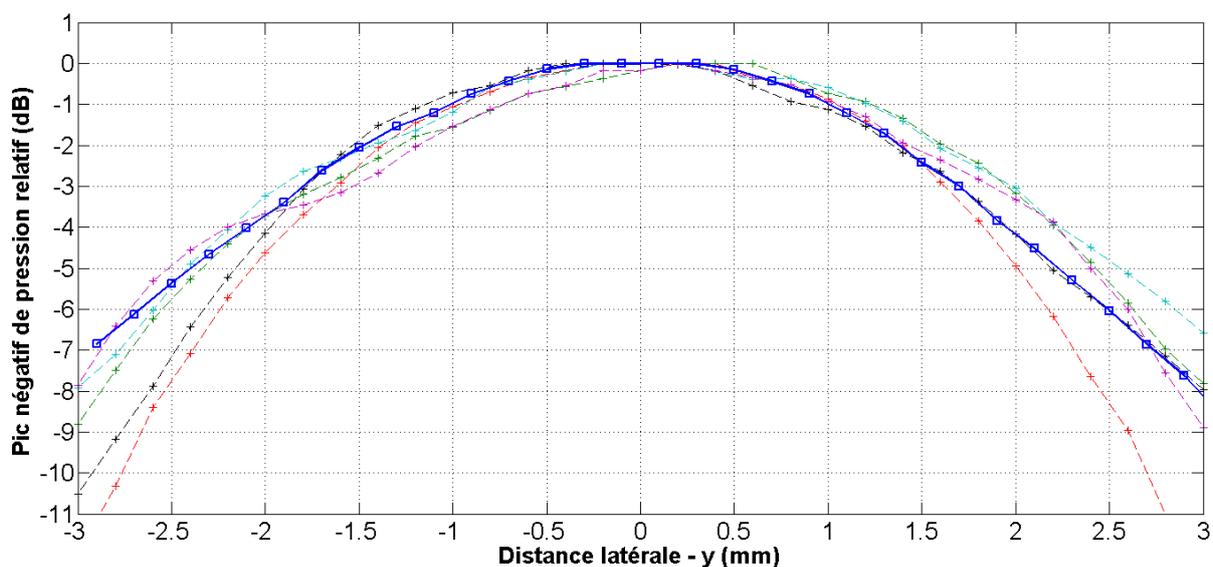


Figure 2.27 : Exemple de profils latéraux de pression réalisés en présence et en absence de crânes de souris, à une fréquence de 0,5 MHz (sonde Imasonic), afin d'évaluer la distorsion causée par les crânes. Les profils réalisés avec crâne (N = 5) sont représentés en pointillés et en trait fin, alors que celui réalisé sans crâne est représenté en trait plein et gras. Tous les profils ont été réalisés avec le cône associé à la sonde, à une distance de 4 mm après son sommet, dans la direction axiale.

Afin de comparer les cas avec et sans crâne, une moyenne des profils latéraux de pression réalisés avec les cinq crânes a été effectuée (Figures 2.28 à 2.30). Les figures 2.28 et 2.29 indiquent qu'à basse fréquence (0,5 et 1 MHz), le faisceau ultrasonore est peu influencé par le crâne de souris, en termes de distorsion. En effet, seule une légère déformation du faisceau est visible sur les profils de pression réalisés suivant la direction x . A la fréquence de 2 MHz, le profil réalisé suivant cette même direction montre un effet de distorsion un peu plus prononcé, mais relativement limité. En effet, on observe un décalage latéral du maximum de pression de l'ordre de 0,4 mm, et une largeur de faisceau un peu plus grande ($\approx 1,8$ mm, contre $\approx 1,6$ mm sans le crâne, à -3 dB). Par ailleurs, les profils réalisés à 1 et 2 MHz, suivant la direction x , montrent une différence d'amplitude entre le lobe principal et les lobes

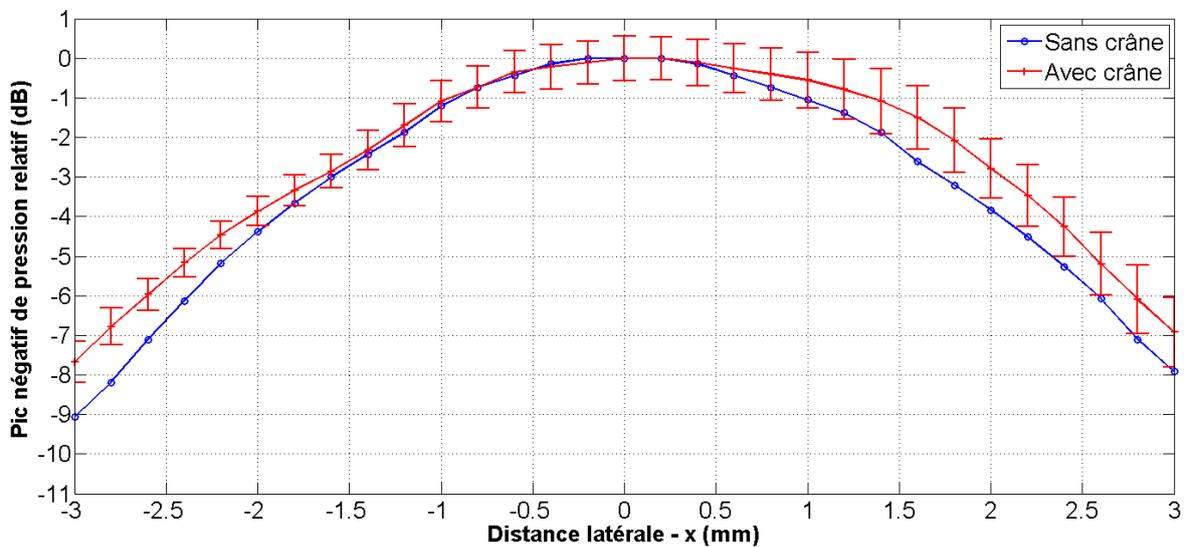
⁴⁰ Direction latérale suivant la largeur de la calotte crânienne (axe médiolatéral).

⁴¹ Direction latérale suivant la longueur de la calotte crânienne (axe antéropostérieur).

secondaires moins importante en présence du crâne qu'en son absence. L'impact de cet effet est néanmoins limité, puisque l'amplitude des lobes secondaires reste bien moins importante que celle du lobe principal. Enfin, les profils de pression réalisés suivant la direction y montrent qu'aucune distorsion n'a lieu suivant cette direction, quelle que soit la fréquence utilisée. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que le crâne possède une courbure moins importante suivant cette direction, en comparaison de la direction x.

Les mesures de profils latéraux montrent donc que l'effet de distorsion des crânes de souris est négligeable aux fréquences utilisées dans les expériences *in vivo*. Ainsi, seule l'atténuation générée par ces crânes sur le faisceau ultrasonore mérite d'être prise en compte à ces fréquences-là.

(a)



(b)

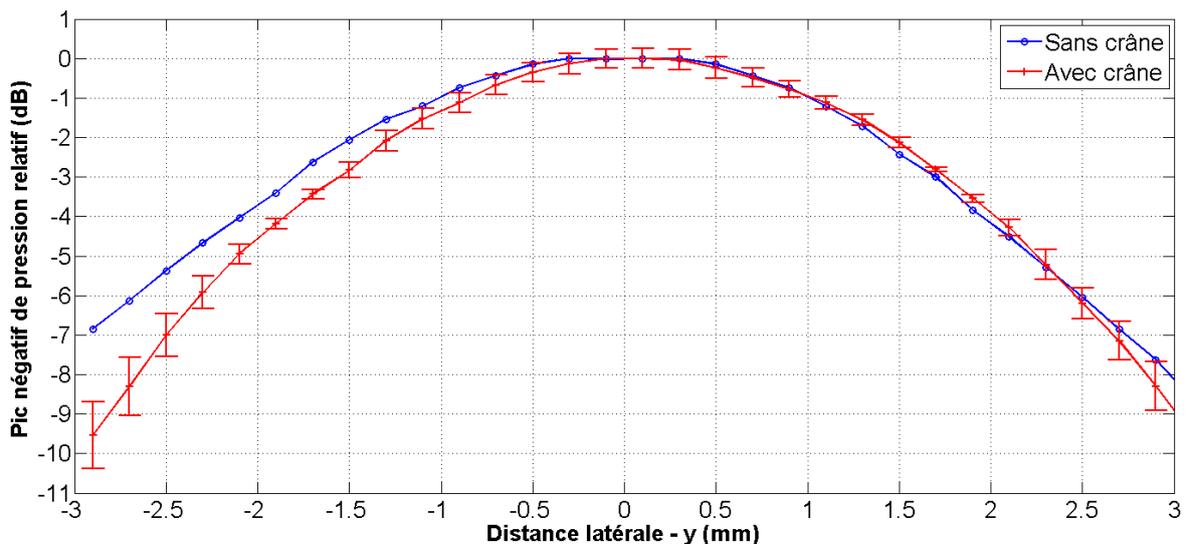


Figure 2.28 : Profils latéraux de pression réalisés dans la direction x (a) et la direction y (b), en présence et en absence de crâne de souris, à une fréquence de 0,5 MHz (sonde Imasonic). Le profil représentant la mesure avec crâne est la moyenne de mesures sur cinq calottes crâniennes différentes. Les barres d'erreur sont représentées en erreur type de la moyenne (SEM). Tous les profils ont été réalisés avec le cône associé à la sonde, à une distance de 4 mm après son sommet, dans la direction axiale.

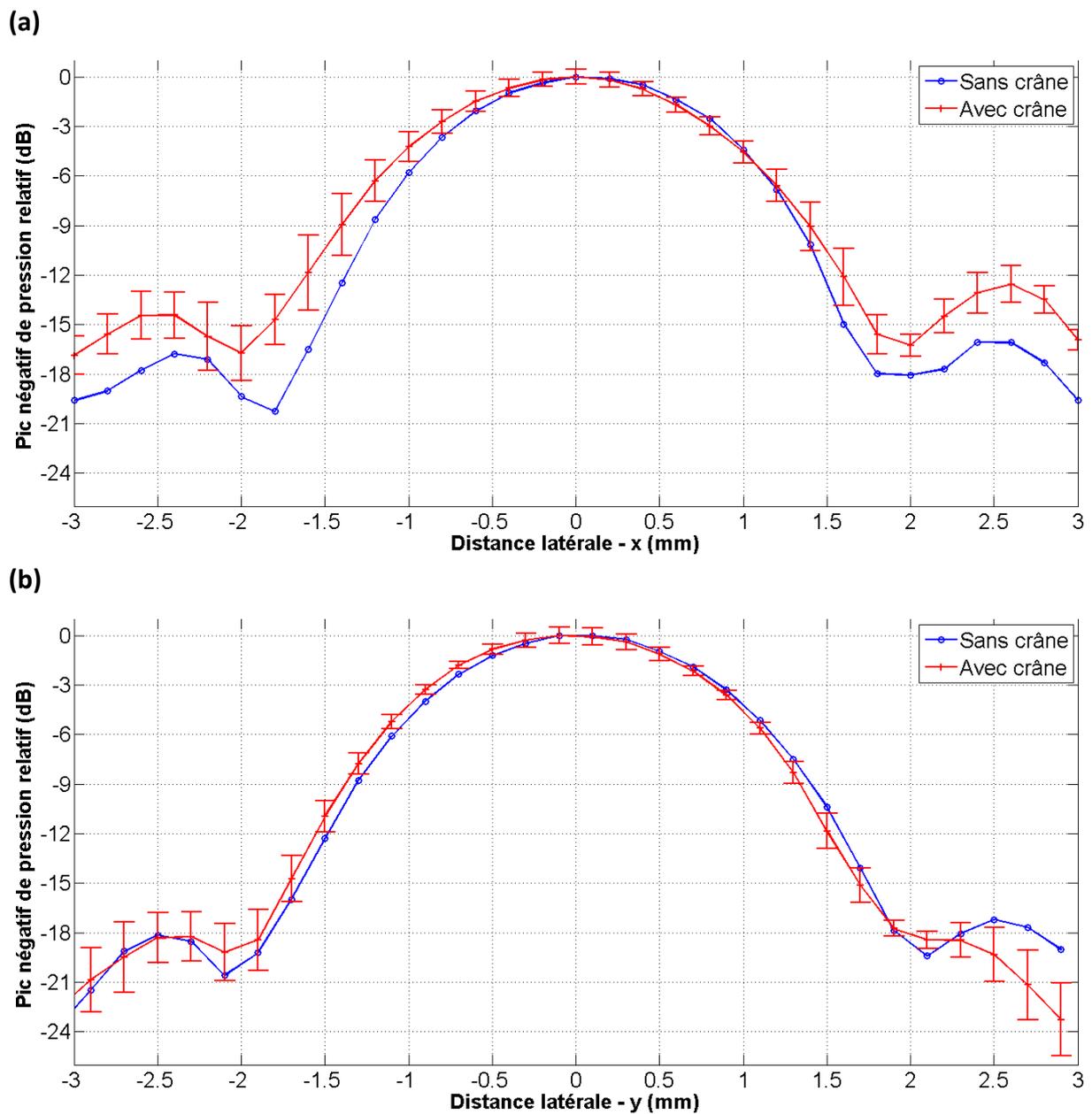


Figure 2.29 : Profils latéraux de pression réalisés dans la direction x (a) et la direction y (b), en présence et en absence de crâne de souris, à une fréquence de 1 MHz. Le profil représentant la mesure avec crâne est la moyenne de mesures sur cinq calottes crâniennes différentes. Les barres d'erreur sont représentées en erreur type de la moyenne (SEM). Tous les profils ont été réalisés avec le cône associé à la sonde, à une distance de 4 mm après son sommet, dans la direction axiale.

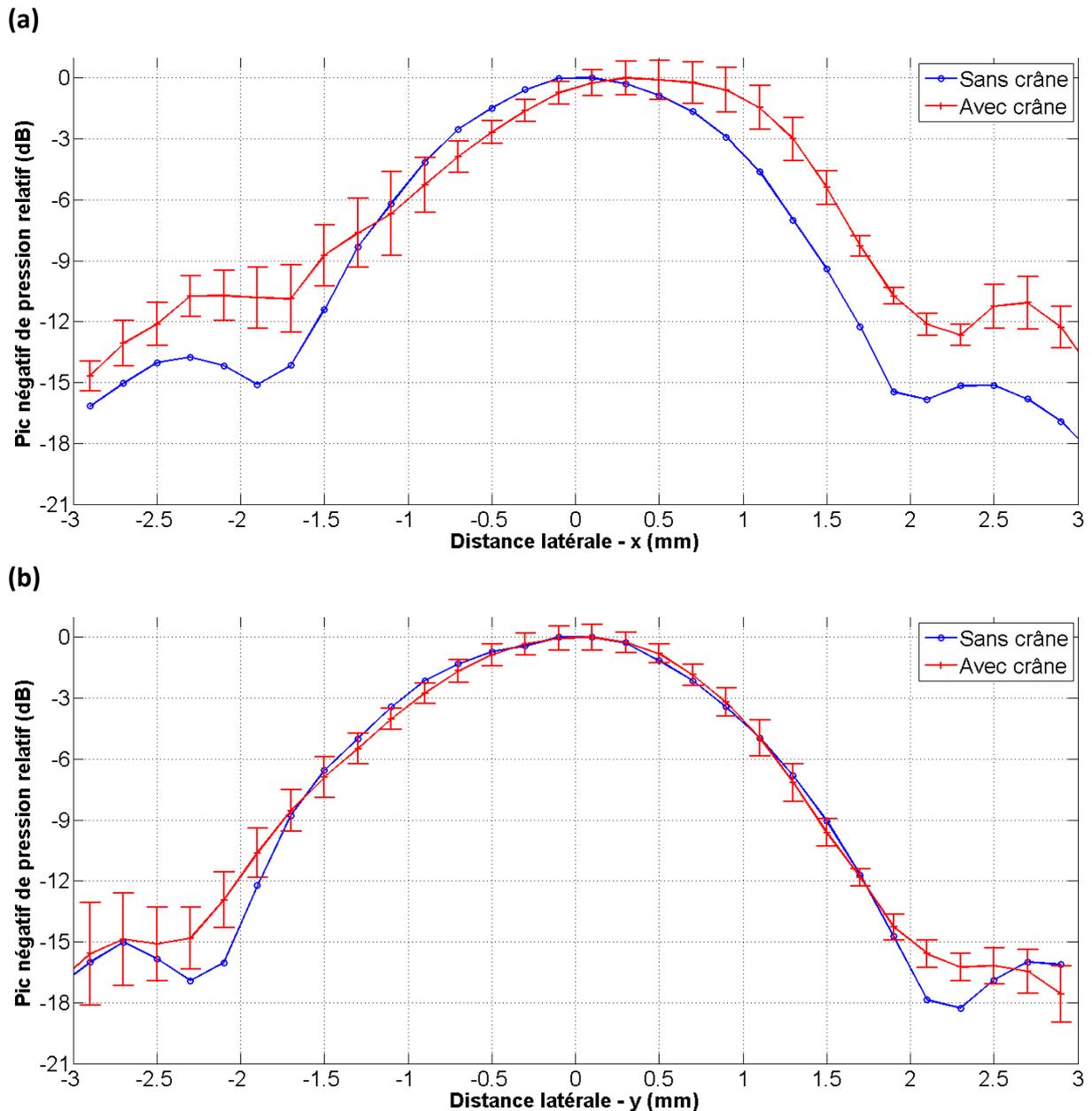


Figure 2.30 : Profils latéraux de pression réalisés dans la direction x (a) et la direction y (b), en présence et en absence de crâne de souris, à une fréquence de 2 MHz. Le profil représentant la mesure avec crâne est la moyenne de mesures sur cinq calottes crâniennes différentes. Les barres d'erreur sont représentées en erreur type de la moyenne (SEM). Tous les profils ont été réalisés avec le cône associé à la sonde, à une distance de 4 mm après son sommet, dans la direction axiale.

III. Mesures sur des crânes de rats

Sur les crânes de rats, nous avons mesuré l'atténuation des ondes ultrasonores aux fréquences 0,5 et 1 MHz, retenues pour des études *in vivo* sur cet animal. Pour la première fréquence, l'objectif des expériences *in vivo* était de stimuler le cortex moteur primaire (M1) et le cortex cingulaire antérieur (ACC). Ainsi, l'atténuation a été mesurée aux coordonnées correspondant à ces régions cérébrales, mais également à d'autres coordonnées, pour comparaison (Tableau 2.4). Par ailleurs, ces mesures ont été effectuées à différents voltages

d'entrée (ceux susceptibles d'être utilisés durant les expériences *in vivo*). Les résultats de ces mesures ayant révélé des écart-types de l'ordre de 1% ou moins, c'est la moyenne de l'atténuation, mesurée aux différents voltages, qui a été prise en compte.

Coordonnées (en mm)	Atténuation (%)	Ecart-type (%)
AP = 0 ; ML = 0 (Bregma)	31	10
AP = + 1,44 ; ML = 0 (ACC)	20	4
AP = + 1,44 ; ML = -2,4 (M1)	33	6
AP = + 1,44 ; ML = +2,4 (M1)	26	4
AP = -2 ; ML = -2,4	22	4
AP = -2 ; ML = +2,4	18	2

Tableau 2.4 : Mesures d'atténuation effectuées à une fréquence de 0,5 MHz (sonde Imasonic associée à son cône) sur des crânes de rats. Les valeurs présentées sont la moyenne des mesures réalisées sur 2 à 3 crânes et en utilisant différents voltages d'entrée (voltages susceptibles d'être utilisés dans les expériences *in vivo*). Les écarts-types ont été moyennés sur les différents voltages utilisés. Les coordonnées sont indiquées par rapport au Bregma, dans les directions antéropostérieure (AP) et médio-latérale (ML). La coordonnée AP = -2 mm (avec ML = ± 2,4 mm) correspond à des zones situées assez loin des sutures, où le crâne a une géométrie relativement uniforme.

Les résultats montrent, de manière assez attendue, que l'atténuation est plus élevée au niveau et à proximité des sutures et du Bregma, en comparaison des zones situées loin de ces derniers. Aussi, une remarque similaire peut être faite en ce qui concerne la variabilité des mesures.

Pour la fréquence de 1 MHz, des mesures analogues ont été effectuées, pour un autre type d'expériences *in vivo*. Celles-ci ont la particularité d'avoir été réalisées sur des rats des deux sexes, sachant que les rats mâles ont un poids corporel significativement plus important (500-600 g dans notre cas, contre ≈ 300 g pour les femelles). Par conséquent, les mesures d'atténuation ont été réalisées sur des crânes issus de rats mâles et femelles, afin d'en effectuer la comparaison (Tableau 2.5).

Coordonnée antéropostérieure (ML = +3,15 mm)	Crânes de rats femelles		Crânes de rats mâles	
	Atténuation (%)	Ecart-type (%)	Atténuation (%)	Ecart-type (%)
Bregma - 3 mm	61	-	63	1
Bregma - 2,5 mm	59	-	62	3
Bregma - 2 mm	60	-	65	6
Bregma - 1,5 mm	63	6	60	4
Bregma - 1 mm	60	1	61	3
Bregma - 0,5 mm	60	24	66	8
Bregma	84	-	69	1
Bregma + 0,5 mm	75	-	84	-
Bregma + 1 mm	88	-	84	-
Bregma + 1,5 mm	93	-	90	-
Bregma + 2 mm	66	-	84	-

Tableau 2.5 : Mesures d'atténuation effectuées à une fréquence de 1 MHz (sonde utilisée avec le cône correspondant) sur des crânes issus de rats mâles et femelles. Les mesures ont été réalisées à une coordonnée médio-latérale (ML) constante de +3,15 mm par rapport au Bregma. Les valeurs présentées sont la moyenne des mesures réalisées sur deux crânes (deux pour chaque sexe). Les valeurs manquantes (tirets) correspondent aux coordonnées auxquelles certains crânes (un de chaque sexe) ne permettaient pas d'effectuer de mesures, en raison de la manière dont ils ont été découpés. A ces coordonnées, les résultats représentent donc les mesures effectuées sur un seul crâne.

Comme précédemment, avec les mesures réalisées à 0,5 MHz ainsi que celles réalisées sur les crânes de souris, les mesures effectuées à 1 MHz confirment le fait que l'atténuation mesurée au niveau ou à proximité de sutures est plus élevée (Bregma et zones voisines). En particulier, les parties du crâne situées aux coordonnées antéropostérieures positives (avant du crâne), de texture assez irrégulière, sont plus atténuantes que celles situées aux coordonnées négatives (centre du crâne), qui présentent un aspect plus uniforme. D'autre part, la comparaison entre les crânes issus de rats mâles et femelles ne révèle pas de différence significative en ce qui concerne l'atténuation ultrasonore à 1 MHz.

IV. Conclusions

A travers ce chapitre, nous avons vu tous les éléments essentiels à la réalisation d'expériences de neurostimulation ultrasonore *in vivo*. La première partie a servi à présenter les sondes ultrasonores utilisées à cet effet ainsi que leur caractérisation, incluant aussi bien le volet expérimental que la simulation. La seconde partie s'est concentrée sur les effets du crâne sur le faisceau ultrasonore, notamment l'atténuation et la distorsion. Ainsi, nous avons vu, chez la souris, que la distorsion est négligeable aux fréquences utilisées en *in vivo* (0,5 à 2,25 MHz). Quant à l'atténuation, nous avons vu qu'elle est faible pour de basses fréquences (6-12 % pour des fréquences $\leq 0,5$ MHz), mais qu'elle devient significative lorsque la fréquence augmente (e.g., 40 % à 2,25 MHz). D'autre part, les mesures ont montré que les sutures du crâne augmentent sensiblement l'atténuation, potentiellement en raison d'une diffraction et/ou d'une diffusion des ondes ultrasonores. Cette observation s'est particulièrement vérifiée dans les mesures sur des crânes de rat, qui permettent de mieux évaluer cet aspect du fait de leur plus grande taille. Aussi, et de manière attendue, ces mesures réalisées chez le rat ont révélé une atténuation globalement bien plus élevée que celle mesurée sur les crânes de souris, moins épais. Enfin, la comparaison entre des crânes de rats des deux sexes, dont le poids corporel est significativement différent, n'a pas révélé de différence du point de vue de l'atténuation ultrasonore.

Le chapitre suivant traite des expériences de neurostimulation ultrasonore *in vivo* réalisées chez la souris. Les valeurs d'atténuation présentées dans ce chapitre ont ainsi été appliquées aux courbes de sensibilité utilisées durant ces expériences *in vivo*.

Chapitre 3 : Neurostimulation ultrasonore chez la souris : impact des paramètres ultrasonores et des propriétés du faisceau acoustique

Les nombreuses études sur la neurostimulation ultrasonore décrites dans le premier chapitre ont montré qu'à ce jour, l'impact d'un large éventail de paramètres acoustiques sur l'efficacité de la technique a été analysé. Néanmoins, l'idée principale qui émerge de ces différents travaux est que le choix de paramètres idoines n'est pas encore arrêté. Ainsi, cela révèle l'importance de continuer à explorer ces paramètres acoustiques, dans le but d'avoir une neurostimulation ultrasonore précise, efficace, fiable et sûre. Les travaux de thèse que nous avons menés *in vivo*, chez la souris, s'inscrivent donc dans cette logique, et le présent chapitre s'emploie à les présenter. En particulier, l'article original publié à ce sujet, qui décrit le contexte, les matériels et méthodes ainsi que les résultats relatifs à ces expériences, est inséré dans ce chapitre. Au préalable, un résumé du contenu de cet article est présenté en début de chapitre.

I. Résumé étendu de l'article original

1. Objet de l'étude

L'étude de la neurostimulation ultrasonore au sein de notre laboratoire a débuté avec les travaux de Legrand *et al.*, qui ont porté sur l'application de cette technique chez un modèle murin de dépression [27]⁴². Sur la base de ces travaux et de la littérature existante, nous avons entrepris une étude sur l'influence de différents paramètres acoustiques sur la neurostimulation ultrasonore chez la souris. Ces paramètres sont la fréquence, la pression acoustique (pic négatif de pression, noté PNP), la durée de l'impulsion ultrasonore ainsi que le diamètre de tâche focale. Ainsi, des fréquences ultrasonores de 0,5, 1, 1,5 et 2,25 MHz ont été testées, à une durée d'impulsion fixe de 160 ms, et aux plages de PNP respectives suivantes : 55 – 550 kPa, 110 – 770 kPa, 520 – 1460 kPa et 530 – 1070 kPa (intensités I_{SPTA} correspondantes situées entre 0,001 et 1,1 W/cm²). La durée d'impulsion a été testée à une fréquence constante de 1,5 MHz, avec trois valeurs différentes, à savoir 53,3, 160 et 320 ms, correspondant respectivement à des nombres de cycles de 80 000, 240 000 et 480 000, et pour des PNP compris entre 520 et 1460 kPa. Enfin, le diamètre de tâche focale a été étudié en utilisant deux sondes de fréquence centrale 0,5 MHz (Imasonic et Sonic Concepts), dont les tâches focales mesurent 3 et 2,2 mm de large, respectivement (à -3 dB). Cette dernière expérience a été réalisée à une durée d'impulsion fixe de 160 ms, pour des PNP allant de 55 à 550 kPa.

⁴² Se référer à l'article original, plus loin dans le chapitre, pour les références indiquées.

2. Matériel et méthodes

Pour réaliser ces expériences, nous avons utilisé des souris Balb/c mâles adultes (âgées de neuf semaines), dont nous avons ciblé le cortex moteur primaire (M1) gauche⁴³ avec des ultrasons et observé les réponses motrices provoquées au niveau de la patte avant droite. L'évaluation de ces réponses s'est faite visuellement, d'une part, notamment en utilisant une caméra filmant l'animal durant l'expérience, et à l'aide de l'électromyographie, d'autre part. Dans les deux cas, le comptage des réponses motrices a permis de calculer un taux de succès, afin d'évaluer l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore pour un jeu de paramètres acoustiques donné. En complément de ces deux modalités, des analyses immunohistochimiques (détection de la protéine c-Fos) ont été menées sur les tissus de la zone cérébrale ciblée, afin d'évaluer l'effet de la neurostimulation ultrasonore sur l'activation neurale. L'ensemble des résultats obtenus a été soumis à une analyse statistique de type one-way ANOVA, suivie de tests de comparaisons multiples (tests de Tukey post-hoc), pour lesquels une différence est considérée comme significative si $p \leq 0,05$.

Durant toute la durée des expériences, les souris étaient maintenues sous anesthésie gazeuse, à l'aide d'un masque facial permettant de diffuser le gaz dans leurs voies respiratoires. Le mélange anesthésique était composé de Vetflurane (Vibrac, Carros, France) et de dioxygène (2 L/mn). Le taux de Vetflurane dans le mélange variait de 3 % lors de l'endormissement de l'animal, à 0,25 % durant les phases de neurostimulation. Par ailleurs, durant ces expériences, les souris étaient placées sur un plateau chauffant, relié à un dispositif de contrôle de température, permettant de maintenir leur température à 37 °C. Enfin, une autre partie importante du dispositif expérimental est le cadre stéréotaxique, utilisé pour la fixation des animaux à l'aide de barres d'oreilles, mais aussi pour le maintien et le déplacement de la sonde ultrasonore. En effet, le cadre comprend un dispositif de déplacement en 3D, composé de chariots munis de vis micrométriques, qui permettent des déplacements de l'ordre de 0,01 mm. Par ailleurs, il est à noter que chaque sonde ultrasonore était munie d'un cône en plexiglas rempli d'eau dégazée, utilisé pour faire coïncider la tâche focale du faisceau avec la zone cible du cerveau (Fig. 1-a de l'article).

D'autre part, les expériences ont été réalisées sans ouvrir le scalp des animaux, afin d'éviter les désagréments liés à la chirurgie. Ainsi, pour le positionnement de la sonde au niveau des coordonnées voulues, nous avons défini un repère visuel externe, qui est la crête occipitale du crâne de souris. En effet, cette dernière forme un relief à l'arrière du crâne qui est aisément identifiable à l'œil nu. Afin de définir ce point comme repère, nous avons mesuré la distance moyenne (7,6 mm) qui le sépare du Bregma sur dix souris⁴⁴, préalablement aux expériences de neurostimulation. En outre, des mesures ont été réalisées *ex vivo* sur des

⁴³ Coordonnées : Bregma + 0,5 mm dans la direction antéropostérieure ; Bregma + 1,7 mm dans la direction médiolatérale.

⁴⁴ Non utilisées dans les expériences de neurostimulation par la suite.

calottes crâniennes de souris afin d'évaluer l'atténuation et la distorsion subies par le faisceau ultrasonore (cf. Chapitre 2, pp. 102 – 108).

Par ailleurs, le protocole expérimental des expériences *in vivo* a longuement été éprouvé au préalable, et a été perfectionné au fur et à mesure de nombreux tests. Il se découpe en six étapes principales, avant le début des séries de neurostimulation ultrasonore :

- Fixation de l'animal (anesthésie à 3 % ; environ 5 min) ;
- Repérage de la crête occipitale, puis déplacement de la sonde aux bonnes coordonnées (avec application de gel ultrasonore entre le cône et la tête de l'animal ; anesthésie à 3 % ; environ 5 min) ;
- Diminution de la concentration d'anesthésie à 1 % et attente de 5 min ;
- Diminution de la concentration d'anesthésie à 0,25 % et attente de 5 min ;
- Test de l'éveil et des réflexes de l'animal, en le touchant ou en lui pinçant une patte arrière ou la queue (étape facultative) ;
- Réalisation de quelques stimulations tests, afin d'évaluer la présence de réponses motrices et leur qualité ; en cas de tests insatisfaisants, des tests supplémentaires étaient réalisés autour de la zone des coordonnées initiales, dans un rayon de 0,1 – 0,2 mm.

A la suite de ces étapes, les séries de neurostimulation ultrasonore de l'animal étaient lancées (10 répétitions pour chaque PNP, à f et DI fixes ; $IIS = 10$ s), et duraient généralement 15 à 25 min environ. Cette durée variait essentiellement en fonction du nombre de paliers de pression à tester (entre 7 et 10, suivant la fréquence testée), mais aussi de l'éveil de l'animal. En effet, si ce dernier se réveillait en cours d'expérience, il était nécessaire de le rendormir en augmentant la concentration d'anesthésie à 2 %, puis de rediminuer progressivement celle-ci à 0,25 %, avant de reprendre les stimulations 5 à 10 min après l'éveil. Finalement, chaque animal était exposé à une centaine de stimulations au total, en comptant les stimulations tests précédant les séries.

Dans le cas particulier des animaux chez qui les réponses motrices étaient également évaluées par électromyographie, des séries de stimulation supplémentaires étaient réalisées. Ainsi, les souris étaient rendormies à la fin des premières séries de stimulations (anesthésie à 2 %), afin de placer les aiguilles d'EMG au niveau de leur patte avant droite. La concentration d'anesthésie était ensuite à nouveau diminuée de manière progressive jusqu'à 0,25 %, sur un laps de temps de 5 à 10 min, avant de débiter les nouvelles séries de stimulation.

En ce qui concerne le comptage des réponses motrices, celui-ci était réalisé en traitant les données obtenues par électromyographie. Un programme informatique permettait ainsi de filtrer les signaux bruts par un filtre passe-bas, puis de les compter ou non comme des réponses motrices, suivant des conditions fixées sur leur latence, leur amplitude et leur durée. Quant à l'évaluation visuelle de ces réponses, elle se faisait en s'aidant d'une LED, qui s'allumait simultanément à la stimulation durant 0,5 s. Ainsi, seuls les mouvements survenant

avant l'extinction de la lampe étaient considérés comme des réponses motrices. Un descriptif plus détaillé de ces évaluations de réponses motrices est disponible à la quatrième page de l'article original.

3. Résultats et Discussion

Les résultats de ces expériences ont montré, tout d'abord, que le taux de succès suit une croissance sigmoïdale en fonction du PNP appliqué (ou de l'intensité I_{SPTA} correspondante), quels que soient la fréquence, la durée d'impulsion ou le diamètre de tâche focale testés (Figures 2 – 5 de l'article). En particulier, un plateau à 90 - 100 % de taux de succès a été observé pour plusieurs jeux de paramètres acoustiques. Par exemple, cette observation s'est vérifiée à la fréquence de 0,5 MHz (durée d'impulsion de 160 ms ; pour les deux sondes utilisées à cette fréquence), confirmant ainsi des résultats observés précédemment dans la littérature [26], [27].

Ensuite, les résultats ont montré que l'augmentation de la fréquence impliquait d'augmenter le PNP / I_{SPTA} appliqué(e) afin de maintenir une efficacité équivalente de la neurostimulation ultrasonore (Fig. 2 de l'article). Cette observation a particulièrement été confirmée entre les fréquences 1 et 2,25 MHz, à diamètre de tâche focale et durée d'impulsion fixes. En outre, les résultats obtenus visuellement ont montré que lorsque la fréquence augmente, la pente de la sigmoïde diminue, nécessitant ainsi une plage de PNP / I_{SPTA} plus large pour passer du plateau inférieur au plateau supérieur de la sigmoïde. Cependant, entre les fréquences 1,5 et 2,25 MHz, les résultats ont montré une tendance inverse. En effet, les PNP / I_{SPTA} requis pour atteindre un taux de succès donné étaient plus faibles à 2,25 qu'à 1,5 MHz. Or, parmi les fréquences que nous avons testées lors de ces expériences, l'augmentation de 1,5 à 2,25 MHz était la seule qui s'accompagnait d'une augmentation du diamètre de tâche focale. Ainsi, nous avons remarqué que lorsque la fréquence augmente, le PNP requis pour avoir un taux de succès maximal n'augmente pas systématiquement, mais suit plutôt une tendance opposée à celle du diamètre de tâche focale. L'hypothèse que nous avons avancée pour expliquer cette observation est que la population neuronale stimulée diminue lorsque le diamètre de la tâche focale diminue, nécessitant ainsi un PNP / I_{SPTA} plus élevé(e) pour avoir une efficacité équivalente à celle d'une tâche focale plus grande.

Ces différents éléments nous ont amenés à étudier le rôle joué par diamètre de tâche focale dans l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore. Tel qu'évoqué précédemment, nous avons comparé les taux de succès obtenus avec deux diamètres de tâche focale différents (2,2 et 3 mm, mesurés à -3 dB), à une fréquence constante de 0,5 MHz, une durée d'impulsion fixe de 160 ms, et pour des PNP variant entre 55 et 550 kPa (Fig. 5 de l'article). Les résultats correspondants n'ont montré aucune différence significative entre les deux tâches focales ($p > 0,05$). Néanmoins, nous avons remarqué une tendance à obtenir des taux de succès plus faibles avec le diamètre le plus petit (à PNP fixé, et pour des PNP < 330 kPa), ce qui va dans le sens de l'hypothèse citée précédemment. Cette analyse, combinée aux résultats

présentés par Ye *et al.*, à ce sujet [28], démontrent que des études approfondies, et éventuellement réalisées à d'autres fréquences, sont nécessaires avant de statuer sur l'influence du diamètre de tâche focale sur l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore.

D'autre part, les analyses immunohistochimiques réalisées sur le cortex moteur ciblé, aux différentes fréquences utilisées, ont révélé que l'activation neuronale était étroitement liée au PNP maximal, appliqué à chaque fréquence pour avoir un taux de succès maximal, et au diamètre de tâche focale (Figures 6 et 8 de l'article). En effet, le nombre de cellules activées varie de manière comparable au PNP maximal, et esquisse une tendance inverse à celle du diamètre de tâche focale correspondant à chaque fréquence. Ainsi, le raisonnement qui émerge de ces observations est qu'une diminution du diamètre de tâche focale nécessiterait d'augmenter la valeur de PNP / I_{SPTA} à utiliser pour avoir un taux de succès maximal, ce qui générerait une activation neuronale plus efficace, et inversement.

Par ailleurs, les analyses immunohistochimiques ont démontré que, pour toutes les durées d'impulsion testées (53,3, 160 et 320 ms, à fréquence fixe de 1,5 MHz), l'activation neuronale était significativement plus élevée lors de la stimulation, en comparaison du groupe non stimulé ($p < 0,01$; Fig. 7 de l'article). En outre, l'étude de l'influence de la durée d'impulsion a montré que, à fréquence fixée (1,5 MHz) et à pression donnée, les taux de succès obtenus pour 160 et 320 ms étaient significativement plus élevés que pour 53,3 ms ($p < 0,05$; Fig. 4 de l'article). Aussi, il a été remarqué que l'utilisation d'une durée d'impulsion de 160 ms avait tendance à donner des taux de succès plus élevés qu'une durée de 320 ms. Cette dernière observation confirme l'idée de saturation de l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore pour les longues durées d'impulsion [26], qui seraient plus enclines à générer des effets inhibiteurs plutôt qu'excitateurs [29].

Ces différents résultats démontrent que l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore dépend en grande partie des paramètres acoustiques choisis, mais également des propriétés géométriques de la sonde utilisée, qui, avec la fréquence, déterminent la taille de la tâche focale.

4. Conclusions

Ce chapitre est consacré à la partie centrale des travaux de thèse décrits dans le présent manuscrit, à savoir les expériences de neurostimulation ultrasonore *in vivo* réalisées sur souris, et à l'article original publié à ce sujet.

Les résultats relatifs à ces expériences ont été obtenus à l'aide d'une évaluation visuelle des réponses motrices, puis confirmés par électromyographie. Ils ont montré, premièrement, que le taux de succès augmente de manière sigmoïdale avec le PNP jusqu'à une valeur maximale (90 – 100 %), pour différentes fréquences (0,5, 1, 1,5 ou 2,25 MHz), durées d'impulsions ou diamètres de tâche focale utilisés. Le second élément important que ces résultats ont mis en évidence est la nécessité d'augmenter le PNP lorsque la fréquence augmente, pour conserver la même efficacité de neurostimulation. En parallèle, il a été

montré que cette variation du PNP était associée à une variation inverse du diamètre de tâche focale, démontrant ainsi une potentielle influence de ce dernier sur l'efficacité de la neurostimulation. De plus, l'évaluation immunohistochimique de la neurostimulation a révélé que le nombre de cellules activées évolue de manière similaire au PNP, et de manière opposée au diamètre de tâche focale, démontrant ainsi un lien étroit entre ces grandeurs. Ainsi, ces différents éléments démontrent que le choix des paramètres acoustiques, mais aussi des propriétés géométriques de la sonde, intervient de manière décisive dans l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore.

II. Article original

Ultrasound Neurostimulation in Mice: Impact of Ultrasound Settings and Beam Properties

Tarik Iazourene¹, Hanaa Malloul¹, Rasha M. Nouredine¹, Edward Oujagir,
Jean-Michel Escoffre¹, *Member, IEEE*, and Ayache Bouakaz², *Senior Member, IEEE*

Abstract—Ultrasound neurostimulation (USNS) is being investigated as a treatment approach for neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. Indeed, unlike the existing methods that use electric or magnetic stimulation, it offers the possibility to modulate brain activity in a noninvasive way, with good spatial specificity and a high penetration capacity. However, there is no consensus yet on ultrasound parameters and beam properties required for efficient neurostimulation. In this context, this preclinical study aimed to elucidate the effect of frequency, peak negative pressure (PNP), pulse duration (PD), and focal spot diameter, on the USNS efficiency. This was done by targeting the motor cortex (M1) of 70 healthy mice and analyzing the elicited motor responses (visually and with electromyography). Also, a further investigation was performed by assessing the corresponding neuronal activity, using c-Fos immunostaining. The results showed that the success rate, a metric that depicts USNS efficacy, increased with PNP in a sigmoidal way, reaching up to 100%. This was verified at different frequencies (0.5, 1, 1.5, and 2.25 MHz) and PDs (53.3, 160, and 320 ms, at 1.5 MHz fixed frequency). Moreover, it was shown that higher PNP values were required to achieve a constant USNS efficacy not only when frequency increased, but also when the focal spot diameter decreased, emphasizing a close link between these acoustic parameters and USNS efficacy. These findings were confirmed with immunohistochemistry (IHC), which showed a strong relationship between neural activation, the applied PNP, and the focal spot diameter.

Index Terms—c-Fos, electromyography, motor cortex, ultrasound neurostimulation (USNS), ultrasound parameters.

I. INTRODUCTION

NEUROLOGICAL disorders constitute one of the major health issues nowadays [1]. Although in the last decades,

Manuscript received November 16, 2021; accepted January 13, 2022. Date of publication January 18, 2022; date of current version March 3, 2022. This work was supported by the French National Research Agency under DEPAC Grant ANR-18-CE19-0006 and in part by the European Regional Development Fund and Région Centre-Val de Loire, DEMUS Project. (Tarik Iazourene and Hanaa Malloul contributed equally to this work.) (Corresponding authors: Jean-Michel Escoffre; Ayache Bouakaz.)

This work involved human subjects or animals in its research. Approval of all ethical and experimental procedures and protocols was granted by the Animal Care and Regional Committee for Ethics, Centre-Val de Loire, under Approval No. 2016101816276148.

Tarik Iazourene, Hanaa Malloul, Edward Oujagir, Jean-Michel Escoffre, and Ayache Bouakaz are with the UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 37000 Tours, France (e-mail: jean-michel.escoffre@univ-tours.fr; ayache.bouakaz@univ-tours.fr).

Rasha M. Nouredine is with the UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 37000 Tours, France, and also with Signals and Images, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Hadath 1003, Lebanon.

Digital Object Identifier 10.1109/TUFFC.2022.3144335

many improvements have been achieved in medical research for treating these brain diseases and their associated symptoms [2], for many of these disorders, and particularly concerning the neuropsychiatric and neurodegenerative ones, it is still required to discover adapted and reliable therapies [3]. Indeed, some diseases, such as depression show high resistance to pharmaceutical agents [4], while others do not even have adequate or efficient treatments [5].

In this context, neurostimulation methods have emerged as promising alternatives for the treatment of these brain disorders. They consist in using electric fields, in the case of transcranial direct current stimulation (tDCS) and deep brain stimulation (DBS), or magnetic fields, in the case of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS), in order to modulate neural activity in the targeted brain areas, thus resulting in therapeutic effects [6]–[8]. In many cases, these methods have shown very promising results. Nevertheless, they have severe limitations that restrain their clinical use. Indeed, DBS is a highly invasive technique, which requires the surgical implantation of electrodes in the targeted brain regions [7], [9]. These electrodes are connected, via subcutaneously inserted wires, to a pulse generator implanted in the chest. Concerning tDCS and rTMS, both techniques are noninvasive but suffer from limited spatial resolution and penetration capacity [10]–[13]—although recent studies suggest that tDCS could reach deep brain areas [12] with a better spatial resolution, through the use of its high defined version (HD-tDCS) [13]. Thus, these two techniques essentially allow the stimulation of large and superficial brain regions. Yet, some brain disorders, such as depression or addiction, have been shown to involve deep brain areas, such as the nucleus accumbens or hippocampus [14], [15].

In comparison with the other neurostimulation methods, focused ultrasound (FUS) stimulation has numerous advantages, as it is noninvasive, exhibits a good spatial resolution (a few millimeters), and can reach deep brain structures [16]. Thus, FUS appears to be a promising method for noninvasive neurostimulation, allowing the targeting of superficial as well as deep brain regions [16]. Indeed, Fry *et al.* [17] showed the possibility of suppressing temporarily, using FUS, action potentials (APs) generated in the visual cortex of cats by visual stimuli. In addition, Gavrilov and colleagues stimulated human nervous structures with FUS, thus generating tactile, heat, or pain feelings on the subjects' skin [18]. More recently, preclinical studies showed that FUS could elicit neural activation, at low frequency (0.44–0.67 MHz) and low intensity (<1 MPa) [19]. Nowadays, the mechanisms involved in the

ultrasound neurostimulation (USNS) process are still not fully understood and several hypotheses are under debate. Many studies pointed out that the contribution of thermal effects is likely to be negligible due to the acoustic parameters that are generally used for USNS [20]–[22]. The mechanical effects of the ultrasound (US) waves are assumed to play a determinant role in the USNS process and are known to have two possible acoustic origins: 1) cavitation and 2) acoustic radiation force (ARF) [23]. Cavitation is more likely to occur when using contrast agents and/or if high acoustic intensities and low frequencies are used [23], [24]. When occurring, it can generate sonoporation, i.e., create pores in the plasma membrane or increase its porosity, being at the origin of ion currents [16], [24]. Another process based on cavitation, known as intramembrane cavitation, can take place between the two leaflets of the plasma membrane, through the expansion/contraction of nanobubbles, thus changing the capacitance of the membrane and modulating neural activity [23], [24]. This change of membrane capacitance can also happen due to variations in the membrane lipids and proteins conformation state, caused by the propagation of ultrasound [16], [24]. The lipid bilayer can also experience local deformations due to ultrasound and, thus, modifications of the transmembrane potential, which can elicit APs; this effect is known as flexoelectricity [16], [23], [24]. In addition, amongst the proposed underlying mechanisms of USNS, another theory, known as the soliton model, predicts that the US can elicit a perturbation in the density of the membrane molecules. This perturbation, so-called soliton, propagates as a mechanical wave and can elicit a coupled AP and/or interfere with already existing APs [23], [24]. Moreover, literature has also reported that the US can modulate ion channels activity, particularly the mechanosensitive ones (two-pore-domain potassium channel family; voltage-gated Ca^{2+} and Na^{+} channels; Piezo 1 and Piezo 2 channels) and TRPA1 channels in astrocytes [23]–[25]. Finally, two more mechanisms are hypothesized to explain the functioning of USNS, namely the modulation of synapses and the microtubule resonance. The effect of US on synapses can intervene via the increase of neurotransmitters release, the widening of the synaptic cleft, an action on the pre- and postsynaptic regions, or by triggering vesicle exocytosis [24]. Regarding the neuronal microtubules, it has been suggested that their resonance frequency is in the megahertz range and that, consequently, they could oscillate synchronously during the USNS process. Given that they are importantly implied in cells' skeleton, their vibration is likely to be transmitted to the plasma membrane and, hence, modulate neuronal activity [24].

Despite abundant research on the application of USNS, the most effective stimulation parameters, which would form the basis for its potential therapeutic use, are not yet determined. A number of preclinical studies have explored this issue, to make USNS an effective and safe therapeutic modality. King *et al.* [26] highlighted the dependence of the motor responses success rate, a metric that depicts USNS efficacy, toward intensity and pulse duration (PD). They showed that the intensity had to be increased with frequency to reach the same USNS efficacy using frequencies between 0.25 and 0.6 MHz. They also described a sigmoidal increase of the success rate

with the applied intensity, but only at 0.5 MHz frequency and 80 ms PD. Our group (Legrand *et al.*) confirmed these results at the same frequency and 160 ms PD [27]. Ye *et al.* [28] did a comparable work but investigated the effects of higher frequencies, up to 2.9 MHz on USNS efficacy. They confirmed the necessity of increasing the acoustic intensity when increasing the frequency, even for frequencies higher than 1 MHz. However, the success rates obtained at these frequencies were low and generally did not exceed 60%. Besides, they examined the influence of the focal spot size on the efficacy of USNS and concluded that the observed results, about the need of increasing acoustic intensity when frequency increases, were more likely due to the frequency itself than to the variation of the focal spot size that accompanied the change of frequency. In addition, Kim *et al.* [29] also reported the dependency of USNS toward frequency, but with a slightly different approach. Indeed, they showed that smaller thresholds of intensity were required at 0.35 MHz frequency than at 0.65 MHz to elicit motor responses. Other metrics than the success rate have also been used to describe the effect of the acoustic parameters on USNS. Tufail *et al.* [20] showed that the EMG responses amplitude decreased with increasing frequencies (0.25–0.5 MHz) or acoustic intensities (21–163 mW/cm^2). Moreover, Li *et al.*, using a high frequency of 5 MHz, reported an enhanced anatomic specificity, reduced motor responses latencies, and similar motor responses peak amplitudes in comparison to stimulation at 1 MHz [30]. This was achieved using a much smaller focal spot diameter at 5 MHz than at 1 MHz frequency (theoretical values of 0.86 and 4.3 mm, respectively, at -3 dB intensity). Surprisingly, they used the same acoustic intensities and had a comparable efficacy for both frequencies. This study contradicts the previous ones, which support the need for increasing the intensity when using higher frequencies to reach the same efficiency.

