

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant
Inserm UMR930, équipe 5 « Imagerie et Ultrasons »

THÈSE présentée par : Chloé ARTHUIS née FOUCHÉ

soutenue le : 05 Décembre 2016

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

Etude de la perfusion placentaire par imagerie fonctionnelle sur un modèle murin de retard de croissance intra-utérin

THÈSE dirigée par :

Monsieur PERROTIN Franck
Monsieur BOUAKAZ Ayache

Professeur, université de Tours
Directeur de recherche, Inserm Université de Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur LUCIDARME Olivier
Monsieur MOREL Olivier

Professeur, Université de Paris
Professeur, Université de Nancy

JURY :

Madame ALISON Marianne
Monsieur BOUAKAZ Ayache
Monsieur LUCIDARME Olivier
Monsieur MOREL Olivier
Monsieur PATAT Frédéric
Monsieur PERROTIN Franck
Monsieur WINER Norbert

Maître de Conférences, Université de Paris
Directeur de recherche, Inserm Université de Tours
Professeur, Université de Paris
Professeur, Université de Nancy
Professeur, Université de Tours
Professeur, université de Tours
Professeur, Université de Nantes

Cette thèse a été préparée au sein de l'équipe 5 « Imagerie et Ultrasons » de l'unité INSERM

UMR 930 « Imagerie et Cerveau »

Directeur : Ayache BOUAKAZ

Adresse : Université François Rabelais, 10 Boulevard Tonnellé 37000 Tours, France.

Téléphone : 02 47 36 63 51.

Avec la participation du Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 – CNRS,

Plateforme d'IRM

Adresse : Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France

Téléphone : 02 38 25 55 40

Directeur : Eva JAKAB TOTH

Responsable scientifique : Sandra MÊME

Avec la participation du Centre d'Imagerie du Petit Animal (CIPA), UPS 44-CNRS,

PHENOMIN TAAM, Orléans, France

Adresse : Site du CNRS, 45100 Orléans, France

Directeur scientifique : Alain LEPAPE

Responsable du CIPA : Stéphanie LERONDEL

Financement :

*Bourse de la société Française de Médecine Périnatale, Financement INSERM, Financement
CNRS*

Avec le partenariat de Bracco

*L'ensemble des expérimentations et résultats présentés dans ce travail ont été obtenus et
analysés par Chloé Arthuis avec l'aide de l'ensemble des équipes participant au projet.*

*A mes Parents,
A Guillaume, Gabriel et Philippine,*

Remerciements

Je remercie Monsieur le Professeur **Olivier LUCIDARME** ainsi que Monsieur le Professeur **Olivier MOREL** qui me font l'honneur de me consacrer de leur temps précieux afin d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie aussi Monsieur le Professeur **Frédéric PATAT**, Monsieur le Professeur **Norbert WINER** et Madame le Docteur **Marianne ALISON** qui ont accepté, en faisant partie des Membres du Jury, d'évaluer ce travail.

Je remercie Monsieur **Ayache BOUAKAZ** et Monsieur le Professeur **Franck PERROTIN** de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 5 de l'INSERM U930 et de m'avoir confié ce travail de thèse.

Je remercie Monsieur **Anthony NOVELL** et Monsieur **Jean-Michel ESCOFFRE** de m'avoir soutenu tout au long de ce travail. L'aide que vous m'avez apporté pour chacune de ces expérimentations ainsi que les longues discussions techniques et méthodologiques ont été très précieuses.

Je remercie Madame **Sandra MEME** et Monsieur **William MEME** pour leur très grand investissement dans ce projet au sein du Centre de Biologie Moléculaire du CNRS d'Orléans.

Je remercie Monsieur le Docteur **Alain LEPAPE**, Madame **Stéphanie LERONDEL** et Monsieur **Florian RAES** de m'avoir accueillie au sein du Centre d'Imagerie du Petit Animal du CNRS d'Orléans.

Je remercie Madame le Docteur **Emmanuelle BLANCHARD-LAUMONNIER**, Madame **Sonia GEORGEAULT**, Madame le Docteur **Cécilia ROUSSELOT**, Madame **Lydie NADAL-DESBARATS** pour les discussions autour de l'histologie du placenta et leur investissement dans ce projet au sein de la plateforme de microscopie et de l'équipe 2 « Neurogénétique et Neurométabolome » de l'INSERM UMR 930.

Je remercie Monsieur le Professeur **François TRANQUART** pour son soutien technique et méthodologique dans ce travail.

Je remercie Madame **Julie LEGER** et Madame **Elsa TAVERNIER** pour les aspects méthodologiques et statistiques de ce travail qui m'ont permis d'approfondir mes connaissances avec rigueur.

Je remercie mes collègues étudiantes qui ont contribué à ce travail Madame le Docteur **Hélène PORET**, Madame **Vanda MENDES**, Madame **Souad MELOUK** et Madame **Malorie PRIVAT**.

Je remercie tous les membres de **l'équipe 5** pour leur accueil.

Je remercie **Valérie SCHUNBEL**, **Jérôme MONTHARU** et **Michèle DE MONTE** pour leur accueil et leur aide au sein de l'animalerie.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les **amis** et **collègues** qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ce parcours. Mes remerciements vont tout particulièrement à Monsieur le Docteur **Emmanuel SIMON**, Madame le Docteur **Caroline DIGUSITO** et Madame le Docteur **Hélène PORET**.

Enfin, je voudrais adresser tous mes remerciements à ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée pendant toutes ces années, ainsi qu'à mes amis.

Résumé

La distinction entre les fœtus constitutionnellement petits de ceux qui présentent une réelle restriction de croissance liée à une insuffisance placentaire n'est pas aisée avec les mesures échographiques utilisées en pratique courante. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) est responsable d'une part importante de la prématurité induite, et d'une augmentation du risque de mortalité et de morbidité néonatales. C'est pourquoi, l'amélioration de la connaissance de la vascularisation placentaire est indispensable pour mieux identifier et prendre en charge les situations d'hypoxie chroniques fœtales associées à l'insuffisance placentaire.

Pour quantifier la vascularisation les modalités d'imagerie de perfusion disponibles sont l'échographie et l'IRM. Les études évaluant la quantification de la perfusion placentaire par échographie de contraste sont peu nombreuses. Les avantages et les limites de cet examen ont été évalués sur un modèle murin de RCIU par ligature vasculaire. Ainsi, l'échographie de contraste permettait de quantifier une baisse de la perfusion placentaire sur un modèle de RCIU sans que l'on puisse observer de passage d'agents de contraste ultrasonores au travers la barrière placentaire. Les résultats obtenus ont été comparés aux données obtenues par l'IRM de perfusion. Les paramètres quantitatifs obtenus à partir des courbes de cinétiques du contraste pour chacune des deux modalités d'imagerie étaient comparables sur un modèle identique de RCIU murin. Enfin, une méthode d'étude de l'oxygénation placentaire par imagerie photoacoustique a été évaluée. Cette modalité d'imagerie non invasive permettait d'obtenir en temps réel l'oxygénation placentaire, avec cependant une profondeur limitée d'exploration. Le placenta semblait se comporter comme une réserve en oxygène au cours de l'étude d'une séquence hypoxie – hyperoxygénation maternelle avec une désaturation moins importante que celle observée dans les autres tissus maternels.

Mots clés : retard de croissance intra-utérin ; insuffisance placentaire ; échographie de contraste ; perfusion placentaire ; photoacoustique.

Résumé en anglais

To identify fetuses small for their gestational-age who have reached their appropriate growth potential from growth-restricted fetuses due to placental insufficiency is uneasy. Intra Uterine Growth Restriction (IUGR) increases the risk for indicated preterm delivery, neonatal mortality and morbidity. Therefore, improving the knowledge of the placental perfusion is essential to better identify and manage fetal chronic oxygen deprivation associated with placental insufficiency.

Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) and MRI are two imaging modalities available to quantify placental perfusion. However, few studies focus on the quantification of placental perfusion with CEUS. First, the advantages and limitations of CEUS were presented in an IUGR rat model by uterine ligation. The placental perfusion observed by CEUS was significantly decreased in the ligated horn. No contrast enhancement was observed in the umbilical vein or the fetus. Then, we compared the CEUS parameters to results obtained by MRI perfusion. Perfusion parameters were obtained from the signal intensity decay curve for the two imaging modalities. Results of such perfusion parameters were comparable in the same IUGR rat model. Finally, we evaluated the response of the placenta to oxygenation by photoacoustic imaging. PA imaging is a real-time, non-invasive method to evaluate placental oxygenation without contrast agents. Our results suggesting that placenta is less affected than maternal tissue by the decline in maternal oxygenation. The placenta may play an important role in protecting the fetus against hypoxia.

Keywords: intrauterine growth restriction; placental insufficiency; ultrasound contrast enhanced; placental perfusion; photoacoustic imaging.

Table des matières

Remerciements	4
Résumé	6
Résumé en anglais	7
Table des matières	8
Liste des tableaux	11
Liste des figures	12
Introduction générale	19
1. Principes de l'imagerie de contraste ultrasonore	24
1.1. Propriétés des agents de contraste	24
1.2. Interactions bulles-ultrasons.....	26
1.3. Imagerie de contraste ultrasonore	27
1.3.1 Outils de quantification d'une image de contraste	27
1.3.2. Techniques d'imagerie de contraste	29
1.4. Quantification de l'imagerie de contraste ultrasonore	32
1.5. Appareils d'échographie utilisés	34
2. Echographie de contraste au cours de la gestation physiologique de la rate	37
2.1. Description échographique et histologique de l'unité fœto-placentaire de la rate... 37	
2.1.1 Echo-anatomie de l'unité fœto-placentaire de la rate.....	37
2.1.2 Histologie placentaire de la rate	39
2.2. Reproductibilité de la mesure.....	45
2.2.1 Matériel et méthode.....	45
2.2.2 Résultats	46
2.2.3 Discussion	49
2.2.4 Conclusion.....	49
2.3. Innocuité de la procédure	50
2.3.1 Matériel et méthodes	52
2.3.2 Etude en échographie	53
2.3.3 Sonoporation et spectrométrie RMN.....	54
2.3.4 Etude histologique et ultra-structurale	55
2.3.5 Conclusion.....	57
2.4. Etude de la perfusion placentaire dans l'unité fœto-placentaire	58
2.4.1 Introduction	59

2.4.2	Material and methods	60
2.4.3	Results	63
2.4.4	Discussion	69
2.4.5	Conclusion.....	70
2.5.	Etude de la perfusion placentaire dans les différentes régions du placenta	72
2.5.1	Protocole expérimental.....	72
2.5.2	Analyse en temps réel et paramétrique de l'échographie de contraste	74
2.5.3	Discussion	76
3.	Echographie de contraste sur modèle de RCIU murin par ligature vasculaire	79
3.1.	Modèle murin de RCIU par ligature de l'artère utérine	79
3.1.1	Description du modèle pathologique.....	79
3.1.2	Validité du modèle chirurgical	80
3.1.3	Limites du modèle chirurgical.....	83
3.2.	Etude de la perfusion placentaire sur modèle pathologique.....	85
3.2.1	Matériel et méthodes	85
3.2.2	Résultats	88
3.2.3	Discussion	93
3.2.4	Conclusion.....	95
4.	Imagerie par résonance magnétique sur un modèle de RCIU murin par ligature vasculaire.....	98
4.1.	Principe de l'IRM de perfusion	99
4.2.	Matériel et méthodes	99
4.3.	Résultats	104
4.4.	Discussion	110
4.5.	Conclusion.....	111
5.	Comparaison de l'échographie de contraste et de l'IRM de perfusion.....	113
5.1.	Objectif.....	113
5.2.	Matériel et méthodes	113
5.3.	Résultats	114
5.4.	Discussion	115
5.5.	Conclusion.....	118
6.	Etude de l'oxygénation placentaire par imagerie photoacoustique.....	121
6.1.	Introduction	122

6.2.	Material and methods	123
6.3.	Results	126
6.4.	Discussion	131
6.5.	Conclusion.....	134
7.	Synthèse et perspectives.....	136
8.	Conclusion.....	139
9.	Bibliographie.....	141
10.	Annexes	153
10.1.	Annexe 1 : Liste des publications	154
	Articles à comité de lecture	154
	Communications dans des congrès internationaux	154
	Communications dans des congrès nationaux.....	155
	Conférences invitées	155
10.2.	Annexe 2 : Abréviations.....	156
10.3.	Articles publiés.....	157
	Résumé.....	158
	Résumé en anglais.....	158

Liste des tableaux

Tableau 1 : Coefficients de corrélation intraclasse de chacun des paramètres quantitatifs de l'échographie de contraste et leur intervalle de confiance à 95% permettant d'étudier la variabilité intra-observateur de la mesure.	48
Tableau 3 : Taux de mortalité et poids des ratons de chaque groupe du modèle de RCIU. ...	88
Tableau 4 : Paramètres quantitatifs étudiés en contraste dans chaque région d'intérêt du placenta au 19 ^{ème} jour de la gestation de la rate Sprague Dawley dans le groupe ligature et le groupe contrôle. Chaque paramètre est présenté avec sa moyenne et son écart type (minimum-maximum) et les groupes sont comparés par un test non paramétrique de Wilcoxon.	91
Tableau 5 : Paramètres quantitatifs des placentas contrôles et des placentas ligaturés d'après l'analyse mono-compartmentale issue du modèle de Toft.....	110
Tableau 6 : Quantitative analysis of oxygenation in the skin and the 3 ROIs of the placenta, on days 14, 17 and 20 of gestation (pooled data). Results are presented as mean \pm standard deviation.	127

Liste des figures

- Figure 1** : Image par microscopie d'un échantillon de microbulles BR-14[®] (Bracco). Image réalisée par Anthony Novell..... 24
- Figure 2** : Oscillations d'une microbulle en fonction de la pression acoustique (*illustration d'Anthony Novell*). 26
- Figure 3** : Etude de la perfusion en mode bolus. Courbe temps-intensité représentant les différents paramètres quantitatifs étudiés en échographie de contraste : le pic d'intensité maximal ou volume sanguin relatif (PE *Peak Enhancement*), la vitesse de remplissage ou débit sanguin relatif (WiR *Wash in Rate*), l'aire sous la courbe (WiAUC *Wash in Area Under the curve*), temps de transit des agents de contraste jusqu'au pic d'intensité maximal (TTP *Time To Peak*), et la vitesse de vidange (WoR *Wash out Rate*). Le *Rise Time* et le *Fall Time* sont obtenus à partir des pentes du *Wash in Rate* et du *Wash out Rate*..... 32
- Figure 4** : Appareils d'échographie utilisés pour les différentes expérimentations présentées. 35
- Figure 5** : A – Description anatomique de l'utérus et de la vascularisation utérine de la rate. B – Echographie en mode B (Vevo2100, Visualsonics) d'une unité fœto-placentaire au 17^{ème} jour de gestation de la rate. On visualise d'une part, le triangle mésométrial et le placenta au sein duquel on peut individualiser le labyrinthe et le vaisseau central maternel. D'autre part, on repère le fœtus et le cordon ombilical..... 37
- Figure 6** : Echographie Doppler du placenta de rate au 17^{ème} jour de gestation. La partie **A** est une acquisition en Doppler couleur et la partie **B** une acquisition en Doppler énergie (Vevo2100, Visualsonics). Les vaisseaux de gros calibre comme le vaisseau central maternel et le cordon ombilical, sont bien visualisés à la différence de la microcirculation placentaire du labyrinthe qui n'est pas visible. 38
- Figure 7** : Echographie de contraste traitement du signal en MIP. Arrivée des agents de contraste échographique au niveau du placenta au 19^{ème} jour de la gestation de la rate.. 38
- Figure 8** : Analyse histologique du placenta et de son site d'implantation au 20^{ème} jour de gestation (44). La coupe est préparée selon le protocole Hematoxylin et Eosine passe par le plan médian du placenta. Les différentes zones histologiques légendées sont : (L) labyrinthe, (T) trophospongium, (VCM) vaisseau central maternel, (D) zone déciduale et (TM) triangle mésométrial. 39

- Figure 9 :** microscopie électronique à transmission montrant les trois zones histologiques étudiées sur le placenta de la rate. 40
- Figure 10 :** Observation en MET des 3 couches trophoblastiques du cytotrophoblaste. La couche 1 est la plus fine et est composée d'un endothélium fenêtré. La couche 2 est en contact direct avec le sang maternel et est le site de nombreux échanges. La couche 3, la plus épaisse et la plus jointive est très active en termes de dégradation cellulaire. Echelle de 2 μm 41
- Figure 11 :** Couches trophoblastiques du labyrinthe observées en MET. A gauche de la figure, la couche trophoblastique 2 est la plus active elle présente de nombreux replis membranaires et des invaginations (astérisques rouge). La partie de droite montre les nombreux échanges avec les vésicules de transport et les ribosomes. 42
- Figure 12 :** Couche trophoblastique 3 du labyrinthe observée en MET. Il s'agit d'une couche très jointive et la couche la plus active sur le plan de la dégradation cellulaire. On visualise des vacuoles autophagiques (astérisque rouge). L'image la plus à droite montre des villosités situées au pôle basal des cellules (flèches noires). 42
- Figure 13 :** Au-delà de la couche 3, visualisation en MET à l'échelle de 2 μm de la lame basale sous laquelle se trouve l'endothélium fœtal (fce). 43
- Figure 14 :** Trophospongium visualisé en MET. L'astérisque rouge montre les spongiotrophoblastes. 44
- Figure 15 :** représentation graphique de Bland et Altman permettant d'étudier la variabilité inter-observateur de la mesure des paramètres quantitatifs étudiés en échographie de contraste. 47
- Figure 16 :** représentation graphique de Bland et Altman permettant d'étudier la variabilité intra-observateur de la mesure des paramètres quantitatifs étudiés en échographie de contraste 48
- Figure 17 :** Echographie en mode B et échographie en mode contraste d'une unité fœto-placentaire au 17^{ème} jour de gestation de la rate, et quantification du pic d'intensité maximal (PE) en échographie de contraste au niveau du placenta, du cordon ombilical et du fœtus aux jours 14, 17 et 20. On visualise nettement le fœtus en mode B alors qu'aucun rehaussement n'est identifiable en mode contraste. Ceci est confirmé en étude quantitative. 54
- Figure 18 :** Prélèvement d'une unité fœto-placentaire dans sa totalité : placenta présentant une coloration bleue intense liée à l'injection de Bleu Evans. La cavité amniotique, les

vaisseaux fœtaux et le fœtus eux ne présente aucun signe de coloration par le Bleu Evans. La partie inférieure représente l'analyse en spectrométrie de flux du liquide amniotique des cas et des contrôles. Les molécules représentées sont les mêmes dans des proportions également similaires. 55

Figure 19 : Coupes histologiques de placentas de rates non exposée et exposée à l'échographie de contraste, après coloration HES observées en microscopie optique avec un grossissement de 2,5. Les différentes régions histologiques sont nommées : le vaisseau maternel (VM), le labyrinthe (L), et le trophospongium (T). 56

Figure 20 : Analyse ultra structurale du placenta en Microscopie Electronique à Transmission de placenta exposés ou non à la procédure de l'échographie de contraste. Les figures A et B représentent la région du trophospongium avec notamment l'étude de la bordure en brosse (mv : microvilli). Les figures C et D représentent la région du labyrinthe avec les 3 zones individualisables tI, tII et tIII. 57

Figure 21 : Monitoring of uteroplacental perfusion by CEUS. A) Ultrasound imaging of the fetoplacental unit on day 17 of gestation; B) Manual drawing of the regions of interest (ROIs) (the mesometrial triangle in blue, the placenta in green, the umbilical cord in red and the fetus in yellow); C) Time-intensity curves. 62

Figure 22 : Doppler ultrasound velocimetry of uterine and arcuate arteries. The RI (A) and PI (B) decreased significantly from day 14 to day 17 of gestation. Arcuate artery PSV (C) increased during gestation while systolic velocity did not change in the uterine arteries; Arcuate artery EDV (D) increased significantly during gestation. Data are expressed as mean \pm SEM (n=22). Statistical analysis was performed with the non-parametric Wilcoxon test. Significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). 64

Figure 23 : Monitoring of microbubble contrast agent in the uteroplacental unit by CEUS on the gestational day 17. First, the enhancement of the mesometrial triangle (arrow) and the maternal spiral arteries is visualized 1 s after contrast agent injection (A). Then, contrast agent microbubbles are detected through the maternal vessel (*) in the center of the placenta to the chorionic plate (B). Finally, the perfusion slowly expands in the placenta (**) to the basal plate (C and D). 65

Figure 24 : Quantitative analysis of uteroplacental perfusion by CEUS. Graphs A to C show quantitative parameters in the bolus mode. Graphs D and E show quantitative parameters in the destruction-replenishment mode. Data are expressed as mean \pm SEM calculated

from 5 pregnant rats. Statistical analysis was performed with the non-parametric Wilcoxon test. Significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)..... 67

Figure 25 : Safety of the CEUS procedure. Parallel section through the implantation site of the placenta of a rat on day 20 of gestation, stained for HES (original magnification x2.5). There were no histological differences between placenta sections of the control group (A) and the CEUS group (B). 68

Figure 26 : séquence typique du rehaussement placentaire après l'injection des agents de contraste en mode bolus. Les 3 ROIS étudiées sont représentées en rouge pour le vaisseau central maternel et ses deux branches de division, en jaune pour le labyrinthe et en bleu pour le placenta total..... 74

Figure 27 : Analyse quantitative en échographie de contraste dans les 3 ROIS aux jours 14, 17 et 20 de la gestation physiologique de la rate. La comparaison entre les jours 14 et 17 de gestation était représentée par # $P=0,05$ ## $P=0,01$ ### $P=0,001$; entre les jours 17 et 20 par * $P=0,05$ ** $P=0,01$ *** $P=0,001$; et entre les jours 14 et 20 + $P=0,05$ ++ $P=0,01$ +++ $P=0,0001$ 75

Figure 28 : Description du modèle pathologique de RCIU par ligature unilatérale d'une artère utérine au 17^{ème} jour de la gestation chez la rate Sprague Dawley. Sous anesthésie générale, incision première de la peau ; exposition des cornes utérines droite et gauche contenant les embryons ; et ligature d'un pédicule vasculaire utérin comprenant l'artère et la veine utérine. A la fin de la procédure, les deux cornes sont réintroduites avec précaution dans la rate et les plans musculaire et cutané sont suturés. 80

Figure 29 : Mortalité fœtale des ratons en fonction du rang de chaque raton dans la corne utérine de la rate. Le rang 1 est défini par le rang le plus proche du col utérin. 81

Figure 30 : Différence de poids des ratons de la corne ligaturée par rapport à la corne contrôle exprimée en pourcentage selon leur rang dans la corne utérine..... 82

Figure 31 : Poids médian des placentas au 20^{ème} jour de la gestation pour le groupe contrôle et le groupe ligature. Le poids des placentas du groupe ligature est plus faible ($P<0,001$). 83

Figure 32 : exemple de perfusion en mode bolus dans un placenta de rate du côté ligaturé. On visualise le contour des 3 ROIS : vaisseau principal maternel (jaune), labyrinthe (rose), et placenta total (vert). Les ROIS étaient tracées manuellement et vérifiées sur l'image en

mode-B et en mode contraste. Sur la partie du bas, apparaissaient avec le logiciel VevoCQ les courbes temps-intensité dans chacune des ROIS. 87

Figure 33 : Image d'une unité fœto-placentaire au cours du temps en mode contraste avec traitement du signal en MIP (*Maximum Intensity Projection*). Etude de l'arrivée des agents de contraste au cours du temps pour un placenta du groupe contrôle et un placenta du groupe ligature. Le rehaussement placentaire est caractérisé par une prise de contraste intense et précoce au niveau du vaisseau principal maternel (MMV : main maternal vessel) puis un rehaussement plus lent, homogène et centrifuge du labyrinthe (L). On visualise très nettement la prise de contraste moins intense et incomplète lors du modèle d'hypoperfusion placentaire par ligature du pédicule utérin..... 89

Figure 34 : Image en mode contraste avec traitement du signal en MIP (*Maximum Intensity Projection*). Perfusion placentaire par les agents de contraste échographique. On note l'aspect caractéristique de la prise de contraste pour le placenta du groupe ligature qui apparaît lente et « crénelé » avec un rehaussement moins important du labyrinthe (L). . 90

Figure 35 : Boxplot représentant les paramètres quantitatifs étudiés en contraste à partir des courbes temps intensité dans chaque région d'intérêt et pour les groupes de rats du côté ligaturé ou du côté contrôle. La partie **A** – représente l'intensité maximale du signal (PE), la partie **B** – le temps d'intensité maximale (TTP), la partie **C** – la vitesse de remplissage (WiR) et la partie **D** – l'aire sous la courbe (WiAUC). 92

Figure 36 : Coupes histologiques de placenta de rate du groupe contrôle et ligature, après coloration HES observées en microscopie optique (grossissement x2). Sur chacune des deux coupes on visualise le labyrinthe (L), le trophospongium (T) et la décidue (D). Le vaisseau central maternel (VM) et ses branches de division (*) est bien identifié sur le placenta du groupe ligature. 93

Figure 37 : Cinétique de valeurs d'intensité de signal obtenue après injection IV de Gadolinium. Les paramètres semi-quantitatifs étudiés sont les phases de remplissage (wash-in) et de vidange (wash-out), le pic d'intensité maximale (PE : Peak enhancement), le temps pour obtenir le pic maximal (TTP : time to peak), et l'aire sous la courbe (AUC : area under the curve). 102

Figure 38 : Modèle de Kety. Représentation de la diffusion (K_{trans}) de l'agent de contraste (jaune) du compartiment plasmatique (V_p) vers le compartiment cellulaire (V_c). L'agent de contraste n'entre pas dans les cellules. Le modèle est assimilé à un compartiment unique alimenté par une artère et drainé par une veine..... 104

Figure 39 : Acquisition IRM-DCE 9,4 Teslas en séquence T1 montrant la prise de contraste du placenta au cours du temps. La ROI placentaire est schématisée en bleue sur les images IRM. L'acquisition de longue durée (1 heure) permet une exploration de la phase de remplissage et de vidange vasculaire.	105
Figure 40 : Acquisition IRM en T1 représentant les ROIS tracées manuellement au niveau des placentas de la corne contrôle (bleu) et de la corne ligaturée (rouge).	106
Figure 41 : Acquisition IRM 9,4 Teslas en séquence T1 permettant une analyse quantitative des différentes régions du placenta après injection intravasculaire de Gadolinium chez la rate au 19 ^{ème} jour de gestation. Les régions d'intérêt étudiées sont le vaisseau maternel (ROI verte), le labyrinthe (ROI rose) et le placenta global (ROI bleue).	106
Figure 42 : Cinétiques des valeurs d'intensité de signal obtenues après injection IV de Gadolinium en IRM 9,4 Teslas, dans les différentes ROIS étudiées pour chacun des groupes contrôle et ligature. Les courbes représentées résultent des moyennes de l'ensemble des mesures de chaque animal.	107
Figure 43 : Cinétiques des valeurs d'intensité de signal, avec leurs intervalles de confiance obtenues après injection IV de Gadolinium en IRM 9,4 Teslas, dans le labyrinthe du côté contrôle et du côté ligaturé pour l'ensemble des animaux étudiés.	108
Figure 44 : Boxplot représentant les paramètres semi-quantitatifs étudiés en IRM au niveau du vaisseau maternel principal, du labyrinthe et du placenta global. Les boîtes bleues correspondent aux mesures faites sur les contrôles et les boîtes rouges correspondent aux mesures du côté ligaturé. Les mesures présentant des différences significatives entre les deux groupes sont signalées par * P <0,05, ** P <0,01 et *** P <0,001 (test de Wilcoxon).	109
Figure 45 : étude du rapport de chaque paramètre de perfusion entre le groupe contrôle et le groupe ligature pour les deux méthodes d'imagerie : l'échographie de contraste et l'IRM. Les variations du maximum d'intensité (PE), de la vitesse de remplissage (WiR) et de l'aire sous la courbe (AUC) sont exprimés en pourcentage de perte de signal par rapport au groupe contrôle. Le maximum d'intensité (TTP) est exprimé en pourcentage de temps par rapport au groupe contrôle.	115
Figure 46 : PA imaging of placental oxygenation on day 17 of gestation. From left to right: the placenta in a sagittal plane (obtained by a B-mode ultrasound scan) and parametric images created with the PA Oxyhemo mode making possible the evaluation of blood SO2 during variations in the oxygen levels supplied to the mother (5-100%).	124

Figure 47 : ROIs placed on the skin (red), the mesometrial triangle (light blue), and the two different zones of the placenta: the basal zone (green) and the labyrinth zone (dark blue). 125

Figure 48 : Time-intensity curves obtained during the experimental sequence of hyperoxygenation (100% O₂, 2.5 min), hypoxia (5% O₂; 4 min), and hyperoxygenation (100% O₂, 4 min) from skin (red), mesometrial triangle (light blue), basal zone (green), and labyrinth zone (dark blue) on day 20 of gestation. 128

Figure 49 : **A** - Box-and-whisker plot showing the mean ΔSO_2 in maternal skin, the mesometrial triangle, and the whole placenta on different days of gestation. Data are mean values and 95% confidence intervals. Comparisons between skin and utero-placental ROIs (mesometrial triangle and whole placenta) at the same day of gestation are indicated by *P=0.05 **P=0.01 ***P<0.001. Comparisons between mesometrial triangle and whole placenta at the same day of gestation are indicated by #P=0.05 ##=0.01 ###P<0.001. **B** – Box-and-whisker plot represents the different part of the placenta: the basal zone and the labyrinth zone on different days of gestation. Data are mean values and 95% confidence intervals..... 131

Introduction générale

La prééclampsie (PE) (1) et le retard de croissance intra-utérin (RCIU) (2) affectent environ 4 à 10 % de l'ensemble des grossesses. La PE est définie par une hypertension artérielle et une protéinurie survenant au-delà de la 20^{ème} semaine de grossesse. Quant au RCIU, il est défini par une estimation de poids fœtal en échographie inférieure au 10^{ème} percentile pour un âge gestationnel donné et un ralentissement de la cinétique de croissance au cours du temps. Celui-ci s'explique par une insuffisance placentaire à l'origine d'une hypoxie chronique, et se différencie des fœtus petits pour l'âge gestationnel mais préservant leur potentiel de croissance. Le RCIU et la PE ne sont pas nécessairement associés (3). Néanmoins, ils sont la source d'une part importante de la prématurité induite (4) et de la morbidité maternelle et périnatale dans les pays développés (5). En effet, le RCIU est associé à une augmentation de la morbidité et de la mortalité périnatale (6), et des séquelles neuro-développementales chez l'enfant (7). Le RCIU pourrait également augmenter la morbidité à l'âge adulte avec notamment une élévation du risque cardiovasculaires (8–10) et des syndromes dépressifs (11,12). Cependant, si les définitions actuelles du faible poids de naissance sont fortement associées au risque de morbi-mortalité néonatale, elles ne sont pas prédictives de la morbidité à l'âge adulte (13). Ainsi, le dépistage et la prévention de la PE et du RCIU constituent un enjeu majeur de la médecine maternelle et fœtale. Une meilleure identification du RCIU en prénatal permettrait de mieux évaluer le retentissement sur l'enfant à long terme et d'instaurer une surveillance adaptée.

PE et RCIU partagent une physiopathologie commune, l'insuffisance placentaire dont le *primum movens* est un remodelage inadapté des artères spiralées maternelles à l'origine d'une diminution du débit sanguin maternel au sein du placenta. L'examen clinique permet de déceler une PE, et l'estimation échographique de la croissance fœtale associée à la mesure des résistances vasculaire par Doppler permettent de diagnostiquer un RCIU. Cependant, l'estimation pondérale par échographie conventionnelle ainsi que l'échographie Doppler de l'artère ombilicale ont une faible sensibilité, allant de 15 à 60 % et un taux de faux positifs élevé de 30 %, pour les RCIU survenant tardivement au cours de la grossesse (14,15). Le Doppler des artères utérines maternelles présente également une valeur prédictive limitée pour le dépistage de la PE et du RCIU (16). L'étude du rapport cérébro-placentaire peut contribuer

à identifier les RCIU notamment lorsque le poids fœtal est inférieur au 10^{ème} percentile (17). Toutefois, certaines études chez l'animal ont retrouvé dans les situations d'hypoxie chronique une normalisation de ce rapport liée à une réduction de la consommation d'oxygène par le fœtus. Ce phénomène adaptatif constitue donc une limite importante du rapport cérébro-placentaire (18,19). Par ailleurs, l'analyse du rythme cardiaque fœtal est également utilisée dans la surveillance de la tolérance du fœtus à l'insuffisance placentaire. Les anomalies attendues telles que la baisse des accélérations et la perte de la capacité du fœtus à décélérer (20) surviennent généralement plus tardivement que les anomalies Doppler.

Les limites des outils échographiques Doppler pour le diagnostic du RCIU mais aussi leur insuffisance pour la surveillance et l'évaluation de la tolérance fœtale au RCIU montrent la nécessité de développer de nouveaux outils diagnostiques. Dans cette perspective, il semble indispensable de quantifier la vascularisation directement au sein du placenta afin de mieux évaluer la capacité d'échange materno-fœtale. Le Doppler conventionnel couleur ou énergie ne permet pas de visualiser la micro-circulation placentaire et ne permet pas non plus de distinguer la circulation maternelle de la circulation fœtale. Différentes méthodes d'imagerie de perfusion non invasives permettent actuellement de quantifier la vascularisation de la chambre intervillieuse : l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'échographie de contraste.

Les méthodes d'IRM sont nombreuses, certaines d'entre elles permettent d'obtenir un débit de perfusion sanguine en ayant parfois recours à une injection d'agents de contraste. Les études réalisées chez l'animal comme chez l'homme retrouvent des résultats intéressants (21–27). Cependant, l'injection d'agents de contraste tel que le Gadolinium[®] traverse la barrière placentaire et son innocuité a été récemment remise en cause. Une étude de cohorte a comparé 397 fœtus exposés au Gadolinium[®] au cours de la grossesse à 1418451 fœtus non exposés à l'IRM (28). D'après les résultats, l'exposition au Gadolinium[®] au cours de la grossesse augmentait le risque de pathologies rhumatologiques, inflammatoires, et de décès *in utero* ou néonatal. Ainsi, l'injection de Gadolinium[®] ne semble pas envisageable au cours de la grossesse mais d'autres techniques de perfusion sans injection d'agents de contraste sont possibles parmi lesquelles l'étude par marquage des spins artériels (Arterial Spin Labeling) et l'étude du tenseur de diffusion (29). L'autre avantage de ces techniques fonctionnelles utilisées en IRM est le large champ d'exploration permettant d'étudier à la fois le placenta et le fœtus. En particulier, l'étude du cerveau fœtal qui est très sensible aux variations en

oxygène au cours de son développement dans la période périnatale. Ainsi, dans les situations à haut risque hypoxique la recherche des séquelles cérébrales fœtales pourrait présenter un intérêt pronostic.

L'échographie de contraste constitue l'autre modalité d'imagerie de perfusion disponible et non invasive. Elle présente l'avantage d'être largement accessible, facilement réalisée par les professionnels de santé prenant en charge les femmes et les fœtus RCIU, peu coûteuse, et avec une très bonne résolution. Les agents de contraste ultrasonore sont des microbulles gazeuses injectées dans l'organisme par voie intraveineuse, qui oscillent sous l'excitation d'une onde ultrasonore et génèrent ainsi un écho important. Le rehaussement du signal obtenu permet d'augmenter l'échogénicité des vaisseaux sanguins. Les microbulles présentent un profil rhéologique comparable aux hématies, et restent uniquement dans le compartiment vasculaire (30). Cette méthode d'imagerie nous permettrait donc d'analyser la vascularisation de la chambre intervillieuse du placenta. Actuellement, les agents de contraste ultrasonores ne présentent pas d'autorisation d'utilisation chez la femme enceinte car trop peu de données sont disponibles (31). Quelques études ont tout de même déjà été réalisées chez l'homme (32) et quelques données sur l'innocuité de la procédure sont rassurantes (33,34). Néanmoins, ces études restent exploratoires et des travaux complémentaires sont nécessaires pour permettre un développement clinique de la technique d'imagerie tant sur le plan de la reproductibilité de la méthode que sur l'analyse des paramètres quantitatifs utilisés. Ainsi, toutes nos études ont été réalisées chez le petit animal. Nous avons choisi la rate Sprague Dawley du fait de son placenta de type hémochorial comme chez l'humain.

La perspective de notre travail était donc de quantifier la perfusion placentaire en utilisant et en comparant les deux modalités d'imagerie de perfusion disponibles, c'est-à-dire l'échographie de contraste et l'IRM. Ainsi, nous débuterons cette thèse avec le **chapitre 1** qui traite des grands principes de l'imagerie de contraste ultrasonore, permettant de mieux comprendre les propriétés des agents de contraste ultrasonores, leurs modalités d'interaction avec les ultrasons et les outils de quantification de la perfusion. Dans le **chapitre 2** nous aborderons la perfusion placentaire par échographie de contraste au cours de la gestation physiologique de la rate. Nous discuterons ici de la reproductibilité de la méthode et de l'innocuité des agents de contraste ultrasonores. La présentation de la méthodologie de la mesure d'après les connaissances histologiques du placenta de la rate obtenues par microscopie optique et électronique, et les résultats quantitatifs de chaque paramètre étudié y

sont présentés. Ensuite, le modèle de RCIU murin par ligature d'une artère utérine décrit par Wigglesworth en 1964 est présenté et discuté dans le **chapitre 3**. A partir de ce modèle, l'étude de la perfusion placentaire est réalisée et comparée entre les placentas du groupe contrôle et ceux du groupe ligature. Dans un premier temps cette comparaison est réalisée avec l'échographie de contraste. Puis dans le **chapitre 4**, les résultats de la quantification de la perfusion placentaire réalisée par IRM en séquences de perfusion avec injection de Gadolinium[®] sur le même modèle murin de RCIU, sont présentés. Le **chapitre 5** présente la comparaison des résultats semi-quantitatifs et quantitatifs des deux modalités d'imagerie de perfusion. Par ailleurs, dans le **chapitre 6** nous aborderons une approche innovante de l'évaluation de l'oxygénation placentaire par imagerie photoacoustique au cours de la gestation physiologique de la rate. Enfin, le **chapitre 7** présente les perspectives cliniques de l'étude fonctionnelle du placenta par imagerie de perfusion.

Chapitre 1

Principes de l'imagerie de contraste ultrasonore

1. Principes de l'imagerie de contraste ultrasonore

1.1. Propriétés des agents de contraste

Les produits de contraste ultrasonore sont des microbulles gazeuses, non toxiques pour l'organisme, qui ont la particularité d'entrer en oscillation et de générer un écho important sous l'excitation d'une onde ultrasonore (35). Ces agents sont injectés dans l'organisme par voie intraveineuse (bolus ou perfusion continue) pour augmenter l'échogénicité des vaisseaux sanguins. Une solution de contraste est composée de millions de bulles de taille variable dont le diamètre est de l'ordre de quelques μm (0,5 à 20 μm de diamètre). Leur petite taille leur permet de franchir les capillaires pulmonaires avant de parvenir à la circulation systémique. Une image par microscopie d'un échantillon de microbulles BR-14® est présentée dans la figure 1.

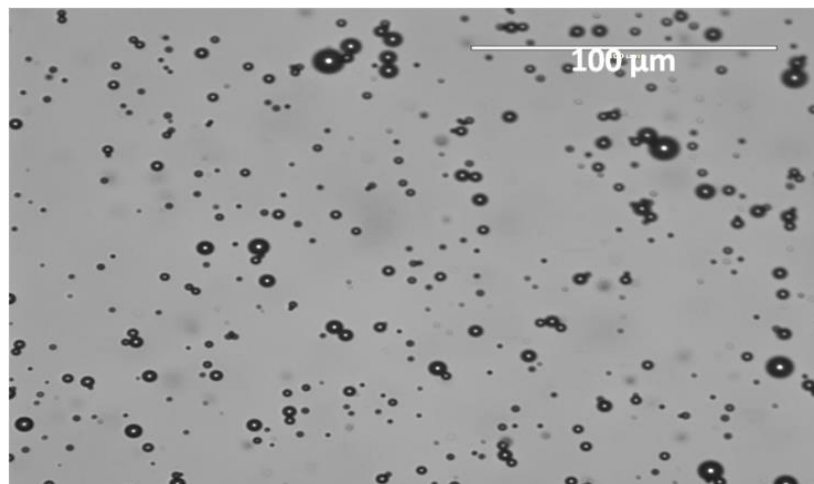


Figure 1 : Image par microscopie d'un échantillon de microbulles BR-14® (Bracco). Image réalisée par Anthony Novell (36).

Les microbulles sont généralement composées d'un gaz lourd afin de réduire leur cinétique de dissolution dans le sang et ainsi de pouvoir réaliser un examen échographique de plusieurs minutes. Ce gaz est entouré d'une coque dont la fonction est de protéger la bulle. L'épaisseur de la paroi varie de quelques nm à plusieurs centaines de nm. Elle est

généralement composée de protéines, de phospholipides, de surfactants ou des polymères. Les microbulles encapsulées se révèlent beaucoup plus stables que des bulles dites nues. Il est alors possible de prolonger sensiblement la durée utile de l'écho fourni par l'agent de contraste. La composition et l'épaisseur de la paroi ont une influence directe sur le pouvoir réflecteur de la bulle. D'autre part, les agents de contraste peuvent porter à leur surface des anticorps ou des ligands pour étudier des processus moléculaires comme l'angiogénèse (37) ou induire un transfert ciblé de médicaments (38). De par la forte compressibilité du gaz, les microbulles sont des diffuseurs ultrasonores très efficaces. Le contraste de l'image dépend alors de la nature et de la concentration des agents de contraste ainsi que des paramètres acoustiques appliqués.

De plus, selon la fréquence d'excitation, les microbulles peuvent se comporter comme des systèmes résonants (39). Leur fréquence de résonance est dans la gamme des fréquences appliquées en échographie clinique (1 - 10 MHz) ou en échographie à haute résolution (18 – 21 MHz). Ce phénomène de résonance induit une augmentation de la réflexion des bulles.

Les agents de contraste MicroMarker1[®] fournis par Bracco Research (Bracco, Genève) et Definity[®] ont été utilisés dans les travaux de cette thèse. Les Vevo MicroMarker[®] sont composées d'un mélange de perfluorobutane et de nitrogen (C_4F_{10}/N_2), entouré de polyéthylène glycol, de phospholipides et d'acides gras. La concentration des microbulles reconstituées est d'environ 2×10^9 microbulles/mL. La dilution des microbulles est réalisée dans une solution saline à 0,9%, au $1/10^{\text{ème}}$ ($15 \mu\text{L}$ d'agents de contraste pour $150 \mu\text{L}$ de solution saline). Leur diamètre moyen est de 2,3 à 2,9 μm et leur fréquence de résonance se situe autour de 5 MHz. Les Vevo MicroMarker[®] sont exclusivement utilisées en recherche pour les études expérimentales. Elles sont idéales pour l'imagerie à haute résolution notamment sur le petit animal. Les agents de contraste Definity[®] sont composés de Octafluoropropane (C_3F_8) stabilisé par une couche de phospholipides. Leur concentration après reconstitution de la solution est de $1,2 \times 10^{10}$ microbulles/mL. Leur diamètre moyen est de 1,1 à 3,3 μm , et peut atteindre jusqu'à 20 μm . Les microbulles ont une taille inférieure à 10 μm dans 98% des cas. Leur fréquence de résonance se situe autour de 4 à 5 MHz. Le Definity[®] est un agent de contraste utilisé en pratique clinique.

