

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UN CATHÉTER MULTIMODAL VISANT L'ÉTUDE DE LA
PLAQUE D'ATHÉROSCLÉROSE

MAXIME ABRAN

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIÆ DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

JUIN 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

DÉVELOPPEMENT D'UN CATHÉTER MULTIMODAL VISANT L'ÉTUDE DE LA
PLAQUE D'ATHÉROSCLÉROSE

présentée par : ABRAN Maxime

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiæ Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. LEBLOND Frédéric, Ph. D., président

M. LESAGE Frédéric, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. TARDIF Jean-Claude, MD, membre et codirecteur de recherche

M. BRAULT Jean-Jules, Ph. D., membre

M. LEVESQUE Ives R., Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu mon épouse, mes parents, ma famille et mes amis pour leur support et leur motivation tout au long de mes études. Ils m'ont toujours encouragé à poursuivre mes buts et à aller jusqu'au bout de mes ambitions.

Je remercie également mon directeur de recherche, Frédéric Lesage, pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mes travaux de recherche aux cycles supérieurs avec lui. Ses conseils, sa motivation et sa disponibilité m'ont été forts utiles.

Un merci spécial à toute l'équipe de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour leur patience et leur aide avec tout ce qui a trait au domaine biomédical, en particulier mon co-directeur de recherche Jean-Claude Tardif, Eric Rhéaume, Teodora Mihalache-Avram, David Busseuil, Mélanie Mecteau, Nolwenn Merlet et Barbara E. Stähli. En tant que diplômé en génie électrique, je ne serais jamais arrivé à réaliser la partie biomédicale de mon projet sans eux.

Je remercie aussi les collaborateurs du laboratoire de biorhéologie et d'ultrasonographie médicale (LBUM), Guy Cloutier, Marie-Hélène Roy Cardinal et Boris Chayer pour leur grande aide et leur expérience en imagerie ultrasonore.

Merci à tous les membres du laboratoire d'imagerie optique et moléculaire (LIOM), avec qui j'ai passé du très bon temps, autant au laboratoire qu'à l'extérieur.

Au point de vue financier, j'aimerais remercier le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour l'octroi d'une bourse d'études supérieures du Canada Alexander-Graham-Bell.

RÉSUMÉ

L'objectif de cette thèse est de concevoir et valider un système d'imagerie par cathéter visant l'étude de la plaque d'athérosclérose. L'innovation repose dans l'intégration de plusieurs modalités d'imagerie dans un seul appareil. En effet, le système combine des techniques d'imagerie anatomique et moléculaire. Ceci permet d'obtenir de l'information riche et diversifiée en temps réel à propos de la plaque d'athérosclérose.

Le système conçu permet d'effectuer simultanément l'imagerie ultrasonore intravasculaire (IVUS), l'imagerie photoacoustique intravasculaire (IVPA), ainsi que l'imagerie de fluorescence intravasculaire (NIRF). L'élastographie intravasculaire (IVE) est également possible en post-traitement. L'hypothèse de travail est que la combinaison de l'ensemble de ces techniques d'imagerie permet une étude plus détaillée que l'utilisation d'une seule modalité.

L'IVUS est une technique d'imagerie morphologique largement utilisée en recherche clinique qui permet d'obtenir en temps réel des séries de coupes transversales des artères à haute résolution. La paroi artérielle peut être étudiée afin d'identifier certains types de plaque. L'IVUS est la composante principale du système d'imagerie par cathéter conçu dans le cadre de ce projet. Bien que cette technique d'imagerie permette de visualiser l'anatomie générale de l'artère, elle permet difficilement de caractériser les composantes principales d'une plaque vulnérable.

Afin de compléter l'IVUS, des techniques d'imagerie moléculaire, l'IVPA et la NIRF, ont été incorporées au système. Le but est d'étudier le développement de la plaque à un stade d'évolution plus précoce, alors qu'il y a inflammation de la paroi artérielle, mais une accumulation insuffisante de dépôts lipidiques pour être visibles en IVUS. L'imagerie moléculaire a le potentiel de mieux caractériser les plaques vulnérables, qui sont plus susceptibles de subir des complications, telle une thrombose. Une des applications potentielles est l'étude de l'effet de nouveaux médicaments, qui ne se traduit pas nécessairement par un changement anatomique perceptible en IVUS, mais plutôt par un changement au niveau moléculaire.

L'IVE permet d'obtenir de l'information quantitative à propos des propriétés élastiques de la paroi artérielle. Elle vise à compléter l'IVUS en fournissant des propriétés mécaniques de l'artère et en évaluant la vulnérabilité de la plaque d'athérosclérose.

La première contribution de ce travail contient une description détaillée du système d'imagerie par cathéter qui a été conçu. Une preuve de concept est ensuite présentée en exposant des résultats sur fantômes exprimant un contraste dans toutes les modalités d'imagerie intégrées au système : l'IVUS, l'IVPA, la NIRF et l'IVE.

La deuxième contribution pousse la validation du système plus loin en évaluant le potentiel de détection de la plaque d'athérosclérose *in vivo* chez le lapin. La combinaison de l'IVUS et de la NIRF, avec injection d'un biomarqueur, soit le vert d'indocyanine (ICG), a permis la détection de certaines plaques et a été comparée avec des techniques d'imagerie *ex vivo*. La performance ainsi que la reproductibilité des mesures ont été évaluées.

La troisième contribution est reliée à la colocalisation des images en IVUS et en NIRF obtenues chez le lapin avec des images *ex vivo* volumétriques à très haute résolution. Les images *ex vivo* sont comparées à celles obtenues avec le cathéter, afin de mieux apprécier les capacités et les limites du système d'imagerie *in vivo* conçu.

ABSTRACT

The aim of this thesis is to design and validate a catheter imaging system for the study of the atherosclerotic plaque. The innovation resides in the integration of multiple imaging modalities in a single device. Indeed, the system combines anatomical and molecular imaging techniques. This allows obtaining rich and diversified information in real time about the atherosclerotic plaque.

The designed system allows simultaneously performing intravascular ultrasound imaging (IVUS), intravascular photoacoustic imaging (IVPA) and intravascular fluorescence (NIRF). Intravascular elastography (IVE) is also possible in post-processing. The hypothesis of this work is that the combination of all these imaging techniques allows a more detailed study than the usage of a single modality.

IVUS is a morphological imaging technique widely used in preclinical research that allows obtaining in real time series of cross sections of arteries at a high resolution. The artery wall can be studied to identify certain types of plaque. IVUS is the main component of the catheter imaging system designed in this project. While this imaging technique allows visualizing the general anatomy of the artery, it is not well suited for characterizing the main components of a vulnerable plaque.

To complement IVUS, molecular imaging techniques, IVPA and NIRF, were incorporated to the system. The goal is to study the development of the plaque at an earlier evolution stage when there is inflammation in the artery wall, but an insufficient accumulation of lipids to be visible in IVUS. Molecular imaging has the potential to better characterize vulnerable plaques, which are more prone to complications, such as thrombosis. One of the potential applications is the study of the effect of new drugs, that doesn't always translate by an anatomical change perceptible in IVUS, but rather a change at the molecular level.

IVE allows obtaining quantitative information about elastic properties of the artery wall. It aims at complementing IVUS by providing mechanical properties of the artery and by evaluating the vulnerability of atherosclerotic plaque.

The first contribution to this work contains a detailed description of the designed catheter imaging system. A proof of concept is then presented by exposing results on phantoms with contrasts in all the imaging modalities integrated to the system: IVUS, IVPA, NIRF and IVE.

The second contribution further validates the system by evaluating the detection potential of atherosclerotic plaque *in vivo* on rabbits. The IVUS and NIRF combination, with the injection of a biomarker, indocyanine green (ICG), allowed the detection of certain plaques and was compared to *ex vivo* imaging techniques. The performance and the reproducibility of the measures were evaluated.

The third contribution is related to the colocalisation of IVUS and NIRF images obtained in rabbits with volumetric *ex vivo* images at a very high resolution. *Ex vivo* images are compared to the ones obtained with the catheter, in order to better appreciate the capabilities and the limitations of the designed *in vivo* imaging system.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVIII
LISTE DES ANNEXES.....	XX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte et problématique	1
1.2 Brève revue de la littérature	3
1.2.1 Athérosclérose.....	3
1.2.2 Sondes moléculaires ciblant l'athérosclérose.....	4
1.2.3 Détection de la plaque d'athérosclérose par cathéter	6
1.3 Objectifs et hypothèses.....	6
1.4 Présentation de la thèse et cohérence des articles	8
CHAPITRE 2 REVUE DES MODALITÉS D'IMAGERIE	10
2.1 Imagerie ultrasonore.....	10
2.1.1 Physique des ultrasons	10
2.1.2 Formation d'image	12
2.1.3 Applications	13
2.2 Élastographie.....	15
2.3 Imagerie photoacoustique	17

2.4	Imagerie de fluorescence.....	20
2.5	Autres modalités.....	23
CHAPITRE 3 ARTICLE 1 : DEVELOPMENT OF A PHOTOACOUSTIC, ULTRASOUND AND FLUORESCENCE IMAGING CATHETER FOR THE STUDY OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUE		26
3.1	Introduction	26
3.2	Materials and methods	28
3.2.1	System overview	28
3.2.2	Catheter conception.....	29
3.2.3	Optical design.....	31
3.2.4	Electronics	32
3.2.5	Acquisition	33
3.2.6	Reconstruction.....	34
3.2.7	Phantoms	35
3.3	Results	37
3.3.1	Sensitivity measurements.....	37
3.3.2	Elastography.....	40
3.4	Conclusion.....	41
3.5	References	42
CHAPITRE 4 ARTICLE 2 : ATHEROSCLEROTIC PLAQUE DETECTION USING A BIMODAL INTRAVASCULAR ULTRASOUND (IVUS) AND NEAR-INFRARED FLUORESCENCE (NIRF) CATHETER IN RABBITS		48
4.1	Introduction	48
4.2	Materials and methods	50
4.2.1	Animal model of atherosclerosis.....	50

4.2.2	Balloon dilation procedures	50
4.2.3	Bimodal intravascular ultrasound (IVUS) / near-infrared fluorescence (NIRF) catheter system	51
4.2.4	<i>In vivo</i> intravascular imaging procedures.....	51
4.2.5	Intravascular ultrasound (IVUS)/ near-infrared fluorescence (NIRF) image analysis 52	
4.2.6	<i>Ex vivo</i> imaging.....	52
4.3	Results	53
4.3.1	<i>Ex vivo</i> near-infrared fluorescence (NIRF) imaging: validation of the model.....	53
4.3.2	<i>In vivo</i> intravascular ultrasound (IVUS) / near-infrared fluorescence (NIRF) imaging 55	
4.4	Discussion	58
4.4.1	Indocyanine green (ICG) and molecular plaque imaging	59
4.4.2	Bimodal imaging systems	60
4.4.3	Limitations	60
4.5	Conclusion.....	61
4.6	Acknowledgments.....	61
4.7	References	62
CHAPITRE 5 ARTICLE 3 : VALIDATING INTRAVASCULAR IMAGING WITH SERIAL OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY AND CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPY		67
5.1	References	75
CHAPITRE 6 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES		78
6.1	Résolution du cathéter.....	78
6.2	Aortes <i>ex vivo</i>	78

6.3	Autre sonde fluorescente.....	79
6.4	Autres fonctionnalités du système.....	81
CHAPITRE 7 DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME.....		83
7.1	Présentation du système conçu.....	83
7.2	Interface graphique.....	85
7.3	Synchronisation avec les moteurs	86
7.4	Synchronisation avec le laser photoacoustique	87
CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE		89
8.1	Objectif 1	89
8.2	Objectif 2.....	90
8.3	Objectif 3.....	91
CHAPITRE 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		93
BIBLIOGRAPHIE		95
ANNEXES		119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Caractéristiques des modalités d'imagerie de l'athérosclérose.....	24
Tableau 6.1: Résolution mesurée à 2 mm du centre du cathéter pour les trois modalités d'imagerie.....	78

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1: Interpolation des échos ultrasonores IVUS acquis en coordonnées polaires vers un système de coordonnées cartésiennes. (a) Écho ultrasonore filtré obtenu par le transducteur à un angle donné. (b) Image IVUS identifiant en rouge la localisation de l'écho ultrasonore de (a).	13
Figure 2-2: Mesure de la plaque dans la carotide en imagerie ultrasonore. L'aire de la plaque est entourée d'une ligne pointillée. Tiré de Spence, 2006.	14
Figure 2-3: Classification automatique de la plaque d'athérosclérose. (A) Image IVUS en ton de gris montrant une plaque excentrique. (B) Image en histologie virtuelle identifiant les composantes de la plaque. Tiré de König et Klauss, 2007.	15
Figure 2-4: Élastographie ultrasonore de tumeurs du sein. (a) Tumeur bénigne (adénofibrome). (b) Tumeur maligne (carcinome canalaire <i>in situ</i>). Adapté de Zhi <i>et al.</i> , 2010.(Spence, 2006)	16
Figure 2-5: Image photoacoustique 3D <i>in vivo</i> de la vascularisation d'une paume de main. Tiré de E. Z. Zhang, Laufer, Pedley et Beard, 2009.	18
Figure 2-6: Imagerie photoacoustique de tumeurs chez deux souris avec une sonde à base de nanotubes de carbone. La sonde a été validée avec et sans l'agent ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, surexprimée dans l'angiogenèse tumorale. Tiré de de la Zerda <i>et al.</i> , 2012.	19
Figure 2-7: Spectre d'absorption de l'hémoglobine oxygénée (HbO ₂) et désoxygénée (Hb). Tiré de Prahl, 1999.	20
Figure 2-8: Imagerie de fluorescence résolue dans le temps (FLIM) d'une souris porteuse d'une tumeur 24 heures après l'injection de la sonde. Adapté de Bloch <i>et al.</i> , 2005.	22
Figure 3-1: (a) Diagram of the tip of the catheter. The overlapping region of the light illumination and the ultrasound field of view is shown. It allows the co-registration of the different imaging modalities. The space under the prism and between the fiber and the transducer is filled with glue. (b) Photograph of the tip of the catheter inside the LDPE tube. The fiber was connected to a 660 nm laser and the catheter was placed on a white surface for visualization.	30