Extending our prior work [31], we aimed to thoroughly explore the influence of the acoustic parameters on the efficacy of USNS in healthy mice, and to identify those parameters to achieve a 100% success rate. Thereby, we investigated the effect of frequency, with values ranging from 0.5 to 2.25 MHz. We explored the effect of focal spot diameter by using either fixed frequency and changing focal spot size or fixed focal spot size at different frequencies. In addition, the effect of pulselength, as well as peak negative pressures (PNPs), was evaluated. The efficacy of USNS was assessed by measuring and recording the motor response following motor cortex stimulation. To further validate the USNS efficacy, neural activation was evaluated with immunohistochemistry (IHC).

II. MATERIAL AND METHODS

A. Ultrasound Setup

Ultrasonic waves were generated using transducers with different specifications (Table I—the probe from Sonic concepts has a 0.5 MHz center frequency, and also operates at its third harmonic, i.e., 1.5 MHz, using a special adaptor). The transducers were inserted in dedicated degassed water-filled cones to ensure coupling with the mouse head [see Fig. 1(a)]. The circular base of the cones had the same diameter as the transducer, while their top aperture was selected to be

TABLE I
SPECIFICATIONS OF THE TRANSDUCERS THAT
WERE USED FOR THE EXPERIMENTS

Center Frequency (MHz)	Active diameter (mm)	Focal length (mm)	Focal spot diameter at -3 dB (mm)	Manufacturer
0.5	38	60	3	Imasonic, Voray sur l'Ognon, France
0.5	63.5	63	2.2	Sonic Concepts, Bothell, WA, USA
1	47.5	49	1.7	Laboratory made
1.5	63.5	63	1.35	Sonic Concepts, Bothell, WA, USA
2.25	25.4	55	1.7	Olympus NDT, Waltham, MA, USA

much larger than the focal spot of the transducer (8–17 mm diameter), to allow propagation of the beam with limited interactions on the edges of the aperture. Also, the cones were designed so that their height is 2 mm shorter than the focal length of the transducer. The US probes were driven with an electrical signal generated by an arbitrary waveform generator (33250A; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and then amplified by a power amplifier (AAP-150-0.5-10-D; ADECE, Vallauris, France). The corresponding radial pressure profiles were measured in degassed water, using capsule hydrophones (HGL-0085 and HGL-0200; ONDA Corporation, Sunnyvale, CA, USA), connected to an oscilloscope (TDS 3044B; Tektronix, Beaverton, OR, USA). The measurements were carried out 2 mm behind the cones' front in the axial direction, in order to take into account the location of the center of the motor cortex (which was estimated to be at 2 mm deep inside the brain, behind the skull).

B. USNS Protocol

Seventy male Balb/c mice (nine weeks old, 20–30 g) were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and were housed with 12 h light cycle, and food and water *ad libitum*. The mice were anesthetized with 3% vetflurane (Vibrac, Carros, France), administered with 2 L/min of O₂ via a facial oxygen mask, and were positioned in a stereotaxic

frame. A thermostatically controlled pad was used to maintain body temperature at 37 °C. The mouse head was shaved and ultrasound gel was applied between the transducer and the head skin to enhance US transmission. The percentage of vetflurane was decreased to 0.25% in order to facilitate the occurrence and the detection of motor responses, or motor evoked potentials (MEPs), during USNS. Using a 3-D micro-metric positioning system (Thorlabs, Newton, NJ, USA), the transducer was positioned at the stereotaxic coordinates of the primary motor cortex (M1) of the left cerebral hemisphere: Anterior-Posterior = +0.5 mm; Medial-Lateral = +1.7 mm; from the Bregma.

For precise positioning of the transducer on the targeted zone, we cut the scalp of ten adult male Balb/c mice in preliminary experiments in order to measure the distance between the Bregma and the bump at the back of the mice skull (used as an external landmark). The average distance (7.6 mm) was then used as a reference for the positioning of the transducer during the USNS experiments without cutting the scalp of the animals.

To investigate the influence of acoustic pressure on the efficacy of USNS, different PNP were tested at the fixed center frequency and PD. For each set of these three acoustic parameters, ten acoustic pulses (i.e., bursts), separated with a burst interval (BI) of 10 s, were applied. The skull heating was considered to be negligible because of the thinness of the skull (0.2–0.6 mm thickness, depending on the skull zone) and due to the short PD and slow repetition rate (large BI) used. In addition, PNP values ranged from 55 to 1460 kPa and were derated to correct for the mouse skull, that is, 12% at 0.5 MHz, 20% at 1 MHz, 26% at 1.5 MHz, and 40% at 2.25 MHz of that measured in water. To achieve this, the ultrasound attenuation was measured in several independent experiments on three mouse skulls *ex-vivo*, in a separate setup using the capsule hydrophone. The attenuation was evaluated as $1 - (P_{\text{with skull}}/P_{\text{without skull}})$, $P_{\text{with skull}}$ and $P_{\text{without skull}}$ being the PNP measured in water with and without skull, respectively. Then, for each tested frequency, the resulting value of attenuation (SD = ±1.3% to 3.4%, depending on the frequency) was applied equally to the animals used in the *in vivo* experiments.

The spatial-peak temporal-average intensities (I_{SPTA}), corresponding to the different PNP values and delivered in the brain tissue, were calculated as follows:

$$I_{\text{SPTA}} = \frac{\text{PNP}^2}{2\rho c} * \text{BDC}$$

ρ being the density of the brain tissue (1028 kg/m³), c the velocity of ultrasonic waves in the same medium (1515 m/s) based on a previous study [20], and BDC the burst duty cycle used in the experiments, i.e., the ratio of PD and BI.

The effects of center frequency, PD as well as focal spot diameter on the efficacy of USNS were also assessed using the same US sequence. More precisely, the effect of center frequency was investigated at 160 ms fixed PD, whereas PD was tested at 1.5 MHz fixed frequency, using three different values, namely 53.3, 160, and 320 ms (i.e., 80 000, 240 000, and 480 000 cycles). Moreover, we investigated the influence

of the transducer focal spot diameter by using either the same frequency (0.5 MHz) with two different focal spots or a fixed focal spot at two different frequencies (1 and 2.25 MHz).

C. Monitoring of Motor Response

1) *Visual Monitoring of Motor Response*: First, the motor responses, which were elicited consequently to the delivery of US sequences on mice motor cortex, were detected visually. They consisted of a stretching movement of the forepaw contralateral to the targeted region. For this experiment, eight to ten mice were used for the study of each set of acoustic parameters. Thereby, two operators took note of the occurrence of the responses, independently of each other; the obtained scores were averaged for the final results. To help them with this task, an LED, which was connected to the emitting system and triggered with the ultrasound emission, was placed in evidence—the movements of the forepaws were counted as motor responses if they only occurred during the lightening of the LED, which was set to last 500 ms to allow sufficient time for the visual assessment. In addition, a camera, placed in front of the experimental setup, recorded the whole experiment and was used to check the movements of the mice for ambiguous cases, i.e., when the movements were not clear or when there was a need to ensure that they occurred in the right time span, in order to increase the reliability of the results.

2) *Electromyography (EMG) Monitoring of Motor Response*: An electromyograph (Powerlab 26T; AD Instruments, Sydney, NSW, Australia) was also used to detect the motor responses; for this modality, three to five animals were used for each studied set of acoustic parameters. To do so, two EMG needles were subcutaneously inserted in the right forepaw of the animals, contralaterally to the targeted brain region; these were connected, via their respective wires, to the EMG device, itself connected to a computer equipped with the corresponding software (LabChart 8; AD Instruments), for the acquisition of the raw EMG signals. In order to detect motor responses and include them as true responses, the EMG signals were first numerically filtered in the LabChart software, using a bandpass filter of 300 Hz and 3 kHz low and high cut-off frequencies, respectively, to remove the background noise. Then, they were processed and analyzed, using conditions adapted from [26], [28] to our dataset. In particular, to smooth the signals and allow easier identification of the motor responses, a Gaussian filter of 40 ms width (23 ms FWHM) was applied on each EMG signal. Beforehand, the dc component of the signals was removed by subtracting their mean; then, they were rectified, i.e., taken with their absolute value. The conditions that were fixed to count EMG signals as positive motor responses were set as follows.

- 1) Beginning in a period of 250 ms after the stimulation (for stimulations using 160 ms pulses). For stimulations at 320 ms PD (1.5 MHz), the limit was set to 500 ms, due to increased latencies of the motor responses observed with this set of parameters.
- 2) Having their amplitude above a threshold value, defined as the mean plus three times the standard deviation of each EMG signal envelope, and calculated on a period of 200 ms before the ultrasonic stimulation.

- 3) Having a duration of at least 30 ms or a minimum peak amplitude value, which was fixed independently for each set of parameters (it varied from 15 to 50 μ V, depending on the signal-to-noise ratio of the raw data).

These processing and analysis steps were performed using a custom software, written in MATLAB¹ (version 7.5.0 (R2007b); MathWorks, Natick, MA, USA).

The obtained results allowed calculation of the success rate, a metric that depicts the efficacy of neurostimulation, which is defined as follows:

$$\text{Success rate} = \frac{\text{Number of USNS elicited motor responses}}{\text{Total number of USNS}} \times 100.$$

D. c-Fos Immunohistochemistry (IHC)

c-Fos expression induced by USNS was examined to evaluate the impact of US frequency and PD on neuronal activity. Following visual evaluation of the motor responses, an experimental group of five mice was formed for each frequency/PD combination. An additional group of five mice was used as a “sham group,” reproducing the exact same experimental conditions but without USNS.

Ninety minutes following the completion of USNS series (at a given frequency, PD and PNP) or sham, mice were intraperitoneally injected with an overdose of pentobarbital (400 mg/kg body weight; Exagon¹, Centravet, Dinan, France), transcardially perfused with 0.9% saline before being fixed with 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma-Aldrich¹, St. Louis, MO, USA) in phosphate-buffered solution (PBS, 0.01 M, pH 7.4; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Then brains were extracted, post-fixed overnight in the same fixative solution at 4 °C, embedded with a 30% sucrose solution (Sigma-Aldrich¹) at 4 °C, and finally snap-frozen in a dry ice/isopentane bath (Sigma-Aldrich¹). To be processed for immunofluorescence assay, the brains were cut into 40- μ m-thick floating coronal sections with a freezing cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

For c-Fos immunostaining, sections containing the motor cortex were pretreated with sodium citrate buffer (pH 6.0; Sigma-Aldrich¹) for 10 min at 95 °C and permeabilized in a blocking solution of 5% normal goat serum (Sigma-Aldrich¹) and 0.02% Triton X-100 (Sigma-Aldrich¹) in PBS for 1 h at room temperature (RT). Then, they were incubated 48 h at 4 °C with c-Fos antibody (1:5000, mouse monoclonal [2H2]; ab208942; Abcam, Cambridge, U.K.) diluted in PBS, 0.02% Triton X-100, 1% BSA (Sigma-Aldrich¹), and 1% normal goat serum, followed by incubation with a goat anti-mouse secondary antibody (1:1000, AlexaFluor 488-conjugated; ab150113; Abcam) diluted in PBS and 1% normal goat serum. Finally, sections were counterstained with the nuclear dye 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:1000; Sigma-Aldrich¹), mounted, and cover-slipped with antifade mounting medium Mowiol (4–88 reagent, Calbiochem 475904; Merck Chimie SAS, Fontenay-sous-Bois, France).

Analysis of the number and density of c-Fos-positive nuclei in the primary motor cortex (M1) was performed as described

¹Registered trademark

previously [32] by an operator blinded to the experimental groups. The immunolabelled sections were visualized and counted with a Leica CTR-5500 microscope equipped with a Hamamatsu C10600 camera. Five animals per group were used for these analyses and more than five representative sections spanning from 2.22 to 0.14 mm of Bregma (location of the motor cortex) were counted to minimize variability. Region of interest in each stained slice was selected based on DAPI staining and several micrographs at 10 \times magnification until the entire M1 was covered. The size of each captured image was 863 μ m in length and 657 μ m in large. In ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA), the total number of c-Fos+ cells in the M1 was manually quantified using the point tool and the ROI Manager tool was utilized to calculate the sampled area in the M1. The density of c-Fos+ cells was calculated using the formula $D = (N/(A \times t)) \times 10^9$, where N is the number of counted cells, A is the sampled area (μ m²), and t is the thickness of the analyzed section (40 μ m). Cell densities were expressed as the number of positive cells per mm³.

E. Statistical Analysis

Statistical evaluations of the visual and electromyographic assessment of motor response but also of the immunohistochemical analyses were conducted by one-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test for multiple comparisons. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) and a difference was considered statistically significant at $p \leq 0.05$. Statistical analyses were performed using Prism 7.0 for Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

III. RESULTS

A. Radial Beam Profiles of the Different Transducers

As mentioned previously, different US transducers were used in order to investigate the different acoustic parameters. The corresponding measured radial profiles at the corresponding focal length are presented in Fig. 1(b). One can see that the beams get narrower when frequency increases, as expected, except for the 2.25 MHz frequency probe, which exhibits a beam that is larger than the one at 1.5 MHz, but as large as the beam at 1 MHz. Also, at 0.5 MHz frequency, the beamwidths are unequal and the Sonic Concepts transducer exhibits a much narrower beam.

B. Effect of Acoustic Parameters on USNS Success Rate

1) *Effect of PNP and Frequency:* As shown in Fig. 2(a), the success rate (assessed visually) increases in a sigmoidal way with PNP, regardless of the used frequency. We can appreciate that these sigmoids reach a 100% success rate, at the highest PNP values—in the case of 2.25 MHz, only the beginning of the plateau is visible, as it was not possible to generate higher pressure values at this frequency. The statistical analyses, performed on the various datasets, at different frequencies, show significant statistical differences between the PNP values, especially between those giving

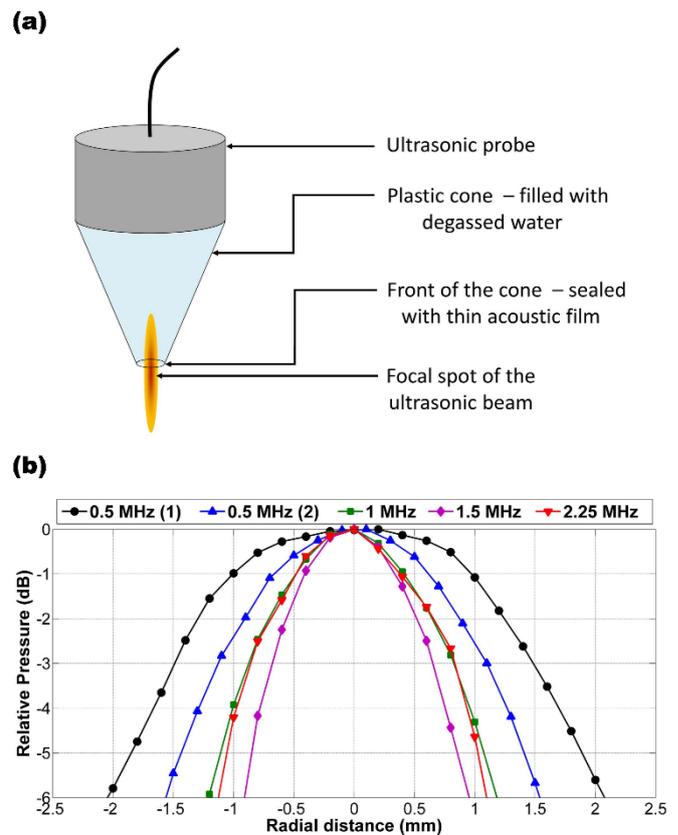


Fig. 1. (a) Schematic of the cone associated with the ultrasonic probe during USNS experiments. (b) Measured radial pressure profiles of the single element transducers, at the corresponding focal lengths. 0.5 MHz (1) and 0.5 MHz (2) refer to the Imasonic probe and the Sonic Concepts probe, respectively.

small success rates (typically 0%–40%) and those giving success rates greater than 60% ($p < 0.05$). Also, and as was expected, a shift of the curves toward the highest PNP values is observed when the center frequency is increased. Surprisingly, this shift was not observed when increasing the frequency from 1.5 to 2.25 MHz. The results indicate that at 1.5 MHz frequency, a higher acoustic pressure is required to achieve a successful motor cortex stimulation in comparison to 2.25 MHz frequency. This is opposite to what has been reported earlier where higher frequencies would require higher acoustic pressures [26], [28].

The success rate of the motor cortex stimulation is displayed in Fig. 2(b) as a function of I_{SPTA} . A similar trend is seen here, where the slope of the sigmoids decreases when frequency increases, except between 1.5 and 2.25 MHz, where the opposite is observed. Indeed, the slope of the curves directly reflects the range of PNP needed to reach maximum success rate, that is to say, that a smaller slope is associated with a larger span of PNP, and vice versa.

In order to confirm the reliability of the visual assessment of the motor responses, a cohort of mice ($3 \leq N \leq 5$) was used for the detection of the induced motor responses with EMG. As shown in Fig. 3, comparable values and variations of the success rates are observed using both methods. Indeed, an increase in the success rate with PNP is noticed. This observation is corroborated by the statistical analysis, which

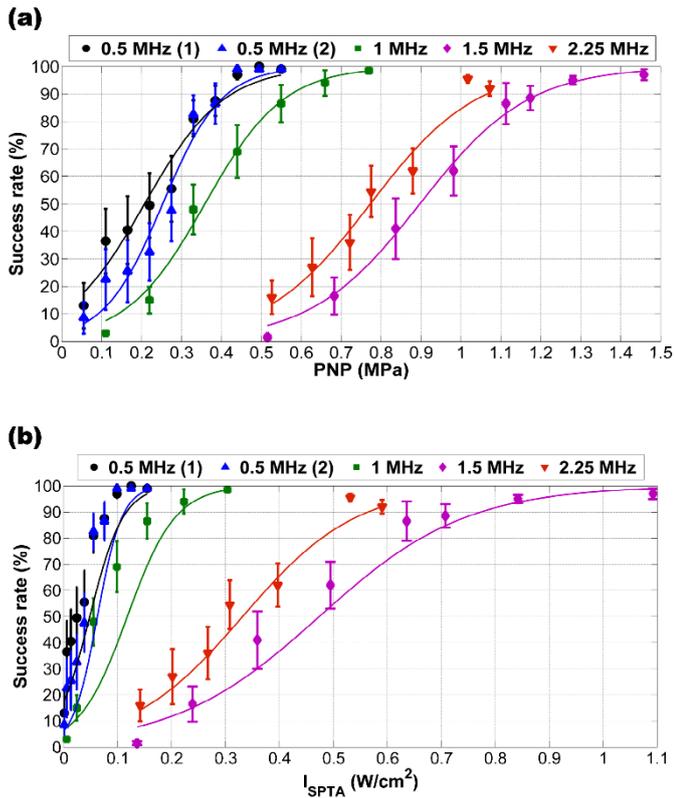


Fig. 2. Success rate assessed visually versus peak negative pressure (PNP)—(a) or spatial-peak temporal-average intensity (I_{SPTA})—(b), for different frequencies, at 160 ms fixed pulse duration. Each data point represents the success rate calculated over ten trials at the corresponding PNP/ I_{SPTA} and frequency, and then averaged over ten mice. Results are presented as mean \pm SEM, over the ten animals. The fitting of the curves (solid lines) was done with Boltzmann equation for sigmoid curves and using the least-squares method. 0.5 MHz (1) and 0.5 MHz (2) refer to the Imasonic probe and the Sonic Concepts probe, respectively.

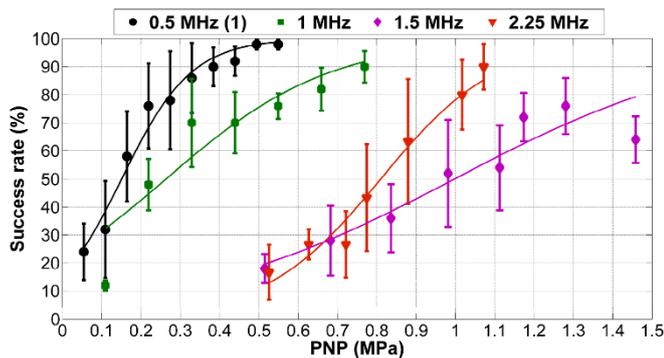


Fig. 3. Success rate assessed by electromyography versus PNP, for different frequencies, at 160 ms fixed pulse duration. Each data point represents the success rate calculated over ten trials at the corresponding PNP and frequency, and then averaged over N mice ($N = 5$, except for 2.25 MHz frequency, where $N = 3$). Results are presented as mean \pm SEM, over the N animals. The fitting of the curves (solid lines) was done with Boltzmann equation for sigmoid curves and using least-squares method. 0.5 MHz (1) refers to the Imasonic probe.

shows no significant difference between the results obtained with both methods ($p > 0.05$). Thus, only visual assessment was applied for the rest of the results presented, in addition to immunohistochemical assessment.

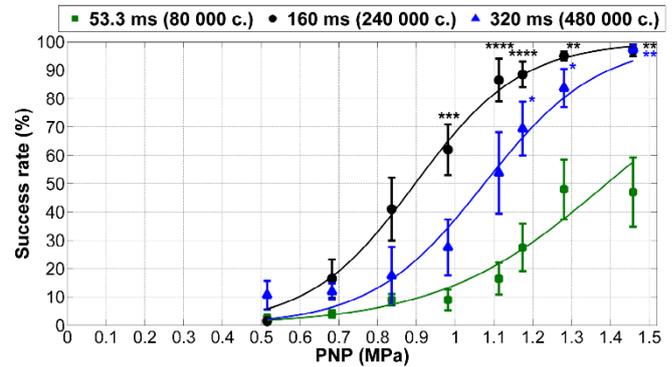


Fig. 4. Success rate assessed visually versus PNP, for different pulse durations (i.e., number of cycles: c), at 1.5 MHz frequency. Each data point represents the success rate calculated over ten trials at the corresponding PNP and pulse duration, and then averaged over N mice ($N = 10$ for 53.3 and 160 ms pulse durations; $N = 8$ for 320 ms). Results are presented as mean \pm SEM, over the N animals. The fitting of the curves (solid lines) was done with Boltzmann equation for sigmoid curves and using least-squares method. Tukey post-hoc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ refer to the 53.3 ms PD versus 160 or 320 ms PD comparison.

2) Effect of PNP and PD: In addition, the effect of PD on the efficiency of USNS is investigated at a 1.5 MHz frequency, using three different PDs, namely 53.3, 160, and 320 ms, (80 000, 240 000, and 480 000 cycles, respectively).

As previously reported in Fig. 2, the success rate increases sigmoidally with PNP, regardless of the PD (see Fig. 4). At 53.3 ms PD (80 000 cycles), only the first half of the sigmoid is visible, showing a lower efficacy of USNS when using this PD. Our results show a significant increase in the success rate when PD changes from 53.3 to 160 ms for PNP higher than 0.98 MPa ($p < 0.05$) or to 320 ms for PNP higher than 1.17 MPa ($p < 0.05$). On another side, the required PNP to reach a success rate of 50% is smaller at 160 ms PD (0.9 MPa) than at 320 ms (1.1 MPa; $p < 0.05$) and 53.3 ms (1.3 MPa; $p < 0.001$).

3) Effect of the Focal Spot Diameter: We explored the effect of the focal spot diameter at 0.5 MHz and 160 ms fixed frequency and PD, respectively, at PNP values ranging between 55 and 550 kPa, using two different transducers (focal spot diameters measured at -3 dB). The smallest size was 2.2 mm (for the Sonic Concepts transducer) while the other transducer (Imasonic) had a focal spot diameter about 1.4 times larger, that is around 3 mm [Table I and Fig. 1(b)]. Similar to the previous finding (see Figs. 2–4), the success rate increases sigmoidally as a function of PNP, whatever the ultrasound probe used (see Fig. 5). Moreover, no significant difference is observed when comparing the success rates obtained with both probes, at each PNP value ($p > 0.05$) although the transducer with the narrower beam seems to require higher pressures to achieve a similar success rate.

C. Effect of Acoustic Parameters on Neuronal Activity in the Motor Cortex

1) Effect of USNS Frequency: To examine the neuronal activity following USNS at various frequencies (0.5, 1, 1.5, and 2.25 MHz) and at a fixed PD of 160 ms, c-Fos expression as an

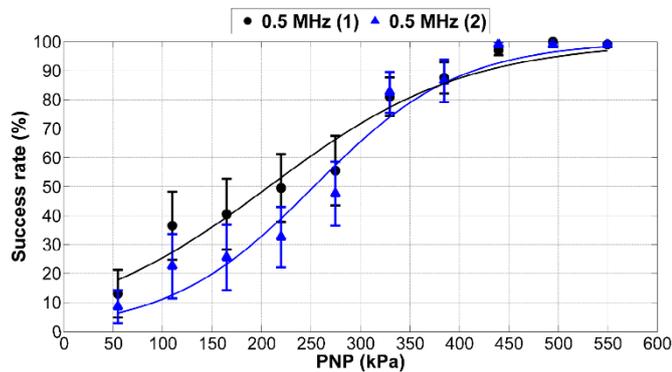


Fig. 5. Success rate assessed visually versus PNP, at 0.5 MHz fixed frequency and using two probes of different diameters. Each data point represents the success rate calculated over ten trials at the corresponding PNP, and then averaged over ten mice. Results are presented as mean \pm SEM, over the ten animals. The fitting of the curves (solid lines) was done with Boltzmann equation for sigmoid curves and using least-squares method. 0.5 MHz (1) and 0.5 MHz (2) refer to the Imasonic probe and the Sonic Concepts probe, respectively.

endogenous marker of neuronal activation [33] was evaluated using the immunofluorescence assay. As shown in Fig. 6, the immunolabelling of reactive c-Fos cells revealed that USNS significantly enhanced neuronal activation in the M1, regardless of the frequency (One-way ANOVA, $F(4, 20) = 9.74$, $p < 0.001$). Tukey post-hoc comparisons showed that the density of c-Fos+ cells increased significantly following the USNS with respect to the sham group ($q = 4.82$, $p < 0.05$; $q = 6.24$, $p < 0.01$; $q = 8.51$, $p < 0.001$; $q = 5.25$, $p < 0.05$, respectively), whereas there were no significant differences between the stimulated groups ($p > 0.05$). USNS at 1.5 MHz induced however the highest c-Fos+ cells. The corresponding simulated acoustic beam plots, which are shown [see Fig. 6(e)] for the different frequencies, seem to indicate that the tightest beam is associated with the highest activation.

2) Effect of USNS PD: Next, we evaluated the effect of the PD on neural activity at 80 000, 240 000, and 480 000 cycles, corresponding respectively to 53.3, 160, and 320 ms PDs at a fixed frequency of 1.5 MHz (see Fig. 7). Interestingly, the quantitative analysis of c-Fos immunofluorescence revealed a significant increase of the density of c-Fos+ cells in the M1 following USNS (one-way ANOVA, $F(3, 16) = 14.38$, $p < 0.001$). Post-hoc comparisons confirmed significant differences between sham and stimulated groups (53.3 ms versus sham: $q = 5.34$, $p < 0.01$; 160 ms versus sham: $q = 7.95$, $p < 0.001$; 320 ms versus sham: $q = 8.13$, $p < 0.001$), while no statistical difference was observed between the stimulated groups (53.3 ms versus 160 ms: $q = 2.61$, $p > 0.05$; 53.3 ms versus 320 ms versus sham: $q = 2.79$, $p > 0.05$; 160 ms versus 320 ms: $q = 0.17$, $p > 0.05$).

3) Relationship Between USNS Frequency, PNP, Focal Spot Diameter, and Neuronal Activity: In Fig. 8, the c-Fos+ cells density in M1 is plotted together with the corresponding required PNP to reach a maximum success rate as a function of the transmitted frequency. The figure shows that these two metrics exhibit a similar tendency, that is to say, that 1.5 MHz, which is the USNS frequency that requires the highest PNP to reach 100% success rate, is also the one that exhibits

the highest neural activation. Next to these two parameters, we have included the focal spot diameter of the transducers as a function of frequency. This result shows an opposite tendency, where the smallest beamwidth is the one for which the neural activation is the highest.

D. Safety Considerations

The maximum PNP values we used at the different frequencies were chosen so that the mechanical index (MI), which is defined as the ratio of PNP (in MPa) and the square root of frequency (in MHz), did not exceed 0.7–0.8 (except at 1.5 MHz frequency, where the maximal MI was 1.19). In any case, the MI values we used were far under the limit fixed by the FDA for the use of ultrasound on the brain, i.e., $MI = 1.9$ [16]. Furthermore, the qualitative evaluation of the quality of mouse life and variations in mouse behavior (i.e., respiratory deficiency, loss of locomotion, loss of appetite, etc.) and in body weight before and after USNS experiments revealed no adverse effects. In addition, available literature did not report safety issues of US neurostimulation even at intensities higher than those used in our study [34]. Hence, although dedicated safety investigation should be carried out in future work, we believe that USNS did not induce harm to the animals we used in this study.

IV. DISCUSSION

In this study, we investigated the influence of acoustic parameters, namely the frequency, the acoustic pressure, the PD, and the focal spot diameter, on the efficiency of USNS of the motor cortex. This was realized by applying ultrasonic pulses, combining different sets of the parameters cited above, on mice motor cortex, and observing the elicited motor activity visually and with EMG. In addition, IHC was performed on mice brains after USNS (or non-USNS for the sham group) to reveal the expression of the c-Fos protein, which is a biomarker of neuronal activation.

First, our results highlighted the sigmoidal increase of the success rate of motor response when the applied PNP gets higher, reaching a plateau at 90%–100% for the highest PNP values at 0.5 MHz frequency (see Figs. 2–5), thus confirming previous studies performed at frequencies below 1 MHz [26], [27]. In addition, our study explored further this relationship at higher frequencies (1, 1.5, and 2.25 MHz, at 160 ms fixed PD), for which the results showed a similar behavior to that at 0.5 MHz. A noticeable shift of the curves toward the highest PNP values was observed when the center frequency was increased. In particular, the rise of frequency from 1 to 2.25 MHz, using fixed focal spot diameter and PD, highlighted this need for increasing PNP to reach similar success rates. At the same time, this raise in frequency was accompanied by the need for larger spans of PNP and acoustic intensity to reach the plateau at a maximum success rate. Surprisingly, using the highest frequency (2.25 MHz) required lower acoustic pressures than at 1.5 MHz to reach the plateau of success rate. It is worthy to notice that the 2.25 MHz transducer has a larger focal spot than the 1.5 MHz transducer. Except between these two last frequencies, the results clearly

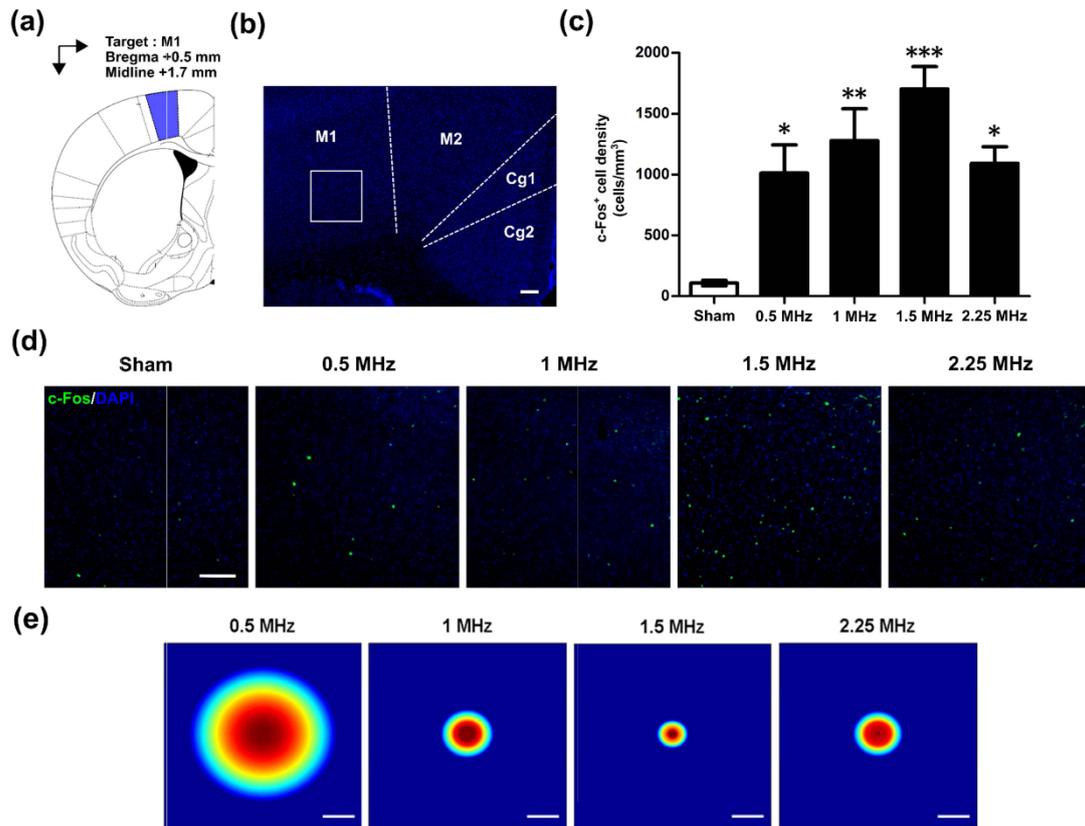


Fig. 6. Neuronal activity in the M1 following different USNS frequencies at a fixed pulse duration of 160 ms. (a) Schematic drawing of coronal mice brain section illustrating the anatomical site of ultrasound stimulation. (b) Photomicrograph of DAPI staining showing the region of interest in the M1 used for c-Fos quantification. (c) Density of c-Fos+ cells within the M1 in sham and stimulated groups with four frequencies (0.5, 1, 1.5, and 2.25 MHz). (d) Representative photomicrographs of the window in (b) illustrating the c-Fos+ distribution in the M1 of sham and stimulated mice. Results are presented as mean \pm SEM ($n = 5$ per group). Tukey post-hoc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ refer to the sham versus stimulated groups comparison. Scale bar in (b) and (d): 100 μm . (e) Simulated acoustic intensity, displayed in the transverse plane at focal length, for the different used frequencies (Imasonic probe for 0.5 MHz frequency). The figures show the respective focal spot diameters (at FWHM, i.e., -3 dB), highlighting a tendency versus frequency that is inverted with regard to c-Fos results in (c). Scale bar in (e): 1 mm. M1: Primary motor cortex; M2: Secondary motor cortex; Cg1: Area 1 of cingulate cortex; Cg2: Area 2 of cingulate cortex.

suggest that an increase of the delivered PNP and thus, of the acoustic intensity, is required when frequency increases, to reach the same USNS efficiency. In addition, the results between 1.5 and 2.25 MHz frequencies raise the question of the influence of the focal spot diameter on the efficacy of USNS, and particularly, on the required PNP and intensities for reaching given success rates. The relevance of this question is confirmed in Fig. 8. Indeed, when frequency gets higher, the required PNP for having maximum success rate is not necessarily higher, but rather follows a tendency opposite to that of the focal spot diameter. Consequently, the applied PNP and the focal spot diameter seem to be closely linked to USNS efficacy. One possible explanation of this dependence is that a small focal spot size is less likely to cover the entirety of the targeted zone than a larger one, thus sonicating a smaller neuronal population. In addition, if we consider the distortion of the US beam induced by the skull, smaller focal spot diameters have a higher probability of missing, even partly, the targeted area. Yet, we can assume that the greater the number of neurons stimulated in the targeted area, the more efficient the neurostimulation should be, in terms of motor responses,

as suggested by Menz *et al.* [21]. Thus, this would justify the required increase of intensity for smaller focal spot diameters in order to obtain a similar USNS efficacy.

Given these observations and hypotheses, we investigated the effect of the focal spot diameter at 0.5 MHz and 160 ms fixed frequency and PD, respectively, using two US probes with different geometrical features, resulting in two different focal spot diameters (2.2 and 3 mm). Also, the comparison between these two probes was done at the same PNP values. Knowing that the focal spot diameters are relatively close, our results revealed that there is no significant difference ($p > 0.05$, at each PNP used) in success rates between both focal spot diameters (see Fig. 5). Recently, Ye *et al.* [28] reported similar success rates with two different focal spot sizes at 0.4 MHz (10.11 mm² versus 13.24 mm², i.e., 3.6 mm versus 4.1 mm in focal spot diameter) and 0.5 MHz frequencies (6.78 mm² versus 13.57 mm², i.e., 2.9 mm versus 4.2 mm in focal spot diameter). However, they described a better efficacy with the larger focal spot at 0.3 MHz frequency while at 0.6 MHz, on the opposite, their study revealed that the smaller focal spot size induced an enhanced efficiency.

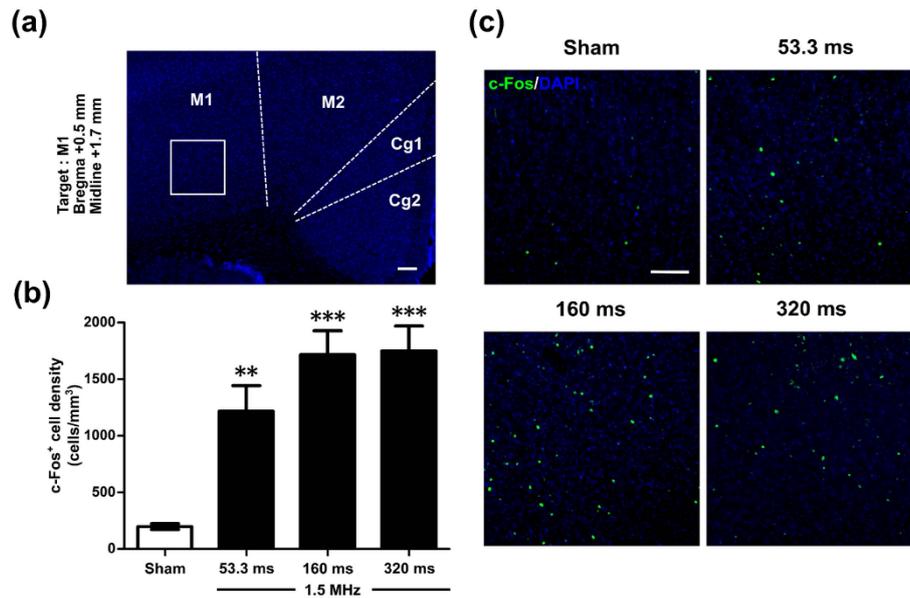


Fig. 7. Neuronal activity in the M1 following different USNS pulse durations at a fixed frequency of 1.5 MHz. (a) Photomicrograph of DAPI staining showing the site of ultrasound stimulation in the M1. (b) Density of c-Fos+ cells within the M1 in sham and stimulated groups with three pulse duration (53.3, 160, and 320 ms). (c) Representative photomicrographs of the window in (a) illustrating the c-Fos+ distribution in the M1 of sham and stimulated mice. Results are presented as mean \pm SEM ($n = 5$ per group). Tukey post-hoc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ refer to the sham versus stimulated groups comparison. Scale bar in (a) and (c): 100 μm . M1: Primary motor cortex; M2: Secondary motor cortex; Cg1: Area 1 of cingulate cortex; Cg2: Area 2 of cingulate cortex.

Altogether, these results suggest that further studies are required to investigate the effect of the focal spot diameter at different fixed frequencies than 0.5 MHz. Indeed, the influence of this parameter may be highly dependent on the frequency used.

On another part, the c-Fos IHC showed, as expected, an enhanced activity of the neurons in the targeted area (M1) consecutively to the application of USNS, for all frequencies, in comparison with the sham group (see Fig. 6). Moreover, the results showed a larger activation of cells at 1.5 MHz in comparison with the other frequencies (at 160 ms fixed PD). This latter observation is quite surprising, as the results obtained visually and with EMG revealed a higher efficiency of USNS at 0.5 MHz frequency, given that a lower PNP is required to reach 100% success rate at this frequency, in comparison with the other frequencies. However, the results displayed in Fig. 8 highly suggest that the density of cells activated consecutively to USNS is closely linked to the applied PNP (and I_{SPTA}) and, also, to the focal spot diameter of the transducer. Although for this latter, we could expect the opposite, that is to say having more activated cells when the focal spot is larger, as assumed previously. But the reasoning that emerges from these results is that smaller focal spots and/or higher frequencies require higher PNPs to reach an equivalent USNS efficiency, thus resulting in a larger neural activation.

Then, our results also showed a dependency of the success rate with the applied PD. The analysis of these results at fixed PNP showed higher success rates when using 160 and 320 ms PDs than when using 53.3 ms PD. Also, when checking the required PNP to reach a success rate of 50%, it appeared that a smaller value was needed at 160 ms PD (0.9 MPa) than at 320 ms (1.1 MPa) and 53.3 ms (1.3 MPa). Thus, we can deduce that among the PDs we have used, 160 ms

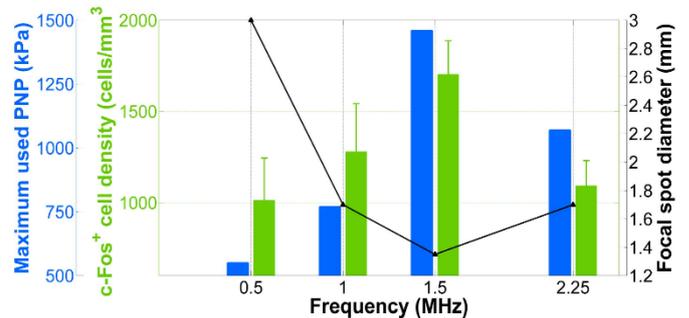


Fig. 8. Combined representation of density of c-Fos+ cells in the M1, consequently to USNS, versus frequency, at 160 ms fixed pulse duration (green bars—on the right; represented as mean \pm SEM), focal spot diameters (black triangles and solid line), and PNP at maximum success rate (blue bars—on the left), given that the c-Fos results were obtained after these pressure values were applied. The focal spot diameters were measured at acoustic intensity FWHM (i.e., at -3 dB).

constitutes the optimal one at 1.5 MHz frequency, as it confers an enhanced efficacy in comparison with the other PDs. This corroborates the observation of a saturated efficacy with the use of high PDs [26], and reinforces the idea that longer PDs are more likely to induce inhibitory effects rather than excitatory effects [29]. Nevertheless, Ye *et al.* [28] showed no significant variation of the success rate when changing PD at fixed frequency but at much lower frequencies. Finally, the c-Fos immunolabelling on M1 showed an enhanced activity of the neurons in this region, consecutively to the application of USNS, whatever the PD that was used, in comparison with the sham group (see Fig. 7).

Finally, our data demonstrate indeed that a neural activation can be achieved with selected ultrasound parameters in a mouse model. The translation of such findings to humans should not pose a challenge as the currently available

technology allows compensating for the effects of the human thick skull [35]–[37] and, hence, to target deep brain regions. However, the parameters obtained in our study on a small animal model would need additional investigations to determine the optimal US settings to achieve neural activation in the human brain.

V. CONCLUSION

This work showed a definite impact of various ultrasonic parameters on neurostimulation in mice. First, the obtained results emphasized the fact that the success rate, which depicts USNS efficacy, increased with PNP in a sigmoidal shape, reaching a plateau at 90%–100%, for different frequencies (below and beyond 1 MHz), PDs, and focal spot diameters. Moreover, our study demonstrated the dependence of USNS using low and high frequencies, as it revealed that an increase of PNP was needed when increasing frequency, to achieve a constant success rate, while it also highlighted the crucial influence of the focal spot diameter. Indeed, it brought to light the fact that the required PNP to reach a given success rate depends not only on the frequency, but also on the focal spot diameter. Hence, although the beamwidth is strongly dependent on the frequency, the transducer design (size, f -number) is of a major play for USNS. On top of that, the c-Fos IHC study highlighted a close link between the density of cells that were activated consequently to USNS, the applied PNP, and the focal spot diameter.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the following members from UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France: J.-Y. Tartu and J.-M. Grégoire for their technical assistance, and A. Passet, B. Brizard, Y. Mofid, A. Surget, and J.-P. Remenieras for their help on the experiments and for the fruitful discussions.

REFERENCES

- [1] (2006). *Neurological Disorders: Public Health Challenges*. WHO (World Health Organization). [Online]. Available: https://www.who.int/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf
- [2] M. Ryan and J. T. Slevin, "Introduction: Treatment of neurological disorders," *J. Pharmacy Pract.*, vol. 20, no. 2, pp. 115–116, Apr. 2007, doi: [10.1177/0897190007305127](https://doi.org/10.1177/0897190007305127).
- [3] E. Hitt, "Neurodegenerative and neuropsychiatric disorders research: A cerebral career choice," *Sci. Mag.*, vol. 338, no. 6103, pp. 142–145, Oct. 2012. [Online]. Available: <https://www.science.org/content/article/neurodegenerative-and-neuropsychiatric-disorders-research-cerebral-career-choice>
- [4] M. H. Trivedi *et al.*, "Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR* D: Implications for clinical practice," *Amer. J. Psychiatry*, vol. 163, no. 1, pp. 28–40, Jan. 2006, doi: [10.1176/appi.ajp.163.1.28](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.1.28).
- [5] (2017). *The Value of Treatment Policy White Paper: Towards Optimizing Research and Care for Brain Disorders*. European Brain Council. [Online]. Available: https://www.braincouncil.eu/wp-content/uploads/2017/06/EBC_white_policy_paper_DEF26072017_Low.pdf
- [6] H. Zhao *et al.*, "Modulation of brain activity with noninvasive transcranial direct current stimulation (tDCS): Clinical applications and safety concerns," *Frontiers Psychol.*, vol. 8, p. 685, May 2017, doi: [10.3389/fpsyg.2017.00685](https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.00685).
- [7] J. M. Bronstein *et al.*, "Deep brain stimulation for Parkinson disease: An expert consensus and review of key issues," *Arch. Neurol.*, vol. 68, no. 2, p. 165, Feb. 2011, doi: [10.1001/archneurol.2010.260](https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.260).
- [8] J.-P. Lefaucheur *et al.*, "Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS)," *Clin. Neurophysiol.*, vol. 125, no. 11, pp. 2150–2206, Nov. 2014, doi: [10.1016/j.clinph.2014.05.021](https://doi.org/10.1016/j.clinph.2014.05.021).
- [9] S. Miocinovic, S. Somayajula, S. Chitnis, and J. L. Vitek, "History, applications, and mechanisms of deep brain stimulation," *JAMA Neurol.*, vol. 70, no. 2, p. 163, Feb. 2013, doi: [10.1001/2013.jamaneurol.45](https://doi.org/10.1001/2013.jamaneurol.45).
- [10] N. Sollmann *et al.*, "Results on the spatial resolution of repetitive transcranial magnetic stimulation for cortical language mapping during object naming in healthy subjects," *BMC Neurosci.*, vol. 17, no. 1, p. 67, Dec. 2016, doi: [10.1186/s12868-016-0305-4](https://doi.org/10.1186/s12868-016-0305-4).
- [11] E. M. Wassermann and S. H. Lisanby, "Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation: A review," *Clin. Neurophysiol.*, vol. 112, no. 8, pp. 1367–1377, Aug. 2001, doi: [10.1016/S1388-2457\(01\)00585-5](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(01)00585-5).
- [12] P. Y. Chhatbar *et al.*, "Evidence of transcranial direct current stimulation-generated electric fields at subthalamic level in human brain *in vivo*," *Brain Stimulation*, vol. 11, no. 4, pp. 727–733, Jul. 2018, doi: [10.1016/j.brs.2018.03.006](https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.03.006).
- [13] A. F. DaSilva, D. Q. Truong, M. F. DosSantos, R. L. Toback, A. Datta, and M. Bikson, "State-of-art neuroanatomical target analysis of high-definition and conventional tDCS montages used for migraine and pain control," *Frontiers Neuroanatomy*, vol. 9, p. 89, Jul. 2015, doi: [10.3389/fnana.2015.00089](https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00089).
- [14] L. Xu, J. Nan, and Y. Lan, "The nucleus accumbens: A common target in the comorbidity of depression and addiction," *Frontiers Neural Circuits*, vol. 14, p. 37, Jun. 2020, doi: [10.3389/fncir.2020.00037](https://doi.org/10.3389/fncir.2020.00037).
- [15] S. Campbell and G. MacQueen, "The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression," *J. Psychiatry Neurosci.*, vol. 29, no. 6, pp. 417–426, Nov. 2004.
- [16] J. Blackmore, S. Shrivastava, J. Sallet, C. R. Butler, and R. O. Cleveland, "Ultrasound neuromodulation: A review of results, mechanisms and safety," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 45, no. 7, pp. 1509–1536, Jul. 2019, doi: [10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.015](https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.015).
- [17] F. J. Fry, H. W. Ades, and W. J. Fry, "Production of reversible changes in the central nervous system by ultrasound," *Science*, vol. 127, no. 3289, pp. 83–84, Jan. 1958, doi: [10.1126/science.127.3289.83](https://doi.org/10.1126/science.127.3289.83).
- [18] L. R. Gavrilov, G. V. Gersuni, O. B. Ilyinski, E. M. Tsurulnikov, and E. E. Shchekanov, "A study of reception with the use of focused ultrasound. I. Effects on the skin and deep receptor structures in man," *Brain Res.*, vol. 135, no. 2, pp. 265–277, Oct. 1977, doi: [10.1016/0006-8993\(77\)91030-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)91030-7).
- [19] W. J. Tyler, Y. Tufail, M. Finsterwald, M. L. Tauchmann, E. J. Olson, and C. Majestic, "Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 10, p. e3511, Oct. 2008, doi: [10.1371/journal.pone.0003511](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003511).
- [20] Y. Tufail *et al.*, "Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits," *Neuron*, vol. 66, no. 5, pp. 681–694, 2010, doi: [10.1016/j.neuron.2010.05.008](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.008).
- [21] M. D. Menz, P. Ye, K. Firouzi, K. B. Pauly, B. T. Khuri-Yakub, and S. A. Baccus, "Physical mechanisms of ultrasonic neurostimulation of the retina," *bioRxiv*, Dec. 2017, Art. no. 231449, doi: [10.1101/231449](https://doi.org/10.1101/231449).
- [22] J. K. Mueller, L. Ai, P. Bansal, and W. Legon, "Computational exploration of wave propagation and heating from transcranial focused ultrasound for neuromodulation," *J. Neural Eng.*, vol. 13, no. 5, Oct. 2016, Art. no. 056002, doi: [10.1088/1741-2560/13/5/056002](https://doi.org/10.1088/1741-2560/13/5/056002).
- [23] H. A. S. Kamimura, A. Conti, N. Toschi, and E. E. Konofagou, "Ultrasound neuromodulation: Mechanisms and the potential of multimodal stimulation for neuronal function assessment," *Frontiers Phys.*, vol. 8, p. 150, May 2020, doi: [10.3389/fphy.2020.00150](https://doi.org/10.3389/fphy.2020.00150).
- [24] A. Jerusalem *et al.*, "Electrophysiological-mechanical coupling in the neuronal membrane and its role in ultrasound neuromodulation and general anaesthesia," *Acta Biomaterialia*, vol. 97, pp. 116–140, Oct. 2019, doi: [10.1016/j.actbio.2019.07.041](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.07.041).
- [25] A. Fomenko, C. Neudorfer, R. F. Dallapiazza, S. K. Kalia, and A. M. Lozano, "Low-intensity ultrasound neuromodulation: An overview of mechanisms and emerging human applications," *Brain Stimulation*, vol. 11, no. 6, pp. 1209–1217, Nov. 2018, doi: [10.1016/j.brs.2018.08.013](https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.08.013).
- [26] R. L. King, J. R. Brown, W. T. Newsome, and K. B. Pauly, "Effective parameters for ultrasound-induced *in vivo* neurostimulation," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 39, no. 2, pp. 312–331, Feb. 2013, doi: [10.1016/j.ultrasmedbio.2012.09.009](https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2012.09.009).
- [27] M. Legrand *et al.*, "Efficacy of chronic ultrasound neurostimulation on behaviors and distributed brain metabolism in depressive-like mice," *bioRxiv*, Oct. 2019, Art. no. 813006, doi: [10.1101/813006](https://doi.org/10.1101/813006).