1.2. Interactions bulles-ultrasons

Une microbulle est assimilable à un réflecteur qui, à la suite d'une excitation, émet un écho dans toutes les directions. De par la forte compressibilité du gaz, la microbulle se présente comme un excellent diffuseur ultrasonore. Sa capacité de diffusion est fortement liée aux propriétés physiques de la bulle (compressibilité du gaz, densité, taille), au milieu environnant (compressibilité, densité), ainsi qu'aux paramètres d'excitation (fréquence d'excitation, pression...).

La propagation d'une onde ultrasonore dans un fluide modifie la pression locale instantanée. Une microbulle présente dans le milieu sera donc affectée par le passage de l'onde et oscillera suivant la phase de l'excitation ultrasonore. La bulle sera comprimée durant la phase positive de l'onde puis dilatée durant la phase négative. Les vibrations de la bulle dépendent également de l'amplitude de la pression incidente. Soumise à de faibles amplitudes acoustiques, la bulle oscille linéairement en fonction des phases de la pression appliquée (Fig.2). Pour de fortes amplitudes d'excitation, les vibrations de la bulle deviennent asymétriques et résultent en une réponse acoustique non linéaire caractérisée par la génération d'harmoniques supérieures ($2f_0$, $3f_0$, $4f_0$...). Ce phénomène provient de la difficulté à comprimer la microbulle au-delà d'un rayon minimal.

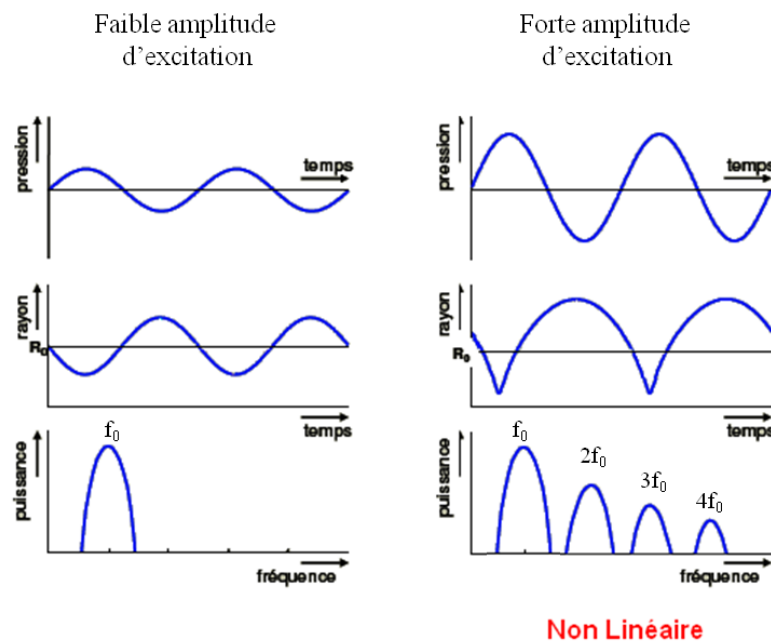


Figure 2 : Oscillations d'une microbulle en fonction de la pression acoustique (36).

D'autre part, sous l'effet d'une impulsion ultrasonore, le comportement d'une bulle peut être assimilé à celui d'un oscillateur harmonique amorti. La microbulle devient alors un système résonant capable d'emmagasiner un maximum d'énergie à sa fréquence de résonance. A cette fréquence, les oscillations de la bulle sont maximales. Une première approche négligeant la tension de surface et la viscosité permet d'estimer simplement la fréquence de résonance d'une bulle à partir de l'équation de Minnaert (40):

$$f_{res} = \frac{1}{2\pi R} \sqrt{\left(\frac{3\kappa p_0}{\rho}\right)}$$

Avec R : le rayon instantané de la bulle, κ : le coefficient polytropique du gaz, p_0 : la pression ambiante, ρ : la densité du milieu.

Toutefois, un agent de contraste est composé d'un ensemble de microbulles de tailles différentes ayant chacune leur propre fréquence de résonance. Par conséquent, la résonance de l'agent de contraste dépend de la distribution en taille des bulles.

En fonction de l'excitation, les microbulles agissent comme des réflecteurs non linéaires capables de vibrer à des fréquences harmoniques. Leur réponse acoustique porte donc une signature non linéaire spécifique, différente de celles des tissus biologiques. Cette propriété est utilisée en imagerie pour extraire et distinguer la réponse des bulles de celle des tissus.

1.3. Imagerie de contraste ultrasonore

1.3.1 Outils de quantification d'une image de contraste

L'index mécanique

L'index mécanique (MI) est utilisé en échographie pour contrôler les effets biomécaniques engendrés par les ultrasons (41). L'application d'un fort MI peut induire des phénomènes de cavitation ou des hémorragies dans les organes les plus sensibles. En application clinique, cet index ne doit pas excéder 1,9. Il est défini par le quotient de la pression négative (en MPa) sur la racine carrée de la fréquence d'excitation (en MHz) :

$$MI = \frac{P_-}{\sqrt{f_0}}$$

L'index mécanique constitue un des paramètres fondamentaux de l'imagerie de contraste ultrasonore (42). Pour un faible MI ($< 0,1$), les microbulles réfléchissent principalement de façon linéaire. Toutefois, à ces pressions, la réponse des bulles reste faible et leur détection peut s'avérer délicate. L'augmentation de la pression acoustique implique un comportement non linéaire des bulles (Fig. 2). Ce régime est généralement utilisé pour la détection d'agents de contraste (mode harmonique). Dans la plupart des cas, un index mécanique compris entre 0,1 et 0,5 correspond au meilleur compromis entre sensibilité, sélectivité et destruction. Au-delà de 0,5, la pression acoustique est suffisamment élevée pour engendrer une rupture de la paroi entourant la bulle. Ceci entraîne la libération du gaz et donc la disparition rapide des agents de contraste. Le seuil de pression dépend fortement de la taille et de la composition de la microbulle. Pour certaines applications comme la perfusion myocardique, des séquences nécessitant de forts MI (e.g. séquence flash ou imagerie déclenchée) sont utilisées pour détruire les agents de contraste et ensuite estimer la cinétique de remplissage du réseau vasculaire.

Le rapport signal sur bruit

Le rapport signal sur bruit (SNR) est utilisé pour estimer la sensibilité d'une image. Le rapport, exprimé en dB, est défini pour une région d'intérêt (ROI) par :

$$SNR_{dB} = 10 \log_{10} \left(\frac{P_{signal}}{P_{bruit}} \right) = 10 \log_{10} \left(\frac{\sum_{ROI} |x_{signal}|^2}{\sum_{ROI} |x_{bruit}|^2} \right)$$

Le bruit présent dans les systèmes échographiques (e.g. électronique, sonde,...) empêche la détection des échos les plus faibles. Généralement, pour un MI compris entre 0,1 et 0,5, la forte échogénicité des microbulles permet de récupérer un écho suffisamment important pour être observé.

Le rapport contraste sur tissu

L'efficacité d'une méthode d'imagerie de contraste est généralement quantifiée par le rapport de la puissance diffusée par les microbulles à la puissance diffusée par les tissus avoisinants (43). Ce rapport, nommé CTR, est défini tel que :

$$CTR_{dB} = 10 \log_{10} \left(\frac{P_{bulles}}{P_{tissus}} \right) = 10 \log_{10} \left(\frac{\sum_{ROI} |x_{bulles}|^2}{\sum_{ROI} |x_{tissus}|^2} \right) \quad (1.8)$$

Un faible CTR est synonyme d'une mauvaise sélectivité. Il est alors difficile de distinguer les milieux perfusés des tissus non perfusés. Au contraire, un fort CTR correspond à un excellent contraste entre les microbulles et le tissu environnant, favorisant ainsi la visualisation du flux sanguin. La plupart des nouvelles méthodes de détection de bulles sont élaborées dans le but d'optimiser ce rapport.

1.3.2. Techniques d'imagerie de contraste

Selon l'excitation ultrasonore, les bulles peuvent vibrer, en plus de la composante fondamentale en f_0 , à d'autres fréquences non linéaires ($f_0/2$, $3f_0/2$, $2f_0$, $3f_0$, $4f_0$, ...). Pour une microbulle de taille fixe, la génération de ces harmoniques dépend essentiellement de l'amplitude, de la fréquence et de la forme du signal d'excitation.

La réponse des microbulles peut donc être composée de l'ensemble de ces fréquences. Cette spécificité des agents de contraste permet de regrouper les méthodes de détection en deux catégories selon le nombre d'impulsions utilisées en transmission : les méthodes mono-impulsionnelles et multi-impulsionnelles. Les méthodes multi-impulsionnelles sont les plus utilisées actuellement. Leurs grands principes physiques sont décrits ci-dessous :

Imagerie par inversion de phases (PI) :

L'imagerie par inversion de phases (PI) est une des méthodes standard d'imagerie de contraste. Cette technique permet de sélectionner et accentuer la composante $2H$ renvoyée par le milieu. L'imagerie PI consiste en la transmission de deux impulsions successives où la seconde impulsion (p_2) est déphasée de 180° par rapport à la première (p_1). Dans un milieu linéaire tel que les tissus, la réponse à la seconde excitation est la réplique inversée de la première. La somme des deux échos est donc nulle. En revanche, pour un réflecteur non linéaire tel que les microbulles, la réponse à la seconde impulsion est différente et la somme des deux réponses résulte en un signal non nul dont l'amplitude dépend du degré de non linéarité. Lors de la somme, l'ensemble des composantes non linéaires paires ($2f_0$, $4f_0$, $6f_0$, ...)

sont conservées et additionnées alors que les composantes impaires sont éliminées ($f_0, 3f_0, 5f_0, \dots$). Toutefois, la bande passante restreinte des transducteurs limite essentiellement la méthode à l'observation de la fréquence à $2f_0$. D'autre part, la sensibilité de la méthode PI permet l'utilisation de faibles MI évitant, ainsi, la destruction des bulles.

Imagerie par modulation d'amplitude (PM) :

La technique de modulation d'amplitude ou modulation de puissance est utilisée pour détecter les non linéarités d'ordres pairs et impairs. La contribution de différentes composantes non linéaires améliore le SNR et donc la sensibilité de la méthode. Elle consiste en la transmission de deux impulsions successives à différentes amplitudes. Par exemple, la seconde impulsion (p_2) est transmise à la moitié de l'amplitude de la première impulsion (p_1) telle que : $p_2 = 0.5 p_1$. L'écho récupéré suite à la deuxième excitation est ensuite multiplié par un facteur 2 puis soustrait de la réponse de la première impulsion. Dans le cas de réflecteurs linéaires tels que les tissus, les échos s'annulent. Par contre, la variation de l'amplitude modifie le degré de non linéarité dans la réponse des microbulles. Pour une faible amplitude d'excitation, les bulles ont un comportement quasi-linéaire alors qu'une forte pression incidente induit des distorsions dans la réponse des bulles résultant en la génération de composantes non linéaires. La génération de ces harmoniques engendre également une perte d'énergie à la fréquence fondamentale. Par conséquent, la soustraction des deux échos résulte en l'apparition d'une composante en f_0 , appelée fondamentale non linéaire, et de composantes harmoniques ($2f_0, 3f_0, \dots$) issues de la réponse des agents de contraste. Cette modalité est utilisée dans l'échographe Vevo2100 (Visualsonics Inc., Toronto, Canada).

Méthode CPS :

Les séquences d'impulsion de contraste (CPS) sont implémentées dans le module d'imagerie de contraste des systèmes Acuson (Siemens Healthcare, Mountain View, CA). La méthode CPS est également basée sur la combinaison des modulations de phase et d'amplitude. Une séquence de trois impulsions est transmise telle que : $p_1 = -2p_2 = p_3$. Comparée à la méthode PID, la séquence CPS a montré une augmentation du CTR comprise entre 12 dB ($MI < 0.2$) et 30 dB ($MI > 1$). La transmission de trois impulsions réduit les artéfacts liés aux mouvements de la cible et améliore la suppression de la composante linéaire au détriment de la cadence image.

A travers ces méthodes, le comportement non linéaire des microbulles est à chaque fois exploité pour améliorer la détection des agents de contraste. Actuellement, les modules contrastes disponibles sur les échographes commercialisés utilisent principalement les séquences PI, PM ou encore CPS. Ces techniques sont utilisées en routine lors d'examens cliniques nécessitant l'injection de produits de contraste. Les différents paramètres acoustiques (MI, fréquence) dépendent essentiellement de l'application et de la solution de contraste injectée.

1.4. Quantification de l'imagerie de contraste ultrasonore

Les différentes acquisitions de l'imagerie de contraste ultrasonore ont été réalisées avec un appareil Vevo2100 ou VevoLAZR (Visualsonics) connectés à une sonde linéaire à haute fréquence. L'évaluation de la perfusion placentaire a d'abord été réalisée en mode bolus par analogie avec les techniques utilisées en IRM. Après l'injection des agents de contraste ultrasonores, nous observons les prises de contraste et les retards de perfusion à partir de la cinétique d'intensité du signal représentée graphiquement par une courbe (Fig.3). Ceci permettait de réaliser une analyse semi-quantitative de la vascularisation observée au niveau de régions d'intérêts (ROIS) définies et tracées manuellement sur l'image en contraste, l'image en B-mode conventionnelle ou l'image paramétrique. La quantification de la perfusion placentaire a été réalisée avec le logiciel VevoCQ Software (Visualsonics) après l'extraction des données brutes du Vevo2100 (Visualsonics).

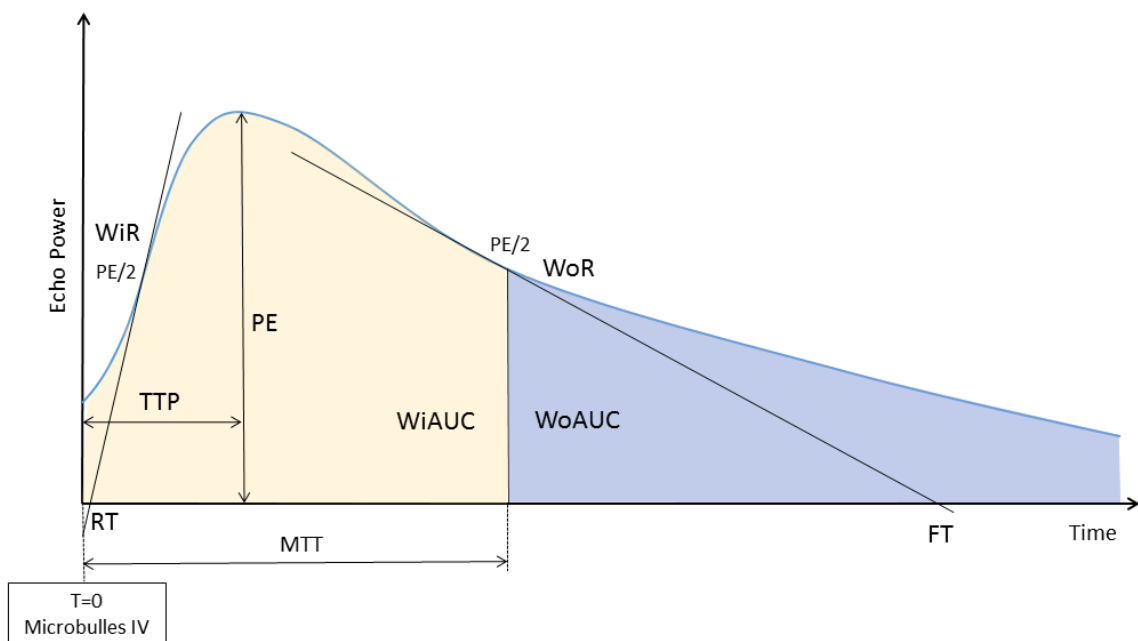


Figure 3 : Etude de la perfusion en mode bolus. Courbe temps-intensité représentant les différents paramètres quantitatifs étudiés en échographie de contraste : le pic d'intensité maximal ou volume sanguin relatif (PE *Peak Enhancement*), la vitesse de remplissage ou débit sanguin relatif (WiR *Wash in Rate*), l'aire sous la courbe (WiAUC *Wash in Area Under the curve*), temps de transit des agents de contraste jusqu'au pic d'intensité maximal (TTP *Time To Peak*), et la vitesse de vidange (WoR *Wash out Rate*). Le *Rise Time* et le *Fall Time* sont obtenus à partir des pentes du *Wash in Rate* et du *Wash out Rate*.

Les paramètres quantitatifs obtenus (Fig.3) à partir du modèle logarithmique fournissent des informations sur la densité du réseau micro-vasculaire pour le maximum d'intensité (*PE : Peak Enhancement*) et l'aire sous la courbe (*WiAUC : Wash-in Area Under the Curve*). Les autres paramètres évaluent le fonctionnement de la micro-circulation comme le délai pour obtenir le maximum d'intensité (*TTP : Time to Peak*), le délai moyen de transit (*MTT : Mean Transit Time*), et les vitesses de remplissage (*WiR : Wash-in rate*) et de vidange vasculaire (*WoR : Wash-out rate*).

Le *WiR* et le *WoR* sont calculés à partir de la droite passant par le *PE/2* et tangente à la pente de rehaussement du signal. Lorsque l'on poursuit ses deux droites jusqu'à l'axe des abscisses, le temps auquel elles coupent cet axe correspond au rise time (*RT*) et au fall time (*FT*). Enfin, l'index de perfusion correspond au rapport *WiAUC/ RT* et est exprimé en [a.u].

Modèle logarithmique :

$$f(t) = O + A \frac{1}{st\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(\ln(t)-m)^2}{2s^2}}, t > 0$$

Où *O*, *A*, *m*, et *s* sont des paramètres d'ajustement de l'équation et *Rise Time (RT)*, *Time to Peak (TTP)*, *Wash in Rate (WiR)*, and *Peak Enhancement (PE)* sont tous des paramètres quantitatifs du modèle bolus. Source : *VevoCQ (Visualsonics Inc., Toronto, Canada)*.

Par ailleurs, plutôt que d'étudier la perfusion en mode bolus, c'est-à-dire comme nous venons de le décrire en observant l'arrivée des microbulles dans les tissus, il est possible d'observer la reperfusion des tissus après destruction première des microbulles d'une région d'intérêt. Cette séquence de destruction-reperfusion est présentée dans le chapitre 2 partie 4 qui traite de l'étude de la perfusion au sein de l'unité fœto-placentaire au cours de la gestation physiologique de la rate.

Ce mode implique une phase de destruction des microbulles sous l'effet d'une série d'ondes ultrasonores destructrices. Cette approche permet d'obtenir une reperfusion très

rapide et donc de s'affranchir des mouvements posant problème lors de la quantification en mode bolus. De plus, ce mode destructif permet de s'affranchir des variations de concentration des microbulles lors des différentes injections d'agents de contraste ultrasonores. La destruction des microbulles permet d'intégrer parfaitement les microbulles à la circulation générale, qui circulent de façon plus homogène et continue afin d'obtenir une concentration constante. Le mode de destruction peut alors se modéliser par une exponentielle décroissante en l'absence du phénomène de perfusion. Les paramètres extraits sont liés à l'indice de perfusion : le volume sanguin relatif (*rBV relative Blood Volume*) et le flux sanguin relatif (*rBF relative Blood Flow*).

Chez le petit animal, comme étudié dans ce travail ce mode destructif ne semble pas apporter un intérêt majeur du fait du faible volume sanguin total. De plus, pour s'approcher des paramètres étudiés en IRM nous avons préférentiellement étudié le mode bolus.

1.5. Appareils d'échographie utilisés

Les trois appareils d'échographie utilisés dans ce travail sont l'Acuson Séquoia 512 (Siemens Medical System, Mountain View, CA) muni d'un transducteur linéaire 15L8 avec une fréquence centrale de 14 MHz ; le Vevo2100 (Visualsonics Inc, Toronto, Canada) muni d'un transducteur linéaire MS250 avec une bande passante de 8 – 30 MHz et une fréquence centrale de 21 MHz ; et d'un VevoLAZR (Fujifilm Visualsonics Inc., Toronto, Canada) connecté à une sonde de 21 MHz (LZ-250; résolution axiale de 75 μm) utilisé pour l'imagerie photoacoustique (Fig.4).

Les techniques d'imagerie utilisées par l'échographe de Siemens et de Visualsonics sont différentes. Le Séquoia 512 de Siemens utilise les séquences d'impulsion de contraste alors que le Vevo2100 et le VevoLAZR de Visualsonics utilisent de l'imagerie par modulation d'amplitude comme décrit ci-dessus.

L'échographe Séquoia 512 a été utilisé uniquement pour l'étude des Doppler des artères utérines et arquées réalisée lors de la première expérimentation de la perfusion au cours de la gestation physiologique de la rate présentée dans le chapitre 2. Ce choix avait été fait car le laboratoire disposait du Vevo2100 avec un mode contraste mais sans mode Doppler couleur

ce qui constituait un facteur limitant pour l'analyse des Doppler. Par la suite, nous avons utilisé l'échographe de Visualsonics pour réaliser l'ensemble de nos expérimentations en échographie de contraste. D'une part, car cet appareil dispose d'une sonde haute fréquence à 21 MHz permettant d'obtenir une excellente résolution sur l'imagerie du petit animal et notamment d'identifier différentes régions d'intérêt au sein du placenta. D'autre part, pour des soucis de reproductibilité nous avons essayé de limiter les appareils utilisés.



Figure 4 : Appareils d'échographie utilisés pour les différentes expérimentations présentées

Chapitre 2

Echographie de contraste au cours de la gestation
physiologique de la rate

2. Echographie de contraste au cours de la gestation physiologique de la rate

2.1. Description échographique et histologique de l'unité fœto-placentaire de la rate

2.1.1 Echo-anatomie de l'unité fœto-placentaire de la rate

L'utérus de la rate est bicorné. Les embryons sont répartis dans chacune des cornes avec en moyenne 6 embryons par corne. La vascularisation utérine est assurée par les artères utérines droite et gauche. Elles réalisent une vascularisation proximale par des branches de l'artère iliaque commune et une vascularisation distale par des branches de l'aorte. Les artères utérines donnent ensuite naissance aux artères arquées et aux artères radiales. Cette distribution vasculaire étagée et en boucle permet d'assurer une perfusion optimale de l'ensemble de la corne utérine.

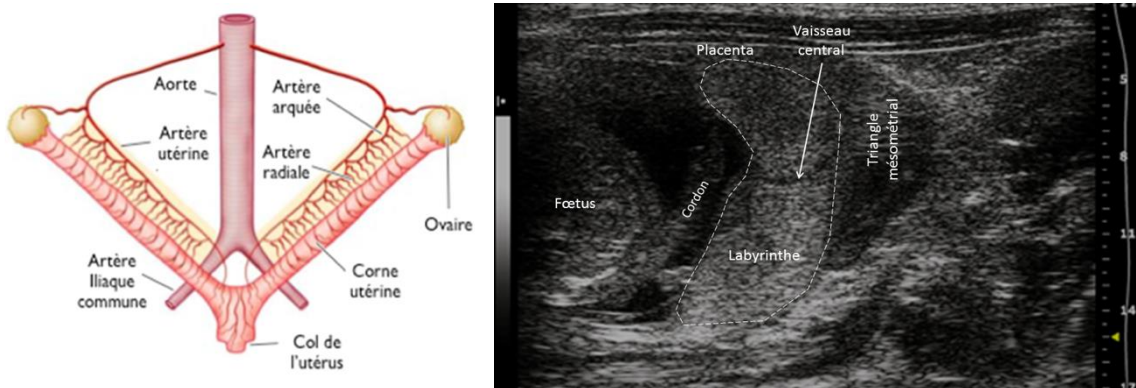


Figure 5 : A – Description anatomique de l'utérus et de la vascularisation utérine de la rate. B – Echographie en mode B (Vevo2100, Visualsonics) d'une unité fœto-placentaire au 17^{ème} jour de gestation de la rate. On visualise d'une part, le triangle mésométrial et le placenta au sein duquel on peut individualiser le labyrinthe et le vaisseau central maternel. D'autre part, on repère le fœtus et le cordon ombilical.

L'unité fœto-placentaire est définie par le fœtus, le placenta et son site d'implantation correspondant au triangle mésométrial (Fig.5). Ces différentes régions sont très bien visualisées en échographie à haute résolution. L'échographie Doppler énergie ou couleur ne permet cependant pas d'apprécier la perfusion de la chambre intervillieuse, c'est-à-dire du labyrinthe chez la rate (Fig. 6).

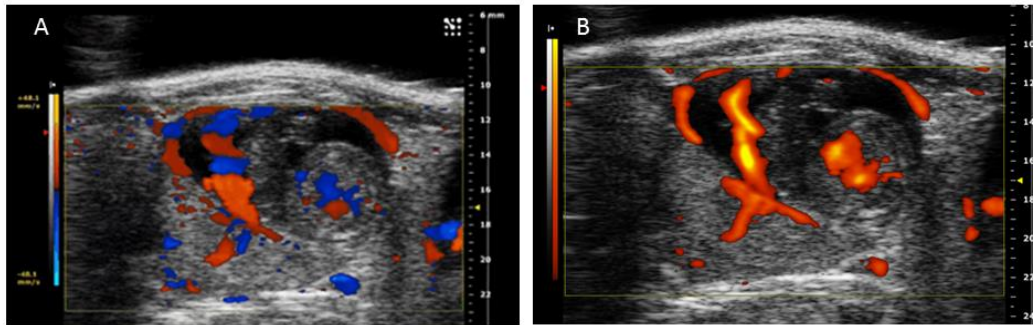


Figure 6 : Echographie Doppler du placenta de rate au 17^{ème} jour de gestation. La partie **A** est une acquisition en Doppler couleur et la partie **B** une acquisition en Doppler énergie (Vevo2100, Visualsonics). Les vaisseaux de gros calibre comme le vaisseau central maternel et le cordon ombilical, sont bien visualisés à la différence de la microcirculation placentaire du labyrinthe qui n'est pas visible.

La vascularisation utérine maternelle arrive au niveau du triangle mésométrial par les artères radiales puis traverse le placenta au niveau du vaisseau central maternel jusqu'à la plaque chorale (Fig. 7). Le vaisseau maternel principal se divise en deux branches principales qui se ramifient en de plus petites branches qui perfusent le labyrinthe. Le labyrinthe correspond à un ensemble très dense de vaisseaux de petits calibres. Il s'agit de la zone d'échange materno-fœtale. Le placenta de la rate est de type hémochorial il n'y a donc pas de mélange des deux circulations.



Figure 7 : Echographie de contraste traitement du signal en MIP. Arrivée des agents de contraste échographique au niveau du placenta au 19^{ème} jour de la gestation de la rate.

Les régions visualisées en échographie correspondent aux régions histologiques du même nom. Il n'est toutefois pas possible de différencier précisément la limite entre le labyrinthe placentaire et le trophospongium.

2.1.2 Histologie placentaire de la rate

Analyse histologique

Des coupes en histologie conventionnelle du placenta de la rate retrouvent le triangle mésométrial qui correspond au point d'ancrage du placenta dans les tissus maternels et la zone d'arrivée de la perfusion maternelle. Les vaisseaux se regroupent à ce niveau pour donner un vaisseau de plus gros calibre qui traverse de façon rectiligne la partie centrale du placenta jusqu'à la plaque choriale. Le vaisseau central principal se divise ensuite en deux branches qui vont se ramifier en vaisseaux de plus petit calibre pour vasculariser le labyrinthe qui correspond à la chambre intervillieuse où se situent les échanges materno-fœtaux. La perfusion du labyrinthe se propage dans le sens inverse de la perfusion du vaisseau rectiligne central, elle est centrifuge. La figure représente une coupe histologique transversale passant par la partie centrale du placenta (Fig. 8).

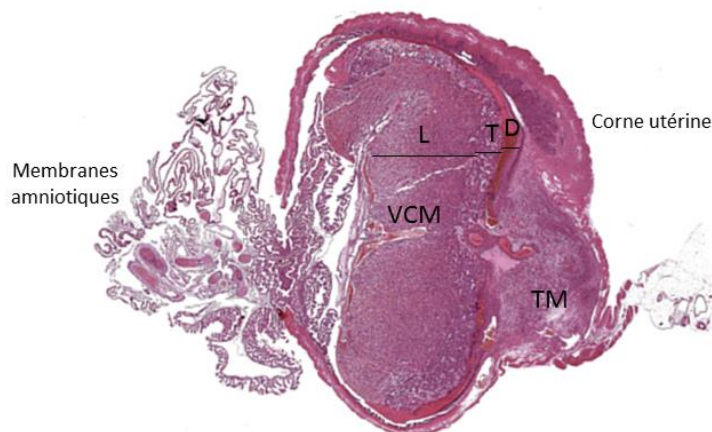


Figure 8 : Analyse histologique du placenta et de son site d'implantation au 20^{ème} jour de gestation (44). La coupe est préparée selon le protocole Hematoxylin et Eosine passe par le plan médian du placenta. Les différentes zones histologiques légendées sont : (L) labyrinthe, (T) trophospongium, (VCM) vaisseau central maternel, (D) zone déciduale et (TM) triangle mésométrial.

Analyse en microscopie électronique à transmission

Pour mieux comprendre la constitution du placenta et les zones d'échanges, et ainsi mieux interpréter nos paramètres de perfusion nous avons réalisé une analyse ultra structurale du placenta de la rate Sprague Dawley au 20^{ème} jour de gestation par microscopie électronique à transmission (MET). Les différentes zones et leurs fonctions sont présentées.

Du fœtus vers la rate, le placenta contient à la fois des cellules d'origine fœtale et maternelle. Il est sous- divisé en trois zones distinctes (Fig.9) :

- Le labyrinthe : une multitude de lacunes sanguines maternelles dans lesquelles plongent des vaisseaux fœtaux avec une structure très intriquée.
- Le trophospongium ou zone jonctionnelle : un compartiment cellulaire constitué de deux types cellulaires avec une migration cinétiquement différente.
- La déciduale.

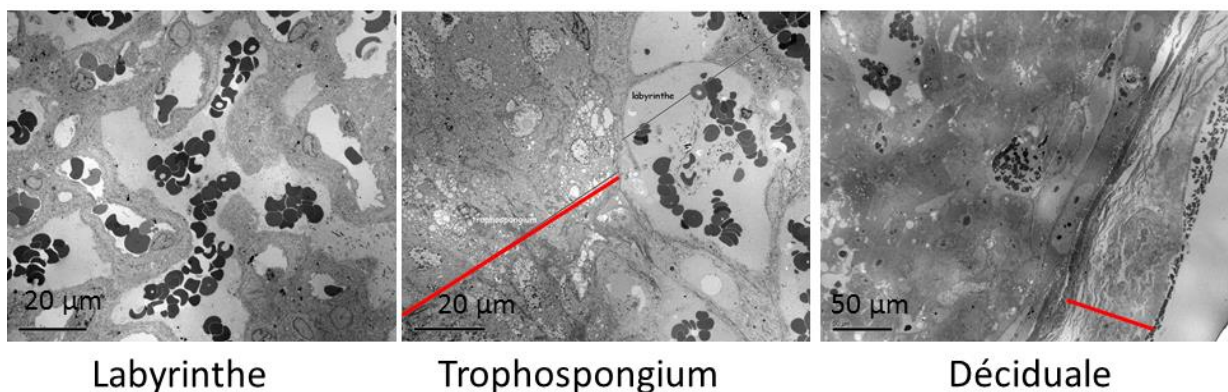


Figure 9 : microscopie électronique à transmission montrant les trois zones histologiques étudiées sur le placenta de la rate.

Le labyrinthe

Le labyrinthe de la rate est une structure trichoriale, les vaisseaux maternels sont bordés par 3 couches de cellules épithéliales d'origine trophoblastique (Fig.10).

- La couche trophoblastique 1 (cytotrophoblast layer), légendée t1 est en contact direct avec la lumière du vaisseau maternel et représente la couche la plus fine des trois. Elle est composée d'un épithélium plus ou moins jointif de type « endothéliforme fenêtré »

(cellule très fine, très étalée avec un noyau occupant une grande majorité du volume total cellulaire). Il n'y a pas de microvillosités au pôle apical de la cellule, quelques protrusions sont toutefois visibles. La couche 1 met régulièrement en évidence des perforations qui permettent de mettre directement en contact la couche syncytiale (couche 2) avec le sang maternel. Ponctuellement, les cytotrophoblastes peuvent créer des ponts cytoplasmiques entre 2 faces d'un même capillaire maternel.

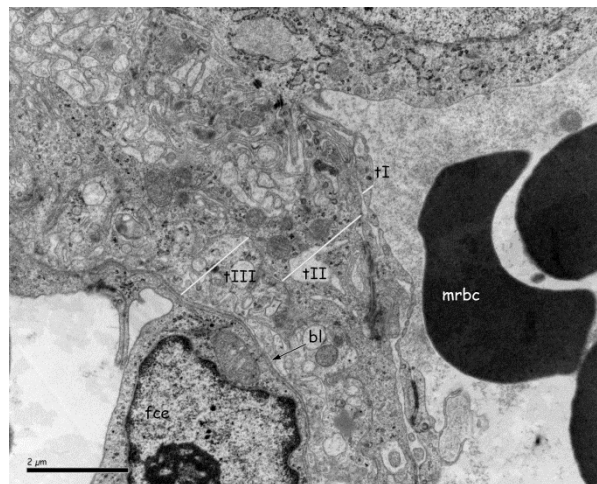


Figure 10 : Observation en MET des 3 couches trophoblastiques du cytotrophoblaste. La couche 1 est la plus fine et est composée d'un endothélium fenêtré. La couche 2 est en contact direct avec le sang maternel et est le site de nombreux échanges. La couche 3, la plus épaisse et la plus jointive est très active en termes de dégradation cellulaire. Echelle de 2 µm.

- La couche trophoblastique 2 (the first syncytial trophoblast layer), légendée tII, est faiblement liée à la couche 1 par quelques jonctions desmosomales. Cette couche 2 est en contact direct avec le sang maternel, on observe de nombreux espaces d'échanges générés par la présence de nombreuses invaginations, de replis membranaires réalisés par cette première couche syncytiale (Fig. 11). La présence de ces circonvolutions a pour but d'augmenter la surface d'échange entre le sang maternel et la face apicale de cette couche cellulaire. Cette couche 2 représente la couche la plus active en termes d'endocytose, d'échange, avec de très nombreuses vésicules de transport. Il existe également une prédominance ribosomale, soit libre dans le cytosol, soit lié au reticulum endoplasmique. Cette couche semble également la plus riche en organites et en vacuolisation cytoplasmique.

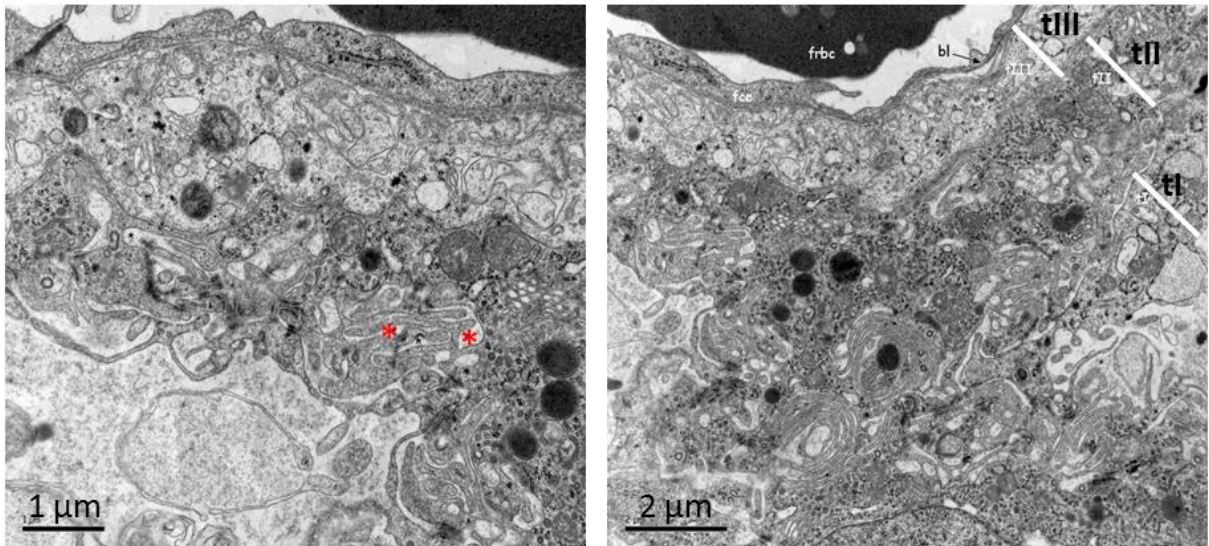


Figure 11 : Couches trophoblastiques du labyrinthe, observées en MET. A gauche de la figure, la couche trophoblastique 2 est la plus active elle présente de nombreux replis membranaires et des invaginations (astérisques rouge). La partie de droite montre les nombreux échanges avec les vésicules de transport et les ribosomes.

- La couche trophoblastique 3 (the second syncytial trophoblast layer), légendée tIII, représente la couche la plus jointive. En effet, de très nombreuses jonctions assurent une bonne étanchéité entre les couches 2 et 3. Cette couche est électroniquement la moins dense et la plus épaisse. Elle semble très active en termes de dégradation cellulaire, avec de nombreuses vacuoles autophagiques à double membrane. Au pôle basal de ces cellules, de nombreuses interdigitations augmentent les surfaces d'échanges (Fig. 12).

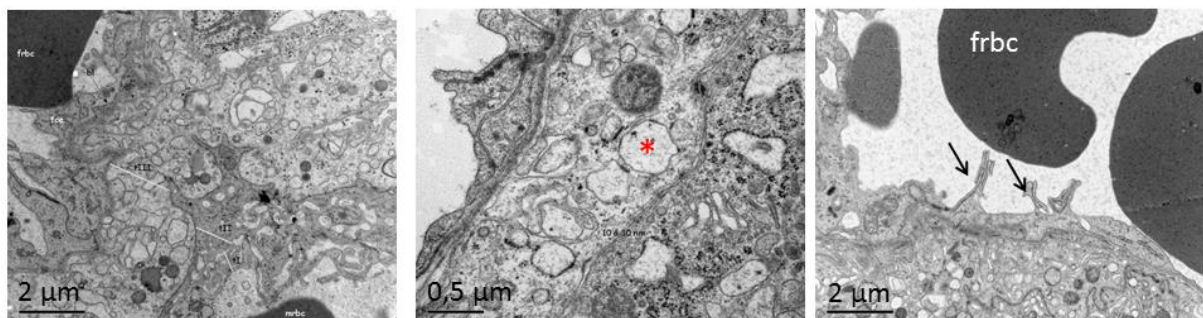


Figure 12 : Couche trophoblastique 3 du labyrinthe, observée en MET. Il s'agit d'une couche très jointive et la couche la plus active sur le plan de la dégradation cellulaire. On visualise des vacuoles autophagiques (astérisque rouge). L'image la plus à droite montre des villosités situées au pôle basal des cellules (flèches noires).

Sous ces 3 couches de cellules, la couche trophoblastique 3 repose sur la lame basale, légendée bl. Sous cette lame basale se trouve l'endothélium foetal, légendé fce, plus ou moins fenêtré (Fig. 13). Les cellules endothéliales reconnaissables par la présence de nombreuses cavéoles assurent les phénomènes de transcytose entre le sang foetal et le trophoblaste, et inversement.

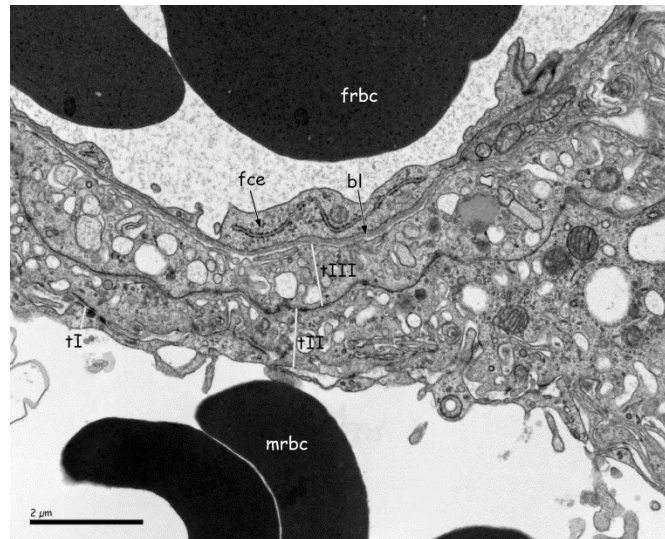


Figure 13 : Au-delà de la couche 3, visualisation en MET à l'échelle de 2 µm de la lame basale sous laquelle se trouve l'endothélium foetal (fce).

Dans le labyrinthe, le diamètre des vaisseaux maternels (mrbc) se situe entre 20 et 200 µm, celui des vaisseaux fœtaux (frbc) entre 5 et 15 µm. Les capillaires fœtaux sont facilement reconnaissables par la présence d'érythroblastes dans leur lumière.

Le labyrinthe renferme également un vaisseau central maternel de 50 à 100 µm de diamètre, entouré d'une couche de cellules endothéliales, d'une lame basale puis d'une voire deux couches de cellules musculaires lisses. Par endroits, il semble que le vaisseau central maternel soit entouré par une zone capsulaire directement en contact avec les différentes couches du labyrinthe.

Le trophospongium

Depuis le labyrinthe vers la déciduale, nous avons observé :

- Majoritairement des cellules de types spongiotrophoblastes, avec un reticulum endoplasmique granulaire extrêmement dilaté. Entre ces cellules sont présentes des jonctions de type desmosomal et de structures granulo-fibrillaires.
- De nombreux vaisseaux et sinus veineux bordés par les spongiotrophoblastes (Fig. 14) qui renferment des hématies maternelles. Ils ont un calibre deux à trois fois supérieur aux vaisseaux du labyrinthe.
- Plus rarement des cellules riches en glycogènes ou trophoblastes, regroupées en clusters. Elles sont déjà présentes au milieu des spongiotrophoblastes mais leur nombre augmente au fur et à mesure qu'on se rapproche de la déciduale. Au fur et à mesure de la gestation ces cellules migrent vers la déciduale.
- Des giant cells avec un reticulum endoplasmique granuleux classique à la limite du trophospongium/déciduale. Des interdigitations et des jonctions serrées sont présentes entre les cellules.

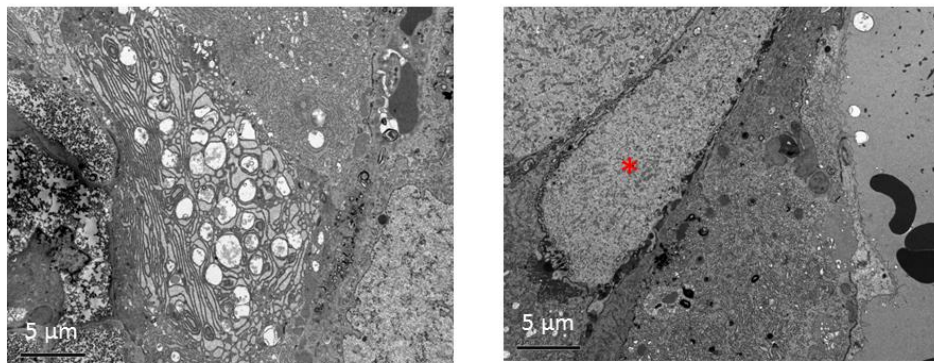


Figure 14 : Trophospongium visualisé en MET. L'astérisque rouge montre les spongiotrophoblastes.

La déciduale

Est difficilement explorée après décollement du placenta.

2.2. Reproductibilité de la mesure

La reproductibilité de la mesure est fondamentale pour étendre l'application de l'échographie de contraste cependant elle est peu étudiée dans la littérature. Afin d'évaluer la fiabilité de nos mesures nous avons souhaité étudier la reproductibilité de la méthode de quantification de la perfusion placentaire par échographie de contraste.