Figure 3-2: Overview of the tri-modal catheter system.	32
Figure 3-3: Block diagram of the electronic circuit.	33
Figure 3-4: Timeline of the tri-modal acquisition for a single angular position repeated 256 times to gather one frame. A frame rate of 30 Hz could be obtained with the current implementation. The photoacoustic (PA) pulse and acquisition was not generated at every angular position, but at 20 Hz on average.	34
Figure 3-5: 3D depiction of the phantoms. (a) Phantom for fluorescence and photoacoustic sensitivity tests ('d' is an adjustable distance from the outer layer of the catheter to the thin film of the surface of the inclusion). The inclusion contained either ICG or black ink at different concentrations. (b) Two tubes in a spiral shape (one filled with ICG and the other with black ink) around the imaging catheter for tri-modal validation. (c) PVA phantom with a softer region on one quarter of a slice for ultrasound elastography measures. This region was injected with ICG for fluorescence validation.	36
Figure 3-6: Sensitivity in photoacoustic with black ink at different concentrations. The ink was diluted in water for the 50 and 25% concentrations. (b) Sensitivity in fluorescence with different concentrations of indocyanine green. Dilutions were made with dimethyl sulfoxide.	37
Figure 3-7: Simultaneous photoacoustic, ultrasound and superimposed fluorescence imaging. (a) The bottom inclusion (tube filled with black ink) is visible in photoacoustic. (b) Both inclusions are visible in IVUS. The contour in the IVUS image represents the fluorescence intensity signal. The top inclusion (tube filled with 1 μ M of ICG) is visible in fluorescence. (c) Fluorescence signal is shown. 0 $^{\circ}$ is at the right of the IVUS image, with a clockwise rotation.	38
Figure 3-8: 3D reconstructions from a tri-modal acquisition. The catheter is shown in gray. (a) Ultrasound signal of both inclusions is in blue. (b) Photoacoustic signal is in red and fluorescence signal in green. (c) 3 frames along the phantom in all three imaging modalities. Scale bar is 1 mm.	39

Figure 3-9: (a) Combined IVUS-fluorescence image of a slice of the phantom. (b) Radial strain deformation in %. The softer region is shown by the white arrow. Negative strains correspond to the compression of the phantom.....41

Figure 4-1 : *Ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) images of rabbit aortas. Rabbit aortas were cut in two sections to fit in the field of view of the imaging system. For each panel, the upper part represents the aortic arch, the thoracic aorta and the proximal abdominal aorta. The lower part represents the continuation of the abdominal aorta and the left (top) and right (bottom) iliac arteries. Green brackets indicate areas of balloon injury. A.U., arbitrary units.53

Figure 4-2 : Signal comparison for selected arterial segments in *ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) images. The distal 0-40 mm abdominal aorta and the right iliac artery are the balloon-injured regions, when performed. The ratios were obtained by dividing the mean right iliac artery (or distal 0-40 mm abdominal aorta) signal by the mean left iliac artery (or distal 40-80 mm abdominal aorta) signal for each animal. The error bars are the standard errors on the mean for the three rabbits of each group.54

Figure 4-3 : Paired *ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) and white light images of three rabbit aortas, one for each group. (a, c, e) *Ex vivo* fluorescence images of excised aorta and iliac arteries showing increased ICG-accumulation in balloon-injured areas and in rabbits fed a cholesterol-enriched diet. (b, d, f) White light images of excised aorta and iliac arteries showing corresponding macroscopic plaque formation. The red circle shows scar tissue caused by the balloon injury. The green arrows show the regions that underwent balloon injury, including the right iliac artery (bottom).....55

Figure 4-4 : Integrated intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) imaging *in vivo*. (a-e) Integrated IVUS/NIRF images of aortic segments of rabbits fed a cholesterol-enriched diet; (f) image of a rabbit on a regular diet, outside balloon-dilated area. The contour in the IVUS image represents the fluorescence signal intensity. Scale bar is 1 mm. A.U., arbitrary units.56

Figure 4-5 : Comparison of *in vivo* and *ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) images and corresponding white light images of rabbit aortas. (a, e) *In vivo* fluorescence imaging; (b, f) corresponding *ex vivo* fluorescence imaging; (c, g) white light images of the abdominal aorta

and iliac arteries of 2 balloon-injured rabbits. The green arrows show the regions that underwent balloon injury, including the right iliac artery (bottom). The red arrows show corresponding enhanced ICG-accumulation visible in both *in vivo* and *ex vivo* fluorescence imaging. (d, h) Integrated intravascular ultrasound (IVUS)/NIRF cross-sectional images at the locations indicated by the red arrows.57

Figure 4-6 : Effect of blood attenuation compensation on *in vivo* fluorescence images. (a, d, g) *In vivo* fluorescence images of the abdominal aortas of 3 rabbits without blood attenuation compensation; (b, e, h) Corresponding *in vivo* fluorescence images after blood attenuation compensation; (c, f) Corresponding *ex vivo* fluorescence images; (g, h) Integrated intravascular ultrasound (IVUS)/near-infrared fluorescence (NIRF) cross-sectional images (g) without and (h) with blood attenuation compensation.58

Figure 5-1: *In vivo* imaging system. Overview of the bimodal catheter system with a detailed view of the catheter's tip. PMT stands for photomultiplier tube.69

Figure 5-2: *Ex vivo* imaging system. Overview of the serial histology imaging system. PMT stands for photomultiplier tube.71

Figure 5-3: IVUS and OCT colocalization of anatomical landmarks. (a, b, c, d) *In vivo* IVUS cross-sectional images; (e, f, g, h) *Ex vivo* OCT cross-sectional images; (i) 3D reconstruction in OCT using a maximum intensity projection algorithm. Indicated numbers in mm (upper left of each image) represent the distances between the cross-section and the iliac bifurcation. The catheter was introduced in the right iliac artery, the bottom-right one in the OCT image in (h, i). Green arrows indicate the location of the cross-section slices on 3D reconstruction. Red arrows denote side branches (anatomical landmarks) used for colocalization.72

Figure 5-4: Longitudinal view of the abdominal aorta and iliac arteries in IVUS and OCT imaging. (a) *In vivo* IVUS image of a 50 mm long artery segment; (b) *Ex vivo* OCT image of the same segment, which shrunk to a length of 30 mm. Scale bars represent a region of 1 mm by 1 mm.73

Figure 5-5: Cross-sectional view of the abdominal aorta. (a) IVUS-NIRF imaging *in vivo*; (b) OCT imaging *ex vivo*; (c) Confocal fluorescence microscopy imaging *ex vivo*; (d, e) Enlarged sections of the green region of (b, c). Red arrows identify the intimal thickness at

two locations in the OCT image. White arrows indicate colocalization between <i>in vivo</i> and <i>ex vivo</i> fluorescence. Arrow 3 shows a weaker colocalization due to the limitation of our blood attenuation compensation algorithm.	74
Figure 6-1: Images IVUS <i>ex vivo</i> d'aortes abdominales de lapin. (a) Aorte d'un lapin sain. (b) Aorte d'un lapin ayant reçu une diète riche en cholestérol. (c) Identique à (b), avec identification de la plaque en jaune.	79
Figure 6-2: Analyse d'une sonde activable ciblant les MMP. (a), (b) et (c) représentent le signal de fluorescence sur les aortes de 3 lapins. (d), (e) et (f) sont les photographies correspondantes. Les lapins en (a), (b), (d) et (e) étaient sous une diète riche en cholestérol et le lapin en (c) et (f) était sous une diète régulière.	80
Figure 6-3: Coupe longitudinale en imagerie ultrasonore intravasculaire dans l'aorte d'un lapin. Les flèches en rouge pointent sur des discontinuités dans la paroi et indiquent des artères connectées à l'aorte.	81
Figure 6-4: Évolution du signal à un angle donné en fonction du temps dans l'aorte d'un lapin. .	82
Figure 7-1: Schéma-bloc de l'électronique.	83
Figure 7-2: Photographie de l'intérieur du boîtier électronique.	84
Figure 7-3: Photographie de la base du cathéter et du montage opto-mécanique.	85
Figure 7-4: Capture d'écran de l'interface graphique.	86
Figure 7-5: Diagramme temporel de l'acquisition tri-modale. L'impulsion et l'acquisition photoacoustique n'étaient pas effectuées à chaque position angulaire, mais plutôt à une moyenne de 20 Hz.	88

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADC	Convertisseur analogique à numérique
CIMT	Épaisseur de l'intima-media de la carotide
CT	Tomodensitométrie
dB	Décibel
FLIM	Fluorescence résolue dans le temps
FPGA	Réseau de portes programmables <i>in situ</i>
ICG	Vert d'indocyanine
IRM (MRI)	Imagerie par résonance magnétique
IVE	Élastographie intravasculaire
IVFL (NIRF)	Imagerie de fluorescence intravasculaire proche infrarouge
IVPA	Imagerie photoacoustique intravasculaire
IVUS	Imagerie ultrasonore intravasculaire
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LDPE	Polyéthylène de basse densité
LSME	Estimateur Lagrangien de mouvement
Mbps	Mégabit par seconde
MMP	Métalloprotéinases matricielles
Nd:YAG	Grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme
SDRAM	Mémoire dynamique synchrone à accès aléatoire
OCT	Tomographie en cohérence optique
OPO	Oscillateur paramétrique optique
PMT	Tube photomultiplicateur
PVA	Alcool polyvinylique

RF	Radio fréquence
SNR	Rapport signal sur bruit
TEP	Tomographie par émission de positrons
VGA	Amplificateur à gain variable

LISTE DES ANNEXES

Annexe A - Conception du cathéter	119
Annexe B - Schémas électriques des circuits imprimés.....	128

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte et problématique

Les accidents cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés (Lloyd-Jones *et al.*, 2010). La majorité de ces accidents sont reliés à l'athérosclérose, qui consiste en la formation de plaque dans la paroi artérielle. Les méthodes traditionnelles pour évaluer les risques d'accidents cardiovasculaires, telles que la mesure du taux de cholestérol sanguin et de la pression artérielle, ont permis le développement de traitements efficaces, comme les statines pour la réduction de la cholestérolémie (Steven E. Nissen *et al.*, 2004). En conséquence, il devient de plus en plus difficile d'évaluer de nouveaux traitements, compte-tenu que ces solutions sont déjà efficaces. En effet, les nouveaux médicaments sont comparés aux médicaments actuels dans des études cliniques avec un large échantillonnage et une longue durée.

De nouvelles techniques permettant l'étude du développement de la plaque d'athérosclérose sont donc nécessaires pour permettre la recherche de nouveaux traitements visant à réduire les risques d'accidents cardiovasculaires. En ce sens, plusieurs modalités d'imageries ont été développées pour l'étude de la plaque (Tardif, Lesage, Harel, Romeo et Pressacco, 2011), par exemple, l'échographie de la carotide est utilisée pour mesurer la sténose et l'épaisseur de l'intima-media de la carotide (Hosomi *et al.*, 2001; North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators, 1991; Pignoli, Tremoli, Poli, Oreste et Paoletti, 1986). Les techniques d'imagerie basées sur les rayons X, telles que la tomodensitométrie et la coronarographie, permettent de quantifier la présence de calcium dans la plaque des artères coronaires et de mesurer leur degré de sténose (Ugolini *et al.*, 2009). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet la détection de plusieurs caractéristiques d'une plaque vulnérable, comme l'inflammation, une chape fibreuse mince et un cœur lipidique abondant (Cai *et al.*, 2002), avec une résolution d'environ 0,4 mm. L'imagerie ultrasonore intravasculaire (IVUS) par cathéter révèle quant à elle l'information structurelle de la plaque d'athérosclérose avec une très bonne résolution (0,1 mm). L'élastographie intravasculaire (IVE), une méthode basée sur l'analyse des images radiofréquences de l'IVUS, permet de quantifier les propriétés biomécaniques de la paroi vasculaire et a démontré un potentiel de détection des plaques vulnérables (C. L. de Korte, van

der Steen, *et al.*, 2000; Majdouline *et al.*, 2014). Plus récemment, le développement de la tomographie par cohérence optique intravasculaire (IOCT), une technique qui offre une excellente résolution (0,01 mm), a permis de visualiser l'amincissement de la chape fibreuse de la plaque vulnérable (Pinto et Waksman, 2006).

Les techniques d'imagerie présentées ci-haut sont généralement limitées à de l'information structurelle et permettent difficilement d'étudier le développement et la composition de la plaque à un niveau moléculaire et cellulaire. L'imagerie moléculaire devient donc nécessaire pour permettre une caractérisation plus poussée de la plaque, notamment grâce à une grande variété de sondes ciblées vers des processus pathologiques précis. Dans cet ordre d'idée, l'imagerie de fluorescence intravasculaire (NIRF) permet l'utilisation d'agents fluorescents combinés à des sondes. Il existe des sondes activables par des enzymes, telles les métalloprotéinases matricielles (MMP) (Deguchi *et al.*, 2006; Jaffer *et al.*, 2007; Seulki Lee *et al.*, 2008), qui permettent de détecter leur activité locale associée à la réponse inflammatoire. Il est également possible de suivre plusieurs sondes simultanément, lorsqu'elles émettent à des bandes spectrales distinctes (Dickinson, Bearman, Tille, Lansford et Fraser, 2001; Mahmood, Tung, Tang et Weissleder, 2002). L'imagerie photoacoustique intravasculaire (IVPA), quant à elle, offre une perspective intéressante grâce à l'utilisation d'agents de contraste ciblés ou activables à base de nanocoquilles d'or (Kim *et al.*, 2007). Elle permet d'obtenir une résolution axiale, contrairement à l'imagerie de fluorescence et il est aussi possible de suivre plusieurs sondes photoacoustiques opérant à des bandes spectrales distinctes (Galanzha, Shashkov, Tuchin et Zharov, 2008). De son côté, la tomographie par émission de positrons (TEP) offre une sensibilité exemplaire, malgré une faible résolution (4 mm), et permet de détecter des changements dans l'activité métabolique de la plaque (N. Tahara *et al.*, 2006).

La combinaison de l'imagerie anatomique et moléculaire est une option très intéressante pour l'étude du développement de la plaque d'athérosclérose. Par exemple, la TEP propose une excellente sensibilité, mais une faible résolution spatiale, qui peut être surmontée par la combinaison avec la tomodensitométrie (Di Carli, 2004). L'IVUS est considérée comme l'étalon-or pour les mesures de taille et de composition de la plaque. Cependant, cette technique d'imagerie est principalement limitée aux changements morphologiques. L'ajout de l'IVPA et de la NIRF, avec des sondes adaptées, pourrait permettre la détection de changements cellulaires et moléculaires dans la plaque, imperceptibles en IVUS.