- [28] P. P. Ye, J. R. Brown, and K. B. Pauly, "Frequency dependence of ultrasound neurostimulation in the mouse brain," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 42, pp. 1512–1530, Jul. 2016, doi: [10.1016/j.ultrasmedbio.2016.02.012](https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2016.02.012).
- [29] H. Kim, A. Chiu, S. D. Lee, K. Fischer, and S.-S. Yoo, "Focused ultrasound-mediated non-invasive brain stimulation: Examination of sonication parameters," *Brain Stimulation*, vol. 7, no. 5, pp. 748–759, Sep. 2014, doi: [10.1016/j.brs.2014.06.011](https://doi.org/10.1016/j.brs.2014.06.011).
- [30] G. Li *et al.*, "Improved anatomical specificity of non-invasive neurostimulation by high frequency (5 MHz) ultrasound," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 24738, Apr. 2016, doi: [10.1038/srep24738](https://doi.org/10.1038/srep24738).
- [31] T. Iazourene, H. Malloul, E. Oujagir, J.-M. Escoffre, and A. Bouakaz, "Characterization of ultrasound neurostimulation in mice," in *Proc. IEEE Int. Ultrason. Symp. (IUS)*, Sep. 2020, pp. 1–4, doi: [10.1109/IUS46767.2020.9251345](https://doi.org/10.1109/IUS46767.2020.9251345).
- [32] H. Malloul, M. Bennis, and S. Ba-M'hamed, "Positive reinforcement and c-Fos expression following abuse-like thinner inhalation in mice: Behavioural and immunohistochemical assessment," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 48, no. 5, pp. 2182–2198, Sep. 2018, doi: [10.1111/ejn.14095](https://doi.org/10.1111/ejn.14095).
- [33] K. J. Kovács, "c-Fos as a transcription factor: A stressful (re) view from a functional map," *Neurochem. Int.*, vol. 33, no. 4, pp. 287–297, Oct. 1998, doi: [10.1016/S0197-0186\(98\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(98)00023-0).
- [34] C. Pasquinelli, L. G. Hanson, H. R. Siebner, H. J. Lee, and A. Thielscher, "Safety of transcranial focused ultrasound stimulation: A systematic review of the state of knowledge from both human and animal studies," *Brain Stimulation*, vol. 12, no. 6, pp. 1367–1380, Nov. 2019, doi: [10.1016/j.brs.2019.07.024](https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.07.024).
- [35] A. Kyriakou, E. Neufeld, B. Werner, M. M. Paulides, G. Szekely, and N. Kuster, "A review of numerical and experimental compensation techniques for skull-induced phase aberrations in transcranial focused ultrasound," *Int. J. Hyperthermia*, vol. 30, no. 1, pp. 36–46, 2014, doi: [10.3109/02656736.2013.861519](https://doi.org/10.3109/02656736.2013.861519).
- [36] G. Maimbourg, A. Houdouin, T. Deffieux, M. Tanter, and J.-F. Aubry, "3D-printed adaptive acoustic lens as a disruptive technology for transcranial ultrasound therapy using single-element transducers," *Phys. Med. Biol.*, vol. 63, no. 2, Jan. 2018, Art. no. 025026, doi: [10.1088/1361-6560/aaa037](https://doi.org/10.1088/1361-6560/aaa037).
- [37] S. Almquist, D. L. Parker, and D. A. Christensen, "Rapid full-wave phase aberration correction method for transcranial high-intensity focused ultrasound therapies," *J. Therapeutic Ultrasound*, vol. 4, no. 1, p. 30, Dec. 2016, doi: [10.1186/s40349-016-0074-7](https://doi.org/10.1186/s40349-016-0074-7).



Tarik Iazourene was born in Tizi Ouzou, Algeria, in 1988. He received the bachelor's degree in physics and the master's degree in acoustics from Paris-Diderot University, Paris, France, in 2013 and 2015, respectively. He is currently pursuing the Ph.D. degree with the UMR 1253, iBrain, Inserm, University of Tours, Tours, France.

His current research interests include low-intensity focused ultrasound for brain therapy, in particular, ultrasound neurostimulation in rodents and sheep.



Hanaa Malloul received the B.Sc. degree in biological science from Ibn Zohr University, Agadir, Morocco, in 2011, and the M.Sc. and Ph.D. degrees in neuroscience from Cadi Ayyad University, Marrakech, Morocco, in 2013 and 2018, respectively.

She was a Postdoctoral Researcher with the University of Turin, Turin, Italy, and the Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi, Turin, before joining UMR 1253, iBrain, Inserm, University of Tours, Tours, France, in 2019. Her

research interests include the neurobiological basis for solvent abuse-related disturbances, ultrasound neurostimulation technique, and major depression disorder.

Dr. Malloul is also an IBRO Alumna 2019, she has received multiple awards and honors, including the Worldwide Style (WWS2) Award in 2015 and the IBRO-ARC Bursary in 2019.



Rasha M. Noureddine received the master's degree in biomedical engineering from Lebanese International University, Beirut, Lebanon, in 2015, the master's degree (by research) in medical physics and life imaging from Lebanese University, Beirut, in 2017, and the joint Ph.D. degree in biomedical engineering from the iBrain, Inserm, University of Tours, Tours, France, and Lebanese University in 2021.

Her research interest includes the area of ultrasonic neurostimulation for treating psychiatric disorders involving autism spectrum disorder.



Edward Oujagir received the B.S. and M.S. degrees in cellular biology and physiology from the University of Orléans, Orléans, France, in 2011 and 2013, respectively.

From 2015 to 2018, he was an Engineer Assistant at the Chemical and Biological Technologies for Health Unit, UTBCS, Inserm U1022, CNRS, UMR 8258, Paris Descartes University, Paris, France. First, he worked on small animal imaging platforms on projects in oncology and/or performed *in vivo* fluorescent assays. Second,

he worked on an immunomodulation strategy for colorectal cancer treatment. Since 2018, he is an Engineer Assistant at the Imaging and Brain Unit, Inserm U1253, University of Tours, Tours, France. His main research interests lie in the fields of ultrasound treatments (acoustically mediated drug delivery, ultrasound neuromodulation) and ultrasound imaging in rodent models.



Jean-Michel Escoffre (Member, IEEE) received the M.Sc. degree in vectorology, gene therapy, and vaccinology and cell biophysics from Paul Sabatier University, Toulouse, France, in 2005 and 2006, and the Ph.D. degree in cell biophysics from the Institute of Pharmacology and Structural Biology (CNRS, UMR 5089), Paul Sabatier University, in 2010.

In 2010, he joined Dr. Bouakaz's team at the French Institute for Health and Medical Science (Inserm, UMR 930, Imaging and Brain), Tours,

France, where he worked as a Postdoctoral Researcher for three years on drug delivery using microbubble-assisted ultrasound. From April 2013 to May 2015, he was employed at the Utrecht University Medical Center, The Netherlands. His research focused on therapeutic ultrasound (HIFU, mild-hyperthermia, sonoporation). In June 2015, he came back to Dr. Bouakaz's team before he has held a permanent position as an Inserm Senior Researcher in 2016. His main research interest lies in the fields of biodrug delivery using microbubble-assisted ultrasound and ultrasound neuromodulation.

Dr. Escoffre is an Elected Member of Research and Academic Councils of University of Tours (France) and an Elected Member of Specialized Scientific Commission "Technologies for Health" from Inserm. He is an expert in diagnostic tools, therapies, and public health for many national, European, and international public and private agencies.

Ayache Bouakaz (Senior Member, IEEE) received the M.S. degree in acoustics and the Ph.D. degree from the Department of Electrical Engineering, INSA Lyon, Villeurbanne, France, in 1992 and 1996, respectively.

In 1998, he joined the Department of Bioengineering, Penn State University, State College, PA, USA, as a Postdoctoral Researcher for two years. From 1999 to 2004, he was an Associate Professor with the Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands. His

research focused on imaging, ultrasound contrast agents, and transducer design. Since 2009, he has been the Director of Research at Inserm, Tours, France, where he is currently the Head of the Ultrasound and Imaging Laboratory. His research focuses on imaging and therapeutic applications of ultrasound and contrast agents.

Dr. Bouakaz was the General Chair and the Co-Chair of the 2016 and 2021 international conferences IEEE IUS, and he is the Vice-President of IEEE UFFC in Charge of Symposia.

Chapitre 4 : Influence des paramètres acoustiques sur les réponses motrices dues à la neurostimulation ultrasonore : Une étude électromyographique

Nous avons vu précédemment que l'électromyographie a essentiellement été utilisée pour appuyer les résultats obtenus par l'évaluation visuelle des réponses motrices après neurostimulation ultrasonore. Mais, nous avons également évoqué le fait que cette technique permet d'extraire les principales caractéristiques des réponses motrices. En effet, l'amplitude, la latence ou la durée des réponses sont des propriétés non mesurables avec la méthode visuelle. Ainsi, en complément des résultats vus dans le chapitre précédent, nous présentons les résultats relatifs à ces caractéristiques de réponses motrices. En particulier, l'influence exercée par les paramètres acoustiques tels que la fréquence, le PNP et la durée de l'impulsion ultrasonore, sur ces caractéristiques, est discutée dans ce chapitre. Il est à noter que, comme pour les résultats présentés dans l'article original, ces résultats obtenus par électromyographie ont été soumis à une analyse statistique de type one-way ANOVA, suivie de tests de comparaisons multiples (tests de Tukey post-hoc).

I. Influence du PNP et de la fréquence ultrasonore sur les caractéristiques des réponses motrices

Cette section présente les résultats relatifs à l'influence exercée par le PNP et la fréquence ultrasonore sur l'amplitude, la latence et la durée des réponses électromyographiques, pour une durée d'impulsion ultrasonore (DI) constante de 160 ms. Dans un premier temps, l'influence du PNP est évaluée pour chaque fréquence. Puis, dans un second temps, l'influence de la fréquence est mise en évidence à PNP équivalent entre les différentes fréquences, *i.e.*, à un PNP correspondant à un taux de succès maximal pour chaque fréquence.

1. Influence du PNP à fréquence donnée

Amplitude des réponses motrices

La figure 4.1 montre une augmentation significative de l'amplitude moyenne des réponses motrices en fonction du PNP à 0,5 et 1,5 MHz ($p < 0,05$). Aux deux autres fréquences utilisées, les différences d'amplitude, lorsque le PNP augmente, ne sont pas significatives, mais on peut néanmoins observer une tendance à l'augmentation. Ce résultat est particulièrement visible entre les deux premières valeurs de PNP et le reste des valeurs, aussi bien à 1 MHz qu'à 2,25 MHz. Par ailleurs, on remarque que l'amplitude moyenne des réponses motrices est, de

manière générale, bien plus élevée à 0,5 MHz qu'aux autres fréquences utilisées. En effet, les amplitudes maximales atteintes à 1, 1,5 et 2,25 MHz sont assez comparables, et de l'ordre de 200 à 300 μV , alors que les valeurs atteintes à 0,5 MHz dépassent les 500 à 600 μV pour plusieurs PNP. Les réponses motrices semblent donc plus robustes pour les fréquences inférieures à 1 MHz. Ainsi, il serait intéressant de tester d'autres valeurs de cette plage fréquentielle lors de futurs travaux, afin de voir si cette observation se confirme et, éventuellement, faire le lien avec les mécanismes sous-tendant la neurostimulation.

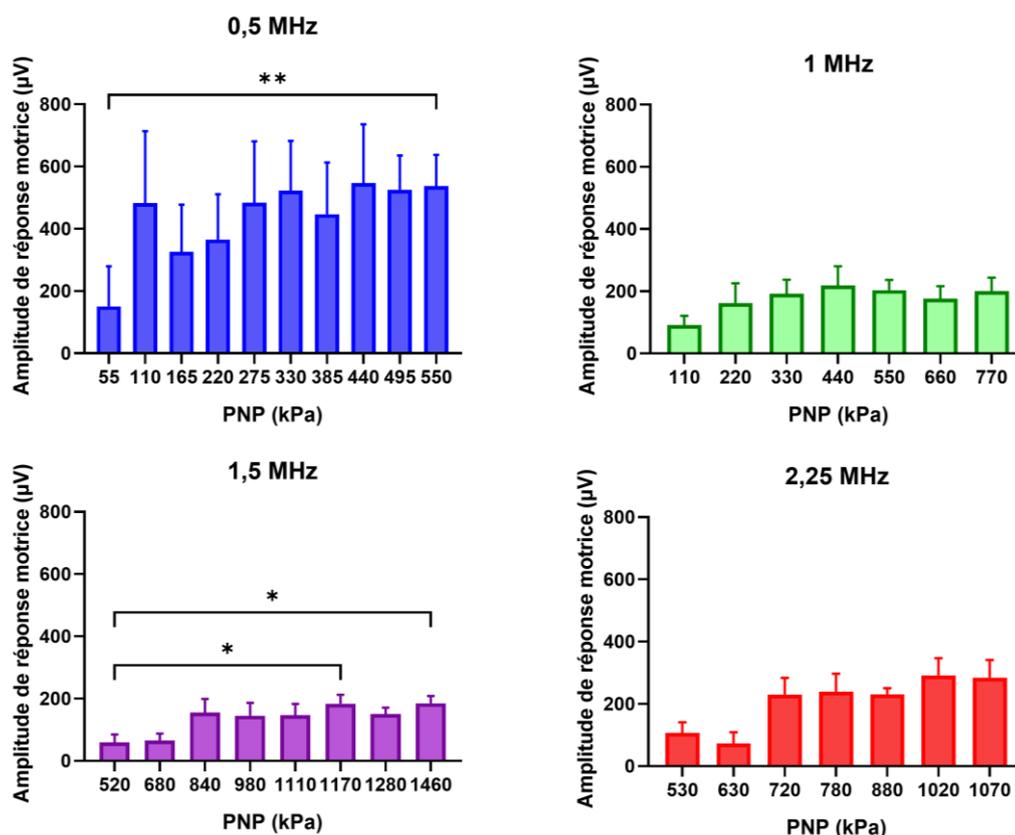


Figure 4.1 : Amplitude des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes fréquences utilisées (DI fixe de 160 ms). Chaque barre représente l'amplitude moyenne des réponses motrices obtenues sur 10 répétitions (à PNP et fréquence donnés), calculée sur N animaux (N = 5 à 0,5, 1 et 1,5 MHz ; N = 3 à 2,25 MHz). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. Tests de Tukey post-hoc : *p < 0,05 et **p < 0,01.

Latence des réponses motrices

A 0,5 MHz, on observe un nette baisse de la latence moyenne des réponse motrices lorsque le PNP augmente, avec une baisse significative entre 165 / 330 kPa et 550 kPa (Fig. 4.2 ; p < 0,05). A titre de comparaison, King *et al.*, ont observé une tendance similaire pour la latence lorsque l'intensité acoustique augmente (f = 0,5 MHz ; mode continu : DS = 80 ms ; IIS \geq 5 s ; intensité acoustique pic à pic = 0,1 – 16,8 W/cm^2) [1]. D'autre part, cette baisse de la latence lorsque le PNP augmente n'est pas vérifiée pour les autres fréquences utilisées, puisqu'aucune différence significative n'y est observée (p > 0,05). Ainsi, ces résultats montrent que la latence des réponses motrices est affectée par la variation du PNP uniquement à la fréquence de 0,5

MHz. Aussi, on remarque que, quelle que soit la fréquence supérieure à 0,5 MHz, la latence des réponses motrices est de l'ordre de 100 à 150 ms. A 0,5 MHz, la latence exhibe des valeurs assez similaires pour les faibles PNP (entre 55 et 220 kPa), mais diminue notablement pour les PNP les plus élevés (495 et 550 kPa), avec des valeurs de l'ordre de 30 ms.

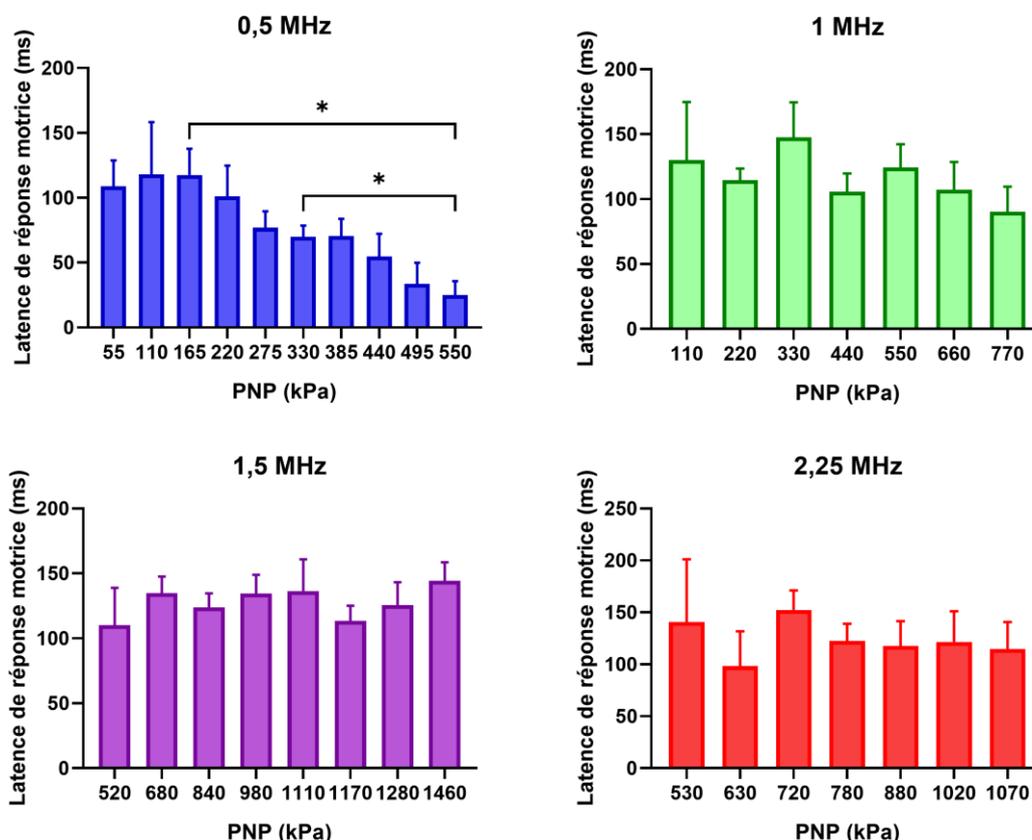


Figure 4.2 : Latence des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes fréquences utilisées (DI fixe de 160 ms). Chaque barre représente la latence moyenne des réponses motrices obtenues sur 10 répétitions (à PNP et fréquence donnés), calculée sur N animaux (N = 5 à 0,5, 1 et 1,5 MHz ; N = 3 à 2,25 MHz). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. Tests de Tukey post-hoc : *p < 0,05.

Durée des réponses motrices

La figure 4.3 montre une augmentation significative de la durée moyenne des réponses motrices pour une fréquence de 2,25 MHz (entre 630 et 1070 kPa ; p < 0,05). Aux fréquences inférieures, on note également une augmentation, non significative cependant, de la durée avec le PNP appliqué. Par ailleurs, on remarque que les valeurs de durée moyenne des réponses motrices sont comparables entre les fréquences 1, 1,5 et 2,25 MHz, alors que les valeurs à 0,5 MHz sont globalement bien plus élevées. En effet, la durée maximale des réponses motrices à cette dernière fréquence est de l'ordre de 1 s (1000 ms), alors qu'elle est environ trois à cinq fois plus faible pour les autres fréquences (de l'ordre de 200 à 300 ms).

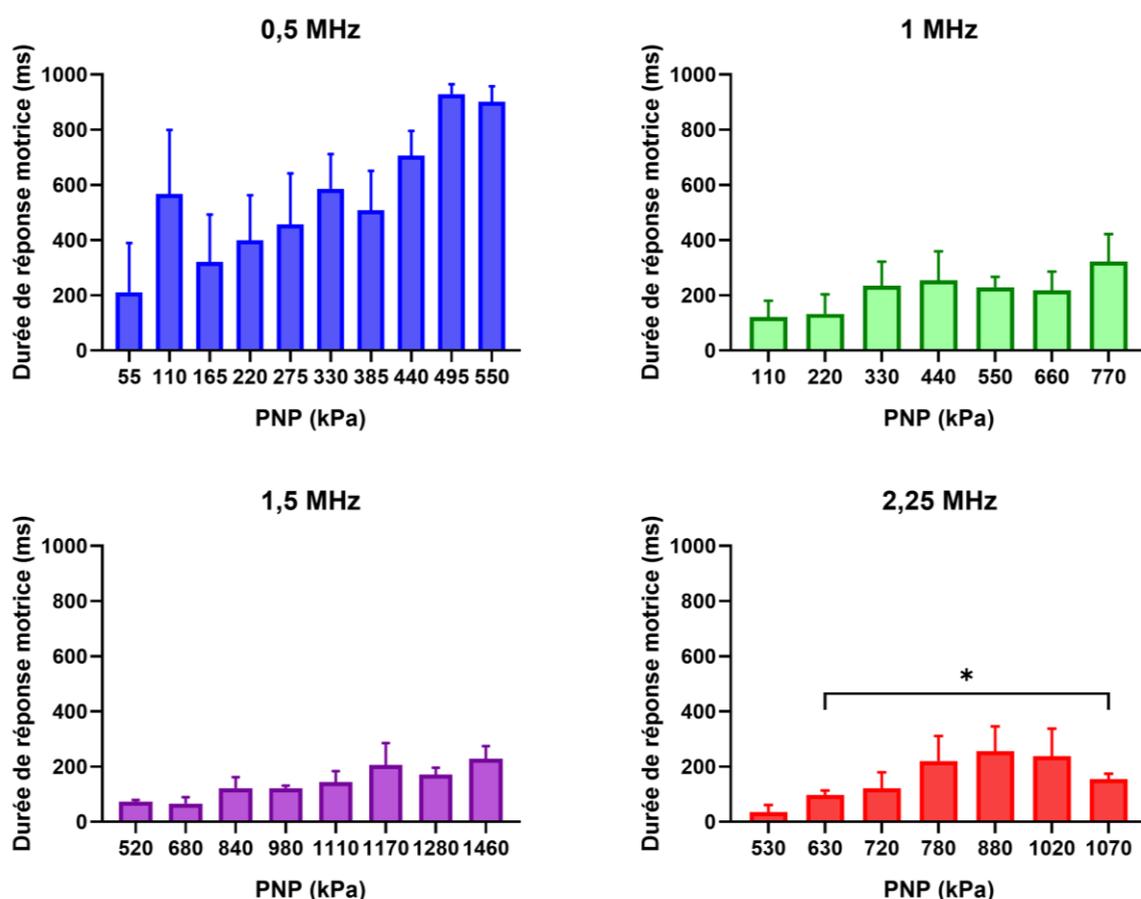


Figure 4.3 : Durée des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes fréquences utilisées (DI fixe de 160 ms). Chaque barre représente la durée moyenne des réponses motrices obtenues sur 10 répétitions (à PNP et fréquence donnés), calculée sur N animaux (N = 5 à 0,5, 1 et 1,5 MHz ; N = 3 à 2,25 MHz). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. Tests de Tukey post-hoc : *p < 0,05.

2. Influence de la fréquence à PNP équivalent

Les valeurs de PNP utilisées aux différentes fréquences n'étant pas les mêmes, il n'est pas possible d'effectuer la comparaison inter-fréquences des caractéristiques des réponses motrices à PNP constant. C'est ainsi que nous avons tracé des graphiques à PNP équivalent, correspondant à un taux de succès maximal (90 – 100 %), afin de pouvoir réaliser cette comparaison. Ainsi, la figure 4.4 compare les valeurs de l'amplitude, de la latence et de la durée des réponses motrices, prises au PNP maximal de chaque fréquence.

Les résultats de la figure 4.4 montrent qu'à PNP équivalent, correspondant à un taux de succès maximal, l'amplitude et la durée des réponses motrices sont significativement plus importantes à 0,5 MHz, comparativement aux autres fréquences (p < 0,01 et p < 0,001, respectivement). Tufail *et al.*, ont également observé une diminution de l'amplitude des réponses motrices lorsque la fréquence augmente, mais pour des fréquences plus faibles (0,25 – 0,5 MHz) et à I_{SPTA} constante [2]. En outre, la latence des réponses motrices est significativement plus courte à 0,5 MHz, par rapport aux valeurs de latence observées à 1,5 et

2,25 MHz ($p < 0,05$). Ainsi, l'ensemble de ces résultats permet de déduire que, lorsque le PNP utilisé correspond à un taux de succès maximal, les réponses motrices obtenues à 0,5 MHz sont plus fortes, ont lieu plus vite et durent plus longtemps, comparativement aux autres fréquences. Cette analyse abonde dans le même sens que les observations précédentes, à savoir que la neurostimulation ultrasonore à une fréquence de 0,5 MHz génère des réponses motrices plus robustes que les fréquences supérieures ou égales à 1 MHz. Ainsi, il se pourrait que les neurones du cortex moteur soient plus excitables à une fréquence de 0,5 MHz, générant ainsi des réponses motrices plus rapidement, et de manière plus intense et plus longue par rapport aux fréquences supérieures. Il serait donc intéressant, lors de futurs travaux, de rechercher une explication à cette observation à travers le prisme des mécanismes sous-jacents à la neurostimulation ultrasonore. En effet, les différences observées au niveau des réponses motrices pourraient indiquer que la neurostimulation fonctionne différemment suivant la fréquence utilisée, tant au niveau cellulaire que des réseaux de neurones. C'est d'ailleurs la conjecture émise par Li *et al.*, qui, notant une diminution de la latence des réponses lorsque la fréquence augmente de 1 à 5 MHz, ont suggéré que la fonction et le nombre de réseaux neuronaux activés aux deux fréquences pourraient être différents. Par ailleurs, ils ont émis une autre hypothèse qui explique cette baisse de latence par l'élévation de température qui accompagne l'augmentation de fréquence [3]. Cette dernière hypothèse irait néanmoins à l'encontre des conclusions de Baek *et al.*, qui indiquent que les effets mécano-thermiques des ultrasons seraient plutôt associés à des latences plus longues et à de plus grandes amplitudes, en comparaison des seuls effets mécaniques (à $f = 1$ MHz) [4].

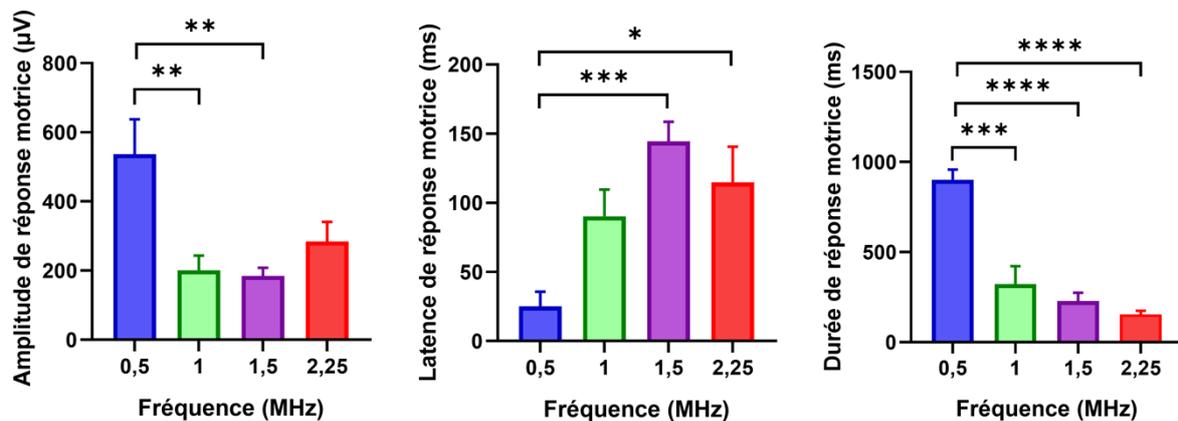


Figure 4.4 : Amplitude, latence et durée des réponses motrices en fonction de la fréquence utilisée (DI fixe de 160 ms). A chaque fréquence, la valeur représentée est celle obtenue au pic négatif de pression (PNP) maximal (550 kPa à 0,5 MHz, 770 kPa à 1 MHz, 1460 kPa à 1,5 MHz, et 1070 kPa à 2,25 MHz). Chaque barre représente la moyenne des réponses motrices obtenues sur 10 répétitions (à fréquence / PNP maximal donnés), calculée sur N animaux (N = 5 à 0,5, 1 et 1,5 MHz ; N = 3 à 2,25 MHz). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. Tests de Tukey post-hoc : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$.

II. Influence de la durée de l'impulsion ultrasonore sur les caractéristiques des réponses motrices

Cette section présente les résultats relatifs à l'influence exercée par le PNP et la durée de l'impulsion ultrasonore sur l'amplitude, la latence et la durée des réponses motrices, à une fréquence constante de 1,5 MHz. Tout d'abord, l'influence du PNP est évaluée pour chaque DI utilisée. Ensuite, l'influence de la DI est mise en évidence à PNP constant (PNP maximal utilisé à 1,5 MHz, *i.e.*, 1460 kPa).

1. Influence du PNP à durée d'impulsion ultrasonore (DI) donnée

Amplitude des réponses motrices

Sur la figure 4.5, on peut observer que, quelle que soit la DI utilisée, l'amplitude moyenne des réponses motrices augmente significativement avec le PNP ($p < 0,05$). Aussi, il apparaît une différence notable des amplitudes observées à 320 ms par rapport aux deux autres DI, avec des valeurs maximales de l'ordre de 800 μV , contre 200 μV , respectivement.

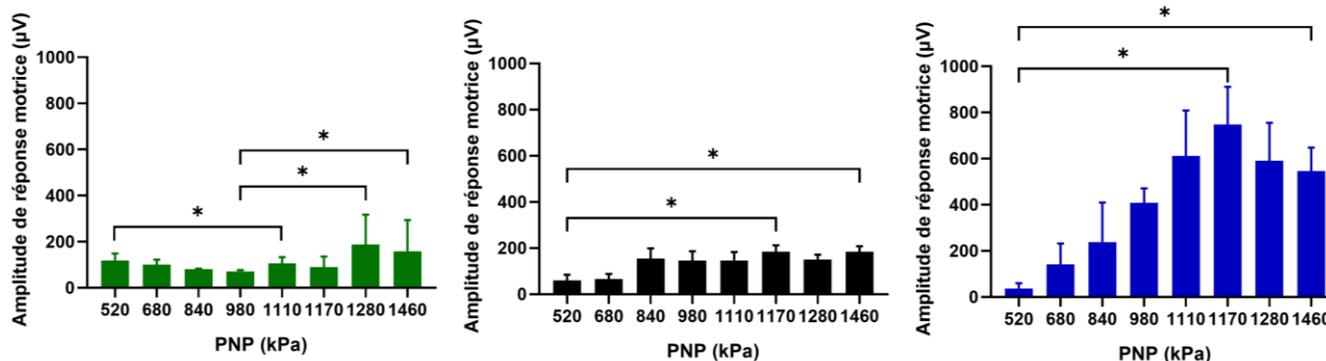


Figure 4.5 : Amplitude des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes DI utilisées (à une fréquence fixe de 1,5 MHz) : 53,3 ms (en vert, fig. de gauche), 160 ms (en noir, fig. centrale), et 320 ms (en bleu, fig. de droite). Chaque barre représente l'amplitude moyenne des réponses motrices obtenues sur 10 répétitions (à PNP et DI donnés), calculée sur N animaux (N = 5 pour 160 ms ; N = 4 pour 53,3 et 320 ms). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. Tests de Tukey post-hoc : * $p < 0,05$.

Latence des réponses motrices

Sur la figure 4.6, on remarque que, pour une DI de 53,3 ms, la variation de la latence en fonction du PNP ne suit pas une tendance nette. En effet, on observe une baisse significative de cette latence entre 520 et 1110 kPa, puis une hausse significative entre 980 et 1280 / 1460 kPa ($p < 0,05$). Ensuite, pour une DI de 160 ms, les résultats ne montrent aucune variation significative de la latence ($p > 0,05$). Enfin, les résultats pour une DI de 320 ms montrent une augmentation significative de la latence avec le PNP (520 *versus* 1460 kPa, et 680 *versus* 1170 / 1460 kPa ; $p < 0,05$). Par ailleurs, les valeurs de latence relevées pour les deux DI les plus

courtes (53,3 et 160 ms) sont de l'ordre de 50 à 150 ms, alors qu'elles dépassent les 400 ms pour une DI de 320 ms.

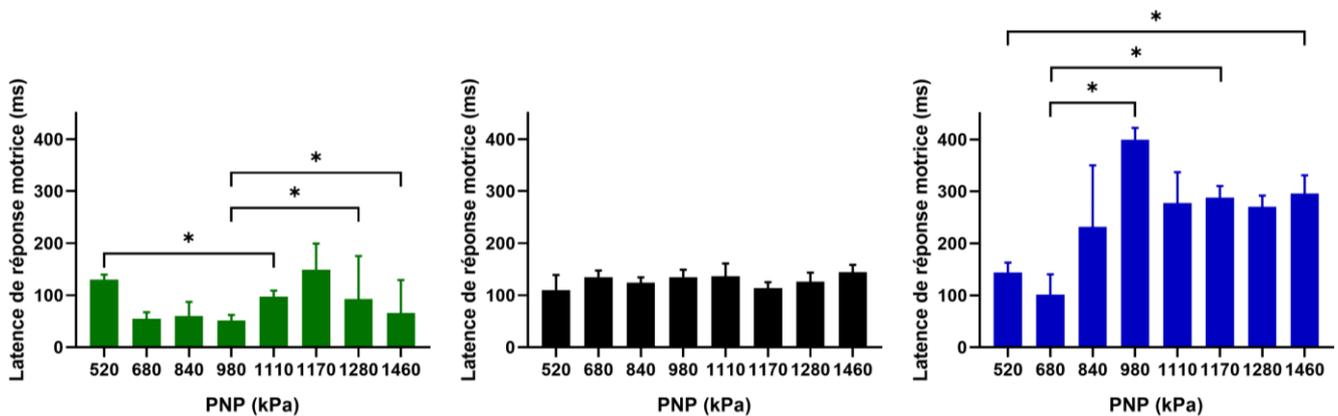


Figure 4.6 : Latence des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes DI utilisées (à une fréquence fixe de 1,5 MHz) : 53,3 ms (en vert, fig. de gauche), 160 ms (en noir, fig. centrale), et 320 ms (en bleu, fig. de droite). Chaque barre représente la latence moyenne des réponses motrices obtenues sur 10 répétitions (à PNP et DI donnés), calculée sur N animaux (N = 5 pour 160 ms ; N = 4 pour 53,3 et 320 ms). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. Tests de Tukey post-hoc : * $p < 0,05$.

Durée des réponses motrices

Sur la figure 4.7, on observe que la durée moyenne des réponses motrices augmente significativement avec le PNP, pour des DI de 53,3 et 320 ms ($p < 0,05$). Pour une DI de 160 ms, les résultats ne montrent pas de variation significative, mais esquissent néanmoins une tendance à l'augmentation ($p > 0,05$). Enfin, on remarque que, de manière générale, les réponses motrices durent bien plus longtemps pour une DI de 320 ms. En effet, pour cette dernière, la durée moyenne des réponses motrices dépasse les 500 ms pour plusieurs PNP (PNP ≥ 1170 kPa), alors que les valeurs maximales atteintes pour les DI 53,3 et 160 ms sont de l'ordre de 200 ms.

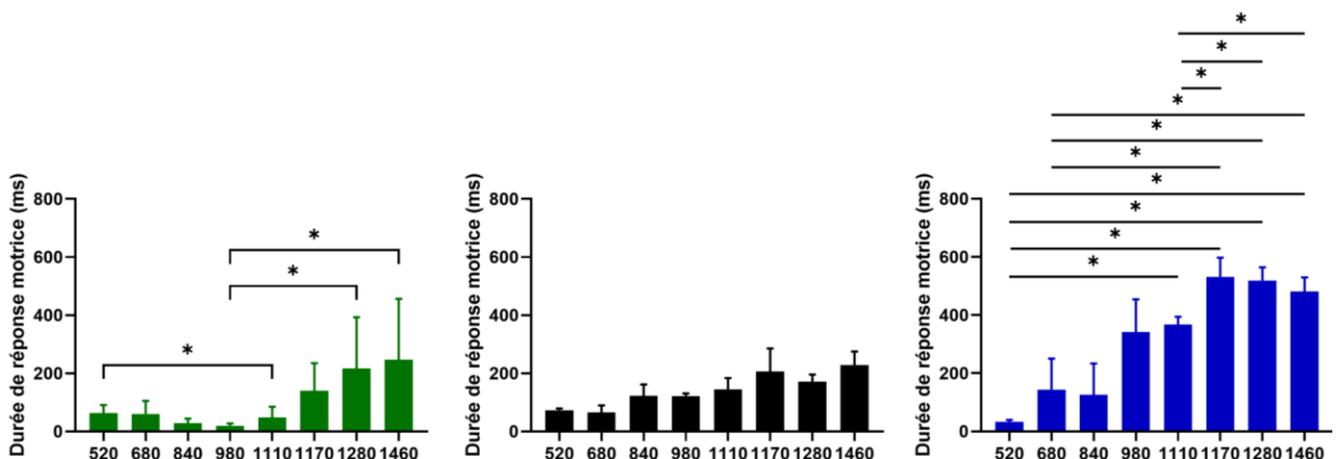


Figure 4.7 : Durée des réponses motrices en fonction du pic négatif de pression (PNP), aux différentes DI utilisées (à une fréquence fixe de 1,5 MHz) : 53,3 ms (en vert, fig. de gauche), 160 ms (en noir, fig. centrale), et 320 ms (en bleu, fig. de droite). Chaque barre représente la durée moyenne des réponses motrices obtenues sur 10 répétitions (à PNP et DI donnés), calculée sur N animaux (N = 5 pour 160 ms ; N = 4 pour 53,3 et 320 ms). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. Tests de Tukey post-hoc : * $p < 0,05$.

2. Influence de la durée d'impulsion ultrasonore (DI) à PNP constant

La figure 4.8 montre, à PNP constant (PNP maximal utilisé à 1,5 MHz, *i.e.*, 1460 kPa), une nette augmentation de l'amplitude et de la latence moyennes des réponses motrices, lorsque la DI augmente de 53,3 / 160 ms à 320 ms ($p < 0,05$). Comme indiqué par l'étude de Baek *et al.*, l'augmentation de ces deux caractéristiques pourrait indiquer une influence plus importante des effets thermiques dans le processus de neurostimulation ultrasonore, en plus des effets mécaniques initialement présents [4]. Néanmoins, ces résultats nécessitent une confirmation, d'autant qu'ils contredisent ceux de certains travaux. En effet, King *et al.*, par exemple, ont observé que la DI n'avait pas d'influence sur la force (proportionnelle à l'amplitude) et la latence des réponses motrices [1].

D'autre part, sur la figure 4.8, on peut noter que la durée moyenne des réponses motrices augmente également avec la DI, mais de manière non significative ($p > 0,05$), passant de 200 ms à 500 ms environ, pour des DI respectives de 53,3 ms et 320 ms. A ce sujet, les observations rapportées par Mohammadjavad *et al.*, par exemple, sont assez similaires, avec une durée de réponses motrices qui augmente linéairement avec la DI, de 100 à 600 ms environ ($f = 0,5$ MHz ; DI = 80 – 680 ms ; $I_{SPTA} = 2,9$ W/cm²) [5].

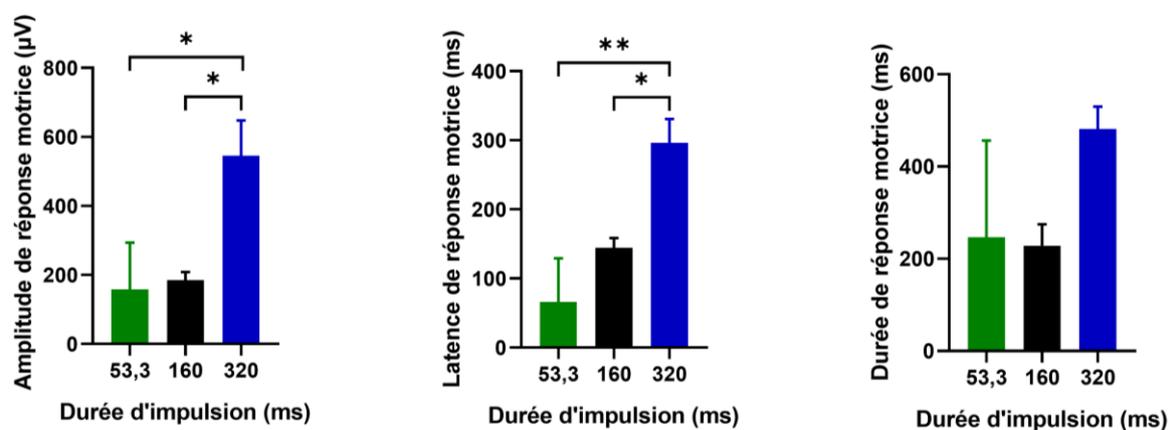


Figure 4.8 : Amplitude, latence et durée des réponses motrices en fonction de la DI utilisée (à fréquence fixe de 1,5 MHz). Pour chaque DI, la valeur représentée est celle obtenue au pic négatif de pression (PNP) maximal (1460 kPa). Chaque barre représente la moyenne des réponses motrices obtenues sur 10 répétitions (à DI donnée, au PNP maximal), calculée sur N animaux (N = 5 pour 160 ms ; N = 4 pour 53,3 et 320 ms). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. Tests de Tukey post-hoc : * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

III. Conclusions

Les résultats relatifs aux caractéristiques des réponses motrices, obtenus par électromyographie et non publiés dans l'article original, ont été présentés dans ce chapitre. Ils montrent que lorsque la fréquence augmente (à une DI fixe de 160 ms), l'amplitude et la durée des réponses motrices diminuent, tandis que leur latence augmente. D'autre part, lorsque la DI augmente (à fréquence fixe de 1,5 MHz), ces trois données caractéristiques de la

réponse motrice augmentent. Quant au PNP, nous avons vu qu'il exerçait une influence sur ces caractéristiques dans certains cas seulement, à fréquence et DI constantes.

En outre, il est important de remarquer que ces résultats confirment que les réponses observées ne sont pas des mouvements de réflexe des animaux stimulés. En effet, tel qu'expliqué par Mohammadjavadi *et al.*, le fait que les valeurs de latence observées soient supérieures à 10 ms (valeur typique des mouvements de réflexe) et que la durée des réponses motrices dépende de la DI utilisée indique que les réponses observées sont bien des réponses motrices [5].

L'une des déductions principales découlant de ces résultats est donc que l'usage d'une basse fréquence (0,5 MHz, à DI = 160 ms) permet d'obtenir des réponses plus fortes et qui durent plus longtemps. De plus, à cette même fréquence et avec la même DI, l'usage d'un PNP maximal (550 kPa) permet de minimiser la latence des réponses motrices (≈ 30 ms). Ainsi, l'usage de ces paramètres semble générer des réponses motrices de manière plus facile et plus robuste, en comparaison des autres paramètres, notamment les autres valeurs de fréquence. Cet élément pourrait s'expliquer par l'hypothèse avancée par Li *et al.*, à savoir une fonction et un nombre de réseaux neuronaux stimulés différents suivant la fréquence utilisée [3]. Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'investiguer ce sujet, et d'établir un lien entre ces observations et les mécanismes sous-jacents à la neurostimulation ultrasonore, aussi bien au niveau cellulaire que des réseaux de neurones. Par ailleurs, il serait intéressant de reproduire les expériences avec plusieurs diamètres de tâche focale à chaque fréquence, afin de mettre en évidence la potentielle influence de ce paramètre sur les caractéristiques des réponses motrices.

Aussi, une autre observation importante qui ressort de ces résultats est que l'utilisation d'une longue DI (320 ms, à 1,5 MHz de fréquence) permet également d'obtenir des réponses plus importantes et qui durent plus longtemps, par rapport aux DI plus faibles. Cependant, cette augmentation de la DI s'accompagne d'une augmentation de la latence, ce qui, d'après les travaux de Baek *et al.*, pourrait être associé à la présence d'effets thermiques dans le processus de neurostimulation ultrasonore, en plus des effets mécaniques [4].

Enfin, ces analyses seules ne permettent pas de statuer sur les valeurs optimales des paramètres acoustiques à utiliser pour la neurostimulation. En effet, le caractère optimal de ces valeurs dépend de l'utilisation souhaitée de la technique et des résultats recherchés. De plus, avant de pouvoir tirer des conclusions définitives, il serait nécessaire de reproduire ces résultats au niveau des différents membres des animaux, ainsi qu'en ciblant d'autres coordonnées du cortex moteur. En effet, comme rapporté par Aurup *et al.*, les résultats peuvent être différents suivant la zone cérébrale ciblée et la patte observée [6].

Références bibliographiques

- [1] R. L. King, J. R. Brown, W. T. Newsome, et K. B. Pauly, « Effective Parameters for Ultrasound-Induced In Vivo Neurostimulation », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 39, n° 2, p. 312-331, févr. 2013, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.09.009.
- [2] Y. Tufail *et al.*, « Transcranial Pulsed Ultrasound Stimulates Intact Brain Circuits », *Neuron*, vol. 66, p. 681-694, juin 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.008.
- [3] G.-F. Li *et al.*, « Improved Anatomical Specificity of Non-invasive Neuro-stimulation by High Frequency (5 MHz) Ultrasound », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 1, p. 24738, juill. 2016, doi: 10.1038/srep24738.
- [4] H. Baek *et al.*, « Mechanical and mechanothermal effects of focused ultrasound elicited distinct electromyographic responses in mice », *Phys. Med. Biol.*, vol. 66, n° 13, p. 135005, juill. 2021, doi: 10.1088/1361-6560/ac08b1.
- [5] M. Mohammadjavadi, P. P. Ye, A. Xia, J. Brown, G. Popelka, et K. B. Pauly, « Elimination of peripheral auditory pathway activation does not affect motor responses from ultrasound neuromodulation », *Brain Stimulat.*, vol. 12, n° 4, p. 901-910, juill. 2019, doi: 10.1016/j.brs.2019.03.005.
- [6] C. Aurup, H. A. S. Kamimura, et E. E. Konofagou, « High-Resolution Focused Ultrasound Neuromodulation Induces Limb-Specific Motor Responses in Mice in Vivo », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 47, n° 4, p. 998-1013, avr. 2021, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.12.013.

Chapitre 5 : Faisabilité de la neurostimulation ultrasonore chez la brebis

Après les études sur la neurostimulation ultrasonore que nous avons réalisées chez les rongeurs, il était intéressant de mener des travaux équivalents sur le gros animal. C'est ainsi qu'un projet de recherche⁴⁵, ayant pour objet l'étude de la neurostimulation ultrasonore dans un modèle ovin, a été mis en place, en collaboration avec l'INRAE⁴⁶ - Val de Loire.