2.2.1 Matériel et méthode

L'étude a été réalisée à partir d'un modèle murin de RCIU par ligature de l'artère utérine. Onze rates Sprague Dawley (CERJ, Le Genest Saint-Isle, France) avaient une échographie de contraste au 19^{ème} jour de gestation avec une analyse qualitative et quantitative du rehaussement observé. Toutes les expérimentations ont été menées conformément aux directives institutionnelles et aux recommandations Françaises pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire.

Les agents de contrastes échographiques étaient dilués dans du sérum physiologique afin d'obtenir une concentration de $1,2 \times 10^{10}$ microbulles/mL. Deux cent microlitres de solution d'agents de contrastes Definity (Lantheus Medical Imaging ; Billerica, MA) était injectée manuellement par le même opérateur au niveau d'un cathéter de 24-gauge positionné dans la veine caudale de la rate. Après l'injection de la solution, 50 μ L de sérum physiologique étaient injectés dans le cathéter afin de réduire la part d'agent de contraste dans l'espace mort de la tubulure. L'enregistrement du clip vidéo était débuté de façon synchrone avec l'injection des agents de contraste, par un autre opérateur. Les clips étaient enregistrés sur une durée de 2min 30s. Lorsque plusieurs injections étaient réalisées sur la même rate, le délai entre deux injections était d'au moins 15 minutes. Le nombre d'injection maximal était de 3 par animal. L'acquisition du clip vidéo était réalisée à partir d'un Vevo2100 (Visualsonics Inc, Toronto, Canada) muni d'un transducteur linéaire MS250 avec une bande passante de 8 – 30 MHz et une fréquence centrale de 21 MHz. Les paramètres échographiques étaient identiques pour toutes les acquisitions, seule la focale était centrée sur la zone d'intérêt. Ceux-ci comprenaient une puissance de 100%, une cadence image de 10 Hz, une courbe de compensation du gain en profondeur (*Time Gain Compensation* TGC) linéaire et un gain de 20 dB.

Les ROIS étaient tracées manuellement par deux opérateurs formés selon une méthodologie prédéfinie. La première ROI contournait le vaisseau maternel principal et ses deux branches principales à 120 frames soit 12s après le début de l'injection. Ce temps permettait d'obtenir le rehaussement du vaisseau. La seconde ROI correspondait à la totalité du placenta. Afin de bien déterminer ses contours, le clip était d'abord visionné en totalité puis les points étaient tracés en vérifiant leur positionnement au niveau de l'image échographique en B-mode. La troisième ROI correspondait au labyrinthe c'est-à-dire que ses contours excluaient la zone du vaisseau maternel et englobaient tout le reste du placenta. Les courbes ajustées résultantes étaient utilisées pour estimer les paramètres fonctionnels comme le PE, MTT, TTP, WiR et l'AUC.

L'analyse suivait les recommandations pour l'étude de la reproductibilité (*Guidelines for Reporting Reliability and Agreement Studies*) (45). La reproductibilité de chacun des paramètres quantitatifs a été évaluée sur 60 mesures entre deux opérateurs (C.A, V.M) en aveugle pour la reproductibilité inter-observateur, et sur 60 mesures réalisées à 1 mois d'intervalle par le même opérateur (C.A) en aveugle des premières mesures pour la mesure intra-observateur.

La reproductibilité intra et inter-observateur était ensuite évaluée par des coefficients de corrélation intraclass (CCI) associée à la représentation graphique de Bland et Altman correspondante avec les intervalles de confiance de l'agrément à 95%. Les valeurs de CCI inférieures à 0,20 définissaient une corrélation très faible, celles entre 0,21 et 0,40 une corrélation faible, de 0,41 à 0,60 une corrélation modérée, de 0,61 à 0,80 une corrélation bonne et enfin de 0,81 à 1,00 une excellente corrélation (46).

2.2.2 Résultats

La reproductibilité intra-observateur était excellente pour chacun des paramètres étudiés avec des CCI allant de 0,96 à 0,98. La reproductibilité inter-observateur était bonne pour le PE, TTP et le WiAUC avec des CCI de 0,89 et 0,91. Alors que le WiR présentait un CCI plus faible de 0,80 (Tableaux 1 et 2). Les graphiques de Bland et Altman correspondants sont représentés Figures 15 et 16.

Tableau 2 : Coefficients de corrélation intraclasse de chacun des paramètres quantitatifs de l'échographie de contraste et leur intervalle de confiance à 95% permettant d'étudier la variabilité inter-observateur de la mesure.

Paramètre contraste	Variabilité inter-observateur	
	Limites d'agréments à 95 %	CCI (IC 95 %)
PE	-91,76 – 86,41	0,91 (0,85 – 0,98)
TTP	-14,90 – 16,41	0,90 (0,74 – 0,97)
WiR	-48,60 – 43,14	0,80 (0,77 – 0,98)
WiAUC	-665,28 – 643,56	0,89 (0,76 – 0,95)

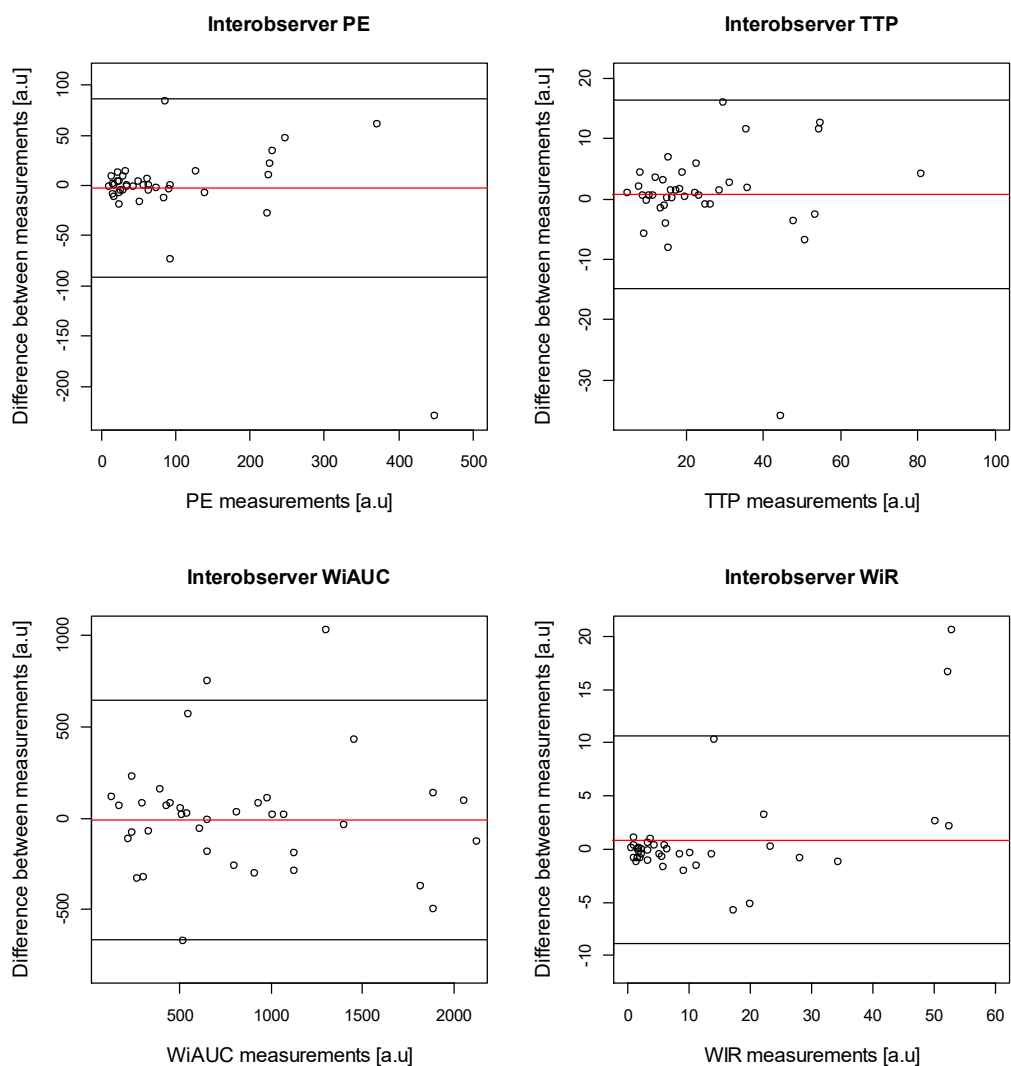


Figure 15 : représentation graphique de Bland et Altman permettant d'étudier la variabilité inter-observateur de la mesure des paramètres quantitatifs étudiés en échographie de contraste.

Tableau 1 : Coefficients de corrélation intraclasse de chacun des paramètres quantitatifs de l'échographie de contraste et leur intervalle de confiance à 95% permettant d'étudier la variabilité intra-observateur de la mesure.

Paramètre contraste	Variabilité intra-observateur	
	Limites d'agrèments à 95 %	CCI (IC 95 %)
PE	-39,62 – 49,29	0,98 (0,96– 0,99)
TTP	-19,76 – 18,02	0,97 (0,96 – 0,98)
WiR	-10,75 – 13,18	0,97 (0,94 – 0,99)
WiAUC	-455,22 – 493,26	0,96 (0,93 – 0,97)

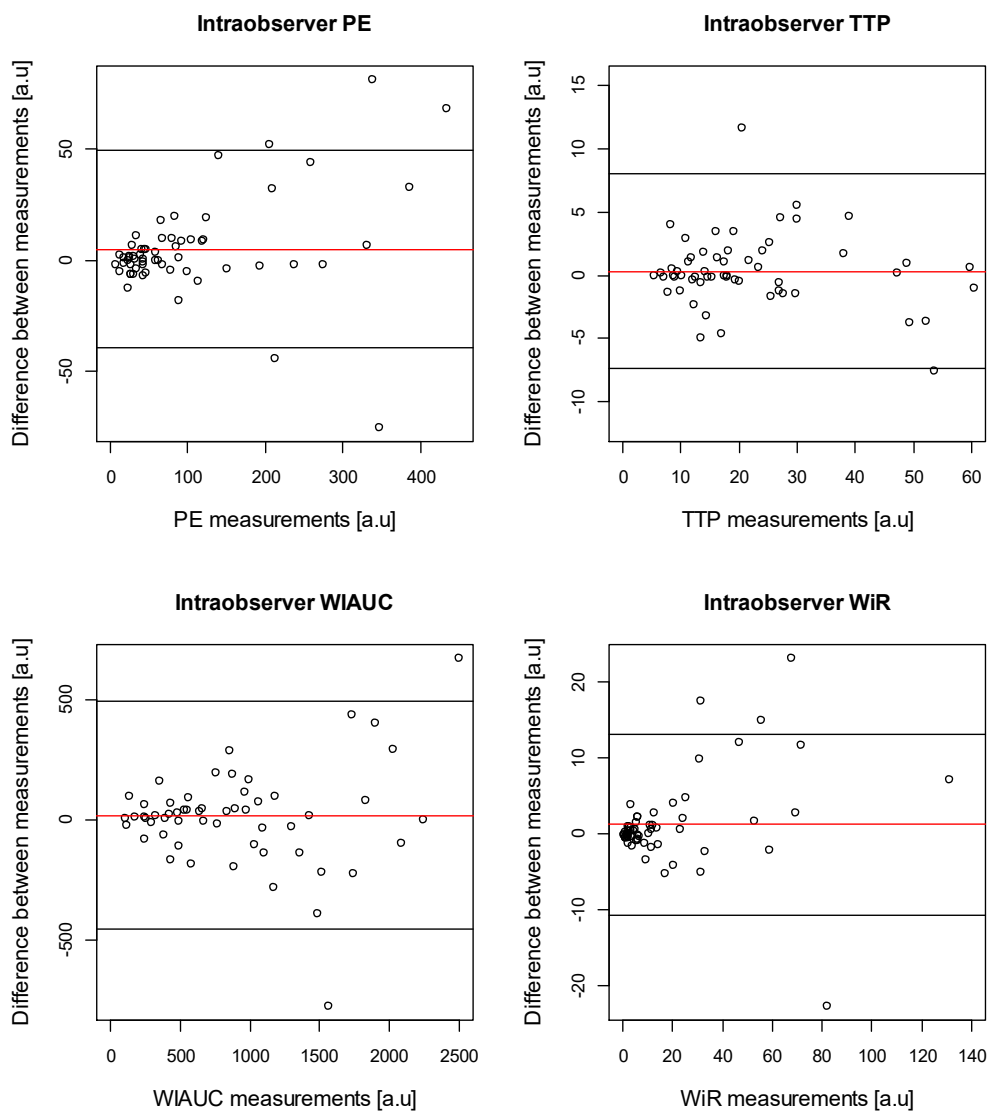


Figure 16 : représentation graphique de Bland et Altman permettant d'étudier la variabilité intra-observateur de la mesure des paramètres quantitatifs étudiés en échographie de contraste

2.2.3 Discussion

La concentration et la taille des agents de contraste influence ses propriétés acoustiques, sa force de radiation et son échogénéicité. La concentration des agents de contraste lors de leur arrivée sur la zone à étudier influence également le PE et le WiR. Au cours de nos différentes manipulations nous avons pu confirmer la variabilité de cette prise de contraste qui peut être augmentée par l'injection manuelle des agents de contraste. Ainsi, il existe des dispositifs automatisés qui contrôlent la concentration, le volume et la vitesse d'injection des agents de contraste afin d'améliorer la reproductibilité de la mesure (47). Nous n'avons pas utilisé ce dispositif. Dizeux et *al.* l'ont testé sur la perfusion rénale et tumorale de souris et ont montré que ce dispositif permettait d'améliorer la reproductibilité de la mesure.

La concentration des agents de contraste utilisée est un paramètre important pour éviter la saturation du signal ou les cônes d'ombres acoustiques. Pour nos expérimentations nous avons suivi les recommandations du fabricant. Il a également été montré que le PE et l'AUC variait de façon linéaire avec la concentration des agents de contraste utilisée (48).

Par ailleurs, certains auteurs ont rapportés une modification des paramètres de perfusion lorsque les injections des agents de contraste étaient répétées au niveau de tumeurs (49) mais ils ne mettaient pas en évidence ce phénomène au niveau rénal. Ceci pouvait être expliqué par les modifications de la circulation au sein d'une tumeur. Nous n'avons pas mis en évidence de modifications significatives des paramètres de perfusion au niveau du placenta après des injections successives. Le délai de 15 minutes apparaît suffisant pour l'élimination des agents de contraste dans la circulation générale.

2.2.4 Conclusion

La reproductibilité de nos mesures était bonne mais pourrait probablement être améliorée en utilisant un dispositif d'injection contrôlé. D'après nos observations le placenta présente un remplissage et une vidange rapide non modifiée malgré les injections répétées des agents de contraste.

2.3. Innocuité de la procédure

Les agents de contraste ultrasonores sont largement utilisés chez l'homme, ils présentent très peu d'effets secondaires et les réactions d'hypersensibilité sont également peu fréquentes (0,002%) (31). De plus, ils ne présentent pas de néphrotoxicité ni d'interaction avec la thyroïde. La procédure de l'échographie couplée aux ultrasons peut cependant induire des effets biologiques comme des phénomènes de cavitation, d'hémorragie et d'apoptose cellulaire. Les études montrent que ces effets surviennent avec des index mécaniques élevés. Ces modifications tissulaires ont pu être observées pour des MI supérieurs à 0,4 en présence d'agents de contraste ultrasonores (50). Cependant, l'utilisation d'agents de contraste échographiques au cours de la grossesse soulève encore des questions. Ainsi, les femmes enceintes n'ont pas été incluses précédemment dans les essais cliniques. Les principales préoccupations au niveau de la circulation placentaire sont le passage de la barrière placentaire par les agents de contraste, le déplacement de l'agent de contraste dans la microcirculation maternelle, l'activation du complément et des marqueurs de l'apoptose cellulaire, et le phénomène de cavitation pouvant entraîner des microhémorragies.

De nombreuses études précliniques et cliniques permettent de répondre à une partie de ces questions et sont rassurantes. Tout d'abord, les agents de contraste sont de grande taille (plusieurs μm de diamètre) ceci explique que leur passage transplacentaire semble difficile. En effet, deux études portant sur 5 macaques (Levovist[®]) et 3 macaques (Aerosome[®]) n'ont pas retrouvées de passage transplacentaire. Notre étude réalisée sur 11 rates gestantes a confirmé l'absence de passage transplacentaire des microbulles Vevo MicroMarker[®] (44).

Concernant les conséquences de l'échographie de contraste sur le fœtus, Ragavendra et al. s'étaient également intéressés au suivi du rythme cardiaque fœtal lors de la procédure. Aucune anomalie n'a été détectée. Une autre équipe a mené une étude sur 4 macaques au début de la gestation avec un suivi jusqu'à la naissance (51). Parmi les 4 nouveaux-nés : 3 étaient nés en bonne santé, et un était mort-né à terme. L'examen foetopathologique a pu identifier de nombreuses malformations responsables du décès. La première utilisation des agents de contraste au cours de la grossesse de la femme a été décrite en 1999. Les auteurs ont étudié la vascularisation placentaire en Doppler énergie sans et avec l'injection de microbulles Levovist[®] au troisième trimestre de la grossesse chez 25 femmes, parmi lesquelles 8 fœtus présentaient un RCIU. Ces derniers ne retrouvaient pas de différence d'intensité du signal

Doppler entre les fœtus de poids normal pour le terme et ceux présentant un RCIU (52). Dans une autre étude, la même équipe a évaluée les effets des agents de contraste sur 69 fœtus en surveillant l'enregistrement du rythme cardiaque fœtal, l'hémodynamique fœtale et l'examen clinique de nouveau-né (32). L'évaluation du fœtus au cours de la procédure ne montrait aucun retentissement sur le rythme cardiaque fœtal ni sur la vitesse de l'artère ombilicale dans les 5 minutes qui suivaient l'injection des microbulles. L'examen clinique du nouveau-né comportait le poids de naissance, les pH, la détresse respiratoire, l'hémorragie anténatale et l'examen macroscopique du placenta. Les auteurs ne décrivaient aucun retentissement maternel ni fœtal de l'échographie de contraste.

Une équipe s'est intéressée à la perfusion placentaire par échographie de contraste des grossesses gémellaires monochoriales biamniotiques afin de mieux repérer les anastomoses artério-veineuses responsables de pathologies sévères pour les fœtus (53). Parmi les 14 grossesses étudiées, aucun effet n'a été mis en évidence sur les fœtus.

Hua et *al.* ont étudiés parmi 60 rates les effets de l'échographie de contraste sur la perméabilité de la barrière placentaire (34). L'étude portait sur les variations de l'index mécanique et le caractère continu et intermittent de l'insonation, avec du Sonovue[®]. Le passage transplacentaire était évalué en fluorescence par la présence de Bleu Evans. Les auteurs concluaient à une absence de modification de la perméabilité placentaire en échographie diagnostique avec du Sonovue[®].

Plus récemment, Roberts et *al.* ont apportés d'autres éléments sur l'innocuité du Definity[®] (33). Les auteurs ont à la fois étudié l'activation du complément, l'apoptose cellulaire du placenta de macaques, et l'ultrastructure placentaire du placenta humain au premier trimestre après l'injection d'agents de contraste. Les résultats ne retrouvaient pas de dommages de la structure du placenta suite à l'échographie de contraste.

Malgré l'ensemble de ces études les recommandations ne sont pas encore favorables à l'utilisation des agents de contraste au cours de la grossesse. A l'occasion de nos expérimentations nous avons pu également avoir quelques données concernant l'innocuité des agents de contraste au cours de la gestation.

L'objectif de notre étude était (1) de démontrer l'absence de modifications de la perméabilité placentaire au cours de séquences de sonoporation, (2) de réaliser une analyse de l'ultrastructure placentaire chez des rates gestantes exposées-non exposées à l'échographie de contraste.

2.3.1 Matériel et méthodes

Toutes les expérimentations ont été menées conformément aux directives institutionnelles et aux recommandations Françaises pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire.

L'étude a été réalisée sur un total de 15 rates Sprague Dawley (CERJ, Le Genest Saint-Isle, France). Parmi les 15 rates, 5 d'entre elles permettaient d'étudier le passage de microbulles par échographie de contraste, 5 autres étaient dédiées à l'étude en sonoporation, et enfin 5 rates ne recevaient aucun agent de contraste et constituaient ainsi le groupe contrôle.

Les rates étaient hébergées à l'animalerie de Tours avec un cycle jour-nuit 12 : 12 heures et une nourriture *ad libitum*. Une période d'acclimatation de 7 jours était respectée avant le début du protocole, et les rates étaient pesées chaque jour. Les rates étaient anesthésiées au masque avec de l'isoflurane (Aerrane, Bayer, France), rasées et un cathéter de 24-gauges était placé au niveau de la veine caudale au 17^{ème} et 20^{ème} jour de la gestation.

La première partie de l'étude correspondait à la réalisation d'échographie de contraste sur 5 rates Sprague Dawley au 17^{ème} jour de gestation afin d'évaluer le passage d'agents de contraste au travers la barrière placentaire et leur arrivée au sein du cordon ombilical et du fœtus. Les échographies étaient réalisées avec le Vevo2100 (Visualsonics) et les microbulles utilisées étaient les Vevo MicroMarker[®].

Dans une deuxième partie au 20^{ème} jour de gestation, une unité fœto-placentaire était localisée en échographie et un repérage au marqueur était positionné sur l'abdomen de la rate. Tout d'abord, le Bleu Evans (1mL/kg) était injecté lentement au niveau de la veine caudale. La sonde d'insonification était mise en place au niveau du repère cutané et tenue par un opérateur pendant que le second injectait des microbulles Vevo MicroMarker[®] (450 µl/kg) suivi de 50 µl de sérum physiologique pour laver le cathéter. Une insonification de 500 kPa, DC : 1%, burst 10 ms, PRF : 1 Hz, était maintenue pendant 2 minutes. Ceci correspond à une intensité 100 fois plus importante que celle utilisée en échographie conventionnelle en mode-B. A la fin de l'insonification, la peau de l'abdomen de la rate était incisée et l'unité fœto-placentaire constituée du placenta et du fœtus était prélevée. Sur la même rate, une unité fœto-placentaire contrôle était également prélevée très à distance du placenta insonifié.

Une analyse macroscopique de l'unité fœto-placentaire était réalisée après son prélèvement. L'objectif était de visualiser le passage de Bleu Evans dans la cavité amniotique ou dans le fœtus. Le liquide amniotique était ensuite prélevé à la seringue afin de réaliser une étude par spectrométrie RMN.

Enfin, dans une troisième partie de l'étude une analyse microscopique des placentas était réalisée. Ainsi, 5 rates Sprague Dawley (CERJ, Le Genest Saint-Isle, France) ayant eue des échographies de contraste diagnostiques réalisées avec le Vevo2100 (Visualsonics) avec un index mécanique de 0,43 et des microbulles Vevo MicroMarker[®] (Visualsonics) étaient comparées à 5 rates Sprague Dawley de même provenance n'ayant pas reçues d'agents de contraste. L'ensemble des rates étaient sacrifiées au 20^{ème} jour de la gestation. Les placentas étaient prélevés par césarienne pour une étude histologique et une étude en microscopie électronique à transmission. Pour l'étude en microscopie optique, les placentas étaient placés dans le formol puis sectionnés et préparés selon un protocole hématoxyline/éosine. Pour l'étude de l'ultrastructure du placenta par microscopie électronique à transmission les placentas étaient mis dans un fixateur puis inclus en paraffine.

2.3.2 Etude en échographie

En échographie en mode B à haute résolution, on visualisait très nettement la morphologie fœtale, on distinguait également le cordon ombilical et son départ du placenta. Le placenta et la corne utérine pouvaient aussi être aisément identifiés (Fig. 17). En mode contraste on ne visualisait ni le placenta ni le fœtus en l'absence d'injection de microbulles. Rapidement, après l'injection des agents de contraste on observait un rehaussement au niveau des tissus maternels puis du placenta. Il n'était pas identifié de prise de contraste au niveau du compartiment fœtal même après un délai de plusieurs minutes.

L'analyse quantitative du pic d'intensité maximal dans la région du placenta, du cordon ombilical et du fœtus confirmait l'absence de prise de contraste dans le compartiment fœtal.

Ainsi, l'analyse qualitative et quantitative en échographie de contraste démontrait l'absence de passage transplacentaire des microbulles Vevo MicroMarker[®].

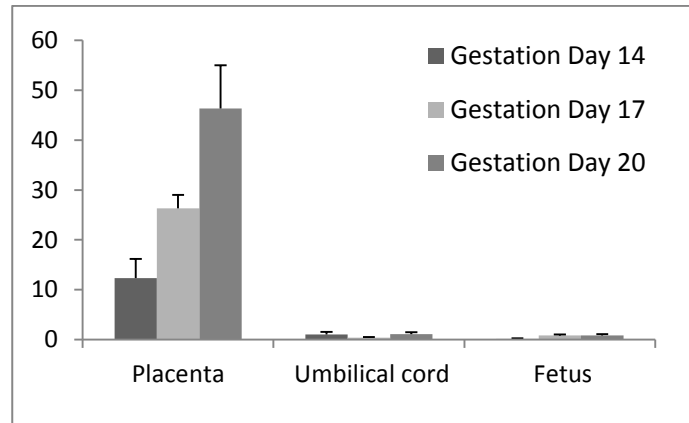
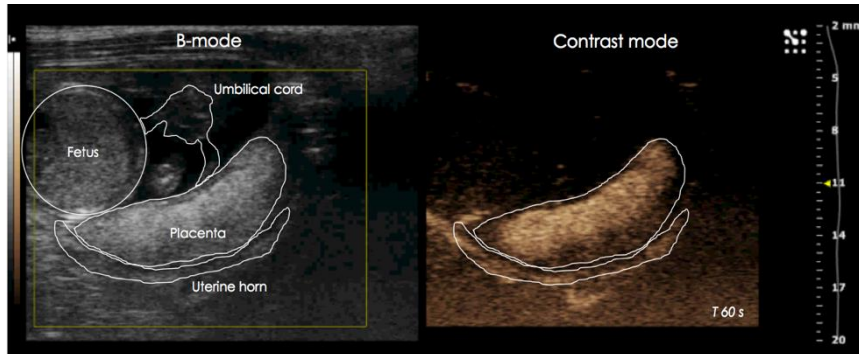


Figure 17 : Echographie en mode B et échographie en mode contraste d'une unité fœto-placentaire au 17^{ème} jour de gestation de la rate, et quantification du pic d'intensité maximal (PE) en échographie de contraste au niveau du placenta, du cordon ombilical et du fœtus aux jours 14, 17 et 20. On visualise nettement le fœtus en mode B alors qu'aucun rehaussement n'est identifiable en mode contraste. Ceci est confirmé en étude quantitative.

2.3.3 Sonoporation et spectrométrie RMN

L'évaluation macroscopique du placenta montrait une coloration bleue intense de l'ensemble du placenta (Fig. 18). Par contre, les vaisseaux des membranes amniotiques le liquide amniotique et le fœtus ne présentaient aucun signe de coloration par le Bleu Evans. Ainsi, on peut conclure que la sonoporation n'est pas responsable d'un passage de Bleu Evans au travers la barrière placentaire et ne semblait donc pas modifier la perméabilité de celle-ci. L'analyse du liquide amniotique en spectrométrie RMN des exposés à la procédure de sonoporation et des contrôles retrouvait une répartition identique des grosses molécules étudiées et des concentrations semblables de chaque molécule dans les deux groupes. L'absence de modification de la composition des liquides amniotiques des fœtus ayant eu une sonoporation comparée aux contrôles était également en faveur d'une absence de perméabilité de la barrière placentaire malgré les séquences de fortes intensités utilisées.

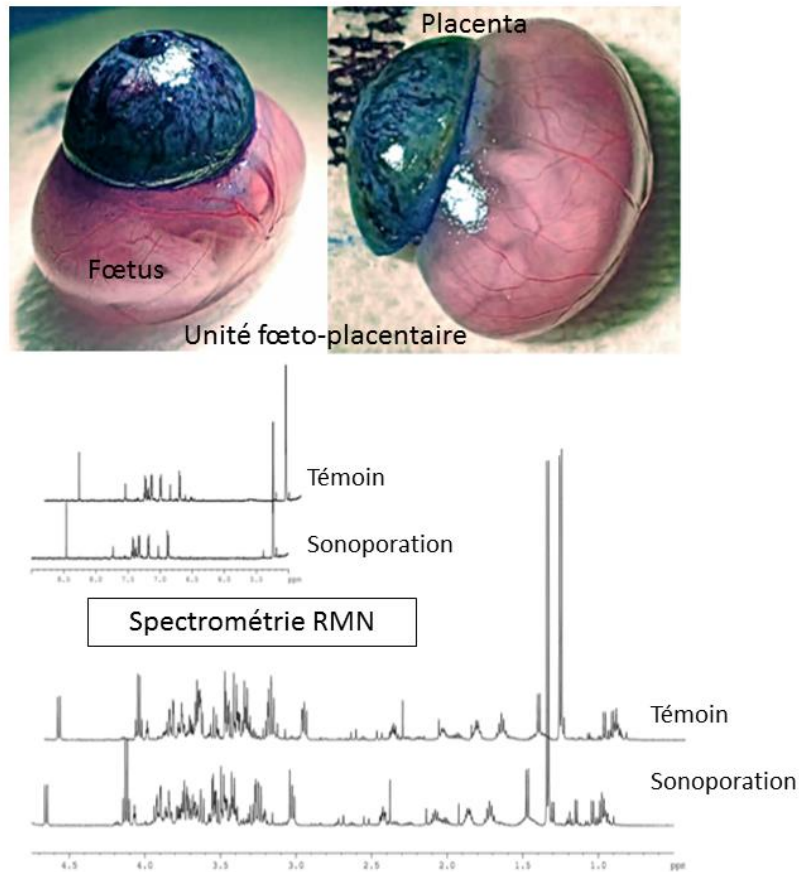


Figure 18 : Prélèvement d'une unité fœto-placentaire dans sa totalité : placenta présentant une coloration bleue intense liée à l'injection de Bleu Evans. La cavité amniotique, les vaisseaux fœtaux et le fœtus eux ne présente aucun signe de coloration par le Bleu Evans. La partie inférieure représente l'analyse en spectrométrie de flux du liquide amniotique des cas et des contrôles. Les molécules représentées sont les mêmes dans des proportions également similaires.

2.3.4 Etude histologique et ultra-structurale

Les prélèvements analysés en microscopie optique ne retrouvaient aucune différence significative entre les échantillons traités ou non par un agent de contraste Vevo MicroMarker[®] (5 rates par groupe). Notamment, il n'a pas été visualisé de phénomène de nécrose, d'hémorragie ou de micro-thrombus au sein du placenta (Fig. 19).

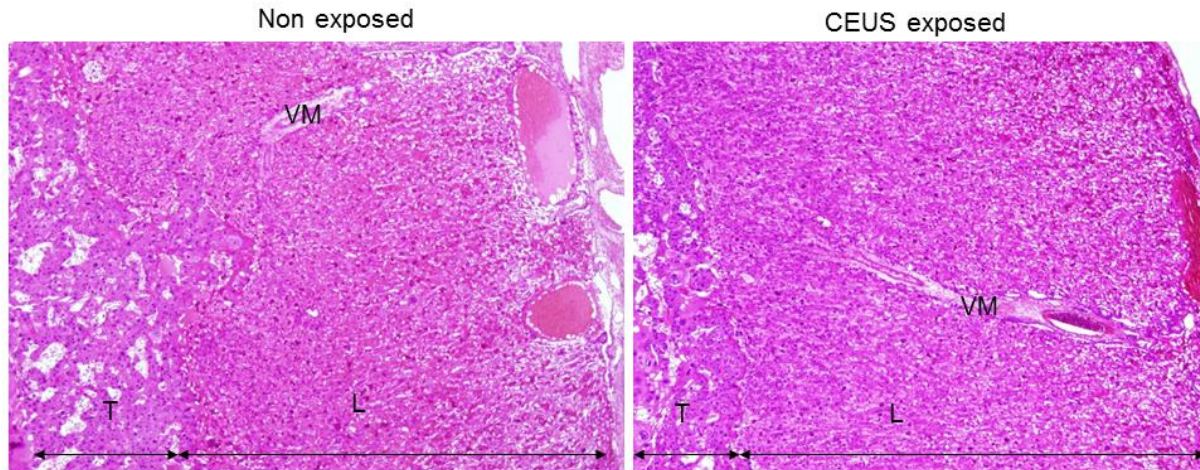


Figure 19 : Coupes histologiques de placentas de rates non exposée et exposée à l'échographie de contraste, après coloration HES observées en microscopie optique avec un grossissement de 2,5. Les différentes régions histologiques sont nommées : le vaisseau maternel (VM), le labyrinthe (L), et le trophospongium (T).

Dans la limite des prélèvements analysés en microscopie électronique à transmission (Fig 20), les biopsies placentaires ne montrent aucune différence ultra-structurale significative entre les échantillons traités ou non par un agent de contraste (5 rates par groupe). L'ultra structure placentaire n'est pas modifiée, la morphologie du trophoblaste et du trophospongium est identique. Dans le placenta traité il n'y a pas plus de phénomène d'endocytose, ni d'autophagie, ni même d'accumulation de produits de contraste dans les différentes assises cellulaires. Il n'existe pas non plus de différence d'épaisseur de couches entre les deux types d'échantillons. Absence d'infiltrat inflammatoire, de fibrose collagène. Il n'a pas été vu de phénomène de nécrose, ni de microthrombus significatif.

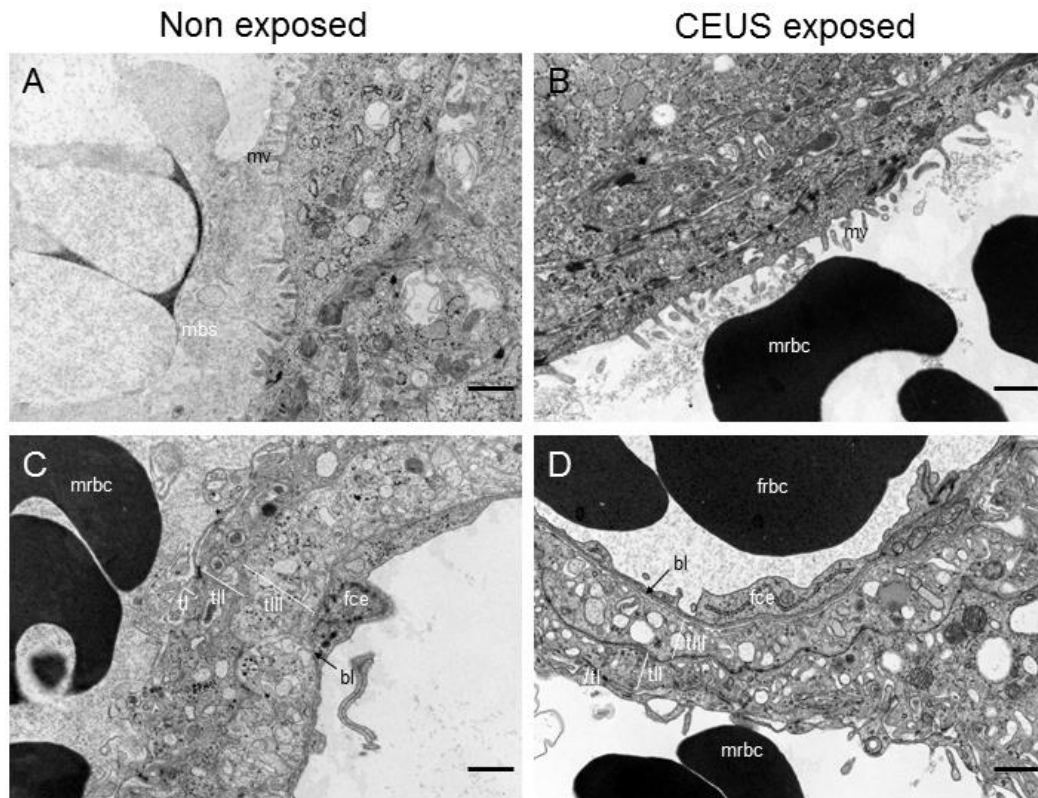


Figure 20 : Analyse ultra structurale du placenta en Microscopie Electronique à Transmission de placenta exposés ou non à la procédure de l'échographie de contraste. Les figures A et B représentent la région du trophospongium avec notamment l'étude de la bordure en brosse (mv : microvilli). Les figures C et D représentent la région du labyrinthe avec les 3 zones individualisables tI, tII et tIII.

2.3.5 Conclusion

Les résultats obtenus sur l'innocuité de la procédure sont rassurants. En effet, aucun passage des agents de contraste échographique n'a été mis en évidence sur le plan macroscopique et microscopique malgré un index thermique élevé et pour un index mécanique de 0,4. De plus, aucune lésion tissulaire n'a été mise en évidence en microscopie optique ni en microscopie électronique à transmission. D'autre part, sur l'ensemble des expérimentations réalisées aucune malformation macroscopique n'a été mise en évidence.

2.4. Etude de la perfusion placentaire dans l'unité fœto-placentaire

Article ayant fait l'objet d'une publication dans *Placenta*.

New insights into uteroplacental perfusion: Quantitative analysis using Doppler and contrast-enhanced ultrasound imaging

Chloé J Arthuis^{*1,2}, Anthony Novell¹, Jean-Michel Escoffre¹, Frédéric Patat^{1,3},
Ayache Bouakaz¹, Franck Perrotin^{1,2}.

¹ UMR Inserm U 930, University François-Rabelais Tours, 10 bd ter Tonnellé, 37032 Tours, France

² Department of Obstetrics and Gynecology CHRU Tours, 2 bd Tonnellé, 37044 Tours, France

³ Inserm CIC-IT 806, CHRU Tours, 2 bd Tonnellé, 37044 Tours, France

Placenta. 2013 May;34(5):424-31. doi: 10.1016/j.placenta.2013.01.019

2.4.1 Introduction

During human pregnancy, normal placental development results in remodeling the maternal spiral arteries to allow increased delivery of maternal blood through a low-pressure, low-velocity placental bed (54). Reduced trophoblastic invasion, incomplete remodeling of maternal spiral arteries and the premature entry of maternal blood into the villous trophoblast contribute to abnormal development of the villous tree (55). Several complications, such as intrauterine growth restriction (IUGR), gestational hypertension and preeclampsia, are associated with such an high oxygen concentrations inside the intervillous space in early pregnancy, an oxydative stress into the villous trophoblast and a reduction in uteroplacental blood flow (55). These complications are major causes of maternal and fetal morbidity and mortality (56). The use of Doppler ultrasound (DUS) to assess uteroplacental blood flow is currently the reference method for the clinical management of high-risk pregnancies (57). This is often suggested that the uterine artery Doppler flow might provide a proxy measure of the degree of vascular remodeling (58), whereas the umbilical artery Doppler flow is related to the extent of the placental villus capillary network. However, this has never been demonstrated. If the both are correlated, no evidence of causation is yet described. Indeed, abdominal pregnancies with normal uterine artery resistance index (RI) were reported (55). Unfortunately, both uterine and umbilical artery Doppler measurements are only indirect parameters of placental vascular development, and their application as screening tools for IUGR, preeclampsia and perinatal death remains controversial (61). Noninvasive quantification of intervillous placental perfusion would yield valuable information about placental function.

Microbubble-based contrast-enhanced ultrasound (CEUS) improves blood perfusion imaging in various organs (62,63). This noninvasive technique is based on the detection of gas-filled microbubbles used as perfusion tracers that scatter ultrasound during their transit through any vascular compartment. Microbubbles significantly increase the ultrasound scattering by blood and are used to visualize the microcirculation usually invisible by traditional DUS (64). Microbubbles have intravascular rheologic properties similar to those of red blood cells and remain entirely within the intravascular space (65). Therefore, imaging of the contrast wash-in can be used to measure the microbubble (or blood) velocity in tissue or blood volume fractions. CEUS has been used for years to assess tumor vascularization (*e.g.*, in the liver, kidneys, and breasts) (66,67) and to evaluate myocardial perfusion (68). In obstetrics, CEUS offers a new opportunity to monitor the uteroplacental circulation and

quantify the intervillous space flow velocity. However, none of the previous investigations in this context (51,52,69–72) measured either quantitative values or temporal changes in the contrast enhancement. Quantification parameters related to the contrast enhancement have been proposed as objective indicators to estimate blood perfusion rates (73). Moreover, the use of ultrasound contrast agents in obstetrics is still not approved for clinical use and has received little attention in the literature (74). The safety of CEUS during pregnancy has not yet been clearly established (31,34).

The aim of this study was to monitor and quantify uteroplacental perfusion during pregnancy in healthy rats by the complementary use of two ultrasonographic methods: DUS and CEUS. DUS allows accurate assessment of the RI, the pulsatility index (PI) and the velocity of blood in the uterine, arcuate and umbilical arteries, while CEUS is used to quantify the intervillous blood flow.

2.4.2 Material and methods

Animal preparation

All procedures were performed in accordance with the ethical guidelines of and were approved by the Regional Committee of Tours for Animal Care and Ethics in Animal Experiments. Fourteen presumptively pregnant Sprague-Dawley rats (CERJ, Le Genest Saint-Isle, France) (10 weeks old; 285.5 g (± 4.5)) were randomized into two groups (the control and the CEUS groups). The rats were anesthetized by 1.5% isoflurane (Aerrane[®], Baxter) via a facial oxygen mask in place throughout the procedure. The gaseous anesthesia was limited to one hour, and a thermostatically controlled pad was used to maintain body temperature at about 37°C. The rats were weighed and the abdomen was shaved before the ultrasound examination. After 2 days of adaptation, pregnancy was verified by ultrasound imaging. Rats that were not pregnancy or had fetuses with IUGR were excluded.

Doppler Ultrasound imaging

Both groups of rats underwent bilateral uterine and arcuate artery DUS studies on days 8, 11, 14, 17, 19 and 20 of the 22-day gestation period. The DUS of the umbilical artery was performed from the umbilical cord on day 14. The RI and PI of the uterine, arcuate, umbilical and fetal cerebral arteries were measured by color DUS with a Sequoia 512 ultrasound machine (Siemens Medical System, Mountain View, CA) and a linear array transducer (15L8)

at 14 MHz. The same operator performed all measurements. A 1-mm pulsed Doppler gate was used and the insonating angle was $<30^\circ$. Doppler waveforms were obtained with the following standardized method: the ultrasound transducer was positioned on the pubic symphysis and then displaced in small lateral motions to locate the proximal uterine artery sonographically. The arcuate artery was recorded close to an embryo implantation site. The embryo's umbilical artery was visualized near the site of placental implantation. After Doppler imaging, the peak systolic velocity (PSV) and the end-diastolic velocity (EDV) were measured manually from 3 consecutive cardiac cycles of Doppler waveforms. The RI was calculated with the formula $RI=(PSV-EDV)/PSV$, and the PI with $PI=(PSV-EDV)/m$ (with m the mean velocity).

CEUS imaging

CEUS was performed on days 14, 17 and 20 of gestation in the CEUS group alone. Ultrasound scans were obtained with the Vevo2100 (Visualsonics Inc., Toronto, Canada) and a 21-MHz (MS250) probe at a mechanical index of 0.43. A 23-gauge catheter was placed in a tail vein to inject the Vevo MicroMarker® contrast agent (Visualsonics Inc., Toronto, Canada). The contrast agent consists of a mixture of nitrogen and perfluorobutane microbubbles surrounded by PEGylated and phospholipids shell. The mean diameter ranges from 2.3 to 2.6 μm . The mesometrial triangle, placenta, umbilical cord and fetus were all visualized on the ultrasound image. A bolus of 250 μL of contrast agent (1 mL/kg) was then injected.

Immediately after this injection, the first set of measurements was taken at a low transmitted power. Video clips of 36 seconds were recorded at 10 frames per second to study the tissue perfusion of the contrast agent in the different compartments. After the microbubbles were homogeneously distributed through the placenta, high power pulses were transmitted to destroy them locally. Afterwards, the replenishment of the contrast was recorded at a low mechanical index for 29 seconds. We then observed the kinetics of tissue reperfusion as the new microbubbles entered into the mesometrial triangle and the intervillous space.