La solution proposée dans ce projet est l'imagerie intravasculaire par cathéter multimodal. L'IVUS, fournissant les mesures anatomiques à haute résolution, est combinée aux imageries intravasculaires photoacoustique et par fluorescence, ouvrant la porte à l'utilisation d'une panoplie de sondes activables et ciblées. Le cathéter multimodal fournit l'information des trois types d'imagerie simultanément et en temps réel. Des algorithmes sont ensuite appliqués en post-traitement aux données radiofréquences ultrasonores, afin d'obtenir des images en IVE.

Les travaux présentés ici visent à confirmer le potentiel des techniques d'imagerie moléculaire pour l'étude des plaques d'athérosclérose. L'hypothèse de travail de ce projet est que la combinaison de marqueurs moléculaires et morphologiques, tels que définis par l'imagerie photoacoustique, fluorescente et ultrasonore combinées, est plus avantageuse que l'utilisation d'une seule modalité d'imagerie. Le but de cette thèse est de développer et valider un système d'imagerie par cathéter multimodal à haute résolution pour la détection et la caractérisation de la plaque d'athérosclérose *in vivo*.

1.2 Brève revue de la littérature

1.2.1 Athérosclérose

L'athérosclérose est caractérisée par la formation de plaque à l'intérieur de la paroi artérielle, causant son épaissement. Le développement de cette plaque d'athérome débute chez le fœtus (Napoli *et al.*, 1997, 1999; Palinski et Napoli, 2002) et se situe principalement dans les artères de gros et moyen calibre. La première étape est l'accumulation de lipoprotéines de basse densité (LDL) dans la paroi artérielle, lorsqu'elles sont en excès. Les LDL sont fabriquées par le foie et les intestins et sont des transporteurs de cholestérol. Ces LDL s'oxydent, causant l'inflammation de l'intima. Ceci conduit à la sécrétion de chimiokines et de molécules d'adhésion (VCAM-1 et ICAM-1) qui engendrent respectivement le recrutement et l'adhérence des monocytes à l'endothélium. Ces monocytes pénètrent l'espace sous-endothélial, pour ensuite se transformer en cellules spumeuses (macrophages gorgés de LDL). De plus, la présence de macrophages dans l'intima augmente l'inflammation et provoque un phénomène d'auto-amplification de la plaque (Moore et Tabas, 2011). Les leucocytes sont des cellules du système immunitaire qui pénètrent également la paroi artérielle, lorsqu'il y a inflammation de l'intima. La combinaison des macrophages et des leucocytes augmentent la production de cytokines pro-inflammatoires, qui est

à la source de l'expression des MMP-2 et MMP-9 dégradant la matrice extracellulaire (Tedgui et Mallat, 2006).

L'étape intermédiaire, précédant la présence d'athéromes, est caractérisée par une faible accumulation de lipides extracellulaires. Les lésions plus avancées comportent un amas de lipides formant le cœur lipidique de l'athérome, qui est isolé du lumen par une partie fibreuse, composée de cellules musculaires lisses, d'élastine, de collagène et de protéoglycanes. La plaque peut également être calcifiée, lorsqu'il y a dépôt de minéraux. La plaque fibreuse est caractérisée par une régression du cœur lipidique et par une abondance de tissus fibreux.

Les plaques vulnérables, aussi appelées les plaques à risque ou instables, sont principalement caractérisées par l'amincissement de la chape fibreuse et par la présence d'un cœur nécrotique (C. L de Korte *et al.*, 2011; Morteza Naghavi et Falk, 2010). Elles sont plus susceptibles d'être la source de complications, comme une thrombose, une hémorragie dans la plaque ou une rupture. La chape fibreuse est une couche qui sépare le cœur lipidique de l'intima du vaisseau. La détérioration de celle-ci est causée par la dégradation de la matrice extracellulaire et la réduction des cellules musculaires lisses qui la compose. Pour ce qui est du cœur nécrotique, il est causé par l'apoptose des macrophages et une phagocytose défectueuse de ceux-ci dans les lésions avancées. Il y a donc mort des macrophages et problème d'élimination des débris.

La détection et caractérisation *in vivo* de ces plaques vulnérables est un élément important de l'étude pré-clinique de la plaque d'athérosclérose. De plus, au niveau clinique, la détection de plaques à un stade d'évolution plus précoce, alors que le dépôt lipidique est trop faible pour être visible en imagerie conventionnelle, telle l'imagerie ultrasonore et l'IRM, permettrait une meilleure caractérisation du développement de la plaque. L'utilisation de sondes moléculaires en imagerie a le potentiel de détecter ces plaques, en ciblant des cellules et molécules spécifiques qui y sont présentes.

1.2.2 Sondes moléculaires ciblant l'athérosclérose

Les sondes moléculaires peuvent cibler des récepteurs spécifiques associés à une activité cellulaire ou l'expression d'enzymes et de marqueurs présents dans le milieu extracellulaire. Elles peuvent être divisées en deux catégories, soit les sondes ciblées et les sondes activables (Bulte et Arifin, 2010). Les sondes ciblées se lient à des cellules ou des molécules d'intérêts, ce qui permet

de localiser ces dernières par un processus de visualisation. Les sondes activables deviennent détectables seulement en présence de certaines particules, comme une enzyme, un ion ou une protéine.

En photoacoustique, l'utilisation de nanoparticules d'or comme agents de contraste est très prometteuse, en raison de l'énorme absorption et diffusion causées par la résonance plasmonique de ces nanoparticules (Garcia, 2011; Khaing Oo, Du et Wang, 2010). Il est également possible de fabriquer des sondes activables en joignant deux nanocoquilles d'or par un lien peptidique (Chau *et al.*, 2010; Jain et El-Sayed, 2007). Un décalage de la longueur d'onde du pic d'absorption se produit lorsque le lien est brisé, par exemple en présence de MMP, permettant une détection très spécifique.

En ce qui a trait à l'imagerie de fluorescence, plusieurs sondes moléculaires sont utilisées pour l'étude de la plaque d'athérosclérose. L'une d'entre elles est le vert d'indocyanine (ICG) qui cible principalement les macrophages gorgés de lipides (Vinegoni *et al.*, 2011). D'autres chercheurs ont développé des sondes permettant de suivre les cathepsines B (Chen *et al.*, 2002), les cathepsines K (Jaffer *et al.*, 2007), les molécules d'adhésions VCAM-1 (Nahrendorf *et al.*, 2006) ou les MMPs (Seulki Lee *et al.*, 2008), toutes impliquées dans le développement de l'athérosclérose. Il existe également des sondes activables, fabriquées en combinant une molécule fluorescente avec une particule qui désactive cette fluorescence. Le lien entre ces deux entités peut ensuite être brisé par la présence de la molécule que l'on souhaite imager, ce qui active la fluorescence. Ce phénomène se nomme le *quenching*. Par exemple, un agent de contraste fluorescent peut être combiné avec des nanoparticules d'or pour bloquer l'émission de fluorescence, jusqu'à ce qu'une certaine enzyme, comme les MMPs, libère les fluorophores (Seulki Lee *et al.*, 2008).

La plupart des études d'imagerie avec des sondes moléculaires photoacoustiques et fluorescentes sont effectuées sur des tissus *ex vivo* ou sur des petits animaux, en raison de l'absorption élevée de l'hémoglobine. Une approche intravasculaire est préférable pour l'imagerie moléculaire *in vivo* d'animaux plus gros, comme le lapin ou le porc, ou de l'humain. De plus, la faible disponibilité de marqueurs cliniquement approuvés limite grandement la translation chez l'humain.

1.2.3 Détection de la plaque d'athérosclérose par cathéter

Des cathéters d'imagerie de fluorescence ont été développés pour imager la plaque d'athérosclérose chez le lapin, au niveau moléculaire (Calfon, Vinegoni, Ntziachristos et Jaffer, 2010; Jaffer *et al.*, 2011; Razansky *et al.*, 2010; Vinegoni *et al.*, 2011). Dans certains cas, les images de fluorescence sont alignées avec les images IVUS prises avec un cathéter différent, mais ceci complique les manipulations et le traitement des données. Des cathéters combinant la fluorescence avec l'IVUS ont également été conçus (Bec *et al.*, 2011, 2014; Dixon et Hossack, 2013; Stephens, Park, Sun, Papaioannou et Marcu, 2009). Cependant, ces cathéters sont peu adaptés à l'imagerie *in vivo*, puisqu'ils sont relativement gros et le temps d'acquisition est élevé.

Des cathéters combinant l'imagerie photoacoustique et ultrasonore ont été fabriqués avec une illumination externe (S. Sethuraman, Mallidi, *et al.*, 2007; S. Sethuraman, Aglyamov, Amirian, Smalling et Emelianov, 2005, 2006, 2007; Shriram Sethuraman, Amirian, Litovsky, Smalling et Emelianov, 2007, 2008; Wang *et al.*, 2009; Wang, Su, Amirian, *et al.*, 2010; Wang, Su, Karpouk, *et al.*, 2010; J. Zhang et Xing, 2011). La source d'illumination pour l'excitation photoacoustique n'est pas intégrée dans le cathéter, ce qui empêche toute étude *in vivo*. Des travaux plus récents ont intégré cette illumination à même le cathéter et des résultats ont été obtenus sur fantômes (Wang *et al.*, 2009, 2012a; Wang, Su, Karpouk, *et al.*, 2010; Yeager *et al.*, 2012) et tissus *ex vivo* (Jansen, van der Steen, *et al.*, 2014; Jansen, Wu, van der Steen et van Soest, 2014; Jansen, van der Steen, van Beusekom, Oosterhuis et van Soest, 2011). Une validation *in vivo* a aussi été démontrée dans l'aorte abdominale d'un lapin, préalablement ligaturée (Wang *et al.*, 2012b).

1.3 Objectifs et hypothèses

L'objectif général du projet est de développer et valider un cathéter d'imagerie multimodal visant l'étude de la plaque d'athérosclérose. À cette fin, un système complet d'imagerie ultrasonore, photoacoustique et par fluorescence doit être conçu et testé.

De manière plus détaillée, le projet peut être divisé en trois objectifs spécifiques :

Objectif 1 : Développer un système d'imagerie multimodal par cathéter. Le système doit permettre l'imagerie ultrasonore intravasculaire (IVUS), l'imagerie photoacoustique intravasculaire (IVPA), l'imagerie de fluorescence intravasculaire (NIRF) et l'élastographie

intravasculaire (IVE). Le cathéter conçu doit être suffisamment petit pour être inséré dans l'aorte abdominale d'un lapin anesthésié. Le développement du système inclut la conception des circuits électroniques, la fabrication des cathéters, le montage optique, l'assemblage mécanique et le logiciel d'acquisition et d'analyse avec une interface utilisateur conviviale.

Hypothèse 1 : L'intégration des trois modalités d'imagerie à l'intérieur d'un cathéter suffisamment petit pour être utilisé chez le lapin est possible, tout en obtenant une sensibilité suffisante à la détection des biomarqueurs.

Publications reliées :

Abran, M., Cloutier, G., Cardinal, M.-H. R., Chayer, B., Tardif, J.-C. et Lesage, F. (2014). Development of a Photoacoustic, Ultrasound and Fluorescence Imaging Catheter for the Study of Atherosclerotic Plaque. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 8(5), 696-703. doi:10.1109/TBCAS.2014.2360560

Abran, M., Matteau-Pelletier, C., Zerouali-Boukhal, K., Tardif, J.-C. et Lesage, F. (2012). Combined acoustic-photoacoustic and fluorescence imaging catheter for the detection of the atherosclerotic plaque (vol. 7899, p. 78992N-78992N-8). Communication présentée au Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series, San Francisco (USA). doi:10.1117/12.873928

Abran, M., Ono, Y., Jen, C. K., Kobayashi, M. et Lesage, F. (2008). Multi-modal acoustic-photo-acoustic imaging for small animal imaging (p. p.1-3 (CD Proceedings)). Communication présentée au 31st Canadian Medical and Biological Engineering Conference, Montreal (Canada): National Research Council Canada, Industrial Materials Institute.

Objectif 2 : Valider le système conçu sur des fantômes et des tissus *ex vivo*. Il est d'abord nécessaire de concevoir des fantômes ayant des propriétés optiques et acoustiques similaires aux tissus biologiques. Des aortes de lapin excisées sont aussi utilisées pour cette validation. Puis, évaluer les performances du système et sa capacité à imager des contrastes acoustiques, photoacoustiques et fluorescents simultanément.

Hypothèse 2 : La combinaison de marqueurs moléculaires et morphologiques, tels que définis par l'imagerie photoacoustique, fluorescente et ultrasonore combinées, devrait être plus avantageuse que l'utilisation d'une seule modalité d'imagerie.

Publication reliée :

Abran, M., Cloutier, G., Roy-Cardinal, M.-H., Chayer, B., Tardif, J.-C. et Lesage, F. (2014). Development of a Photoacoustic, Ultrasound and Fluorescence Imaging Catheter for the Study of Atherosclerotic Plaque. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 8(5), 696-703. doi:10.1109/TBCAS.2014.2360560

Objectif 3 : Valider le système conçu en imageant la plaque d'athérosclérose de l'aorte abdominale chez des lapins ayant reçu une diète riche en cholestérol.

Hypothèse 3 : La détection de sondes moléculaires fluorescentes et photoacoustiques ciblées ou activables permet de détecter et caractériser le développement de la plaque.

Publications reliées :

Article soumis à la revue *Biomedical Optics Express* le 4 février 2015 :

Abran, M. Stähli, B. E., Merlet, N., Mihalache-Avram, T., Mecteau, M., Rhéaume, E., Busseuil, D., Tardif, J.-C. et Lesage, F. (2015). Atherosclerotic Plaque Detection Using a Bimodal Intravascular Ultrasound (IVUS) and Near-Infrared Fluorescence (NIRF) Catheter in Rabbits.

Lettre soumise à la revue *Optics Letters* le 10 mars 2015 :

Abran, M. Castonguay, A., Stähli, B. E., Merlet, N., Mihalache-Avram, T., Mecteau, M., Rhéaume, E., Busseuil, D., Tardif, J.-C. et Lesage, F. (2015). Validating Intravascular Imaging with Serial Optical Coherence Tomography and Confocal Fluorescence Microscopy.

1.4 Présentation de la thèse et cohérence des articles

Cette thèse a mené à la soumission de trois articles à des revues avec comité de lecture qui sont présentés dans les chapitres suivants. Ils sont suivis d'un chapitre contenant des résultats complémentaires qui n'ont pas été présentés dans les articles, mais qui sont liés aux objectifs du projet de recherche.