Ce projet est né du besoin d'une équipe de neurochirurgiens, affiliés à notre laboratoire, qui réalisent des chirurgies éveillées chez des patients atteints de tumeurs cérébrales, et cherchent à limiter au maximum les séquelles liées à ces chirurgies. En effet, lors de telles opérations, il est important de laisser intactes des zones dites éloquentes, liées par exemple au langage ou à la motricité, afin de préserver la qualité de vie post-opératoire des patients. Pour ce faire, les chirurgiens réalisent une cartographie des différentes zones cérébrales fonctionnelles pendant l'opération, en stimulant électriquement les zones corticales concernées pendant que les patients réalisent des tâches cognitives. La stimulation électrique démontre alors un effet stimulateur dans certains cas (notamment pour le système sensorimoteur), et inhibiteur dans d'autres (langage, motricité, cognition). Néanmoins, d'après les neurochirurgiens, cette technique présente un risque épileptogène, qui est particulièrement élevé lorsque la durée de la stimulation est prolongée. Ainsi, son utilisation est limitée à 4 secondes au maximum, obligeant les patients à réaliser des tests neuropsychologiques dans ce court laps de temps. Cet élément constitue donc une limitation majeure pour l'utilisation de la technique souhaitée par les neurochirurgiens. L'utilisation de la neurostimulation ultrasonore offrirait ainsi une alternative exempte de cette limitation. En effet, elle permettrait de prolonger la durée des tests neuropsychologiques peropératoires tout en évitant le risque épileptogène, aucun effet de ce type n'ayant été rapporté dans la littérature. Cette technique ouvrirait donc la porte à une palette de tests plus large, et à un confort accru dans le travail. Ainsi, la neurostimulation ultrasonore permettrait de rendre la cartographie fonctionnelle du cerveau plus fiable, et permettrait à la communauté scientifique de recueillir plus de données sur les chirurgies éveillées du cerveau. Par ailleurs, il est à noter que, dans le cadre de cette étude, les problèmes liés à l'aberration du faisceau ultrasonore par le crâne ne se posent pas, étant donné que la technique est destinée à une utilisation à crâne ouvert, ce qui constitue une facilité majeure.

⁴⁵ Titre du projet : *STIMUS 1 - Stimulation ultrasonore cérébrale peropératoire : Etude de faisabilité chez le mouton.*

⁴⁶ Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement – site de Tours (Nouzilly).

I. Matériel et méthodes

Pour cette étude, dix brebis adultes (race Ile-de-France ; âgées de 2 – 4 ans ; masse corporelle de 50 – 80 kg environ) et ovariectomisées⁴⁷ ont été utilisées. Lors des expériences, elles étaient placées sur une table percée de trous, permettant d’y passer les pattes de l’animal afin d’observer correctement leurs mouvements lors de la stimulation. En outre, la tête des brebis était maintenue droite durant les expériences à l’aide d’un cadre dédié à cet effet (Fig. 5.1).



Figure 5.1 : Dispositif expérimental utilisé pour la fixation de l’animal, composé d’une table percée de trous, permettant d’y faire passer les pattes de l’animal (image de gauche), et d’un cadre maintenant la tête de l’animal fixe (image de droite).

Préalablement aux expériences de neurostimulation, les animaux subissaient une craniotomie au niveau de la position du cortex moteur, afin de rendre cette zone cérébrale accessible lors des expérimentations. Auparavant, la laine des brebis était tondue au niveau de la tête, des épaules, du cou et des cuisses, pour les besoins de la chirurgie et des expériences. Par ailleurs, durant toute la durée des manipulations, les animaux étaient maintenus sous anesthésie générale chimique (propofol : 40 mL pour l’induction ; puis diffusion, *via* un cathéter, d’un mélange propofol + sérum physiologique à 180 mL/L : débit de 350 – 1000 mL/h). En outre, l’injection sous-cutanée d’une anesthésie locale (0,5 – 1 mL de Buprécare + 5 – 10 mL de Procamidol ; Laboratoire Axience, Pantin, France) était réalisée peu avant la craniotomie, au niveau de l’endroit de l’incision. Aussi, les animaux étaient placés sous respirateur, par l’intermédiaire d’une intubation (*cf.* Fig. 5.1). D’autre part, durant toute la durée de la chirurgie puis de l’expérimentation, le rythme cardiaque et la saturation de l’hémoglobine en dioxygène (SpO₂) des animaux étaient régulièrement surveillés.

⁴⁷ Ovariectomies réalisées à l’aide d’un implant d’estradiol, à la même saison, afin de limiter les variations hormonales relatives à la photopériode et au cycle de reproduction.

Pour la craniotomie, une ouverture d'une longueur de quelques centimètres (4 – 5 cm, typiquement) était réalisée au niveau de la position du cortex moteur. De petites languettes numérotées⁴⁸ étaient déposées sur le tissu cérébral découvert afin de repérer les différentes zones du cortex moteur à stimuler (Fig. 5.2). Par ailleurs, du sérum physiologique était régulièrement versé sur le tissu cérébral découvert afin d'éviter qu'il ne se dessèche.

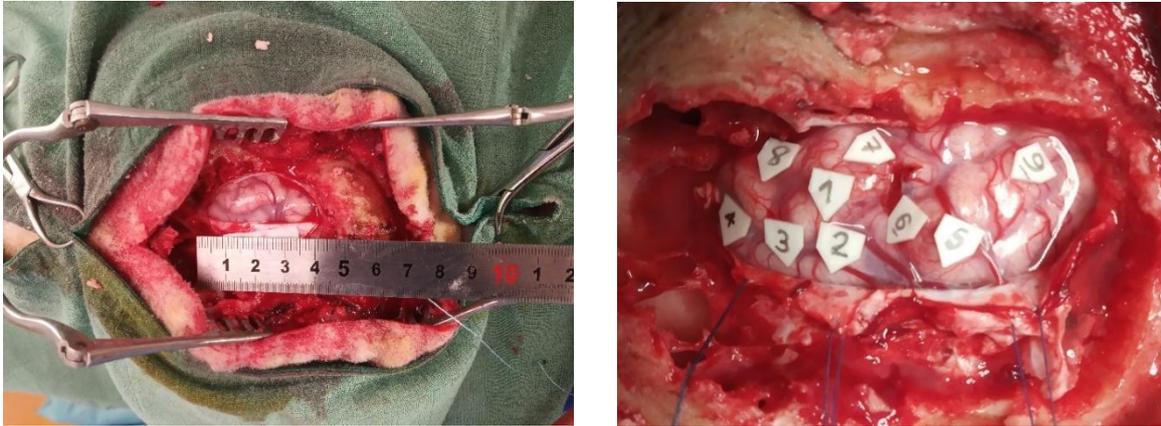


Figure 5.2 : Craniotomie réalisée sur une des brebis, au niveau des coordonnées du cortex moteur. L'ouverture est maintenue à l'aide d'écarteurs et de pinces (image de gauche) et de fil chirurgical (image de droite). Des languettes numérotées, déposées sur le tissu découvert, permettent de se repérer visuellement au sein du cortex moteur (image de droite).

Les expériences de neurostimulation débutaient par des tests de réactivité de l'animal à la stimulation électrique (onde biphasique rectangulaire de fréquence 60 Hz, de durée 1 s et d'amplitude 7 – 10 mA). Cette stimulation était réalisée au moyen d'une sonde (Fig. 5.3), connectée à un appareil de stimulation électrique peropératoire de type Nimbus (Innopsys, Chicago, IL, USA). La neurostimulation par ultrasons était mise en œuvre une fois que des réponses motrices étaient observées à la suite de la stimulation électrique. Ce recours à la stimulation électrique avait essentiellement lieu en début d'expérience, mais pouvait également avoir lieu plus tard durant l'expérimentation, en cas de baisse de la réactivité de l'animal à la stimulation ultrasonore.

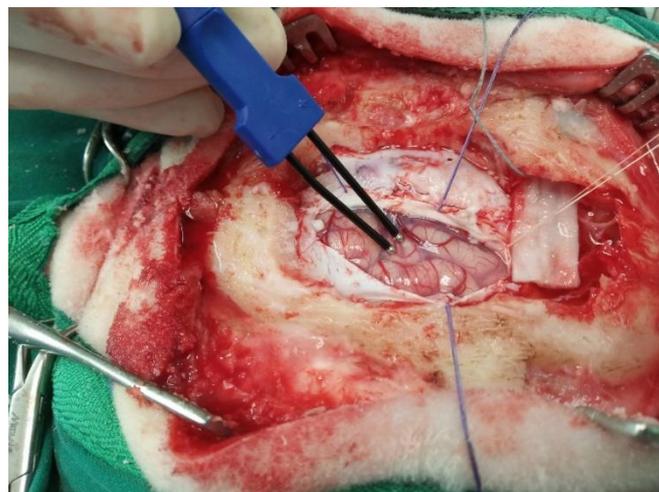


Figure 5.3 : Sonde utilisée pour l'application de la stimulation électrique.

⁴⁸ Une fois photographiées, ces languettes étaient retirées.

Pour la neurostimulation ultrasonore, différentes sondes ont été testées, dont les sondes mono-élément Imasonic et Sonic Concepts vues précédemment (*cf.* Chapitre 2, p. 82), ainsi que deux autres sondes du constructeur Ultran (GPS350-D25-P38 et GS200-D25-P50 ; The Ultran Group, State College, PA, USA). La sonde Ultran GPS350 a été utilisée à 350 kHz, sa fréquence centrale, ainsi qu'à 250 kHz. Cette sonde, de diamètre 25 mm et de longueur focale 35 mm, était associée à un cône rempli d'eau dégazée lors de son utilisation (Fig. 5.4, image de gauche). L'autre sonde Ultran (GS200), de diamètre 25 mm et de longueur focale 15 mm, a été utilisée à une fréquence de 220 kHz. Nous avons préféré utiliser cette dernière sonde avec un bloc de gel ultrasonore⁴⁹ (Fig. 5.4, image de droite) plutôt qu'avec un cône rempli d'eau dégazée, ce qui facilitait son positionnement au niveau de la zone cérébrale ciblée, notamment.

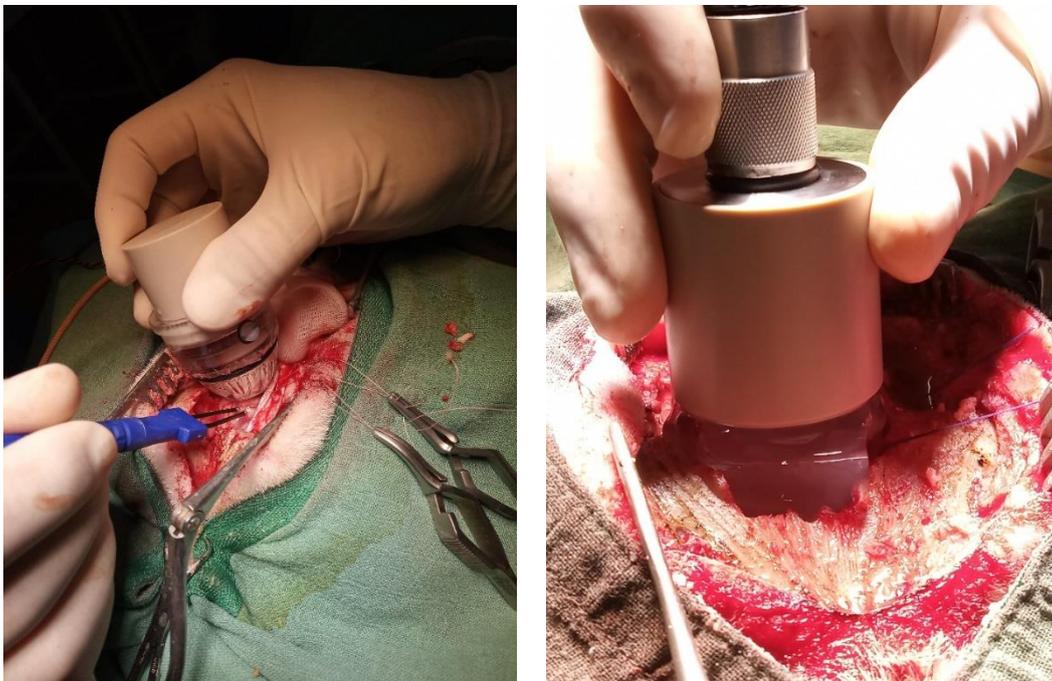


Figure 5.4 : Sondes ultrasonores Ultran utilisées lors des expériences de neurostimulation sur la brebis. La sonde GPS350, de fréquence centrale 350 kHz (également utilisée à 250 kHz), a été testée ; elle est montrée ici, munie d'un cône en plexiglas rempli d'eau dégazée, lors d'essais réalisés pour voir si les ultrasons inhibaient les effets de la stimulation électrique (image de gauche). L'autre sonde (GS200) a été utilisée à une fréquence de 220 kHz, avec un bloc de gel ultrasonore plutôt qu'un cône rempli d'eau dégazée (image de droite).

⁴⁹ Facilement adaptable à la forme et à la taille de l'ouverture réalisée dans le crâne, mais également à la sonde ultrasonore (diamètre et longueur focale), en le découpant aux bonnes dimensions.

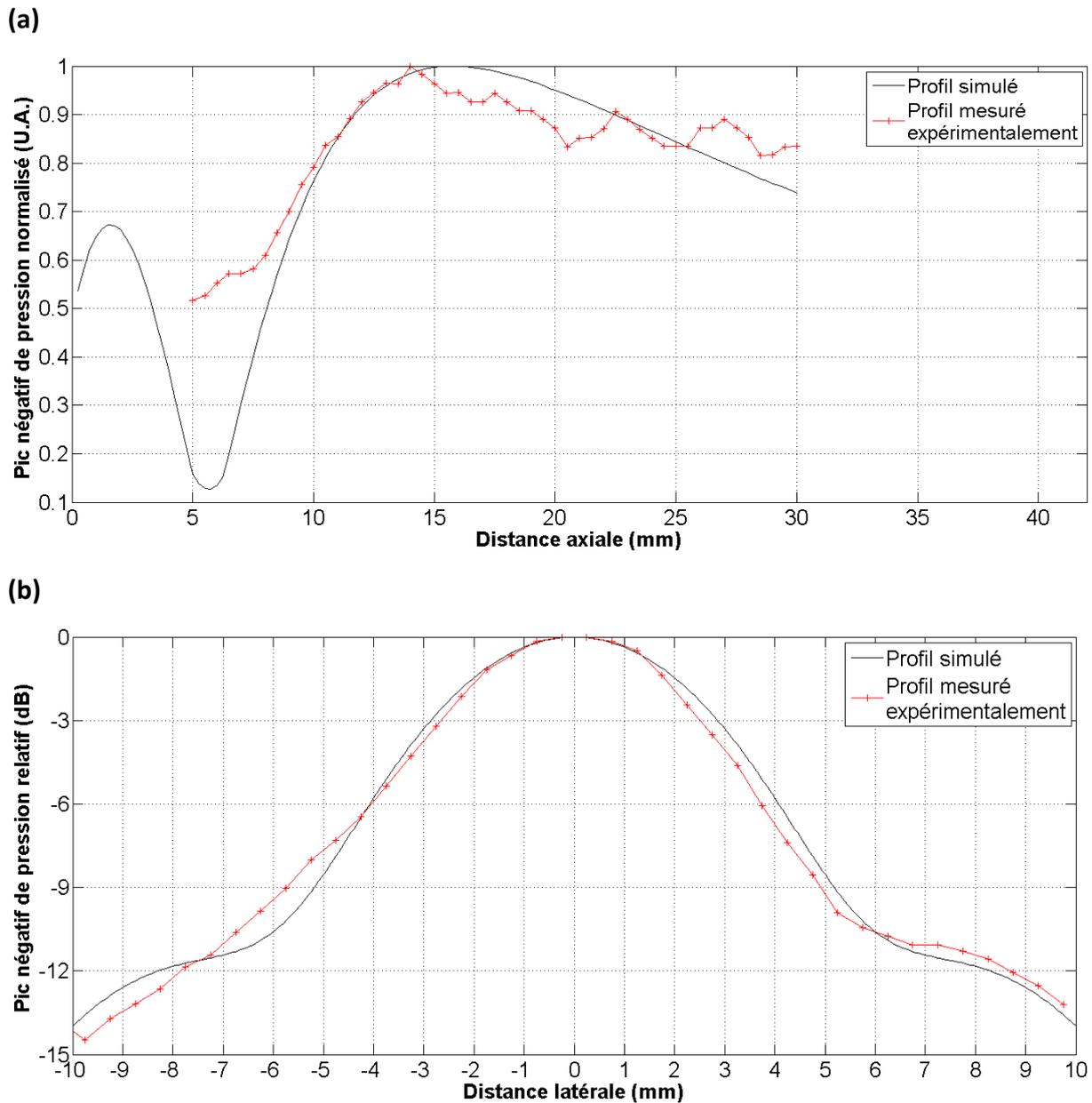


Figure 5.5 : Profils de pression axiaux (a) et latéraux (b) simulés et mesurés expérimentalement, pour la sonde Ultrason GS200, à sa fréquence centrale (220 kHz). La simulation a été réalisée avec un diamètre actif de 24 mm et un rayon de courbure de 50 mm (logiciel Field II).

Les différentes sondes ultrasonores étaient branchées au même dispositif d'émission de formes d'ondes que celui utilisé pour les expériences chez les rongeurs (*cf.* Chapitre 2, p. 80), avec cependant un amplificateur de puissance différent (AAP-500-0.2-6-D ; ADECE, Vallauris, France). Aussi, nous avons enregistré des données par électromyographie en utilisant le dispositif décrit précédemment, en insérant les aiguilles⁵⁰ au niveau des muscles des pattes avant et/ou arrière des animaux, notamment. Le traitement des données ainsi obtenues a été effectué de manière assez similaire à celui effectué chez la souris (*cf.* Chapitre 3, p. 122, et

⁵⁰ L'aiguille de terre était insérée à l'arrière du cou des animaux, au niveau du milieu de l'axe médiolatéral.

annexe 1, pp. 174 – 176), en prenant également en compte la méthode décrite par Yoon *et al.* [1].

Par ailleurs, les expériences de neurostimulation ultrasonore ont été menées en testant d'autres paramètres acoustiques en plus de la fréquence, comme le PNP, la durée d'impulsion (DI), la fréquence de répétition (FR), la durée de sonication (DS) ou encore l'intervalle inter-stimulus (IIS). Le choix de ces paramètres s'appuyait notamment sur les études de Yoon *et al.* [1] et Lee *et al.* [2], ainsi que sur nos travaux chez la souris (Tableau 5.1).

	Fréquence (MHz)	DI (ms)	FR (kHz)	DS (ms)	IIS (s)	PNP (kPa)
Mode pulsé	0,22, 0,25, 0,35, 0,375 et 0,5	0,5 – 2	0,35 – 1,4	200 – 300	1 – 5	150 – 1100
Mode continu	0,35, 0,5 et 1,5			140 – 160 et 320	1 – 10	350 – 800

Tableau 5.1 : Paramètres acoustiques testés pour les expériences de neurostimulation ultrasonore chez la brebis. DI = Durée d'impulsion ultrasonore ; FR = Fréquence de répétition ; DS = Durée de sonication ; IIS = Intervalle inter-stimulus ; PNP = Pic négatif de pression. Pour le mode pulsé, la DI et la FR étaient généralement choisies de manière à avoir un rapport cyclique de 70 %. Les PNP indiqués couvrent toute la plage de valeurs utilisées, toutes fréquences confondues (pour un mode donné, i.e., pulsé ou continu).

A la fin des expériences de neurostimulation, les animaux étaient soit euthanasiés immédiatement (sans réveil), soit gardés en observation pour quelques heures / jours (jusqu'à trois jours) avant d'être euthanasiés. Pour ces derniers, l'incision qu'ils avaient subi au niveau du crâne était cousue avant leur réveil d'anesthésie, et leur état de santé était suivi jusqu'à leur euthanasie. La douleur causée par la chirurgie et, éventuellement, par l'expérimentation, était notamment évaluée, à l'aide d'une liste de signes cliniques observés et suivis de manière régulière (alimentation, comportement, signes d'inflammation ou d'infection, épilepsie, paralysie, *etc.*).

D'autre part, les cerveaux des brebis étaient récupérés après leur euthanasie, afin d'effectuer une étude histologique ainsi que des analyses immunohistochimiques, dans le but d'évaluer l'innocuité de la stimulation sur les tissus cérébraux⁵¹. L'étude histologique, réalisée sur les cerveaux de trois brebis jusqu'à présent, a été effectuée en colorant les tissus cérébraux à l'aide du violet de Crésyl⁵². Quant aux analyses immunohistochimiques, réalisées sur les

⁵¹ Pour ce volet, nous nous sommes notamment aidé des travaux de stage de Alan Lelièvre, étudiant en BTS Biotechnologies (stage réalisé à l'INRAE de Nouzilly, et encadré par Mme Meurisse Maryse – Equipe NECOS).

⁵² Coloration permettant de distinguer la substance grise, contenant les noyaux des cellules cérébrales, de la substance blanche, qui ne contient pas de noyaux.

mêmes cerveaux, elles ont été effectuées par marquage de la protéine Iba1⁵³, qui permet de savoir si une réaction inflammatoire a eu lieu au sein des tissus cérébraux. Par ailleurs, les expériences de neurostimulation étaient généralement réalisées sur un seul hémisphère cérébral, afin que l'autre hémisphère puisse servir de contrôle pour ces études tissulaires.

II. Résultats

Comme il a été expliqué précédemment, les expériences de neurostimulation décrites présentement entrent dans le cadre d'une étude de faisabilité et d'optimisation. Ainsi, plusieurs expériences, notamment parmi les premières, effectuées pour la plupart à une fréquence de 0,5 MHz, ont été infructueuses en termes de résultats, ou ont donné des résultats peu exploitables. Dans les parties suivantes, nous décrivons des résultats obtenus sur deux brebis, lors de deux expérimentations réalisées à des fréquences de 220 et 250 / 350 kHz.

Par ailleurs, il est à noter qu'en raison de leur caractère préliminaire, et du faible nombre d'animaux utilisés à chaque expérience (N = 1), les résultats sont présentés sans barre d'erreurs ni analyse statistique. Ainsi, les analyses de ces données ont essentiellement vocation à orienter les futurs travaux sur ce sujet, plutôt qu'à tirer des déductions définitives.

1. Résultats obtenus avec la sonde ultrasonore Ultrason GS200

Cette partie rapporte des résultats de neurostimulation obtenus avec la sonde Ultrason GS200. La neurostimulation ultrasonore a ainsi été appliquée au niveau du cortex moteur droit (aux différentes positions numérotées ; cf. Fig. 5.2) de la brebis, à une fréquence acoustique de 220 kHz, et pour des PNP allant de 500 à 630 kPa environ *in situ*. Les impulsions ultrasonores appliquées avaient une DI de 0,5 ms, une FR de 1,4 kHz (soit un rapport de cycle de 70 %), une DS de 200 ms et un IIS de 1 à 5 s. Le nombre de séries de stimulations s'élevait à dix, comprenant chacune 12 à 38 répétitions, pour un total de 242 stimulations couvrant tous les tests de paramètres cités. Par ailleurs, les résultats que nous avons représentés graphiquement dans cette partie sont ceux ayant démontré une tendance cohérente. Enfin, pour cette expérience, les données électromyographiques ont été enregistrées au niveau des pattes controlatérales à la zone stimulée, *i.e.*, les pattes avant et arrière gauches.

Parmi les résultats obtenus pour la patte avant gauche, nous avons extrait des éléments intéressants. Tout d'abord, nous avons observé que la valeur optimale de IIS à utiliser est 1 s, pour laquelle un taux de succès de 14,8 % a été atteint pour un PNP de 500 kPa, contre 0 % pour 2 et 5 s (positions stimulées : 1, 8 et 9).

Ensuite, en utilisant un IIS de 1 s, et pour des valeurs croissantes de PNP, nous avons observé une augmentation du taux de succès, passant de 16,7 % à 530 kPa à 47,4 % à 630 kPa

⁵³ Protéine exprimée par la microglie en cas de réaction inflammatoire au sein du cerveau.

(Fig. 5.6 ; résultats obtenus pour les positions 1,2 et 9). Le taux de succès le plus élevé (47,4 %) a été obtenu en stimulant la position 9, qui, cependant, pour d'autres séries, a démontré peu de réponses motrices.

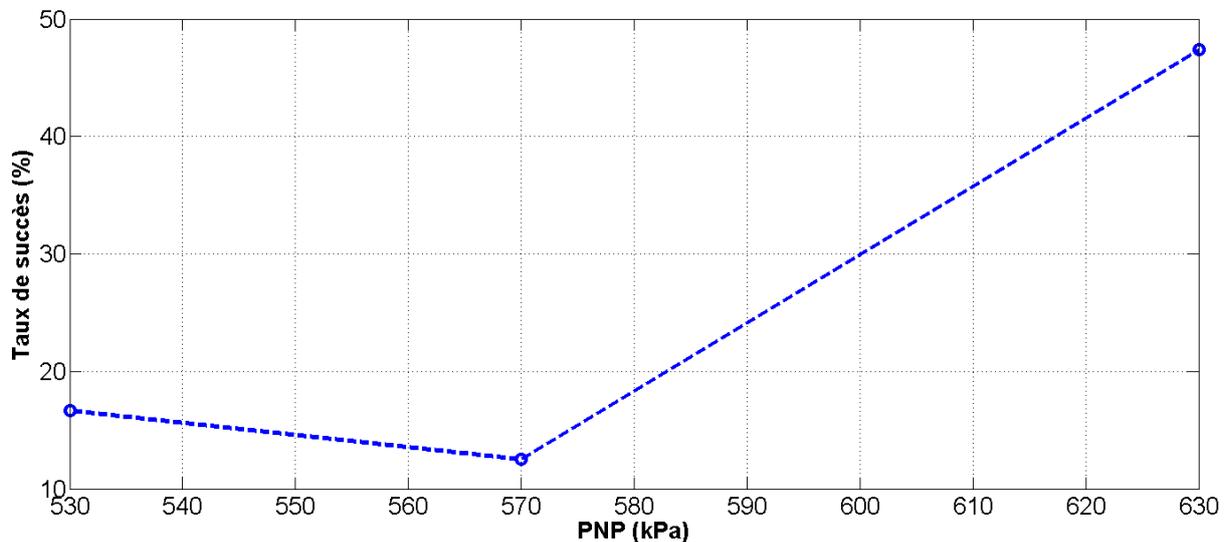


Figure 5.6 : Taux de succès observé chez la brebis (N = 1), en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué, à une fréquence ultrasonore de 220 kHz (sonde Ultrason GS200). Les résultats, obtenus par électromyographie, sont issus de la stimulation du cortex moteur droit et de l'observation de la patte avant gauche (i.e., controlatérale). Le nombre de stimulations réalisées aux différents PNP est de 18, 32 et 38, respectivement.

Cette évolution du taux de succès en fonction du PNP abonde dans le même sens que les résultats obtenus pour la souris (cf. Chapitre 3, p. 124). De plus, le graphique du taux de succès évoque un début de sigmoïde, avec un palier inférieur autour de 15 % entre 530 et 570 kPa, et un début de pente avant 630 kPa. Néanmoins, ces résultats ayant été obtenus chez un seul animal, ils doivent être reproduits avec plus d'animaux, lors de futures études. Ces dernières devraient aussi prévoir des tests à des valeurs de PNP plus élevées, afin de voir si ce comportement sigmoïdal du taux de succès en fonction du PNP, déjà observé chez la souris, se confirme chez la brebis. Par ailleurs, on peut remarquer que les taux de succès que nous avons observés sont nettement supérieurs à ceux rapportés par Yoon *et al.* [1] par exemple, dont le taux de succès maximal était de $12,4 \pm 9,2$ % (f = 250 kHz ; PNP \approx 700 kPa ; résultats obtenus pour la patte arrière controlatérale). Néanmoins, dans cette dernière étude, un nombre plus important d'animaux a été utilisé (N = 10), ce qui pourrait avoir joué un rôle dans la faiblesse des valeurs observées.

En parallèle, lorsque le PNP augmente entre 530 et 630 kPa, nous avons observé une augmentation de l'amplitude moyenne des réponses motrices (de 7,5 à 17,9 μ V ; Fig. 5.7), de leur latence (de 80,1 à 129,9 ms ; Fig. 5.8) et de leur durée (de 26,0 à 59,8 ms ; Fig. 5.9).

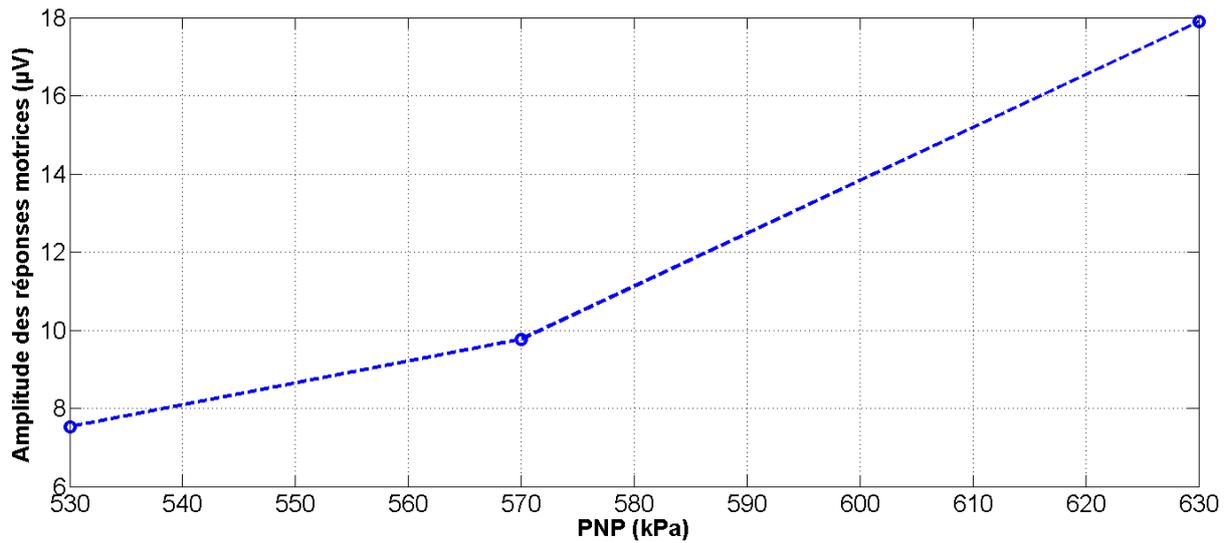


Figure 5.7 : Amplitude des réponses motrices observées chez la brebis ($N = 1$), en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué, à une fréquence ultrasonore de 220 kHz (sonde Ultrason GS200). Les résultats, obtenus par électromyographie, sont issus de la stimulation du cortex moteur droit et de l'observation de la patte avant gauche (i.e., controlatérale). Pour chaque PNP, les amplitudes représentées sont la moyenne des amplitudes observées.

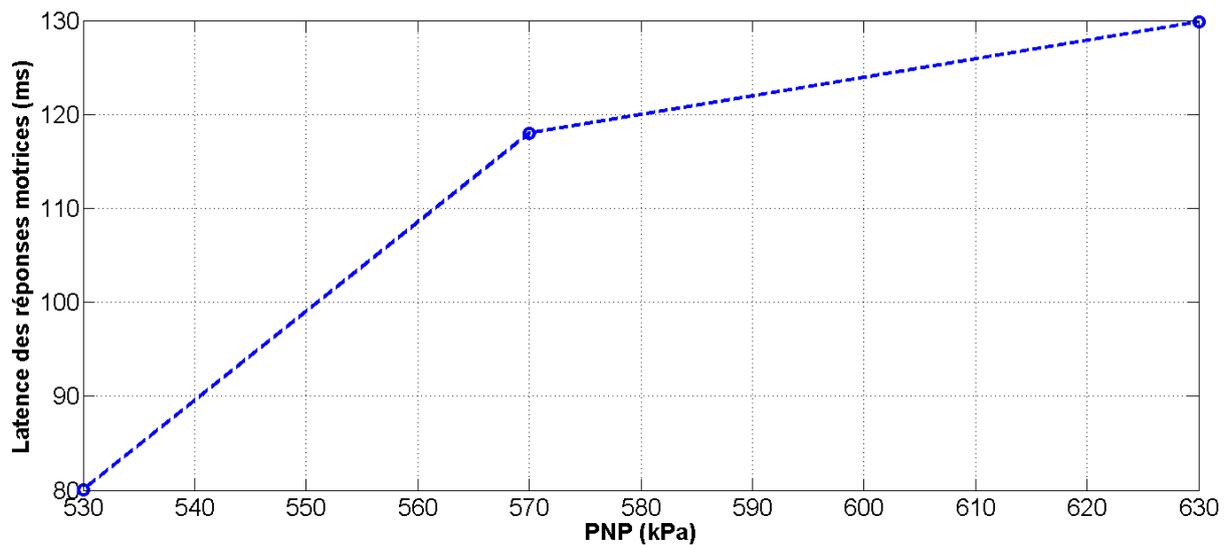


Figure 5.8 : Latence des réponses motrices observées chez la brebis ($N = 1$), en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué, à une fréquence ultrasonore de 220 kHz (sonde Ultrason GS200). Les résultats, obtenus par électromyographie, sont issus de la stimulation du cortex moteur droit et de l'observation de la patte avant gauche (i.e., controlatérale). Pour chaque PNP, les latences représentées sont la moyenne des latences observées.

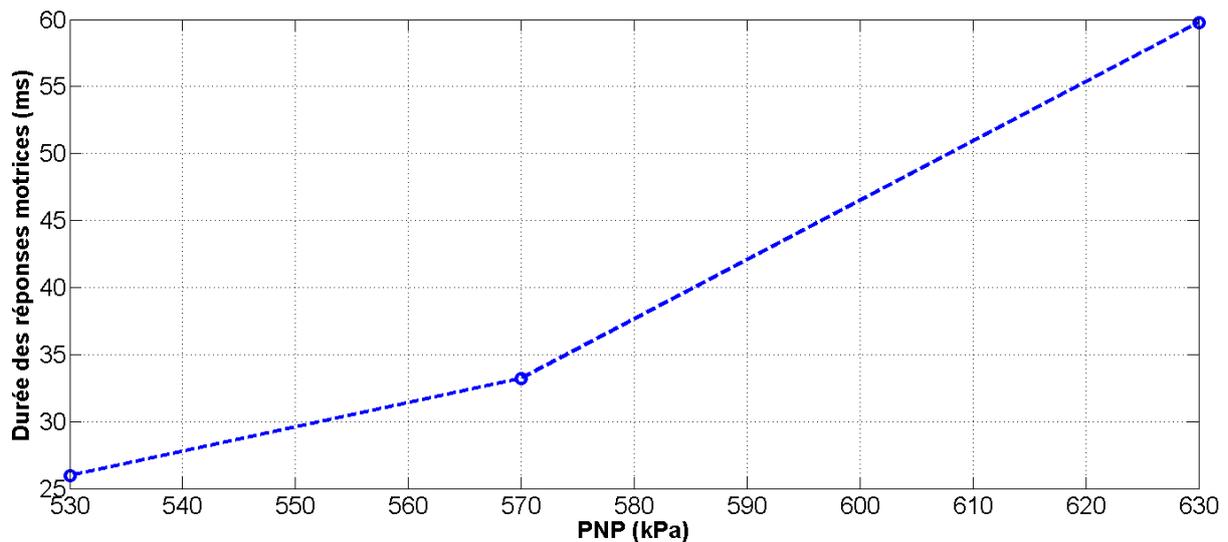


Figure 5.9 : Durée moyenne des réponses motrices observées chez la brebis ($N = 1$), en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué, à une fréquence ultrasonore de 220 kHz (sonde Ultrason GS200). Les résultats, obtenus par électromyographie, sont issus de la stimulation du cortex moteur droit et de l'observation de la patte avant gauche (i.e., controlatérale). Pour chaque PNP, les durées représentées sont la moyenne des durées observées.

Ces résultats viennent également appuyer ceux obtenus chez la souris, à 0,5 MHz par exemple, notamment pour l'amplitude et la durée des réponses. Pour ce qui est de la latence, dans le cas de la souris, elle suit une tendance inverse pour 0,5 MHz, i.e., elle diminue quand le PNP augmente, alors qu'elle reste plus ou moins stable pour les autres fréquences testées (1, 1,5 et 2,25 MHz). D'autre part, Lee *et al.*, ont également rapporté, dans leur étude chez la brebis, à une fréquence voisine de 250 kHz, une augmentation de l'amplitude des réponses avec l'intensité acoustique appliquée ($f = 250$ kHz ; $DI = 1$ ms ; $FR = 0,5$ kHz ; $DS = 300$ ms ; $IIS = 5$ s ; $I_{SPPA} = 3,4 - 11,8$ W/cm², soit $PNP \approx 325 - 600$ kPa). Aussi, ils ont observé, chez une partie des animaux stimulés, des amplitudes de réponses motrices comparables à celles que nous avons relevées (5 – 45 μ V, tous animaux et I_{SPPA} confondus) [2]. De même, les valeurs que l'on a obtenues pour les différentes caractéristiques de réponses motrices sont confortées par les résultats obtenus par Yoon *et al.* ($f = 250$ kHz ; $DI = 0,5 - 3$ ms ; $FR = 0,233 - 1,4$ kHz ; $DS = 200$ ms ; $PNP \approx 700$ kPa *in situ*). En effet, prenant en compte les réponses obtenues pour tous les jeux de paramètres acoustiques qu'ils ont utilisés, ils ont décrit une latence moyenne de $116 \pm 13,9$ ms, alors que la valeur moyenne que nous avons relevée est de 105 ms (tous PNP confondus). Aussi, ils ont noté des amplitudes moyennes allant jusqu'à 3 μ V environ, pour des réponses obtenues en utilisant des paramètres comparables aux nôtres [1]. Bien que ces valeurs d'amplitude soient inférieures à celles que nous avons observées, elles restent néanmoins du même ordre.

Enfin, on peut noter la latence moyenne de réponses motrices, de $57,1 \pm 48,8$ ms, rapportée par Lee *et al.* [2]. En effet, l'écart-type élevé de cette dernière valeur, qui est quasiment égal à la valeur moyenne, indique que certains des animaux utilisés pour cette étude avaient des latences de réponses motrices proches de celles que nous avons observées, alors que d'autres en étaient éloignés. Cet élément, qui souligne la variabilité inter-individuelle qu'il peut y avoir

lors d'une expérience, montre qu'il est important que l'on reproduise nos résultats en utilisant plus d'animaux, à l'occasion de futurs travaux.

Pour ce qui est de la patte arrière gauche, très peu de réponses motrices y ont été observées. Les taux de succès qui y sont associés sont donc très faibles (0 – 5,7 %), et les résultats correspondants sont globalement peu exploitables.

2. Résultats obtenus avec la sonde ultrasonore Ultrason GPS350

L'utilisation de la sonde ultrasonore Ultrason GPS350 pour la neurostimulation sur la brebis a également abouti à des résultats intéressants. Pour cette expérience, nous avons aussi ciblé le cortex moteur droit (positions 1 et 2, et positions plus en arrière ; cf. Fig. 5.2), mais les réponses ont été observées, cette fois-ci, sur toutes les pattes, afin de comparer leurs réponses motrices respectives. Ainsi, nous avons d'abord inséré les aiguilles sur les pattes avant en début d'expérience, puis sur les pattes arrière en fin d'expérience. La stimulation a été menée à une fréquence de 350 kHz (DI = 0,5 ms ; FR = 1,4 kHz ; DS = 200 ms ; ISI = 1 s ; PNP ≈ 350 kPa), ainsi qu'à 250 kHz pour les pattes arrière uniquement (PNP ≈ 300 kPa). En outre, le débit d'anesthésie chimique utilisé (550 – 600 mL/h) a été augmenté pour certaines stimulations réalisées pour les pattes arrière (à 700 mL/h), sans qu'aucune influence notable de ce changement ne soit néanmoins observée sur l'occurrence de réponses motrices. Par ailleurs, lors de cette expérience, nous avons effectué 9 séries de stimulations sur l'animal, dont 3 pour l'observation des réponses motrices au niveau des pattes avant (169 stimulations au total), et 6 pour l'observation au niveau des pattes arrière (298 stimulations au total), en dehors des séries de stimulations servant de tests.

Les résultats obtenus pour les pattes avant sont présentés ci-dessous, dans les figures 5.10 à 5.13.

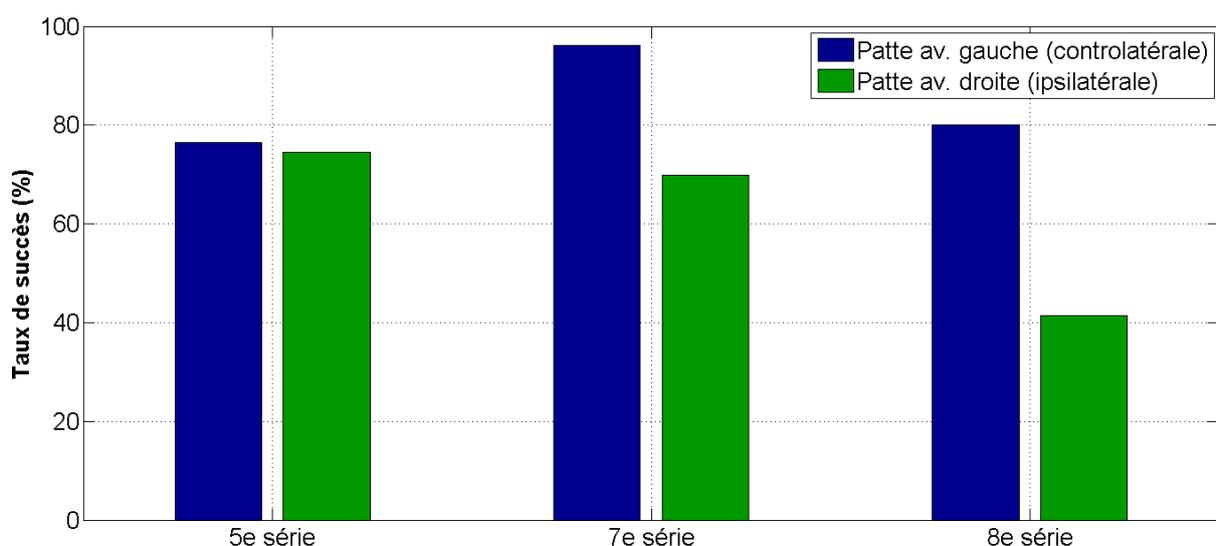


Figure 5.10 : Taux de succès observés chez la brebis (N = 1), à une fréquence ultrasonore de 350 kHz (sonde Ultrason GPS350) et un PNP de 350 kPa. Les réponses motrices, obtenues par stimulation du cortex moteur droit, ont été détectées par électromyographie au niveau des pattes avant (av.), pour trois séries de stimulations différentes (5^e, 7^e et 8^e séries, comprenant 51, 53 et 65 stimulations, respectivement).

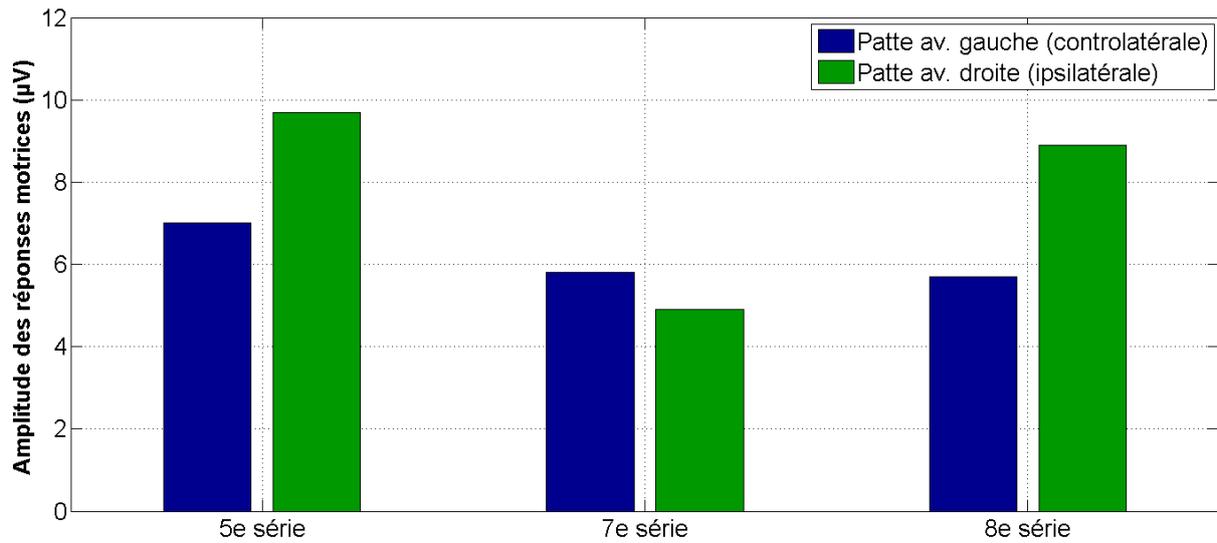


Figure 5.11 : Amplitude des réponses motrices observées chez la brebis ($N = 1$), à une fréquence ultrasonore de 350 kHz (sonde *Ultran GPS350*) et un PNP de 350 kPa. Les réponses motrices, obtenues par stimulation du cortex moteur droit, ont été détectées par électromyographie au niveau des pattes avant (av.), pour trois séries de stimulations différentes (5^e, 7^e et 8^e séries, comprenant 51, 53 et 65 stimulations, respectivement). Pour chaque série, l'amplitude représentée est la moyenne des amplitudes observées.

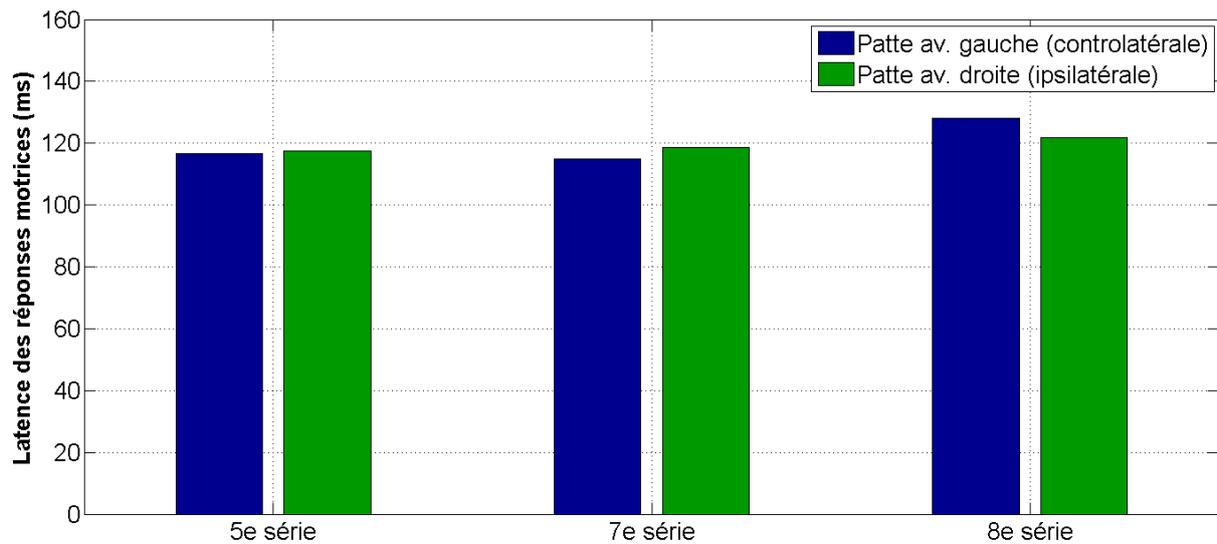


Figure 5.12 : Latence des réponses motrices observées chez la brebis ($N = 1$), à une fréquence ultrasonore de 350 kHz (sonde *Ultran GPS350*) et un PNP de 350 kPa. Les réponses motrices, obtenues par stimulation du cortex moteur droit, ont été détectées par électromyographie au niveau des pattes avant (av.), pour trois séries de stimulations différentes (5^e, 7^e et 8^e séries, comprenant 51, 53 et 65 stimulations, respectivement). Pour chaque série, la latence représentée est la moyenne des latences observées.

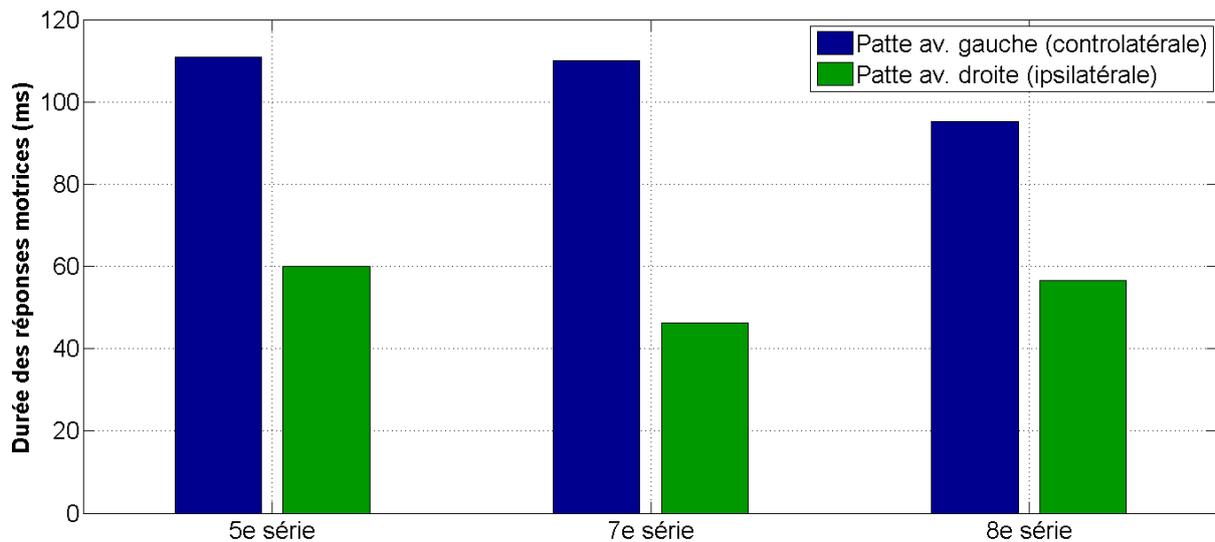


Figure 5.13 : Durée des réponses motrices observées chez la brebis (N = 1), à une fréquence ultrasonore de 350 kHz (sonde Ultrason GPS350) et un PNP de 350 kPa. Les réponses motrices, obtenues par stimulation du cortex moteur droit, ont été détectées par électromyographie au niveau des pattes avant (av.), pour trois séries de stimulations différentes (5^e, 7^e et 8^e séries, comprenant 51, 53 et 65 stimulations, respectivement). Pour chaque série, la durée représentée est la moyenne des durées observées.