After image acquisition, tissue perfusion was analyzed quantitatively from the linear raw data with VevoCQ software (Visualsonics Inc., Toronto, Canada). Motion artifacts were corrected and four regions of interest (ROIs) were manually defined — the mesometrial triangle, the placenta, the umbilical cord and the fetus. Time-intensity curves for each ROI

were computed with VevoCQ software (Fig.21) (76). Various parameters, including the peak enhancement (PE), the wash-in curve-rate (WiR), corresponding to the maximum slope of the curve fit function, and the area under the curve during the wash-in (WiAUC) were calculated for each ROI from the time-intensity curves. The PE and the WiR were measures of relative blood volume and flow respectively. In addition, the relative blood volume (rBV) and the relative blood flow (rBF) were estimated in destruction-replenishment mode for each ROI (77).

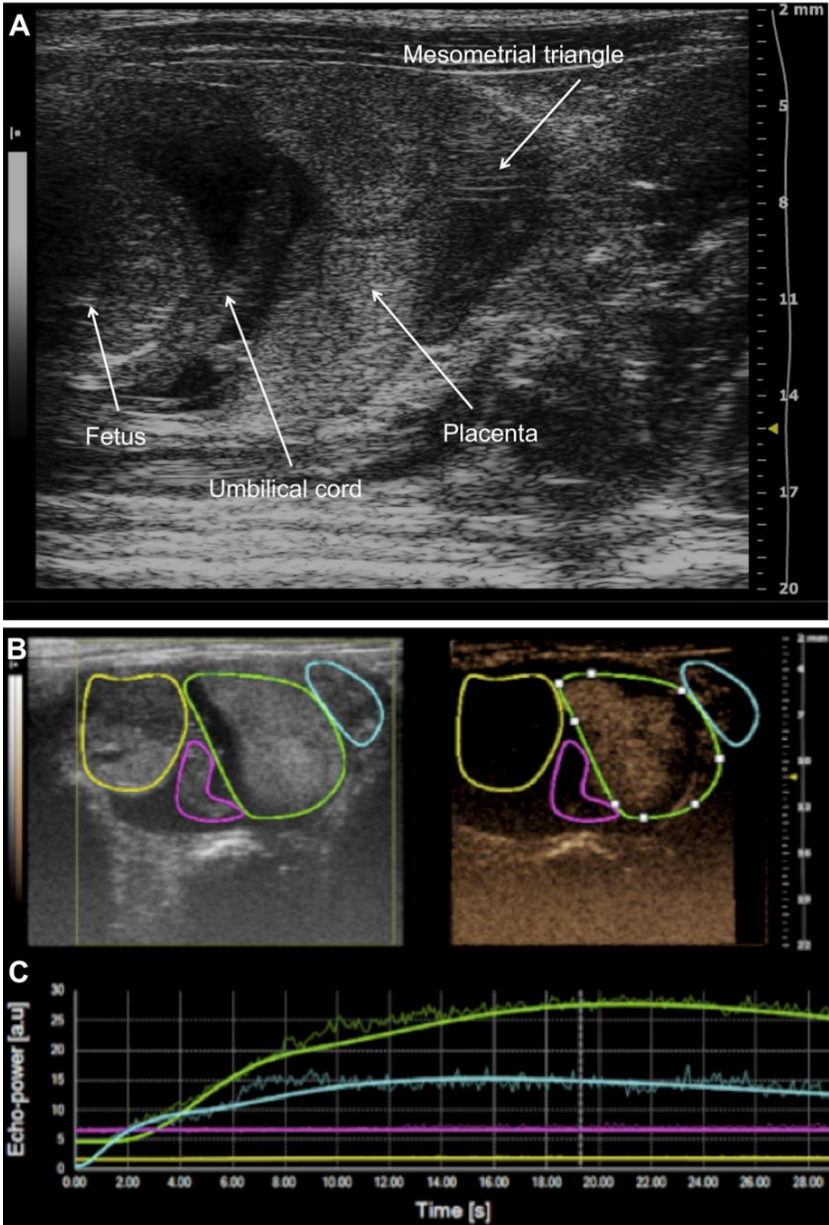


Figure 21 : Monitoring of uteroplacental perfusion by CEUS. A) Ultrasound imaging of the fetoplacental unit on day 17 of gestation; B) Manual drawing of the regions of interest (ROIs)

(the mesometrial triangle in blue, the placenta in green, the umbilical cord in red and the fetus in yellow); C) Time-intensity curves.

Histological analysis

On day 20, the fetuses were delivered by cesarean section and weighed. The placenta and uterine horns were fixed in formol-acetic acid solution. Tissue samples were then embedded in paraffin, cut of approximately 5 μm and prepared with a conventional hematoxylin/eosin staining protocol. The tissue sections were examined by light microscopy on a Leica (Leica-France, Nanterre) microscope. The quality of the histological sections, tissue accountability, slides labeling and tissue placement were good and considered adequate for our study by the pathologist. In blinded review, the pathologist was seeking for necrotic and hemorrhage areas.

Statistical analysis

Randomization was performed by a computer-generated random-allocation sequence. Results are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Continuous variables were compared with a non-parametric Wilcoxon test. P values <0.05 were considered to be statistically significant. Statistical analysis was carried out with R statistical software (version 2.15.0).

2.4.3 Results

Three rats were excluded from the analysis, one because she was not pregnant and the other two because contrast agent injection failed. Eleven rats were therefore examined. The rats grew by 119.7 g (± 7.9) from day 8 to day 20 of gestation.

Evaluation of uterine vascular resistance by DUS imaging

The left and right uterine arteries of all animals were identified by DUS imaging within 15 (± 1) minutes in all cases. Because no significant differences were observed between the two sides in any measurements, we grouped these data together for quantitative analysis. DUS of the uterine artery showed a significant decrease in the RI (Fig.22A) and PI (Fig.22B) from day 14 to day 17 ($n=22$, $p<0.01$). From day 17 to day 20, both the RI and PI were stable at 0.6 (± 0.009) and 1.03 (± 0.04), respectively. Systolic velocity in the uterine artery did not

change during this period (Fig. 22C) while the EDV increased from day 14 to 17 ($p<0.01$) (Fig. 22D).

Arcuate artery RI and PI decreased significantly from day 14 to 17 ($n=22$, $p<0.01$), but then remained stable at $0.46 (\pm 0.009)$ and $0.67 (\pm 0.02)$, respectively, until the end of gestation. The RI of the arcuate artery was lower than that of the uterine artery throughout gestation ($p<0.001$) (Fig.22A). Arcuate artery EDV (Fig.22D) and PSV (Fig.22C) both increased significantly over the course of gestation ($p<0.05$). Umbilical artery PSV was detectable by DUS for embryos from day 14, while EDV remained close to zero at every measurement through the end of gestation (supplementary data). Moreover, the cerebral Doppler blood flow was stable throughout gestation, not changing from the beginning through the end of gestation (supplementary data).

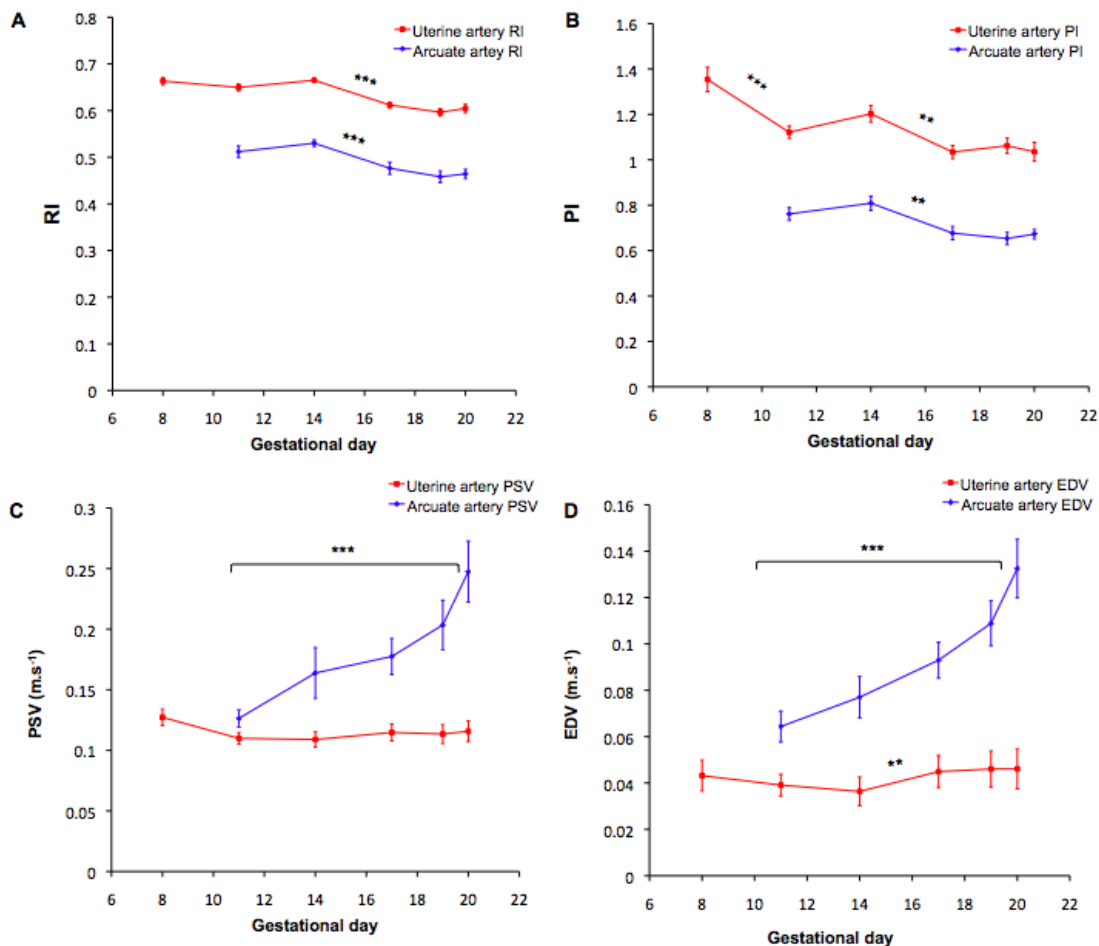


Figure 22 : Doppler ultrasound velocimetry of uterine and arcuate arteries. The RI (A) and PI (B) decreased significantly from day 14 to day 17 of gestation. Arcuate artery PSV (C) increased during gestation while systolic velocity did not change in the uterine arteries; Arcuate artery EDV (D) increased significantly during gestation. Data are expressed as mean

±SEM (n=22). Statistical analysis was performed with the non-parametric Wilcoxon test. Significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Evaluation of uteroplacental perfusion by CEUS imaging

Quantification of uteroplacental perfusion

CEUS imaging was used to monitor and quantify the perfusion of five fetoplacental units. The quality of the curves fitted by the VevoCQ software was considered satisfactory (>75%). On days 14, 17 and 20, the ultrasound signal from contrast agents was strongly enhanced in the uteroplacental unit within 1 to 3 seconds after the intravascular bolus (Fig.23). The contrast agent first appeared in the mesometrial triangle. The ultrasound contrast signal then increased slowly (36 seconds) in the placenta. No contrast enhancement was observed in the umbilical vein or the fetus.

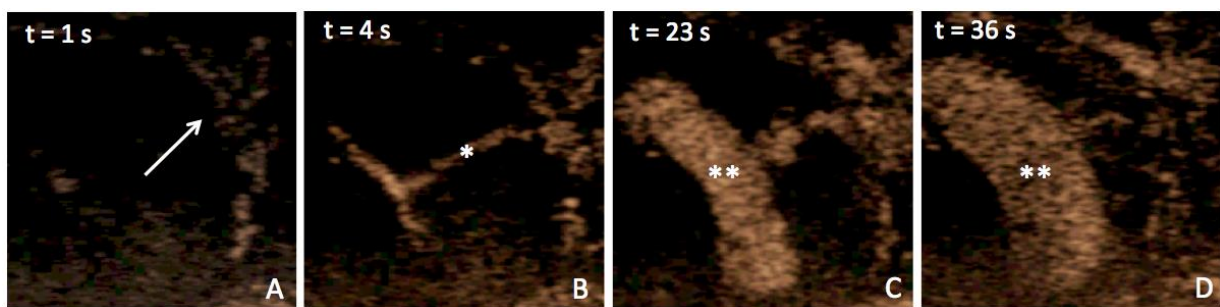


Figure 23 : Monitoring of microbubble contrast agent in the uteroplacental unit by CEUS on the gestational day 17. First, the enhancement of the mesometrial triangle (arrow) and the maternal spiral arteries is visualized 1 s after contrast agent injection (A). Then, contrast agent microbubbles are detected through the maternal vessel (*) in the center of the placenta to the chorionic plate (B). Finally, the perfusion slowly expands in the placenta (**) to the basal plate (C and D).

Quantification of placental perfusion was based on objective parameters from the linear raw data, before signal compression, including PE, WiR and WiAUC (Fig.24). During gestation, the PE increased significantly in the mesometrial triangle and in the placenta ($p < 0.01$). Indeed, the PE multiplied by a factor of 15 in the mesometrial triangle but by only a factor of 4 in the placenta from day 14 to day 20. The perfusion rate (WiR) also grew significantly from day 14 to day 20 in the mesometrial triangle ($p < 0.01$) and in the placenta ($p < 0.05$). On day 20, the WiR was significantly lower in the placenta (8.08 a.u. ±1.96) than in the mesometrial triangle (30.68 a.u. ±11.74). Thus, during physiological gestation, perfusion

began earlier and increased more rapidly in the mesometrial triangle than in the placenta. The WiAUC increased significantly in the mesometrial triangle ($p < 0.01$) and in the placenta ($p < 0.05$) during the reporting period. On day 14, the WiAUC was significantly higher in the placenta (123.34 a.u. \pm 62.00) than in the mesometrial triangle (18.44 a.u. \pm 8.29), but by day 20 it had quadrupled in the placenta and multiplied by 7 in the mesometrial triangle. Taken together, the results from the perfusion profiles showed that blood perfusion increased in the mesometrial triangle and placenta from day 14 through day 20 of gestation.

Our quantitative analysis did not reveal the presence of contrast agents in the umbilical vein and the fetus.

For the destruction-replenishment mode, on days 14, 17 and 20, the time-intensity curves showed a trend similar to that observed in the bolus mode. However, these results were less sensitive for estimating uteroplacental perfusion.

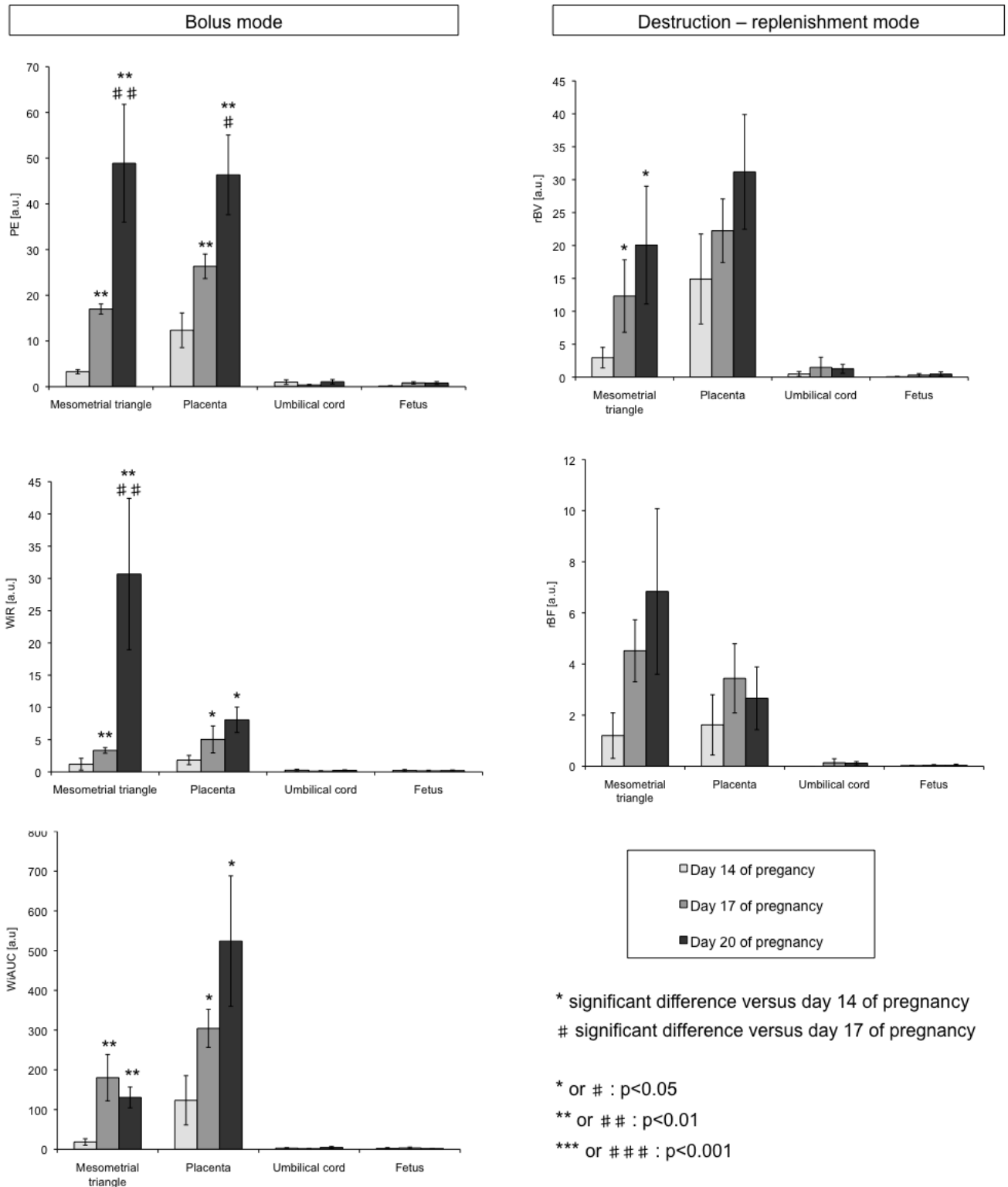


Figure 24 : Quantitative analysis of uteroplacental perfusion by CEUS. Graphs A to C show quantitative parameters in the bolus mode. Graphs D and E show quantitative parameters in the destruction-replenishment mode. Data are expressed as mean \pm SEM calculated from 5 pregnant rats. Statistical analysis was performed with the non-parametric Wilcoxon test. Significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Histology

On day 20, a total of 140 pups were delivered by the cesarean section. The mean weight of the pups in the control ($4.32 \text{ g} \pm 0.04$) and contrast ($4.24 \text{ g} \pm 0.04$) groups did not differ ($p=0.14$). Histological studies of the placenta showed no differential tissue damage between the two groups (Fig. 25). All pups were grossly normal at the newborn stage.

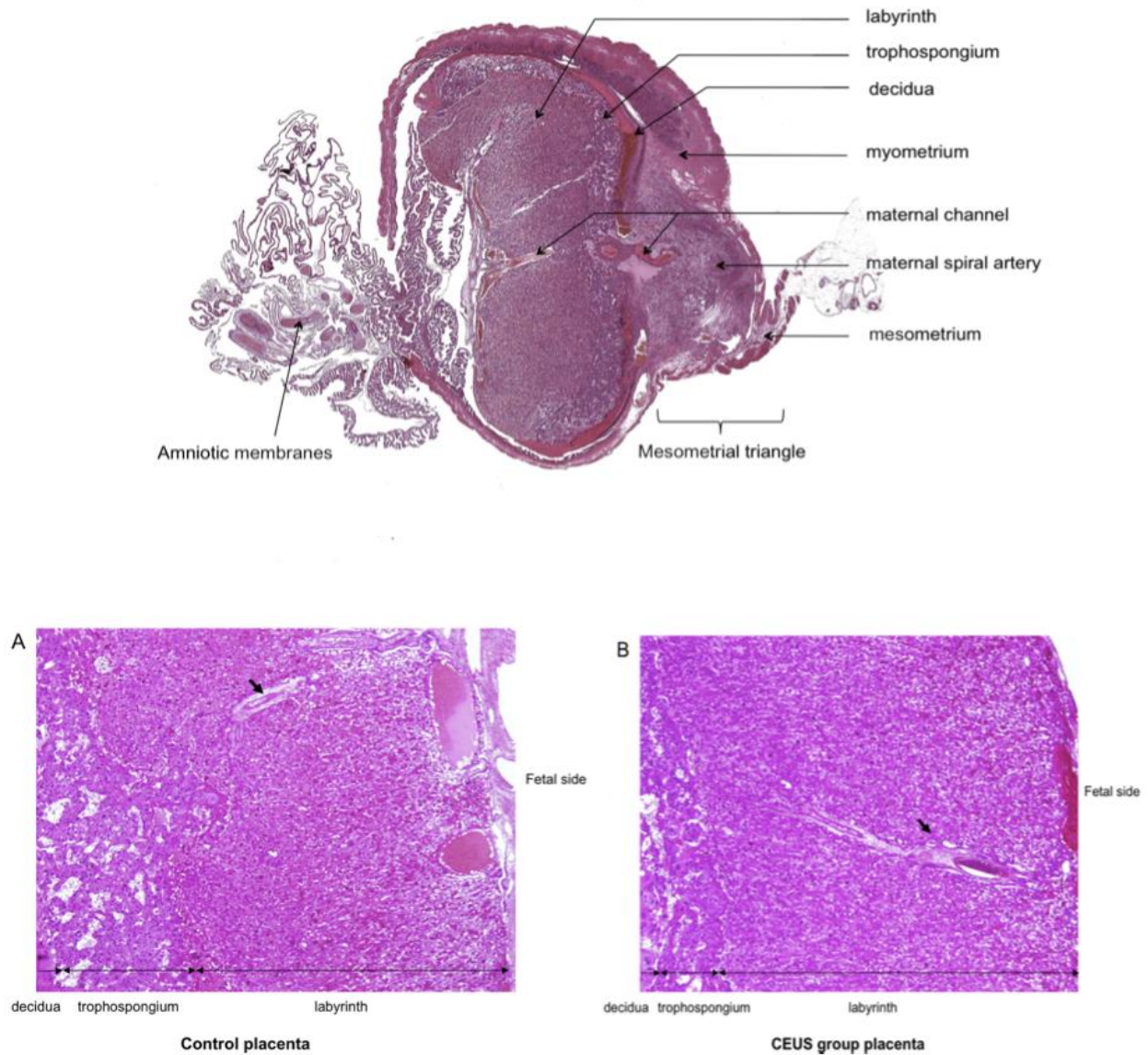


Figure 25 : Safety of the CEUS procedure. Parallel section through the implantation site of the placenta of a rat on day 20 of gestation, stained for HES (original magnification x2.5). There were no histological differences between placenta sections of the control group (A) and the CEUS group (B).

2.4.4 Discussion

The purpose of this investigation was to use DUS and CEUS imaging to monitor and quantify uteroplacental blood flow in rat pregnancies. Our data show that resistance decreased in the uterine and arcuate arteries from day 14 of gestation, while PSV and EDV increased over the course of the pregnancy. These data are consistent with previously published studies that showed a reduction of uterine artery RI and PI during the gestational period (78). Moreover, Mu *et al.* found that during mouse gestation EDV and PSV increased as uterine artery RI decreased (79). Our data showed that hemodynamic changes occurred during the last week of gestation. Indeed, this period is characterized by the physiological conversion of the spiral arteries. The endovascular trophoblast invasion occurs on day 13 of gestation (80) and the interstitial trophoblast invasion begins on day 15, in the decidua and mesometrial triangle (81). The increase in size of the arcuate arteries reduces uteroplacental vascular resistance and increases uteroplacental blood flow (82), thereby optimizing the transfer of oxygen and nutrients to the fetus. These hemodynamic changes are similar to those observed during human pregnancies (83,84).

Doppler waveform analysis of the uterine artery in women has been widely used as a screening tool for suspected placental insufficiency in pregnancies at risk for preeclampsia or IUGR (57,61). However, DUS lacks sensitivity and specificity (61,85,86). According to Chien *et al.*, the uterine artery Doppler flow velocity has limited diagnostic accuracy in predicting any of preeclampsia, IUGR or perinatal death (61). Moreover, DUS provides indirect measurements of vascular impedance and cannot be used to quantify placental perfusion (59,60).

Our study revealed that the filling of the intervillous space with the maternal blood and contrast agent in CEUS is slow, continuous and uniform. After 15 minutes, the microbubbles were undetectable. This finding is in line with observations by Schmiedl *et al.* (70). The quantification of uteroplacental perfusion by CEUS indicates that PE, WiR and WiAUC all increase during gestation. This finding is consistent with physiologic hemodynamic changes. Indeed, the development of the vascular network, including capillaries in both the mesometrial triangle and placenta, may well explain the increased PE (80,81). Moreover, maternal blood flow and the caliber of the spiral arteries both increase during pregnancy whereas the resistance of the uterine arteries decreases. These factors contribute to the expansion of uteroplacental perfusion. The expected results are in agreement with the RI

measured with DUS in our study. Further complementary experiments are required to demonstrate the repeatability data of DUS and CEUS imaging.

CEUS allowed uteroplacental perfusion to be monitored and quantified. Bolus mode seems to be sufficient and more accurate for estimating placental perfusion. Moreover, bolus injection is the standard administration mode for non-cardiac indications, whereas replenishment mode is frequently used in cardiac applications (73).

Furthermore, our results did not show that the microbubbles reached either the umbilical vein or the fetus. We saw no macroscopic or histologic evidence of adverse effects. This finding suggests that the contrast microbubbles probably do not cross the placenta. This absence of fetal detection of contrast agents and of any weight difference between the two groups of pups weight loss between the control and the CEUS groups would suggest that the CEUS procedure does not induce deleterious effects on pup growth during pregnancy. Consistent with previous studies (51,52,69,70), no maternal or fetal side effects were detected. Only a single study has evaluated uteroplacental circulation in human pregnancies; it used Levovist[®] microbubbles and power Doppler in third trimester pregnancies (8 with IUGR and 17 normal-sized fetuses) (52). The authors reported a modification of Doppler signal intensity before and 30 seconds after the injection of the contrast agent. They did not, however, quantify uteroplacental perfusion. Nevertheless, there was no association between fetal growth and the power Doppler signal blood flow intensity in uteroplacental vessels or the intraplacental area.

2.4.5 Conclusion

In conclusion, this study demonstrates that the monitoring and quantification of the uteroplacental blood flow during rat pregnancy by DUS and CEUS are complementary. CEUS allows a noninvasive and direct approach to placental microcirculation. In clinical practice, CEUS could be a new functional imaging tool to help diagnose placental disturbances earlier and more precisely in women with preeclampsia or IUGR.

Quels éléments sont apportés par ces expérimentations ?

- Bonne reproductibilité des paramètres quantitatifs en échographie de contraste.
- Absence de passage de la barrière placentaire par les agents de contraste ultrasonores lors de procédures diagnostiques et thérapeutiques.
- Etude cinétique de la perfusion placentaire à trois âges gestationnels chez la rate.
- Identification du remplissage du placenta par les agents de contraste ultrasonores dans les différentes régions du placenta.

Après avoir évalué la reproductibilité de la méthode et donner quelques éléments complémentaires rassurants sur l'innocuité de la procédure, nous avons montré la faisabilité du suivi de la cinétique de perfusion placentaire au cours de la gestation. Cependant, nous ne nous sommes pas intéressés aux différentes régions du placenta. Ainsi, lors des acquisitions le vaisseau central maternel n'était pas systématiquement visualisé. Au cours d'une seconde expérimentation animale, nous avons donc défini des critères qualité de la coupe transversale du placenta en échographie pour permettre de quantifier la perfusion dans les différentes régions d'intérêts aux caractéristiques histologiques propres. D'autre part, seule la phase de remplissage (wash-in) a été étudiée. Nous avons donc également souhaité compléter nos mesures par l'étude de la phase de vidange du placenta (wash-out).

2.5. Etude de la perfusion placentaire dans les différentes régions du placenta

L'objectif de cette étude était de quantifier la perfusion placentaire en utilisant l'échographie de contraste en temps-réel et l'analyse de l'imagerie paramétrique aux jours 14, 17 et 20 de la gestation physiologique de la rate, dans différentes régions du placenta.

Ces travaux sont actuellement en cours de publication.

2.5.1 Protocole expérimental

L'étude a été réalisée en accord avec les règles d'éthique Françaises et internationales, et a été approuvée par le comité d'éthique national. Quinze rates gestantes Sprague Dawley (CERJ, Le Genest Saint-Isle, France) ont été hébergées dans une pièce à température contrôlée avec un cycle jour-nuit de 12h, avec de la nourriture et de l'eau à libre disposition. Le lendemain de l'accouplement définissait le jour 0 de la gestation. Une période d'acclimatation de 7 jours était respectée avant de débiter les échographies de contraste.

Les rates ont été divisées en 3 groupes selon leur âge gestationnel afin de réaliser des acquisitions aux jours 14, 17 et 20 de la gestation. L'échographie de contraste était réalisée sous anesthésie gazeuse au masque avec de l'isoflurane 1,5% (Aerrane®, Baxter France). Un débit minimal de 1,5 L/min était maintenu pendant l'ensemble de la procédure. Les rates étaient maintenues sur une plaque thermostatique afin de contrôler leur température corporelle. La fréquence cardiaque était également contrôlée. Avant de débiter l'échographie, l'abdomen était rasé et dépilé.

La procédure échographique était réalisée avec un VevoLAZR (Fujifilm Visualsonics Inc., Toronto, Canada) connecté à une sonde de 21 MHz (LZ-250; résolution axiale de 75 μm) utilisé en mode contraste. La sonde d'échographie était fixée à un portoir pour s'affranchir des mouvements de l'opérateur durant l'acquisition. Les critères qualité du cliché échographique en mode-B étaient les suivants :

- coupe transversale du placenta d'un fœtus vivant
- un seul placenta par acquisition
- présence du cordon ombilical dans la zone d'exploration

- Visualisation de la totalité du vaisseau central maternel du placenta au centre de l'écran
- Absence de cône d'ombre
- Placenta occupant les 2/3 de l'écran

Le placenta était analysé quel que soit son orientation (antérieure, latérale ou postérieure) par rapport à la sonde. La qualité de la visualisation en mode-B devait être satisfaisante avant de débiter l'injection des agents de contraste.

Les acquisitions ont été réalisées avec des microbulles Vevo MicroMarker[®] (Visualsonics Inc., Toronto, Canada) avec une injection de 250 µL à la concentration de microbulles de l'ordre de 1 mL/kg, en mode bolus. L'injection était réalisée au niveau de la veine de la queue par un cathéter de 24 gauges. Dès l'injection des agents de contraste, l'enregistrement d'un clip de 3 min était débuté.

L'analyse quantitative de la perfusion était réalisée avec le logiciel VevoCQ à partir de l'étude visuelle en temps-réel de l'arrivée des agents de contraste et de l'image paramétrique. Les ROIS étaient définies d'après les connaissances histologiques de la vascularisation du placenta de la rate. Ainsi, la zone centrale du placenta correspondant au vaisseau maternel de plus gros calibre et la zone périphérique correspondant au labyrinthe avec des vaisseaux de petits calibres enchevêtrés ont été analysées séparément. Enfin, la globalité du placenta comprenant ces deux zones était également étudiée. Les ROIS étaient définies manuellement par deux opérateurs expérimentés (C.A et A.N). L'étude quantitative portait sur les paramètres de remplissage et de vidange. D'une part, les valeurs des différentes ROIS étaient comparées entre elles. D'autre part pour une ROI donnée, les valeurs étaient comparées selon le jour de gestation étudié. Les données sont présentées sous la forme de moyennes \pm écart type. Les différents paramètres de perfusion étaient comparés entre les différents jours de gestation par des tests non paramétriques de Wilcoxon réalisés avec le logiciel R version (3.3.1). La significativité était définie par une p-value<0,05.

2.5.2 Analyse en temps réel et paramétrique de l'échographie de contraste

Analyse visuelle en temps réel de l'échographie de contraste

A partir du 14^{ème} jour de gestation l'imagerie haute résolution de la rate permet d'identifier avec précision les structures fœtales et du placenta. Pour chaque rate au moins un placenta était accessible et répondait aux critères qualité de l'imagerie échographique. Les agents de contrastes échographiques ne franchissant pas la barrière hémato-placentaire, l'étude n'a tenu compte de l'observation des structures fœtales. Seul le cordon ombilical était visualisé à l'image.

Les agents de contraste arrivent rapidement au niveau de la corne utérine puis passent directement dans la circulation maternelle du placenta (Fig.26). Le rehaussement est rapide et intense au niveau du vaisseau central et de ses deux branches de division droite et gauche sur la face choriale. Ensuite, les deux branches principales se ramifient en vaisseaux de moyen et petit calibres très denses qui constituent le labyrinthe. Le rehaussement se faisait dans une direction opposée à la première de façon lente, centrifuge et homogène au sein de la chambre intervillieuse. Aucune prise de contraste n'a été mise en évidence au niveau du cordon ombilical.

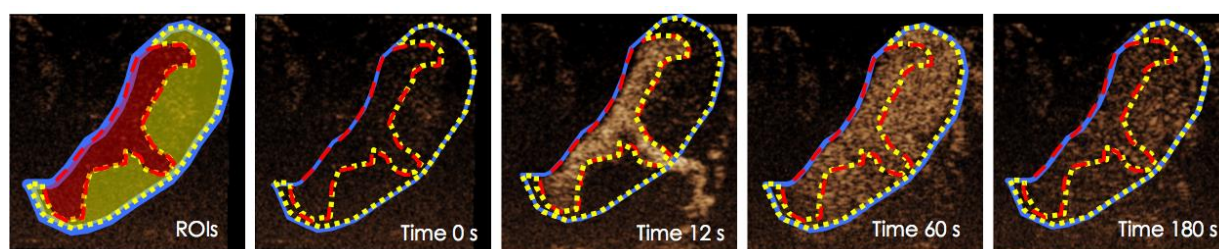


Figure 26 : séquence typique du rehaussement placentaire après l'injection des agents de contraste en mode bolus. Les 3 ROIS étudiées sont représentées en rouge pour le vaisseau central maternel et ses deux branches de division, en jaune pour le labyrinthe et en bleu pour le placenta total.

Analyse paramétrique de l'imagerie de contraste

L'analyse quantitative a été possible pour les quinze rates. Les paramètres quantitatifs sont présentés dans les box-plots de la figure 27. Tout au long de la gestation on observait une augmentation de la surface placentaire et cela de façon très significative entre le 14^{ème} et le

17^{ème} jour (P=0,01). De façon similaire, les vitesses de remplissage (WiR) apparaissaient plus élevées au 20^{ème} jour de gestation et l'intensité du signal était maximale au 20^{ème} jour. Ceci correspondait à une arrivée plus rapide et en quantité plus importante de microbulles. Par ailleurs, les vitesses de vidange (WoR) étaient également plus rapides à la fin de la gestation.

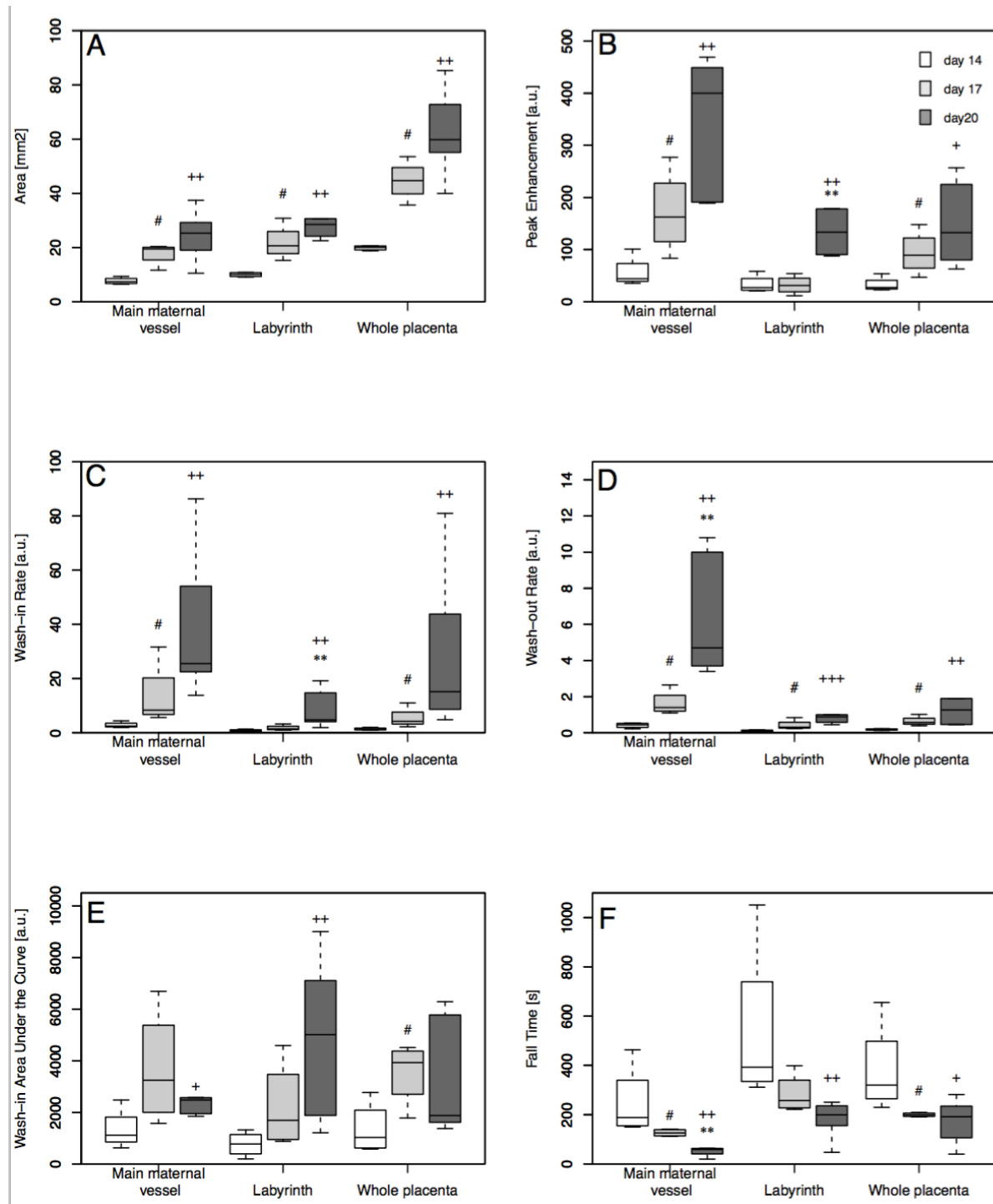


Figure 27 : Analyse quantitative en échographie de contraste dans les 3 ROIS aux jours 14, 17 et 20 de la gestation physiologique de la rate. La comparaison entre les jours 14 et 17 de

gestation était représentée par # $P=0,05$ ## $P=0,01$ #### $P=0,001$; entre les jours 17 et 20 par * $P=0,05$ ** $P=0,01$ *** $P=0,001$; et entre les jours 14 et 20 + $P=0,05$ ++ $P=0,01$ +++ $P=0,0001$.

2.5.3 Discussion

L'échographie de contraste permet de caractériser les différences de perfusion selon les variations de calibre des vaisseaux observés.

Les acquisitions ont été réalisées avec une sonde de 21 MHz, alors que d'autres acquisitions avaient été réalisées avec une sonde de 18 MHz. Cette différence technique peut expliquer la différence de sensibilité de la mesure. On visualise plus d'agents de contraste sans différence de concentration.

Nos précédentes analyses et notamment sur le plan histologique montrent que le calibre des vaisseaux variait dans le placenta. Le canal central maternel est un vaisseau de très gros calibre, rectiligne connecté sur les artères afférentes maternelles de la corne utérine. Au contraire, le labyrinthe est très dense avec des vaisseaux de petit calibre remplis d'hématies maternelles. C'est à ce niveau que se déroule les échanges entre les deux circulations maternelle et fœtale.

Par ailleurs, l'exploration des vitesses de vidange de perfusion placentaire n'avait pas été explorée auparavant. Cette information nouvelle est donc particulièrement intéressante. Elle nous montre que la circulation placentaire est rapide avec un remplissage et une vidange rapide des agents de contraste. Ce comportement de la circulation placentaire peut expliquer pourquoi il n'est pas observé de différence lorsque l'on réalise plusieurs injections d'agents de contraste sur un même animal et qu'un délai de 15 min entre chaque injection semble suffisant à l'élimination des microbulles.

En conclusion, nous avons démontré la possibilité d'évaluer la perfusion placentaire par échographie de contraste dans différentes régions du placenta avec une résolution spatiale et temporelle élevée. Ceci permettrait d'évaluer les différences de perfusion dans un modèle pathologique d'hypoperfusion placentaire ou encore l'effet de certaines thérapeutiques utilisées dans les pathologies d'insuffisance placentaire sur la perfusion.

Quels éléments sont apportés par cette expérimentation ?

- Méthode échographique standardisée.
- Etude du remplissage et de la vidange placentaire dans différentes régions, à trois âges gestationnels différents.

A la suite de ces expérimentations au cours de la gestation physiologique, nous avons souhaité valider l'utilisation d'un modèle de RCIU murin. Parmi les différents modèles publiés, nous avons retenu le modèle de RCIU par ligature du pédicule utérin décrit par Wigglesworth (87). La suite de nos expérimentations en échographie de contraste portera sur l'étude de la perfusion placentaire dans ces conditions pathologiques.

Chapitre 3

Echographie de contraste sur un modèle de RCIU murin par
ligature vasculaire

3. Echographie de contraste sur modèle de RCIU murin par ligature vasculaire

3.1. Modèle murin de RCIU par ligature de l'artère utérine

3.1.1 Description du modèle pathologique

Pour induire un RCIU nous avons utilisé le modèle de ligature du pédicule utérin au 17^{ème} jour de la gestation décrit par Wigglesworth en 1964 (87).

La ligature était réalisée à l'extrémité proximale de l'arcade des vaisseaux utérins (artère et veine utérine). La ligature était réalisée de façon unilatérale afin d'obtenir des contrôles dans la corne utérine controlatérale du même animal. Ceci permet de s'affranchir de la variabilité inter-individus. Cependant, pour un petit nombre de rates en échographie de contraste nous avons réalisé la ligature de façon bilatérale. En effet, ceci nous a permis d'induire un RCIU pour l'ensemble des rats et donc de connaître la perfusion placentaire avec certitude en cas de ligature. Cette manipulation préliminaire vient du fait que la localisation des unités foeto-placentaire peut être délicate dans certaines situations. Ainsi, la ligature bilatérale permettait de s'affranchir de la difficulté à distinguer les cornes non ligaturées des cornes ligaturées.

La procédure chirurgicale se déroulait sous anesthésie générale de l'animal au masque et analgésie par une injection intra-péritonéale de Buprénorphine (0,05 mg/kg) avant l'incision chirurgicale. La rate était positionnée en décubitus dorsal, l'abdomen était rasé et désinfecté à la bétadine, puis une incision cutanée d'environ 20 mm était réalisée au niveau de la ligne médiane au bistouri froid (Fig. 28). La cavité péritonéale était ouverte entre les muscles abdominaux afin de pouvoir extérioriser délicatement les deux cornes utérines. L'arcade vasculaire était alors facilement visualisée et le pédicule utérin droit était ligaturé avec un fil serti d'Ethilon 5.0. Les deux cornes étaient ensuite réintégrées dans la cavité péritonéale et les plans musculaires et cutanés étaient fermés au Monocryl 3.0 péritonéale. Une injection intrapéritonéale de Buprénorphine était renouvelée 5 heures après la fin de la procédure afin de prendre en charge la douleur post-opératoire.