Le premier objectif du projet était de concevoir le système d'imagerie en entier. Cette partie a débuté durant mes études à la maîtrise, avant mon passage direct au doctorat. Plus de la moitié de mon temps au doctorat a été consacré à cet objectif de taille. Le deuxième objectif est

directement lié au premier, puisqu'il s'agit de la validation du système conçu sur des fantômes et tissus *ex vivo*. Le premier article a été soumis à un journal axé sur l'ingénierie de systèmes biomédicaux : IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems. Le système conçu y est décrit en profondeur et tous les aspects de l'objectif 1 sont abordés. Cet article contient aussi une validation sur des fantômes, en réponse à la première partie de l'objectif 2. La seconde partie de cet objectif, traitant de résultats sur des tissus *ex vivo*, est traitée dans le chapitre des résultats complémentaires : des aortes abdominales de lapins ayant reçu une diète riche en cholestérol ont été excisées et imagées avec le cathéter.

Le troisième objectif concerne la validation du système *in vivo*, chez le lapin. Des essais préliminaires ont été effectués dès le début du projet de doctorat. Les deuxième et troisième articles présentent les résultats de validation *in vivo* en réponse à ce dernier objectif. Les résultats obtenus avec le cathéter sont comparés avec d'autres systèmes d'imagerie. Dans le deuxième article, les images en NIRF obtenues avec le cathéter sur des aortes de lapins sont comparées avec un système d'imagerie de fluorescence *ex vivo*. Pour le troisième article, des aortes excisées de lapins ont été imagées avec un système d'imagerie volumétrique à haute résolution, combinant la tomographie par cohérence optique (OCT) et l'imagerie confocale. L'OCT est une technique d'imagerie anatomique, tout comme l'IVUS, et les acquisitions de ces deux modalités peuvent être comparées l'une à l'autre. La résolution spatiale supérieure de l'OCT permet une meilleure étude du contenu des images IVUS. L'imagerie confocale permet de localiser la présence d'ICG dans la paroi artérielle avec une bonne résolution et ainsi valider les résultats acquis en NIRF.

CHAPITRE 2 REVUE DES MODALITÉS D'IMAGERIE

Dans ce chapitre, les modalités d'imagerie employées dans le système par cathéter conçu sont décrites en profondeur. D'autres techniques d'imagerie de l'athérosclérose sont également présentées.

2.1 Imagerie ultrasonore

2.1.1 Physique des ultrasons

Un transducteur à ultrason peut émettre des ondes de pression ultrasonore, lorsqu'une impulsion électrique y est appliquée. À l'inverse, lorsqu'une onde ultrasonore atteint le transducteur, une impulsion électrique est générée. L'onde de pression p est souvent considérée comme une onde plane qui se déplace dans une seule direction. Elle satisfait donc à l'équation suivante :

$$\frac{\partial^2 p}{\partial r^2} = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} \quad (1)$$

Où r est la distance dans la direction du déplacement et c est la vitesse de déplacement de l'onde. Une des solutions à cette équation est une fonction sinusoïdale :

$$p(z, t) = \cos(k(r - ct)) \quad (2)$$

Où $k = 2\pi/\lambda$ et λ représente la longueur d'onde.

Dans ce projet, un transducteur à ultrason est installé à l'extrémité du cathéter et est utilisé pour émettre et recevoir des ondes de pression à une fréquence centrale de 45 MHz.

Lorsqu'une onde de pression ultrasonore rencontre une interface entre deux milieux d'impédances acoustiques différentes, Z_1 et Z_2 , une partie de l'onde est réfléchi. Pour une incidence perpendiculaire à l'interface, les coefficients de réflexion et de transmission sont :

$$R = \frac{p_r}{p_i} = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \quad (3)$$

$$T = \frac{p_t}{p_i} = \frac{2Z_2}{Z_2 + Z_1} \quad (4)$$

Où p_i , p_r et p_t représentent les ondes de pression incidente, réfléchiée et transmise, respectivement. L'unité de l'impédance acoustique Z est le Rayleigh (Rayl), dont les valeurs typiques sont de l'ordre de 10^6 Rayl. Ces ondes doivent aussi tenir compte de la relation de continuité suivante :

$$p_i = p_r + p_t \quad (5)$$

La vitesse de propagation des ondes ultrasonores dans le sang et les tissus mous, comme les vaisseaux sanguins, est d'environ 1540 m/sec (Goss, Johnston et Dunn, 1980; Shung et Reid, 1978). Sachant cela, il est possible de localiser la distance entre une interface et le transducteur selon le délai entre la génération d'une impulsion ultrasonore et la réception de l'écho.

L'onde de pression ultrasonore s'atténue en fonction de la distance de propagation et du tissu traversé. En considérant A_0 comme l'amplitude de l'onde à la sortie du transducteur, l'amplitude à une distance donnée est définie par :

$$A(z) = A_0 e^{-\mu_a z} \quad (6)$$

Où μ_a est le facteur d'atténuation de l'amplitude. L'unité de mesure de μ_a est le Nepers/cm, mais il est plus commun d'employer le coefficient d'atténuation qui est en dB/cm et qui est défini comme suit :

$$\alpha = 20(\log_{10} e)\mu_a \approx 8,686 \mu_a \quad (7)$$

L'atténuation acoustique est principalement de l'absorption, soit la conversion de l'énergie acoustique en énergie thermique. Cette atténuation dépend grandement du milieu, mais, dans les tissus mous, elle est souvent approximée à 0,6 dB/cm/MHz, alors que dans le sang, elle se situe autour de 0,2 dB/cm/MHz (Wells, 1999).

Un procédé de compensation de gain de l'amplificateur est généralement intégré aux systèmes ultrasonores, incluant celui conçu dans ce projet, afin de compenser pour l'atténuation des échos provenant de tissus plus éloignés. Ainsi, le gain de l'amplificateur ultrasonore est augmenté durant la réception d'un écho. Le gain est donc supérieur pour un écho provenant d'un tissu plus

éloigné. Les paramètres de cette compensation sont ajustables par l'utilisateur, en fonction du tissu qui est imagé. La compensation peut également être modifiée en fonction de la distance. Dans ce projet, la compensation pouvait être fixée à $\alpha = 9$ dB/cm pour les échos provenant d'une distance inférieure à 1,5 mm, qui était généralement du sang et $\alpha = 27$ dB/cm pour les échos plus éloignés.

La résolution spatiale dépend principalement de la fréquence du transducteur utilisé, mais aussi de sa géométrie et des paramètres de l'acquisition. Cette résolution est déterminée en mesurant la largeur à mi-hauteur du signal obtenu en imageant une source ponctuelle. Ces mesures peuvent être effectuées en imageant un fil très mince (10 μ m de diamètre), installé dans un bassin d'eau (Elliott et Thrush, 1996).

2.1.2 Formation d'image

Les signaux radiofréquences acquis par le transducteur doivent être traités avant d'être affichés à l'écran. D'abord, un filtre passe-bande, avec une fréquence centrale et une largeur de bande dépendante de l'impulsion ultrasonore, est appliqué aux données afin de réduire le bruit. Un algorithme permet ensuite d'extraire l'enveloppe des données à haute fréquence, pour en simplifier l'affichage. Une compression logarithmique est aussi effectuée afin de rehausser les échos plus faibles dans l'image. Un moyennage de plusieurs séries de signaux est parfois effectué, afin d'augmenter le rapport signal à bruit, mais en causant une diminution du taux de rafraîchissement et en créant potentiellement un flou dans l'image. Finalement, l'utilisateur peut contrôler le gain logiciel et la plage dynamique pour optimiser l'affichage des tissus imagés.

Une sonde ultrasonore contient généralement une matrice de transducteurs, ou parfois un seul transducteur en mouvement. Les signaux obtenus par la sonde sont combinés et une reconstruction est effectuée afin d'obtenir une image 2D en ton de gris. Plusieurs techniques sont possibles pour obtenir des images en 3D (Fenster, Downey et Cardinal, 2001). Certains systèmes utilisent une matrice 2D de transducteurs, afin de directement imagier un volume. D'autres procèdent plutôt avec une méthode motorisée pour déplacer une série de transducteurs positionnés en ligne.

En IVUS, l'obtention des coupes transversales en 2D se fait soit par l'utilisation d'une matrice de transducteurs tout autour du cathéter ou, plus souvent, par un seul transducteur en rotation. Dans les deux cas, il est nécessaire d'effectuer une interpolation des signaux acquis en coordonnées

polaires, vers un système de coordonnées cartésiennes. La figure qui suit montre un écho ultrasonore obtenu à un angle donné et la reconstruction d'une image en utilisant 256 échos ultrasonores. L'imagerie d'une artère en 3D est possible grâce à l'utilisation d'un moteur de retrait qui déplace le cathéter longitudinalement à une vitesse constante, afin d'acquérir des coupes transversales sur toute la longueur de l'artère.

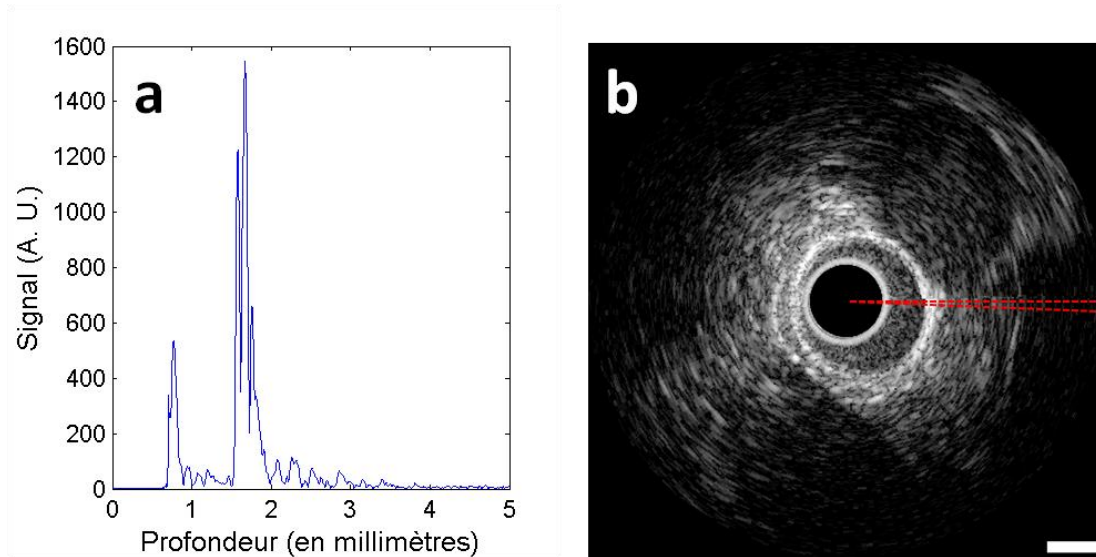


Figure 2-1: Interpolation des échos ultrasonores IVUS acquis en coordonnées polaires vers un système de coordonnées cartésiennes. (a) Écho ultrasonore filtré obtenu par le transducteur à un angle donné. (b) Image IVUS identifiant en rouge la localisation de l'écho ultrasonore de (a).

2.1.3 Applications

L'imagerie ultrasonore conventionnelle utilise généralement une série de transducteurs positionnés en ligne afin de former une image en 2D. Cette technique est largement utilisée pour la mesure de l'épaisseur de l'intima-média de la carotide, dans le but de prédire les accidents cardiovasculaires (Bots, Hoes, Koudstaal, Hofman et Grobbee, 1997; Lorenz, Markus, Bots, Rosvall et Sitzer, 2007; Spence, 2006). La figure suivante présente une image ultrasonore d'une carotide avec présence de plaque, où cette mesure d'épaisseur est effectuée.

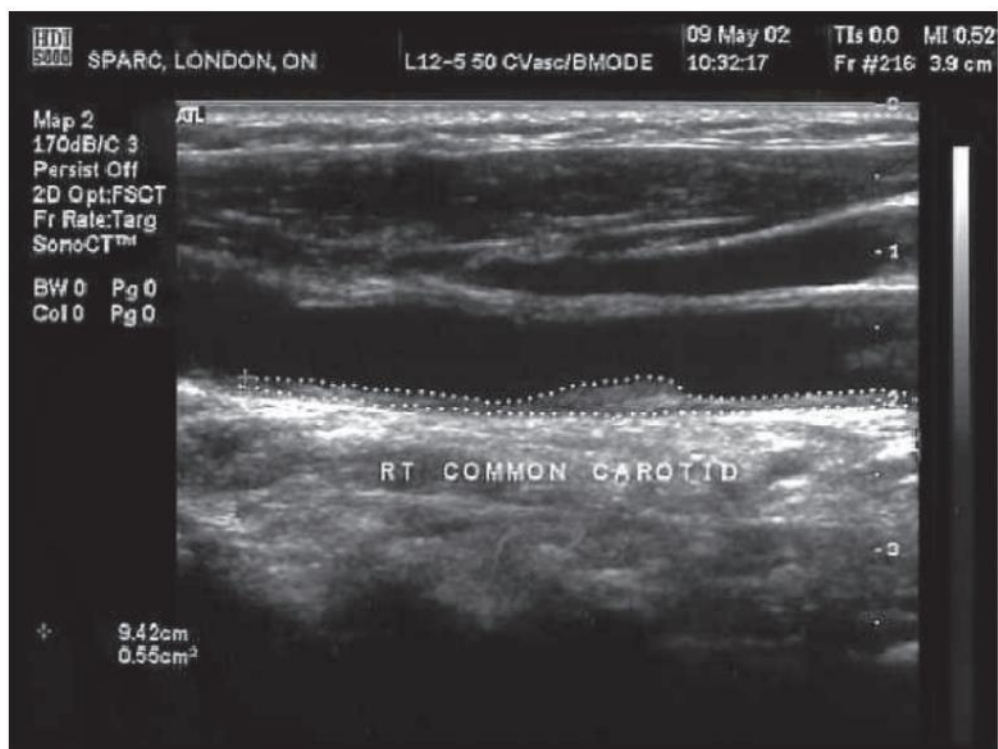


Figure 2-2: Mesure de la plaque dans la carotide en imagerie ultrasonore. L'aire de la plaque est entourée d'une ligne pointillée. Tiré de Spence, 2006.

En pratique, une plaque d'athérosclérose calcifiée a une impédance acoustique beaucoup plus élevée qu'une plaque lipidique, générant ainsi un écho plus fort (Hiro *et al.*, 1997; König et Klauss, 2007). Cette affirmation a mené au fil des ans, au développement de techniques d'histologie virtuelle, tel qu'illustré dans la figure suivante. La composition spectrale et l'intensité des données radiofréquences ultrasonores sont analysées afin de classifier automatiquement les tissus d'une plaque d'athérosclérose.