Tout d’abord, on peut remarquer que les taux de succès obtenus pour cette expérience sont nettement plus élevés que pour les résultats précédents, pourtant obtenus à fréquence plus basse (220 kHz). En effet, les valeurs observées se situent entre 41,5 et 96,2 %, en prenant en compte les résultats des deux pattes avant. Cette observation démontre qu’il est possible d’obtenir des taux de succès élevés chez la brebis. Cependant, pour en avoir confirmation, il est important de reproduire l’expérience en augmentant le nombre d’animaux utilisés.

Ensuite, ces résultats démontrent que la neurostimulation ultrasonore est plus efficace du côté controlatéral, puisque la patte avant gauche montre, globalement sur les trois séries, des taux de succès plus élevés que pour la patte avant droite. En effet, les taux de succès pour le côté controlatéral se situent entre 76,5 et 96,2 %, contre 41,5 – 74,5 % pour le côté ipsilatéral. Cette analyse correspond à nos attentes, puisque nous avons déjà remarqué une plus grande efficacité de la neurostimulation du côté controlatéral lors de nos travaux sur la souris, et des observations semblables ont également été rapportées dans des études réalisées chez la brebis [1], [2].

On peut aussi noter que la durée des réponses est plus élevée du côté controlatéral (facteur 2 environ), alors que leur amplitude et leur latence sont plus ou moins identiques entre les deux pattes (amplitude de 5,7 – 7 μ V du côté controlatéral, et 4,9 – 9,7 μ V du côté ipsilatéral ; latence de 115 – 128 ms du côté controlatéral, et 118 – 122 ms du côté ipsilatéral). Ces résultats semblent indiquer assez logiquement que, du côté ipsilatéral à la stimulation, les réseaux de neurones sollicités sont équivalents à ceux qui le sont du côté controlatéral, en termes de nombre et de type de neurones. En revanche, la durée de réponses plus élevée du côté controlatéral pourrait indiquer que des réseaux neuronaux supplémentaires y sont activés, par rapport au côté ipsilatéral. Ces derniers seraient activés plus tardivement, puisque la durée des réponses est affectée alors que l’amplitude ne l’est pas. Néanmoins, ces

hypothèses restent à vérifier, et de futurs travaux devront tout d'abord reproduire ces résultats avec un plus grand nombre d'animaux, afin de les confirmer. D'autre part, on peut remarquer que les amplitudes et les latences observées pour cette expérience sont très proches des résultats obtenus à 220 kHz. Ainsi, ces résultats constituent un ensemble assez cohérent, les deux expériences ayant été réalisées à des fréquences et PNP comparables (le reste des paramètres acoustiques étant identiques). Cependant, on peut remarquer que les durées sont nettement plus élevées pour cette expérience (95,3 – 111 ms du côté controlatéral) que pour l'expérience à 220 kHz (26,0 – 59,8 ms, du côté controlatéral également). Cet élément pourrait être l'un des aspects à explorer et interpréter lors d'expériences complémentaires.

Ainsi, pour résumer ces résultats obtenus au niveau des pattes avant, nous pouvons dire que des réponses motrices plus fréquentes et plus longues sont observées du côté controlatéral à la stimulation. Mais, d'un autre côté, les réponses observées au niveau des deux pattes surviennent avec des amplitudes et des latences comparables. Sous réserve de confirmation, ces éléments pourraient indiquer que les réseaux neuronaux activés des côtés ipsilatéral et controlatéral à la stimulation sont équivalents, mais que des réseaux supplémentaires sont activés, de manière tardive, du côté controlatéral.

Enfin, concernant les résultats obtenus pour les pattes arrière, la plupart des séries de stimulations ont abouti à des taux de succès faibles (0 – 10 %), donnant ainsi des résultats difficilement exploitables en raison du faible nombre de réponses motrices. Cependant, l'une des séries de stimulations, effectuée à une fréquence de 250 kHz, est associée à des taux de succès relativement élevés, comparables à ceux obtenus pour les pattes avant, mais globalement plus faibles (43,6 – 69,2 %, contre 41,5 – 96,2 % pour les pattes avant). Pour cette série, les amplitudes et les latences moyennes des réponses motrices (5,0 – 16,3 μ V, et 131,9 – 148,3 ms, respectivement) étaient du même ordre que ce que l'on a observé pour les pattes avant, alors que les durées étaient environ deux à trois fois plus élevées (174,0 – 217,1 ms, contre 46,3 – 111,0 ms pour les pattes avant). Sachant que ces résultats au niveau des deux types de pattes (*i.e.*, avant et arrière) ont été obtenus à des fréquences différentes, il est difficile d'en effectuer une comparaison solide. Des expériences plus élaborées, réalisées avec des paramètres acoustiques fixés et un nombre d'animaux plus élevé, restent donc nécessaires avant de pouvoir analyser et interpréter de telles observations.

3. Résultats concernant l'innocuité de la neurostimulation ultrasonore / électrique

Comme évoqué précédemment, une étude histologique ainsi que des analyses immunohistochimiques ont été effectuées sur les tissus cérébraux de trois brebis⁵⁴ utilisées lors des expériences. Ces analyses avaient pour but d'évaluer l'innocuité de la

⁵⁴ Euthanasiées à des moments différents : l'une immédiatement à la fin de l'expérience (sans réveil), l'une 4 heures après la fin de l'expérimentation, et l'une 3 jours après l'expérience.

neurostimulation, sans distinction des techniques ultrasonore et électrique, étant donné que les deux ont été utilisées lors de nos expériences. L'étude histologique a révélé plusieurs lésions corticales modérées à sévères, à la fois au sein de l'hémisphère stimulé⁵⁵ que dans l'hémisphère contrôle (Fig. 5.14). Cette observation montre donc une propagation corticale de ces lésions, sans que les tissus touchés aient nécessairement été stimulés durant l'expérience. Aussi, des microhémorragies ont été remarquées au sein de tissus cérébraux profonds.



Figure 5.14 : Exemple de dommages cérébraux observés sur un cerveau de brebis après stimulation : vues dorsale (image de gauche) et de l'avant (image de droite) du cerveau ($f = 0,5 / 1,5$ MHz ; PNP = 500 / 800 kPa). On remarque notamment des hémorragies à l'avant du cerveau, au niveau des deux hémisphères (signalées par des flèches sur l'image de gauche). Images de Meurisse Maryse – Equipe NECOS, INRAE de Nouzilly.

D'autre part, les analyses immunohistochimiques, consistant à marquer la protéine Iba1, ont révélé la présence d'une neuro-inflammation microgliale dans tout le cerveau, particulièrement marquée au niveau des zones corticales, et notamment au niveau des lésions observées.

Dans la littérature, Lee *et al.*, ont rapporté avoir observé des microhémorragies, mais pas de dommages cérébraux majeurs, chez quatre des brebis qu'ils ont stimulées avec des ultrasons uniquement (parmi huit au total). Il est important de noter que les animaux chez qui ces microhémorragies ont été détectées ont été soumis à des périodes de stimulation prolongées (500 stimulations ou plus ; $f = 250$ kHz ; DI = 1 ms ; FR = 0,5 kHz ; DS = 300 ms ; IIS = 1 s ; $I_{SPPA} = 6,6 - 10,5$ W/cm² ; IM = 0,9 – 1,2), contrairement au reste des animaux [2]. A titre de comparaison, l'une des brebis ayant servi à notre étude sur l'innocuité de la neurostimulation a été stimulée environ 300 fois ($f = 220$ kHz ; FR = 1,4 kHz ; DS = 200 ms ; IIS = 1 – 5 s ; $I_{SPPA} = 8 - 12,7$ W/cm² ; IM = 1,1 – 1,3). Bien que le nombre de stimulations utilisé dans notre cas soit inférieur, la proximité de nos valeurs de paramètres acoustiques avec celles de l'étude citée précédemment n'exclut pas que les ultrasons soient à l'origine des microhémorragies observées. D'autant que lors de certaines expériences, le nombre de

⁵⁵ Paramètres de stimulation ultrasonore : $f = 0,22 / 0,5$ MHz ; DI = 0,5 ms ; FR = 1,4 kHz ; DS = 200 ms ; IIS = 1 – 5 s ; PNP $\approx 500 - 650$ kPa.

stimulations que nous avons effectuées approchait les 500. Cependant, cette analyse ne suffit pas à expliquer les lésions plus sévères ainsi que la microglie inflammatoire décelées dans notre étude. Aussi, il est important de rappeler que plusieurs études sur la neurostimulation ultrasonore ont souligné son innocuité, rapportant peu de cas de dommages cérébraux causés par cette technique (cf. Chapitre 1, pp. 62 – 63). D'autre part, des dommages cérébraux comparables à ceux que nous avons observés ont été rapportés dans de précédents travaux sur la stimulation électrique [3]–[5]. Ainsi, ces différents éléments pourraient indiquer que cette dernière technique est, au moins en partie, à l'origine des lésions observées. Ces différentes hypothèses nécessitent néanmoins d'être confirmées, à l'occasion de futurs de travaux, par une étude d'innocuité portant sur chaque technique séparément.

III. Conclusions

Ce chapitre a été consacré à la mise en place d'un dispositif pour la neurostimulation chez la brebis et l'étude de sa faisabilité. Les expériences réalisées ont tout d'abord permis de mettre en exergue les différentes contraintes expérimentales, nous permettant d'apporter des améliorations progressives aux différents éléments expérimentaux (dispositifs, techniques, protocoles, etc.). Aussi, durant ces expériences, nous avons initié la démarche d'optimisation des conditions expérimentales, dans le but d'obtenir une neurostimulation ultrasonore efficace. Par exemple, nous avons identifié, pour certains paramètres acoustiques, les valeurs permettant potentiellement d'augmenter les taux de succès afin d'obtenir des réponses motrices chez la brebis. Ainsi, certaines expériences ont donné des résultats intéressants, qui méritent une attention particulière, mais qui doivent néanmoins être reproduits avec un plus grand nombre d'animaux pour être confirmés.

Premièrement, en ciblant le cortex moteur de brebis à une fréquence ultrasonore de 220 kHz, nous avons observé, par électromyographie, une augmentation du taux de succès, de l'amplitude et de la durée des réponses motrices avec le pic négatif de pression (PNP). Ces résultats confirment les résultats précédemment observés chez la souris, ainsi que certains résultats d'études menées sur la brebis. En outre, nous avons remarqué que les réponses surviennent plus tardivement lorsque le PNP est augmenté. Ces différents résultats ont été obtenus sur la patte avant gauche de l'animal, controlatérale à la zone stimulée.

Lors d'une autre expérience, menée à 250 - 350 kHz, et où nous avons observé les réponses au niveau de toutes les pattes de la brebis, nous avons constaté que les réponses au niveau des pattes avant étaient beaucoup plus fréquentes, et les résultats correspondants plus exploitables. En effet, nous avons noté que, pour les pattes arrière, une seule série de stimulations a donné des taux de succès relativement élevés, mais globalement plus faibles que pour les pattes avant. Cette série était associée à des amplitudes et des latences comparables à celles observées pour les pattes avant, mais à des durées environ deux à trois fois plus élevées. Il est à noter, cependant, que les résultats obtenus au niveau des pattes arrière l'ont été pour une fréquence différente de celle utilisée pour les pattes avant ($f = 250$

et 350 kHz, respectivement). Ainsi, ces résultats doivent être reproduits à paramètres acoustiques fixes, et avec un plus grand nombre d'animaux, afin de pouvoir effectuer la comparaison de manière correcte. D'autre part, au niveau des pattes avant, nous avons remarqué une plus grande efficacité de la neurostimulation ultrasonore du côté controlatéral, ce qui correspond également à ce que nous avons observé chez la souris, et à ce qui a été rapporté par de précédentes études chez la brebis. De manière générale, les réponses motrices semblent être plus fréquentes et durer plus longtemps du côté controlatéral, tout en ayant une amplitude et une latence comparables à celles des réponses survenant du côté ipsilatéral. Cette observation pourrait indiquer que les réseaux neuronaux activés des deux côtés sont équivalents, mais que des réseaux supplémentaires sont activés, plus tardivement que les premiers, du côté controlatéral à la stimulation. Cette hypothèse nécessitera une vérification lors d'éventuelles expériences futures réalisées sur ce sujet.

En outre, il est important de souligner que, par rapport aux valeurs rapportées dans la littérature (valeur maximale de $12,4 \pm 9,2$ %, pour $f = 250$ kHz et $PNP \approx 700$ kPa [1]), les taux de succès que nous avons obtenus étaient globalement bien plus élevés, avec notamment une valeur maximale de 96,2 % (à $f = 350$ kHz ; $PNP = 350$ kPa). Bien que ces résultats aient besoin d'être reproduits avec un nombre d'animaux plus élevé, ils démontrent qu'il est possible d'obtenir des taux de succès élevés pour la neurostimulation ultrasonore réalisée chez la brebis.

Par ailleurs, les études histologique et immunohistochimique, menées sur trois cerveaux de brebis neurostimulées, ont révélé de nombreux dommages, modérés à sévères, sur les tissus cérébraux. En effet, des microhémorragies ont été détectées au sein de tissus profonds, alors que des lésions plus importantes ont été observées au niveau des zones corticales, aussi bien au sein de l'hémisphère stimulé que de l'hémisphère contrôle. Les analyses ont aussi montré la présence de signes de neuro-inflammation dans le cerveau, en particulier au niveau du cortex et des différentes lésions. Ces résultats, ainsi que plusieurs éléments de la littérature, semblent indiquer que la stimulation électrique pourrait être à l'origine, au moins en partie, des dommages observés. En revanche, ils ne permettent pas de dédouaner entièrement la neurostimulation ultrasonore à ce sujet, notamment en ce qui concerne les microhémorragies. Ainsi, des travaux complémentaires, étudiant l'innocuité de chaque technique séparément, restent nécessaires avant de statuer sur ce point. Aussi, il serait important de déterminer si la chirurgie réalisée avant la stimulation joue un rôle quelconque dans l'apparition des différentes lésions.

Enfin, il est important de rappeler que tous les résultats présentés dans ce chapitre sont préliminaires. Ainsi, l'analyse qui en a été faite reste superficielle, et doit être confirmée par des expériences plus élaborées. En effet, ces résultats doivent être relativisés, notamment du fait des conditions expérimentales en cours d'optimisation, et en raison du faible nombre d'animaux utilisés. C'est pourquoi notre analyse des résultats, tout au long de ce chapitre, s'est limitée à l'observation, sans tirer aucune conclusion définitive. Néanmoins, cette étude constitue une base de travail, ouvrant la voie à de futurs travaux sur le sujet, notamment en

termes d'optimisation des aspects expérimentaux, et d'orientation sur les axes de recherche à explorer.

Références bibliographiques

- [1] K. Yoon *et al.*, « Effects of sonication parameters on transcranial focused ultrasound brain stimulation in an ovine model », *PLOS ONE*, vol. 14, n° 10, p. e0224311, oct. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0224311.
- [2] W. Lee *et al.*, « Image-Guided Focused Ultrasound-Mediated Regional Brain Stimulation in Sheep », *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 42, n° 2, p. 459-470, févr. 2016, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2015.10.001.
- [3] D. Harnack, C. Winter, W. Meissner, T. Reum, A. Kupsch, et R. Morgenstern, « The effects of electrode material, charge density and stimulation duration on the safety of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats », *J. Neurosci. Methods*, vol. 138, n° 1-2, p. 207-216, sept. 2004, doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.04.019.
- [4] M. Pekny et M. Nilsson, « Astrocyte activation and reactive gliosis », *Glia*, vol. 50, n° 4, p. 427-434, juin 2005, doi: 10.1002/glia.20207.
- [5] K. van Kuyck, M. Welkenhuysen, L. Arckens, R. Sciot, et B. Nuttin, « Histological Alterations Induced by Electrode Implantation and Electrical Stimulation in the Human Brain: A Review », *Neuromodulation Technol. Neural Interface*, vol. 10, n° 3, p. 244-261, juill. 2007, doi: 10.1111/j.1525-1403.2007.00114.x.

Conclusions et perspectives

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans un contexte de recherche de thérapies pour le traitement de maladies neuropsychiatriques, neurodéveloppementales et neurodégénératives. En effet, parmi ces affections, certaines rencontrent des difficultés de traitements, avec principalement des résistances aux thérapies médicamenteuses et même, dans certains cas, une absence de traitement. Face à ce constat, la recherche s'est orientée vers des solutions alternatives, en ayant notamment recours à des techniques de neurostimulation. Les techniques existantes de neurostimulation (électriques ou magnétique) sont aujourd'hui homologuées en clinique mais souffrent de limitations majeures (résolution spatiale limitée, faible pouvoir de pénétration dans le cerveau, et/ou invasivité). C'est ainsi que la neurostimulation ultrasonore, exemptée de ces limitations, se place comme la technique candidate idéale pour les suppléer. L'étude bibliographique effectuée au sujet de cette technique, présentée dans le premier chapitre de ce manuscrit, a d'ailleurs mis en lumière ses points forts. Ainsi, elle dispose d'un pouvoir pénétrant et d'une résolution spatiale appréciables, qui lui permettraient de traiter de manière non-invasive, ciblée et sélective, aussi bien les régions corticales que profondes du cerveau. De plus, il apparaît que la neurostimulation ultrasonore est une technique relativement sûre d'un point de vue sanitaire, bien que ce point doive être confirmé par des études complémentaires. En effet, étant encore au stade de la recherche et du développement, cette technique a besoin d'être mieux apprivoisée, notamment concernant son innocuité, avant d'être utilisée en milieu clinique. Il reste également des progrès à réaliser dans la compréhension des phénomènes et mécanismes sous-jacents à cette technique. A cet effet, plusieurs hypothèses solides, qui expliquent son fonctionnement au niveau du neurone et du réseau de neurones, ont été émises, mais le lien avec les observations au niveau macroscopique reste peu compris à ce jour. D'autre part, cette technique nécessite que les instances de pharmacovigilance définissent des valeurs limites des paramètres acoustiques à utiliser, afin d'en faire un outil thérapeutique fiable et sûr. En effet, les nombreuses études réalisées dans le but d'optimiser ces paramètres acoustiques ont, certes, réalisé des avancées notables dans ce domaine, mais elles n'ont pas encore abouti à des résultats définitifs. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de développer et valider un ensemble de dispositif ultrasonore et de paramètres acoustiques, pour la stimulation cérébrale chez le rongeur.

A cet effet, nous avons tout d'abord effectué une caractérisation des sondes ultrasonores utilisées pour la neurostimulation, ainsi que des mesures des effets du crâne de souris sur le faisceau ultrasonore. Ces dernières, qui ont montré une distorsion négligeable du faisceau, nous ont permis d'évaluer l'atténuation causée par le crâne de souris sur les ondes ultrasonores, et d'en prendre compte lors des expériences *in vivo*.

Afin d'examiner l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore, nous avons ciblé le cortex moteur primaire (M1) de souris et observé visuellement, ainsi qu'à l'aide de l'électromyographie, les réponses motrices obtenues. L'efficacité a été évaluée à l'aide du taux de succès, défini comme le pourcentage de réponses obtenues parmi les stimulations effectuées. Aussi, une étude immunohistochimique, consistant à marquer la protéine c-Fos au

sein de la zone cérébrale stimulée, a été réalisée, afin d'observer l'influence de la neurostimulation ultrasonore sur l'activation neurale.

Les résultats ont révélé une augmentation sigmoïdale du taux de succès en fonction du PNP (et de l' I_{SPTA} correspondante), à différentes fréquences, durées d'impulsions ultrasonores (DI) et diamètres de tâche focale. Ces résultats ont confirmé les observations rapportées dans la littérature existante, avec cependant des taux de succès maximaux élevés (90 – 100 % pour plusieurs jeux de paramètres) comparativement aux autres études. Un autre résultat majeur de nos travaux est le fait qu'en augmentant la fréquence ultrasonore, il faut augmenter le PNP afin de maintenir un taux de succès constant. Aussi, il est apparu que le diamètre de la tâche focale joue un rôle prépondérant dans l'efficacité de la technique. En effet, nous avons remarqué que lorsque la fréquence augmente, le PNP nécessaire pour obtenir un taux de succès suit une tendance opposée à celle de ce paramètre. Le PNP à utiliser pour atteindre un taux de succès donné semble donc lié non seulement à la fréquence ultrasonore choisie, mais également au diamètre de tâche focale utilisé. Par conséquent, on peut déduire que la fréquence ultrasonore et les caractéristiques géométriques de la sonde utilisée forment un ensemble de paramètres décisifs pour l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore.

D'autre part, l'étude immunohistochimique a montré un lien probable entre ces paramètres acoustiques et l'activation neurale. En effet, l'idée qui ressort de cette étude est que la valeur du PNP à appliquer pour avoir un taux de succès maximal, qui dépend elle-même du diamètre de la tâche focale et de la fréquence utilisés, impacte l'activation neurale, avec une plus grande activation lorsque le PNP augmente.

Les résultats de ces expériences *in vivo* ont par ailleurs mis en lumière, conformément aux conclusions d'autres études, une potentielle saturation de l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore pour les longues DI, qui seraient plus à même de générer des effets inhibiteurs plutôt qu'excitateurs. Une suite logique de ces travaux serait donc de tester des DI plus longues, afin de voir si cette saturation de l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore se confirme.

Par ailleurs, le test de valeurs différentes des autres paramètres acoustiques, notamment de plus grandes fréquences, paraît nécessaire afin de mieux comprendre le fonctionnement de la technique. En effet, si l'on prend l'exemple de l'étude de Li *et al.* (2016), elle montre que l'utilisation d' I_{SPTA} identiques aboutit à des amplitudes de réponses motrices comparables entre les fréquences 1 et 5 MHz. Comme on ne sait pas, pour l'instant, s'il existe un lien entre l'amplitude des réponses motrices et le taux de succès, il serait intéressant de vérifier si nos résultats sur ce dernier paramètre, à savoir sa dépendance envers le PNP lorsque la fréquence augmente, se confirment à des fréquences supérieures, notamment à 5 MHz. Il serait, par ailleurs, utile de recueillir des données électromyographiques sur les caractéristiques de réponses motrices à ces fréquences-là, et d'observer leur évolution. En outre, tester des valeurs de fréquence différentes, en particulier celles comprises entre 2,25 et 5 MHz d'une part, et celles inférieures à 0,5 MHz d'autre part, nous permettrait d'approfondir l'étude de l'influence du diamètre de la tâche focale, qui varie en fonction de la fréquence utilisée. Une

étude chez le rat est d'ailleurs actuellement menée dans ce sens au sein de notre laboratoire, à des fréquences comprises entre 0,2 et 0,5 MHz. En définitive, ces tests sur la fréquence permettraient de mieux évaluer et comprendre le lien existant entre ce paramètre, le PNP (I_{SPTA}), le diamètre de la tâche focale, et l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore.

En outre, il serait également utile de reproduire l'étude immunohistochimique à des fréquences différentes, afin d'observer l'impact que ce changement peut avoir sur l'activation neurale. Plus encore, il serait intéressant de diversifier cette étude immunohistochimique afin de déterminer si, par exemple, différents types de neurones sont activés suivant la fréquence utilisée. Cette analyse pourrait également être étendue aux autres paramètres acoustiques, ce qui permettrait potentiellement de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la neurostimulation ultrasonore.

Ensuite, les résultats obtenus par électromyographie ont permis d'extraire les caractéristiques des réponses motrices, comme leur amplitude, leur latence ou leur durée. Ils ont montré que l'augmentation de la fréquence diminue l'amplitude et la durée des réponses motrices, tandis que leur latence augmente (pour DI = 160 ms). Ces résultats suggèrent, potentiellement, une efficacité plus limitée de la technique et, par conséquent, une diminution de l'excitabilité des neurones, lorsque la fréquence augmente. Tel que conjecturé par Li *et al.* (2016), cette variabilité observée dans les réponses motrices obtenues pourrait être liée à une différence dans les fonctions des neurones et réseaux de neurones stimulés aux différentes fréquences. De futurs travaux devraient axer leurs recherches sur ce point, en essayant notamment de faire le lien entre ces observations et les mécanismes sous-tendant la neurostimulation ultrasonore. Une technique qui pourrait aider à réaliser ce travail serait, tel qu'évoqué précédemment, d'effectuer une étude immunohistochimique permettant de déterminer si différents types de neurones sont stimulés suivant la fréquence utilisée.

D'autre part, il a été observé que l'utilisation d'une plus grande DI induit une augmentation des trois caractéristiques de réponses motrices (pour $f = 1,5$ MHz), indiquant ainsi une neurostimulation ultrasonore plus robuste pour DI = 320 ms. Notons que l'augmentation de la latence des réponses motrices pourrait traduire une présence plus importante des effets thermiques dans le processus de neurostimulation, tel que suggéré par l'étude de Baek *et al.* (2021).

De manière générale, il apparaît, au vu des différents résultats, que l'utilisation de basses fréquences, de longues DI et de PNP élevés permet d'obtenir des réponses motrices plus robustes. Aussi, les choix de valeurs de DI et de PNP doivent répondre aux critères d'innocuité de la technique. Ainsi, le choix des différents paramètres acoustiques requiert un certain compromis, dans l'optique de maximiser l'efficacité de la technique tout en conservant son caractère d'innocuité.

Enfin, il paraît important de reproduire tous les résultats observés en stimulant d'autres coordonnées au sein du cortex moteur, ainsi qu'en observant tous les membres des animaux.

En effet, il a été démontré, dans l'étude d'Aurup *et al.* (2021), que les réponses motrices obtenues pouvaient différer suivant la zone cérébrale ciblée et la patte de l'animal observée.

Par ailleurs, une partie de ces travaux de thèse a été consacrée à l'étude de faisabilité de la neurostimulation ultrasonore dans un modèle ovin.

Des résultats préliminaires ont montré la possibilité d'obtenir des taux de succès élevés (jusqu'à 96,2 %, à $f = 350$ kHz) chez la brebis, comparativement à d'autres études effectuées sur le même modèle animal. De plus, nous avons noté, comme chez la souris, une augmentation du taux de succès avec le PNP appliqué (à $f = 220$ kHz). A ce sujet, de futurs travaux, réalisés à PNP plus élevés, permettraient de déterminer si cette augmentation se fait de manière sigmoïdale. En outre, les résultats suggèrent que les réseaux neuronaux activés des côtés ipsilatéral et controlatéral à la stimulation sont équivalents, mais que des réseaux supplémentaires sont activés du côté controlatéral, de manière tardive. Cette hypothèse, qui nécessite des investigations et une validation, constituerait un sujet de recherche intéressant pour les futurs travaux sur le sujet. Par ailleurs, ces derniers devront se concentrer sur l'étude de l'innocuité de la technique.

Somme toute, cette étude de faisabilité aura permis de poser les bases de futurs travaux sur le sujet, en démarrant un travail d'optimisation des différents aspects expérimentaux, mais également en ouvrant quelques axes de recherche à développer. Un projet dédié à cette optimisation est d'ailleurs en cours de préparation au sein de notre laboratoire. Des études complémentaires devront également s'atteler à reproduire les résultats de cette étude préliminaire dans des conditions expérimentales plus élaborées, avec, notamment, un plus grand nombre d'animaux.

Finalement, les différents travaux réalisés au cours de cette thèse auront participé à affiner la recherche de valeurs idoines pour les paramètres acoustiques, dans le but d'avoir une neurostimulation ultrasonore efficace, sûre, et, par conséquent, transférable en milieu clinique. Cependant, il apparaît que le choix de ces valeurs idéales reste conditionné par l'application souhaitée de la neurostimulation ultrasonore et l'effet recherché. En effet, on peut envisager que certaines applications nécessiteraient une modulation neuronale forte, qui survient rapidement et qui dure longtemps, à l'inverse d'autres applications, qui nécessiteraient des caractéristiques de modulation différentes. Enfin, ces travaux de thèse aident à orienter les futures recherches au sujet de cette technique, en définissant des axes d'amélioration. En étant bien exploités, ces derniers pourront apporter à la communauté scientifique des éléments décisifs, qui aideront à comprendre de manière plus large et plus complète l'application de la neurostimulation ultrasonore.

Annexes

Annexe 1 : Neurostimulation ultrasonore chez la souris

I. Dispositif expérimental

Pour les expériences de neurostimulation ultrasonore sur la souris, nous avons utilisé un dispositif expérimental conçu au sein de notre laboratoire. Ce dispositif comprend plusieurs parties, dont les principales sont un cadre stéréotaxique, utilisé pour fixer la tête de l'animal et pour déplacer une sonde ultrasonore par-dessus, une arrivée d'anesthésie pour endormir l'animal, ainsi qu'un tapis chauffant pour maintenir la température corporelle de ce dernier (Fig. A.1). Toutes ces parties, ainsi que d'autres éléments importants de ce dispositif expérimental, sont détaillés ci-dessous.

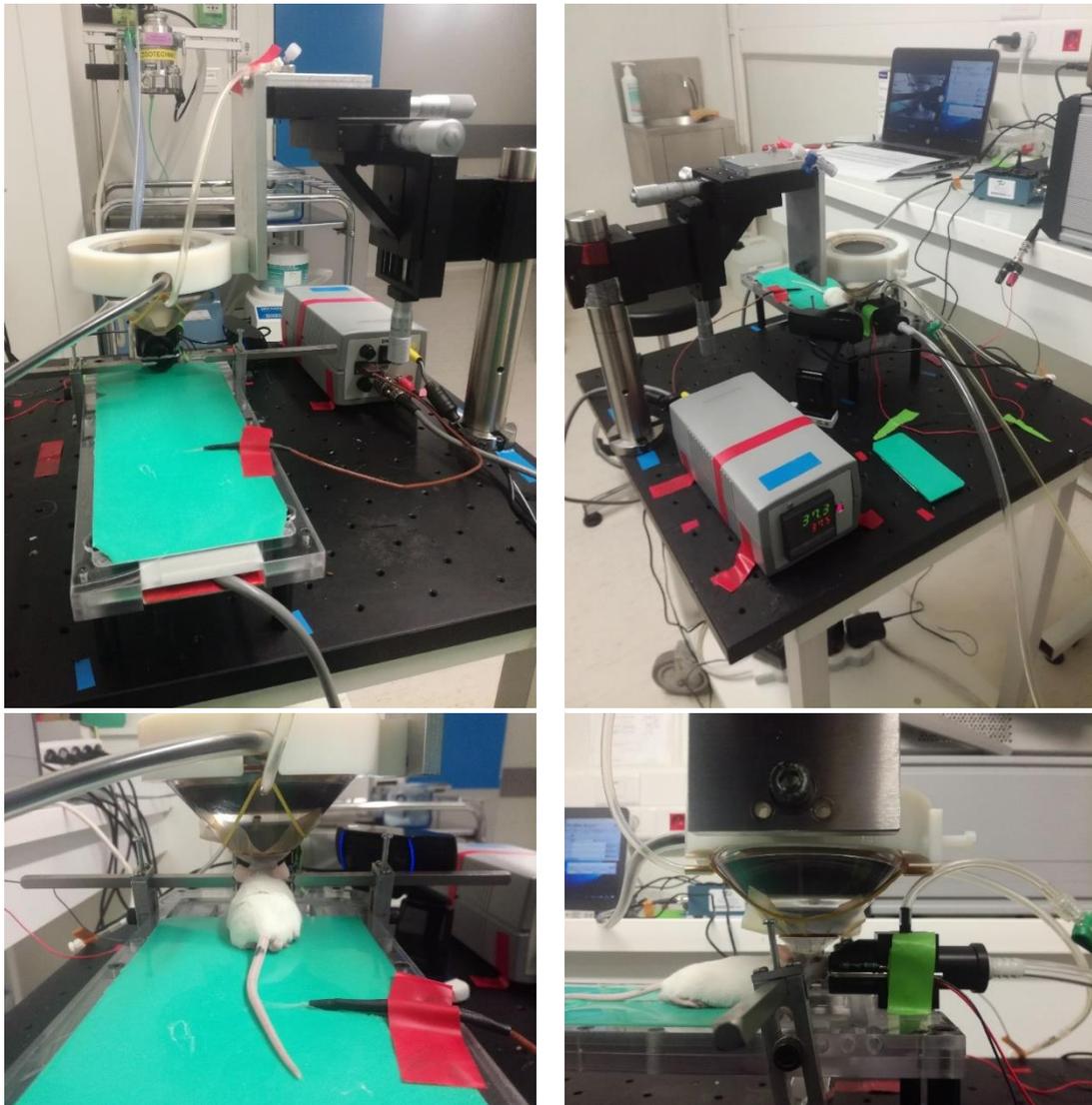


Figure A.1 : Dispositif expérimental utilisé pour les expériences *in vivo* de neurostimulation ultrasonore sur souris. Il comprend un plateau chauffant (dont la température est réglée et maintenue à 37 °C), un système de fixation de la tête de la souris

(barres d'oreilles et barre de maintien des dents), un masque facial à travers lequel est diffusée l'anesthésie gazeuse, un système permettant la fixation et le déplacement de la sonde en 3D (chariots de vis micrométriques), une partie dédiée à l'émission des ultrasons (sonde, générateurs de fonctions et amplificateur de puissance) ainsi qu'une partie servant à l'acquisition de données (caméra, électromyographe et ordinateur).

Premièrement, la souris est disposée sur un tapis en silicone, reposant sur un plateau en plexiglas qui comprend, en son sein, une plaque chauffante. Cette dernière est connectée à un dispositif comprenant, entre autres, une sonde de température insérée dans le tapis ainsi qu'un thermostat. L'ensemble permet de maintenir la température corporelle de la souris à 37 °C⁵⁶.

Ensuite, une partie importante du dispositif est celle qui permet de maintenir l'animal endormi pendant toute la durée de l'expérimentation. Elle se compose d'un masque facial, dans lequel vient s'insérer la gueule de la souris, et qui est connecté à un tuyau acheminant l'anesthésie gazeuse depuis un concentrateur. Ce dernier réalise le mélange d'isoflurane (Vetflurane® - Vibrac, Carros, France ; 0,25 à 2 % du mélange final) avec du dioxygène (2 L/min). Une chambre d'induction, dans laquelle est diffusé de l'isoflurane à forte concentration (typiquement 3%), est également utilisée préalablement aux expériences, pour endormir les animaux. D'autre part, le masque facial possède une autre fonction, qui est celle d'accrocher les dents de la souris, à l'aide d'une petite barre en acier qui le traverse en largeur. Par ailleurs, la fixation de la tête de la souris est également assurée par des barres d'oreilles, placées à l'avant du cadre en plexiglas et dont la position est réglable en 3D.

Une autre partie du dispositif expérimental est dédiée à la fixation et au déplacement de la sonde ultrasonore servant à réaliser la neurostimulation. Cette sonde est ainsi maintenue au moyen d'une bague, vissée sur un système de chariots munis de vis micrométriques, et qui permettent des déplacements de l'ordre de 0,01 mm dans les trois directions de l'espace. L'ensemble est arrimé à une barre de fixation, elle-même vissée sur une plateforme métallique, sur laquelle est également fixé le plateau chauffant. Cette plateforme est munie de trous percés à intervalles réguliers, qui permettent de fixer et positionner les différentes parties du dispositif expérimental de manière précise et reproductible (Fig. A.1).

En outre, le dispositif expérimental comprend une partie dédiée à l'émission ultrasonore, composé de la sonde, d'un générateur de fonctions et d'un amplificateur de puissance. Tel qu'indiqué dans le chapitre précédent, ce sont les mêmes appareils qui ont été utilisés lors de la caractérisation de la sonde ultrasonore. Les fonctionnalités du générateur permettent de gérer la fréquence, l'amplitude et la durée de l'impulsion. Pour pouvoir répéter ce signal à une fréquence de répétition (FR) donnée, il est nécessaire de connecter le générateur à un second générateur qui, à l'aide d'un signal carré de fréquence FR, pilote l'émission du premier appareil. Dans notre cas, c'est l'électromyographe (Powerlab 26T ; AD Instruments, Sydney, NSW, Australie) qui fait office de second générateur. En effet, il est possible d'utiliser l'électromyographe (EMG) pour déclencher l'émission du générateur, en le paramétrant et en

⁵⁶ Température corporelle normale de la souris.

le pilotant depuis un ordinateur muni du logiciel adéquat (LabChart 8 ; AD Instruments ; Fig. A.2). Par ailleurs, une LED, connectée à ce dispositif émetteur, et qui s'illumine simultanément à l'émission, permet à l'expérimentateur de repérer les événements de stimulation.

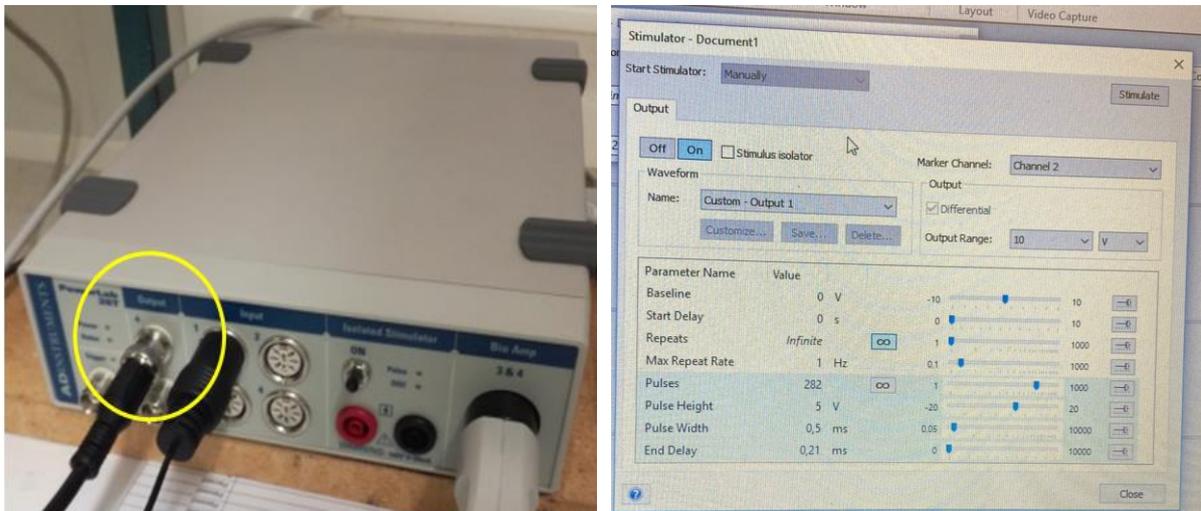


Figure A.2 : Electromyographe utilisé pour l'acquisition de signaux, mais aussi pour piloter le générateur de fonctions. A cet effet, la sortie « Output + » de l'électromyographe (image de gauche) est connectée au générateur, et le déclenchement de celui-ci est piloté à l'aide de signaux paramétrés dans le logiciel LabChart (image de droite).

Enfin, une partie du dispositif est dédiée à l'acquisition de données. Elle comprend l'EMG, d'une part, et une caméra HD⁵⁷, d'autre part, en plus de l'ordinateur qui permet de les faire fonctionner. L'EMG permet l'acquisition de signaux électriques issus d'aiguilles insérées dans les pattes de l'animal. Tel qu'évoqué précédemment, cet appareil fonctionne via un logiciel, qui permet l'acquisition et l'analyse des données électromyographiques (Fig. A.3). Quant à la caméra, elle est utilisée pour recueillir des images des souris durant les expériences, afin d'aider à l'analyse visuelle de ces dernières.

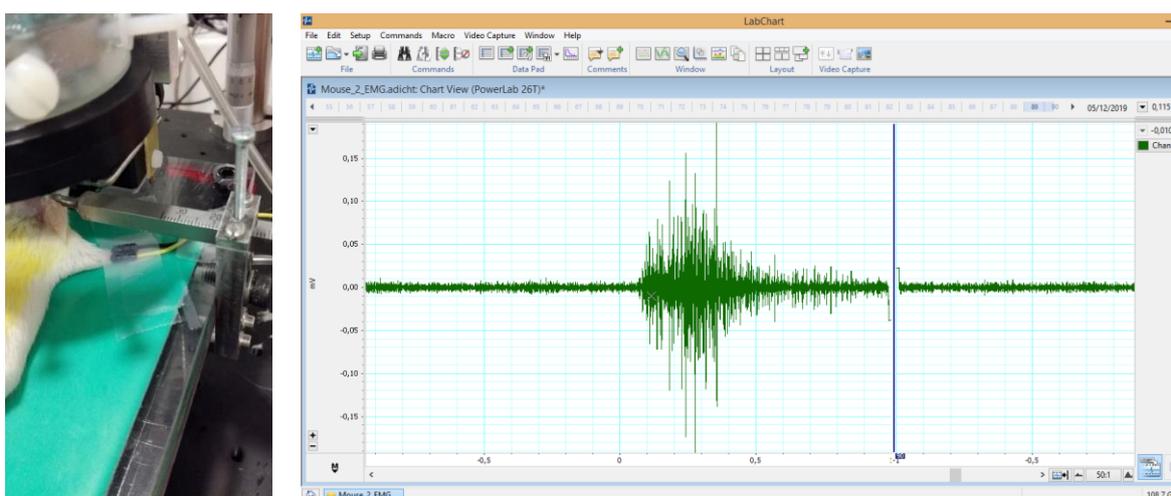


Figure A.3 : Utilisation de l'électromyographie pour la détection des mouvements de patte de la souris. Les signaux électriques sont recueillis par des aiguilles insérées dans la patte avant droite de la souris (image de gauche), puis l'acquisition se fait à travers le logiciel dédié (LabChart 8 ; image de droite).

⁵⁷ Haute définition (720p).

II. Positionnement de la sonde ultrasonore sur le crâne de souris

Lors de ces expériences *in vivo*, l'un des éléments clés pour la réussite de la neurostimulation est le positionnement de la sonde sur le crâne de l'animal, afin de cibler précisément la zone d'intérêt. A cet effet, et afin de pouvoir se repérer au sein du cerveau de souris, nous avons utilisé un atlas du cerveau de souris [1]. Ce dernier indique les coordonnées de manière classique, en prenant comme origine du repère le Bregma. Pour faire en sorte que ce point de repère soit visible, certaines équipes de recherche découpent le scalp du crâne des animaux. Dans notre cas, au contraire, nous avons choisi de laisser le scalp des souris indemne, dans le souci d'éviter les actes chirurgicaux. En effet, ces derniers peuvent générer du stress et de la douleur chez les animaux, ce qui peut potentiellement interférer avec les résultats, notamment au niveau des analyses immunohistochimiques. En outre, une partie des animaux pouvait être réutilisée sur plusieurs jours, et nous voulions éviter toute influence potentielle d'une plaie chirurgicale sur le faisceau ultrasonore. Par conséquent, nous avons mis au point une méthode qui permet de se repérer sans ouvrir le scalp de l'animal. Ainsi, cette méthode consiste à prendre un repère visuel externe sur le crâne de souris, permettant de se repérer et de positionner la sonde de manière précise. Ce repère visuel est la crête occipitale du crâne de souris, qui constitue une sorte de bosse sur le bord arrière du crâne, et que l'on peut aisément distinguer lorsque celui-ci est rasé. Afin de pouvoir faire correspondre les coordonnées de l'atlas à ce point de repère externe, nous avons réalisé des mesures sur dix souris⁵⁸ tests, identiques aux animaux utilisés en *in vivo*. Ainsi, nous avons ouvert le scalp du crâne de ces souris et avons mesuré la distance séparant la crête occipitale du Bregma, dans la direction antéropostérieure. La distance moyenne mesurée est de $7,6 \pm 0,2$ mm (Fig. A.4).

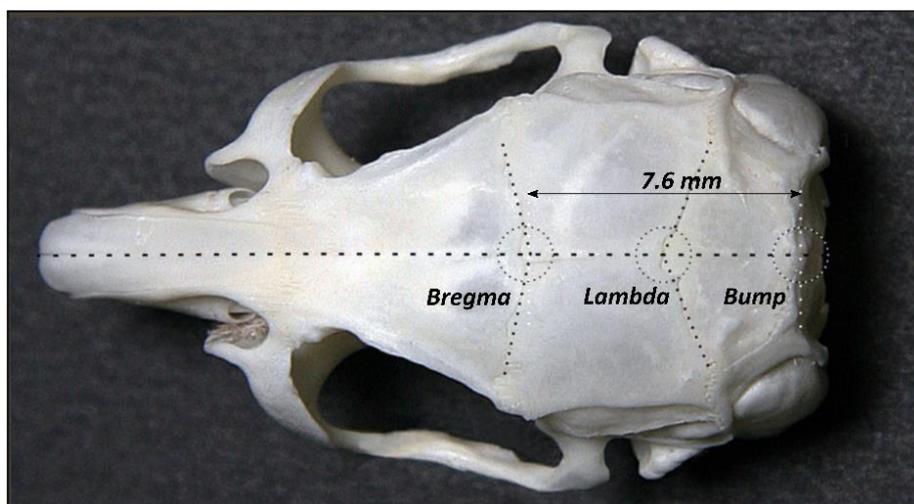


Figure A.4 : Photographie d'un crâne de souris (vue de haut). Y sont indiqués les points de repère classiques (Bregma et Lambda), ainsi que le repère visuel que nous avons utilisé lors de nos expériences *in vivo* (crête occipitale, indiquée ici en tant que « Bump », qui signifie « bosse » en anglais). La distance moyenne entre ce repère et le Bregma, mesurée sur dix souris, est également indiquée.

⁵⁸ Souris Balb/c mâles adultes, non réutilisées lors des expériences *in vivo* de neurostimulation ultrasonore.

Par la suite, nous avons défini un protocole de positionnement de la sonde sur le crâne de souris. Celui-ci consiste, tout d'abord, à bien fixer et positionner l'animal à l'aide des barres d'oreilles et de la barre du masque facial, en s'assurant que la tête de l'animal n'est pas penchée dans quelque direction que ce soit. Puis, il faut positionner la sonde sur la crête occipitale, à l'aide d'une pointe s'insérant au sommet du cône utilisé avec la sonde. Les coordonnées des vis micrométriques sont alors notées et prises comme référence pour le repérage. Ensuite, la sonde est déplacée, toujours à l'aide des vis micrométriques, au niveau de la zone d'intérêt, *i.e.* le cortex moteur primaire (M1) de l'hémisphère gauche. Cette zone a été choisie dans le but d'observer des réponses motrices au niveau de la patte avant droite de l'animal. Pour cibler cette zone d'intérêt, nous avons retenu les coordonnées suivantes, extraites des travaux de Estebanez *et al.* [2] : Bregma + 0,5 mm dans la direction antéropostérieure, et Bregma + 1,7 mm suivant l'axe médiolatéral. En outre, lors du déplacement de la sonde, la distance de 7,6 mm entre le Bregma et la crête occipitale, dans la direction antéropostérieure, est prise en compte. Par ailleurs, suivant la direction verticale, la sonde doit être placée au contact de la tête de la souris. Ainsi, la hauteur idéale doit être notée avant l'application de gel ultrasonore, car une fois appliqué, ce dernier empêche de voir clairement le contact entre le cône et la tête de l'animal.

III. Anesthésie

Outre la précision du positionnement de l'animal sur le cadre stéréotaxique, et de la sonde ultrasonore sur la tête de la souris, l'anesthésie constitue un autre élément clé pour le bon déroulement des expériences de neurostimulation ultrasonore. En effet, pour réussir ces expériences, il est capital de maintenir l'animal dans un état intermédiaire entre l'endormissement et l'éveil, ce qui permet d'observer une stimulation motrice tout en limitant les mouvements spontanés de la souris. Pour y parvenir, il est donc nécessaire de trouver un équilibre dans le dosage de l'anesthésie. Ce critère constitue, d'ailleurs, la raison principale de notre choix d'une anesthésie gazeuse, qui est beaucoup plus modulable qu'une anesthésie par injection. Ainsi, afin de déterminer la bonne dose d'anesthésie à administrer, nous avons réalisé plusieurs tests, pour des concentrations allant de 0,25 % à 1 % d'anesthésie, dans le mélange final avec le dioxygène (débit de 2 L/min). Ces tests, dont un exemple est montré en Fig. A.5, ont montré qu'une concentration de 0,25 % d'anesthésie était idéale pour la réalisation de nos expériences. Aussi, ces tests nous ont permis de mettre en place un protocole relatif à l'anesthésie. Ainsi, nous avons pu déterminer la concentration à utiliser pour l'endormissement initial de l'animal (3 %, dans la chambre d'induction), celle à utiliser pour la fixation de l'animal (2 %) ainsi que les étapes à suivre entre la fin de la fixation de l'animal et le début de la stimulation. En effet, afin de passer d'un état d'endormissement profond de l'animal, pendant sa fixation, à un état de semi-éveil, propice à la neurostimulation, une baisse progressive de la concentration d'anesthésie, ponctuée de temps d'attente, est nécessaire. Nous avons ainsi mis en place les étapes suivantes :

- La concentration de l'anesthésie est baissée à 1 % immédiatement après avoir fini de fixer l'animal ;
- Puis, une nouvelle baisse de cette concentration, à 0,25 %, est opérée au bout de 5 min – à ce stade, l'animal montre, en général, quelques signes d'éveil (mouvement de vibrisses, mouvement de queue, *etc.*) ;
- Enfin, une attente de 5 min est nécessaire avant de commencer la stimulation, le temps pour l'animal de se retrouver dans un état de semi-éveil. Il est possible de vérifier l'état d'éveil de la souris en testant ses réflexes (*e.g.*, pincement des pattes arrière). Néanmoins, de manière générale, cette vérification s'avère inutile puisque l'animal montre souvent des signes clairs d'éveil, à ce stade (quelques mouvements de pattes, mouvements de vibrisses, *etc.*).