La validité du modèle était vérifiée lors de la césarienne avec la pesée des ratons de chacune des cornes utérines. Pour que le modèle soit considéré comme valide, une différence de poids de 20% devait être observée entre les ratons des cornes ligaturées et contrôles.

Une analyse histologique d'une partie des placentas a été réalisée.

Toutes les procédures ont été validées par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de la Région Centre.

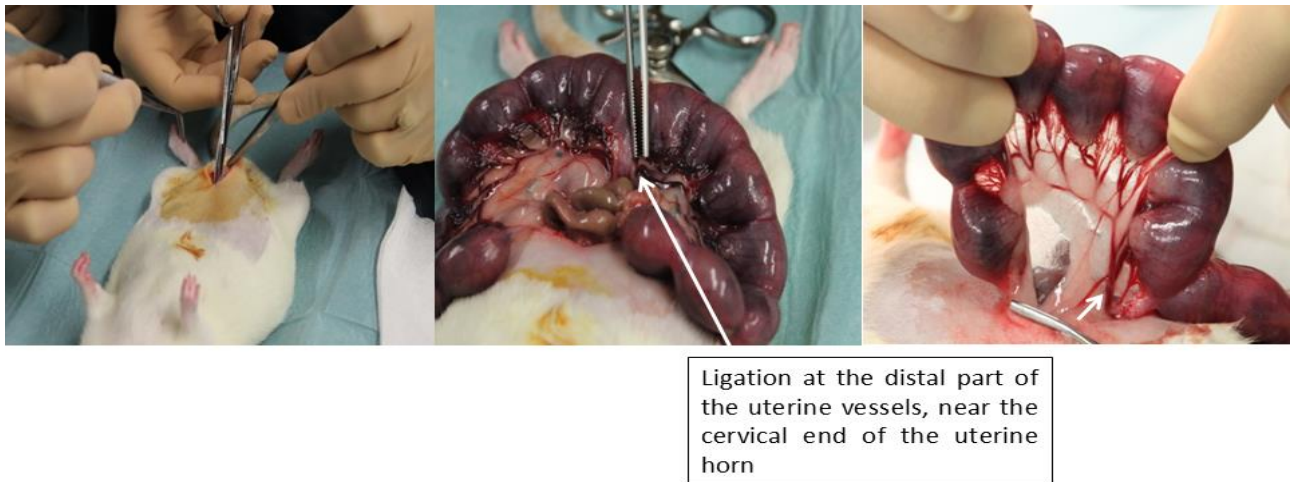


Figure 28 : Description du modèle pathologique de RCIU par ligature unilatérale d'une artère utérine au 17^{ème} jour de la gestation chez la rate Sprague Dawley. Sous anesthésie générale, incision première de la peau ; exposition des cornes utérines droite et gauche contenant les embryons ; et ligature d'un pédicule vasculaire utérin comprenant l'artère et la veine utérine. A la fin de la procédure, les deux cornes sont réintroduites avec précaution dans la rate et les plans musculaire et cutané sont suturés.

3.1.2 Validité du modèle chirurgical

La validité du modèle a pu être vérifiée sur un total de 9 rates Sprague Dawley et de 194 embryons. Au 20^{ème} jour de gestation, 108 embryons ont été extraits du côté non ligaturé et 86 du côté ligaturé. Les fœtus morts étaient facilement identifiés. Le taux de mortalité fœtale variait selon la position du fœtus dans la corne utérine ligaturée. Les décès ont donc été rapportés au rang occupé par le fœtus dans la corne (Fig. 29).

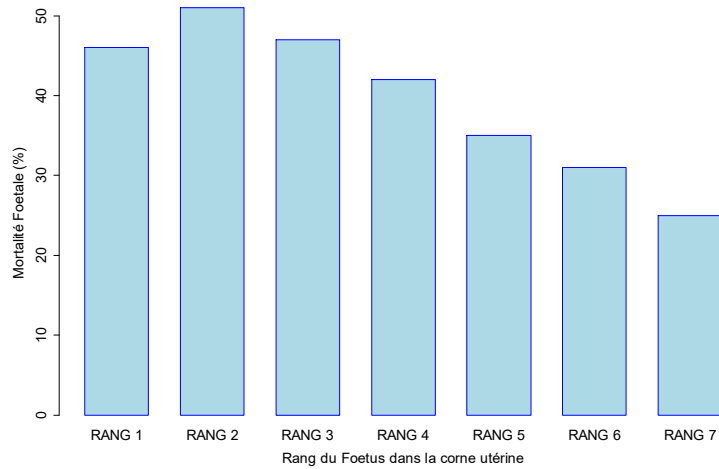


Figure 29 : Mortalité foetale des ratons en fonction du rang de chaque raton dans la corne utérine de la rate. Le rang 1 est défini par le rang le plus proche du col utérin.

Les rangs ont été numérotés dans l'ordre croissant à partir de l'extrémité proximale de la corne, à proximité de la ligature. La mortalité était plus élevée pour les fœtus situés à proximité de la ligature et diminuait ensuite. A l'exception du premier fœtus de la corne utérine qui pouvait bénéficier d'une revascularisation par une branche collatérale lorsque la ligature n'était pas suffisamment proximale. La différence de mortalité in utero entre les fœtus du côté ligaturé était très supérieure à celle des contrôles (p-value <0,0001). Le taux de mortalité in utero du côté non ligaturé était nul.

Les pesées effectuées après la césarienne ont permis de mesurer une différence de poids moyenne de 25% entre les fœtus du côté ligaturé et ceux du côté non ligaturé (Fig. 30). La comparaison des poids des embryons des deux groupes par un test de Mann Whitney retrouvait une p-value <0,0001. Les différences de poids entre les fœtus étaient également plus importantes pour ceux se trouvant à proximité de la ligature. Les fœtus étaient donc numérotés selon leur rang dans la corne, puis comparés aux fœtus du même rang sur la corne opposée non ligaturée.

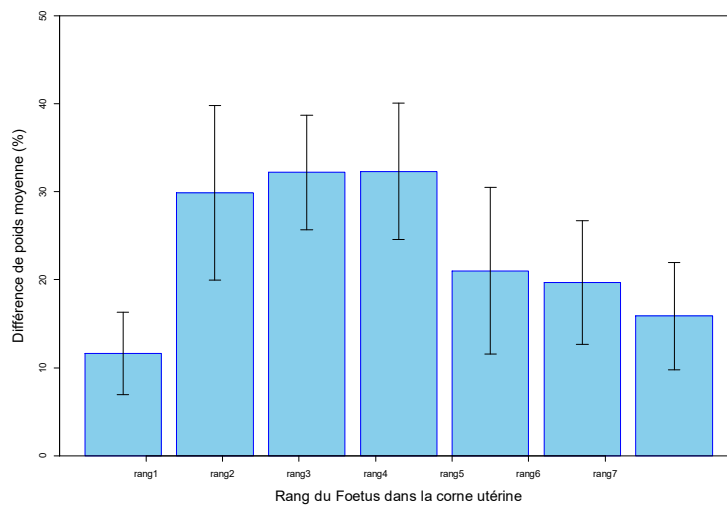


Figure 30 : Différence de poids des rats de la corne ligaturée par rapport à la corne contrôle exprimée en pourcentage selon leur rang dans la corne utérine.

L'analyse des poids des fœtus semble montrer que le RCIU était plus sévère au centre de la corne utérine (Fig.30). C'était aussi au centre de la corne utérine que l'on observait la plus forte mortalité in utero. Ainsi, le RCIU pouvait varier selon la position du fœtus dans la corne utérine.

Les placentas ont également été pesés pour 3 rates, afin de déterminer si la ligature les affectait également. Au total, la pesée a été effectuée sur 16 placentas du côté ligaturé et 18 du côté non ligaturé. Les placentas du côté ligaturé étaient en moyenne de plus faible poids que ceux du côté non ligaturé ($P < 0,001$) (Fig.31).

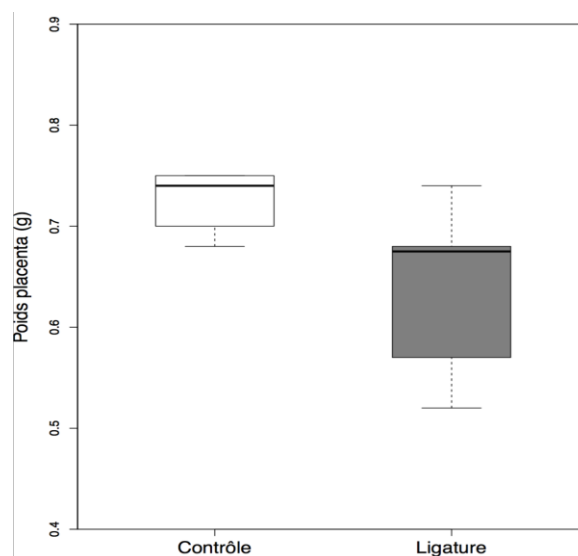


Figure 31 : Poids médian des placentas au 20^{ème} jour de la gestation pour le groupe contrôle et le groupe ligature. Le poids des placentas du groupe ligature est plus faible ($P < 0,001$).

3.1.3 Limites du modèle chirurgical

Ce modèle chirurgical induit à une hypoperfusion placentaire aigue qui ne reproduit pas réellement la physiopathologie humaine de l'insuffisance placentaire. En effet, la ligature de l'artère entraîne une réduction rapide et massive de l'afflux sanguin au niveau de la corne utérine qui se prolonge sur une période brève de 3 jours sur les 22 jours de gestation de la rate. Ainsi, le taux de mortalité fœtale est élevé. La revascularisation par des branches collatérales et par l'artère ovarienne à la partie supérieure de l'arcade vasculaire expliquent que les fœtus situés au niveau de la portion distale de la corne survivent mieux et ont un poids de naissance plus élevé.

En analyse histologique on n'observe pas de lésions d'ischémie chronique au niveau du placenta mais plutôt un phénomène congestif qui peut s'expliquer par la ligature du pédicule vasculaire comprenant l'artère et la veine. Il est difficile de par la taille des vaisseaux de réaliser une ligature sélective de l'artère utérine.

Cependant ce modèle est bien décrit et très utilisé dans ce domaine d'expertise. Il existe de nombreuses variantes, avec la possibilité de lier les pédicules vasculaires de façon unilatérale ou bilatérale, le jour de réalisation de ligature entre les jours 16 et 19 de gestation. Ces adaptations ont pu être proposées pour réduire le taux de mortalité fœtale in utero.

D'autre part, la ligature unilatérale permet de limiter les problèmes de variabilité inter-individuelle en utilisant chaque animal comme son propre témoin.

En conclusion, ce modèle simple à réaliser sur le plan technique et peu coûteux nous a permis d'obtenir une hypoperfusion placentaire satisfaisante pour étudier la faisabilité de l'imagerie de contraste.

3.2. Etude de la perfusion placentaire sur modèle pathologique

Travaux en cours de publication

L'objectif de notre étude était de réaliser une étude descriptive et quantitative de la perfusion placentaire par échographie de contraste sur un modèle murin de RCIU par ligature du pédicule vasculaire utérin.

3.2.1 Matériel et méthodes

Animaux

L'étude a porté sur onze rates gestantes Sprague-Dawley (CERJ, Le Genest saint-Isle, France) âgées de 10-12 semaines et d'un poids médian de 377 ± 17 g. Le premier jour de la gestation était défini par le lendemain de l'accouplement. Les rates étaient nourries *ad libitum*, avec des cycles jour/nuit de 12h à l'animalerie de Tours. Après réception des animaux, une période d'acclimatation de 7 jours était respectée.

Avant chaque procédure, les rates étaient pesées, anesthésiées par un mélange Isoflurane/air au masque puis rasées au niveau de l'abdomen. La température corporelle était maintenue à 37°C par une plaque chauffante.

Modèle de RCIU par ligature du pédicule utérin

Le modèle de ligature réalisé selon les modalités décrites ci-dessus était réalisé au 17^{ème} jour de la gestation.

Pour 4 rates, la ligature a été réalisée de façon bilatérale et pour 7 rates la ligature était réalisée uniquement à droite. La ligature bilatérale permettait de s'affranchir des éventuelles difficultés de localisation des cornes ligaturées et non ligaturées, et ainsi de réaliser des échographies sur une unité fœto-placentaire présentant un RCIU.

Echographie de contraste

Les échographies de contraste ont été réalisées au 19^{ème} jour de la gestation avec l'appareil Vevo2100 (Visualsonics Inc., Toronto, Canada) connecté à une sonde de 21-MHz

(MS250) utilisée à un index mécanique de 0,43. En échographie B-mode, une unité foeto-placentaire en coupe transversale était ajustée sur l'artère centrale maternelle du placenta. En mode contraste, les réglages de l'échographe étaient prédéfinis et n'étaient pas modifiés pour l'ensemble des acquisitions. Les agents de contraste échographiques étaient alors injectés en bolus de 200 μ L à la concentration de 1mL/kg de microbulles Definity[®] (Lantheus Medical Imaging ; Billerica, MA), dilués dans 1 mL de sérum physiologique 0,9% au niveau d'un cathéter de 24-gauges situé dans la veine caudale de la rate. L'enregistrement des clips était débuté simultanément à une cadence de 10 images/sec pendant 2,5 minutes. L'arrivée des agents de contraste échographique était visualisée directement au sein du placenta puis l'analyse était réalisée en mode bolus avec le logiciel VevoCQ (Visualsonics Inc, Toronto, Canada). Une nouvelle injection d'agents de contraste pouvait être réalisée en respectant un intervalle de 20 minutes afin d'étudier une autre unité foeto-placentaire. Un maximum de 4 injections de microbulles étaient effectuées afin de ne pas dépasser 10% du volume sanguin de la rate (10-13 mL).

Les différents paramètres quantifiés étaient : l'intensité maximale du signal (PE : Peak Enhancement), le temps d'intensité maximale (TTP : Time To Peak), la vitesse de remplissage (WiR : Wash in Rate) et le volume sanguin (WiAUC : aire sous la courbe entre T0 et TTP) comme décrit dans la figure 3. Pour l'étude de la vidange vasculaire (WoR : Wash out Rate), une extrapolation des courbes de cinétique obtenues a été réalisée sous Matlab quand cela été nécessaire. En effet, la durée de l'enregistrement du clip ne permettait pas toujours d'avoir une décroissance jusqu'à la fin du MTT, soit PE/2. L'étude des paramètres quantitatifs était réalisée dans 3 ROIS définies selon les principales régions histologiques constituant le placenta de la rate et individualisable en échographie : le vaisseau principal maternel au centre, le labyrinthe correspondant à la chambre intervillieuse et le placenta dans sa totalité (Fig. 32). Les mêmes ROIS étaient interprétées du côté ligaturé et non ligaturé.

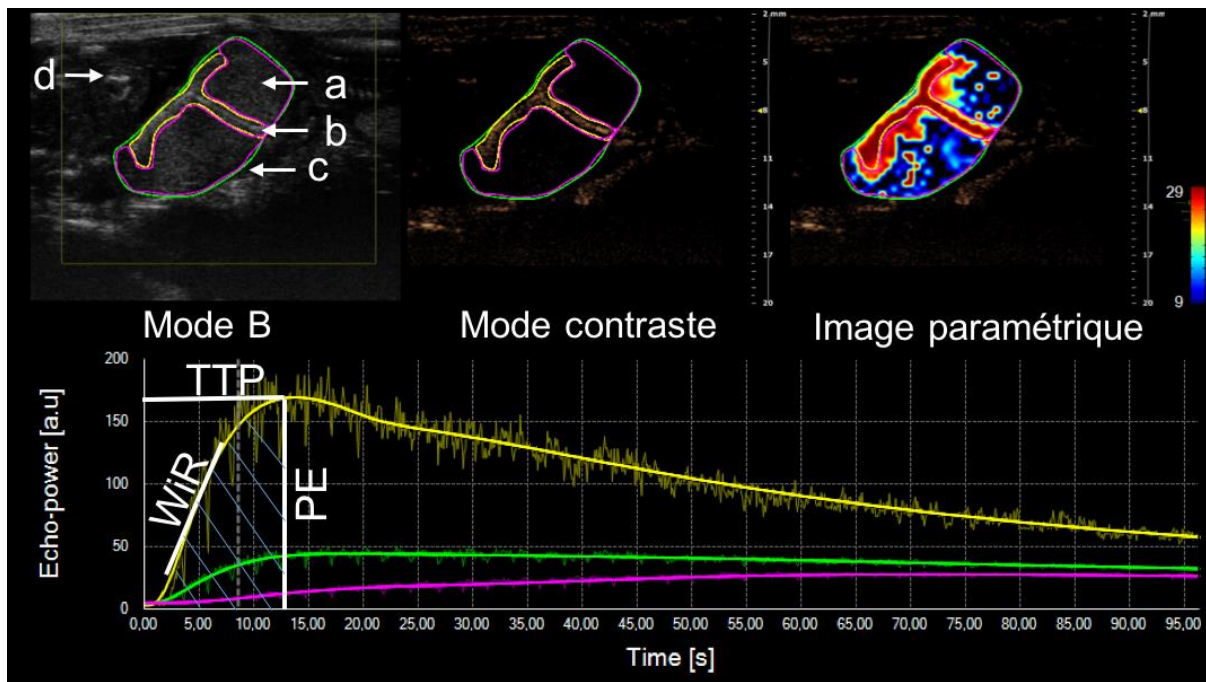


Figure 32 : exemple de perfusion en mode bolus dans un placenta de rate du côté ligaturé. On visualise le contour des 3 ROIS : vaisseau principal maternel (jaune), labyrinthe (rose), et placenta total (vert). Les ROIS étaient tracées manuellement et vérifiées sur l'image en mode-B et en mode contraste. Sur la partie du bas, apparaissent avec le logiciel VevoCQ les courbes temps-intensité dans chacune des ROIS.

Analyse histologique

Les caractéristiques histologiques des placentas étaient étudiées après leur prélèvement lors de la césarienne, au 20^{ème} jour de la gestation. Les placentas étaient fixés dans du formol et inclus en paraffine. Ensuite, des coupes de 5 μ m et une coloration selon un protocole HES (hématoéline/éosine/safran) étaient réalisées pour l'analyse en microscopie. Les lames étaient observées par un anatomopathologiste qualifié avec un microscope optique Leica (Leica-France, Nanterre). L'objectif était d'évaluer le retentissement placentaire du modèle de RCIU en recherchant des zones de nécrose, d'ischémie et des lésions tissulaires.

Analyse statistique

Les variables quantitatives ont été décrites à l'aide de moyennes et d'écart-type et les variables qualitatives à l'aide d'effectif et de pourcentage. Pour les rates où plusieurs mesures ont été effectuées, nous avons considéré la moyenne des différentes valeurs pour tenir compte de la corrélation des données d'une même portée. Ainsi nous avons utilisé un test non paramétrique de Wilcoxon pour comparer les paramètres quantitatifs des groupes ligatures et

contrôles. Le seuil de significativité des tests était fixé à 0,05. L'ensemble des analyses était réalisé avec le logiciel R version 3.1.2.

3.2.2 Résultats

Validité du modèle de RCIU

Une rate était décédée sur les 11 au 19^{ème} jour de gestation au cours de la procédure échographique. Le taux d'efficacité des ligatures du pédicule utérin était de 73% : 11 des 15 ligatures ont provoqué un RCIU. Dans le groupe ligature, le total était de 73 ratons dont 26 vivants versus 80 ratons vivants dans le groupe contrôle. Aucune mort fœtale in utero (MFIU) n'a été objectivée dans le groupe contrôle versus 64% (47/73) dans le groupe ligature. Le poids moyen des ratons vivants était de $2,5 \pm 0,6$ g dans le groupe ligature et de $3,6 \pm 0,2$ g dans le groupe contrôle (Tableau 3).

Tableau 2 : Taux de mortalité et poids des ratons de chaque groupe du modèle de RCIU.

Parameters	Non-ligated	Ligated	p-value
Feto-placental units	40	59	...
Intrauterine fetal death (%)	0	38 (64)	<0.001
Living fetuses (%)	40	21 (36)	...
Weight of living fetuses (g) (mean \pm sd) (g)	3.7 ± 0.3	2.7 ± 0.8	<0.001

Repérage échographique des placentas de chaque groupe

Les placentas étaient repérés par échographie en mode-B sur les bords latéraux droits et gauches de la rate à partir de la vessie maternelle. Les cornes étaient suivies de part et d'autre de l'animal. La taille du fœtus et les morts fœtales in utero nous guidaient pour définir le côté observé (ligaturé ou non ligaturé). Avec l'habitude ce repérage était assez facile. Les unités fœto-placentaires les plus douteuses étaient celles qui étaient visualisées au niveau de la ligne médiane. Les cornes utérines étant assez mobiles il était parfois difficile de définir s'il s'agissait du côté droit ou gauche. En cas de doute sur la corne étudiée, l'unité fœto-placentaire n'était pas prise en compte dans l'analyse.

Visualisation de la perfusion placentaire par échographie de contraste

Les agents de contraste ultrasonores arrivent dans les 5 premières secondes dans le placenta par le vaisseau maternel principal (Fig. 33), puis traversent le labyrinthe jusqu'au trophospongium. Le rehaussement du placenta était centrifuge avec une perfusion rapide et intense du vaisseau maternel de gros calibre puis un rehaussement lent du labyrinthe. Dans le groupe présentant une hypoperfusion placentaire, on visualise une prise de contraste moins intense et plus lente dans ces 3 régions. La prise de contraste était caractéristique avec un aspect « crénelé » ou « en flammèches » (Fig. 34). Parfois, on visualise un retard de perfusion mais celui-ci n'était pas caractéristique. Nous n'avons pas observé de prise de contraste au niveau du fœtus ni du cordon ombilical.

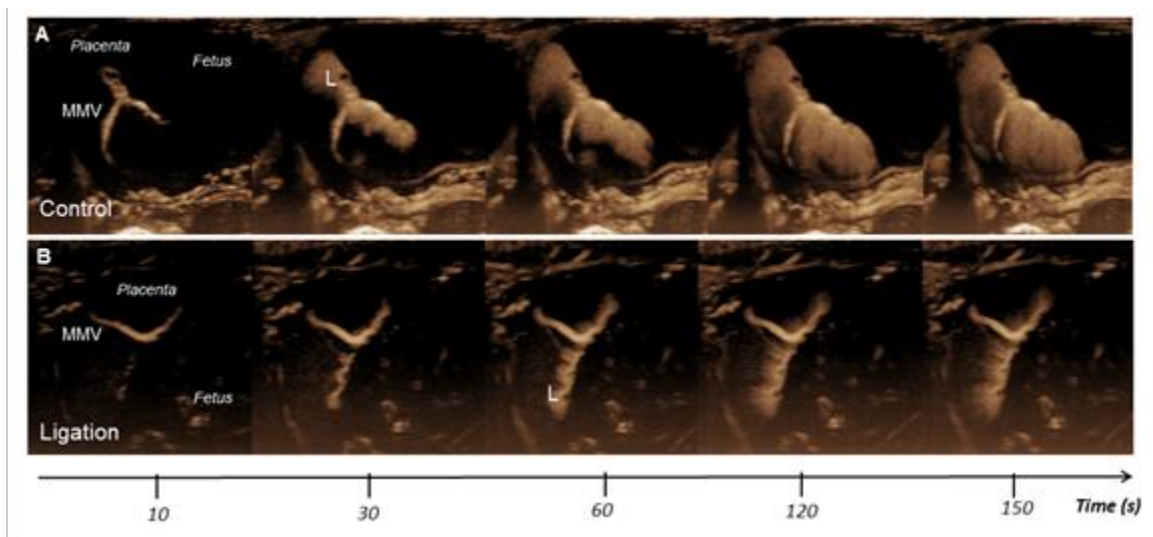


Figure 33 : Image d'une unité fœto-placentaire au cours du temps en mode contraste avec traitement du signal en MIP (*Maximum Intensity Projection*). Etude de l'arrivée des agents de contraste au cours du temps pour un placenta du groupe contrôle et un placenta du groupe ligature. Le rehaussement placentaire est caractérisé par une prise de contraste intense et précoce au niveau du vaisseau principal maternel (MMV : main maternal vessel) puis un rehaussement plus lent, homogène et centrifuge du labyrinthe (L). On visualise très nettement la prise de contraste moins intense et incomplète lors du modèle d'hypoperfusion placentaire par ligature du pédicule utérin.

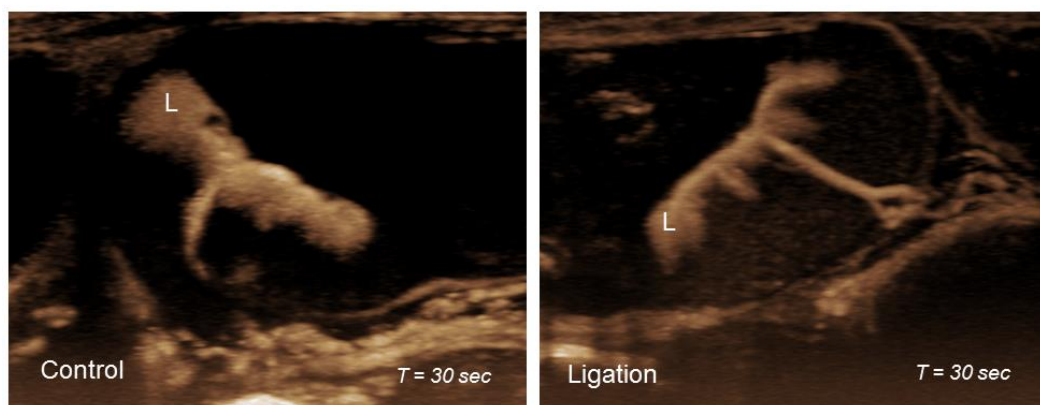


Figure 34 : Image en mode contraste avec traitement du signal en MIP (*Maximum Intensity Projection*). Perfusion placentaire par les agents de contraste échographique. On note l'aspect caractéristique de la prise de contraste pour le placenta du groupe ligature qui apparaît lente et « crénelé » avec un rehaussement moins important du labyrinthe (L).

Quantification de la perfusion placentaire par échographie de contraste

Les paramètres de perfusion ont été calculés à partir des courbes temps-intensité selon le modèle logarithmique pour 10 placentas du groupe contrôle et 12 placentas du groupe ligature. Pour chaque ROI (vaisseau principal maternel, labyrinthe et placenta total) une précision de l'interpolation de la courbe temps-intensité supérieure à 80% était considérée comme satisfaisante, ceci était le cas pour l'ensemble des courbes analysées.

Les paramètres s'intéressant à la densité du réseau micro-vasculaire étaient globalement divisés par un facteur deux dans le groupe ligature par rapport au groupe contrôle. En effet, quelle que soit la ROI étudiée le PE et l'AUC étaient diminués de façon significative (Tableau 4). Par ailleurs, la vitesse d'arrivée des agents de contraste était également diminuée d'un facteur deux dans chacune des ROIS dans le groupe ligature et cela de façon significative ($P=0,033$ pour le vaisseau maternel, $P=0,004$ pour le labyrinthe et $P=0,008$ pour le placenta total) (Fig. 35). Par contre, le délai entre l'injection des agents de contraste et leur maximum d'intensité n'était pas modifié entre les deux groupes (P -value non significatives pour chaque ROI). Nous avons également étudié, la vitesse de vidange des agents de contraste au niveau du placenta global. Le WoR moyen était de $-0,46 (\pm 0,15)$ pour les placentas contrôles contre $-0,19 (\pm 0,08)$ ($P=0,004$). Devant l'approximation trop importante de l'extrapolation des courbes des régions du vaisseau maternel et du labyrinthe ce paramètre n'a pas été calculé.

A partir de ces paramètres nous avons pu calculer l'index de perfusion (qui correspond à WiAUC/RT). Celui était de 61 [u.a] ($\pm 22,3$) pour le côté contrôle contre 27,9 [u.a] ($\pm 14,8$) du côté ligaturé (P=0,0003).

Tableau 3 : Paramètres quantitatifs étudiés en contraste dans chaque région d'intérêt du placenta au 19^{ème} jour de la gestation de la rate Sprague Dawley dans le groupe ligature et le groupe contrôle. Chaque paramètre est présenté avec sa moyenne et son écart type (minimum-maximum) et les groupes sont comparés par un test non paramétrique de Wilcoxon.

	Control Mean \pmsd (min-max)	Ligation Mean \pmsd (min-max)	P-value
PE			
Whole placenta	76,1 \pm 16,7 (57,2-92,2)	32,6 \pm 15,5 (13,3-55,6)	0,001
Main maternal vessel	323,3 \pm 133 (215,9-564,1)	128,2 \pm 81,4 (25,6-220,7)	0,002
Labyrinth	46,8 \pm 20,2 (26,6-73,8)	20,8 \pm 7,8 (10-33,3)	<0,001
TTP			
Whole placenta	19,7 \pm 9,7 (6,7-35,1)	20,9 \pm 6,2 (12,5-27,9)	0,722
Main maternal vessel	12,6 \pm 6 (4,5-21)	12,4 \pm 4 (5,9-16,3)	0,553
Labyrinth	43,6 \pm 21,5 (21,8-78,8)	41,1 \pm 16,8 (19,8-62,7)	0,754
WiR			
Whole placenta	11,3 \pm 5,5 (4,8-20,1)	4,5 \pm 3,3 (1,6-10,4)	0,008
Main maternal vessel	81,3 \pm 94,7 (35-274,2)	21,9 \pm 13,8 (6,4-43,9)	0,033
Labyrinth	3,4 \pm 1,8 (1,9-5,8)	1,7 \pm 0,9 (0,6-3,3)	0,004
WiAUC			
Whole placenta	986,1 \pm 643,6 (259,3-2189,1)	426,7 \pm 181 (138,4-642,5)	0,040
Main maternal vessel	2275,9 \pm 1543,6 (927,1-4663)	990,4 \pm 633,4 (75,3-1816,4)	0,147
Labyrinth	1223,6 \pm 631,7 (540,8-2011,1)	570,4 \pm 370,9 (284,7-1276,2)	0,018

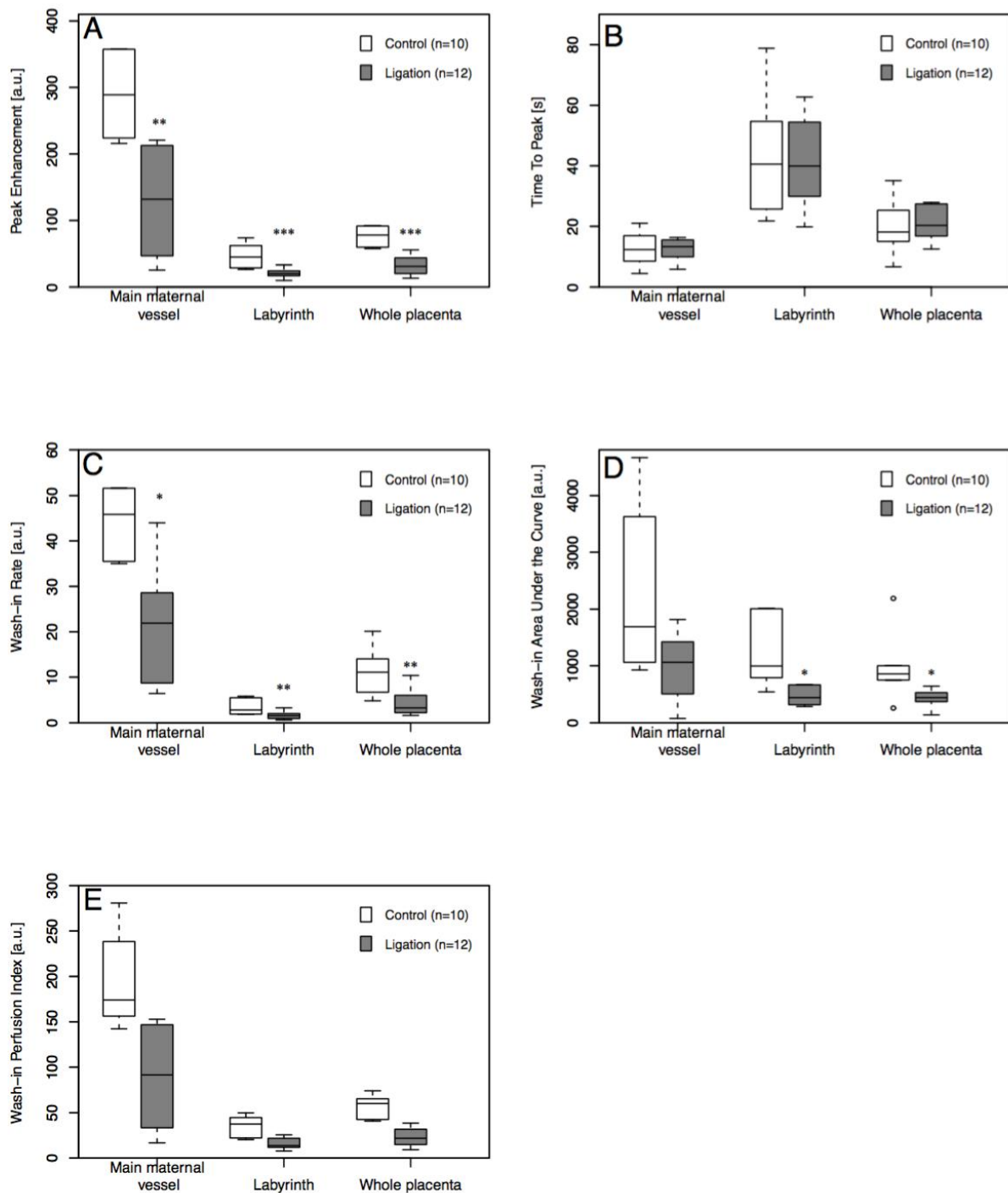


Figure 35 : Boxplot représentant les paramètres quantitatifs étudiés en contraste à partir des courbes temps intensité dans chaque région d'intérêt et pour les groupes de rats du côté ligaturé ou du côté contrôle. La partie **A** – représente l'intensité maximale du signal (PE), la partie **B** – le temps d'intensité maximale (TTP), la partie **C** – la vitesse de remplissage (WiR) et la partie **D** – l'aire sous la courbe (WiAUC).

Analyse histologique

Sept placentas du groupe contrôle et 9 placentas du groupe ligature ont été analysés en histologie conventionnelle. Trois placentas montraient des signes de congestion vasculaire. Les signes les plus importants de congestion correspondaient au raton de plus faible poids (1,2 g) (Fig. 36). Aucun signe d'ischémie placentaire n'a été objectivé sur l'ensemble des prélèvements.

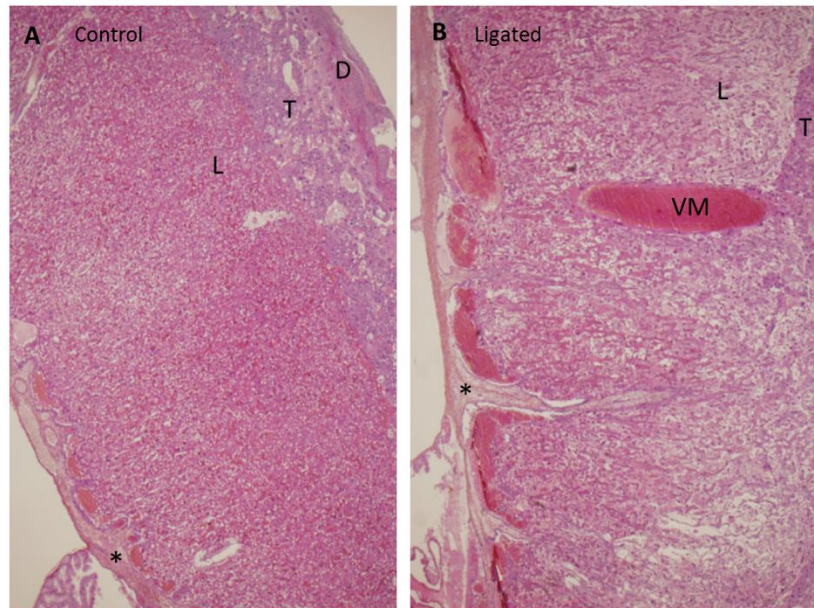


Figure 36 : Coupes histologiques de placenta de rate du groupe contrôle et ligature, après coloration HES observées en microscopie optique (grossissement x2). Sur chacune des deux coupes on visualise le labyrinthe (L), le trophospongium (T) et la décidue (D). Le vaisseau central maternel (VM) et ses branches de division (*) est bien identifié sur le placenta du groupe ligature.

3.2.3 Discussion

D'après nos résultats l'analyse qualitative et quantitative de la perfusion placentaire par échographie de contraste était significativement diminuée dans le modèle de RCIU murin. Des variations de perfusion au cours de situation pathologiques peuvent donc être visualisées en échographie de contraste.

Nous avons observé un taux élevé de MFIU dans le groupe ligature. Celui-ci est comparable au taux observé par Quibel et *al.* (75) qui ont réalisé une ligature selon le même

modèle de Wigglesworth (87). En 2014, sur un modèle de ligature bilatérale chez la souris, Janot et *al.* objectivaient un taux de MFIU entre 10% et 63% selon le jour de la ligature réalisée respectivement aux âges gestationnels de 17 et 16,5 jours sur la partie centrale de la corne utérine (88). Les ligatures réalisées plus tardivement au 17^{ème} jour de gestation n'induisaient pas de RCIU. D'après notre expérience, lors de la mise en place du modèle nous avons procédé à des ligatures plus précoces aux 15^{ème} et 16^{ème} jours de gestation qui entraînaient une mortalité proche de 100%. Nous avons également réalisé des ligatures étagées au milieu de la corne utérine ou à la partie la plus distale de la corne utérine afin de réduire la mortalité, mais ces deux méthodes n'induisaient pas ou moins de RCIU (*résultats non publiés*). D'autre part, selon le nombre de fœtus dans chaque corne, cette méthode était moins reproductible.

Dans un premier temps les ligatures étaient réalisées de façon bilatérale afin d'éviter les erreurs topographiques des cornes lors de l'étude échographique. En effet, nous pensions avoir quelques difficultés à suivre les cornes utérines ligaturées en échographie. En fait, les cornes droites et gauches étaient globalement bien identifiées et, les MFIU représentaient un indice supplémentaire sur la latéralité de la corne étudiée. En effet, au cours de la césarienne la corne utérine droite n'était pas forcément à droite de la ligne médiane. Par la suite, nous avons réalisé des ligatures bilatérales. Tous les clips pour lesquels les deux opérateurs n'étaient pas sûrs du groupe d'appartenance étaient exclus d'emblée.

La prise de contraste dans le labyrinthe était plus lente et moins intense sur le modèle de RCIU par rapport au groupe contrôle. La prise de contraste était très différente entre les cas et les témoins dans tous les cas. De plus, les valeurs quantitatives de perfusion obtenues dans le groupe contrôle étaient semblables à celles retrouvées au cours de la gestation physiologique chez la rate (44). Les valeurs moyennes du pic d'intensité maximal étaient de 50 [a.u] pour 76 [a.u] dans cette étude, et les vitesses de remplissage moyennes étaient de 10 [a.u] pour 11,3 [a.u] dans cette étude. Ceci laisse penser que la chirurgie n'altère pas les paramètres de perfusion du côté contrôle. La perfusion est ainsi diminuée, ce qui est en accord avec les données de la littérature (22). La diminution de la perfusion placentaire peut donc entraîner une altération des échanges materno-fœtaux qui est responsable d'une restriction de croissance fœtale et d'un plus fort taux de MFIU comme observé dans cette étude.

Notre étude est la première à quantifier la perfusion placentaire sur un modèle pathologique de RCIU par échographie de contraste. Des études comparables ont été réalisées en quantifiant la perfusion placentaire par IRM. Dans le placenta total, une diminution

significative du PE de 61,7% est objectivée dans le groupe ligature, ainsi qu'une diminution du volume sanguin de 60,9% du volume sanguin (WiAUC). Deloison *et al.*, ont quantifiés la perfusion placentaire par IRM de perfusion, également au 19^{ème} jour de la gestation sur un modèle de RCIU par ligature vasculaire (22). Les auteurs décrivaient une diminution significative du débit sanguin de 33 %, sans modification du volume sanguin dans le placenta. Salomon *et al.*, retrouvaient une réduction de 42,9 % du débit sanguin en IRM sur un modèle de RCIU par injection de noradrénaline (89). Dans le groupe ligature, la diminution significative du WiAUC dans le placenta total et dans le labyrinthe correspond à une baisse du volume sanguin circulant dans ces deux régions.

Par ailleurs, l'analyse anatomopathologique retrouve des signes de congestion sur des placentas provenant des cornes ligaturées. Ce phénomène peut contribuer également à une baisse du débit et du volume sanguin dans les placentas du groupe ligature.

Notre étude présente par ailleurs des limites, bien que la rate ait en moyenne 6 unités fœto-placentaires par corne utérine, l'étude de la perfusion placentaire par échographie de contraste a eu lieu sur de petits effectifs. En effet, contrairement à une imagerie IRM, une proportion bien plus faible d'unités fœto-placentaires peuvent être imagées par échographie de contraste. Une injection de microbulles permet de quantifier la perfusion placentaire d'une seule unité fœto-placentaire et le nombre maximal d'injection d'agents de contraste est limité à 4. D'autre part, l'insertion du placenta sur la corne utérine influence la visualisation de la prise de contraste. L'échographie de contraste fut réalisée essentiellement sur les placentas antérieurs ou latéraux. Le cône d'ombre secondaire à la prise de contraste du VMP, peut rendre difficile la quantification de la prise de contraste dans le labyrinthe sur les placentas postérieurs.

3.2.4 Conclusion

L'échographie de contraste permet de quantifier une baisse de la perfusion placentaire sur un modèle de RCIU par ligature vasculaire. Aucun passage de microbulles n'a été observé dans le compartiment fœtal. L'échographie de contraste pourrait être une aide au diagnostic de l'insuffisance placentaire et améliorer ainsi la prise en charge du RCIU.

Quels éléments sont apportés par cette expérimentation ?

- Le modèle de RCIU murin par ligature vasculaire est valide, et les résultats obtenus sont concordants avec ceux rapportés dans la littérature.
- L'échographie de contraste peut être utilisée pour quantifier la perfusion placentaire chez la rate, et peut dépister une hypoperfusion sanguine.

L'analyse réalisée grâce au VevoCQ (Visualsonics) est semi-quantitative. Nous n'avons pas connaissance du débit vasculaire car nous ne connaissons pas la concentration précise des microbulles injectées. Afin de tenter d'interpréter au mieux les paramètres quantitatifs de l'échographie de contraste, nous avons souhaité les rapprocher des tendances obtenues par IRM dynamique avec injection de Gadolinium. Dans le chapitre suivant nous présenterons les résultats de l'étude de la perfusion placentaire sur le modèle de RCIU murin par ligature utérine en IRM dynamique (DCE-MRI).

Chapitre 4

Imagerie par résonance magnétique sur un modèle de RCIU
murin par ligature vasculaire

4. Imagerie par résonance magnétique sur un modèle de RCIU murin par ligature vasculaire

L'IRM s'est très largement développée et est de plus en plus utilisée en complément de l'échographie au cours de la grossesse. De nombreuses études suggèrent que l'IRM peut apporter des informations sur la fonction placentaire et notamment en quantifiant le débit sanguin (22,89–92). L'échographie de contraste est beaucoup moins développée pour l'étude de la fonction placentaire. Pourtant, l'échographie est une modalité d'imagerie non invasive, largement disponible et peu coûteuse. Une des explications repose peut-être sur la difficulté à obtenir des informations quantitatives sur la perfusion sanguine, car nous n'avons pas connaissance précisément de la concentration des microbulles injectées en intravasculaire. Une autre limite est l'absence d'étude clinique de grande envergure chez la femme au cours de la grossesse. Enfin, la reproductibilité de la méthode est peu étudiée, et les résultats qualitatifs ou semi-quantitatifs restent parfois difficiles à interpréter. Ainsi, l'IRM est le plus souvent considérée comme une approche innovante de référence. Cependant, les données récentes sur les effets secondaires induits par l'injection de Gadolinium au cours de la grossesse ne sont pas encourageants pour l'étude de la fonction placentaire avec cette technique d'IRM (28). Nous pensons que l'échographie de contraste pourrait avoir une place intéressante dans l'étude de la fonction placentaire. En effet, l'agent de contraste utilisé étant beaucoup plus volumineux il ne passe pas la barrière placentaire (34). Seule l'étude de la perfusion placentaire est donc possible mais a priori sans effet secondaire sur le fœtus. Aucune étude n'a mis en parallèle ces deux modalités d'imagerie pour l'exploration de la perfusion placentaire. L'objectif de notre étude était de déterminer la perfusion placentaire par une technique d'IRM de perfusion (Dynamic contrast-enhanced) afin de pouvoir extraire les paramètres semi-quantitatifs à partir des courbes de cinétique d'intensité du signal en fonction du temps, et les comparer dans un second temps aux paramètres semi-quantitatifs obtenus en échographie de contraste sur le même modèle murin de RCIU.