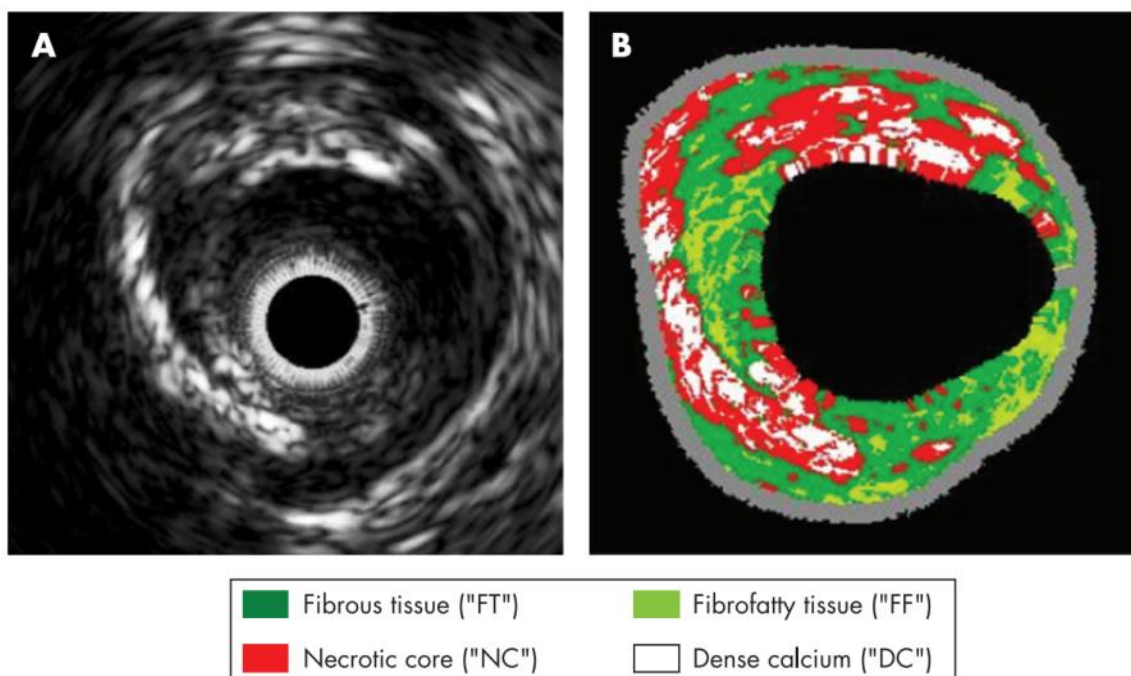


Figure 2-3: Classification automatique de la plaque d'athérosclérose. (A) Image IVUS en ton de gris montrant une plaque excentrique. (B) Image en histologie virtuelle identifiant les composantes de la plaque. Tiré de König et Klaus, 2007.

2.2 Élastographie

L'élastographie ultrasonore est une modalité d'imagerie qui mesure les propriétés élastiques des tissus. Elle tire ses origines de la palpation manuelle, qui est limitée aux tissus accessibles, à l'expérience du praticien et à des mesures qualitatives. En fonction de la rigidité du tissu, il est possible de diagnostiquer certaines maladies et leur évolution. En effet, les tumeurs cancéreuses sont généralement plus rigides que les tissus sains (Ophir, Céspedes, Ponnekanti, Yazdi et Li, 1991) et la fibrose du foie augmente sa rigidité (Ziol *et al.*, 2005). Pour l'athérosclérose, les plaques calcifiées sont plus rigides que les plaques lipidiques (Hiro *et al.*, 1997; König et Klaus, 2007). En élastographie, les images sont comparées avant et après l'induction d'une déformation. La déformation peut provenir d'une vibration mécanique à basse fréquence (Catheline, Wu et Fink, 1999; Lerner, Huang et Parker, 1990) ou d'un phénomène physiologique naturel.

L'élastographie ultrasonore a été utilisée pour la détection du cancer de la prostate (Cochlin, Ganatra et Griffiths, 2002), du cancer du sein (Zhi *et al.*, 2010) et du cancer de la thyroïde (Mansor *et al.*, 2012). La figure qui suit illustre un exemple où l'élastographie ultrasonore a

permis de différencier des tumeurs malignes de tumeurs bénignes, lors d'une étude sur le cancer du sein.

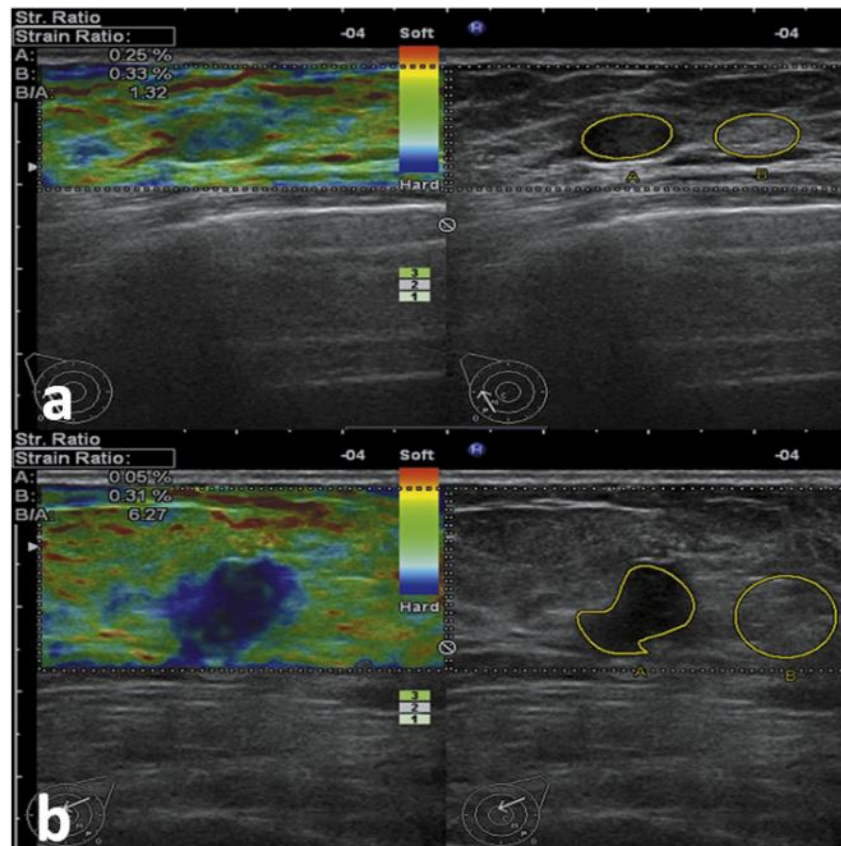


Figure 2-4: Élastographie ultrasonore de tumeurs du sein. (a) Tumeur bénigne (adénofibrome).

(b) Tumeur maligne (carcinome canalaire *in situ*). Adapté de Zhi *et al.*, 2010.(Spence, 2006)

L'IVE consiste à analyser les données radiofréquences acquises en IVUS, afin d'étudier les maladies cardiovasculaires et la plaque d'athérosclérose (Chris L. de Korte, van der Steen, Céspedes et Pasterkamp, 1998; C. L. de Korte, Pasterkamp, van der Steen, Woutman et Bom, 2000). À chaque battement cardiaque, la paroi artérielle se déforme et une série d'images est acquise et analysée. Différents algorithmes ont été développés afin d'estimer les déformations de la paroi artérielle liées à la pulsatilité cardiaque (Majdouline *et al.*, 2014; Roch L. Maurice, Ohayon, Finet et Cloutier, 2004). En utilisant le modèle de l'estimateur Lagrangien de mouvement (LSME), deux types d'ondes sont estimés, soit les ondes de déformation, qui sont le déplacement parallèle à l'onde de propagation et les ondes de cisaillement, qui sont les mouvements perpendiculaires à l'onde de propagation. La distribution spatiale de ces ondes est affichée à plusieurs moments dans le cycle cardiaque, afin d'illustrer une cartographie des

propriétés mécaniques de la paroi artérielle, que l'on nomme élastogramme. L'IVE a également le potentiel de prédire la vulnérabilité des plaques (Majdouline *et al.*, 2014; Schaar *et al.*, 2003).

2.3 Imagerie photoacoustique

L'effet photoacoustique est la formation d'ondes ultrasonores à la suite de l'absorption lumineuse d'un tissu. Cette absorption provoque une hausse localisée de température, ce qui génère une augmentation rapide de volume. La fluence lumineuse peut être modélisée par l'approximation de diffusion, pour un milieu homogène, comme suit :

$$F(r) = \frac{F_0}{4\pi D_0} e^{-\mu_{eff}r}, \text{ où } D_0 = \frac{1}{3(\mu_a + \mu_s')} \text{ et } \mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s')} \quad (8)$$

Où r est la distance de la source, F_0 est la fluence initiale, généralement exprimée en mJ / cm^2 , μ_a est le coefficient d'absorption, μ_s' est le coefficient de dispersion réduit.

La génération d'une onde photoacoustique est décrite par l'équation suivante :

$$\left(\frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} - \nabla^2 \right) p(r, t) = \frac{\beta}{C_p} \frac{\partial H(r, t)}{\partial t} \quad (9)$$

Où c est la vitesse de l'onde de pression acoustique $p(r, t)$ résultante, ∇^2 est le Laplacien tridimensionnel, β est le coefficient d'expansion thermique, C_p est la capacité thermique et $H(r, t)$ est la distribution de chaleur spatiale et temporelle causée par l'absorption lumineuse. Le terme de gauche représente la composante acoustique, alors que le terme de droite est lié au changement de température.

L'équation précédente montre que l'onde de pression acoustique résultante est proportionnelle à la dérivée de la distribution de chaleur $H(r, t)$. Donc, afin de produire une onde acoustique détectable, une variation rapide de la chaleur doit être induite. C'est pourquoi, on utilise un laser générant des impulsions lumineuses puissantes et très courtes. Ainsi, l'effet thermique provoque une expansion, puis une contraction très rapide, qui se traduit par la génération d'ondes de pression ultrasonores, détectable avec le transducteur à ultrasons.

Un échantillon ayant un contraste photoacoustique élevé est caractérisé par un coefficient d'absorption optique élevé. En imagerie médicale, l'hémoglobine est un des absorbeurs principaux dans les tissus et peut-être utilisé pour localiser les vaisseaux sanguins (Hoelen, de Mul, Pongers et Dekker, 1998). À l'aide de la technique photoacoustique, des images à haute résolution et en 3D de la vascularisation en surface (5 mm de profondeur) peuvent être obtenues (L. Li *et al.*, 2014; E. Z. Zhang, Laufer, Pedley et Beard, 2009), tel que présenté à la figure suivante.

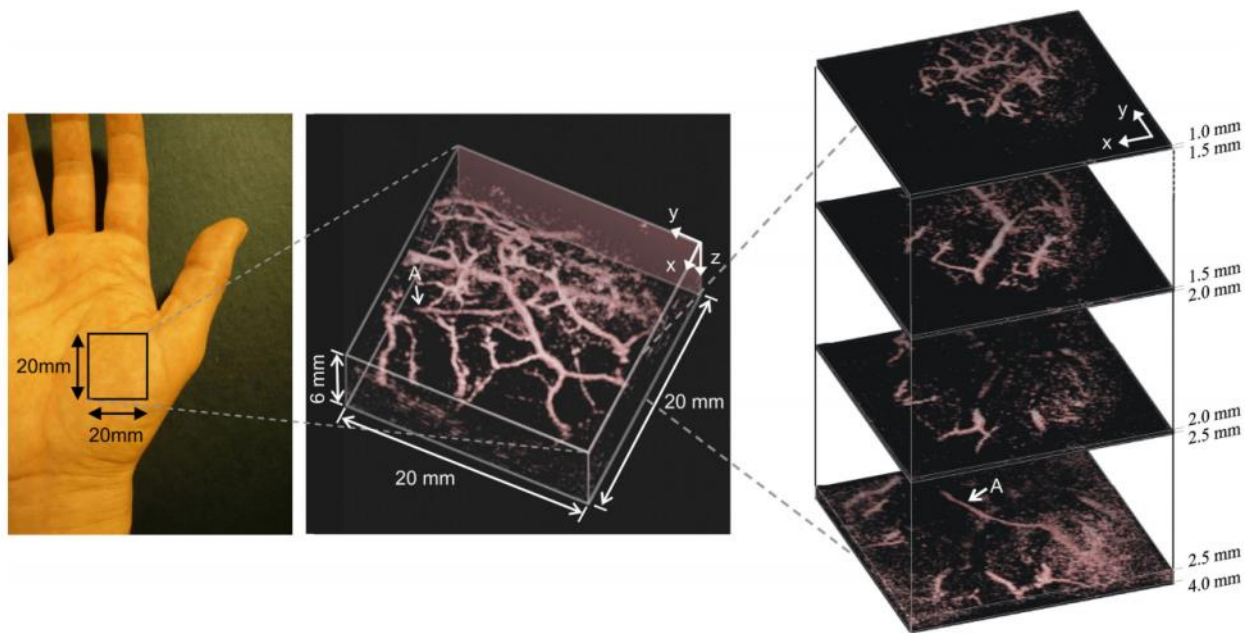


Figure 2-5: Image photoacoustique 3D *in vivo* de la vascularisation d'une paume de main. Tiré de E. Z. Zhang, Laufer, Pedley et Beard, 2009.

L'imagerie photoacoustique intrinsèque, c'est-à-dire sans l'utilisation d'agents de contraste exogènes, est utile dans plusieurs applications. Elle a été utilisée pour évaluer la profondeur et la gravité d'une brûlure de la peau (H. F. Zhang, Maslov, Stoica et Wang, 2006), en mesurant la concentration de sang qui s'accumule en périphérie de la brûlure. Aussi, le taux de saturation d'oxygène dans le sang a été mesuré en utilisant un laser avec une longueur d'onde variable afin de distinguer l'oxyhémoglobine de la désoxyhémoglobine (Laufer, Delpy, Elwell et Beard, 2007). Une étude a démontré que la photoacoustique permettait de détecter un mélanome sous-cutané chez la souris, en analysant l'angiogenèse autour de la tumeur (H. F. Zhang *et al.*, 2006).