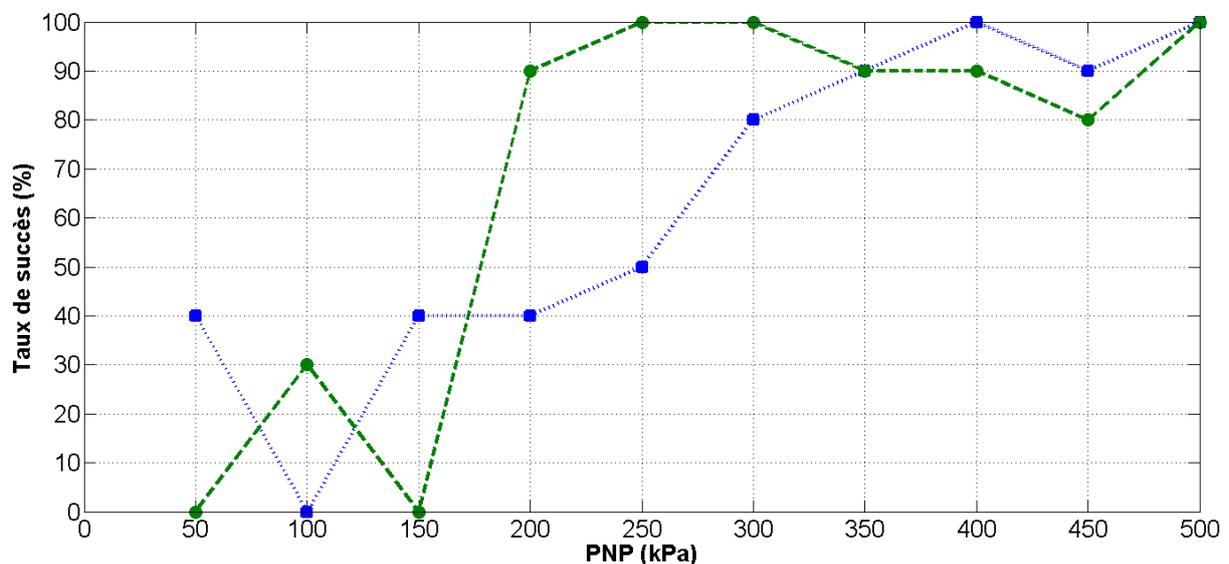


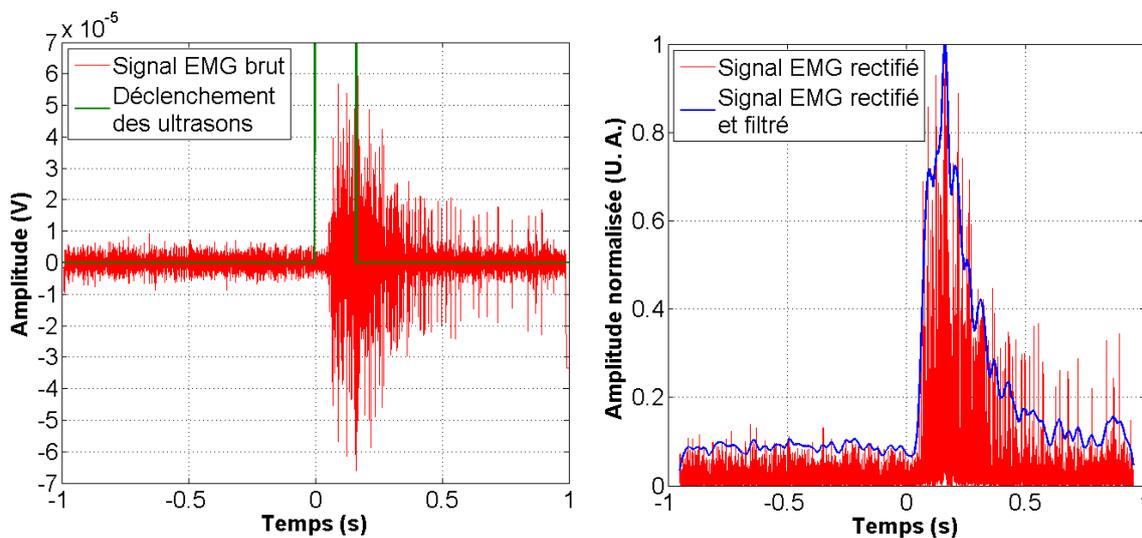
Figure A.5 : Taux de succès, évalué visuellement, en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué à une souris. La neurostimulation a été réalisée à une fréquence de 0,5 MHz (sonde Imasonic), avec une durée d'impulsion de 160 ms (80 000 cycles) et à deux concentrations d'anesthésie différentes : 0,25% (courbe verte ; points reliés par des tirets) et 0,5% (courbe bleue ; carrés reliés par des pointillés). Les taux de succès ont été calculés sur dix essais pour chaque PNP/concentration d'anesthésie. On peut voir que le taux de succès maximal est atteint pour une PNP plus basse lorsque la concentration d'anesthésie utilisée est de 0,25%.

IV. Analyse des données électromyographiques

L'évaluation des réponses motrices des souris a principalement été faite de manière visuelle lors des expériences *in vivo*. En complément, nous avons également utilisé l'électromyographie afin de confirmer les résultats visuels, d'une part, et d'extraire les principales caractéristiques des réponses motrices (amplitude, latence et durée), d'autre part. L'acquisition des données a été réalisée à l'aide de l'électromyographe PowerLab 26T et du logiciel associé LabChart 8. Afin de pouvoir exploiter les signaux acquis, des étapes de traitement et d'analyse de ces données, effectuées à l'aide d'un programme que nous avons réalisé sous Matlab, ont été nécessaires. Le traitement des données consiste principalement

à centrer les signaux bruts autour de l'amplitude nulle, puis les rectifier⁵⁹, et enfin les filtrer. Par la suite et dans un premier temps, les données ainsi traitées sont analysées, afin de distinguer les réponses motrices parmi tous les signaux recueillis. Cette action est réalisée sur la base de valeurs seuils d'amplitude, de durée et de latence des réponses motrices incluses dans le programme. Ainsi, seuls les signaux qui remplissent les conditions définies sont considérés comme étant des réponses motrices. Dans un second temps, les signaux sélectionnés sont analysés, afin d'extraire les caractéristiques des réponses motrices citées précédemment. Toutes ces étapes de traitement et d'analyse sont décrites de manière plus détaillée dans l'article original (*cf.* Chapitre 3, p. 122). Par ailleurs, un exemple les illustrant est présenté en figure A.6.

(a)



(b)

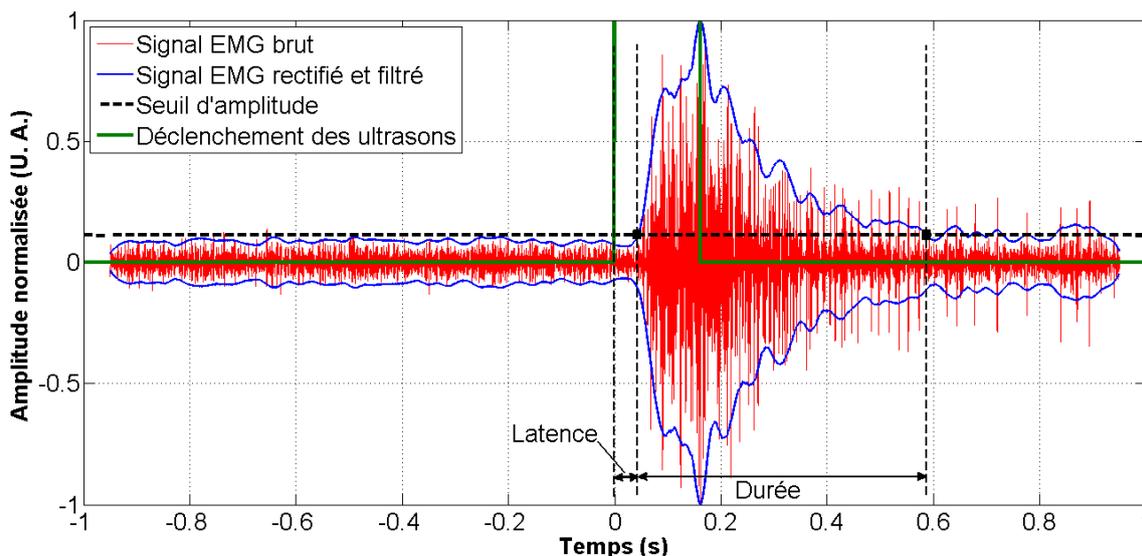


Figure A.6 : Exemple de signal électromyographique (EMG) acquis (a) – fig. de gauche, puis traité (a) – fig. de droite. L'analyse du signal traité permet d'extraire les caractéristiques principales de la réponse motrice (b). Le filtre utilisé est une gaussienne

⁵⁹ L'étape de rectification consiste à prendre la valeur absolue du signal brut, une fois que celui-ci a été centré autour de l'amplitude nulle.

de 40 ms de largeur totale à mi-hauteur. Le seuil d'amplitude est défini comme $\mu + 3\sigma$, μ étant l'amplitude moyenne du signal traité sur la période de 200 ms avant la stimulation, et σ son écart-type sur la même période. Le déclenchement des ultrasons est opéré en utilisant une fonction carrée d'amplitude 5 V et de même durée que l'impulsion ultrasonore.

V. Ajustement des courbes de taux de succès

En traitant les données obtenues au cours des différentes expériences *in vivo* réalisées, nous avons remarqué que la variation du taux de succès en fonction du PNP esquissait une forme particulière, à savoir une sigmoïde. Cette forme est particulièrement bien visible lorsque le taux de succès atteint les 100 %, avec un plateau à cette valeur. Ainsi, pour la présentation des résultats, nous avons prévu un modèle d'ajustement des courbes de taux de succès, basé sur l'équation de Boltzmann pour les sigmoïdes, qui s'écrit comme suit :

$$TS(P) = TS_{\max} + (TS_{\min} - TS_{\max}) / \left(1 + e^{\frac{P - P_{50}}{dP}}\right),$$

avec TS le taux de succès, TS_{\min} et TS_{\max} les valeurs minimale et maximale du taux de succès, respectivement, P le pic négatif de pression, P_{50} le pic négatif de pression pour lequel $TS = 50\%$, et dP la pente de la courbe. Etant donné que nous avons $TS_{\min} = 0\%$ et $TS_{\max} = 100\%$, l'équation peut se réécrire :

$$TS(P) = 100 / \left(1 + e^{\frac{P_{50} - P}{dP}}\right).$$

L'algorithme que nous avons élaboré, pour implémenter le modèle, allie cette équation à une méthode des moindres carrés. L'ensemble permet ainsi de trouver la sigmoïde qui se rapproche le plus des résultats expérimentaux. Un exemple d'ajustement est présenté en figure A.7.

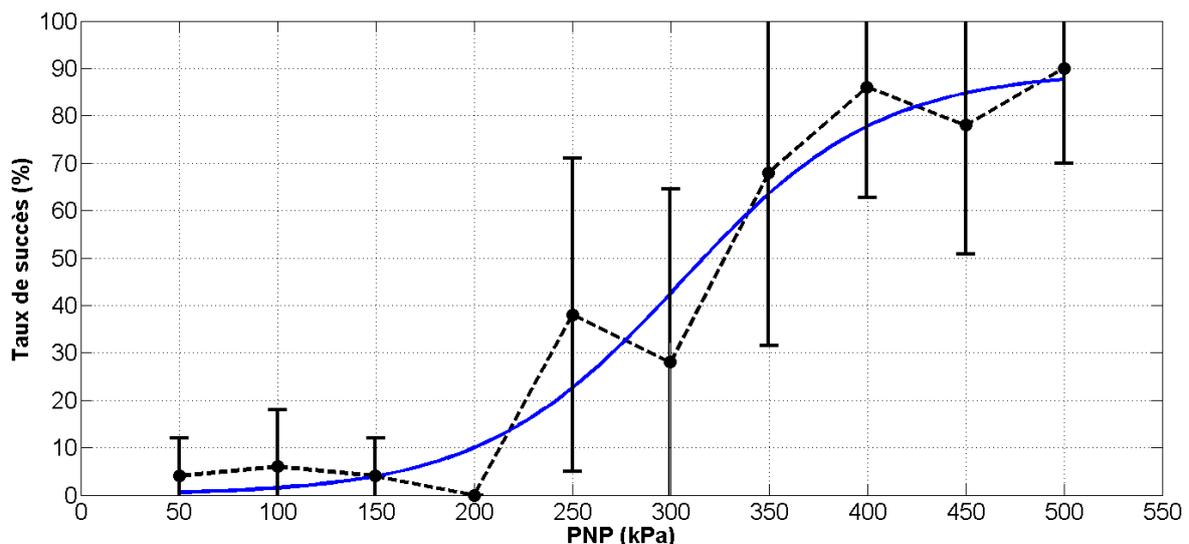


Figure A.7 : Taux de succès moyen ($N = 5$) en fonction du pic négatif de pression (PNP) appliqué aux souris, à une fréquence de 0,5 MHz et une durée d'impulsion de 160 ms (80 000 cycles). Les données expérimentales, acquises par électromyographie, sont représentées en points reliés par des tirets (en noir). La courbe en trait plein (en bleu) représente l'ajustement de la courbe expérimentale, obtenu par la méthode des moindres carrés et en utilisant l'équation de Boltzmann. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Références bibliographiques

- [1] K. B. J. Franklin et G. Paxinos, *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 3. ed. Amsterdam: Elsevier, AP, 2008.
- [2] L. Estebanez, D. Hoffmann, B. C. Voigt, et J. F. A. Poulet, « Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Primary Motor Cortex Signal Reaching », *Cell Rep.*, vol. 20, n° 2, p. 308-318, juill. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.044.

Annexe 2 : Communications scientifiques / Enseignements dispensés

Publications dans des journaux à comité de lecture

- T. Iazourene**, H. Malloul, R. M. Nouredine, E. Oujagir, J.-M. Escoffre, and A. Bouakaz, "Ultrasound Neurostimulation in Mice: Impact of Ultrasound Settings and Beam Properties," *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, Vol. 69, No. 3, pp. 1053-1063, Mar. 2022. DOI: 10.1109/TUFFC.2022.3144335.
- A. Presset, S. Bodard, A. Lefèvre, A. Millet, E. Oujagir, C. Dupuy, **T. Iazourene**, A. Bouakaz, P. Emond, J.-M. Escoffre, and L. Nadal-Desbarats, "First Metabolomic Signature of Blood-Brain Barrier Opening Induced by Microbubble-Assisted Ultrasound," *Frontiers in Molecular Neuroscience*, Vol. 15, Art. no. 888318, Jun. 2022. DOI: 10.3389/fnmol.2022.888318.
- R. M. Nouredine, A. Surget, **T. Iazourene**, M. Audebrand, H. Eliwa, B. Brizard, M. Nasserredine, Y. Mofid, J. Charara, and A. Bouakaz, "Guidelines for Successful Motor Cortex Ultrasonic Neurostimulation in Mice," *Ultrasonics*, Vol. 128, Feb. 2023. DOI: 10.1016/j.ultras.2022.106888.

Acte de congrès

- T. Iazourene**, H. Malloul, E. Oujagir, J.-M. Escoffre, and A. Bouakaz, "Characterization of ultrasound neurostimulation in mice," *2020 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*, Las Vegas, NV, USA, pp. 1-4, Sep. 2020. DOI: 10.1109/IUS46767.2020.9251345.

Congrès avec participation

Congrès **IEEE International Ultrasound Symposium (IUS) 2020** (Las Vegas, NV, USA – tenu en visioconférence en raison de l'épidémie de Covid-19) : **Présentation orale**.

Congrès **IEEE International Ultrasound Symposium (IUS) 2021** (Xi'an, Chine – tenu en visioconférence en raison de l'épidémie de Covid-19) : **Poster**.

Enseignements dispensés

Enseignements en travaux pratiques, dispensés à des étudiants en Licence Professionnelle des Métiers du Numérique (UX2i), à l'**IUT de Blois**. Discipline enseignée : Culture technique en audiovisuel pour le web.

Annexe 3 : Premier article en tant que co-auteur



First Metabolomic Signature of Blood-Brain Barrier Opening Induced by Microbubble-Assisted Ultrasound

Antoine Passet¹, Sylvie Bodard¹, Antoine Lefèvre^{1,2}, Anaïs Millet¹, Edward Oujagir¹, Camille Dupuy¹, Tarik lazourène¹, Ayache Bouakaz¹, Patrick Emond^{1,2,3}, Jean-Michel Escoffre^{1*†} and Lydie Nadal-Desbarats^{1,2*†}

OPEN ACCESS

¹ UMR 1253, iBrain, Inserm, Université de Tours, Tours, France, ² Département Analyses Chimique et Métabolique, PST Analyses des Systèmes Biologiques, Université de Tours, Tours, France, ³ CHRU Tours, Serv Med Nucl in Vitro, Tours, France

Edited by:

Antonios N. Poullopoulos,
King's College London,
United Kingdom

Reviewed by:

Sophie Morse,
Imperial College London,
United Kingdom
Gerhard Leinenga,
The University of Queensland,
Australia

*Correspondence:

Lydie Nadal-Desbarats
lydie.nadal-desbarats@univ-tours.fr
Jean-Michel Escoffre
jean-michel.escoffre@univ-tours.fr

[†] These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Signaling and Pathways,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Neuroscience

Received: 02 March 2022

Accepted: 06 May 2022

Published: 20 June 2022

Citation:

Passet A, Bodard S, Lefèvre A,
Millet A, Oujagir E, Dupuy C,
lazourène T, Bouakaz A, Emond P,
Escoffre J-M and Nadal-Desbarats L
(2022) First Metabolomic Signature
of Blood-Brain Barrier Opening
Induced by Microbubble-Assisted
Ultrasound.
Front. Mol. Neurosci. 15:888318.
doi: 10.3389/fnmol.2022.888318

Microbubble (MB)-assisted ultrasound (US) is a promising physical method to increase non-invasively, transiently, and precisely the permeability of the blood-brain barrier (BBB) to therapeutic molecules. Previous preclinical studies established the innocuity of this procedure using complementary analytical strategies including transcriptomics, histology, brain imaging, and behavioral tests. This cross-sectional study using rats aimed to investigate the metabolic processes following acoustically-mediated BBB opening *in vivo* using multimodal and multimatrices metabolomics approaches. After intravenous injection of MBs, the right striata were exposed to 1-MHz sinusoidal US waves at 0.6 MPa peak negative pressure with a burst length of 10 ms, for 30 s. Then, the striata, cerebrospinal fluid (CSF), blood serum, and urine were collected during sacrifice in three experimental groups at 3 h, 2 days, and 1 week after BBB opening (BBBO) and were compared to a control group where no US was applied. A well-established analytical workflow using nuclear magnetic resonance spectrometry and non-targeted and targeted high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry were performed on biological tissues and fluids. In our experimental conditions, a reversible BBBO was observed in the striatum without physical damage or a change in rodent weight and behavior. Cerebral, peri-cerebral, and peripheral metabolomes displayed specific and sequential metabolic kinetics. The blood serum metabolome was more impacted in terms of the number of perturbed metabolisms than in the CSF, the striatum, and the urine. In addition, perturbations of arginine and arginine-related metabolisms were detected in all matrices after BBBO, suggesting activation of vasomotor processes and bioenergetic supply. The exploration of the tryptophan metabolism revealed a transient vascular inflammation and a perturbation of serotonergic neurotransmission in the striatum. For the first time, we characterized the metabolic signature following the acoustically-mediated BBBO within the striatum and its surrounding biological compartments.

Keywords: microbubble, blood-brain barrier opening, metabolomics, HPLC-MS, NMR, ultrasound, inflammation, neurotransmission

INTRODUCTION

The blood-brain barrier (BBB) is one of the most selective and semi-permeable biological barriers in mammals. It isolates the central nervous system (CNS) from the whole body, creating a privileged environment for maintaining the homeostasis of the cerebral compartment (Pardridge et al., 1986). BBB is composed of endothelial cells, perivascular astrocyte end-feet, pericytes, neurons, and basal membrane. The permeability of this barrier is drastically reduced by the presence of tight junctions (TJs) between endothelial cells, abolishing any paracellular diffusion of molecules (Abbott et al., 2010). In addition, brain cells and blood vessel cells are provided with passive and active transporters that regulate the concentration of molecules within the cerebral tissue. Nutrients, gases (O₂ and CO₂), ions, water (through aquaporin-4), and small lipid-soluble molecules less than 400 Daltons can pass through this barrier by facilitated diffusions, such as glucose and large amino-acid transporters (Daneman and Prat, 2015). Nevertheless, active efflux proteins (ATP-binding cassette and solute carrier family transporters) transport any compound from the brain tissue to the vascular compartment. These active transporters limit the passage through the BBB of pathogens, toxins, solutes, and large hydrophilic molecules like therapeutics (Barar et al., 2016). Because of this barrier and its physiological functions, the BBB renders the treatment of neurological diseases challenging by reducing, if not abolishing, the biodistribution of therapeutics in the cerebral tissue. One way to bypass this barrier is to transiently disrupt endothelial cells by applying the microbubble (MB)-assisted ultrasound (US) method (also known as sonoporation), thus allowing a non-invasive and targeted delivery of therapeutics. MBs are intravenously injected and locally activated by focused US, thus increasing the permeability of the vascular endothelium and facilitating drug extravasation and its bioavailability in the targeted brain tissue (Presset et al., 2020). Importantly, this procedure enables precise BBB opening (BBBO) in deeper brain regions without resorting to surgical intervention. For instance, the striatum is a functional deep subcortical nucleus in the brain involved in the processing of motor and cognitive tasks. This cerebral structure is specifically implicated in several neurological and psychiatric pathologies, such as Parkinson's or Huntington's disease, addiction, bipolar or autism spectrum disorders, and attention deficit or hyperactivity disorders (Grahn et al., 2008). Hence, the striatum remains a prime target for studying the effect of neuroprotective treatment (Schober, 2004) or novel curative strategies, such as cellular therapies (Gaillard and Jaber, 2011).

Blood-brain barrier opening safety using US and MBs has been investigated using complementary analytical strategies including transcriptomics, histology, behavioral tests, and brain imaging, e.g., magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography/computed tomography (PET/CT). Transcriptomic studies showed overexpression of pro-inflammatory- and antiapoptotic-associated genes (Kovacs et al., 2017; McMahon and Hynynen, 2017; McMahon et al., 2017, 2020; Ji et al., 2021). Gene set enrichment analysis allowed describing classes of genes that are over- or under-represented in a large set of genes. These results revealed the involvement of

drug transporter activity, chronic inflammatory response, and antigenic stimuli associated with the inflammatory response. Immunohistochemistry (IHC) analysis of the brain tissue partly confirmed these results. Indeed, this approach revealed the presence of inflammatory proteins and scavenger receptors of complex hemoglobin/haptoglobin, an over-expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), and some apoptotic neurons. Electron microscopy allowed a deep investigation of TJ integrity and the cytoarchitectural consequences of acoustically-mediated BBBO, especially on clathrin- and caveolin-mediated endocytosis and paracellular adhesion. In addition, hematoxylin and eosin staining of brain sections only showed rare red-blood-cell extravasation and gliosis under severe acoustic conditions (Sheikov et al., 2004, 2006, 2008; McDannold et al., 2005; Baseri et al., 2010; Alonso et al., 2011; Kovacs et al., 2018), namely a very high dose of MBs (corresponding to 10-fold the conventional MB dose applied in clinical US imaging, i.e., 100 µL of Definity MBs/kg) or a high mechanical index of 100. Several imaging studies, such as brain MRI, have confirmed the absence of hemorrhages or edema during the BBBO procedure under clinical acoustic conditions (Liu et al., 2008; Kim et al., 2013; Horodyckid et al., 2017; Mainprize et al., 2019). Behavioral studies on non-human primates (NHP) or rodents did not show significant differences between the experimental groups (Olumolade et al., 2016; Tsai et al., 2018). All these studies convey that acoustically-mediated BBBO induces low or no neurophysiological damage onto the targeted tissue. These potential damages are directly correlated to the acoustic parameters and MBs, i.e., their composition and concentration, specifically (McMahon and Hynynen, 2017; McMahon et al., 2019). To date, to the best of our knowledge, no study explored the neurophysiological aftermath of this procedure on the metabolic level. In addition, all studies cited above focused on the cerebral tissue or endothelial cells. The vascular compartment has been shown to be the first impacted matrix after BBBO by MB-assisted US (Presset et al., 2020). Therefore, the present study focused on the metabolomic fingerprint of the brain tissue and body fluids, such as the cerebrospinal fluid, the blood, and urine following acoustically BBBO.

Metabolomics is an omics-based discipline that investigates, at a large scale, small molecules (called metabolites) from metabolic processes of cells, biofluids, tissues, and organisms defined as biological matrices. This promising and powerful approach gives access to the molecular phenotype by identifying the metabolites and measuring their concentrations, thus enabling the direct readout of the underlying biochemical activity in contrast to other omics approaches (e.g., genomics, transcriptomics, among others). These metabolites and their interactions within a given biological system are defined as the metabolome. To cover most of the metabolome, a multiplatform metabolomics approach, including nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectroscopy (MS), is often implemented and allows exploring the influence of physical factors on the functioning of an organism by the description of its metabolome. Metabolomics showed a clear potential in the evaluation of biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapeutic monitoring. In this context, the present study

aimed to investigate the metabolic consequences of acoustically-mediated BBBO targeted in the striatum region. As already described in transcriptomics approaches (Kovacs et al., 2017, 2018; McMahon and Hynynen, 2017; McMahon et al., 2017, 2020), short longitudinal studies were conducted; specifically, the maximum interval reported between sonoporation and transcriptomic investigations was 4 days after acoustically-mediated BBBO (McMahon and Hynynen, 2017). In this present study, a wide longitudinal study (up to a week after the procedure) of these metabolic consequences on brain tissue (i.e., striatum), cerebrospinal fluid (CSF), blood serum, and urine metabolomes was performed using NMR spectroscopy and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS).

MATERIALS AND METHODS

Animals and Housing

All male rats Sprague Dawley (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were 7 weeks old (about 250 g) before experiments. They were housed in groups of 4 under humidity and temperature-controlled conditions and a 12:12 light-dark cycle (light on at 7:00 AM) with *ad libitum* access to food and water. Animals were acclimated to their housing for 1 week before the *in vivo* procedures.

Acoustically-Mediated Blood-Brain Barrier Opening Ultrasound Set-Up

As previously described, US waves were generated using a single element lab-made transducer with a center frequency of 1 MHz (Escoffre et al., 2013). The transducer had a diameter of 49 mm and was focused at 49 mm. It was driven with an electrical signal generated by an arbitrary waveform generator (Ref. 33220A; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, United States), then amplified with a power amplifier (Ref. AAP-500-0.2-6-D; ADECE, Vallauris, France). The peak negative pressure was determined in a distinct setup using a capsule hydrophone (Ref. HGL-0200; ONDA Corporation, Sunnyvale, CA, United States) at the focal distance of the transducer.

Blood-Brain Barrier Opening Protocol

Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (70 mg/kg, Kétamine 1000[®], Virbac, Carros, France) and xylazine (7 mg/kg, Rompun[®], Elanco, Cuxhaven, Germany). Then, they were placed into a stereotactic frame and on a heating plate. The 1 MHz single element transducer (**Figure 1A**) was inserted in a degassed water-filled cone to ensure coupling with the head of the animals. This transducer was placed over the scalped skull at specific stereotactic coordinates of the region of interest (ROI), the right striatum, i.e., anteroposterior – AP –0.5 mm,

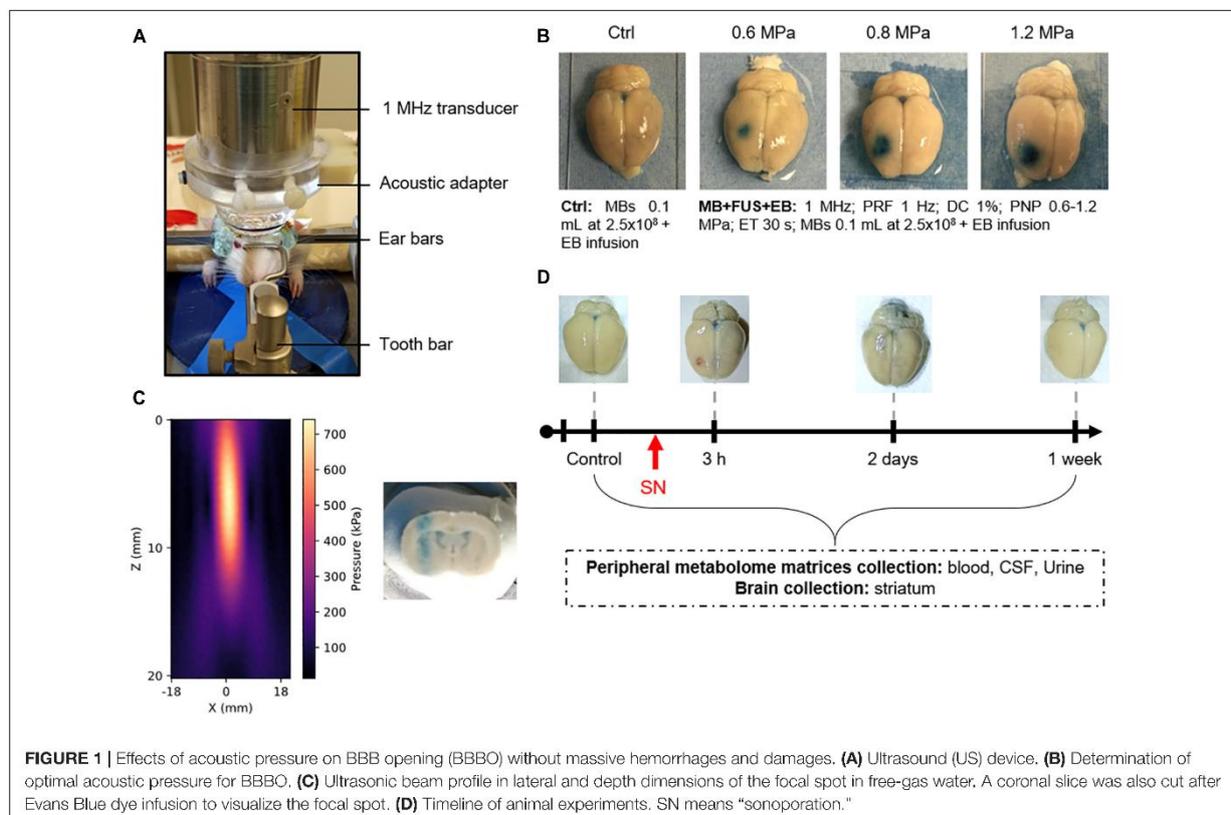


TABLE 1 | Summary of sample sizes by matrix and group and of animal weight (before and after the sonoporation).

		Number of samples			
	Group	Control	3-h	2 days	1 week
Matrices	Striatum	8	8	8	8
	CSF	8	8	7	8
	Blood serum	11	10	9	10
	Urine	8	8	8	10
Weight (g)	Before MB-FUS	343 ± 15	332 ± 11	341 ± 22	344 ± 24
	After MB-FUS	367 ± 19	383 ± 22	378 ± 28	379 ± 28

Bodyweight of rats is expressed as mean ± standard deviation. MB-FUS: microbubble-assisted focused ultrasound.

Lateral – L ± 3.15 mm, and ventrodorsal – VD 5 mm. From now on, the right striatum will be called striatum ipsilateral. After a bolus injection of MBs (Vevo Micromarker; 100 µL at 2.5×10^8 MBs/mL; mean diameter in volume 2.3 to 2.9 µm; Fujifilm-Visualsonics Inc., Amsterdam, Netherlands), the ROI was exposed to 1 MHz sinusoidal US waves for 30 s with a pulse repetition frequency (PRF) of 1 Hz and 10,000 cycles per pulse (10 ms burst length). The peak negative pressure (PNP) ranged from 0 to 1.2 MPa in agreement with Gerstenmayer et al. (2018). Immediately after US exposure, a 2% Evans blue solution (EB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) was carefully intravenously injected at 5 ml/kg *via* the caudal vein to monitor the BBBO. After 1 h, animals were intraperitoneally injected with an overdose of the anesthetic mixture and transcatheterially perfused with a 0.9% saline solution. Then, brains were collected and observed under an optical stereomicroscope (MZ9.5; Leica, Wetzlar, Germany).

For metabolomics analysis, BBBO was achieved one time using the same protocol above described using a PNP of 0.6 MPa but the EB solution was not administered. As defined above, the animals were sacrificed for 3 h (3-h group), 2 days (2-days group), and 1 week (1-week group) after the BBBO. Animals from control groups were treated as described above with no US application. The group size is presented in **Table 1**.

Animal wellbeing has been assessed each day until sacrifice by monitoring variations in rat behaviors (i.e., respiratory deficiency, loss of locomotion, loss of appetite, loss of grooming, aggressiveness, fear, etc.) and in body weights. Rat weights before and after the procedure have been consigned in **Table 1**.

Collection and Preparation of Biological Samples

Striatum

Brains tissues were collected and striata were dissected by an expert in brain microsurgery. Then, tissues were lyophilized and homogenized. Dry residues were weighted to approximately 3 mg. Finally, metabolites were extracted using an extraction protocol described by Dieme et al. (2017).

Cerebrospinal Fluid

Cerebrospinal fluid (CSF) was collected from cisterna magna and was centrifugated at 10,000 g for 15 min at 4°C. Finally, the

extraction of metabolites was performed according to a protocol established by Blasco et al. (2013).

Blood Serum

Blood was collected directly from the right cardiac atria and was coagulated for 30 min at room temperature. Then, blood was centrifugated at 10,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was collected corresponding to blood serum. Metabolites were extracted as previously reported by Alshammari et al. (2015).

Urine

Urine was collected directly from the output of the bladder. For ^1H NMR analyses, samples were centrifuged and diluted to $1/4$ in D_2O with final concentration of 123 µM of trimethylsilylpropanoic acid (TSP) buffer (Dieme et al., 2015).

^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and High-Performance Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry Analysis

As previously reported by Dieme et al. (2015, 2017) ^1H NMR analyses were carried out on brain tissue, CSF, blood serum, and urine. Briefly, these analyses were performed on a Bruker DRX-600 Avance III HD (Bruker, Billerica, MA, United States) equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were acquired using a “noesypr1d” pulse sequence with a relaxation delay of 20 s. Scans were acquired successively 64 times on each sample.

Striata, CSF, and blood serum were analyzed using HPLC-MS analysis as established by Dupuy et al. (2021). In brief, HPLC-MS analyses were performed on a UHPLC Ultimate WPS-3000 system (Dionex, Sunnyvale, CA, United States) coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and operated in positive (ESI+) and negative (ESI-) electrospray ionization modes. HPLC was achieved using two different columns to increase the metabolic coverage: a Kinetex XB C18 column (150 mm × 2.1 mm × 1.7 µm; Phenomenex Inc., Torrance, CA, United States) and a Cortecs HILIC column (150 mm × 2.1 mm × 1.6 µm; Waters Corporation, Milford, MA, United States). During the full-scan acquisition (full MS, AGC target of 10^6 , maximum injection time of 250 ms), which ranged from 58 to 870 m/z, the instrument operated at 70,000 resolution (m/z = 200). Finally, tryptophan's derivatives were quantified within brain tissues, CSF, and blood serum as described in Lefevre et al. (2019); Alarcón et al. (2021).

Data Processing

Metabolite Identification

A targeted analysis was applied to the samples of each matrix, based on a library of standard compounds (Mass Spectrometry Metabolite Library of standards; IROA Technologies, Sea Girt, NJ, United States). The following criteria were used to identify the metabolites: retention time of the detected metabolite within ± 20 s of the standard reference and exact measured molecular mass of the metabolite within a range of 10 ppm around the known molecular mass of the reference compound. The intensity value was calculated using Xcalibur 2.2 software

(ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, United States) by integrating the chromatographic peak area corresponding to the selected metabolite. In addition, tryptophan derivatives were identified and quantified by the correspondence between isotopic ratios of the metabolite and the labeled internal standard. NMR spectra were preprocessed (phase correction, baseline correction, peak alignment, and normalization), and NMR peak identification and quantification were performed by fitting spectra with a library of pure quantified metabolite spectrum with R software 4.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) with ASICS package 2.6.1 (Lefort et al., 2019).

Normalization

Concentration and intensities of blood serum and CSF samples were normalized to the total area while cerebral tissue samples were normalized to the weighted dry masses. Creatinine concentration was determined using TSP as an internal standard compound. Urine samples were normalized to the creatinine concentration (Craig et al., 2006).

Quality Control

High-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ^1H NMR instruments' stability were evaluated by multiple injections of quality control (QC) samples obtained from a pool of 10 μl of all samples analyzed. QCs were analyzed at the beginning of the run, every 10 samples, and at the end of the run. Coefficients of variation, defined as $\text{CV} = (\text{the standard deviation}/\text{mean}) \times 100$, were calculated for all metabolites in the dataset. Metabolites detected with a CV greater than 30% in QC samples were discarded for further analysis.

High-Performance Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry and ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Data Fusion

Each biological matrix was explored using HPLC-MS and ^1H NMR. For CSF samples, 181 metabolites in C18 column ESI+/ESI-, 119 metabolites in HILIC column ESI+, and 86 metabolites in NMR spectroscopy, were identified. For blood serum samples, 306 metabolites in C18 column ESI+/ESI-, 160 metabolites in HILIC column ESI+, and 109 metabolites in NMR spectroscopy, were identified. For brain samples, 224 metabolites in C18 column ESI+/ESI-, 161 metabolites in HILIC column ESI+, and 92 metabolites in NMR spectroscopy, were identified. Each metabolite of lists coming from the different platforms and modalities was associated with universal identifiers from online databases, such as Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, Kyoto, Japan, accessed on 10 June 2021), Human Metabolome Database (HMDB, Ottawa, Canada, accessed on 10 June 2021), and PubChem (Bethesda, MD, United States, accessed on 10 June 2021) databases (Kanehisa et al., 2017; Wishart et al., 2018; Kim et al., 2021). The redundancy of unique identifiers was analyzed to keep only metabolites with the smallest CV found in the 4 explored modalities (C18-MS ESI+/ESI-, HILIC-MS ESI+, and NMR spectroscopy). After redundancy filtering, 214 metabolites were identified in CSF, 251 were identified in blood serum, and 199 were identified in the

striatum. The number of identified metabolites only with NMR spectroscopy in urine was 124.

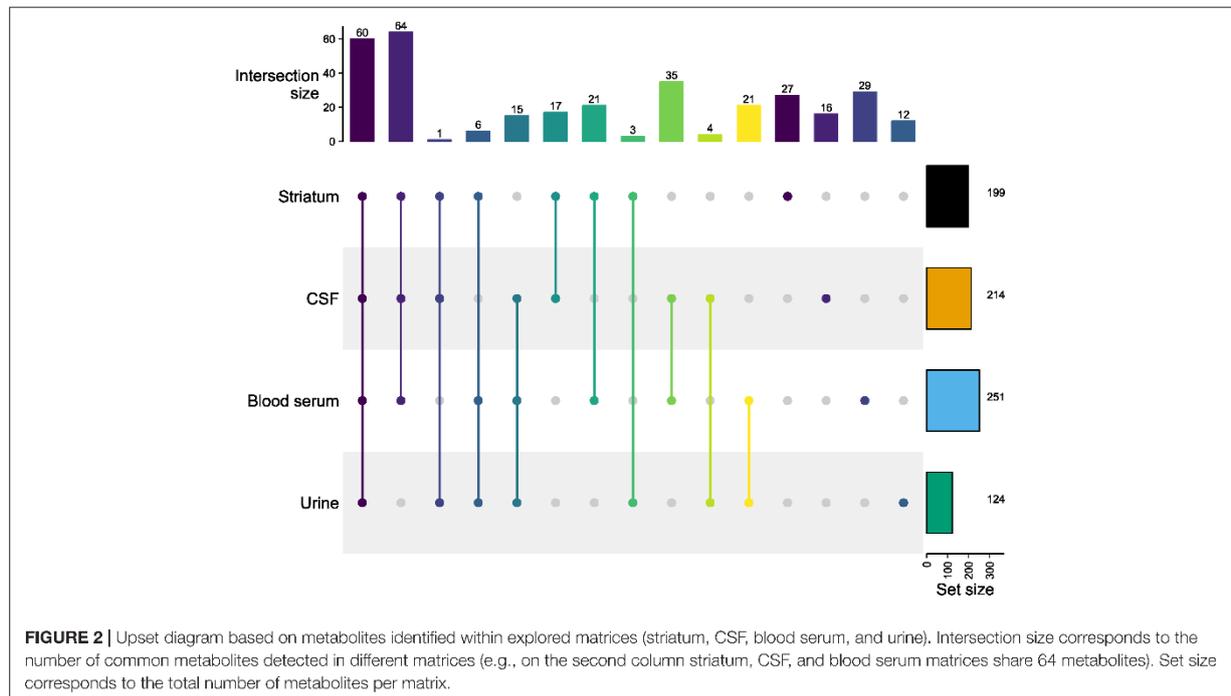
Statistical Analyses

Multivariate data analyses were achieved using unsupervised principal component analysis (PCA). PCA is commonly used for dimensionality reduction by projecting each data point onto only the first few principal components to obtain lower-dimensional data while preserving as much of the data's variation as possible. It allows summarizing data by reducing the number of variables and denoising the data. In addition, this statistical approach has several goals: (i) exploration of a large dataset characterized by several quantitative variables; (ii) identification of clusters by grouping samples that share nearly metabolic profiles, represented by score plot; and (iii) identification of aberrant samples called outliers. Supervised partial least square discriminant analysis (PLS-DA) was also used to establish predictive models between two-time groups by constraining the sample membership to specific groups. The model's significance is evaluated by two p -values: pR^2Y that assesses the significance of the model and pQ^2 that reflects the predictability of the model. These supervised analyses determine the metric termed variable importance in projection (VIP), which summarize the importance of each metabolite to define the predictive model. All of these multivariate analyses were performed using ropls R package 1.22 (Thevenot et al., 2015). After checking the normal distribution of samples (Shapiro test) and the homogeneity of variance (Fligner test), non-parametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test with Bonferroni p -value adjustment were performed. Metabolites were considered significant when the adjusted p -value was inferior to 0.05. Finally, significant metabolites identified by univariate analyses depending on the temporality comparisons were used to perform metabolic pathway analyses using a hypergeometric test with false discovery rate (FDR) p -value adjustment, based on definitions of the KEGG database. Each significant pathway (i.e., adjusted p -value inferior to 0.05) was reviewed to verify its pertinent involvement in the explanation of biological differences (i.e., metabolites that follow pertinent metabolic ways and biochemical reactions with other dysregulated metabolites).

RESULTS

Reversible Blood-Brain Barrier Opening Without Inducing Permanent Tissue Damages

Particular attention has been paid to animal well-being. The procedure is well tolerated by animals that did not show apparent physical signs of suffering and have not lost weight (Table 1) before and after the US application. The BBBO was assessed by EB extravasation immediately after the intravascular injection (i.v.) of MBs with or without US exposure. The results are shown in Figure 1B. As expected, the i.v. injection of MBs alone (i.e., control condition) induced neither an EB extravasation nor microhemorrhages in the target area. However, the exposure of



this target area to the MB-assisted US at 0.6 MPa resulted in EB extravasation, thus confirming the BBBO. The qualitative microscopic analysis of the brain tissue revealed the occasional presence of a few microhemorrhages. The increase of acoustic pressure from 0.8 to 1.2 MPa induced an enhancement of the tissue area where EB was extravasated. This BBBO was associated with a moderate to a high number of microhemorrhages at both 0.8 and 1.2 MPa, respectively. Taking this into consideration, an acoustic pressure of 0.6 MPa was retained for the investigation of metabolic consequences of acoustically-mediated BBBO using metabolomics approaches.

To assess the duration of BBBO at 0.6 MPa, EB was intravenously injected at different time points (immediately to 1 week) after the US exposure and then brains were collected and analyzed. Our data showed that the native BBB permeability was restored 1-h post-US exposure (**Supplementary Figure 1**). Few microhemorrhages were observed until 3 h after BBBO only (**Figure 1D**). As shown in **Figure 1**, the results demonstrate that our protocol induced a reversible BBBO without inducing irreversible damage to the tissue.

Multiplatform and Multimatrices Cross-Analyses Allow the Identification of Common Metabolites Between Matrices

As previously reported, an upset diagram of identified metabolites depending on the degree mode of intersections was generated to assess the complementarity in terms of metabolite coverage across all matrices (**Figure 2**; Lex et al., 2014). This

diagram allows efficient identification of the total number of metabolites per matrix (i.e., set size) and the number of common metabolites detected in different matrices (i.e., intersection set). In **Figure 2**, the horizontal bar graph indicates the total number of metabolites for each matrix: 124 in urines, 199 in the striatum, 214 in the CSF, and 251 in the blood serum. As expected, the blood serum metabolome provides the highest specificity. Indeed, the blood serum, and by extension the blood, is a biological matrix well known to be rich in metabolites (Psychogios et al., 2011).

Supplementary Table 5 shows the detailed list of metabolites identified in each intersection of the upset diagram. As shown in **Figure 2**, the vertical bar graph indicates the total number of only exclusive metabolites with one biological matrix: 12 in urines, 16 in the CSF, 27 in the striatum, and 29 in the blood serum. The presence of these unique metabolites displays the complementarity of the metabolic coverage supplied by each biological matrix. With 35 common metabolites, CSF and blood serum provide a higher score of intersection between the two matrices. This result is not surprising given the expected correlation between the CSF and the blood serum. Indeed, the CSF is an ultrafiltrate of blood, which is substantially similar to it, except that CSF is a nearly protein-free matrix, which has some different electrolytes concentrations (Segal, 2000; Bulat and Klarica, 2011). As expected, the intersection with brain tissue, CSF, and blood serum provides a higher number of metabolites shared between the three matrices (i.e., 64 metabolites). Indeed, these compartments are directly related to each other through biological barriers (i.e., blood-CSF barrier, glomerular filtration, etc.).

Cerebral and Peripheral Metabolomes Depict Specific and Sequential Kinetics After Acoustically-Mediated Blood-Brain Barrier Opening

The metabolomes' profiles of different biological matrices (e.g., striatum, CSF, blood serum, and urine) from control andinsonified groups at different time points (e.g., 3-h, 2-days, 1-week) post-BBBO were determined by using unsupervised multivariate analyses (PCA). Taking into consideration the temporal dimension of these profiles, the kinetics of metabolic changes after acoustically-mediated BBBO for each matrix is defined. As shown in **Figures 3–6** and **Tables 2–5**, each matrix showed specific kinetics of metabolic changes. The blood serum metabolome was more important than CSF, striatum, and urine metabolomes in terms of observed metabolic perturbations. Indeed, the CSF metabolome seems to return to the basal level more quickly than the blood serum metabolome. There is no longer any metabolic disruption in CSF 3 h after BBBO in comparison with the blood serum metabolome, which showed metabolic perturbations up to 1-week post-BBBO. In contrast, metabolic dysregulations within the striatum metabolome were greatest 2 days post-BBBO and persisted for up to a week, as well as urine metabolome showed metabolic perturbations up to a week after the BBBO procedure.

Pathway Analyses on Cerebral and Peripheral Metabolomes Reveal Several Metabolic Dysregulations Over Time Striatum Tissue

Taking the temporal dimension into consideration, the two first components of the PCA explained 33.5% of the total

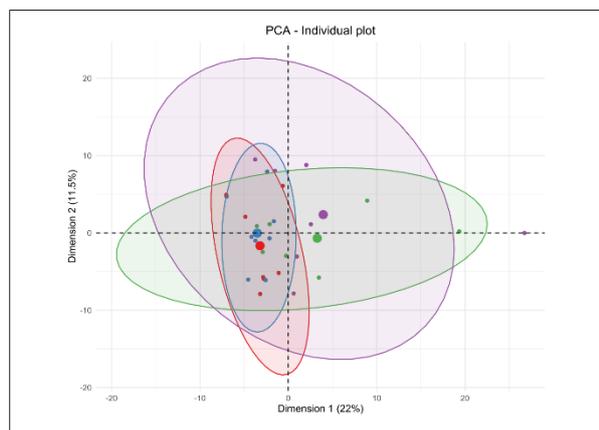


FIGURE 3 | Unsupervised multivariate analyses on striatum metabolome between control and insonified groups. Score plot of principal component analysis (PCA) constructed with metabolites within the striatum metabolome after acoustically-mediated BBB opening (BBBO). Larger dots are inertial centers of ellipses (center of a sample group) plotted based on smaller dots representing each sample individually. Red dots are control samples; Blue dots are 3-h post-BBBO samples; Green dots are 2-days post-BBBO samples; Purple dots are 1-week post-BBBO samples. Two samples having the same metabolic profile will be clustered in the same dimensional space.

variance (**Figure 3**). Control and 3-h post-BBBO groups would share the same metabolic profile, while 2-days and 1-week post-BBBO groups would share another one. The analysis of

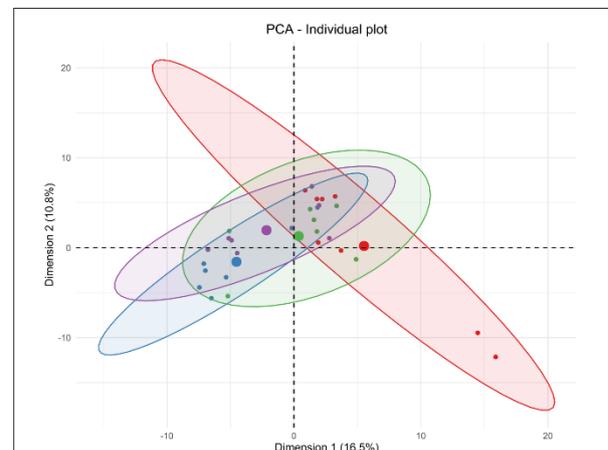


FIGURE 4 | Unsupervised multivariate analyses on CSF metabolome between control and insonified groups. Score plot of principal component analysis (PCA) constructed with metabolites within the CSF metabolome after acoustically-mediated BBB opening (BBBO). Larger dots are inertial centers of ellipses (center of a sample group) plotted based on smaller dots representing each sample individually. Red dots are control samples; Blue dots are 3-h post-BBBO samples; Green dots are 2-days post-BBBO samples; Purple dots are 1-week post-BBBO samples. Two samples having the same metabolic profile will be clustered in the same dimensional space.