4.1. Principe de l'IRM de perfusion

L'étude dynamique de la biodistribution au cours du temps d'un complexe de gadolinium injecté en intravasculaire est la technique IRM la plus répandue pour mesurer la perfusion et la perméabilité capillaire (IRM-DCE). L'acquisition d'images avant, pendant et après l'injection des agents de contraste permet d'obtenir la cinétique de contraste des phases de remplissage (wash-in) et de vidange (wash-out) dans les tissus d'intérêt. En utilisant des séquences en T1 (temps de relaxation longitudinale des protons après émission d'une onde de radiofréquence) on visualise l'unité fœto-placentaire de façon anatomique avec le placenta en hypersignal (blanc) et le liquide en hyposignal (noir). Le rehaussement des tissus dépend de plusieurs paramètres comme la vascularisation, la perfusion et la perméabilité capillaire. Ce sont les différences selon les tissus et les pathologies qui sont intéressantes à analyser. L'étude du contraste en IRM repose sur l'analyse qualitative par visualisation de la prise de contraste et l'intensité du signal au cours du temps, une analyse semi-quantitative avec l'étude des paramètres obtenus à partir des courbes temps – intensité du signal (PE, TTP, WiR, WoR et AUC), et une analyse quantitative par l'étude compartimentale et l'analyse du débit de perfusion.

4.2. Matériel et méthodes

Ethique

Toutes les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique de la Région Centre Val de Loire et par le ministère. Elles répondent aux recommandations Nationales et internationales du bien-être des animaux.

Animaux

Pour cette étude, 22 rates femelles gestantes Sprague-Dawley (Janvier, France) ont été utilisées. Le J0 de la gestation était défini comme le lendemain de l'accouplement. Les animaux étaient hébergés avec des cycles jour-nuit de 12h-12h avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*, à l'animalerie du Centre de Biophysique Moléculaire du CNRS d'Orléans. Une semaine d'acclimatation était respectée entre la livraison des animaux et le début des expérimentations.

Les acquisitions IRM étaient réalisées sur des animaux anesthésiés par inhalation au masque avec de l'Isoflurane (Vetflurane®) 1,5 à 2%, et un mélange d'air/O₂ (1/1) à un débit

de 0,5 L/min. Ensuite, les animaux étaient positionnés sur le ventre dans une gouttière en plastique adaptée, puis placés dans une bobine volumique au centre du tunnel de l'aimant. La contention de l'animal était effectuée au niveau du museau. L'Isotrurane était maintenu pendant toute la procédure et son taux était régulé afin d'obtenir une fréquence respiratoire de 30 à 40 respirations par minute. Les paramètres physiologiques de l'animal étaient contrôlés pendant l'acquisition, grâce à un capteur de mouvement placé au niveau du dos et réagissant aux mouvements de la cage thoracique. Ce capteur était relié à un moniteur qui présentait la fréquence respiratoire en temps réel. L'animal était réchauffé par un coussin équipé d'un circuit d'eau chaude contenu au niveau du dispositif de contention de l'animal, afin de maintenir une température corporelle autour de 37°C.

Modèle de RCIU vasculaire par ligature du pédicule utérin

Le modèle de RCIU vasculaire murin était obtenu par ligature d'une artère utérine de façon unilatérale, comme décrit dans le chapitre ci-dessus. Ainsi, chaque rate constituait son propre contrôle. Ceci permettait de s'affranchir de la variabilité inter-rate. La ligature était réalisée au 17^{ème} jour de gestation. Les animaux étaient euthanasiés avant le prélèvement des fœtus par césarienne au 20^{ème} jour de gestation.

Acquisition des images

Les acquisitions IRM ont été réalisées au 19^{ème} jour de la gestation à l'aide d'un imageur horizontal 9,4 Teslas (Bruker Biospin, Wissembourg, France). Une bobine linéaire homogène de diamètre 72 mm dédiée aux études chez le rat permettait la transmission des radiofréquences (Champ magnétique B1) et l'excitation des protons ¹H pour donner un signal IRM appelé FID (Free Induction Decay). L'acquisition était synchronisée sur la respiration de la rate pour limiter les artefacts de mouvements. L'image était ensuite obtenue par transformée de Fourier. Les différentes séquences IRM ont été paramétrées grâce au logiciel Paravision PV5 (Bruker).

Le Tripilot était la première série d'images obtenue, elle permettait de contrôler la position de la rate au centre de l'imageur, et d'obtenir des coupes dans les 3 plans : coronal, axial et sagittal. A partir du plan coronal, une séquence Ig Flash multicoupes de repérage T1 comportant 25 coupes de 1,5 mm d'épaisseur, était centrée sur l'abdomen dans une FOV de 8 x 8 cm afin de repérer les unités fœto-placentaires pour la suite du protocole. La résolution dans le plan était de 312 x 312 µm avec une épaisseur de coupe 1,15 mm. A l'issue de cette séquence de repérage, la coupe présentant le plus grand nombre de placenta interprétables

était déterminée pour effectuer une séquence morphologique en T2. Cette séquence était utile pour l'analyse des images à posteriori. Ensuite, la séquence Inversion-Répétition (IR) TrueFISP T1 2s, était utilisée pour l'analyse de la perfusion placentaire. Une image était effectuée toutes les 10 secondes sur une durée d'une heure. Quatre minutes après le début de l'acquisition, l'injection de l'agent de contraste était débutée manuellement en bolus au niveau de la veine caudale de la rate par un cathéter de 24-gauges. L'agent de contraste utilisé était le Gadolinium (Dotarem[®], gadoterate, Guerbet, Aulnay-Sous-Bois, France) à la dose de 650 μ l (33,5 μ mol/kg) dilué dans du sérum physiologique (NaCl 9%) hépariné (2500 UI/5ml). Le passage de Gadolinium était confirmé par une séquence IR TrueFisp centrée sur les reins avant et après l'injection.

Traitement des images

Les images étaient transférées sur un PC et traitées grâce au logiciel GOA (Guerbet, France). Sur la coupe axiale de l'abdomen de la rate à partir d'une des images obtenue selon la technique IR TrueFISP, les unités fœto-placentaires de la corne contrôle et celles de la corne ligaturée étaient identifiées par 2 opérateurs (S.M. et C-J.A). La ROI était ensuite propagée sur l'ensemble de la série dynamique. En cas de doute sur le côté de la corne, le placenta n'était pas pris en compte dans l'analyse définitive.

Ceci permettait d'obtenir des cinétiques de valeurs d'intensité de signal pour chacune des images de la séquence (n=360). Les courbes expérimentales étaient ensuite ajustées à une courbe théorique par la méthode des moindres carrés. La courbe obtenue dans le placenta était ensuite comparée à celle de l'aorte abdominale (AIF : arterial input function). La courbe de distribution du Gadolinium dans l'aorte était déterminée sur une des rates du lot.

Les différents paramètres semi-quantitatifs du rehaussement placentaire étaient ainsi obtenus : le maximum d'intensité du signal (PE : Peak Enhancement), le temps d'intensité maximale (TTP : Time To Peak), la vitesse de remplissage (WiR : Wash in Rate), la vitesse de vidange sanguine (WoR : Wash out Rate) et le volume sanguin global du début à la fin de l'acquisition (AUC : area under the curve de T0 à la fin de l'acquisition) (Fig. 37).

La ROI placentaire étudiée était similaire à celle du placenta global étudié dans le protocole d'imagerie en échographie de contraste. De la même façon, les paramètres semi-quantitatifs extraits à partir des courbes temps – intensité étaient comparables aux paramètres étudiés en échographie de contraste. Ceci nous permettra de comparer plus facilement les tendances des paramètres étudiés en échographie de contraste et en IRM.

Nous avons également réalisé une analyse quantitative de la perfusion et de la perméabilité selon une analyse compartimentale.

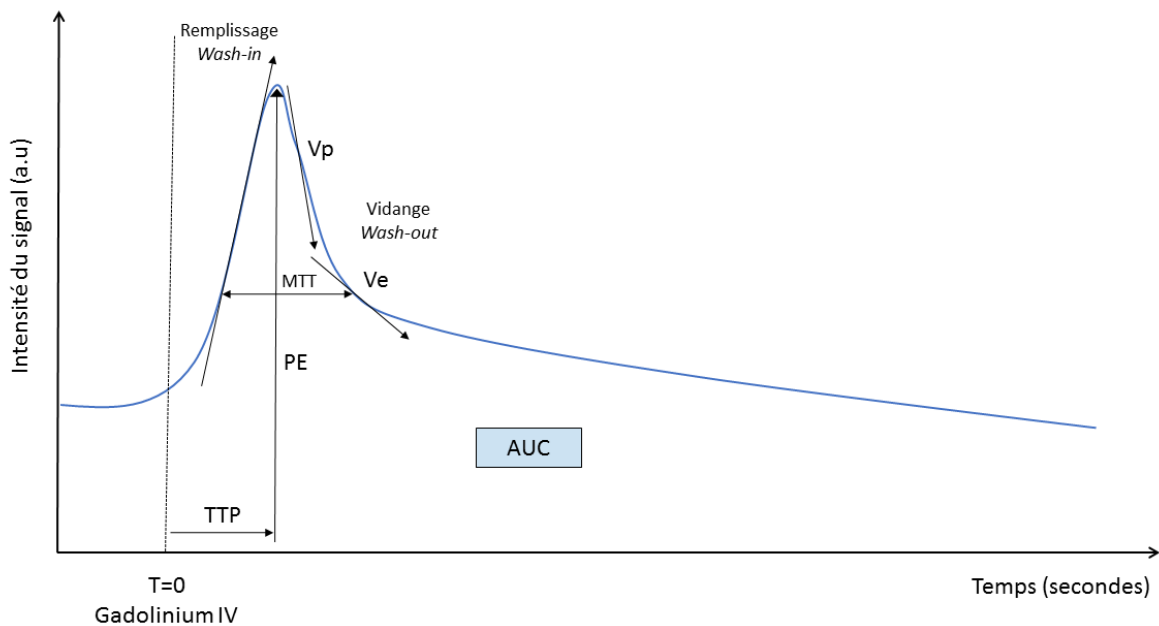


Figure 37 : Cinétique de valeurs d'intensité de signal obtenue après injection IV de Gadolinium. Les paramètres semi-quantitatifs étudiés sont les phases de remplissage (wash-in) et de vidange (wash-out), le pic d'intensité maximale (PE : Peak enhancement), le temps pour obtenir le pic maximal (TTP : time to peak), et l'aire sous la courbe (AUC : area under the curve).

Analyse compartimentale

L'agent de contraste se comporte comme un traceur et est donc retrouvé à la fois dans le placenta et le fœtus. Ainsi, l'analyse compartimentale permet de décrire les échanges entre les différents compartiments où est présent l'agent de contraste à l'aide de constante de transfert. Elle repose sur la concentration du produit de contraste, en fonction du temps dans le réseau capillaire et les tissus, et a été modélisée pour la première fois par (93).

Deux analyses ont été réalisées dans notre étude. Une analyse mono-compartimentale sur le placenta global à partir du modèle de Tofts et une analyse bi-compartimentale sur 3 régions du placenta (le vaisseau maternel principal, le labyrinthe et le placenta global) à partir du modèle de Kety (94).

Dans un premier temps, à partir des données physiologiques nous avons assimilé le placenta à un modèle mono-compartiment alimenté par une arrivée artérielle et drainé par une veine d'après le modèle de Toft :

$$\frac{dQ_{pc}(t)}{dt} = F_t \cdot Q_{pa}(t)$$

Dans un second temps, une analyse bi-compartimentale était réalisée pour étudier différentes régions du placenta correspondant à différentes zones histologiques. Le modèle bi-compartimental de Kety (94) est très proche du modèle de Tofts (93) et permet de relier une variation d'intensité de signal IRM sur une région donnée (voxel) à trois paramètres : F_t le flux sanguin, V_p le volume plasmatique, K_{ps} la constante de perméabilité des capillaires sanguins. Les équations de Kety permettent de déterminer la variation de quantité de produit qui se trouve dans le système sanguin au sein du voxel choisi $dQ_{pc}(t)/dt$:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dQ_{pc}(t)}{dt} = F_t \cdot Q_{pa}(t) - \left(\frac{F_t + K_{ps}}{V_p} \right) Q_{pc}(t) \\ \frac{dQ_{pe}(t)}{dt} = \frac{K_{ps}}{V_p} Q_{pc}(t) \\ Q_t(t) = Q_{pc}(t) + Q_{pe}(t) \end{array} \right.$$

Dans le modèle de Kety, on considère que la quantité de produit à un instant t dans le compartiment sanguin est liée à la quantité de produit qui entre moins la quantité de produit qui sort du compartiment. La quantité de produit qui entre et sort du compartiment dépend du flux sanguin F_t . Les sorties de produit dépendent aussi du flux de produit qui traverse les parois des vaisseaux sanguin du fait de leur perméabilité K_{ps} . Pour déterminer la quantité de produit qui entre dans le compartiment, l'équation de Kety se base sur une fonction de référence : l'AIF, arterial input fonction. L'AIF correspond à une courbe d'intensité de signal en fonction du temps pour une artère de l'organisme étudié. Dans notre cas, nous avons déterminé l'AIF au niveau de l'aorte abdominale d'une rate en coupe axiale. Dans ce modèle, on considère que la fraction plasmatique V_p de l'artère est de 100% et que K_{ps} est nulle. Ainsi, à un instant t , la quantité de produit qui entre dans le compartiment sanguin du voxel choisi est liée à la quantité de produit contenu dans l'artère $Q_{pa}(t)$. En sachant que la quantité de produit total dans le voxel choisi Q_t correspond à la somme des quantités de produits dans le compartiment tissulaire Q_{pe} et le compartiment sanguin Q_{pc} , on peut déterminer les trois paramètres de l'équation (Fig.38). Les courbes ont été modélisées à partir du logiciel GOA et

Excel par des courbes bi-exponentielles et permettaient de déterminer des paramètres de flux F , de volume plasmatique V_p et de perméabilité capillaire K_{ps} , au sein du placenta.

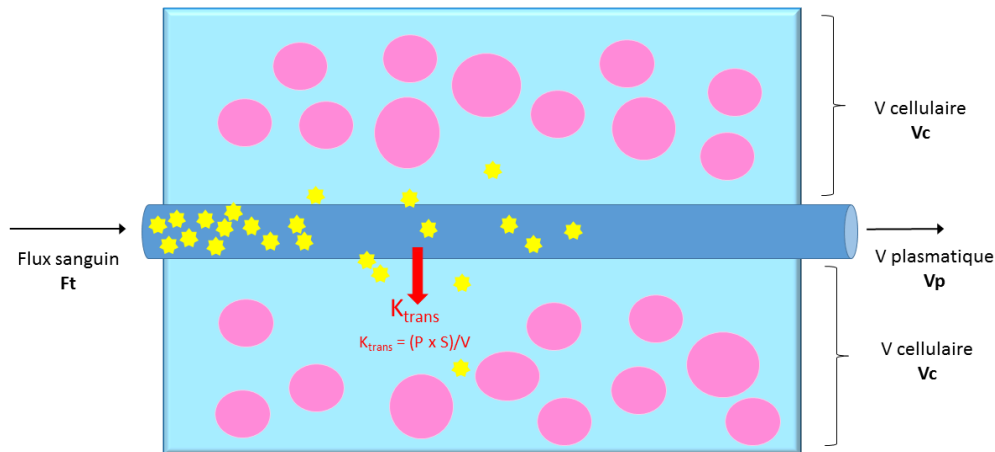


Figure 38 : Modèle de Kety. Représentation de la diffusion (K_{trans}) de l'agent de contraste (jaune) du compartiment plasmatique (V_p) vers le compartiment cellulaire (V_c). L'agent de contraste n'entre pas dans les cellules. Le modèle est assimilé à un compartiment unique alimenté par une artère et drainé par une veine.

Analyse statistique

Les analyses ont été réalisées sous R Version 3.3.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Les données quantitatives continues étaient présentées sous la forme de médianes et d'intervalle interquartile, alors que les données qualitatives étaient présentées sous la forme d'effectifs et de pourcentages. Pour chaque rate, il y avait des cas et des contrôles. Afin de tenir compte de la corrélation des données, toutes les mesures prises sur un animal étaient moyennées et ainsi une seule moyenne pour les mesures des cas et une seule moyenne pour celles des contrôles était donc prise en compte. Les données entre les cas et les contrôles étaient comparées par des tests non paramétriques de Wilcoxon.

4.3. Résultats

Parmi les 22 rates de l'étude, 6 rates ont permis la validation des acquisitions IRM. Pour 3 rates, le modèle de RCIU n'était pas valide et 7 rates ont présentées des complications de la chirurgie, de l'anesthésie, ou une absence de passage de l'agent de contraste ne permettant pas

la visualisation d'un rehaussement placentaire. Ainsi, le protocole a été réalisé de façon complète et les résultats étaient interprétables pour 6 rates gestantes. Certaines mesures obtenues sur des placentas de fœtus décédés *in utero* ont été exclues de l'analyse. Ainsi, nous avons pu analyser les données de 28 placentas du côté contrôle et 19 placentas du côté ligaturé.

Analyse qualitative

L'analyse qualitative des séquences anatomiques retrouvait un rehaussement intense et rapide de l'aorte abdominale, et un rehaussement plus lent du placenta au niveau de sa partie supérieure correspondant à la région histologique du vaisseau maternel principal, puis du labyrinthe (Fig.39). A partir de cette acquisition, les unités fœto-placentaires étaient bien visualisées.

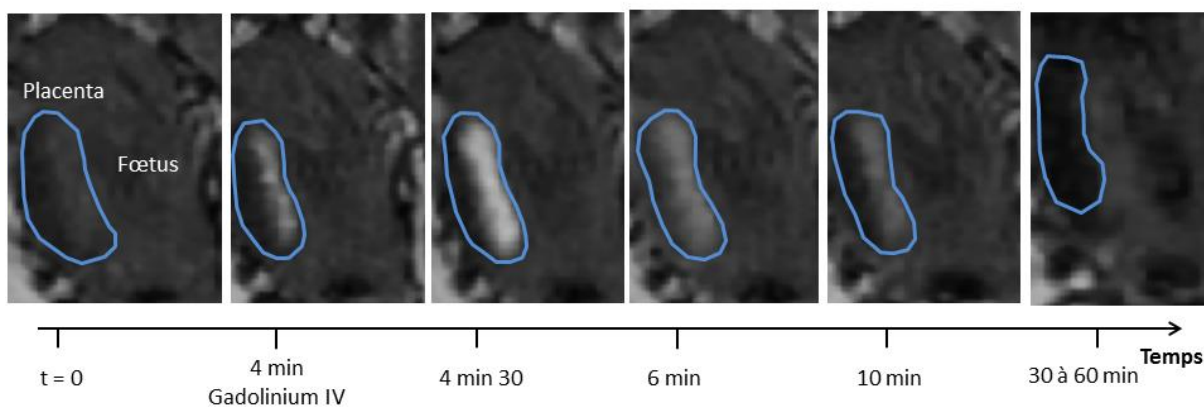


Figure 39 : Acquisition IRM-DCE 9,4 Teslas en séquence T1 montrant la prise de contraste du placenta au cours du temps. La ROI placentaire est schématisée en bleue sur les images IRM. L'acquisition de longue durée (1 heure) permet une exploration de la phase de remplissage et de vidange vasculaire.

Analyse semi-quantitative

Les unités fœto-placentaires étaient identifiées avec le placenta positionné latéralement. La figure 40 montre une image d'une séquence dynamique identifiant les placentas des cornes contrôle et ligaturée. La figure 41 détaille les 3 ROIS tracées sur chaque placenta analysé.

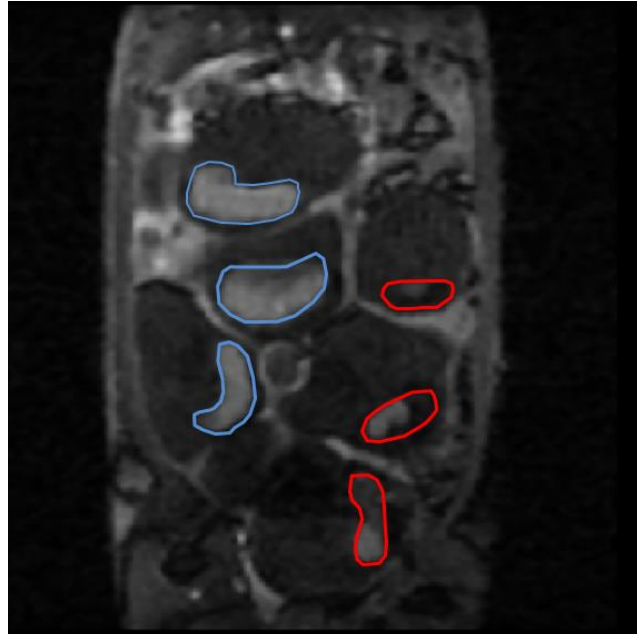


Figure 40 : Acquisition IRM en T1 représentant les ROIS tracées manuellement au niveau des placentas de la corne contrôle (bleu) et de la corne ligaturée (rouge).

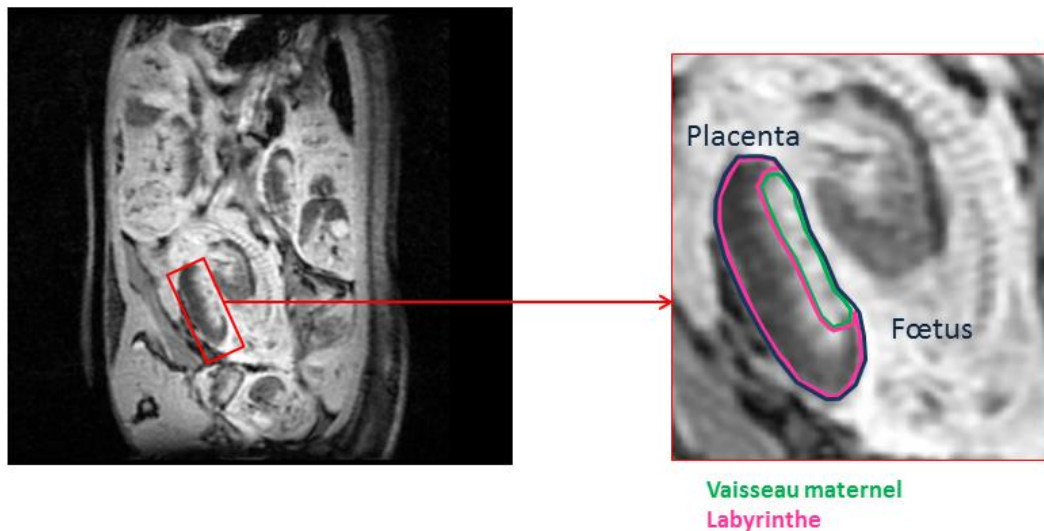


Figure 41 : Acquisition IRM 9,4 Teslas en séquence T1 permettant une analyse quantitative des différentes régions du placenta après injection intravasculaire de Gadolinium chez la rate au 19^{ème} jour de gestation. Les régions d'intérêt étudiées sont le vaisseau maternel (ROI verte), le labyrinthe (ROI rose) et le placenta global (ROI bleue).

La figure 42 représentent les courbes de perfusion obtenues pour chaque ROI du placenta correspondent aux moyennes de l'ensemble des 131 courbes. La différence d'intensité maximale entre les placentas des deux groupes était de 44 % pour le placenta total, de 47 %

pour le vaisseau maternel et de 37 % pour le labyrinthe. La distribution des valeurs d'intensité du signal au niveau du labyrinthe est représentée dans la figure 43.

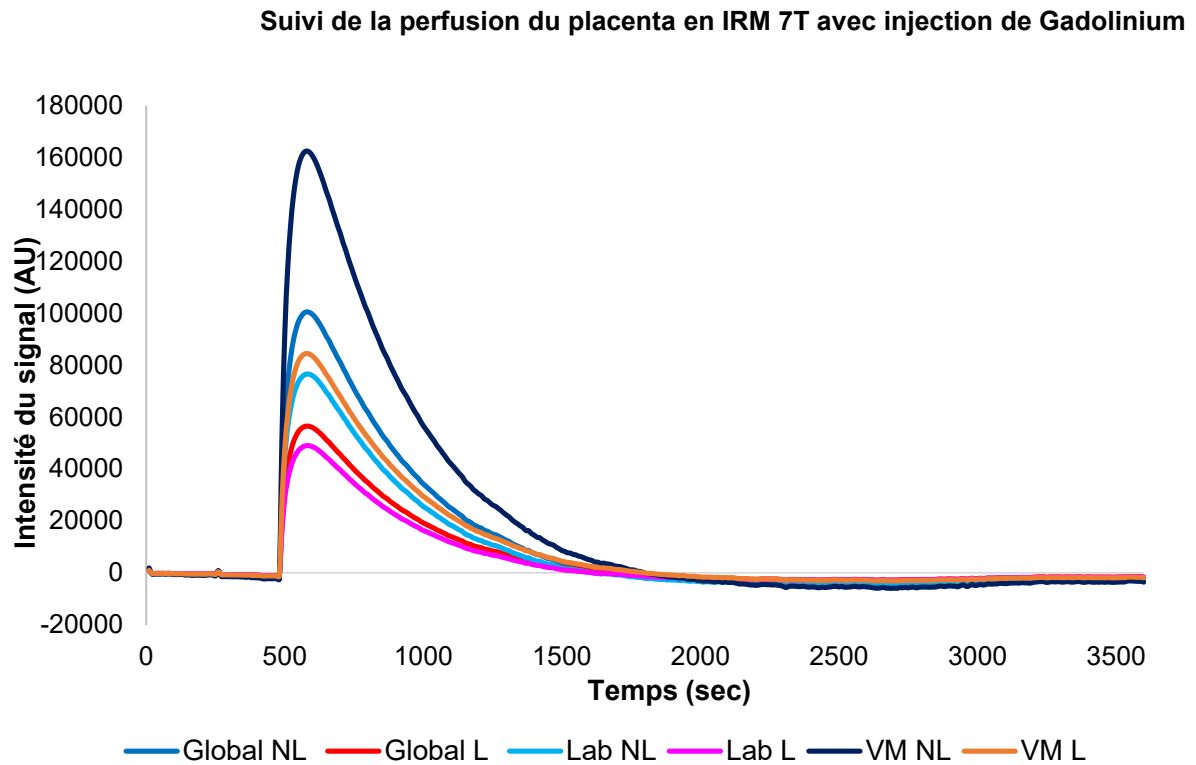


Figure 42 : Cinétiques des valeurs d'intensité de signal obtenues après injection IV de Gadolinium en IRM 9,4 Teslas, dans les différentes ROIS étudiées pour chacun des groupes contrôle et ligature. Les courbes représentées résultent des moyennes de l'ensemble des mesures de chaque animal.

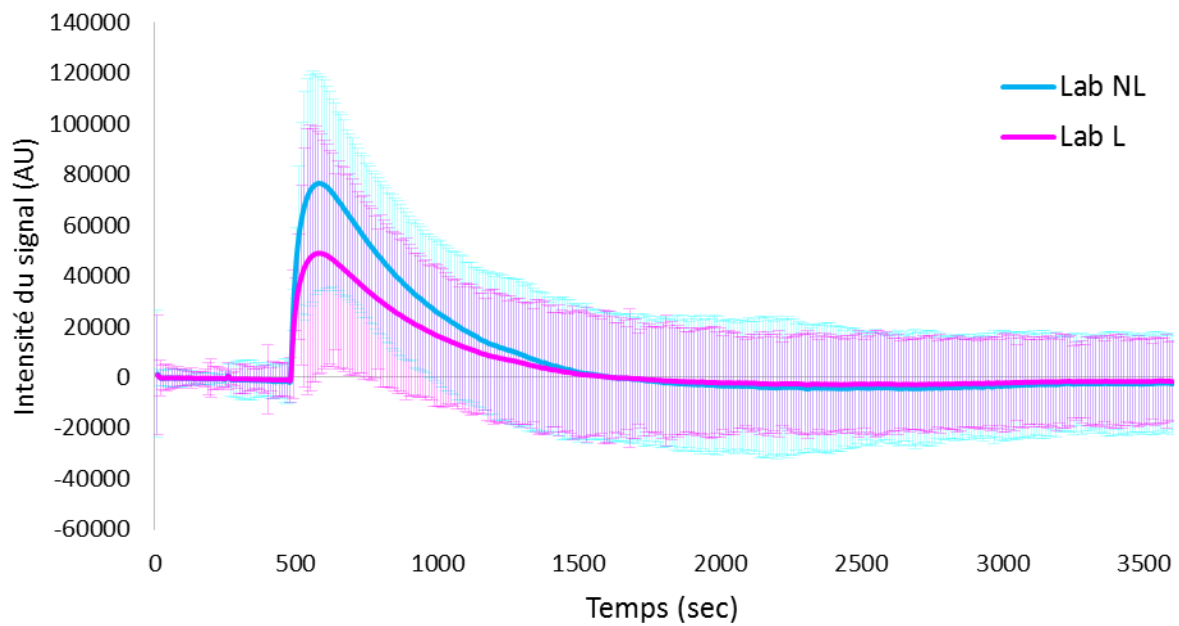


Figure 43 : Cinétiques des valeurs d'intensité de signal, avec leurs intervalles de confiance obtenues après injection IV de Gadolinium en IRM 9,4 Teslas, dans le labyrinthe du côté contrôle et du côté ligaturé pour l'ensemble des animaux étudiés.

A partir de chacune des courbes de perfusion, les paramètres semi quantitatifs étaient calculés et les valeurs pour les deux groupes sont représentées par des boxplots (Fig. 44). Ainsi, la perfusion était diminuée de façon significative entre les placentas contrôles et ceux ligaturés ($P < 0,001$ pour chacune des régions). En effet, le PE, le WiR, le WoR et l'AUC étaient significativement diminuées pour les 3 régions étudiées. Cependant, l'échantillonnage réalisé toutes les 10 secondes ne montrait pas de différence concernant le temps d'arrivée des agents de contraste (TTP) pour le vaisseau principal maternel ($P = 0,351$), le labyrinthe ($P = 0,180$), et le placenta total ($P = 0,772$) dans le groupe contrôle et ligature.

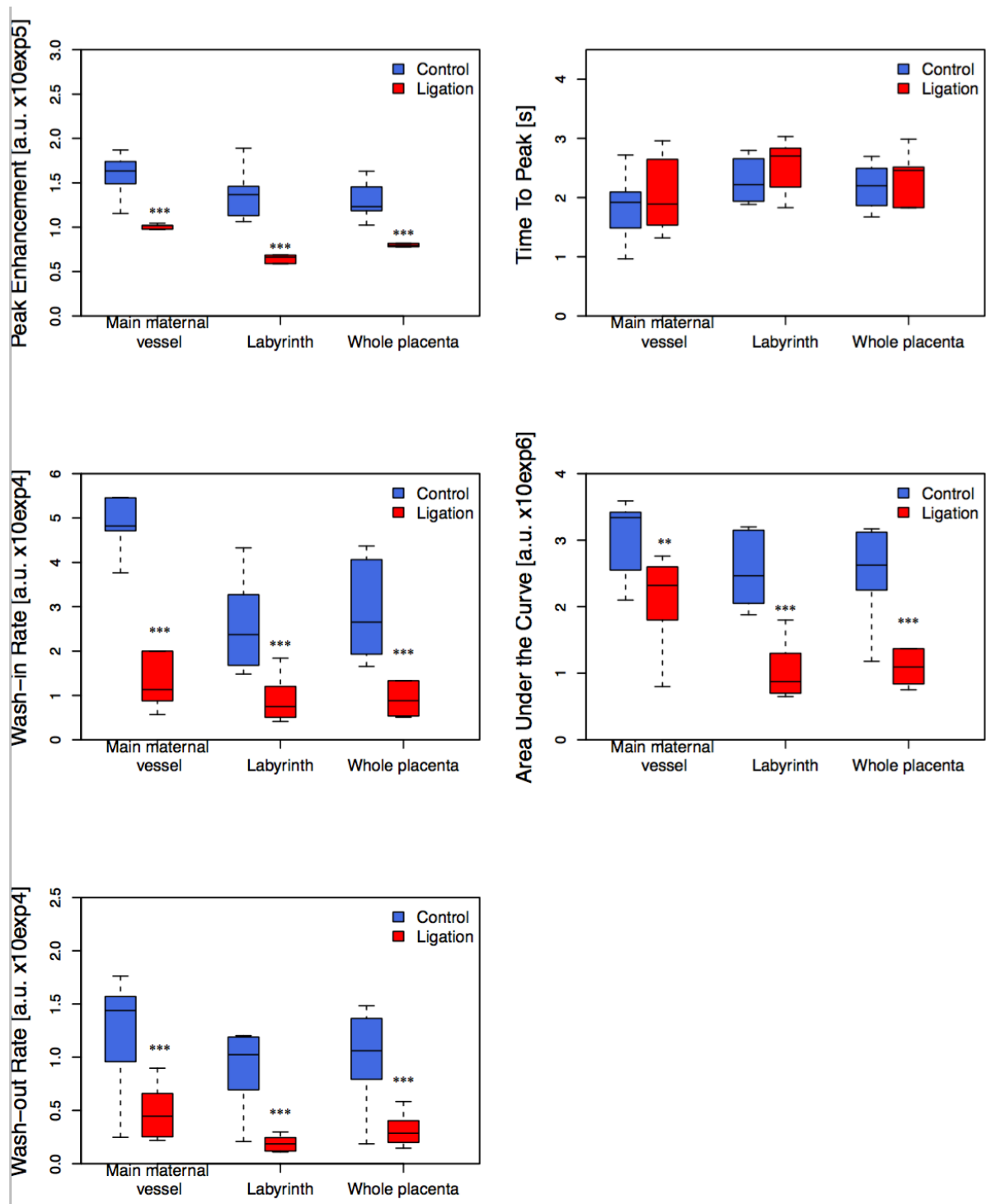


Figure 44 : Boxplot représentant les paramètres semi-quantitatifs étudiés en IRM au niveau du vaisseau maternel principal, du labyrinthe et du placenta global. Les boîtes bleues correspondent aux mesures faites sur les contrôles et les boîtes rouges correspondent aux mesures du côté ligaturé. Les mesures présentant des différences significatives entre les deux groupes sont signalées par * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$ (test de Wilcoxon).

Analyse quantitative

Les paramètres quantitatifs étudiés retrouvaient une diminution très significative du flux sanguin dans les placentas des cas présentant une ligature vasculaire (Tableau 5). Le flux sanguin mesuré était de 90,9 mL/min/100 mL (IQR 85,1 – 95,7) pour les placentas contrôles versus 51,2 mL/min/100 mL (IQR 34,9 – 54,9) pour les placentas des cas ligaturés ($P < 0,00001$). De la même façon, le volume plasmatique était de 18,1 % (IQR 17,6 – 18,4) pour les placentas contrôles versus 11,9 % (11,6 – 12,4) pour les placentas ligaturés.

Tableau 4 : Paramètres quantitatifs des placentas contrôles et des placentas ligaturés d'après l'analyse mono-compartimentale issue du modèle de Toft.

Paramètres	Contrôles	Cas ligaturés	P-value
Placenta total			
Flux sanguin (mL/min/100 mL)	90,9 (85,1 – 95,7)	51,2 (34,9 – 54,9)	<0,00001
Constante de transfert Kps (mL/min/mL)	0 (0 – 0,0007)	0 (0 – 0,0017)	0,235
Volume plasmatique (%)	18,1 (17,6 – 18,4)	11,9 (11,6 – 12,4)	<0,0001

4.4. Discussion

Les résultats que nous avons observés en analyse semi-quantitative et quantitative concordent tous vers une diminution de la perfusion placentaire dans les placentas de la corne ligaturée par rapport à ceux de la corne contrôle. Ceci est en accord avec les résultats de la littérature.

Le flux sanguin placentaire observé dans le groupe contrôle et le groupe ligature est comparable aux résultats publiés. En effet, Alison et *al.* obtenaient chez la rate avec un modèle de ligature vasculaire un débit de 115 (± 72) mL/min/100 mL du côté contrôle contre 66 (± 30) mL/min/100 mL du côté RCIU (23). Dans une autre étude de la même équipe avec le même modèle de RCIU chez la rate (22), les auteurs retrouvaient un débit sanguin moyen estimé à 159 ($\pm 54,6$) mL/min/100 mL dans les placentas contrôles et de 108 (± 41) mL/min/100 mL du côté ligaturé. Une autre étude réalisée sur la souris Balb/c au cours de la gestation physiologique montrait un débit d'environ 99 ($\pm 0,5$) mL/min/ 100 mL (95).

Concernant les paramètres semi-quantitatifs, ils ne sont généralement pas publiés dans les études portant sur l'IRM car l'analyse d'un débit est plus parlante. Nous avons tenu à présenter ces résultats afin de pouvoir les rapporter aux variations de ces mêmes paramètres étudiés en échographie de contraste.

Une des limites de l'analyse en IRM est le faible rapport signal sur bruit. Ainsi, l'analyse des différentes régions identifiées en analyse histologique sur le placenta de la rate sont tracées de façon assez grossière sur l'acquisition IRM.

4.5. Conclusion

La quantification de la perfusion placentaire que nous avons obtenue est comparable aux résultats obtenus sur des modèles de RCIU vasculaire chez la rate gestante déjà publiés. Ceci permet de montrer la validité de nos résultats, et de comparer l'analyse des paramètres semi-quantitatifs des deux modalités d'imagerie à savoir l'IRM et l'échographie de contraste.

Chapitre 5

Comparaison de l'échographie de contraste et de l'IRM de perfusion

5. Comparaison de l'échographie de contraste et de l'IRM de perfusion

Travaux en cours de publication

5.1. Objectif

Ainsi, les chapitres précédents présentent les résultats des paramètres quantitatifs obtenus en échographie de contraste et en IRM sur le modèle de RCIU murin par ligature vasculaire. Nous avons souhaité aborder dans ce chapitre la comparaison de ces deux modalités d'imagerie. En effet, il n'est pas possible de comparer directement l'échographie et l'IRM car les agents de contraste ont leurs propres propriétés et les techniques d'imagerie ne mesurent pas exactement les mêmes choses. En particulier, l'échographie de contraste ne permet pas de mesurer directement un débit sanguin comme obtenu en IRM. Cependant, avec les deux méthodes nous visualisons un rehaussement de signal après l'injection d'un agent de contraste qui nous permet d'obtenir une courbe de valeurs cinétiques de l'intensité du signal en fonction du temps. C'est à partir de ces courbes que nous avons tenté de comparer les tendances des paramètres de perfusion mesurés en échographie de contraste et en IRM au niveau du placenta du modèle murin de RCIU vasculaire. Cette comparaison est l'objectif de ce chapitre.

5.2. Matériel et méthodes

Les résultats des paramètres de perfusion des deux expérimentations précédentes sur l'échographie de contraste et l'IRM dans le modèle de RCIU murin par ligature vasculaire ont été comparés. Six rates ont été exploitées en IRM avec injection de Gadolinium et 6 rates ont été étudiées en échographie de contraste avec injection de microbulles Definity®. Le protocole expérimental était le même pour les deux modalités d'imagerie étudiées, c'est-à-dire une ligature vasculaire au 17^{ème} jour de la gestation ce qui équivaut au début du troisième trimestre de grossesse chez la femme, et l'acquisition des images au 19^{ème} jour de gestation.

Pour chaque rate étudiée, nous disposions de mesures réalisées sur des placentas contrôles et des mesures réalisées sur des placentas ligaturés. Afin de tenir compte de la corrélation des données, nous avons réalisé la moyenne de l'ensemble des mesures obtenues pour la corne contrôle et de la même façon nous avons réalisé la moyenne des mesures obtenues dans la corne ligaturée. Ainsi, une moyenne des mesures était obtenue pour chacune des cornes de chaque animal étudié. Ces valeurs pouvaient être comparées pour chaque animal.

Nous avons ensuite calculé la différence exprimée en pourcentage, des mesures obtenues entre les placentas des deux cornes utérines : $((\text{mesure contrôle} - \text{mesure ligature}) / \text{mesure contrôle}) \times 100$. Les différences observées par échographie de contraste et par IRM étaient ensuite comparées et représentées graphiquement par un boxplot. Cette comparaison était réalisée pour chacun des paramètres semi-quantitatifs étudiés par les deux modalités d'imagerie, à savoir l'AUC, le PE, le TTP, le WiR et le WoR au moyen d'un test exact de Fisher. L'ensemble des analyses étaient réalisées avec R version 3.1.1. La significativité du test était fixée à 5%.

5.3. Résultats

D'après les résultats semi-quantitatifs obtenus avec les deux modalités d'imagerie, les agents de contraste arrivaient en même temps (TTP) dans les placentas des deux groupes ($P=0,937$) (Fig. 45). Le maximum d'intensité du signal (PE) était diminué dans les placentas avec une ligature vasculaire, mais cette diminution évoluait dans les mêmes proportions en échographie et en IRM ($P=0,240$). De plus, l'étude du remplissage et de la vidange vasculaire montraient une diminution des vitesses pour les placentas du groupe ligature par rapport au groupe contrôle, mais là encore cette diminution était comparable dans les deux modalités d'imagerie ($P=0,937$ et $P=0,818$ pour le WiR et le WoR respectivement). L'étude globale de l'aire sous la courbe (AUC) retrouvaient des valeurs diminuées dans le groupe ligature sans que l'on retrouve de différence significative entre l'échographie de contraste et l'IRM ($P=0,065$).

L'analyse quantitative avec la mesure du débit sanguin obtenue en IRM n'a pas d'équivalent en échographie de contraste. La mesure qui permet au mieux d'approcher la perfusion, sans pour autant donner un débit, est l'index de perfusion qui peut être calculé en faisant le rapport du *WiAUC* (*Wash-in AUC*) sur le RT (*rise time*). La comparaison des

variations du débit obtenu en IRM de perfusion et de l'index de perfusion obtenu en échographie de contraste ne montre pas de différence entre les deux méthodes (P=0,393).