Des agents de contraste exogènes peuvent aussi être injectés, afin de cibler des molécules d'intérêt. Ces sondes moléculaires sont typiquement à base de composés absorbant la lumière fortement, par exemple les nanoparticules d'or (Wang *et al.*, 2009; Q. Zhang *et al.*, 2009). La sonde peut être conjuguée, par exemple, avec un anticorps VCAM-1 qui permettra de cibler les molécules VCAM-1 présentes au début de l'évolution de la plaque d'athérosclérose (Rouleau *et al.*, 2013). L'utilisation de nanoparticules d'or de géométries différentes permet d'exploiter plusieurs bandes d'absorption spectrale et de détecter plusieurs contrastes simultanément (Ng, Berti, Lesage et Kakkar, 2012). Des sondes moléculaires basées sur des nanotubes de carbone à paroi simple ont également été conçues (de la Zerda *et al.*, 2012). Ces nanotubes de carbone ont été liés à un marqueur (QSY₂₁) afin d'obtenir une absorption optique élevée, puis conjugués à des peptides cycliques comportant une séquence Arg-Gly-Asp, dans le but de cibler l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui est surexprimée dans l'angiogenèse tumorale. La figure suivante illustre les capacités de cette sonde sur deux modèles de souris porteuses de tumeurs.

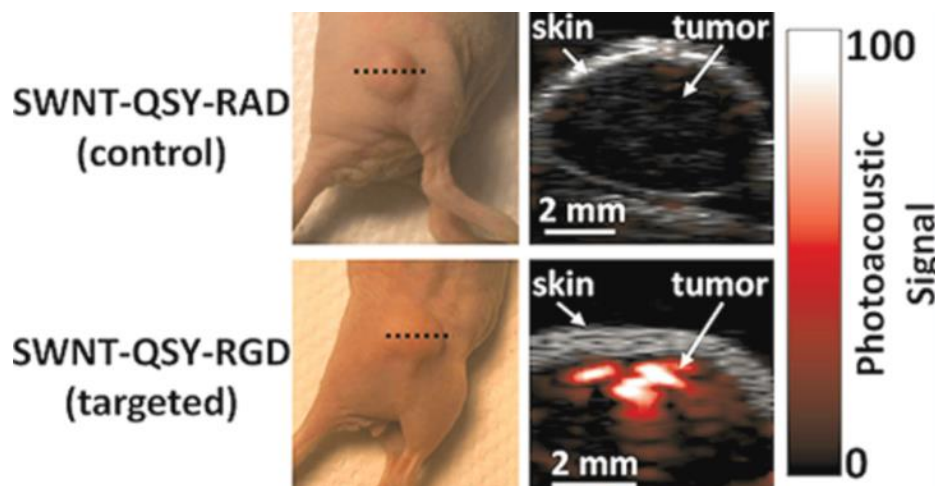


Figure 2-6: Imagerie photoacoustique de tumeurs chez deux souris avec une sonde à base de nanotubes de carbone. La sonde a été validée avec et sans l'agent ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, surexprimée dans l'angiogenèse tumorale. Tiré de de la Zerda *et al.*, 2012.

En IVPA, le sang devient un obstacle, puisqu'il se trouve entre le cathéter et la paroi artérielle, que l'on souhaite imager. Il est donc primordial de travailler avec des longueurs d'onde dans la fenêtre optique, soit entre 650 nm et 1200 nm, où le sang est moins absorbant. La figure suivante montre le spectre d'absorption de l'hémoglobine, où l'on distingue que l'absorption de l'hémoglobine diminue significativement au-delà de 650 nm (Prahl, 1999).

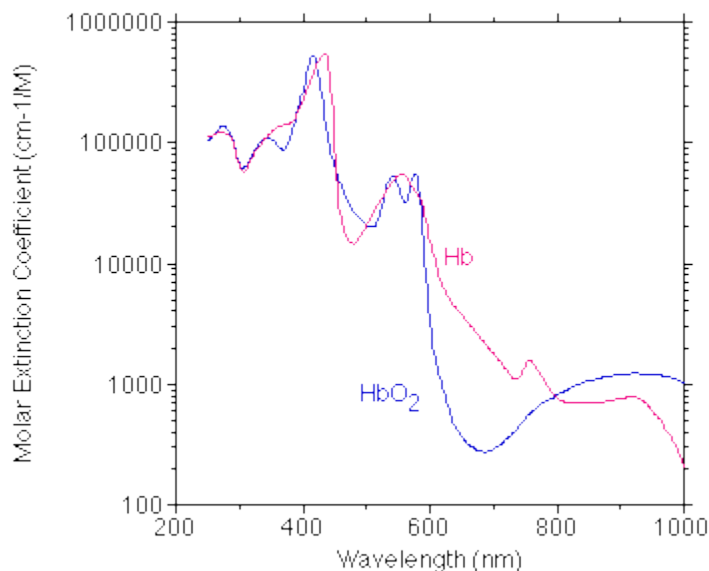


Figure 2-7: Spectre d'absorption de l'hémoglobine oxygénée (HbO₂) et désoxygénée (Hb). Tiré de Prahl, 1999.

Les lipides ont aussi un contraste endogène intéressant, puisqu'ils absorbent abondamment autour de 1200 nm. Il est donc possible de détecter leur présence dans la paroi artérielle en utilisant un laser à impulsions à cette longueur d'onde (Wang *et al.*, 2012a). Une étude a également démontré que l'utilisation de nanotiges d'or permettait de localiser la plaque d'athérosclérose chez des lapins ayant reçu une diète riche en cholestérol (Yeager *et al.*, 2012).

Bref, l'imagerie photoacoustique est une modalité d'imagerie moléculaire émergente qui combine la résolution élevée de l'imagerie ultrasonore (0,1 mm) avec le contraste élevé des sondes moléculaires optiques, comme les nanoparticules d'or, (G. Ku, Wang, Xie, Stoica et Wang, 2005; Xu et Wang, 2006). Tel que démontré, il existe plusieurs sondes moléculaires intéressantes visant l'étude des maladies cardiovasculaires. Cependant, elles ont surtout été validées chez la souris et la transition à l'humain requiert une approche intravasculaire.

2.4 Imagerie de fluorescence

La fluorescence est définie par l'émission de lumière par une substance, suite à l'absorption de lumière. La lumière est réémise à une longueur d'onde plus élevée que celle absorbée. Cette différence de longueur d'onde peut être exploitée en imagerie avec l'utilisation de filtres

optiques. Ceci permet une détection spécifique des substances fluorescentes, appelées fluorophores.

Une source de lumière filtrée est utilisée pour exciter le tissu. Généralement, la source est une diode laser ou une lumière blanche. Un détecteur optique, tel un tube photomultiplicateur, une caméra ou une photodiode, est aligné avec le tissu et installé avec un filtre captant seulement la lumière fluorescente, ce qui permet de détecter la présence de fluorophores.

L'imagerie de fluorescence est effectuée suite à l'injection d'une sonde fluorescente dans le système sanguin. La longueur d'onde d'émission de fluorescence varie grandement d'un fluorophore à l'autre. Compte tenu de la grande absorption de l'hémoglobine, les fluorophores qui émettent dans la zone du proche infrarouge (650 à 950 nm) sont privilégiés. Tout comme en imagerie photoacoustique, il est possible d'utiliser des sondes moléculaires sur différentes bandes spectrales afin de cibler plusieurs processus simultanément (Dickinson *et al.*, 2001; Mahmood *et al.*, 2002).

Chez l'humain, peu d'agents de contraste fluorescents sont approuvés pour une utilisation clinique. Les deux principaux fluorophores approuvés par la FDA sont le bleu de méthylène et l'ICG. Ce dernier est notamment employé pour visualiser la vascularisation du cerveau (Balamurugan, Agrawal, Kato et Sano, 2011; Raabe, Beck, Gerlach, Zimmermann et Seifert, 2003) et de l'œil (Herbort, LeHoang et Guex-Crosier, 1998).

L'imagerie de fluorescence est donc principalement utilisée en recherche pré-clinique. Des sondes fluorescentes ont été développées en laboratoire, par exemple en conjuguant un fluorophore avec une sonde ciblant les MMP (Seulki Lee *et al.*, 2008), ou en concevant une nanoparticule captée par les macrophages et lié au fluorophore Cy5.5 (Sosnovik *et al.*, 2007). Des fluorophores ont également été conjugués avec des anticorps (Ballou, Fisher, Hakala et Farkas, 1997) ou des protéines (Becker *et al.*, 2000), afin de cibler spécifiquement des tumeurs. Bref, une grande variété de sondes fluorescentes ont été développées en laboratoire. De plus, il existe plusieurs sondes commerciales, par exemple la série Alexa Fluor, qui peut être conjuguée à des anticorps de souris, de rats ou de lapins.

La fluorescence résolue dans le temps (FLIM) diffère de la fluorescence conventionnelle en mesurant la durée de vie du fluorophore, plutôt que son intensité. Elle a été utilisée pour détecter

des cellules cancéreuses injectées en sous-cutané sur des souris, tel qu'illustré à la figure suivante (Bloch *et al.*, 2005).

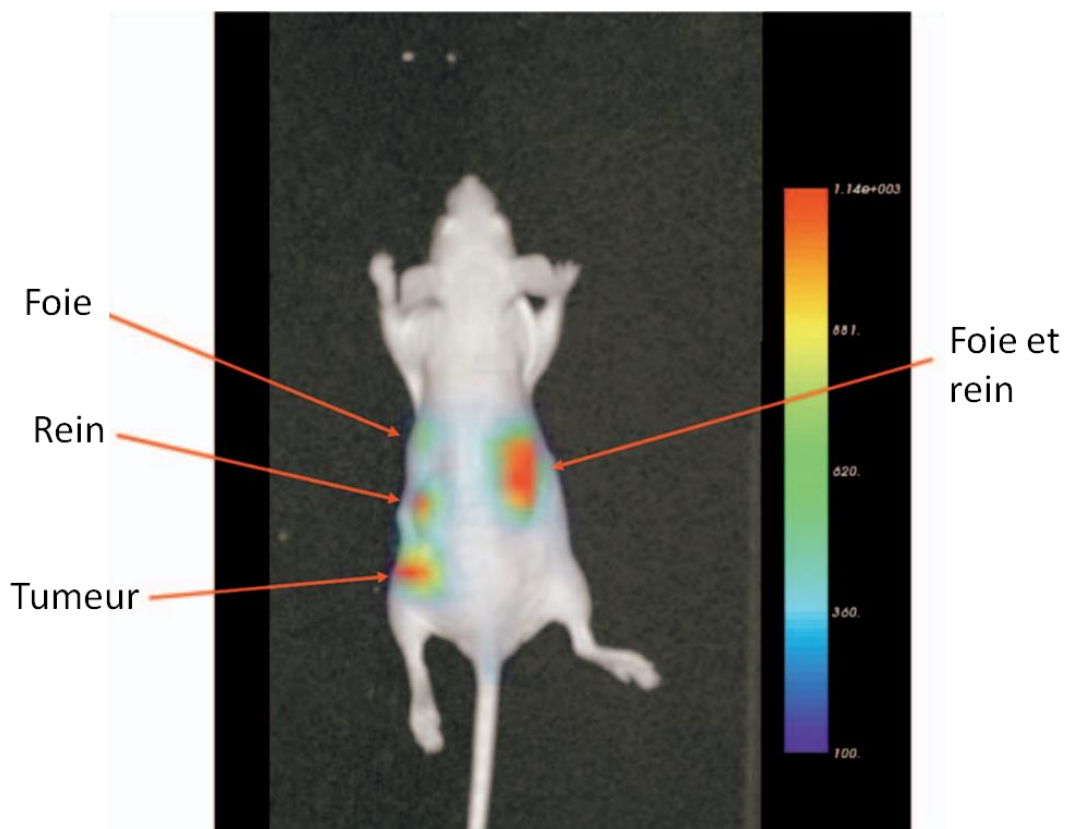


Figure 2-8: Imagerie de fluorescence résolue dans le temps (FLIM) d'une souris porteuse d'une tumeur 24 heures après l'injection de la sonde. Adapté de Bloch *et al.*, 2005.

En imagerie de fluorescence intravasculaire, la source de lumière et le détecteur optique doivent être reliés à une fibre optique. Ceci représente un défi supplémentaire, puisque la source et le détecteur partagent le même chemin optique. Un filtre dichroïque installé sur le chemin optique à 45° est nécessaire, permettant de réfléchir la source à 90° tout en transmettant l'émission de fluorescence vers le détecteur. Une des principales limitations de la fluorescence intravasculaire est l'absence de résolution axiale, contrairement à la photoacoustique. Il est donc impossible de déterminer l'origine du signal de fluorescence en profondeur, dans la paroi artérielle. De plus, cette technique est limitée aux petits vaisseaux, en raison de l'absorption et de la diffusion de l'hémoglobine, qui limite la profondeur d'imagerie à environ 2 mm. L'approche intravasculaire implique l'utilisation de petites fibres optiques pour l'illumination et la détection, ce qui contribue à la faible profondeur d'imagerie.

L'imagerie de fluorescence intravasculaire est une technique prometteuse pour l'identification des plaques d'athérosclérose vulnérables. Des études ont montré la capacité de détecter certaines caractéristiques des plaques vulnérables, comme l'inflammation, chez le lapin (Jaffer *et al.*, 2011; Vinegoni *et al.*, 2011). La FLIM intravasculaire a également été démontrée pour l'analyse des plaques d'athérosclérose chez le porc (Bec *et al.*, 2014).

2.5 Autres modalités

L'échographie de la carotide est une technique d'imagerie non invasive qui offre des mesures quantitatives et reproductibles avec une bonne résolution (0,15 mm), mais qui permet difficilement de suivre l'évolution de la plaque (Finn, Kolodgie et Virmani, 2010). En effet, cette technique offre généralement une coupe transversale de la carotide, alors que la plaque se développe 2,4 fois plus rapidement en longueur qu'en épaisseur (Barnett, Spence, Manuck et Jennings, 1997).

L'IOCT est une technique d'imagerie émergente qui offre une excellente résolution (0,01 mm), nettement supérieure à l'IVUS, mais une profondeur de pénétration très limitée, soit de 1 à 2 mm (Pinto et Waksman, 2006). Cette technique invasive nécessite également de purger le lumen du vaisseau avec un liquide clair, afin de réduire la présence de sang entre le cathéter et la paroi, et/ou d'effectuer une occlusion temporaire du débit sanguin. Elle permet de visualiser certaines caractéristiques de la plaque, comme l'épaisseur de la chape fibreuse et la présence d'un cœur lipidique. En clinique, l'IOCT est utilisé lors de l'angioplastie pour surveiller la pose du stent et pour vérifier la progression de la lésion suite à la chirurgie (Ozaki *et al.*, 2010).