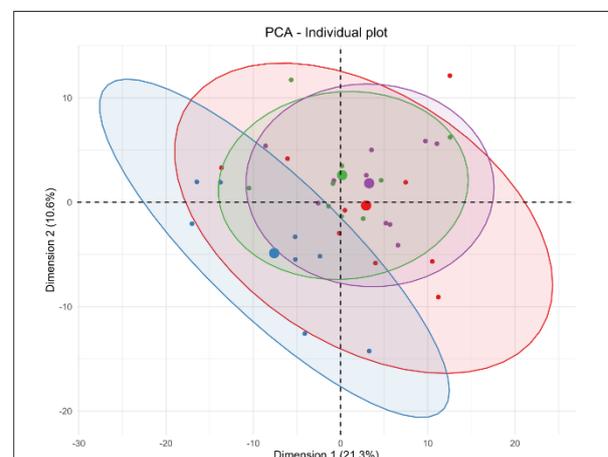


FIGURE 5 | Unsupervised multivariate analyses on blood serum metabolome between control and insonified groups. Score plot of principal component analysis (PCA) constructed with metabolites within the blood serum metabolome after acoustically-mediated BBB opening (BBBO). Larger dots are inertial centers of ellipses (center of a sample group) plotted based on smaller dots representing each sample individually. Red dots are control samples; Blue dots are 3-h post-BBBO samples; Green dots are 2-days post-BBBO samples; Purple dots are 1-week post-BBBO samples. Two samples having the same metabolic profile will be clustered in the same dimensional space.

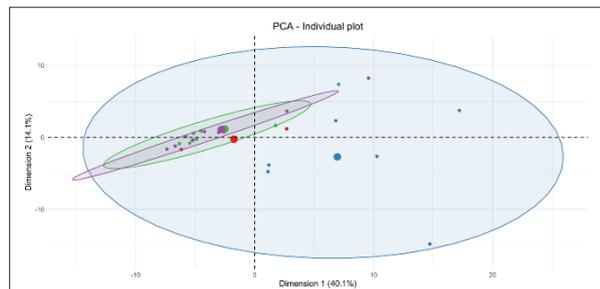


FIGURE 6 | Unsupervised multivariate analyses on urine metabolome between control and insinified groups. Score plot of principal component analysis (PCA) constructed with metabolites within the urine metabolome after acoustically-mediated BBB opening (BBBO). Larger dots are inertial centers of ellipses (center of a sample group) plotted based on smaller dots representing each sample individually. Red dots are control samples; Blue dots are 3-h post-BBBO samples; Green dots are 2-days post-BBBO samples; Purple dots are 1-week post-BBBO samples. Two samples having the same metabolic profile will be clustered in the same dimensional space.

TABLE 2 | Supervised multivariate PLS-DA models computed from metabolites found in striatum metabolome differentiating two groups.

Model	R2X	R2Y	Q2	pR2Y	pQ2	VIP > 1
Control vs. 3-h	0.410	0.988	0.767	0.15	0.05	90
3-h vs. 2-days	0.396	0.991	0.764	0.10	0.05	113
2-days vs. 1-week	0.423	0.991	0.389	0.15	0.35	84
1-week vs. Control	0.491	0.981	0.782	0.40	0.05	100
Control vs. 2-days	0.416	0.995	0.763	0.10	0.20	98
3-h vs. 1-week	0.448	0.981	0.643	0.10	0.10	100

Model is considered significant if permutation metrics (pR2Y and pQ2, corresponding to the p-value of the permutation test) are inferior to 0.05 (in bold), as well as predictive metric (Q2) is higher than 0.5. Variable importance in projection (VIP) is exploitable if and only if the predictive model is significant. Only VIP superior to 1 has been counted (VIP > 1 column).

other principal component axes (i.e., 2nd and 3rd) confirmed this metabolic profile sharing (data not shown). It was noted that the samples of the 2-days group are more heterogeneous than the other groups. Nevertheless, these two clusters of experimental groups appear to have different metabolic profiles. No supervised model using the PLS-DA method has been significantly predictive (Table 2). The statistical analysis of the intensities of metabolites identified a few dysregulated metabolic pathways in the hours and days following the BBB opening (Figure 7). Indeed, upregulation of glycine, serine, and threonine metabolism was observed between control and 3-h post-BBBO groups, but also between 3-h post-BBBO and 2-days post-BBBO groups. In addition, phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis were also upregulated between 3-h and 2-days post-BBBO groups. Finally, the most important metabolic perturbations in the striatum were observed between the control and 1-week post-BBBO groups, where glutathione metabolism, arginine biosynthesis, alanine, aspartate, and glutamate metabolism, and D-glutamine/D-glutamate metabolism, were significantly upregulated.

TABLE 3 | Supervised multivariate PLS-DA models computed from metabolites found in CSF metabolome differentiating two groups.

Model	R2X	R2Y	Q2	pR2Y	pQ2	VIP > 1
Control vs. 3-h	0.504	0.992	0.848	0.05	0.05	86
3-h vs. 2-days	0.426	0.993	0.828	0.05	0.05	80
2-days vs. 1-week	0.407	0.959	0.171	0.80	0.60	74
1-week vs. Control	0.516	0.959	0.426	0.45	0.15	94
Control vs. 2-days	0.445	0.976	0.352	0.10	0.20	93
3-h vs. 1-week	0.397	0.998	0.840	0.15	0.05	71

Model is considered significant if permutation metrics (pR2Y and pQ2, corresponding to the p-value of the permutation test) are inferior to 0.05 (in bold), as well as predictive metric (Q2) is higher than 0.5. Variable importance in projection (VIP) is exploitable if and only if the predictive model is significant. Only VIP superior to 1 has been counted (VIP > 1 column).

TABLE 4 | Supervised multivariate PLS-DA models computed from metabolites found in blood serum metabolome differentiating two groups.

Model	R2X	R2Y	Q2	pR2Y	pQ2	VIP > 1
Control vs. 3-h	0.472	0.989	0.877	0.02	0.01	120
3-h vs. 2-days	0.449	0.989	0.858	0.01	0.01	106
2-days vs. 1-week	0.269	0.901	0.426	0.90	0.60	110
1-week vs. Control	0.182	0.960	0.368	0.80	0.05	111
Control vs. 2-days	0.315	0.898	0.392	0.15	0.15	115
3-h vs. 1-week	0.452	0.990	0.859	0.05	0.05	117

Model is considered significant if permutation metrics (pR2Y and pQ2, corresponding to the p-value of the permutation test) are inferior to 0.05 (in bold), as well as predictive metric (Q2) is higher than 0.5. Variable importance in projection (VIP) is exploitable if and only if the predictive model is significant. Only VIP superior to 1 has been counted (VIP > 1 column).

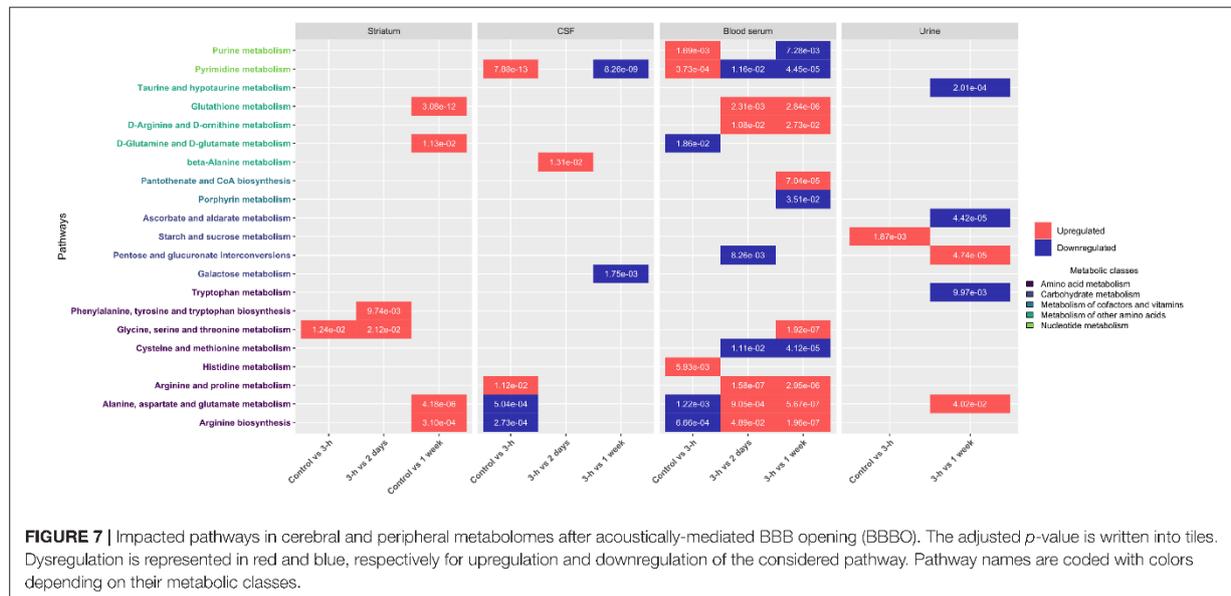
TABLE 5 | Supervised multivariate PLS-DA models computed from metabolites found in urine metabolome differentiating two groups.

Model	R2X	R2Y	Q2	pR2Y	pQ2	VIP > 1
Control vs. 3-h	0.603	0.905	0.286	1.00	0.80	53
3-h vs. 2-days	0.626	0.833	0.423	0.35	0.10	55
2-days vs. 1-week	0.612	0.910	-0.061	0.05	0.50	43
1-week vs. Control	0.706	0.981	0.532	0.05	0.25	40
Control vs. 2-days	0.659	0.969	-0.537	0.30	0.95	40
3-h vs. 1-week	0.645	0.897	0.719	0.05	0.05	48

Model is considered significant if permutation metrics (pR2Y and pQ2, corresponding to the p-value of the permutation test) are inferior to 0.05 (in bold), as well as predictive metric (Q2) is higher than 0.5. Variable importance in projection (VIP) is exploitable if and only if the predictive model is significant. Only VIP superior to 1 has been counted (VIP > 1 column).

Cerebrospinal Fluid

As shown in Figure 4, PCA on CSF metabolites explained 27.3% of the total variance on the first two components. The CSF metabolome profile shifts radically 3 h after the acoustically-mediated BBBO compared to the control condition. Then, the CSF metabolome at 2 days and 1-week post-BBBO seem to recover and shared a similar metabolite profile to the control condition. Supervised PLS-DA analyses identified two significantly predictive models, thus confirming the unsupervised PCA findings (Table 3). Indeed, significant predictive models were identified when comparing control with 3-h post-BBBO



groups and that of 3-h with 2-days post-BBBO groups. Then, univariate analyses were performed on CSF metabolites. Significantly different metabolites have been used to perform a metabolic pathway analysis as a function of post-BBBO time (Figure 7). The comparison of metabolic pathways between control and 3-h post-BBBO groups showed an upregulation of pyrimidine metabolism, arginine, and proline metabolisms, associated with a downregulation of arginine biosynthesis as well as alanine, aspartate, and glutamate metabolism. Then, an upregulation of beta-alanine metabolism occurred 2-days after BBBO. Finally, the comparative analysis of the results between 3-h and 1-week post-BBBO groups revealed the downregulation of galactose and pyrimidine metabolisms.

Blood Serum

Considering the blood serum samples of our four experimental groups, the two first components of the PCA explained 31.3% of the variance (Figure 5). On the score plot of this PCA, the blood serum metabolome profile shifts totally 3 h after BBBO compared to the control group. This metabolic profile undergoes another perturbation 2 days post-BBBO in comparison with the control group. Control and 1-week groups share the same metabolic profile. Supervised PLS-DA analyses showed three significant predictive models: control vs. 3-h post-BBBO group; 3-h post-BBBO group vs. 2-days post-BBBO group; 3-h post-BBBO group vs. 1-week post-BBBO group (Table 4). Univariate analysis of metabolite intensities in the blood serum allows determining of several significantly disrupted metabolites by the acoustically-mediated BBBO. Based on these significantly dysregulated metabolites, metabolic pathways analysis was performed and revealed that blood serum metabolome was the most disturbed biological matrices (Figure 7). The first perturbation of the blood serum metabolome was observed 3 h after BBBO in comparison with the control

group. Indeed, metabolisms of purine, pyrimidine, and histidine were significantly upregulated while alanine, aspartate, and glutamate, as well as D-glutamate/D-glutamine metabolism and arginine biosynthesis were downregulated. A second metabolic perturbation was noticed between 2 days post-BBBO and 3-h post-BBBO group. Indeed, glutathione, arginine and proline, alanine, aspartate, and glutamate metabolisms, as well as arginine biosynthesis and D-arginine and D-ornithine metabolism were upregulated, while metabolisms of pyrimidine, cysteine, and methionine along with pentose/glucuronate interconversion were downregulated. Finally, a comparative analysis of metabolic pathways between 3-h and 1-week post-BBBO groups revealed the downregulation of purine and pyrimidine metabolisms but also porphyrin metabolism, cysteine, and methionine metabolism. This comparison also highlighted the upregulation of glutathione, D-arginine and D-ornithine, glycine, serine and threonine, arginine and proline, alanine, aspartate and glutamate metabolisms, and biosynthesis of pantothenate and CoA.

Urine

Data on urine samples seem to be more heterogenous than other matrices. As shown in Figure 6, a shift of urine metabolic profile between 3-h post-BBBO group and a cluster constituted by control, 2-days, and 1-week groups was identified. By analyzing the three first components in the score plot of PCA (data not shown), these three experimental groups were always clustered together, suggesting that these groups would share the same metabolic profile. Supervised multivariate analyses showed only one significant predictive model: 3-h post-BBBO group vs. 1-week group (Table 5). However, univariate data analyses on the level of urine metabolites identified some disturbed metabolic pathways (Figure 7).

TABLE 6 | Concentrations of tryptophan derivatives in CSF samples using targeted HPLC-MS method.

Metabolites	Control	3-h	2-days	1-week	Significant
Quinolinic acid	0.021 ±0.008	0.023 ±0.007	0.017 ±0.006	0.015 ±0.005	n.s.
Serotonin	0.753 ±0.143	0.798 ±0.212	0.71 ±0.141	0.711 ±0.079	n.s.
Kynurenine	0.051 ±0.012	0.058 ±0.016	0.053 ±0.009	0.045 ±0.010	n.s.
Tryptophan	1.285 ±0.335	1.786 ±0.472	1.684 ±0.452	1.734 ±0.277	n.s.
5-hydroxyindoleacetic acid	0.499 ±0.104	0.535 ±0.071	0.739 ±0.147	0.593 ±0.122	*Control vs. 2-days *3-h vs. 2-days

Standard deviations are expressed as a mean value; n.s. means not significant for non-parametric pairwise multiple comparisons after Bonferroni p -value adjustment; * < 0.05; Groups showing significant differences are written (e.g., control vs 3-h). Concentrations are in micromolar (μ M).

TABLE 7 | Concentrations of tryptophan derivatives in blood serum samples using targeted HPLC-MS method.

Metabolites	Control	3-h	2-days	1-week	Significant
Tryptophan	8.93×10^2 $\pm 4.06 \times 10^2$	1.18×10^3 $\pm 4.47 \times 10^2$	1.05×10^3 $\pm 2.40 \times 10^2$	9.30×10^2 $\pm 2.52 \times 10^2$	n.s.
Serotonin	5.77 ± 2.84	6.82 ± 1.98	7.19 ± 1.81	6.73 ± 2.67	n.s.
Kynurenine	6.10 ± 2.28	6.91 ± 2.64	5.77 ± 2.32	4.91 ± 1.15	n.s.
3-hydroxykynurenine	2.55×10^{-2} $\pm 1.91 \times 10^{-2}$	3.45×10^{-2} $\pm 1.62 \times 10^{-2}$	1.81×10^{-2} $\pm 8.01 \times 10^{-3}$	1.66×10^{-2} $\pm 5.94 \times 10^{-3}$	*3-h vs 1 week
Kynurenic acid	2.41×10^{-1} $\pm 1.16 \times 10^{-1}$	3.08×10^{-1} $\pm 1.33 \times 10^{-1}$	1.48×10^{-1} $\pm 4.04 \times 10^{-2}$	1.76×10^{-1} $\pm 6.91 \times 10^{-2}$	*3-h vs 2-days
Quinolinic acid	7.07×10^{-1} $\pm 3.30 \times 10^{-1}$	2.17 ± 1.27	1.07 $\pm 6.52 \times 10^{-1}$	7.65×10^{-1} $\pm 3.79 \times 10^{-1}$	*Control vs 3-h *3-h vs 1-week
Indole-3-lactic acid	5.57×10^{-1} $\pm 2.74 \times 10^{-1}$	8.17×10^{-1} $\pm 2.98 \times 10^{-1}$	4.28×10^{-1} $\pm 1.58 \times 10^{-1}$	4.65×10^{-1} $\pm 1.68 \times 10^{-1}$	*3-h vs 2-days *3-h vs 1-week
Indole-3-acetic acid	1.77 $\pm 7.64 \times 10^{-1}$	9.71×10^{-1} $\pm 3.59 \times 10^{-1}$	1.49 $\pm 5.20 \times 10^{-1}$	1.17 $\pm 3.03 \times 10^{-1}$	*Control vs 3-h
5-hydroxyindoleacetic acid	2.14×10^{-1} $\pm 9.17 \times 10^{-2}$	2.59×10^{-1} $\pm 8.29 \times 10^{-2}$	1.99×10^{-1} $\pm 4.94 \times 10^{-2}$	2.05×10^{-1} $\pm 5.57 \times 10^{-2}$	n.s.

Standard deviations are specified under mean value; n.s. means not significant for non-parametric pairwise multiple comparisons after Bonferroni p -value adjustment; * < 0.05. Groups showing significant differences are writing (e.g., control vs. 3-h). Concentrations are in micromolar (μ M).

An upregulation of starch and sucrose metabolism was only observed between control and 3-h post-BBBO groups. Finally, several metabolic pathways were dysregulated between 3 h and 1 week after acoustically-mediated BBBO. Thus, the upregulated ones were alanine, aspartate, glutamate metabolism, and pentose/glucuronate interconversions. In addition, tryptophan metabolism, ascorbate, and aldarate metabolism as well as taurine and hypotaurine metabolism were significantly downregulated.

Tryptophan Derivate Dosage Reveals Transient Changes in Biological Matrices

Tryptophan (TRP) is the precursor of biosynthesis pathways of serotonin (5-HT), kynurenine (KYN), and indole derivatives. TRP and its metabolites are strongly involved in the kynurenine

pathways (KP), which play a key role in the modulation of neurotransmission and neuroinflammation, thus influencing the physiology of the CNS (Cervenka et al., 2017). Taking it into consideration, TRP metabolism was explored in the three matrices including the striatum, CSF, and blood serum using HPLC-MS (Tables 6, 7). The analysis of TRP metabolism in the striatum showed that only the concentration of 5-HT decreased up to 2 days after BBBO (57.3 ± 14.6 nmol/g) and returned to normal level 1 week post-BBBO (63.9 ± 16.1 nmol/g). In addition, the 5-hydroxy indoleacetic acid (5-HIAA) is the single TRP metabolite in CSF whose the concentration significantly increased up to 2 days (0.739 ± 0.147 μ M) after the BBBO, then returned to the control concentration (0.593 ± 0.122 μ M) 1-week post-BBBO (Table 6). As expected, changes in TRP metabolism were more pronounced in the blood serum than in the other matrices (Table 7). In fact, 3-hydroxykynurenic

(3-HK) concentration significantly decreased between 3-h (34.5 ± 16.2 nM) and 1 week (16.6 ± 0.59 nM) after BBBO. In addition, quinolinic acid (QUIN) concentration was significantly enhanced between the control group (0.7 ± 0.33 μ M) and 3-h (2.17 ± 1.27 μ M) post-BBBO group, but its concentration significantly decreased 1 week after BBBO (0.76 ± 0.38 μ M) meaning the QUIN returns to its normal level 1 week post-BBBO in the blood serum. The dosage of TRP metabolite revealed an increasing trend in kynurenic acid (KYNA) level 3 h post-BBBO but then a significant decrease is observed between 3-h (0.31 ± 0.13 μ M) and 2-days (0.14 ± 0.4 μ M) after BBBO and finally a stabilization. Furthermore, a significant reduction in indole-3-acetic acid concentration was noticed between control (1.77 ± 0.76 μ M) and 3-h (0.97 ± 0.36 μ M) post-BBBO groups, while the indole-3-lactic acid concentration significantly decreased between 3-h (0.81 ± 0.3 μ M) and 2-days (0.43 ± 0.19 μ M) post-BBBO, then increased 1 week (0.46 ± 0.17 μ M) after BBBO. We have to highlight that these observed modifications return to normal levels within 1 week after the BBBO.

DISCUSSION

The present study aimed to unravel the metabolic events following BBBO using MB-assisted US by answering the following questions: (1) How can acoustically-mediated BBBO processes trigger a global metabolic perturbation in the brain tissue and body fluids, such as the cerebrospinal fluid, the blood, and urine following BBBO? (2) Can it induce neuroinflammation? and (3) Can it potentially lead to an impairment in the neurotransmission? To achieve these goals, we performed a well-established analytical workflow using ^1H NMR spectroscopy and HPLC-MS to assess metabolite levels and quantify tryptophan derivatives involved in inflammatory and neurotransmission processes after BBBO.

Metabolism of Central, Peri-Cerebral, and Peripheral Compartments

The effects of acoustically-mediated BBBO on brain metabolism were mainly investigated using fluorodeoxyglucose (^{18}F FDG) PET/CT scan *via* the metabolism of intracerebral glucose (Yang et al., 2014; Horodyckid et al., 2017; Arif et al., 2020). Yang et al. (2014) described a reduction in ^{18}F FDG uptake in sonicated brain tissues in rats immediately and 1 week after BBBO compared to rodents not exposed to US, suggesting a decrease in the metabolism of cerebral energy supply. In contrast to these findings, our metabolomic data did not show any significant change in glucose metabolism after BBBO, indicating alternative recruitment of energetic resources. Our findings are supported by Horodyckid et al. (2017) who reported an absence of significant change in glucose metabolism in NHP 14 days after BBBO.

Importantly, all these functional imaging studies only focused on energetic metabolism in the cerebral compartment. In the present study, the metabolic signature after acoustically-mediated BBBO is reported in the cerebral compartment, but also in the peripheral zones, which, to the best of our knowledge, has never been shown before. Based on PCA analyses (Figures 3–6) and

the identification of dysregulated metabolic pathways (Figure 7), metabolic perturbations are visible in both central and peripheral matrices. However, these changes in the metabolic signature of the brain, CSF, blood serum, and urine metabolomes show specific and sequential kinetics. Indeed, our multivariate data reveal that metabolic perturbations occur in the blood serum metabolome up to 2 days after BBBO with a peak at 3 h. In the CSF, the peak of metabolic dysregulation occurs 3 h post-BBBO. Metabolic perturbations in the brain metabolome and in the urine metabolome are more latent and the perturbation peak occurs 1 week post-BBBO. These data could be explained by the rapid CSF turnover. Indeed, the CSF is renewed around 12–13 times a day, which could rapidly wipe the metabolic perturbation (Simon and Liff, 2016). In addition, the delayed response of brain tissue could be associated with the setup of compensatory mechanisms that could hide for a while the metabolic response (Hylin et al., 2017). By analyzing metabolic pathways, data showed that arginine, proline, alanine, aspartate, and glutamate metabolisms are mainly and significantly disrupted in all matrices. All these metabolic pathways are interconnected with each other. It is known that alanine, aspartate, asparagine, glutamate, and glutamine are input metabolites for arginine-associated metabolic processes, i.e., urea cycle, tricarboxylic acid cycle, and nitrogen metabolism. Arginine plays a major role in the energetic cell supply and homeostasis by regulating nitrogen levels and immune processes (Tong and Barbul, 2004). This amino acid is also the immediate precursor of nitric oxide (NO) responsible for the vasodilation of blood vessels (Wiesinger, 2001). Indeed, Raymond et al. (2007) reported short-lived vasoconstriction of the blood vessel right after sonication. Thus, NO secretion could occur in response to BBBO vasomotor effects. In addition, several metabolic pathways, namely arginine and glutamate metabolism, involved in energetic metabolism were disrupted in the blood serum and CSF metabolomes immediately after the BBBO, but also in the brain metabolome, 1 week later. Despite BBB resealing, 1 h after US exposure (Supplementary Figure S1), this study evidences that metabolic pathways in the brain, blood serum, and urine metabolomes were durably modified more than a week after BBBO. Further exploration of time points greater than a week after BBBO is warranted to fully ascertain the time to complete recovery, i.e., a metabolome fingerprint similar to that in the physiological state. Altogether, these results indicate that acoustically-mediated BBBO induces significant metabolic changes, not only in the brain tissue but also in the CSF, blood serum, and urine. Based on these multi-compartment data that show more durable effects in comparison to the standard arsenal of readout modalities, this study warrants further application of this sensitive and powerful metabolomic readout in acoustically-mediated BBBO investigations.

By comparing the kinetic of blood serum metabolome perturbations and the number of dysregulated metabolisms within the brain, CSF, and urine metabolomes, the blood serum metabolome was shown to be the most impacted matrix after acoustically-mediated BBBO. These metabolic data are consistent with recent available literature evidencing the effects of MB-assisted US on endothelial cells, thus reporting MB-assisted US-induced bioeffects in the cerebrovascular system, mainly. Indeed, Sheikov et al. (2004) explored the

biophysical mechanisms involved in acoustically-mediated BBBO on brain endothelial cells using electron microscopy techniques and reported several cytoarchitectural changes including the disruption of TJs, the formations of intercellular cleft, and the fenestration on endothelial cells. In addition, exposure of the endothelial wall to acoustically-mediated mechanical stress might induce the secretion of pro-inflammatory agents and/or biologically active molecules by the endothelium or perivascular environment, thus leading to the degradation of TJ proteins and, ultimately, BBB alteration (Cucullo et al., 2003; Brown et al., 2016). Indeed, the metabolic changes observed in our study could be attributed to intra- and inter-cellular changes at the endothelial cell level that were induced by the MB-assisted US. In this, our data support the link between the biophysical effects reported in the available literature and the metabolic changes observed in our study.

Neuroinflammation

Using PET imaging and transcriptomics, previous preclinical studies described conflicting results regarding neuroinflammation processes induced by acoustically-mediated BBBO. Sinharay et al. (2019) observed an increase in the binding of [¹⁸F]DPA-714 (a biomarker of translocator protein involved in inflammatory processes) in sonicated brain regions compared to controls, regardless of the number of sonications (i.e., 1–6) and the duration after BBBO (i.e., 24 h or 10 days). Besides, transcriptomics studies of brain tissues showed overexpression of genes associated with cytokine biosynthesis, thus demonstrating that acoustically-mediated BBBO induces neuroinflammation. This inflammation may participate in the induction and/or maintenance of BBB permeability and the resulting metabolic changes (Kovacs et al., 2017; McMahon and Hynynen, 2017; McMahon et al., 2017, 2020).

To explore further tissue inflammation after acoustically-mediated BBBO, a previously described targeted metabolomic approach using HPLC-MS was applied (Lefevre et al., 2019; Alarcán et al., 2021). We dosed the TRP derivatives, especially metabolites from the KP cascade in the brain tissue, in the CSF, and in the blood serum. KP produces several neuroactive metabolites, which are synthesized following inflammatory events (Tanaka et al., 2021). In the CSF, QUIN is synthesized by microglia or infiltrated peripheral macrophages, while KYNA is produced by astrocytes. In the periphery, the major organ where the synthesis of kynurenes occurs is the liver (Torok et al., 2020). 3-HK and 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA) are well known to induce oxidative stress and apoptosis (Cervenka et al., 2017). QUIN results in neurotoxicity by inducing excitotoxicity, free-radical formation, mitochondrial dysfunction, apoptosis or necrosis, and cytoskeletal destabilization (el-Defrawy et al., 1986). As neuroprotective compounds, picolinic acid (PIC) and KYNA inhibit excitotoxicity and modulate the immune response, respectively (Tanaka et al., 2021). TRP, 3-HK, and KYN can reach the CNS through the BBB, whereas QUIN and KYNA do not cross the BBB (Fukui et al., 1991). Our metabolomics results showed a significant increase in QUIN concentration in the blood serum metabolome 3 h after BBBO and a significant decrease in KYNA and 3-HK levels between 3-h and 2-days post-BBBO groups. These metabolic perturbations were only found

in the blood serum and not in other biological matrices (i.e., brain and CSF). These results could be ascribed (i) either to the production of these metabolites in the liver consecutively to an inflammatory injury or a classic endocrine response to stress, (ii) or to neuroinflammation and, therefore, a passage of the metabolites from the brain tissue to blood compartment through the opened BBB, or (iii) to a vascular inflammation caused by the mechanical action of oscillating MBs on the endothelial wall. This last explanation is supported by McMahon et al. (2017) who performed a transcriptomics analysis from 6 to 24 h after acoustically-mediated BBBO only on vascular endothelial cells after acoustically-mediated BBBO (McMahon and Hynynen, 2017). These authors showed significant overexpression of proinflammatory and antiapoptotic-associated genes, suggesting the initiation of vascular inflammation. This upregulation of gene expression implies the activation and/or repression of the genetic machinery, which requires the biosynthesis of metabolites, specifically nucleotides as reported in our metabolomics analysis. Indeed, this study pinpoints an upregulation of nucleotide metabolisms (i.e., purine and pyrimidine metabolisms) up to 3 h post-BBBO in the blood serum. These metabolisms return to a basal state 1 week post-BBBO. In addition, these transcriptomics data and our metabolomics results (Figure 7) are supported by Brown et al. (2016) who investigated the metabolic consequences of the exposure of an organ-on-a-chip model of the human neurovascular unit to a pro-inflammatory stimulus, defined as a cytokine cocktail. The exposure of this stimulus to the vascular compartment induced a significant increase in BBB permeability by disrupting TJs. Their metabolomics analysis revealed a significant perturbation in aspartate and asparagine, and glycine, serine, alanine, and threonine metabolisms, but also significant changes in valine, leucine, and isoleucine, tryptophan, tyrosine, and lysine metabolisms in both vascular and brain compartments. Besides, cytokine stimulus impacted the pyrimidine metabolism only in the vascular compartment. Their metabolic pathways analysis also revealed significant disruption of coenzyme A biosynthesis from pantothenate, and methionine and cysteine metabolism on the vascular side. Most of these disrupted metabolic pathways are also observed in our metabolomic data in central and peripheral metabolomes.

Altogether, these results suggest that the acoustically-mediated BBBO could induce vascular inflammation. In addition to the acoustically-mediated mechanical stress on the endothelial wall, this inflammation may contribute to the metabolic changes in the blood serum but also in other biological matrices. In our study, the absence of neuroinflammation may be explained by the lower acoustic regime applied, i.e., acoustic parameters, dose, and type of MBs, mainly, in comparison to those in previous preclinical studies (Kovacs et al., 2017; McMahon and Hynynen, 2017; McMahon et al., 2017; Sinharay et al., 2019). In our opinion, further metabolomic investigations exploring catecholaminergic derivatives, but also arachidonic acid derivatives (Wang et al., 2021) would provide key insights into the influence of the US regime and MB usage on inflammatory processes in the central (in the ipsilateral target and in its contralateral region) and peripheral compartments. These studies would provide highly detailed information on the transcriptomics profiles subsequent

to BBBO, as also initiated by McMahon and Hynynen (2017) and Kovacs et al. (2017, 2018) who clearly demonstrated that BBBO-induced inflammatory response is related to the dose of MBs; it was well-established that the bioeffects of the BBBO directly depend on BBBO regime and MB type and injection settings, such as infusion type and rate, i.e., bolus or slow injection, dose, and initial concentration. These results could be compared to complementary IHC studies using inflammation and BBB biomarkers.

Neurotransmission

To the best of our knowledge, the effects of acoustically-mediated BBBO on neurotransmission have never been investigated; this study explored these bioeffects by dosing 5-HT and its derivatives originating from the TRP metabolism by a targeted HPLC-MS approach (Lefevre et al., 2019; Alarcan et al., 2021). Indeed, the striatum is involved in dopaminergic, cholinergic, and GABAergic neurotransmissions. In addition, this functional region is widely innervated by the projections of serotonergic neurons from the dorsal raphe nucleus that are localized in the brain stem (Charnay and Leger, 2010; Nakamura, 2013). This nerve pathway is involved in the regulation of limbic processes such as behavior and mood, especially in stress response and stress-associated disorders (Waselus et al., 2006). TRP dosage in the striatum showed a significant decrease in serotonin concentration between the control and 2 days post-BBBO groups. In addition, a significant increase in the concentration of main serotonin catabolite, i.e., 5-HIAA, was detected in the CSF between 3-h and 2 days post-BBBO groups, then its concentration decreased between 2-days and 1-week groups. Of note, no significant change of these 5-HT derivatives was found in the blood serum, suggesting that these variations only occur in the central compartment and are not due to peripheral gastrointestinal 5-HT metabolism (Stasi et al., 2019). These results demonstrated an upregulation of the serotonin catabolism in our experimental conditions, thus bringing the first evidence that acoustically-mediated BBBO could disrupt serotonergic neurotransmission. As previously described with regards to tissue inflammation, our study warrants a wider use of metabolomics to explore the influence of US- and MB-related parameters on serotonergic neurotransmission. These results could be confirmed by further PET/CT studies using radiotracers dedicated to the investigation of serotonergic neurotransmission (Buchecker et al., 2020; Colom et al., 2021). In the present study, only the serotonergic neurotransmission was investigated while the striatum is also involved in GABAergic and dopaminergic neurotransmission. Hence, additional metabolomics investigations are warranted to assess the potential effects of acoustically-mediated BBBO on these specific neurotransmission pathways, but also those operating in other brain regions.

CONCLUSION

In conclusion, our multimodal and multimatrix metabolomic investigations provided the first metabolic signature related to

the acoustically-mediated BBBO within the striatum tissue and its surrounding compartments. The stronger metabolic response to the acoustically-mediated BBBO was observed in the brain vascular compartment with especially the potential presence of vascular inflammation, but also metabolic modifications of serotonergic neurotransmission pathways in the striatum. These discrepancies in metabolic profiles in all biological matrices were present up to 1 week following BBBO, but no sign of discomfort could be observed. Nevertheless, further investigations are warranted to extensively evaluate the influence of the US and MB settings on brain metabolism and neurological processes such as neuroinflammation and neurotransmission.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: MetaboLights, accession number: MTBLS4423.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Animal Care and Regional Committee for Ethics in Animal Experiments, Centre Val-de-Loire (2018011016593068) in accordance with European Directive 2010/63/EU for animal experiments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP, J-ME, and LN-D designed the experiments and wrote the manuscript. AP, EO, and SB performed the *in vivo* experiments. AM, AP, and CD prepared the biological tissue and fluids for mass spectroscopy (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. AL and CD took care of the development of MS targeted method and the MS acquisition of samples. TI provided the technical support. AP analyzed the metabolomic data. AB and PE reviewed the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

AP was the recipient of a Ph.D. fellowship from the President of Université de Tours. This work was funded by Inserm U1253, Université de Tours (J-ME and LN-D), and the Ligue Nationale Contre Le Cancer (J-ME, LN-D, and AP).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Tartu (UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France) and the “PST Animalerie” and “PST Analyses des Systèmes Biologiques” (Université de Tours, Tours,

France) for their technical support and Dr. Tronel, Dr. Serrière, Dr. Laumonnier, and Dr. Marrouillat (UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France) for fruitful discussions. We gratefully thank Dr. Derieppe (Utrecht, Netherlands) for his English proofreading.

REFERENCES

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., and Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Alarcón, H., Chaumont, R., Emond, P., Benz-De Bretagne, L., Lefevre, A., Bakkouche, S. E., et al. (2021). Some CSF kynurenine pathway intermediates associated with disease evolution in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomolecules* 11:691. doi: 10.3390/biom11050691
- Alonso, A., Reinz, E., Fatar, M., Hennerici, M. G., and Meairs, S. (2011). Clearance of albumin following ultrasound-induced blood-brain barrier opening is mediated by glial but not neuronal cells. *Brain Res.* 1411, 9–16. doi: 10.1016/j.brainres.2011.07.006
- Alshammari, T. M., Al-Hassan, A. A., Hadda, T. B., and Aljofan, M. (2015). Comparison of different serum sample extraction methods and their suitability for mass spectrometry analysis. *Saudi Pharm. J.* 23, 689–697. doi: 10.1016/j.jsps.2015.01.023
- Arif, W. M., Elsinga, P. H., Gasca-Salas, C., Versluis, M., Martínez-Fernández, R., Dierckx, R., et al. (2020). Focused ultrasound for opening blood-brain barrier and drug delivery monitored with positron emission tomography. *J. Control Release* 324, 303–316. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.05.020
- Barar, J., Rafi, M. A., Pourseif, M. M., and Omidi, Y. (2016). Blood-brain barrier transport machineries and targeted therapy of brain diseases. *Bioimpacts* 6, 225–248. doi: 10.15171/bi.2016.30
- Baseri, B., Choi, J. J., Tung, Y. S., and Konofagou, E. E. (2010). Multi-modality safety assessment of blood-brain barrier opening using focused ultrasound and definity microbubbles: a short-term study. *Ultrasound Med. Biol.* 36, 1445–1459. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2010.06.005
- Blasco, H., Corcia, P., Pradat, P. F., Bocca, C., Gordon, P. H., Veyrat-Durebex, C., et al. (2013). Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 12, 3746–3754. doi: 10.1021/pr400376e
- Brown, J. A., Codreanu, S. G., Shi, M., Sherrod, S. D., Markov, D. A., Neely, M. D., et al. (2016). Metabolic consequences of inflammatory disruption of the blood-brain barrier in an organ-on-chip model of the human neurovascular unit. *J. Neuroinflammation* 13:306. doi: 10.1186/s12974-016-0760-y
- Buechler, V., Waldron, A. M., van Dijk, R. M., Koska, I., Brendel, M., von Ungern-Sternberg, B., et al. (2020). [(18)F]MPPF and [(18)F]FDG MuPET imaging in rats: impact of transport and restraint stress. *EJNMMI Res.* 10:112. doi: 10.1186/s13550-020-00693-3
- Bulat, M., and Klarica, M. (2011). Recent insights into a new hydrodynamics of the cerebrospinal fluid. *Brain Res. Rev.* 65, 99–112. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.08.002
- Cervenka, I., Agudelo, L. Z., and Ruas, J. L. (2017). Kynurenines: tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science* 357:eaaf9794. doi: 10.1126/science.aaf9794
- Charnay, Y., and Leger, L. (2010). Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin. Neurosci.* 12, 471–487. doi: 10.31887/DCNS.2010.12.4/ycharnay
- Colom, M., Vidal, B., Fieux, S., Redoute, J., Costes, N., Lavenne, F., et al. (2021). [(18)F]F13640, a 5-HT1A receptor radiopharmaceutical sensitive to brain serotonin fluctuations. *Front. Neurosci.* 15:622423. doi: 10.3389/fnins.2021.622423
- Craig, A., Cloarec, O., Holmes, E., Nicholson, J. K., and Lindon, J. C. (2006). Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabolomic data sets. *Anal. Chem.* 78, 2262–2267. doi: 10.1021/ac0519312
- Cucullo, L., Marchi, N., Marroni, M., Fazio, V., Namura, S., and Janigro, D. (2003). Blood-brain barrier damage induces release of Alpha2-macroglobulin. *Mol. Cell. Proteomics* 2, 234–241. doi: 10.1074/mcp.M200077-MCP200
- Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7:a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412
- Dieme, B., Lefevre, A., Nadal-Desbarats, L., Galineau, L., Madji Hounoum, B., Montigny, F., et al. (2017). Workflow methodology for rat brain metabolome exploration using NMR, IC-MS and GC-MS analytical platforms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 142, 270–278. doi: 10.1016/j.jpba.2017.03.068
- Dieme, B., Mavel, S., Blasco, H., Tripi, G., Bonnet-Brilhault, F., Malvy, J., et al. (2015). Metabolomics study of urine in autism spectrum disorders using a multiplatform analytical methodology. *J. Proteome Res.* 14, 5273–5282. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00699
- Dupuy, C., Castelnaud, P., Mavel, S., Lefevre, A., Nadal-Desbarats, L., Bodard, S., et al. (2021). SHR/NCRL rats as a model of ADHD can be discriminated from controls based on their brain, blood, or urine metabolomes. *Transl. Psychiatry* 11:235. doi: 10.1038/s41398-021-01344-4
- el-Defrawy, S. R., Boegman, R. J., Jhamandas, K., and Beninger, R. J. (1986). The neurotoxic actions of quinolinic acid in the central nervous system. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64, 369–375. doi: 10.1139/y86-060
- Escoffre, J. M., Novell, A., de Smet, M., and Bouakaz, A. (2013). Focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: in vitro characterization and validation. *Phys. Med. Biol.* 58, 8135–8151. doi: 10.1088/0031-9155/58/22/8135
- Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y., and Smith, Q. R. (1991). Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J. Neurochem.* 56, 2007–2017. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb03460.x
- Gaillard, A., and Jaber, M. (2011). Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 34, 124–133. doi: 10.1016/j.tins.2011.01.003
- Gerstenmayer, M., Fella, B., Magnin, R., Selingue, E., and Larrai, B. (2018). Acoustic transmission factor through the rat skull as a function of body mass, frequency and position. *Ultrasound Med. Biol.* 44, 2336–2344. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.06.005
- Grahn, J. A., Parkinson, J. A., and Owen, A. M. (2008). The cognitive functions of the caudate nucleus. *Prog. Neurobiol.* 86, 141–155. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.004
- Horodyckid, C., Canney, M., Vignot, A., Boisgard, R., Drier, A., Huberfeld, G., et al. (2017). Safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device: a multiparametric study in a primate model. *J. Neurosurg.* 126, 1351–1361. doi: 10.3171/2016.3.JNS151635
- Hyllin, M. J., Kerr, A. L., and Holden, R. (2017). Understanding the mechanisms of recovery and/or compensation following injury. *Neural Plast.* 2017:7125057. doi: 10.1155/2017/7125057
- Ji, R., Karakatsani, M. E., Burgess, M., Smith, M., Murillo, M. F., and Konofagou, E. E. (2021). Cavitation modulated inflammatory response following focused ultrasound blood-brain barrier opening. *J. Control Release* 337, 458–471. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.07.042
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). Kegg: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D353–D361. doi: 10.1093/nar/gkw1092
- Kim, H., Park, M. A., Wang, S., Chiu, A., Fischer, K., and Yoo, S. S. (2013). PET/CT imaging evidence of FUS-mediated (18)F-FDG uptake changes in rat brain. *Med. Phys.* 40:033501. doi: 10.1118/1.4789916
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., et al. (2021). Pubchem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res.* 49, D1388–D1395. doi: 10.1093/nar/gkaa971
- Kovacs, Z. I., Burks, S. R., and Frank, J. A. (2018). Focused ultrasound to the blood microbubbles induces sterile inflammatory response proportional to the blood brain barrier opening: attention to experimental conditions. *Theranostics* 8, 2245–2248. doi: 10.7150/thno.24181
- Kovacs, Z. I., Kim, S., Jikaria, N., Qureshi, F., Milo, B., Lewis, B. K., et al. (2017). Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E75–E84. doi: 10.1073/pnas.1614777114

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2022.888318/full#supplementary-material>

- Lefevre, A., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Galineau, L., Attucci, S., Dufour, D., et al. (2019). Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. *Talanta* 195, 593–598. doi: 10.1016/j.talanta.2018.11.094
- Lefort, G., Liaubet, L., Canlet, C., Tardivel, P., Pere, M. C., Quesnel, H., et al. (2019). ASICS: an R package for a whole analysis workflow of 1D 1H NMR spectra. *Bioinformatics* 35, 4356–4363. doi: 10.1093/bioinformatics/btz248
- Lex, A., Gehlenborg, N., Strobel, H., Vuillemot, R., and Pfister, H. (2014). Upset: visualization of intersecting sets. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 20, 1983–1992. doi: 10.1109/TVCG.2014.2346248
- Liu, H. L., Wai, Y. Y., Chen, W. S., Chen, J. C., Hsu, P. H., Wu, X. Y., et al. (2008). Hemorrhage detection during focused-ultrasound induced blood-brain-barrier opening by using susceptibility-weighted magnetic resonance imaging. *Ultrasound Med. Biol.* 34, 598–606. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2008.01.011
- Mainprize, T., Lipsman, N., Huang, Y., Meng, Y., Bethune, A., Ironside, S., et al. (2019). Blood-brain barrier opening in primary brain tumors with non-invasive MR-guided focused ultrasound: a clinical safety and feasibility study. *Sci. Rep.* 9:321. doi: 10.1038/s41598-018-36340-0
- McDannold, N., Vykhodtseva, N., Raymond, S., Jolesz, F. A., and Hynynen, K. (2005). MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound Med. Biol.* 31, 1527–1537. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2005.07.010
- McMahon, D., and Hynynen, K. (2017). Acute inflammatory response following increased blood-brain barrier permeability induced by focused ultrasound is dependent on microbubble dose. *Theranostics* 7, 3989–4000. doi: 10.7150/thno.21630
- McMahon, D., Bendayan, R., and Hynynen, K. (2017). Acute effects of focused ultrasound-induced increases in blood-brain barrier permeability on rat microvascular transcriptome. *Sci. Rep.* 7:45657. doi: 10.1038/srep45657
- McMahon, D., Oakden, W., and Hynynen, K. (2020). Investigating the effects of dexamethasone on blood-brain barrier permeability and inflammatory response following focused ultrasound and microbubble exposure. *Theranostics* 10, 1604–1618. doi: 10.7150/thno.40908
- McMahon, D., Poon, C., and Hynynen, K. (2019). Evaluating the safety profile of focused ultrasound and microbubble-mediated treatments to increase blood-brain barrier permeability. *Expert Opin. Drug Deliv.* 16, 129–142. doi: 10.1080/17425247.2019.1567490
- Nakamura, K. (2013). The role of the dorsal raphe nucleus in reward-seeking behavior. *Front. Integr. Neurosci.* 7:60. doi: 10.3389/fnint.2013.00060
- Olumolade, O. O., Wang, S., Samiotaki, G., and Konofagou, E. E. (2016). Longitudinal motor and behavioral assessment of blood-brain barrier opening with transcranial focused ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 42, 2270–2282. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.05.004
- Pardridge, W. M., Oldendorf, W. H., Cancilla, P., and Frank, H. J. (1986). Blood-brain barrier: interface between internal medicine and the brain. *Ann. Intern. Med.* 105, 82–95. doi: 10.7326/0003-4819-105-1-82
- Presset, A., Bonneau, C., Kazuyoshi, S., Nadal-Desbarats, L., Mitsuyoshi, T., Bouakaz, A., et al. (2020). Endothelial cells, first target of drug delivery using microbubble-assisted ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 46, 1565–1583. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.013
- Psychogios, N., Hau, D. D., Peng, J., Guo, A. C., Mandal, R., Bouatra, S., et al. (2011). The human serum metabolome. *PLoS One* 6:e16957. doi: 10.1371/journal.pone.0016957
- Raymond, S. B., Skoch, J., Hynynen, K., and Bacska, B. J. (2007). Multiphoton imaging of Ultrasound/Optison mediated cerebrovascular effects in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 393–403. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600336
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318, 215–224. doi: 10.1007/s00441-004-0938-y
- Segal, M. B. (2000). The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20, 183–196. doi: 10.1023/a:1007045605751
- Sheikov, N., McDannold, N., Jolesz, F., Zhang, Y. Z., Tam, K., and Hynynen, K. (2006). Brain arterioles show more active vesicular transport of blood-borne tracer molecules than capillaries and venules after focused ultrasound-evoked opening of the blood-brain barrier. *Ultrasound Med. Biol.* 32, 1399–1409. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2006.05.015
- Sheikov, N., McDannold, N., Sharma, S., and Hynynen, K. (2008). Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. *Ultrasound Med. Biol.* 34, 1093–1104. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.12.015
- Sheikov, N., McDannold, N., Vykhodtseva, N., Jolesz, F., and Hynynen, K. (2004). Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.* 30, 979–989. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2004.04.010
- Simon, M. J., and Iliff, J. J. (2016). Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 442–451. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.10.014
- Sinharay, S., Tu, T. W., Kovacs, Z. I., Schreiber-Stainthorp, W., Sundby, M., Zhang, X., et al. (2019). In vivo imaging of sterile microglial activation in rat brain after disrupting the blood-brain barrier with pulsed focused ultrasound: [18f]DPA-714 PET study. *J. Neuroinflammation* 16:155. doi: 10.1186/s12974-019-1543-z
- Stasi, C., Sadalla, S., and Milani, S. (2019). The relationship between the serotonin metabolism, gut-microbiota and the gut-brain axis. *Curr. Drug Metab.* 20, 646–655. doi: 10.2174/1389200220666190725115503
- Tanaka, M., Toth, F., Polyak, H., Szabo, A., Mandi, Y., and Vecsei, L. (2021). Immune influencers in action: metabolites and enzymes of the tryptophan-kynurenine metabolic pathway. *Biomedicines* 9:734. doi: 10.3390/biomedicines9070734
- Thevenot, E. A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., and Junot, C. (2015). Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. *J. Proteome Res.* 14, 3322–3335. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00354
- Tong, B. C., and Barbul, A. (2004). Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev. Med. Chem.* 4, 823–832. doi: 10.2174/1389557043403305
- Torok, N., Tanaka, M., and Vecsei, L. (2020). Searching for peripheral biomarkers in neurodegenerative diseases: the tryptophan-kynurenine metabolic pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 21:9338. doi: 10.3390/ijms21249338
- Tsai, H. C., Chen, W. S., Insera, C., Wei, K. C., and Liu, H. L. (2018). Safety evaluation of frequent application of microbubble-enhanced focused ultrasound blood-brain-barrier opening. *Sci. Rep.* 8:17720. doi: 10.1038/s41598-018-35677-w
- Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., et al. (2021). Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct. Target Ther.* 6:94. doi: 10.1038/s41392-020-00443-w
- Waselus, M., Galvez, J. P., Valentino, R. J., and Van Bockstaele, E. J. (2006). Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum. *J. Chem. Neuroanat.* 31, 233–242. doi: 10.1016/j.jchemneu.2006.01.007
- Wiesinger, H. (2001). Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 64, 365–391. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00056-3
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vazquez-Fresno, R., et al. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 46, D608–D617. doi: 10.1093/nar/gkx1089
- Yang, F. Y., Chang, W. Y., Chen, J. C., Lee, L. C., and Hung, Y. S. (2014). Quantitative assessment of cerebral glucose metabolic rates after blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound using FDG-MicroPET. *Neuroimage* 90, 93–98. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.12.033

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

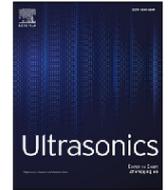
Copyright © 2022 Presset, Bodard, Lefèvre, Millet, Oujagir, Dupuy, Iazourène, Bouakaz, Emond, Escoffre and Nadal-Desbarats. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 4 : Second article en tant que co-auteur



Contents lists available at ScienceDirect

Ultrasonics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ultras

Guidelines for successful motor cortex ultrasonic neurostimulation in mice

Rasha Nouredine^{a,b}, Alexandre Surget^a, Tarik Iazourene^a, Marie Audebrand^a, Hoda Eliwa^{a,c}, Bruno Brizard^a, Mohamad Nassereddine^d, Yassine Mofid^a, Jamal Charara^d, Ayache Bouakaz^{a,*}

^a UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France

^b Lebanese University, Doctoral School of Science & Technology, Hadath, Lebanon

^c Department of Cell Biology, Medical Research Institute, Alexandria University, Egypt

^d Lebanese University, Faculty of Sciences I – Department of Physics – Electronics, Hadath, Lebanon

ARTICLE INFO

Keywords:

Ultrasound neurostimulation
Acoustic pressure
Stimulation success rates
Anesthesia

ABSTRACT

Background: Ultrasound neurostimulation (USNS) is a non-invasive neuromodulation technique that might hold promise for treating neuropsychiatric disorders with regards to its noninvasiveness, penetration depth, and high resolution.