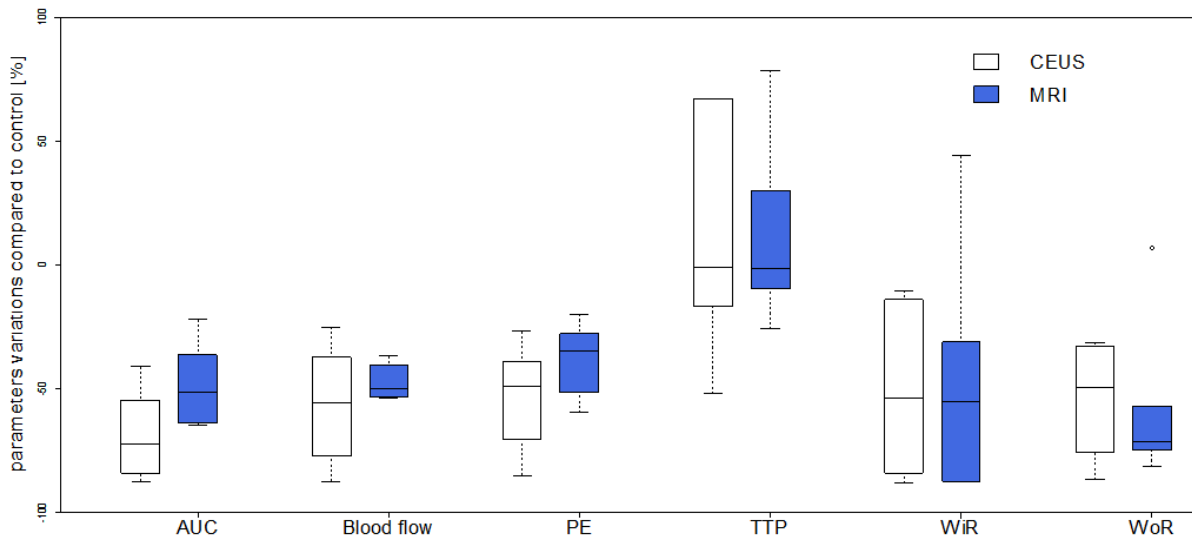


Figure 45 : étude du rapport de chaque paramètre de perfusion entre le groupe contrôle et le groupe ligature pour les deux méthodes d'imagerie : l'échographie de contraste et l'IRM. Les variations du maximum d'intensité (PE), de la vitesse de remplissage (WiR) et de l'aire sous la courbe (AUC) sont exprimés en pourcentage de perte de signal par rapport au groupe contrôle. Le maximum d'intensité (TTP) est exprimé en pourcentage de temps par rapport au groupe contrôle.

5.4. Discussion

Ainsi, d'après nos résultats l'aspect des courbes de cinétique des valeurs d'intensité du signal sont comparables entre l'échographie de contraste et l'IRM. Dans notre étude, les paramètres variaient dans les mêmes proportions entre les groupes contrôles et RCIU. Il faut tout de même rester prudent concernant les mesures de l'AUC et du WoR en échographie de contraste. En effet, une extrapolation des courbes de cinétiques obtenues à partir d'un clip de 3 minutes était nécessaire pour avoir ces deux valeurs. L'extrapolation a été faite de façon la plus rigoureuse possible et en cas d'impossibilité, notamment lors des cinétiques de décroissances trop douce, celle-ci n'était pas réalisée. Ainsi, on note pour ces deux paramètres des tendances de variations un petit plus importantes. La méthode de mesure peut donc en partie expliquer cela.

C'est la première fois que ces deux modalités d'imagerie sont comparées pour l'étude de la perfusion placentaire. Cette approche constitue une première étape encourageante vers la validation de l'échographie de contraste pour dépister des anomalies de perfusion placentaire.

La connaissance préalable des différentes régions histologiques, et de l'écho-anatomie de la rate nous a permis d'établir une méthodologie pour l'acquisition des images. De plus, l'utilisation systématique de bras articulé pour fixer le transducteur, de systèmes de contention pour l'animal, et de corrections de mouvements permettaient l'obtention d'acquisitions de bonne voire de très bonne qualité. Ainsi, la reproductibilité de la mesure est bonne pour l'échographie de contraste. Les deux modalités d'imagerie permettent d'objectiver une diminution significative de la perfusion placentaire dans le groupe RCIU. Cependant, les deux modalités présentent chacune des limites.

Une des limites de l'échographie de contraste est l'absence d'analyse quantitative. En effet, cette limite vient du fait que nous ne connaissons pas précisément la concentration des microbulles injectées en échographie de contraste contrairement à l'IRM. L'index de perfusion permet de s'approcher des valeurs de débit, toutefois il ne permet pas d'obtenir une mesure de débit. Par ailleurs, l'analyse basée uniquement sur les paramètres semi-quantitatifs peut être source d'erreurs. En effet, en échographie de contraste, la modification du gain et la sensibilité du transducteur peuvent modifier de façon importante les résultats obtenus. C'est ce que nous avons observé sur les 2 expérimentations que nous avons réalisées au cours de la gestation physiologique de la rate (cf chapitre 3). Par exemple, le PE est multiplié par un facteur 10 entre les deux expérimentations au même jour de la gestation. Nous avons également parfois observé une hétérogénéité dans la prise de contraste selon la position du placenta (antérieur, latéral ou postérieur), avec certaines acquisitions qui n'étaient pas exploitables. Par ailleurs, les mesures pouvaient également être difficiles à évaluer en cas de d'atténuation.

En IRM, le rapport signal sur bruit est moins bon, et la résolution de l'image ne permettaient pas toujours d'explorer de façon satisfaisante les différentes régions d'intérêt comme nous avons pu le faire en échographie. D'autre part, l'acquisition corps entier rendait un grand nombre de placentas analysables sur la même rate. Cependant, l'incidence des placentas étudiés n'était pas toujours la bonne. Nous avons tout de même pu étudier près de deux fois plus de placentas en IRM par rapport à l'échographie de contraste.

D'autre part, dans nos études l'analyse du placenta est actuellement limitée au plan de coupe étudié. Sur le petit animal les sondes 3D à balayage manuel ne permettent pas d'obtenir

l'évaluation de la perfusion en mode bolus. Lors d'acquisitions en 3D généralement la perfusion est étudiée en mode perfusion c'est-à-dire en injectant des agents de contraste ultrasonore de façon continue. L'acquisition 3D en échographie de contraste permettrait également un recalage plus performant des mouvements. L'avantage de l'IRM est de permettre l'acquisition d'un volume et de pouvoir projeter la ROI étudiée dans les autres plans du volume. De plus, l'IRM avec son large champ d'exploration permet d'étudier la totalité du placenta d'une femme en pratique clinique, et même parfois d'explorer certaines régions d'intérêt au niveau du fœtus. Ceci n'est pas possible en échographie dans la pratique clinique, ainsi nous ne pourrions avoir qu'un reflet partiel de la fonction placentaire centré sur une région choisie.

Un autre point fondamental est d'établir l'innocuité des procédures. L'échographie est largement diffusée au cours de la grossesse et son innocuité est largement démontrée aux index mécaniques utilisés. Cependant, l'injection de microbulles au cours de la grossesse n'est pas autorisée. En effet, comme nous l'avons montré les femmes enceintes ont été exclues des études cliniques et les données sont actuellement trop nombreuses pour les recommander. L'analyse de la littérature et nos résultats sont toutefois rassurants sur leur utilisation. D'une part, les microbulles sont trop volumineuses pour passer la barrière placentaire même sous l'effet de fortes ondes acoustiques (34) (chapitre 2). D'autre part, les dommages qu'elles pourraient engendrer au niveau du placenta comme des phénomènes de cavitation n'ont pas été mis en évidence au niveau des études sur l'animal. Une étude récente sur la femme au premier trimestre de la grossesse mettait en évidence l'absence de modifications au niveau des microvillosités syncytiales et l'absence de phénomène d'apoptose cellulaire (33). Dans notre service nous avons actuellement une étude clinique dont le recrutement est terminé, portant sur l'évaluation de l'échographie de contraste pour le diagnostic des placentas accretas. Aucun effet secondaire maternel ni fœtal grave n'a été notifié à ce jour. Les résultats sont en cours d'analyse. L'étude clinique réalisée par Ordén et *al.* (32) ne retrouvaient pas de modifications hémodynamiques fœtales lors de l'injection des microbulles et pas non plus d'anomalies à l'examen clinique du nouveau-né à la naissance. Cependant, ces études portent sur des effectifs réduits et il n'y a pas d'évaluation à moyen et long terme du retentissement.

L'IRM quant à elle, est également largement utilisée au cours de la grossesse pour l'étude des pathologies fœtales de découverte anténatale. Une étude récente porte sur l'évaluation de son innocuité au premier trimestre. Les auteurs ne retrouvent pas d'augmentation du risque d'anomalies congénitales, de baisse de la vision ou de l'audition. Ils préconisent l'utilisation

de champs magnétiques de 1,5 teslas. L'évaluation de l'innocuité au deuxième et troisième trimestre de la grossesse est plus difficile compte tenu des indications pour lesquelles une IRM est demandée. En effet, les pathologies et anomalies associées constituent des facteurs confusionnels importants. Concernant l'injection de Gadolinium à n'importe quel moment de la grossesse, la même étude de cohorte montre que les fœtus exposés ont un risque plus élevé de développer des pathologies inflammatoires ou rhumatologiques diverses, des infiltrations cutanées, et un risque de mort fœtale in utero ou de décès périnatal. Ainsi, l'avenir de l'IRM en pratique obstétricale n'est probablement pas avec les techniques dynamiques avec injection de Gadolinium mais peut reposer sur le développement de nombreuses autres séquences permettant d'obtenir des informations sur la perfusion sans injection d'agents de contraste comme l'ASL (Arterial Spin Labelling) (96) ou la diffusion (Intra Voxel Incoherent Motion) avec des résultats déjà publiés (27).

Enfin, une des limites de notre étude comparative est d'avoir réalisé l'ensemble de l'expérimentation en deux temps et sur deux sites différents. En effet, nous nous sommes adaptés aux contraintes logistiques concernant les deux appareils d'échographie de contraste et d'IRM. De plus, l'éventuelle réalisation simultanée de deux injections d'agents de contraste différents, la durée longue de la procédure en échographie et surtout en IRM, et la difficulté de repérer précisément les mêmes unités fœto-placentaires, pouvaient complexifier encore la procédure.

5.5. Conclusion

L'échographie de contraste et l'IRM semblent montrer des résultats comparables sur l'étude de la perfusion placentaire dans un modèle murin de RCIU par ligature vasculaire. Compte tenu des avantages et des limites de chaque modalité d'imagerie, la poursuite des investigations en échographie de contraste et en IRM pourrait permettre de quantifier la perfusion placentaire en pratique clinique obstétricale de routine.

Quels éléments sont apportés par cette expérimentation ?

- L'étude de la perfusion placentaire par échographie de contraste et par IRM dynamique de contraste montre des résultats comparables entre les deux méthodes.
- Des études complémentaires sont nécessaires pour savoir si la complémentarité de la résolution de l'échographie couplée à l'injection de microbulles et le champ d'exploration de l'IRM pourrait apporter des informations fonctionnelles supplémentaires sur la perfusion placentaire en pratique clinique.

Par ailleurs, dans le cadre de l'étude du placenta par imagerie fonctionnelle nous avons également étudié l'oxygénation placentaire avec une technique innovante : la photoacoustique. Les résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre 6

Etude de l'oxygénation placentaire par imagerie
photoacoustique

6. Etude de l'oxygénation placentaire par imagerie photoacoustique

Article ayant fait l'objet d'une publication dans **Plos One**.

Real-time monitoring of placental oxygenation during maternal hypoxia and hyperoxygenation using photoacoustic imaging.

Chloé J Arthuis^{1,2}, Anthony Novell¹, Florian Raes³, Jean-Michel Escoffre¹, Stéphanie

Lerondel³, Alain Le Pape³, Ayache Bouakaz¹, Franck Perrotin^{1,2}

¹ Inserm U930, François Rabelais University, Tours, France

² University Hospital Center of Tours, Department of Obstetrics, Gynecology and Fetal Medicine, Tours, France.

³ PHENOMIN TAAM, Center for Small Animal Imaging (CIPA), CNRS Orléans, France

PLoS One. 2017 Jan 12;12(1):e0169850. doi: 10.1371/journal.pone.0169850.

6.1. Introduction

In vivo, fetal oxygenation results from transplacental oxygen transfer from the maternal to the fetal vascular compartment. Impaired oxygen delivery to the fetus may be observed in pathological conditions including placental insufficiency and maternal chronic hypoxia and carries the risk of such severe fetal consequences during the prenatal period as intrauterine growth restriction (IUGR), metabolic acidosis, and fetal death (97). It is thus essential to be able to evaluate the impairment of placental function and oxygenation in clinical practice, especially in pathological situations. The reference methods today for placental insufficiency screening and follow-up are Doppler ultrasound and fetal heart rate monitoring (98). However, neither can be used to measure placental oxygen saturation in clinical practice. Although cordocentesis allows an accurate and reliable measurement of fetal blood oxygenation, the high morbidity associated with this invasive technique makes it useless in clinical practice for placental insufficiency monitoring(99). Currently, blood oxygen level-dependent magnetic resonance imaging (BOLD MRI) has been suggested to be reliable tools for non-invasive exploration of placental perfusion and oxygenation (100,101).

More recently, photoacoustic (PA) imaging is present as a real-time noninvasive imaging method combining laser pulse tissue excitation and ultrasonic detection of the tissue response (102). Typically, the ultrasound image is obtained by irradiating tissue with a nanosecond pulsed laser. Optical absorption induces rapid thermoelastic tissue expansion that generates a wideband ultrasound wave detectable by an ultrasound transducer. The main advantage of this technology is that the optical contrast is combined with the penetration of ultrasound able to detect a backscattered signal at depths up to few centimeters. Indeed, the limitation in exploration depth associated with the wavelength used for the photoacoustic signal. In vivo, tissue contains endogenous chromophores (e.g., hemoglobin, melanin, and lipids) that can generate detectable PA signals. PA imaging, which uses hemoglobin signals, has been used mainly to image variety of tumors and the blood vasculature (103,104). Furthermore, spectroscopic PA imaging allows in vivo assessment of oxygen saturation (SO₂) of the blood by exploiting the differing optical absorption spectra of deoxyhemoglobin (Hb) and oxyhemoglobin (HbO₂). Due to limited penetration depth related to the wavelength used for chromophore excitation, PA is currently restricted in clinical practice but appears to be an excellent tool for understanding aspects of placental function in research.

Our objectives in this study were to evaluate placental SO₂ in pregnant rats by real-time photoacoustic (PA) imaging during the 3rd week of gestation and to specify the variations in placental SO₂ during maternal hypoxia and hyperoxygenation.

6.2. Material and methods

Animal preparation

All procedures were performed in accordance with French and international ethical guidelines and were approved by the National Committee for Animal Care and Ethics in Animal Experiments (No 1037 CECCO n°3). Fifteen pregnant (after timed mating, designated as embryonic day 0) Sprague-Dawley rats (CERJ, Le Genest Saint-Isle, France) were housed in a temperature-controlled room (23°C) with a 12:12-h light-dark cycle and, food and water ad libitum. PA imaging was performed on embryonic days 14, 17, and 20.

The rats were anesthetized with 1.5% isoflurane (Aerrane®, Baxter France), administered with 1.5 L/min of air via a facial oxygen mask. The anesthetic gas was administered for no more than 1 h and a thermostatically controlled pad was used to maintain body temperature at 37°C. Before PA imaging began, rat abdomens were shaved and a warm, centrifuged ultrasound gel was applied between the transducer and abdomen skin to enhance PA transmission.

Photoacoustic imaging procedure

Transabdominal PA imaging of placentas was performed on days 14, 17, and 20 of gestation. PA images were acquired with a 21 MHz probe (LZ-250; 75 µm axial resolution) connected to the VevoLAZR PA imaging system (Fujifilm Visualsonics Inc., Toronto, Canada). For each high-resolution scan, light from the laser (OPO pumped by doubled Nd:YAG, tunable 680-970 nm, 20 Hz repetition rate, 5 ns pulse width, 50 mJ pulse energy) was delivered to the most superficial placentas, which were positioned at the optical focus between 10 and 15 mm. The Vevo imaging station allows adjustment of the probe and imaging optimization to reduce motion artifacts. The parametric images from which we estimated SO₂ levels were displayed by collecting the data at wavelengths of 750 nm and 850 nm in the Oxyhemo mode. Changing the O₂ concentration in the gas supplied to the mother exposed the fetus successively to 2.5 min at 100% O₂ inhalation (hyperoxygenation), then 4 min at 5% O₂ inhalation (hypoxia), and finally 4 min at 100% O₂ inhalation

(hyperoxygenation) for each procedure. PA imaging sequences were recorded at 0.8 frames per second to study tissue oxygenation (Fig.46). No more than 3 procedures were performed per day per animal.

Placental PA imaging was performed in a sagittal plane. The plane of the skin was used as a reference because the distance from the skin to the probe was similar in each measurement, and the attenuation was minimal. Three distinct parts of each placenta were analyzed: the mesometrial triangle, which connects the uterine horn and the placenta; and two placental zone: the labyrinth, closer to the fetus (fetal part), and the basal zone (maternal part). The labyrinth is the exchange zone of the placenta where nutrients and gases are transferred between the mother and the fetus. The basal zone, also called the trophospongium, is located close to the mesometrial triangle and corresponds to the junction between the labyrinth and the decidual area. This zone is composed of trophoblast stem cells, trophoblast giant cells, and glycogen cells.

After image acquisition, tissue SO₂ was quantitatively analyzed from the linear raw data with VevoLAZR software (Fujifilm Visualsonics Inc., Toronto, Canada). Four regions of interest (ROIs) (1.35 mm² diameter, about 11 mm in depth) were manually defined by a single operator (C-J.A): skin, mesometrial triangle, basal zone, and the labyrinth (Fig.47).

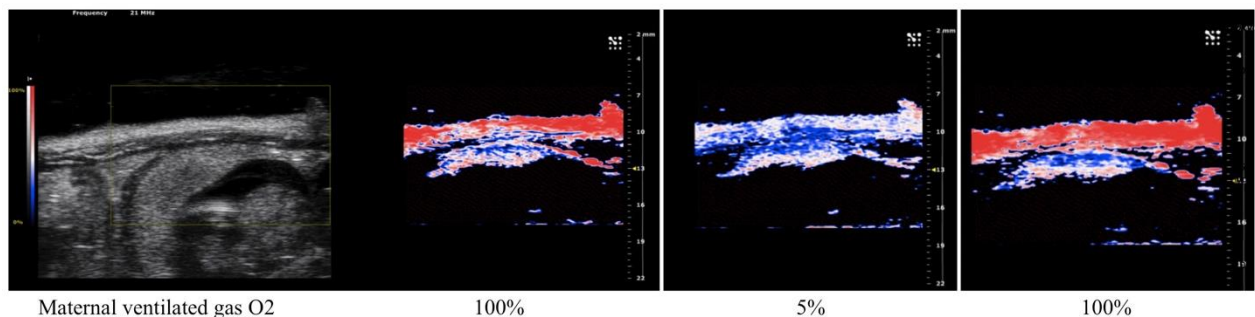


Figure 46 : PA imaging of placental oxygenation on day 17 of gestation. From left to right: the placenta in a sagittal plane (obtained by a B-mode ultrasound scan) and parametric images created with the PA Oxyhemo mode making possible the evaluation of blood SO₂ during variations in the oxygen levels supplied to the mother (5-100%).

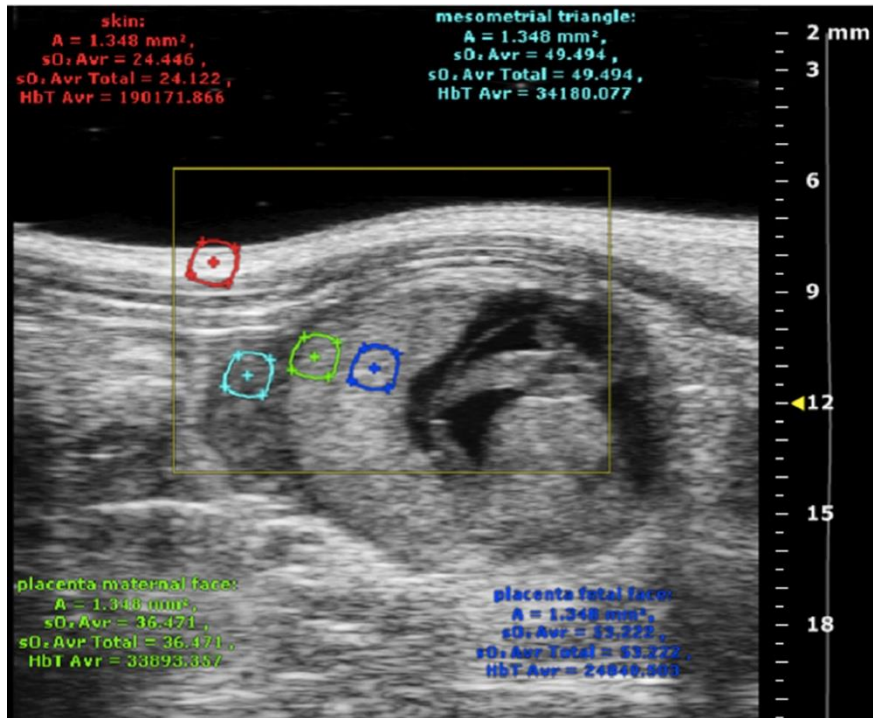


Figure 47 : ROIs placed on the skin (red), the mesometrial triangle (light blue), and the two different zones of the placenta: the basal zone (green) and the labyrinth zone (dark blue).

Time-intensity curves for each ROI were computed with VevoLAZR software. Oxygenation parameters, including SO₂ variation during hypoxia and hyperoxygenation sequences were calculated for each ROI from the time-intensity curves. Rates of SO₂ decrease and SO₂ rise were determined from the slope of the fitted curve. Δ SO₂ corresponded to the change in SO₂ between hyperoxygenated (100% O₂ supplied to mother) and hypoxic (5% O₂) conditions and was defined as follows:

$$\Delta\text{SO}_2 = \text{SO}_2 \text{ hyperoxygenation} - \text{SO}_2 \text{ hypoxia.}$$

On day 20, rats were euthanized by intravenous pentobarbital injection (150 mg/kg) after the imaging procedure.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with R statistical software (version 3.1.1). Quantitative variables are presented as means \pm standard deviations. When more than one placenta was tested on the same rat, the mean value of these nested measurements was taken into account. The paired Friedman test was used to compare the continuous variables between the four

ROIs, and the unpaired Kruskal-Wallis test to compare continuous variable between the three gestational days. In cases of significant differences, pairwise comparisons were tested with the Wilcoxon test. Because of the limited sample size, the analysis was restricted to the pairwise combinations of relevant variables. A P value < 0.05 was considered to indicate a significant difference.

6.3. Results

The study included 15 rats: five for each day of gestation considered. A total of 9 placentas were studied on days 14 and 17 of gestation, and 12 on day 20. PA imaging was performed on all animals under hyperoxygenated and hypoxic conditions (Fig. 46). All time-intensity curves were recorded for about 10 minutes 30 seconds and allowed us to assess the variations in SO₂ in the skin and the placenta.

SO₂ variations observed in real-time during PA imaging were quantitatively analyzed with LAZR software (Table 6) at a depth of up to 1.6 cm. During the procedure, variations in SO₂ could be clearly visualized according to the maternal oxygenation level.

A few minutes after O₂ in the air supplied to the mother was reduced from 100% to 5% (hypoxia), SO₂ decreased significantly in each ROI (P<0.001). The effect of hyperoxygenation from 5% to 100% inhaled O₂ was also well visualized by a significant SO₂ increase in all four ROIs (P<0.001) (Fig.48). Over the course of gestation, from day 14 to day 20, the mean SO₂ values of the skin increased (P=0.007) while it decreased in the labyrinth zone (P<0.001) and in the basal zone (P=0.02). The rates of SO₂ variations during maternal hypoxia and hyperoxygenation (i.e., the slopes of SO₂ decrease and increase corresponding to hypoxia and hyperoxygenation conditions, respectively) were calculated from the raw data. SO₂ rates fell to lower levels in the placenta than in the maternal skin and the mesometrial triangle, and progressively decreased over the course of gestation from day 14 to day 20 (basal zone P=0.003; labyrinth zone P=0.001). On the other hand, we observed a rapid and deep variation of the SO₂ level in the skin under both hypoxic and hyperoxygenated conditions. After hypoxia, SO₂ returned to its initial value in about 1 min 20 sec for each ROI.

Tableau 5 : Quantitative analysis of oxygenation in the skin and the 3 ROIs of the placenta, on days 14, 17 and 20 of gestation (pooled data). Results are presented as mean \pm standard deviation.

ROI	Day 14 (Mean \pm Standard Deviation)	Day 17 (Mean \pm Standard Deviation)	Day 20 (Mean \pm Standard Deviation)	P Value Between day 14 – 17	P Value Between day 17 – 20	P Value Between day 14 – 20
Skin						
SO ₂ maximal (%)	84.81 \pm 6.72	90.37 \pm 5.29	93.17 \pm 5.06	0.07	0.34	0.007
SO ₂ minimal (%)	18.55 \pm 2.22	19.63 \pm 5.88	24.63 \pm 6.44	0.86	0.09	0.007
Rate of SO ₂ decrease (%/s)	0.76 \pm 0.15	0.88 \pm 0.39	0.79 \pm 0.13	0.62	0.96	0.69
Rate of SO ₂ rise (%/s)	1.54 \pm 0.59	1.44 \pm 0.85	1.08 \pm 0.57	0.73	0.23	0.05
Mesometrial triangle						
SO ₂ maximal (%)	69.98 \pm 6.86	70.21 \pm 8.84	70.43 \pm 8.36	0.93	0.93	0.93
SO ₂ minimal (%)	39.23 \pm 6.35	37.55 \pm 5.44	54.11 \pm 5.25	0.66	0.003	0.39
Rate of SO ₂ decrease (%/s)	0.33 \pm 0.10	0.43 \pm 0.31	0.23 \pm 0.13	0.92	0.08	0.07
Rate of SO ₂ rise (%/s)	0.61 \pm 0.24	0.70 \pm 0.64	0.26 \pm 0.26	0.86	0.01	0.02
Labyrinth						
SO ₂ maximal (%)	76.78 \pm 4.17	68.21 \pm 6.85	65.78 \pm 4.94	0.01	0.48	0.001
SO ₂ minimal (%)	53.44 \pm 1.58	54.63 \pm 3.32	54.31 \pm 4.25	0.54	0.93	0.796
Rate of SO ₂ decrease (%/s)	0.28 \pm 0.11	0.19 \pm 0.13	0.11 \pm 0.10	0.07	0.18	0.01
Rate of SO ₂ rise (%/s)	0.57 \pm 0.24	0.23 \pm 0.23	0.09 \pm 0.05	0.01	0.53	0.001
Basal Zone						
SO ₂ maximal (%)	65.42 \pm 10.42	54.80 \pm 5.88	55.88 \pm 3.59	0.03	0.66	0.024
SO ₂ minimal (%)	38.57 \pm 3.68	41.67 \pm 5.21	44.05 \pm 4.57	0.19	0.38	0.003
Rate of SO ₂ decrease (%/s)	0.31 \pm 0.09	0.18 \pm 0.08	0.09 \pm 0.03	0.03	0.01	0.001
Rate of SO ₂ rise (%/s)	0.57 \pm 0.24	0.18 \pm 0.17	0.08 \pm 0.04	0.06	0.14	0.003

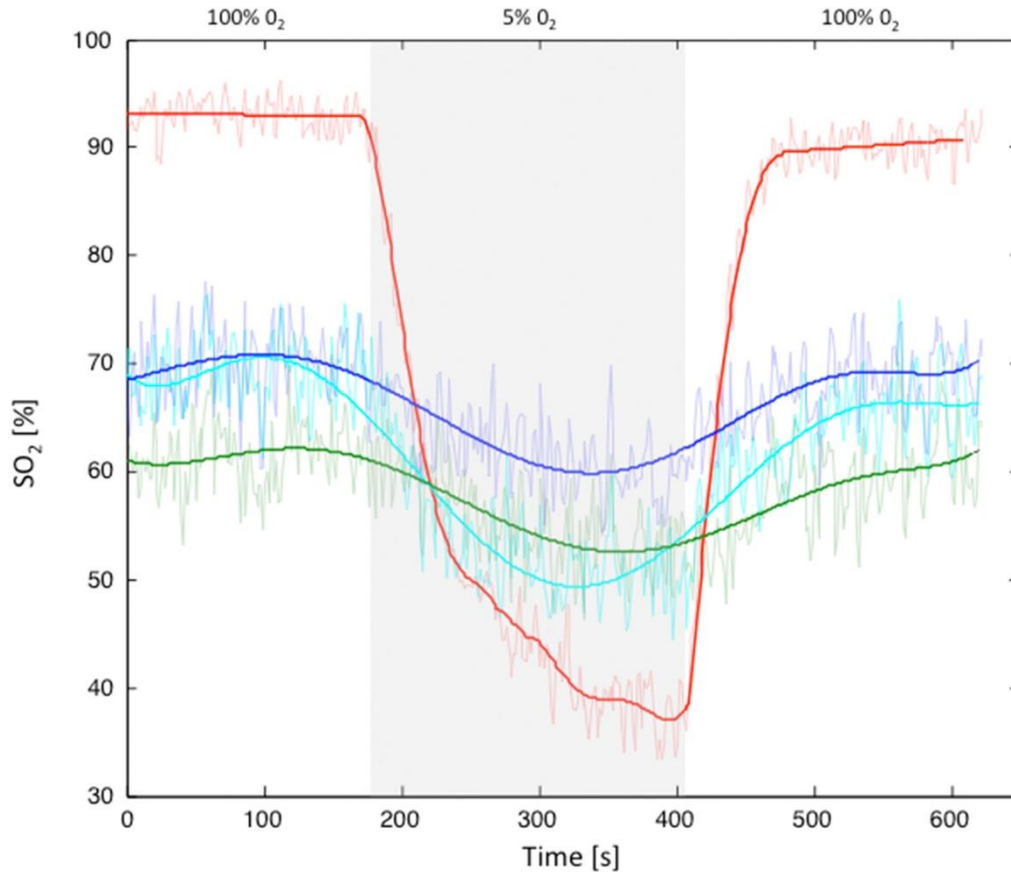
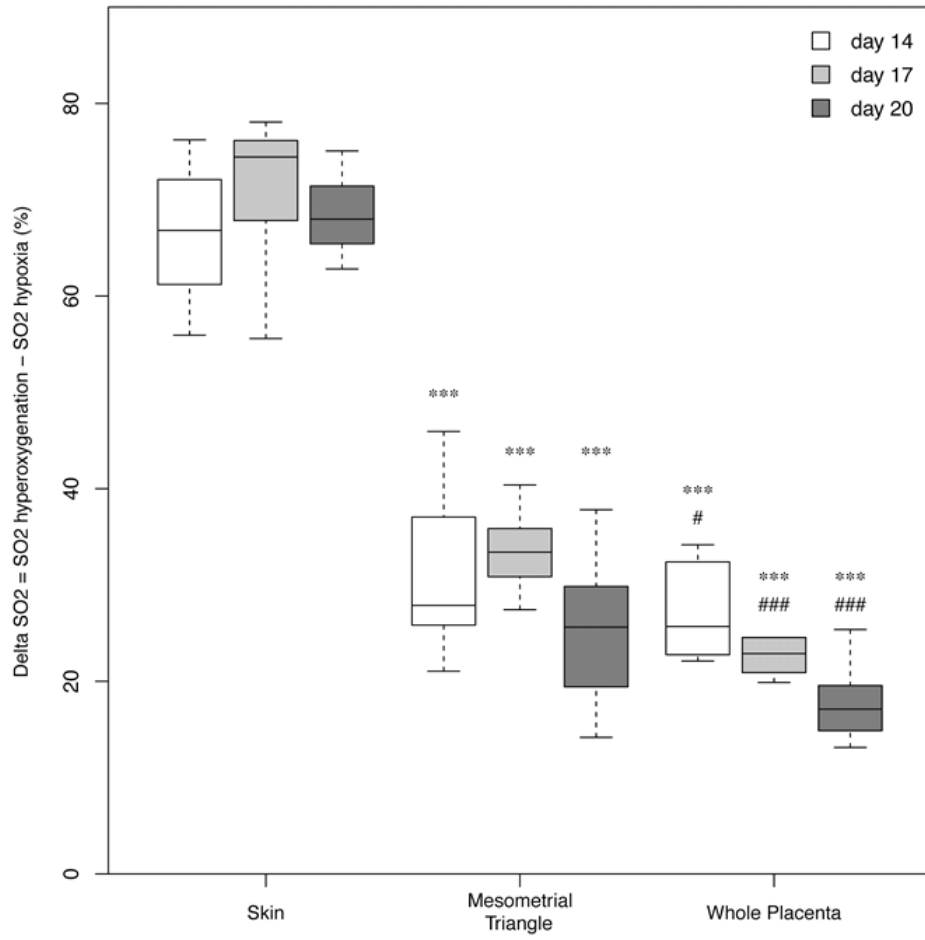


Figure 48: Time-intensity curves obtained during the experimental sequence of hyperoxygenation (100% O₂, 2.5 min), hypoxia (5% O₂; 4 min), and hyperoxygenation (100% O₂, 4 min) from skin (red), mesometrial triangle (light blue), basal zone (green), and labyrinth zone (dark blue) on day 20 of gestation.

Our comparative study thus showed that hypoxia resulted in significant differences in ΔSO_2 between maternal skin and the other ROIs ($P < 0.001$) (Fig 49A), with ΔSO_2 higher in the skin (e.g., $70.74\% \pm 7.65$ on day 17) than in the mesometrial triangle (e.g., $32.66\% \pm 5.75$ on day 17) or in the different areas of the placenta (e.g., labyrinth zone: $18.58\% \pm 6.61$; basal zone: $13.13\% \pm 5.72$ on day 17) throughout gestation. In addition, ΔSO_2 decreased in the placenta over the course of gestation ($23.34\% \pm 3.75$ on day 14 vs $10.10\% \pm 4.28$ on day 20 in the labyrinth) ($P = 0.005$), at a rate not significantly different between the two placental layers (Fig 49B). These results show that SO_2 variations differed significantly from one tissue to another and depended on the day of pregnancy.

Additionally, in order to evaluate the influence of skin attenuation during the procedure, the experiment was repeated after a small surgical incision of the skin that allowed us to image the placenta directly. No significant difference was observed between the two

experimental sets ($P > 0.05$). These results suggested that the skin has a negligible influence on the PA imaging results.



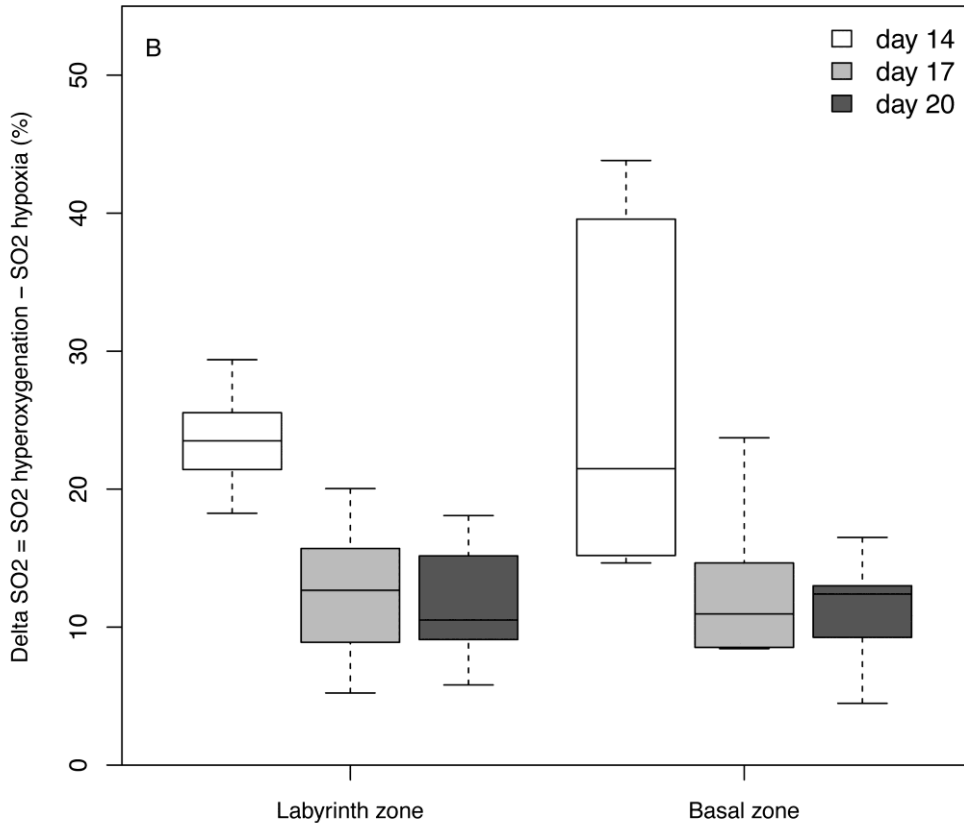


Figure 49 : **A** - Box-and-whisker plot showing the mean ΔSO_2 in maternal skin, the mesometrial triangle, and the whole placenta on different days of gestation. Data are mean values and 95% confidence intervals. Comparisons between skin and utero-placental ROIs (mesometrial triangle and whole placenta) at the same day of gestation are indicated by * $P=0.05$ ** $P=0.01$ *** $P<0.001$. Comparisons between mesometrial triangle and whole placenta at the same day of gestation are indicated by # $P=0.05$ ## $=0.01$ #### $P<0.001$. **B** – Box-and-whisker plot represents the different part of the placenta: the basal zone and the labyrinth zone on different days of gestation. Data are mean values and 95% confidence intervals.

6.4. Discussion

Our study demonstrates that PA imaging is a useful tool that can be applied to placental SO_2 monitoring during hypoxic condition in pregnant rats. Moreover, our experiment suggests that, during maternal hypoxia, the decrease in SO_2 affects the placenta less than it affects maternal tissues (i.e., skin and mesometrial triangle).

The placenta's apparent ability to supply oxygen during maternal hypoxia may be explained by the high capillary network, which increases during the course of gestation. Moreover, we recently demonstrated in a study of uteroplacental perfusion with contrast-enhanced ultrasound that the intervillous space fills with maternal blood slowly, continuously,

and uniformly (44). This substantial degree of vascularization may preserve placental oxygenation for a period of time. The level of SO₂ in the ROI depends on the relative proportion of the ROI occupied by maternal blood. Therefore, the increase of SO₂ at the end of the pregnancy could be attributed to vessel dilatation. Furthermore, more vessels that are not dilated could also cause an overall increase in vessel volume per unit volume of tissue. Besides, the measurement of SO₂ via PA modality remains valid in the labyrinth as spectral absorption curves for fetal and adult hemoglobins are similar (105). Indeed, in the labyrinth, SO₂ level corresponds to the mix of fetal and maternal hemoglobins.

Functional ultrasound and MRI are promising tools for exploring placental oxygenation. Several studies have assessed placental oxygenation by BOLD MRI during gestation of rats or sheep exposed to hypoxia and have established that it can reveal changes in fetal blood oxygenation during hypoxia (21,100,101,106–108). More recent studies have reported the ability of PA imaging to demonstrate variations in the oxygenation of tumors or tissues (6–8). To our knowledge, placental oxygenation over the pregnancy has not previously been evaluated by PA imaging. We therefore compare our results with those of studies by functional MR imaging.

Our results confirm that the placenta is sensitive to oxygen variations. Different regions within the placenta may be distinguished, according to the specific enhancements made in perfusion imaging and histological analyses (109). Published studies have found no difference of oxygenation in these different areas (21,100). Accordingly, we consider that the relatively small differences we observed between the basal zone and the labyrinth zone are not significant.

Wedegartner et al. (106) used BOLD MRI to compare maternal oxygenation to that of the placenta and fetal organs of six ewes during hypoxia. Authors reported changes in placental saturation smaller than those observed on the skin of the mother, similar to the trends we observed here with PA imaging.

PA imaging and BOLD MRI were recently compared with the use of a tissue-mimicking phantom in multiple oxygenation conditions (110). The authors found a good correlation between SO₂ derived from PA imaging, T₂ signal intensity change on BOLD MRI, and PO₂ measurements in phantoms. They also noted that the PA image was the most sensitive, with a signal increase approximately 25% greater than the changes observed in the BOLD MRI. The resolution of the PA imaging depends on the resolution of the US transducer. In contrast to MRI procedures, PA imaging allows real-time observation of blood oxygen saturation at

different levels of oxygenation in the air supplied to the mother. On the other hand, both PA and BOLD MRI are measuring relative percent oxygen saturation and not measuring absolute numbers of oxygen saturation.

Our study nonetheless has some limitations. First of all, we do not compare PA values to PO₂ measured in the labyrinth space blood sample. Indeed, the catheterization of these vessels was not possible. However, oxygen levels at the output of the respirator were controlled and oxygen variations were monitored by skin signal. Furthermore, an important limitation of PA imaging lies in the reduced light penetration depth due to light attenuation, which hampers the exploration of deep tissues. In our study, the depth of exploration of our PA imaging platform was limited to about 16 mm. Therefore, our study focused on the placenta and not the fetal organs. Previous studies, however, have reported the ability of PA imaging to detect sentinel lymph nodes in rats at an imaging depth of 25 mm to 31 mm (111,112). Kruger et al. designed a clinical system to evaluate breast cancer, with exploration depths in tissues up to 50 mm and a resolution of 0.42 mm (19). PA signals depend on optical fluence and absorption. Stronger optical fluence or lower resolution will enable PA imaging to detect placental oxygenation levels at even greater depths while maintaining a safe procedure (113). The change in laser wavelength is one possible option to improve the depth of exploration. Indeed, a 10 cm imaging depth may be reached at 1064 nm wavelength (104). However, at this wavelength, total hemoglobin could be determined but not the SO₂ based on the analysis of oxy- and deoxy-hemoglobins. Thus, the measurement of SO₂ using PA in a deep tissue is an ongoing challenge (114). PA imaging is currently being investigated in preclinical studies, and some studies show its potential applications in clinical practice (115–117). In clinical practice, the depth of exploration is currently the limiting factor thus its clinical applicability is less certain. The placenta is located in positions more or less uniformly distributed around the uterus. If imaging is done trans-abdominally, then the placenta is probably accessible in about a third of the women. Similarly, if transvaginal imaging is performed, one might expect that the placenta would be out of range in about half of the women. Otherwise, another potential clinical application is described in photocoagulation of inter-twin placental anastomosing vessels to treat twin-to-twin transfusion syndrome. PA imaging in combination with ultrasonic tracking could be useful for detecting the human placental vasculature during minimally invasive fetal surgery (26). FDA clinically approves the use of lasers (Nd:YAG or Diode lasers) in fetal surgery for selective photocoagulation at a

power setting of 30–45 W (118). Here, our procedure was performed with a 1000 times less output power, suggesting its safety.

6.5. Conclusion

In conclusion, PA imaging is a real-time, noninvasive method that allowed us to evaluate placental oxygenation without contrast agent injection. Our results demonstrating that placenta is less affected than maternal tissue by the decline in SO_2 suggest that this organ may play an important role in protecting the fetus against maternal hypoxia. Future studies are needed to better understand the underlying mechanisms involved in the regulation of placental oxygenation during situations of potential fetal hypoxia.

Chapitre 7

Synthèse et perspectives

7. Synthèse et perspectives

Aucune étude à ce jour ne s'était intéressée à la comparaison de l'échographie de contraste et de l'IRM dans l'étude de la perfusion placentaire. Ainsi, les connaissances apportées par cette thèse permettront de montrer comme ces deux approches semblent complémentaires. En effet, les variations de perfusion observées entre les placentas contrôles et ceux ligaturés sont comparables avec chacune des deux modalités d'imagerie. Ceci montre la cohérence des mesures effectuées. La résolution de l'imagerie échographique et le champ d'exploration de l'IRM pourraient apporter des informations complémentaires sur la perfusion.

La mesure des paramètres quantitatifs est reproductible et les données sur l'innocuité de la procédure apparaissent rassurantes, même si des explorations complémentaires portant sur des effectifs plus importants sont encore nécessaires. Ces résultats sont donc encourageants pour poursuivre les études dans ce domaine.

Les principales limites pour la quantification de la perfusion par échographie de contraste sont bien connues. Elles reposent sur la relation entre l'intensité du signal et la concentration des microbulles, la compensation des mouvements et le phénomène d'atténuation.