L'IRM permet d'obtenir une bonne résolution spatiale (0,4 mm pour une tranche de 2 mm) de manière non invasive (McConnell *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2006). La résolution peut également être améliorée à l'aide d'une sonde intravasculaire (Blank *et al.*, 2005; Wilensky, Song et Ferrari, 2006). L'IRM offre une caractérisation structurelle de la plaque et peut détecter plusieurs critères définissant les plaques vulnérables (Cai *et al.*, 2002; Wilensky *et al.*, 2006).

La tomographie offre également une bonne résolution (0,4 mm), mais expose le patient à des rayons X. Cette technique est principalement utilisée pour la mesure de la calcification dans les artères et la détection de sténoses, mais il est également possible de mesurer le volume de la

plaque (Ugolini *et al.*, 2009). Cependant, l'identification des plaques vulnérables est difficile, puisque celles-ci ne sont pas nécessairement calcifiées et ne provoquent pas toujours de sténoses.

La TEP offre une sensibilité exemplaire qui permet de détecter des changements subtils dans l'activité métabolique de la plaque (N. Tahara *et al.*, 2006). Cependant, la résolution spatiale est très faible (4 mm), mais elle peut être combinée avec la tomodensitométrie pour faciliter la localisation des vaisseaux (Di Carli, 2004).

L'IRM et les techniques d'imagerie par rayons X sont très dispendieuses, mais elles sont également prometteuses, notamment puisqu'elles sont non invasives et adaptées aux séries d'imagerie des études cliniques.

De plus, plusieurs algorithmes permettent de distinguer les types de plaque en utilisant les données radiofréquences (Caballero, Barajas, Pujol, Salvatella et Radeva, 2006; Deftereos, Giannopoulos, Kossyvakis et Pyrgakis, 2010). Mis à part l'élastographie expliquée plus haut, l'histologie virtuelle est un exemple de ces techniques. Elle permet d'afficher une carte de couleur en transparence au-dessus de l'image IVUS, afin de distinguer les plaques fibreuses, adipeuses et calcifiées, ainsi que les cœurs nécrotiques. Cependant, une grande variabilité a été observée dans les résultats en histologie virtuelle et la distinction des différents tissus n'est pas toujours évidente.

Les techniques conventionnelles de quantification de la plaque sont basées sur l'analyse de l'intensité des images IVUS en ton de gris. Cependant, ces images ont subi une transformation majeure par rapport aux données brutes, pour permettre l'affichage à l'écran. Ainsi, il y a un avantage significatif à utiliser les signaux radiofréquences non transformés pour cette analyse de la plaque, puisque ceci permet d'obtenir des résultats plus précis et reproductibles.

Le tableau suivant résumé les principales modalités d'imagerie de l'athérosclérose abordées dans ce chapitre.

Tableau 2.1: Caractéristiques des modalités d'imagerie de l'athérosclérose

Modalité d'imagerie	Résolution	Avantages et désavantages
Échographie de la carotide	0,15 mm	Faible coût, mais vue limitée de la plaque.

IOCT	0,01 mm	Excellente résolution, mais profondeur de pénétration limitée.
IRM	0,4 mm	Bonne résolution permettant de caractériser la plaque, mais très coûteux.
Tomodensitométrie	0,4 mm	Expose le patient à des rayons X, coûteux et limité à la détection de calcium et de sténoses.
TEP	4 mm	Très faible résolution, mais excellente sensibilité.
IVUS	0,1 mm	Analyse volumétrique de la plaque avec une excellente résolution.
NIRF	1 mm	Excellent potentiel en imagerie moléculaire, mais faible résolution et profondeur de pénétration limitée.
IVPA	0,1 mm	Excellente résolution et excellent potentiel en imagerie moléculaire, mais profondeur de pénétration limitée.

CHAPITRE 3 ARTICLE 1 : DEVELOPMENT OF A PHOTOACOUSTIC, ULTRASOUND AND FLUORESCENCE IMAGING CATHETER FOR THE STUDY OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUE

Cet article a été publié le 24 octobre 2014 dans la revue IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems. Le système d'imagerie par cathéter conçu y est décrit en détail, au niveau de l'électronique, l'optique et la mécanique. Pour ce manuscrit, l'IVPA, l'IVUS, la NIRF (appelée IVFL dans cet article) et l'IVE ont toutes été intégrées et validées. Les performances de l'appareil sont évaluées sur des fantômes simulant les propriétés optiques et acoustiques des tissus biologiques. Les résultats présentés démontrent que le système est prêt pour l'imagerie *in vivo* et l'étude de la plaque d'athérosclérose chez le lapin.

Authors : Maxime Abran, Guy Cloutier, Marie-Hélène Roy Cardinal, Boris Chayer, Jean-Claude Tardif, and Frédéric Lesage.

Abstract : Atherosclerotic cardiovascular diseases are a major cause of death in industrialized countries. Molecular imaging modalities are increasingly recognized to be a promising avenue towards improved diagnosis and for the evaluation of new drug therapies. In this work, we present an acquisition system and associated catheter enabling simultaneous photoacoustic, ultrasound and fluorescence imaging of arteries designed for *in vivo* imaging. The catheter performance is evaluated in tissue-mimicking phantoms. Simultaneous imaging with three modalities is demonstrated at frame rates of 30 images per second for ultrasound and fluorescence and 1 image per 13 seconds for photoacoustic. Acquired radio-frequency ultrasound data could be processed to obtain radial strain elastograms. With motorized pullback, 3D imaging of phantoms was performed using the three modalities.

Index Terms—Biomedical electronics, biomedical optical imaging, catheters, fluorescence, molecular imaging, phantoms, photoacoustic effects, ultrasonic imaging.

3.1 Introduction

Cardiovascular diseases (CV) are the main cause of mortality and morbidity worldwide (Lopez, Mathers, Ezzati, Jamison et Murray, 2006). The majority of CV events are related to atherosclerosis, a pathology characterized by the formation of a plaque into the artery wall

(Morteza Naghavi *et al.*, 2003). Current challenges in evaluating the benefits of new drugs are associated with the difficulty of performing this evaluation on the background of effective standard therapy. To address this issue, new tools are needed to measure CV risk and to evaluate novel therapies. Potential candidates include imaging techniques, as they enable early and longitudinal measures of drug efficacy (Tardif *et al.*, 2011). Current non-invasive imaging techniques include B-mode ultrasound, used to measure the carotid intima-media thickness (CIMT), computed tomography (CT), to quantify coronary and carotid calcium, and magnetic resonance imaging (MRI), to identify carotid fibrous cap status and to provide indirect measures of inflammation with magnetic contrast agents.

Intravascular ultrasound (IVUS) is a minimally invasive technique providing high-resolution images that allow the delineation of small plaques and the follow-up of remodeling processes, mainly in coronary arteries. Intravascular optical coherence tomography, which is a new technique, has recently been shown to provide better resolution than IVUS at the cost of a limited penetration (≈ 2 mm) (Pinto et Waksman, 2006). It also necessitates a saline flush to reduce light absorption of blood.

Atherosclerosis imaging modalities presented above are mostly limited to depict structural features, but emerging molecular imaging techniques now offer an alternative to study the development of the plaque at a cellular level. Molecular imaging of atherosclerosis can provide relevant information on the development of the plaque with a large variety of biomarkers. For example, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)-internalizing targeted iron oxide contrast agent showed greater uptake in the aorta of untreated hyperlipidemic apoE-knockout mice on a high-cholesterol diet compared to the statin-treated mice (Nahrendorf *et al.*, 2006). In our laboratory, anti-VCAM-1 was also successfully conjugated with a fluorophore or with gold nanoshells to provide photoacoustic contrast in mice (Rouleau *et al.*, 2013). Other targets (*e.g.*, matrix metalloproteinases (Deguchi *et al.*, 2006), cathepsins (Jaffer *et al.*, 2007), angiogenic markers (Burtea *et al.*, 2008)) have also been investigated. More recently, non-specific FDA approved indocyanine green (ICG), was shown to target lipid-loaded macrophages in human tissues *ex vivo* (Vinegoni *et al.*, 2011). However, with optical imaging, most of the above studies were performed in mice due to the high absorption of light by the hemoglobin. For optical molecular imaging, extension to larger animals (rabbits, pigs) or humans requires an intravascular approach (Vinegoni *et al.*, 2011).

Multimodal imaging catheters combining ultrasound and photoacoustic were initially demonstrated with an external illumination thus preventing *in vivo* imaging (Wang *et al.*, 2009; S. Sethuraman, Mallidi, *et al.*, 2007). Further integration was demonstrated in recent works where an ultrasound catheter including an optical fiber was tested on phantoms (Karpiouk, Wang et Emelianov, 2010; Wang *et al.*, 2012a; Wang, Su, Karpiouk, *et al.*, 2010; Yeager *et al.*, 2012) and used for *ex vivo* intravascular photoacoustic (IVPA)/IVUS imaging of a coronary artery (Jansen, van der Steen, *et al.*, 2014; Jansen *et al.*, 2011; Jansen, Wu, *et al.*, 2014). Recently, an IVPA/IVUS imaging catheter was used for *in vivo* imaging of a rabbit, but with a low frame rate and on a ligatured artery (Wang *et al.*, 2012b). Separately, 2D fluorescence imaging catheters were developed to perform molecular imaging of atherosclerotic plaques in rabbits (Jaffer *et al.*, 2011). Images were aligned with IVUS acquired with a different catheter, which complicated experimental acquisitions. Catheters combining IVUS and fluorescence imaging were also designed, but they remain relatively large in size (Bec *et al.*, 2012; Dixon et Hossack, 2013; Stephens *et al.*, 2009).

In this work, we present the design and validation of a tri-modal catheter, combining photoacoustic, ultrasound and fluorescence imaging. Data from all three modalities are acquired and displayed simultaneously and the scanning system is designed for *in vivo* imaging. Furthermore, achieved image acquisition at a frame rate of up to 30 Hz in IVUS enables intravascular elastography (IVE) applications. The IVE method displays tissue deformations produced by the pulsating blood pressure using radio-frequency IVUS images. It has been shown to have potential to identify plaque components and vulnerability (C. L. de Korte, Pasterkamp, *et al.*, 2000; Majdoulina *et al.*, 2014). In this work, the diameter of the optical fiber and transducer assembly is 1.1 mm. When inserted in a catheter sheath, it has an outer diameter of 1.4 mm, small enough to fit in a 5 French introducer. The design of the system and its validation in tissue-mimicking phantoms are described including tri-modal 2D and 3D images.

3.2 Materials and methods

3.2.1 System overview

The system was designed as an ultrasound-optical imaging catheter linked to an optical assembly and custom-made electronics. The catheter *per se* combined an optical fiber for fluorescence

imaging and photoacoustic excitation and an ultrasound transducer for acoustic imaging and detection of photoacoustic signals. The electronic circuit synchronized the acquisition of the three modalities with the two motors driving the rotating/translating catheter assembly. The raw data was then transferred to a laptop via a USB connection at rates up to 250 Mbps. A Matlab user interface filtered the signals, reconstructed and displayed the three images in real time during acquisitions.

3.2.2 Catheter conception

Catheters were built by gluing an optical fiber to an ultrasound transducer and its transmission cable with cyanoacrylate along the full length of the catheter. The ultrasound transducer single element and its coaxial transmission cable were extracted from a commercial IVUS 45 MHz catheter (Revolution, Volcano Therapeutics, Rancho Cordova, CA, USA). The 400 μm optical fiber had a numerical aperture of 0.22. A 500 μm right angle prism with an aluminized hypotenuse (Edmund Optics Inc., Barrington, NJ, USA) was glued at the tip of the fiber for side-fire illumination with an optical UV curing adhesive. Alignment was performed by gluing the optical fiber and the ultrasound transducer under a microscope. The prism was tilted on the tip of the fiber by about 15 degrees, to optimize the overlapping region of the illumination and ultrasound emission. This region starts at 1.5 mm from the catheter's surface. The assembly was inserted inside a customized torque coil (Asahi Intecc, Santa Ana, CA, USA) to obtain a uniform rotation and then installed in a thin low-density polyethylene (LDPE) tube with an outer diameter of 1.4 mm so that it would fit in a 5 French introducer. The rigidity of the optical fiber added negligible distortion in the IVUS signal due to the non-uniform rotation, even when applying a radius of curvature of 30 mm. The catheter had a length of 150 cm. A diagram and a picture of the tip of the catheter are shown in Fig. 3-1.

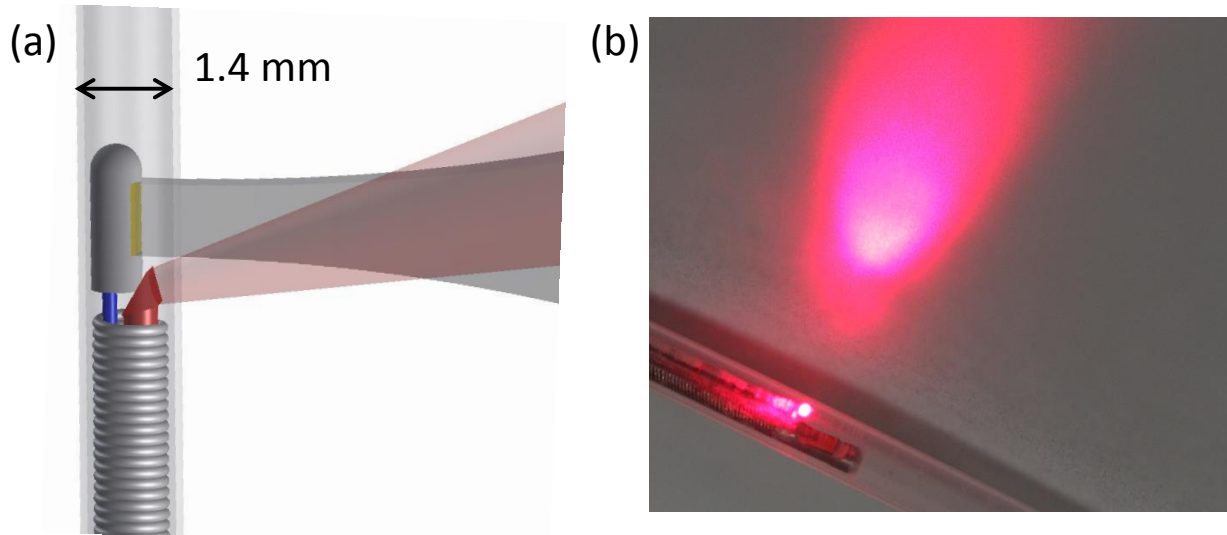


Figure 3-1: (a) Diagram of the tip of the catheter. The overlapping region of the light illumination and the ultrasound field of view is shown. It allows the co-registration of the different imaging modalities. The space under the prism and between the fiber and the transducer is filled with glue. (b) Photograph of the tip of the catheter inside the LDPE tube. The fiber was connected to a 660 nm laser and the catheter was placed on a white surface for visualization.