Objective: We sought in this experimental study to provide detailed and optimized protocol and methodology for a successful ultrasonic neurostimulation of the Primary Motor Cortex (M1) in mice addressed to young researchers/students beginning their research in the field of ultrasonic neurostimulation and encountering practical challenges.

Methods: A 500 kHz single-element transducer was used for stimulating the primary motor cortex at different acoustic pressures in C57BL/6 mice at various anesthesia levels. To further illustrate the effect of anesthesia, real time visual observations of motor responses validated with video recordings as well as electromyography were employed for evaluating the success and reliability of the stimulations.

Results: Detailed experimental procedure for a successful stimulations including targeting and anesthesia is presented. Our study demonstrates that we can achieve high stimulation success rates (91 % to 100 %) at acoustic pressures ranging from 330 kPa to 550 kPa at anesthesia washout period.

Conclusions: This study shows a reliable and detailed methodology for successful USNS in mice addressed to beginners in ultrasonic brain stimulation topic. We showed an effective USNS protocol. We offered a simple and consistent non-invasive technique for locating and targeting brain zones. Moreover, we illustrated the acoustic pressure and stimulation success relationship and focused on the effect of anesthesia level for successful stimulation.

1. Introduction

Neurostimulation techniques are commonly studied in research and applied in clinical practices for the treatment of several neuropathological diseases. These techniques involve invasive methods such as vagus nerve stimulation (VNS) and deep brain stimulation (DBS), and non-invasive methods including electroconvulsive therapy (ECT), transcranial direct current stimulation (tDCS), and repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) [1]. Despite the fact that these previously mentioned well known neurostimulation techniques have been widely used in neuroscience and in the treatment of mental and motor disorders, they have specific limitations in terms of invasiveness, targeting and selectivity, or penetration depth. VNS and DBS are

invasive procedures that require complex neurosurgery and encounter surgical complications [2–3]. ECT is a non-invasive technique that entails general anesthesia [4]. Additionally, tDCS is of poor spatial resolution and limited penetration depth [1]. Moreover, rTMS provides low spatial resolution while targeting only superficial regions of interest (ROI) [5].

As per recent findings, ultrasound neurostimulation (USNS) is proposed as a promising alternative that can overcome the deficiencies of the previously mentioned neurostimulation techniques thanks to its noninvasiveness, ability to reach deep brain tissues with high resolution, and potential safety [1–6]. Various studies have reported the success of ultrasound neurostimulation in inducing motor responses when the waves are focused on the motor cortex of rodent animals [7–9–10]. The

* Corresponding author at: UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France.

E-mail address: ayache.bouakaz@univ-tours.fr (A. Bouakaz).

<https://doi.org/10.1016/j.ultras.2022.106888>

Received 30 October 2021; Received in revised form 4 October 2022; Accepted 4 November 2022

Available online 9 November 2022

0041-624X/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

majority of the studies were performed on anesthetized animals. However, anesthesia plays a significant role in inducing motor responses. Unfortunately, current studies provide only a large picture of the experimental protocols and they lack details on how to develop an efficient compromise between ultrasound neurostimulation, motor response and anesthesia level of the animals. Moreover, there exist no clear guidelines that show researchers how to simply locate and target the selected brain structure, such as locating the exact coordinates of the motor cortex, which is a very challenging phase prior to stimulation.

This study is addressed to young researchers/students who are starting ultrasonic brain stimulation and facing practical difficulties. Hence, we sought to present a detailed procedure of ultrasound neurostimulation of the motor cortex of mice. We therefore will document and evaluate the effect of the anesthesia and how to choose its level in order to achieve a successful motor response. In addition, we will demonstrate how to precisely position the ultrasound probe in order to accurately target the brain region of interest.

2. Step by step instructions

2.1. Animal preparation and anesthesia

In this study, C57BL/6 male mice were used in accordance with Directive 2010/63/EU guidelines on animal ethics. The mouse was initially anesthetized in a closed chamber with 3 % isoflurane induction delivered with oxygen at a rate of 2 L per minute for about 2 min. The anesthetic isoflurane was applied in the present study as it was commonly used in USNS research on mice [11 12]. Also, using gaseous anesthesia, it is easier to control the anesthesia of the animal in comparison to chemical anesthesia. The mouse was then suited on a plate for shaving its head while receiving 2 % isoflurane, as illustrated in Fig. 1.

Subsequently, it was rested on a heating pad within the stereotactic frame to maintain its normal body temperature. Its head was fixed with auxiliary ear bars and fitted in a face mask through which it received oxygen continuously at a rate of 2 L per minute and isoflurane at 2 % induction that maintained it fully anesthetized throughout the preparation phase of the experiment and placement of EMG electrodes. Ophthalmic ointment was placed on the eyes to keep them wet. After locating the coordinates of the region of interest in the brain, ultrasound (US) gel was applied to the shaved head and transducer was positioned approximately at 0.5 mm over the region to be stimulated. Then, isoflurane was reduced to 0 % and the mouse was allowed to habituate for 2 min until a toe pinch-response was detected signifying that an anesthesia washout period had been reached. At that point, USNS stimulation was performed as lighter anesthesia level tends to provide better motor responses following stimulation. This has been reported by other researchers [11 13] and was clearly observed in our pre-experimental tests through which reliable responses could be achieved following stimulation at anesthesia washout period, while no responses could be detected at higher anesthesia planes even within the 2 min' habituation period. Throughout the experiments, respiration rate of the mouse was monitored during mouse preparation to ensure good state of the tested mouse.

2.2. Brain stimulation setup and ultrasonic protocol

Ultrasound stimuli were generated using a single-element transducer (Imasonic, Besançon, France) with a central frequency of 500 kHz, focal length of 57.5 mm and an active diameter of 41 mm. The 500 kHz transducer was utilized in our study as it one of the commonly used transducers in USNS that showed successful and effective neurostimulation accompanied with safety assessment validation [11 7 14].

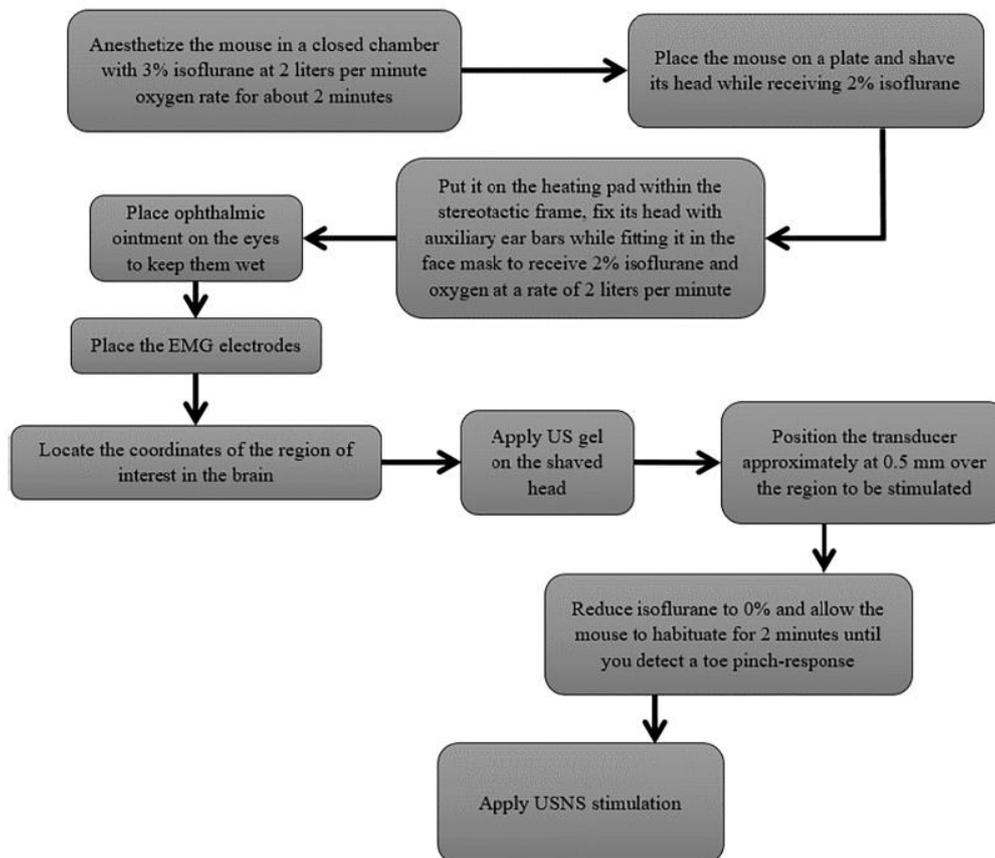


Fig. 1. Flow chart of animal preparation for USNS.

Also, in a separate study from our group, we have shown using a stress animal model that USNS at 0.5 MHz and 160 ms pulse length counteracts anxiety behavior of the animals [12]. Although a number of studies have reported on USNS of motor brain regions using different ultrasound parameters, we have selected those used in our study. The transducer was driven by an electrical signal consisting of bursts of sine waves generated from a function generator (Agilent 33250A, Santa Clara, CA, USA) and then amplified using a power amplifier (500 W ADECE, Artannes sur Indre, France) as shown in Fig. 2. The function generator was triggered by the PowerLab (ADInstrument, Australia) that was in turn controlled by the LabChart 8 software on a PC. A video camera was connected to the computer and programmed using the LabChart 8 software for recording the muscular responses during stimulation. A LED was placed within the stereotactic frame and connected to the ultrasonic emission system to allow a proper visual assessment of motor responses. The LED was triggered with the ultrasound emission and was set to last 590 ms to provide sufficient time for the visual detection of induced muscular responses. A plastic column/cone filled with degassed water was attached to the transducer and sealed with polyethylene to insure a colocation of the ultrasound focus and the targeted brain zone. The cone was designed with a circular base that matches the diameter of the transducer, an 8 mm aperture much larger than the focal spot of the transducer (3 mm) for reducing the interaction of the propagated beam with the aperture's edges, and a height that is 2 mm shorter than the focal length of the transducer. The transducer setup was settled to a 3-axis positioning system that allowed free movement of the transducer over the fixed head of the animal for precise aiming. The equipment and material used throughout the animal preparation and ultrasonic stimulation phases are summarized in Table 1 (a). A pulse of 80,000 cycles forming a pulse duration of 160 ms was used [12]. The pulse was repeated every 10 s (PRF = 0.1 Hz) to avoid blunting of the motor responses [12 7]. The choice of the selected parameters, presented in Table 1 (b), was based on previous studies performed in our group which demonstrated successful neuronal activation in mice [15 16 12].

The acoustic beam profile of the transducer was measured in a degassed water tank, using a calibrated hydrophone (ONDA, HGL-0200, Sunnyvale, CA, USA) connected to an oscilloscope (TDS 3044B, Tektronix, Beaverton, OR, USA). Ultrasound measurements were performed at the focus of the transducer in the presence of the cone and ex-vivo mouse skull. The acoustic pressures were obtained behind the mouse skull at 66 mm in the axial direction and the estimated pressure amplitudes were used in the animal experiments taking into account the attenuation effect of the skull. On the other hand, to evaluate the distortion of the beam, an independent experiment was achieved for scanning the lateral pressures behind the skull cavity using five different mouse skulls. Measurements obtained validated our lateral pressure profile and showed that a negligible beam distortion was noticed in

comparison to the measurements done without skull. Thus, no defocusing of the beam was observed, however an attenuation of the pressure amplitude was detected. The attenuation effect of the mouse skull (12 %) is taken into account in our in-vivo experiments.

2.3. EMG recordings

An electromyography (EMG) electrode was implanted in the brachioradialis muscle group of the right forelimb and another electrode was embedded between the 3rd and 4th carpometacarpal joints to obtain the EMG recordings during USNS as shown in Fig. 2 [17]. EMG electrodes were fed into a bio amplifier of the PowerLab. EMG signals were acquired and post-processed using Labchart 8. A band pass digital filter, between 300 Hz and 1 kHz, was applied to the signal. Then the absolute value with a gain of 1000 was taken [12]. Smoothing using triangular (Bartlett) window was done on 301 samples. A single-event motor evoked potential (MEP) was monitored up to a 590-msec. Averaged MEP amplitudes were then obtained for each individual regardless of motor response success.

2.4. Identification of the motor cortex coordinates

As previously mentioned in the introduction section, available USNS studies do not provide a clear procedure for non-invasively locating and targeting the brain structure or region to be stimulated. Referring to a study about the motor cortex forelimb representation in C57BL/6 mice, the stereotactic coordinates of M1 (Anterior-Posterior: -0.25 mm, Medial-Lateral = $+1.5$ mm; from the Bregma) to be stimulated were identified [18]. Thus, locating the coordinates of M1 to be stimulated in the brain depended on finding the Bregma. Localization of the Bregma was achieved using an initial identification of a hump existing at the back of the head which could be easily recognized by eye and by touch (Fig. 3). Bregma was reached reliably by moving 8 mm anteriorly from this elevation as shown in Fig. 3, with a precision of ± 0.5 mm. This average distance (8 ± 0.5 mm) was confirmed by surgical opening of 5 mice heads and validated by the success rates of our experimentation. The left primary motor cortex (M1) of the forelimbs targeted was positioned at Bregma -0.25 mm, 1.5 mm laterally to the left [18].

Detailed Procedure:

- Make sure that head of the mouse is totally fixed with the auxiliary ear bars in the stereotactic frame, and its nose and mouth are fitted inside the face mask.
- Use a small ruler and place it softly, laterally at the middle of the shaved head to form a temporary line on the skin which serves as an approximate reference for the midline of the brain.

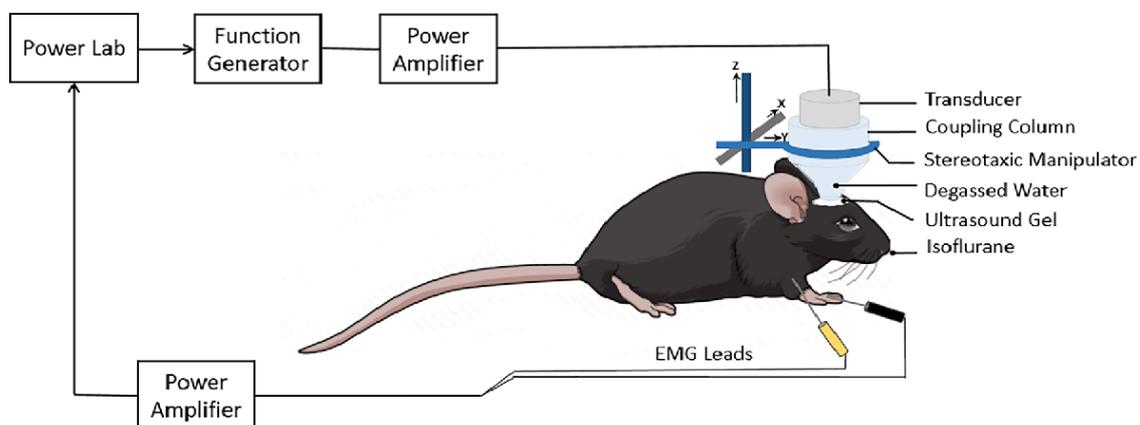


Fig. 2. Brain stimulation setup for USNS of the primary motor cortex (M1) with EMG leads connected to the right forelimb for EMG recordings.

Table 1

Ultrasonic stimulation of mouse brain. (a) Equipment and material, and (b) settings needed for USNS.

Equipment and Material	Ultrasonic Parameters
Anesthesia Machine	Frequency = 500 kHz
Two stereotactic frames each with auxiliary ear bars, built-in face mask, heating pad, and 3-axis positioning system	Number of cycles = 80,000
Function generator	Acoustic pressure = 330 kPa
Agilent 33250A, Santa Clara, CA, USA	Pulse duration = 160 ms
Power amplifier	Pulse repetition frequency (PRF) = 0.1 Hz
500 W ADECE, Artannes sur Indre, France	Stimulation duration = 10 minutes
PowerLab	
ADInstrument, Australia	
Computer	
Video camera	
Single-element transducer	
500 kHz central frequency, 57.5 mm focal length, and 41 mm active diameter / Imasonic, Besançon, France	
Plastic column/cone sealed with polyethylene	
Closed chamber	
Plate with built-in face mask	
EMG electrodes	
LED	
LabChart 8 software	
Isoflurane	
Degassed water	
Ultrasound gel	
Shaving cream	
Ophthalmic ointment	

b

a

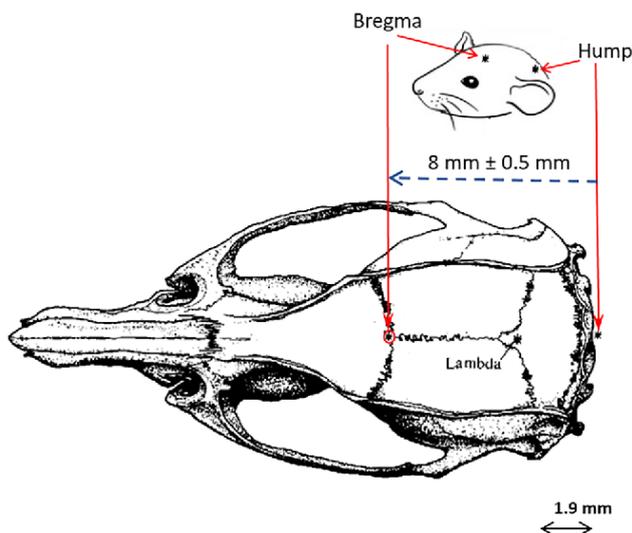


Fig. 3. Schematic diagram for identifying hump and locating Bregma in a mouse head.

- Attach a needle to the cone. Move the needle laterally and in the anterior-posterior directions using the corresponding knobs within the 3-axis positioning system and place it above any point of the drawn reference. Move the needle down using the knob which correlates to the up-down direction until it softly contact the reference for further visual validation. Record the lateral coordinate. Make sure to move the needle up at this stage after noting the coordinate to avoid harming the skin during further movements of the needle.

- Identify visually and through touching the location of the hump. Move the needle in the posterior direction and place it on the hump. Move the needle down until it softly contact the hump for further visual validation that the needle is placed at the point of intersection of the hump and reference line. Write down the coordinates in three directions.
- Move the needle up until it appears clearly that the needle end is totally above the head and will not come in contact with the skin surface during movement. Use the knob that correlates with the anterior direction, and move the needle 8 mm anteriorly to reach Bregma. Refer to Fig. 3.
- From Bregma, move posteriorly by 0.25 mm and laterally by 1.5 mm to the left to reach the left M1.
- After locating the region of interest, move the needle down until it softly comes in contact with the skin to make a temporary soft mark on the skin.
- Using the same knob that corresponds to the up-down direction, move the needle up enough to be able to disconnect it from the cone.
- Place degassed US gel on the area to be stimulated. It is better to put gel enough to totally cover the shaved area. Using the same knob, move the transducer with the cone down until the cone is approximately at 0.5 mm over the region to be stimulated.

3. Ultrasonic neurostimulation

3.1. USNS for studying the effect of anesthesia on motor responses

Mice aged 4 weeks received USNS at the left M1 at three different acoustic pressures (220, 330 and 440 kPa) at 0.5 % isoflurane and anesthesia washout period noting that the anesthesia machine used had

a precision of 0.5 %. 3 pulses, 0.1 Hz PRF, were delivered at each acoustic pressure step. EMG signals elicited from the right forelimb were used to evaluate the impact of anesthesia level on the motor responses.

Fig. 4 (a) shows the raw EMG signals detected from the right forelimb following USNS for the 3 different mice (numbered in ascending order from top to bottom) at 220, 330 and 440 kPa, and at 0.5 % isoflurane and anesthesia washout period. The red spikes present the sync pulses of stimulation and the green traces represent the EMG signals. At 0.5 % isoflurane, out of 9 stimulations, mouse 1 showed no response at all at the 3 pressures used, mouse 2 displayed 2 responses only at 440 kPa, and mouse 3 exhibited 6 responses at 330 and 440 kPa. However, at the anesthesia washout period and out of 9 stimulations, mouse 1 demonstrated 6 responses starting at 330 kPa, and mice 2 and 3 showed 9 responses starting from 220 kPa. The results obtained demonstrate that more motor responses were achieved at lower acoustic pressures at the anesthesia washout period.

The averaged amplitude of the elicited EMG signals was assessed at different acoustic pressures (220, 330 and 440 kPa) and anesthesia levels (0.5 % isoflurane and anesthesia washout period) for the 3 tested mice as displayed in Fig. 4 (b). Our results found effects of acoustic pressures ($F(2, 16) = 3.88$, $p = 0.042$) and anesthesia levels ($F(1, 8) = 17.80$, $p = 0.002$) on the amplitudes of EMG signals. At 0.5 % isoflurane,

the amplitude of the EMG signals detected increased with increasing the acoustic pressure with 5.3 ± 0.97 mV at 220 kPa, 25 ± 20.6 mV at 330 kPa, and 38 ± 29.5 mV at 440 kPa. However, at anesthesia washout period, the amplitude of the elicited EMG signals were higher than that obtained at 0.5 % isoflurane, with 57 ± 30.5 mV at 220 kPa, 93.4 ± 43.7 mV at 330 kPa, and 83 ± 34 mV at 440 kPa. Also, at anesthesia washout period, the amplitude of the EMG signals increased with increasing the acoustic pressure from 220 to 330 kPa, but it then slightly declined with continuous pressure increase at 440 kPa which might be related to neuron saturation.

3.2. USNS for evaluating the impact of pressure on success rate for motor cortex stimulation

10 mice aged 4 weeks were stimulated at M1 at anesthesia washout period. The applied peak negative acoustic pressure was varied from 55 kPa to 550 kPa with a step of 55 kPa. 10 pulses, 10 s apart, were delivered at each acoustic pressure step. Success and reliability of the stimulation was assessed by real time visual observation of muscular responses at the left forelimb confirmed by the video records, and through EMG elicited from the right forelimb. Forelimb movements were counted as motor responses only if they happened during LED

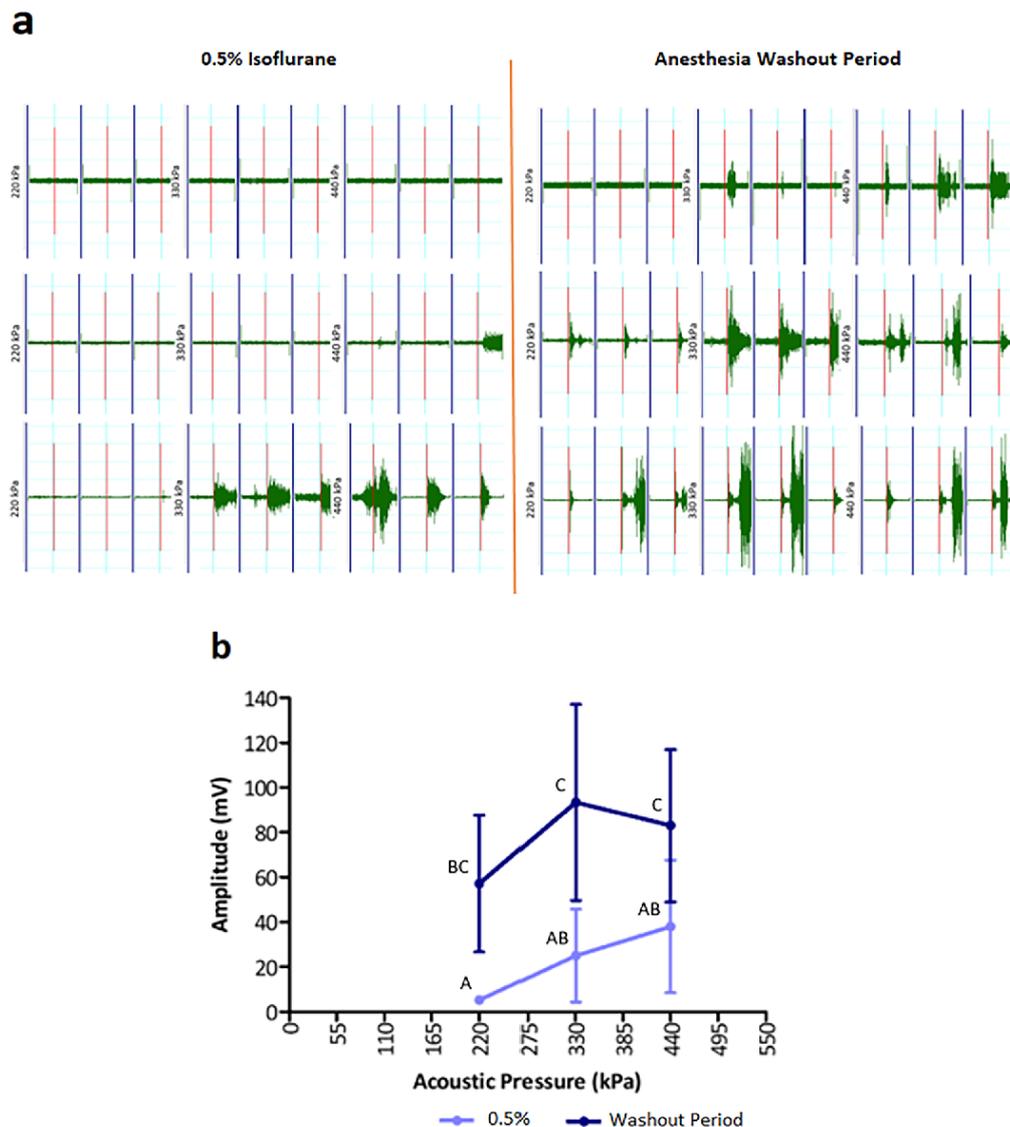


Fig. 4. USNS targeting primary motor cortex induced motor response depending on anesthesia level. Motor responses following USNS of the left primary motor cortex were estimated by electromyography through (a) visual detection of a signal and (b) evaluation of the averaged amplitude according to acoustic pressure and anesthesia level. Results in (b) represent mean \pm SEM ($n = 3$ mice). Post-hoc test according to Benjamini-Hochberg correction procedure: groups sharing a same letter were not significantly different (A-C).

lightening. Thus, the LED helped in appropriately differentiating ultrasonic evoked movements from spontaneous movements.

The success rate was defined as the ratio of the detected number of muscular responses divided by the total number of applied stimulations and expressed in percentage. The muscular responses counted included any muscular movements at the left forelimb directly following USNS (within the LED lightening) regardless of its strength. The success rate of motor responses detected visually at different acoustic pressures was averaged for all animals and displayed in Fig. 5 (a). The success rate significantly increased depending on the acoustic pressure (repeated-measure ANOVA: $F(9, 81) = 26.01$, $p = 0.0001$; see posthoc group differences on Fig. 5 (a)) until it reached its peak at 385 kPa and then it weakly reduced with continuous pressure increase. At the lowest acoustic pressure (55 kPa), a total failure of motor responses (1 % success rate) was observed. A 50 % success rate appeared at 198 kPa. High-success rates (>91 %) were achieved from 330 kPa (91 ± 0.18 %) to 550 kPa (93 ± 0.18 %) while having the highest possible success rate of 100 % at 385 kPa. The success rate of detecting EMG signals in response to USNS stimulation was averaged and significantly increased depending on the acoustic pressure (repeated-measure ANOVA: $F(9, 81) = 28$, $p = 0.0001$; see posthoc group differences on Fig. 5 (b)). An EMG signal was noted to confirm the existence of muscular response at the right upper limb regardless of its strength. Similarly, success rates increased with increasing the acoustic pressure till 385 kPa followed by a slight decline with continuous pressure increase. A total failure of motor responses (1 % success rate) was noticed at the lowest acoustic pressure (55 kPa). A 49 % success rate appeared at 165 kPa. High-success rates (>92 %) were obtained from 330 kPa to 550 kPa with the highest possible success rate of 100 % at 385 kPa. Fig. 5 (c) shows the amplitude of the detected EMG signals at different acoustic pressures. Elicited EMG signals varied in amplitude at different stimulus pressures, with an increased EMG amplitudes depending on acoustic pressures (repeated-measure ANOVA: $F(9, 81) = 3.48$, $p = 0.001$; see posthoc group differences on Fig. 5 (c)). The result was considered significant when P-value was less than 0.05.

4. Discussion

Our results confirm others reports who showed that the success of motor cortex stimulation decreases with increasing anesthesia levels [11 19 20 13 21]. A significant difference was observed in the number and the amplitude of the EMG signals detected at 0.5 % compared to anesthesia washout period, i.e. much more motor responses detected at lower pressures with much higher amplitudes at anesthesia washout period compared to 0.5 %. Since the EMG signals obtained displayed major variation between 0.5 % isoflurane and anesthesia washout period, it was not necessary needed to study the EMG signals at higher anesthesia levels especially that very limited and even null motor responses have been noticed during our pre-experimental trials examined at higher levels of 1 to 2 %. However, further investigation about the effect of anesthesia levels in the range of 0 to 0.5 % with higher precision (such as 0.1 %) could be achieved in the future.

The success rate of motor responses detected visually was fit into a sigmoidal curve till 385 kPa, following the intensity-response relationship [11]. However, a decline of the success rate was observed at pressures higher than 385 kPa, which might be ascribed to neuron saturation. Normally, the neuron response increases with acoustic pressure until the response reaches saturation [22 23 24]. This nerve saturation could be related to the acoustic pressure or stimulation duration [25]. EMG recordings detected at the right forelimb confirmed the experimental results of success rates obtained visually which increased with increasing acoustic pressure till 385 kPa followed by slight decline with continuous pressure increase. However, 49 % success rate of motor responses appeared at 165 kPa and 64 % at 220 kPa, in contrary to the visual observation that showed 41 % success rate at 165 kPa and 55 % at 220 kPa. This can be due to muscular contractions of small amplitude that were recorded on the EMG while could not be visually detected and distinguished. The decline of the success rate observed at pressures higher than 385 kPa might be also linked to neuron saturation. Visual observations and EMG recordings showed increased stimulus success and reliability at the pressures ranging from

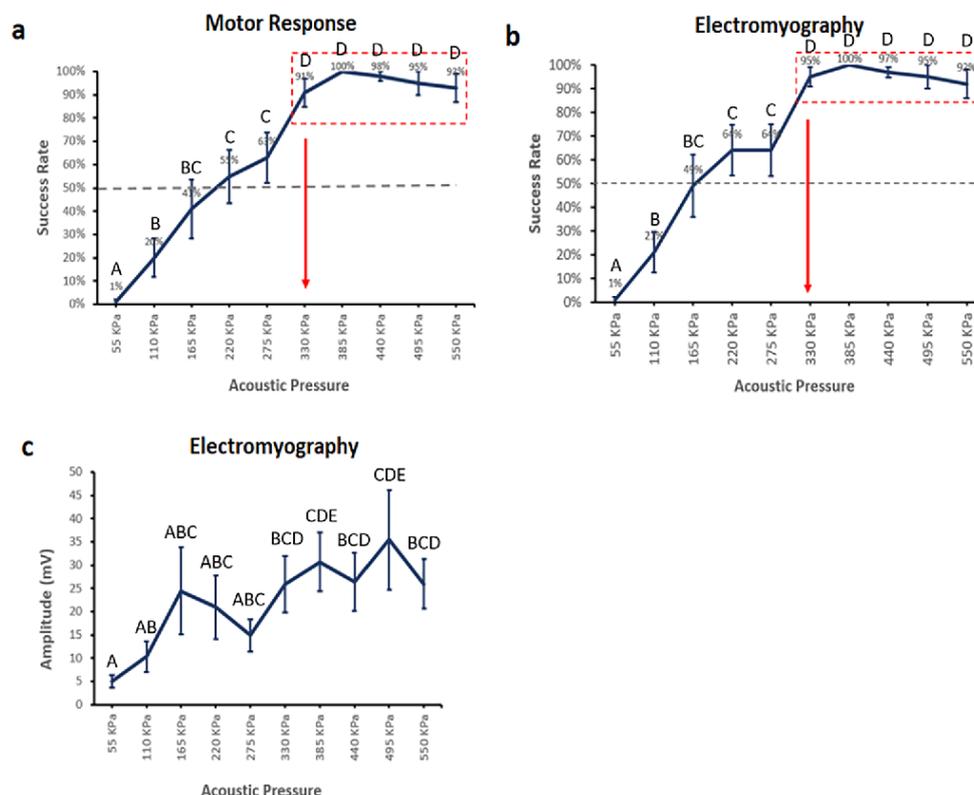


Fig. 5. USNS targeting primary motor cortex induced motor response depending on acoustic pressure. Motor responses following USNS of the left primary motor cortex were estimated by (a) visual detection by experimenter (expressed by averaged success rates according to acoustic pressure) and by electromyography through (b) visual observation of signals (expressed by averaged success rates according to acoustic pressure) and (c) evaluation of averaged amplitude according to acoustic pressure. Results represent mean ± SEM (n = 10 mice). Post-hoc test according to Benjamini-Hochberg correction procedure: groups sharing a same letter were not significantly different (A-E).

330 kPa to 550 kPa. However, elicited EMG signals varied in amplitude during different stimulus pressures. The motor responses detected appeared to be an all-or nothing phenomenon, i.e. stronger stimulus pressure increased the probability of a motor response without affecting the amplitude of the response confirming King's work [11].

The maximum peak negative pressure (PNP) used in this study was 550 kPa (MI 0.8, I_{spta} 155 mW/cm²). Thus, the MI and I_{spta} values used were far below the limits fixed by the FDA for the use of ultrasound on the brain, i.e., MI = 1.9 and I_{spta} = 720 mW/cm² [6]. Furthermore, no safety issues have been reported in literature in USNS studies with higher intensities than the one used in our project [2616]. Therefore, we believe that the USNS applied in this study did not induce harm to the mice brain. However, further safety investigations on the impacts of ultrasound on the brain should be done.

5. Conclusion

Our study shows an effective protocol for ultrasound neuromodulation in preclinical research. We presented a detailed and reliable methodology for successful USNS in mice directed to young students and beginners who are starting in the brain stimulation field and encountering practical challenges. Additionally, we offered a simple and reliable non-invasive method for locating and targeting brain regions in mice. Moreover, we validated that high success of USNS could be achieved at pressures ranging from 330 to 550 kPa and anesthesia washout period. Finally, using the described experimental protocol, we are interested in testing this approach in stimulating another brain regions, such as the anterior cingulate cortex that is known to be involved in various psychiatric diseases such as autism spectrum disorder [27] and major depression [28].

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

We acknowledge Arnaud Cressant and Pascal Barone for their cooperation.

Funding

This work was supported by the Walid Joumblatt Foundation for University Studies and by ANR grant ANR-18-CE19-0006 (ANR DEPEC).

Ethical statement

This study was approved by comité d'éthique Val de Loire N° 19, and validated by Ministry of Higher Education, Research and Innovation.

Disclosure

None.

References

- [1] E. Rezaayat, I. Toostani, A Review on Brain Stimulation Using Low Intensity Focused Ultrasound, *Basic and Clinical Neuroscience* 7 (3) (2016) 187–194.
- [2] Y. Jin and J. Kong, "Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation: A Promising Method for Treatment of Autism Spectrum Disorders," *Front Neurosci*, vol. 10, no. 609, 2016.
- [3] J. Bronstein, M. Tagliati, R. Alterman, A. Lozano, J. Volkman, A. Stefani, F. Horak, M. Okun, K. Foote, P. Krack, R. Pahwa, J. Henderson, M. Hariz, R. Bakay, A. Rezaei, W. Marks Jr, Deep Brain Stimulation for Parkinson Disease: An Expert Consensus and Review of Key Issues, *Arch Neurol* 68 (2) (February 2011) 165.
- [4] T. Kim, J.E. Ryu, G.H. Bahn, Brain Stimulation and Modulation for Autism Spectrum Disorder, *Hanyang Med Rev* 36 (2016) 65–71.
- [5] A. Bystritsky, A. Korb, P. Douglas, M. Cohen, W. Melega, A. Mulgaonkar, A. DeSalles, B.-K. Min, S.-S. Yoo, A Review of Low-Intensity Focused Ultrasound Pulsation, *Brain Stimul* 4 (3) (2011) 125–136.
- [6] H. Baek, K.J. Park, H. Kim, A Review of Low-Intensity Focused Ultrasound for Neuromodulation, *Biomed Eng Lett* 7 (2) (2017) 135–142.
- [7] Y. Tufail, A. Matyushov, N. Baldwin, M. Tauchmann, J. Georges, A. Yoshihiro, S. Helms Tillery, W. Tyler, Transcranial Pulsed Ultrasound Stimulates Intact Brain Circuits, *Neuron* 66 (5) (2010) 681–694.
- [8] S.-S. Yoo, H. Kim, E. Filandrianos, S. J. Taghados and S. Park, "Non-Invasive Brain-to-Brain Interface (BBI): Establishing Functional Links between Two Brains," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013.
- [9] H. Kamimura, S. Wanga, H. Chena, Q. Wang, C. Aurup, K. Fan, A. Carneiro, E. Konofagou, Ipsi- and Contralateral Motor Response Using Ultrasound-induced Neurostimulation in Deeply Anesthetized Mice, *Physics Procedia* 70 (2015) 1212–1215.
- [10] Z. Cui, D. Li, Y. Feng, T. Xu, S. Wu, Y. Li, A. Bouakaz, M. Wan, S. Zhang, Enhanced Neuronal Activity in Mouse Motor Cortex with Microbubbles' Oscillations by Transcranial Focused Ultrasound Stimulation, *Ultrasonics Sonochemistry* 59 (2019).
- [11] R. King, J. Brown, W. Newsome, K.B. Pauly, Effective Parameters for Ultrasound-Induced In Vivo Neurostimulation, *Ultrasonics in Medicine & Biology* 39 (2) (2013) 312–331.
- [12] M. Legrand, L. Galineau, A. Novell, B. Planchez, B. Brizard, S. Leman, C. Tauber, J.-M. Escoffre, A. Lefevre, P. Gosset, W. El-Hage, P. Emond, C. Belzung and A. Bouakaz, "Efficacy of Chronic Ultrasound Neurostimulation on Behaviors and Distributed Brain Metabolism in Depressive-Like Mice," *bioRxiv*, 2019.
- [13] Y. Tufail, A. Yoshihiro, S. Pati, M. Li, W. Tyler, Ultrasonic Neuromodulation by Brain Stimulation with Transcranial Ultrasound, *Nat Protoc* 6 (9) (2011) 1453–1470.
- [14] J. Blackmore, S. Shrivastava, J. Sallet, C. Butler, R. Cleveland, Ultrasound Neuromodulation: A Review of Results, Mechanisms and Safety, *Ultrasonics Med Biol* 45 (7) (2019) 1509–1536.
- [15] T. Iazourene, H. Malloul, E. Oujagir, J.-M. Escoffre and A. Bouakaz, "Characterization of Ultrasound Neurostimulation in Mice," in *IEEE International Ultrasonic Symposium (IUS)*, Las Vegas, 2020.
- [16] T. Iazourene, H. Malloul, R.M. Noureddine, E. Oujagir, J.-M. Escoffre, A. Bouakaz, Ultrasound Neurostimulation in Mice: Impact of Ultrasound Settings and Beam Properties, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 69 (3) (2022) 1053–1063.
- [17] M. Legrand, R. Troubat, B. Brizard, A.-M. Le Guisquet, C. Belzung, W. El-Hage, Prefrontal Cortex rTMS Reverses Behavioral Impairments and Differentially Activates c-Fos in A Mouse Model of Post-Traumatic Stress Disorder, *Brain Stimul* 12 (1) (2019) 87–95.
- [18] K. Tennant, D. Adkins, N. Donlan, A. Asay, N. Thomas, J. Kleim, Jones and Theresa, "The Organization of the Forelimb Representation of the C57BL/6 Mouse Motor Cortex as Defined by Intracortical Microstimulation and Cytoarchitecture," *Cereb Cortex* 21 (4) (2011) 865–876.
- [19] W. Lee, P. Croce, R. Margolin, A. Cammalleri, K. Yoon and S.-S. Yoo, "Transcranial Focused Ultrasound Stimulation of Motor Cortical Areas in Freely-Moving Awake Rats," *BMC Neurosci*, vol. 19, no. 57, 2018.
- [20] Y. Younan, T. Deffieux, B. Larrat, M. Fink, M. Tanter and J.-F. Aubry, "Influence of The Pressure Field Distribution in Transcranial Ultrasonic Neurostimulation," *Med Phys*, vol. 40, no. 8, 2013.
- [21] Y. Yuan, X. Wang, J. Yan and X. Li, "The Effect of Anesthetic Dose on The Motor Response Induced by Low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulation," *BMC Neurosci*, vol. 19, no. 78, 2018.
- [22] M. Menz, Ö. Oralkan, P. Khuri-Yakub, S. Baccus, Precise Neural Stimulation in the Retina Using Focused Ultrasound, *J Neurosci* 33 (10) (2013) 4550–4560.
- [23] P.-A. Lo, K. Huang, Q. Zhou, M. Humayun, L. Yue, Ultrasonic Retinal Neuromodulation and Acoustic Retinal Prosthesis, *Micromachines (Basel)* 11 (10) (2020) 929.
- [24] M. Menz, P. Ye, K. Firouzi, A. Nikoozadeh, K.B. Pauly, P. Khuri-Yakub, S. Baccus, Radiation Force as a Physical Mechanism for Ultrasonic Neurostimulation of the Ex Vivo Retina, *J Neurosci* 39 (32) (2019) 6251–6264.
- [25] J. Vion, "Study of the Mechanisms Underlying Neurostimulation Induced by Low-Energy Pulsed Ultrasound : Towards Approaches for the Management of Cancer-Related Chronic Pain," Lyon, 2019.
- [26] C. Pasquinelli, L. Hanson, H. Siebner, H. Lee, A. Thielscher, Safety of transcranial focused ultrasound stimulation: A Systematic Review of The State of Knowledge from Both Human and Animal Studies, *Brain Stimulation* 12 (6) (2019) 1367–1380.
- [27] R. Kana, T. Keller, N. Minshew, M. Just, Inhibitory Control in High-Functioning Autism: Decreased Activation and Underconnectivity in Inhibition Networks, *Biol Psychiatry* 62 (3) (2007) 198–206.
- [28] D. Pizzagalli, R. Pascual-Marqui, J. Nitschke, T. Oakes, C. Larson, H. Abercrombie, S. Schaefer, J. Koger, R. Benca, R. Davidson, Anterior Cingulate Activity as A Predictor of Degree of Treatment Response in Major Depression: Evidence from Brain Electrical Tomography Analysis, *Am J Psychiatry* 158 (3) (2001) 405–415.

Tarik IAZOURENE

Influence de paramètres acoustiques sur l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore : dispositif expérimental et étude préclinique

Résumé :

Les maladies neuropsychiatriques, neurodéveloppementales et neurodégénératives constituent un problème de santé publique majeur de nos jours. Les thérapies médicamenteuses, lorsqu'elles existent, se caractérisent par des taux de résistance élevés pour plusieurs de ces maladies. La recherche s'est ainsi orientée vers des techniques de stimulation cérébrale ( lectrique ou magnétique), qui présentent cependant de sérieuses limitations. Ainsi, la neurostimulation ultrasonore, qui est dépourvue de ces limitations, constitue une alternative prometteuse. Néanmoins, cette technique nécessite une optimisation des paramètres acoustiques à utiliser. Dans ce contexte, cette thèse s'est fixée pour objectif d'étudier l'influence de certains de ces paramètres (fréquence, pic négatif de pression, durée d'impulsion ultrasonore – DI, et diamètre de tâche focale) sur l'efficacité de la neurostimulation ultrasonore. A cet effet, le cortex moteur primaire de souris a été ciblé avec des ultrasons, et les réponses motrices ainsi générées ont été évaluées, visuellement et par électromyographie. Une étude immunohistochimique (c-Fos) a aussi été menée, afin d'évaluer l'impact de cette stimulation sur l'activation neurale. Les résultats ont démontré une influence conjuguée de différents paramètres acoustiques sur l'efficacité de la technique et sur l'activation neurale, mettant en avant l'importance du choix de la fréquence et des caractéristiques géométriques de la sonde ultrasonore. Aussi, ils ont montré que l'utilisation d'une basse fréquence (0,5 MHz) ou d'une longue DI (320 ms) permet d'obtenir des réponses plus robustes. Cependant, il s'avère que le choix des paramètres acoustiques optimaux dépend de l'utilisation de la technique souhaitée. Enfin, une étude de faisabilité de la neurostimulation ultrasonore sur la brebis a été effectuée, posant les bases de futures études d'optimisation et de validation sur ce sujet.

Mots clés : Neurostimulation ultrasonore, paramètres acoustiques, étude préclinique.

Abstract :

Neuropsychiatric, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders constitute a major public health issue nowadays. Drug therapies, when available, face high resistance levels for many of these diseases. Thus, research has investigated brain stimulation techniques (electrical or magnetic), which have, however, serious limitations. Thereby, ultrasound neurostimulation (USNS), which is free of those limitations, appears to be a promising alternative. Nevertheless, this technique still needs an optimization of the acoustic parameters to use. In this context, the objective of this thesis is to study the influence of some of these parameters (frequency, peak negative pressure, pulse duration – PD, and focal spot diameter) on the efficacy of USNS. To do so, the primary motor cortex of mice was targeted with ultrasound, and the elicited motor responses were evaluated visually and with electromyography. Also, immunohistochemistry (c-Fos) was used to determine the impact of the stimulation on neural activation. The results showed a combined influence of different parameters on the efficacy of USNS and on neural activation, highlighting the importance of choosing well the frequency and the geometrical features of the used ultrasonic probe. Moreover, they showed that the use of a low frequency (0.5 MHz) or a long PD (320 ms) allowed the occurrence of more robust motor responses. However, it appeared that choosing the optimal parameters depends on the desired application of the technique. Finally, a feasibility study of USNS on sheep was conducted, which paved the way for future optimization and validation studies on this subject.

Keywords : Ultrasound neurostimulation, acoustic parameters, preclinical study.