Tout d'abord, la concentration des agents de contraste ultrasonores présente une grande variabilité pour une même dose injectée. Elle peut varier de 1 à 5.10^8 microbulles/mL pour une même dose de Sonovue[®]. La taille (119) et leur comportement en population modifient aussi les propriétés acoustiques. Par ailleurs, d'autres facteurs peuvent considérablement modifier les paramètres de perfusion observés. D'une part, la quantité d'agents de contraste injectés est une source de variabilité importante pour l'évaluation de la microcirculation chez la rate devant son faible volume sanguin. D'autre part, les agents de contraste décantent dans la seringue en laissant les plus grosses bulles au-dessus et les plus petites en bas, générant ainsi deux populations de microbulles. Les conditions d'utilisation sont donc fondamentales. Il a également été montré que l'injection manuelle des agents de contraste ultrasonores est responsable de variations non négligeables des paramètres quantitatifs étudiés (48). Ceci peut être corrigé en utilisant une perfusion constante de microbulles avec un dispositif adapté.

Enfin, il a été mis en évidence un phénomène de destruction des microbulles par l'onde incidente lorsque les artères afférentes se situent dans le même plan que le tissu observé (120). Dans ce cas, la cinétique est modifiée par le phénomène d'entrée en coupe. Tous ces éléments sont susceptibles de modifier la perfusion observée.

Par ailleurs, la compensation des mouvements est nécessaire pour obtenir une imagerie paramétrique de qualité. Pour compenser au mieux certains mouvements une acquisition volumique en 3 dimensions est nécessaire. Ce type d'acquisition ne devrait pas constituer une limite technologique importante mais complexifie l'analyse quantitative de la perfusion.

Du fait de l'ensemble de ces incertitudes de mesures, une analyse quantitative peut être difficile à obtenir en échographie de contraste. Un autre élément à prendre en compte est l'analyse semi-quantitative proposée et utilisée dans cette thèse. En effet, elle repose sur un modèle logarithmique présenté dans le chapitre 1 sans tenir compte des différences intrinsèques de perfusion de chaque organe (49). Par ailleurs, d'autres approches quantitatives pourraient également être explorées en échographie de contraste. En effet, l'analyse faite actuellement permet une représentation temporelle du contraste au sein de la structure étudiée à partir de la cinétique de l'intensité du signal. Cependant, nous n'avons pas la connaissance du mouvement des microbulles au sein de la chambre intervillieuse. Toutefois, cette distribution spatiale avec une représentation vectorielle pourrait être complémentaire de la première analyse temporelle réalisée. Certains travaux sur le placenta ont montré l'effet de l'arrivée du flux sanguin dans la chambre intervillieuse pour le développement des villosités. Ceci pourrait conditionner la qualité de la perfusion placentaire et donc la croissance fœtale. Dans le cadre d'une collaboration, nous travaillons sur cette approche de quantification spatiale.

Avant de transposer l'échographie de contraste à la pratique clinique certaines problématiques restent à résoudre. La principale d'entre elle serait de définir des valeurs qui permettraient de mettre en évidence une diminution de la perfusion sanguine sans avoir de cas ou de contrôle à comparer. D'après nos résultats, cette approche quantitative devrait passer par des ratios afin de s'affranchir de la variabilité importante des mesures obtenues pour toutes les raisons que nous avons détaillées. L'étude de l'index de perfusion qui semble comparable au débit exploré en IRM pourrait être une mesure intéressante à évaluer au cours d'une étude clinique chez la femme enceinte. Des études complémentaires sont également nécessaires pour évaluer les performances diagnostiques de l'échographie de contraste et les

comparer à celles de l'IRM par exemple sur un modèle animal avec une grossesse monofoetale permettant ainsi de comparer de façon certaine le même placenta.

Une autre difficulté probable dans la pratique obstétricale serait l'exploration des placentas postérieurs au troisième trimestre de la grossesse. En effet, en échographie obstétricale nous sommes très dépendants de la position du placenta et du morphotype de la femme. Cependant, nous disposons de deux voies d'abord à savoir abdominale et endovaginale qui permettraient probablement de réaliser cet examen dans quasiment deux tiers des cas. Cette limite technique de profondeur d'exploration est également celle rencontrée pour l'application de l'imagerie photoacoustique. Il s'agit d'une approche innovante et non invasive qui pourrait être couplée facilement à une sonde ultrasonore pour l'exploration de l'oxygénation. L'exploration de l'oxygénation et de la perfusion sont parfaitement complémentaire et justifiées pour l'étude de l'insuffisance placentaire. Malheureusement l'imagerie optique limite fortement la profondeur d'exploration et semble actuellement compromettre son application en pratique clinique à court et moyen terme. D'autres applications de médecine fœtale pourraient toutefois trouver un bénéfice avec cette modalité, par exemple dans le traitement laser par fœtoscopie des syndromes transfuseur-transfusé observé dans les grossesses gémellaires. Pour évaluer le type de vaisseau coagulé, artère ou veine, lors de la procédure thérapeutique.

Nous n'avons pas abordé dans cette thèse les autres modalités d'échographie fonctionnelle. Parmi celles-ci on peut citer la quantification par échographie Doppler en 3 dimensions (121,122), l'élastographie (75) et le Doppler ultra-fast (123). L'objectif commun de ces différentes modalités d'imagerie est l'amélioration des connaissances de la vascularisation placentaire et fœtale afin de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation du fœtus en situation d'hypoxie chronique. Ceci permettrait de mieux évaluer l'effet de nos thérapeutiques actuelles sur la vascularisation et l'hémodynamique prénatale, et peut être de développer de nouvelles thérapeutiques. En effet, le traitement de choix dans l'insuffisance placentaire est l'aspirine. Cependant, son mécanisme d'action est mal connu et son efficacité n'est pas parfaite. Afin de progresser dans les thérapeutiques anténatales pour améliorer la perfusion placentaire il est indispensable de mieux la quantifier.

Ainsi, l'avancée des connaissances en échographie de contraste pour la quantification de la perfusion placentaire permettront peut-être de poursuivre les investigations cliniques.

8. Conclusion

La quantification de la perfusion placentaire est donc indispensable pour améliorer les connaissances, le dépistage, le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des RCIU. Nous avons montré que l'échographie de contraste et l'IRM sont deux modalités complémentaires pour l'étude de la perfusion. Les premières études cliniques sur l'échographie de contraste en obstétrique réalisées il y a près de 15 ans n'ont pas trouvé beaucoup d'écho dans le monde. La pratique de l'échographie est pourtant largement diffusée et le développement des ultrasons en thérapeutique pourrait peut-être ouvrir des pistes de recherche.

9. Bibliographie

1. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1592–4.
2. Jones HN, Powell TL, Jansson T. Regulation of placental nutrient transport--a review. *Placenta*. 2007 Sep;28(8–9):763–74.
3. Milosevic-Stevanovic J, Krstic M, Radovic-Janosevic D, Stefanovic M, Antic V, Djordjevic I. Preeclampsia with and without intrauterine growth restriction--Two pathogenetically different entities? *Hypertens Pregnancy*. 2016 Sep 13;1–10.
4. von Beckerath A-K, Kollmann M, Rotky-Fast C, Karpf E, Lang U, Klaritsch P. Perinatal complications and long-term neurodevelopmental outcome of infants with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2013 Feb;208(2):130.e1-6.
5. Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai B, Curet LB, et al. Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group. *Obstet Gynecol*. 2000 Jan;95(1):24–8.
6. Malin GL, Morris RK, Riley R, Teune MJ, Khan KS. When is birthweight at term abnormally low? A systematic review and meta-analysis of the association and predictive ability of current birthweight standards for neonatal outcomes. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2014 Apr;121(5):515–26.
7. Murray E, Fernandes M, Fazel M, Kennedy SH, Villar J, Stein A. Differential effect of intrauterine growth restriction on childhood neurodevelopment: a systematic review. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2015 Jul;122(8):1062–72.
8. Wang S-F, Shu L, Sheng J, Mu M, Wang S, Tao X-Y, et al. Birth weight and risk of coronary heart disease in adults: a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Dev Orig Health Dis*. 2014 Dec;5(6):408–19.
9. Li L, Law C, Power C. Body mass index throughout the life-course and blood pressure in mid-adult life: a birth cohort study. *J Hypertens*. 2007 Jun;25(6):1215–23.
10. Mi J, Cheng H, Zhao X-Y, Hou D-Q, Chen F-F, Zhang K-L. Developmental origin of metabolic syndrome: interaction of thinness at birth and overweight during adult life in Chinese population. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2008 Mar;9 Suppl 1:91–4.
11. Loret de Mola C, de França GVA, Quevedo L de A, Horta BL. Low birth weight,

preterm birth and small for gestational age association with adult depression: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry J Ment Sci.* 2014 Nov;205(5):340–7.

12. Berle JØ, Mykletun A, Daltveit AK, Rasmussen S, Dahl AA. Outcomes in adulthood for children with foetal growth retardation. A linkage study from the Nord-Trøndelag Health Study (HUNT) and the Medical Birth Registry of Norway. *Acta Psychiatr Scand.* 2006 Jun;113(6):501–9.

13. Malin GL, Morris RK, Riley RD, Teune MJ, Khan KS. When is birthweight at term (≥ 37 weeks' gestation) abnormally low? A systematic review and meta-analysis of the prognostic and predictive ability of current birthweight standards for childhood and adult outcomes. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2015 Apr;122(5):634–42.

14. Boers KE, Bijlenga D, Mol BWJ, LeCessie S, Birnie E, van Pampus MG, et al. Disproportionate Intrauterine Growth Intervention Trial At Term: DIGITAT. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2007;7:12.

15. Sovio U, White IR, Dacey A, Pasupathy D, Smith GCS. Screening for fetal growth restriction with universal third trimester ultrasonography in nulliparous women in the Pregnancy Outcome Prediction (POP) study: a prospective cohort study. *Lancet Lond Engl.* 2015 Nov 21;386(10008):2089–97.

16. Stampalija T, Gyte GM, Alfirevic Z. Utero-placental Doppler ultrasound for improving pregnancy outcome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(9):CD008363.

17. DeVore GR. The importance of the cerebroplacental ratio in the evaluation of fetal well-being in SGA and AGA fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 Jul;213(1):5–15.

18. Pearce W. Hypoxic regulation of the fetal cerebral circulation. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2006 Feb;100(2):731–8.

19. Poudel R, McMillen IC, Dunn SL, Zhang S, Morrison JL. Impact of chronic hypoxemia on blood flow to the brain, heart, and adrenal gland in the late-gestation IUGR sheep fetus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015 Feb 1;308(3):R151-162.

20. Stampalija T, Casati D, Monasta L, Sassi R, Rivolta MW, Muggiasca ML, et al. Brain sparing effect in growth-restricted fetuses is associated with decreased cardiac acceleration and deceleration capacities: a case-control study. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2015 Sep 23;

21. Bobek G, Stait-Gardner T, Surmon L, Makris A, Lind JM, Price WS, et al. Magnetic resonance imaging detects placental hypoxia and acidosis in mouse models of perturbed pregnancies. *PloS One.* 2013;8(3):e59971.

22. Deloison B, Siauve N, Aimot S, Balvay D, Thiam R, Cuenod CA, et al. SPIO-

enhanced magnetic resonance imaging study of placental perfusion in a rat model of intrauterine growth restriction. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2012 Apr;119(5):626–33.

23. Alison M, Quibel T, Balvay D, Autret G, Bourillon C, Chalouhi GE, et al. Measurement of placental perfusion by dynamic contrast-enhanced MRI at 4.7 T. *Invest Radiol*. 2013 Jul;48(7):535–42.

24. Siauve N, Chalouhi GE, Deloison B, Alison M, Clement O, Ville Y, et al. Functional imaging of the human placenta with magnetic resonance. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Oct;213(4 Suppl):S103-114.

25. Sohlberg S, Mulic-Lutvica A, Olovsson M, Weis J, Axelsson O, Wikström J, et al. Magnetic resonance imaging-estimated placental perfusion in fetal growth assessment. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Dec;46(6):700–5.

26. Sohlberg S, Mulic-Lutvica A, Lindgren P, Ortiz-Nieto F, Wikström A-K, Wikström J. Placental perfusion in normal pregnancy and early and late preeclampsia: a magnetic resonance imaging study. *Placenta*. 2014 Mar;35(3):202–6.

27. Alison M, Chalouhi GE, Autret G, Balvay D, Thiam R, Salomon LJ, et al. Use of intravoxel incoherent motion MR imaging to assess placental perfusion in a murine model of placental insufficiency. *Invest Radiol*. 2013 Jan;48(1):17–23.

28. Ray JG, Vermeulen MJ, Bharatha A, Montanera WJ, Park AL. Association Between MRI Exposure During Pregnancy and Fetal and Childhood Outcomes. *JAMA*. 2016 Sep 6;316(9):952–61.

29. Siauve N, Chalouhi GE, Deloison B, Alison M, Clement O, Ville Y, et al. Functional imaging of the human placenta with magnetic resonance. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Oct;213(4 Suppl):S103-114.

30. Cosgrove D. Ultrasound contrast agents: an overview. *Eur J Radiol*. 2006 Dec;60(3):324–30.

31. Piscaglia F, Nolsøe C, Dietrich CF, Cosgrove DO, Gilja OH, Bachmann Nielsen M, et al. The EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Practice of Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS): update 2011 on non-hepatic applications. *Ultraschall Med Stuttg Ger 1980*. 2012 Feb;33(1):33–59.

32. Ordén MR, Leinonen M, Kirkinen P. Contrast-enhanced ultrasonography of uteroplacental circulation does not evoke harmful CTG changes or perinatal events. *Fetal Diagn Ther*. 2000 Jun;15(3):139–45.

33. Roberts VHJ, Lo JO, Salati JA, Lewandowski KS, Lindner JR, Morgan TK, et al.

Quantitative assessment of placental perfusion by contrast-enhanced ultrasound in macaques and human subjects. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Mar;214(3):369.e1-8.

34. Hua X, Zhu L-P, Li R, Zhong H, Xue Y-F, Chen Z-H. Effects of diagnostic contrast-enhanced ultrasound on permeability of placental barrier: a primary study. *Placenta*. 2009 Sep;30(9):780–4.
35. de Jong N, Bouakaz A, Frinking P. Basic acoustic properties of microbubbles. *Echocardiogr Mt Kisco N*. 2002 Apr;19(3):229–40.
36. Novell A. *Imagerie de contraste ultrasonore avec transducteurs capacitifs micro-usinés*. [Doctorat en sciences]. François-Rabelais Tours; 2011.
37. Ellegala DB, Leong-Poi H, Carpenter JE, Klivanov AL, Kaul S, Shaffrey ME, et al. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3. *Circulation*. 2003 Jul 22;108(3):336–41.
38. Negishi Y, Omata D, Iijima H, Takabayashi Y, Suzuki K, Endo Y, et al. Enhanced laminin-derived peptide AG73-mediated liposomal gene transfer by bubble liposomes and ultrasound. *Mol Pharm*. 2010 Feb 1;7(1):217–26.
39. de Jong N, Bouakaz A, Ten Cate FJ. Contrast harmonic imaging. *Ultrasonics*. 2002 May;40(1–8):567–73.
40. Avvaru B, Pandit AB. Oscillating bubble concentration and its size distribution using acoustic emission spectra. *Ultrason Sonochem*. 2009 Jan;16(1):105–15.
41. Abbott JG. Rationale and derivation of MI and TI--a review. *Ultrasound Med Biol*. 1999 Mar;25(3):431–41.
42. de Jong N. Mechanical index. *Eur J Echocardiogr J Work Group Echocardiogr Eur Soc Cardiol*. 2002 Mar;3(1):73–4.
43. Bouakaz A, Frigstad S, Ten Cate FJ, de Jong N. Super harmonic imaging: a new imaging technique for improved contrast detection. *Ultrasound Med Biol*. 2002 Jan;28(1):59–68.
44. Arthuis CJ, Novell A, Escoffre JM, Patat F, Bouakaz A, Perrotin F. New insights into uteroplacental perfusion: quantitative analysis using Doppler and contrast-enhanced ultrasound imaging. *Placenta*. 2013 May;34(5):424–31.
45. Kottner J, Audigé L, Brorson S, Donner A, Gajewski BJ, Hróbjartsson A, et al. Guidelines for Reporting Reliability and Agreement Studies (GRRAS) were proposed. *J Clin Epidemiol*. 2011 Jan;64(1):96–106.
46. Walter SD, Eliasziw M, Donner A. Sample size and optimal designs for reliability

studies. *Stat Med*. 1998 Jan 15;17(1):101–10.

47. Hyvelin J-M, Tardy I, Arbogast C, Costa M, Emmel P, Helbert A, et al. Use of ultrasound contrast agent microbubbles in preclinical research: recommendations for small animal imaging. *Invest Radiol*. 2013 Aug;48(8):570–83.

48. Stapleton S, Goodman H, Zhou Y-Q, Cherin E, Henkelman RM, Burns PN, et al. Acoustic and kinetic behaviour of definity in mice exposed to high frequency ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 2009 Feb;35(2):296–307.

49. Dizeux A, Payen T, Barrois G, Le Guillou Buffello D, Bridal SL. Reproducibility of Contrast-Enhanced Ultrasound in Mice with Controlled Injection. *Mol Imaging Biol MIB Off Publ Acad Mol Imaging*. 2016 Oct;18(5):651–8.

50. ter Haar GR. Ultrasonic contrast agents: safety considerations reviewed. *Eur J Radiol*. 2002 Mar;41(3):217–21.

51. Keator CS, Lindner JR, Belcik JT, Bishop CV, Slayden OD. Contrast-enhanced ultrasound reveals real-time spatial changes in vascular perfusion during early implantation in the macaque uterus. *Fertil Steril*. 2011 Mar 15;95(4):1316-1321-3.

52. Ordén MR, Gudmundsson S, Kirkinen P. Intravascular ultrasound contrast agent: an aid in imaging intervillous blood flow? *Placenta*. 1999 Apr;20(2–3):235–40.

53. Denbow ML, Welsh AW, Taylor MJ, Blomley MJ, Cosgrove DO, Fisk NM. Twin fetuses: intravascular microbubble US contrast agent administration--early experience. *Radiology*. 2000 Mar;214(3):724–8.

54. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JCP. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*. 2009 Jun;30(6):473–82.

55. Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol*. 2003 Jan;162(1):115–25.

56. Hernández-Díaz S, Toh S, Cnattingius S. Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. *BMJ*. 2009;338:b2255.

57. Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BWJ, van der Post JAM, Coomarasamy A, et al. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Med Can*. 2008 Mar 11;178(6):701–11.

58. Everett TR, Lees CC. Beyond the placental bed: placental and systemic determinants

of the uterine artery Doppler waveform. *Placenta*. 2012 Nov;33(11):893–901.

59. Collins SL, Grant D, Black RS, Vellayan M, Impey L. Abdominal pregnancy: a perfusion confusion? *Placenta*. 2011 Oct;32(10):793–5.
60. Acácio GL. Uterine artery Doppler patterns in abdominal pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2002 Aug;20(2):194–6.
61. Chien PF, Arnott N, Gordon A, Owen P, Khan KS. How useful is uterine artery Doppler flow velocimetry in the prediction of pre-eclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? An overview. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2000 Feb;107(2):196–208.
62. Correias JM, Bridal L, Lesavre A, Méjean A, Claudon M, Hélénon O. Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts. *Eur Radiol*. 2001;11(8):1316–28.
63. Jakobsen JA. Ultrasound contrast agents: clinical applications. *Eur Radiol*. 2001;11(8):1329–37.
64. Wilson SR, Burns PN. Microbubble-enhanced US in body imaging: what role? *Radiology*. 2010 Oct;257(1):24–39.
65. Keller MW, Segal SS, Kaul S, Duling B. The behavior of sonicated albumin microbubbles within the microcirculation: a basis for their use during myocardial contrast echocardiography. *Circ Res*. 1989 Aug;65(2):458–67.
66. Cosgrove D, Lassau N. Imaging of perfusion using ultrasound. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010 Aug;37 Suppl 1:S65-85.
67. Lamuraglia M, Escudier B, Chami L, Schwartz B, Leclère J, Roche A, et al. To predict progression-free survival and overall survival in metastatic renal cancer treated with sorafenib: pilot study using dynamic contrast-enhanced Doppler ultrasound. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2006 Oct;42(15):2472–9.
68. Wei K, Jayaweera AR, Firoozan S, Linka A, Skyba DM, Kaul S. Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of microbubbles administered as a constant venous infusion. *Circulation*. 1998 Feb 10;97(5):473–83.
69. Simpson NA, Nimrod C, De Vermette R, Leblanc C, Fournier J. Sonographic evaluation of intervillous flow in early pregnancy: use of echo-enhancement agents. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 1998 Mar;11(3):204–8.
70. Schmiedl UP, Komarniski K, Winter TC, Luna JA, Cyr DR, Ruppenthal G, et al. Assessment of fetal and placental blood flow in primates using contrast enhanced ultrasonography. *J Ultrasound Med Off J Am Inst Ultrasound Med*. 1998 Feb;17(2):75-80-82.

71. Ragavendra N, Tarantal AF. Intervillous blood flow in the third trimester gravid rhesus monkey (*Macaca mulatta*): use of sonographic contrast agent and harmonic imaging. *Placenta*. 2001 Mar;22(2–3):200–5.
72. Barth WH, McCurnin DC, Dee Carey K, Hankins GDV. Contrast sonography, video densitometry and intervillous blood flow: a pilot project. *Placenta*. 2006 Jul;27(6–7):719–26.
73. Tranquart F, Mercier L, Frinking P, Gaud E, Arditi M. Perfusion quantification in contrast-enhanced ultrasound (CEUS)--ready for research projects and routine clinical use. *Ultraschall Med Stuttg Ger* 1980. 2012 Jul;33 Suppl 1:S31-38.
74. Abramowicz JS. Ultrasound contrast media and their use in obstetrics and gynecology. *Ultrasound Med Biol*. 1997;23(9):1287–98.
75. Quibel T, Deloison B, Chammings F, Chalouhi GE, Siauve N, Alison M, et al. Placental elastography in a murine intrauterine growth restriction model. *Prenat Diagn*. 2015 Nov;35(11):1106–11.
76. Greis C. Quantitative evaluation of microvascular blood flow by contrast-enhanced ultrasound (CEUS). *Clin Hemorheol Microcirc*. 2011;49(1–4):137–49.
77. Needles A, Arditi M, Rognin NG, Mehi J, Coulthard T, Bilan-Tracey C, et al. Nonlinear contrast imaging with an array-based micro-ultrasound system. *Ultrasound Med Biol*. 2010 Dec;36(12):2097–106.
78. Tam Tam KB, George E, Cockrell K, Arany M, Speed J, Martin JN, et al. Endothelin type A receptor antagonist attenuates placental ischemia-induced hypertension and uterine vascular resistance. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Apr;204(4):330.e1-4.
79. Mu J, Adamson SL. Developmental changes in hemodynamics of uterine artery, utero- and umbilicoplacental, and vitelline circulations in mouse throughout gestation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Sep;291(3):H1421-1428.
80. Caluwaerts S, Vercruysse L, Luyten C, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta*. 2005 Aug;26(7):574–84.
81. Vercruysse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta*. 2006 Jan;27(1):22–33.
82. Osol G, Cipolla M. Pregnancy-induced changes in the three-dimensional mechanical properties of pressurized rat uteroplacental (radial) arteries. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Jan;168(1 Pt 1):268–74.

83. Thaler I, Manor D, Itskovitz J, Rottem S, Levit N, Timor-Tritsch I, et al. Changes in uterine blood flow during human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1990 Jan;162(1):121–5.
84. Jauniaux E, Jurkovic D, Campbell S, Hustin J. Doppler ultrasonographic features of the developing placental circulation: Correlation with anatomic findings. *Am J Obstet Gynecol.* 1992 Feb;166(2):585–7.
85. Chan FY, Pun TC, Lam C, Khoo J, Lee CP, Lam YH. Pregnancy screening by uterine artery Doppler velocimetry--which criterion performs best? *Obstet Gynecol.* 1995 Apr;85(4):596–602.
86. Gómez O, Martínez JM, Figueras F, Del Río M, Borobio V, Puerto B, et al. Uterine artery Doppler at 11-14 weeks of gestation to screen for hypertensive disorders and associated complications in an unselected population. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005 Oct;26(5):490–4.
87. Wigglesworth JS. EXPERIMENTAL GROWTH RETARDATION IN THE FOETAL RAT. *J Pathol Bacteriol.* 1964 Jul;88:1–13.
88. Janot M, Cortes-Dubly M-L, Rodriguez S, Huynh-Do U. Bilateral uterine vessel ligation as a model of intrauterine growth restriction in mice. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2014;12:62.
89. Salomon LJ, Siauve N, Taillieu F, Balvay D, Vayssettes C, Frija G, et al. In vivo dynamic MRI measurement of the noradrenaline-induced reduction in placental blood flow in mice. *Placenta.* 2006 Oct;27(9–10):1007–13.
90. Gowland PA, Francis ST, Duncan KR, Freeman AJ, Issa B, Moore RJ, et al. In vivo perfusion measurements in the human placenta using echo planar imaging at 0.5 T. *Magn Reson Med.* 1998 Sep;40(3):467–73.
91. Taillieu F, Salomon LJ, Siauve N, Clément O, Faye N, Balvay D, et al. Placental perfusion and permeability: simultaneous assessment with dual-echo contrast-enhanced MR imaging in mice. *Radiology.* 2006 Dec;241(3):737–45.
92. Sinding M, Peters DA, Frøkjær JB, Christiansen OB, Petersen A, Uldbjerg N, et al. Placental magnetic resonance imaging T2* measurements in normal pregnancies and in those complicated by fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016 Jun;47(6):748–54.
93. Tofts PS, Kermode AG. Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. 1. Fundamental concepts. *Magn Reson Med.* 1991 Feb;17(2):357–67.

94. Kety SS. Observations on the validity of a two compartmental model of the cerebral circulation. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1965;14:85–7.
95. Salomon LJ, Siauve N, Balvay D, Cuénod CA, Vayssettes C, Luciani A, et al. Placental perfusion MR imaging with contrast agents in a mouse model. *Radiology.* 2005 Apr;235(1):73–80.
96. Derwig I, Lythgoe DJ, Barker GJ, Poon L, Gowland P, Yeung R, et al. Association of placental perfusion, as assessed by magnetic resonance imaging and uterine artery Doppler ultrasound, and its relationship to pregnancy outcome. *Placenta.* 2013 Oct;34(10):885–91.
97. Doctor BA, O’Riordan MA, Kirchner HL, Shah D, Hack M. Perinatal correlates and neonatal outcomes of small for gestational age infants born at term gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 Sep;185(3):652–9.
98. Chauhan SP, Rouse DJ, Ananth CV, Magann EF, Chang E, Dahlke JD, et al. Screening for intrauterine growth restriction in uncomplicated pregnancies: time for action. *Am J Perinatol.* 2013 Jan;30(1):33–9.
99. Nicolaides KH, Economides DL, Soothill PW. Blood gases, pH, and lactate in appropriate- and small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 1989 Oct;161(4):996–1001.
100. Chalouhi GE, Alison M, Deloison B, Thiam R, Autret G, Balvay D, et al. Fetoplacental oxygenation in an intrauterine growth restriction rat model by using blood oxygen level-dependent MR imaging at 4.7 T. *Radiology.* 2013 Oct;269(1):122–9.
101. Sørensen A, Pedersen M, Tietze A, Ottosen L, Duus L, Uldbjerg N. BOLD MRI in sheep fetuses: a non-invasive method for measuring changes in tissue oxygenation. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Dec;34(6):687–92.
102. Needles A, Heinmiller A, Sun J, Theodoropoulos C, Bates D, Hirson D, et al. Development and initial application of a fully integrated photoacoustic micro-ultrasound system. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2013 May;60(5):888–97.
103. Lungu GF, Li M-L, Xie X, Wang LV, Stoica G. In vivo imaging and characterization of hypoxia-induced neovascularization and tumor invasion. *Int J Oncol.* 2007 Jan;30(1):45–54.
104. Wang X, Pang Y, Ku G, Xie X, Stoica G, Wang LV. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat Biotechnol.* 2003 Jul;21(7):803–6.

105. Zijlstra WG, Buursma A, Meeuwssen-van der Roest WP. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Clin Chem*. 1991 Sep;37(9):1633–8.
106. Wedegärtner U, Tchirikov M, Schäfer S, Priest AN, Kooijman H, Adam G, et al. Functional MR imaging: comparison of BOLD signal intensity changes in fetal organs with fetal and maternal oxyhemoglobin saturation during hypoxia in sheep. *Radiology*. 2006 Mar;238(3):872–80.
107. Huen I, Morris DM, Wright C, Sibley CP, Naish JH, Johnstone ED. Absence of PO2 change in fetal brain despite PO2 increase in placenta in response to maternal oxygen challenge. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2014 Dec;121(13):1588–94.
108. Schoennagel BP, Yamamura J, Fischer R, Tavares de Sousa M, Weyhmiller M, Birkelbach M, et al. BOLD MRI in the brain of fetal sheep at 3T during experimental hypoxia. *J Magn Reson Imaging JMRI*. 2015 Jan;41(1):110–6.
109. Solomon E, Avni R, Hadas R, Raz T, Garbow JR, Bendel P, et al. Major mouse placental compartments revealed by diffusion-weighted MRI, contrast-enhanced MRI, and fluorescence imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 15;111(28):10353–8.
110. Rich LJ, Seshadri M. Photoacoustic imaging of vascular hemodynamics: validation with blood oxygenation level-dependent MR imaging. *Radiology*. 2015 Apr;275(1):110–8.
111. Erpelding TN, Kim C, Pramanik M, Jankovic L, Maslov K, Guo Z, et al. Sentinel lymph nodes in the rat: noninvasive photoacoustic and US imaging with a clinical US system. *Radiology*. 2010 Jul;256(1):102–10.
112. Song KH, Stein EW, Margenthaler JA, Wang LV. Noninvasive photoacoustic identification of sentinel lymph nodes containing methylene blue in vivo in a rat model. *J Biomed Opt*. 2008 Oct;13(5):54033.
113. Mezrich R. Science to practice: Son et Lumiere--understanding tumor heterogeneity. *Radiology*. 2012 May;263(2):313–5.
114. Xia J, Yao J, Wang LV. Photoacoustic tomography: principles and advances. *Electromagn Waves Camb Mass*. 2014;147:1–22.
115. Heijblom M, Piras D, Brinkhuis M, van Hespden JCG, van den Engh FM, van der Schaaf M, et al. Photoacoustic image patterns of breast carcinoma and comparisons with Magnetic Resonance Imaging and vascular stained histopathology. *Sci Rep*. 2015;5:11778.
116. Zackrisson S, van de Ven SMWY, Gambhir SS. Light in and sound out: emerging translational strategies for photoacoustic imaging. *Cancer Res*. 2014 Feb 15;74(4):979–1004.

117. Stoffels I, Morscher S, Helfrich I, Hillen U, Leyh J, Lehy J, et al. Metastatic status of sentinel lymph nodes in melanoma determined noninvasively with multispectral optoacoustic imaging. *Sci Transl Med*. 2015 Dec 9;7(317):317ra199.
118. Ruano R, Rodo C, Peiro JL, Shamshirsaz AA, Haeri S, Nomura ML, et al. Fetoscopic laser ablation of placental anastomoses in twin-twin transfusion syndrome using “Solomon technique.” *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 Oct;42(4):434–9.
119. Gorce JM, Arditi M, Schneider M. Influence of bubble size distribution on the echogenicity of ultrasound contrast agents: a study of SonoVue. *Invest Radiol*. 2000 Nov;35(11):661–71.
120. Lucidarme O, Franchi-Abella S, Correas J-M, Bridal SL, Kurtisovski E, Berger G. Blood flow quantification with contrast-enhanced US: “entrance in the section” phenomenon-phantom and rabbit study. *Radiology*. 2003 Aug;228(2):473–9.
121. Morel O, Pachy F, Chavatte-Palmer P, Bonneau M, Gayat E, Laigre P, et al. Correlation between uteroplacental three-dimensional power Doppler indices and true uterine blood flow: evaluation in a pregnant sheep model. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010 Nov;36(5):635–40.
122. Lecarpentier E, Morel O, Tarrade A, Dahirel M, Bonneau M, Gayat E, et al. Quantification of utero-placental vascularization in a rabbit model of IUGR with three-dimensional power Doppler angiography. *Placenta*. 2012 Oct;33(10):769–75.
123. Osmanski B-F, Lecarpentier E, Montaldo G, Tsatsaris V, Chavatte-Palmer P, Tanter M. Discriminative imaging of maternal and fetal blood flow within the placenta using ultrafast ultrasound. *Sci Rep*. 2015 Sep 16;5:13394.

10. Annexes

10.1. Annexe 1 : Liste des publications

Articles à comité de lecture

Arthuis CJ, Novell A, Escoffre JM, Patat F, Bouakaz A, Perrotin F. New insights into uteroplacental perfusion: quantitative analysis using Doppler and contrast-enhanced ultrasound imaging. *Placenta*. 2013 May;34(5):424-31.

Arthuis CJ, Novell A, Raes F, Escoffre JM, Lerondel S, Lepape A, Bouakaz A, Perrotin F. Real-time monitoring of placental oxygenation during maternal hypoxia and hyperoxygenation using photoacoustic imaging. *Plos One* 2017 Jan 12;12(1):e0169850.

Communications dans des congrès internationaux

Arthuis C, Novell A, Escoffre JM, Lerondel S, Perrotin F, Bouakaz A. Evaluation of placental perfusion using contrast enhanced ultrasound imaging. The 20th European symposium on Ultrasound Contrast Imaging, January 2015, Rotterdam, The Netherlands.

Arthuis C, Novell A, Raes F, Escoffre JM, Lerondel S, Lepape A, Bouakaz A, Perrotin F. Monitoring and quantification of oxygen saturation in placenta by photoacoustic imaging during rat pregnancy. *IEEE*, September 2014, Chicago, USA.

Arthuis C, Novell A, Raes F, Lepape A, Perrotin F, Bouakaz A. Quantitative analysis of the uteroplacental perfusion using contrast enhanced ultrasound imaging. *IEEE*, September 2014, Chicago, USA.

Arthuis C, Perrotin F, Simon E, Novell A, Escoffre J, Bouakaz A. New quantitative analysis of uteroplacental perfusion using Doppler and contrast-enhanced ultrasound imaging. *ISUOG*, October 2013, Sydney, Australia.

Arthuis C, Novell A, Escoffre JM, Patat F, Bouakaz A, Perrotin F. Contrast-enhanced ultrasound to monitor placental perfusion. European symposium on Contrast Ultrasound Imaging, January 2013, Rotterdam, The Netherlands.

Communications dans des congrès nationaux

Arthuis C, Novell A, Escoffre JM, Raes F, Lepape A, Bouakaz A, Perrotin F. Evaluation de l'oxygénation foeto-placentaire à différents jours de la gestation du rat par imagerie photoacoustique. Journées Francophones de la Recherche en Obstétrique et Gynécologie, CNGOF, Décembre 2014, Paris.

Arthuis C, Bouakaz A, Novell A, Raes F, Lepape A, Perrotin F. Exploration fonctionnelle du placenta par échographie de contraste et imagerie photoacoustique à différents stades de la gestation chez la rate. Société Française de Médecine Périnatale, Octobre 2014, Lyon, France.

Arthuis C, Novell A, Escoffre JM, Patat F, Bouakaz A, Perrotin F. Nouvelle approche de la perfusion placentaire : analyse quantitative par Doppler et échographie de contraste chez la rate gestante. Journée Francophone de Recherche en Obstétrique et en Gynécologie, CNGOF, Décembre 2013, Paris.

Conférences invitées

Quantitative analysis of the uteroplacental perfusion using contrast enhanced ultrasound. Studium International Conferences, Targeted Ultrasound Contrast Imaging and Drug Delivery, May 2014, Tours, France.

10.2. Annexe 2 : Abréviations

FT : Fall Time

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

MET : microscopie électronique à transmission

MO : microscopie optique

MTT : Mean Transit Time

PE : prééclampsie

PE: Peak Enhancement

RCIU : retard de croissance intra-utérin

ROIS: Regions of Interest

RT : Rise Time

TTP : Time To Peak

WiAUC : Wash in Area Under the Curve

WiR : Wash-in Rate

WoAUC : Wash out Area Under the Curve

WoR : Wash-out Rate

10.3. Articles publiés

Placenta, 2013 May;34(5):424-31. doi: 10.1016/j.placenta.2013.01.019. Epub 2013 Mar 19.

New insights into uteroplacental perfusion: quantitative analysis using Doppler and contrast-enhanced ultrasound imaging.

Arthuis CJ¹, Novell A, Escoffre JM, Patat F, Bouakaz A, Perrotin F.

⊕ Author information

Abstract

OBJECTIVE: To monitor and quantify uteroplacental perfusion in rat pregnancies by Doppler ultrasound (DUS) and contrast-enhanced ultrasound (CEUS).

METHODS: Fourteen rats were randomized in two groups (the CEUS group and the control group). On days 8, 11, 14, 17, 19 and 20 of gestation, we used DUS to measure the resistance index (RI), pulsatility index and blood velocity in the uterine, arcuate and umbilical arteries in both groups. On days 14, 17 and 20, one group was also examined by CEUS. Quantitative perfusion parameters were calculated in 4 compartments (mesometrial triangle, placenta, umbilical cord and fetus) and compared.

RESULTS: The DUS measurement showed that the RI of the uterine and arcuate arteries decreased ($p < 0.01$) from day 14 to day 17, while velocity increased each of these arteries ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). Quantification of uteroplacental perfusion by CEUS in bolus mode revealed that blood volume and local blood flow increased from day 14 to day 20 in the mesometrial triangle ($p < 0.01$) and the placenta ($p < 0.05$). In the CEUS destruction-replenishment mode, the perfusion parameters showed trends similar to those observed in bolus mode. No microbubbles were detected in the umbilical vein or fetal compartments. The weights of pups in the two groups did not differ significantly.

CONCLUSIONS: CEUS estimates of placental perfusion complement the data provided by DUS.

Copyright © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

PMID: 23518453 DOI: [10.1016/j.placenta.2013.01.019](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.01.019)

PLoS One, 2017 Jan 12;12(1):e0169850. doi: 10.1371/journal.pone.0169850. eCollection 2017.

Real-Time Monitoring of Placental Oxygenation during Maternal Hypoxia and Hyperoxygenation Using Photoacoustic Imaging.

Arthuis CJ^{1,2}, Novell A¹, Raes F³, Escoffre JM¹, Lerondel S³, Le Pape A³, Bouakaz A¹, Perrotin F^{1,2}.

⊕ Author information

Abstract

PURPOSE: This preclinical study aimed to evaluate placental oxygenation in pregnant rats by real-time photoacoustic (PA) imaging on different days of gestation and to specify variations in placental oxygen saturation under conditions of maternal hypoxia and hyperoxygenation.

MATERIAL AND METHODS: Placentas of fifteen Sprague-Dawley rats were examined on days 14, 17, and 20 of pregnancy with a PA imaging system coupled to high-resolution ultrasound imaging. Pregnant rats were successively exposed to hyperoxygenated and hypoxic conditions by changing the oxygen concentration in inhaled gas. Tissue oxygen saturation was quantitatively analyzed by real-time PA imaging in the skin and 3 regions of the placenta. All procedures were performed in accordance with applicable ethical guidelines and approved by the animal care committee.

RESULTS: Maternal hypoxia was associated with significantly greater decrease in blood oxygen saturation (ΔO_2 Saturation) in the skin ($70.74\% \pm 7.65$) than in the mesometrial triangle ($32.66\% \pm 5.75$) or other placental areas (labyrinth: $18.58\% \pm 6.61$; basal zone: $13.13\% \pm 5.72$) on different days of pregnancy ($P < 0.001$). ΔO_2 Saturation did not differ significantly between the labyrinth, the basal zone, and the decidua. After the period of hypoxia, maternal hyperoxygenation led to a significant rise in oxygen saturation, which returned to its initial values in the different placental regions ($P < 0.001$).

CONCLUSIONS: PA imaging enables the variation of blood oxygen saturation to be monitored in the placenta during maternal hypoxia or hyperoxygenation. This first preclinical study suggests that the placenta plays an important role in protecting the fetus against maternal hypoxia.

PMID: 28081216 PMCID: [PMC5232166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5232166/) DOI: [10.1371/journal.pone.0169850](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169850)



Chloé FOUCHÉ épouse ARTHUIS

Etude de la perfusion placentaire par imagerie fonctionnelle sur un modèle murin de retard de croissance intra-utérin



Résumé

La distinction entre les fœtus constitutionnellement petits de ceux qui présentent une réelle restriction de croissance liée à une insuffisance placentaire n'est pas aisée avec les mesures échographiques utilisées en pratique courante. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) est responsable d'une part importante de la prématurité induite, et d'une augmentation du risque de mortalité et de morbidité néonatales. C'est pourquoi, l'amélioration de la connaissance de la vascularisation placentaire est indispensable pour mieux identifier et prendre en charge les situations d'hypoxie chroniques fœtales associées à l'insuffisance placentaire.

Pour quantifier la vascularisation les modalités d'imagerie de perfusion disponibles sont l'échographie et l'IRM. Les études évaluant la quantification de la perfusion placentaire par échographie de contraste sont peu nombreuses. Les avantages et les limites de cet examen ont été évalués sur un modèle murin de RCIU par ligature vasculaire. Ainsi, l'échographie de contraste permettait de quantifier une baisse de la perfusion placentaire sur un modèle de RCIU sans que l'on puisse observer de passage d'agents de contraste ultrasonores au travers la barrière placentaire. Les résultats obtenus ont été comparés aux données obtenues par l'IRM de perfusion. Les paramètres quantitatifs obtenus à partir des courbes de cinétiques du contraste pour chacune des deux modalités d'imagerie étaient comparables sur un modèle identique de RCIU murin. Enfin, une méthode d'étude de l'oxygénation placentaire par imagerie photoacoustique a été évaluée. Cette modalité d'imagerie non invasive permettait d'obtenir en temps réel l'oxygénation placentaire, avec cependant une profondeur limitée d'exploration. Le placenta semblait se comporter comme une réserve en oxygène au cours de l'étude d'une séquence hypoxie – hyperoxygénation maternelle avec une désaturation moins importante que celle observée dans les autres tissus maternels.

Mots clés : retard de croissance intra-utérin ; insuffisance placentaire ; échographie de contraste ; perfusion placentaire ; photoacoustique.

Résumé en anglais

To identify fetuses small for their gestational-age who have reached their appropriate growth potential from growth-restricted fetuses due to placental insufficiency is uneasy. Intra Uterine Growth Restriction (IUGR) increases the risk for indicated preterm delivery, neonatal mortality and morbidity. Therefore, improving the knowledge of the placental perfusion is essential to better identify and manage fetal chronic oxygen deprivation associated with placental insufficiency.

Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) and MRI are two imaging modalities available to quantify placental perfusion. However, few studies focus on the quantification of placental perfusion with CEUS. First, the advantages and limitations of CEUS were presented in an IUGR rat model by uterine ligation. The placental perfusion observed by CEUS was significantly decreased in the ligated horn. No contrast enhancement was observed in the umbilical vein or the fetus. Then, we compared the CEUS parameters to results obtained by MRI perfusion. Perfusion parameters were obtained from the signal intensity decay curve for the two imaging modalities. Results of such perfusion parameters were comparable in the same IUGR rat model. Finally, we evaluated the response of the placenta to oxygenation by photoacoustic imaging. PA imaging is a real-time, non-invasive method to evaluate placental oxygenation without contrast agents. Our results suggesting that placenta is less affected than maternal tissue by the decline in maternal oxygenation. The placenta may play an important role in protecting the fetus against hypoxia.

Keywords: intrauterine growth restriction; placental insufficiency; ultrasound contrast enhanced; placental perfusion; photoacoustic imaging.