A DC motor (MicroMo, Clearwater, FL, USA) was used to rotate the optical fiber and the ultrasound transducer at an angular speed of 30 revolutions/second. Two hundred fifty six angular positions were acquired at each revolution to generate the images. A linear motor (Zaber Technologies, Vancouver, BC, Canada) was used to add a pullback function and to enable 3D reconstructions. Optical and electrical connections between the fixed and rotating assemblies used an optical rotary joint for the optical fiber (Doric Lenses, Quebec, QC, Canada) and a slip ring to transmit and receive the electrical signals, both able to operate at 30 revolutions/second. A small preamplifier with a gain of 20 dB was designed to rotate with the ultrasound transducer to amplify the signal close to the source. A transmit/receive switch was installed in front of the preamplifier to protect the amplifier circuit from the pulser. The slip ring had extra signal lines to provide power to this circuit. The ultrasound excitation signal and the output of the preamplifier were transmitted to the main acquisition circuit through the slip ring.

3.2.3 Optical design

Fig. 3-2 provides an overview of the optical system, combining photoacoustic illumination and fluorescence imaging.

For photoacoustic imaging, a Q-switched ND:YAG pulsed laser (Quanta-Ray INDI series, Newport Corporation, Irvine, CA, USA), followed by an Optical Parametric Oscillator (OPO, GWU-Lasertechnik, Erfstadt, Germany), operating at 710 nm was used. The repetition rate of the laser was 20 Hz and it was synchronized with the rotating motor. The pulse energy was 150 μJ at the tip of the catheter. The laser did not cause any damage to the prism or the fiber. We have calculated that the fluence on an artery wall at 1 mm from the catheter through blood would be 3 mJ/cm^2 , which is below the ANSI safety limit of 20 mJ/cm^2 .

For fluorescence imaging, a filtered laser diode ($\lambda = 780 \text{ nm}$, filter: $769 \pm 20 \text{ nm}$) was used to excite the fluorophore. The output power at the tip of the catheter was 25 mW. A photomultiplier tube (PMT, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan), combined with a narrow-band optical filter ($832 \pm 19 \text{ nm}$) was used to detect the emitted fluorescence. A dichroic filter (cut-off wavelength: 801 nm) isolated the excitation and emission light paths. Filter sets can be changed depending on the fluorophore, in the experiments below, ICG was used. A second dichroic filter (cut-off wavelength: 741 nm) was placed between the fluorescence and photoacoustic light paths to maximize light transmission for both modalities and to avoid saturating the PMT during photoacoustic pulses.

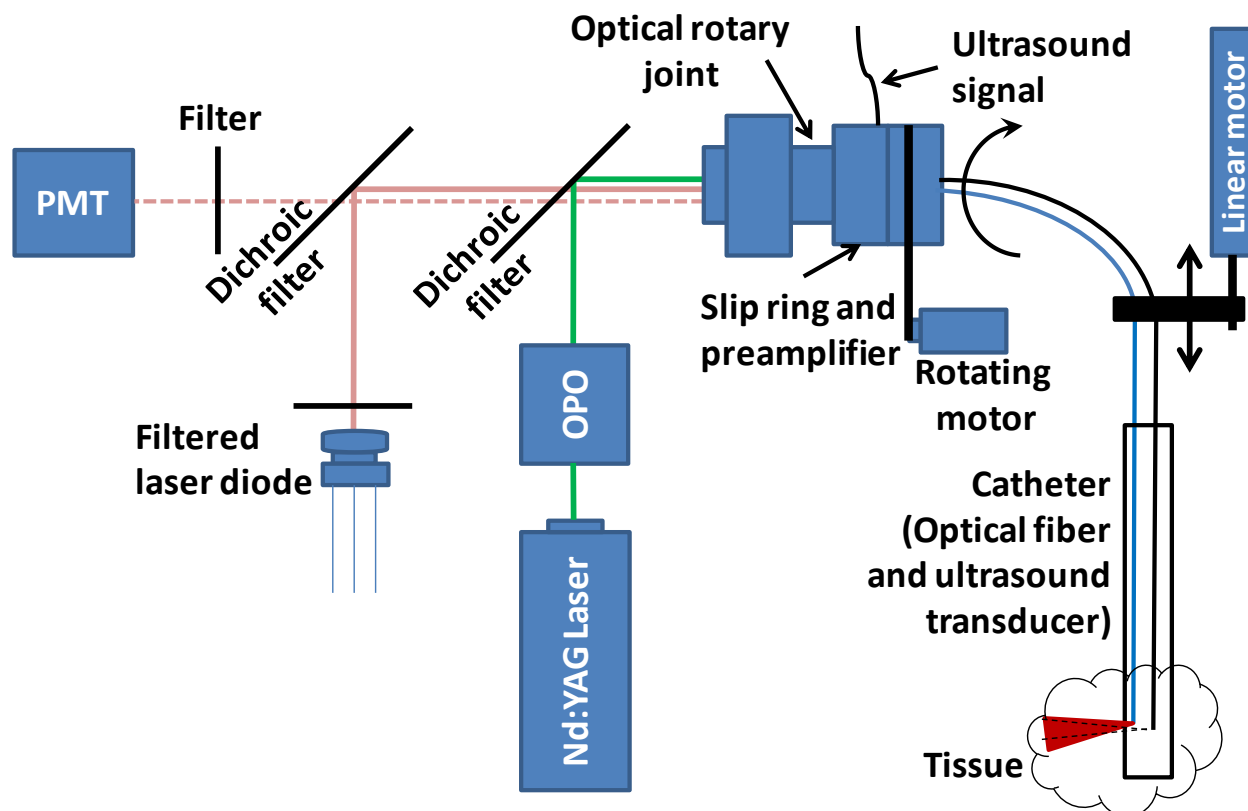


Figure 3-2: Overview of the tri-modal catheter system.

3.2.4 Electronics

The electronic circuit was custom designed from discrete electronic parts to allow simultaneous tri-modal imaging. The main component of the system was a field-programmable gate array (FPGA) (Cyclone III, Altera, San Jose, CA, USA) linked to the computer by a USB connection (using a microcontroller from Cypress Semiconductor, San Jose, CA, USA). The FPGA was in charge of synchronizing and recording all signals acquired. Analog electronics for ultrasound pulse-echo, fluorescence detection and motor control were also integrated and controlled by the FPGA. The schematics of the entire electronic circuit are available on demand.

The ultrasound excitation was generated by a $\pm 20V$ custom pulse circuit with a return-to-zero function. Photoacoustic and ultrasound detection circuits included a variable-gain amplifier (VGA) with customizable time-gain compensation and a 14-bit analog-to-digital converter (ADC) acquiring at 200 MegaSamples/second. The circuit further included digital lines for control of the Nd:YAG laser.

For fluorescence imaging, a laser driver circuit allowed flexibility in using almost any laser diode, depending on the fluorophore used. The variable gain PMT was amplified and then digitalized at 250 kiloSamples/second using an 18-bit ADC. Finally, a part of the circuit controlled the speed of the DC rotating motor and the position of the linear pullback motor. The system included two laser driver and PMT acquisition circuits to visualize two fluorescent contrasts simultaneously for future works.

All data acquired was relayed in real-time to the computer at every angular position. A packet of data contained an ultrasound and photoacoustic vector, a fluorescence value and other acquisition information, such as the motor positions, errors and warnings.

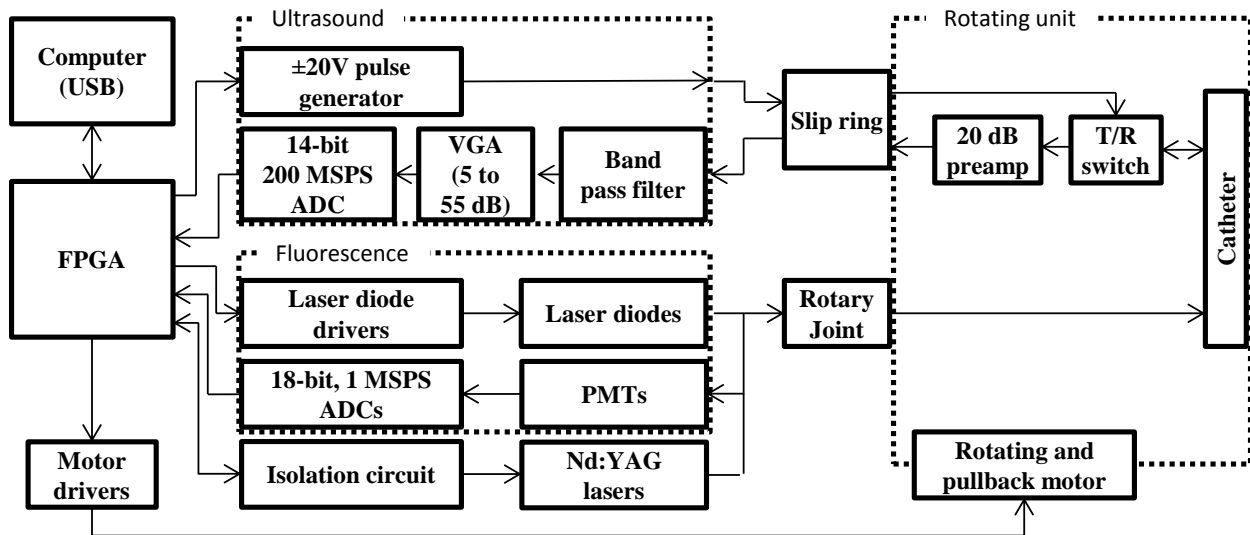


Figure 3-3: Block diagram of the electronic circuit.

3.2.5 Acquisition

Data in ultrasound and fluorescence modes were acquired at a frame rate of 30 Hz. Due to the limited pulse rate of the photoacoustic laser ($20 \text{ Hz} \pm 1 \text{ Hz}$), obtaining a full frame in this modality required 13 seconds. At this laser repetition rate, a photoacoustic laser pulse and acquisition could be performed every 1 turn and a half (i.e., for 256 angles, $\theta_1 = 1$, then $\theta_2 = 129$, $\theta_3 = 2$, $\theta_4 = 130$, $\theta_5 = 3$, etc.). Laser triggering by the acquisition system in the range 19-21 Hz allowed synchronisation between angular positions (measured by the encoder of the motor) and precise angular pulse triggering. In future developments, it would be feasible to increase the

frame rate by using lasers pulsing at kHz rates without any changes to the system electronics or software.

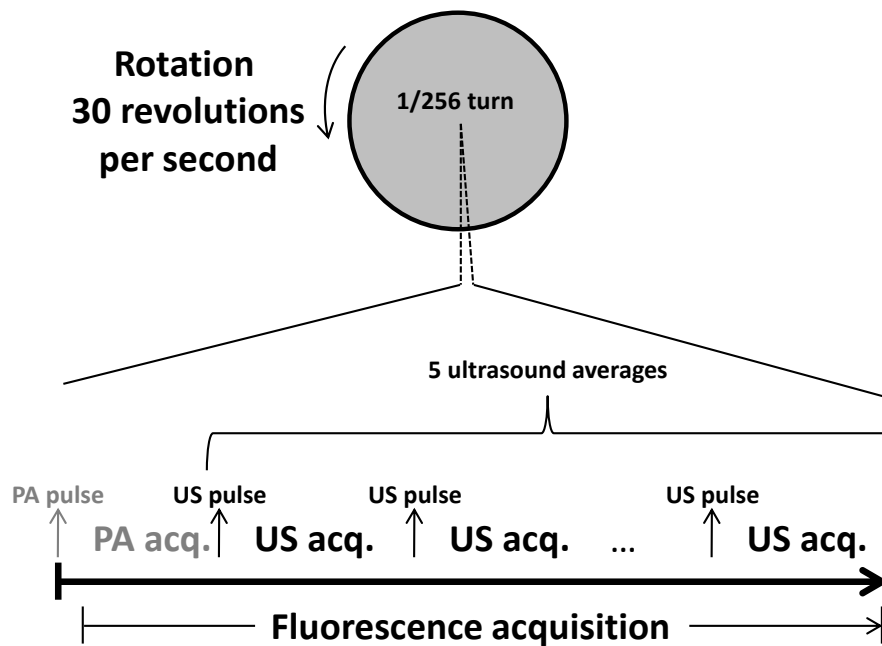


Figure 3-4: Timeline of the tri-modal acquisition for a single angular position repeated 256 times to gather one frame. A frame rate of 30 Hz could be obtained with the current implementation. The photoacoustic (PA) pulse and acquisition was not generated at every angular position, but at 20 Hz on average.

The acquisition process for each angular position is presented in the timeline of Fig. 3-4. First, a trigger was sent to the Nd:YAG laser to illuminate the tissue and the photoacoustic signal was recorded. Next, an ultrasound pulse was generated with the transducer, and the associated echo was recorded to form an ultrasound RF line. Five ultrasound echoes could be performed before the motor reached a new position (adjustable depending on the rotation speed). This specification is of interest if one aims to improve the signal-to-noise ratio (SNR) of B-mode images by reducing the rotation speed. The fluorescence excitation and recording started just after the Nd:YAG laser pulse and lasted until a new angular position.

3.2.6 Reconstruction

At each angular position, the FPGA sent the acquired data to a Matlab user interface on the acquisition computer. When a complete slice of 256 angular positions was received, a B-mode

image was reconstructed for visualization. For that purpose, photoacoustic and ultrasound data were processed first with a band-pass filter (4th order Butterworth, 40 to 50 MHz), followed by a Hilbert transform. Ultrasound data was processed with a logarithm compression. The dynamic range of the signal was 59 dB before logarithm compression and 20 dB after. Further, the images were converted from polar coordinates to Cartesian coordinates. Slices from the three modalities were displayed in real time during the acquisition at up to 30 images/second. For 3D reconstructions, an isosurface with a threshold value was applied to generate the images presented below.

3.2.7 Phantoms

To measure the sensitivity of the system, we placed an inclusion at various distances from the catheter in a blood-mimicking solution, as seen in Fig. 3-5(a). The inclusion was a rectangular-shaped container with a thin and transparent plastic wall. The container had a depth and a width of 10 mm. It contained either ICG at 100 nM and 1 μ M or black ink dilutions to measure fluorescence and photoacoustic sensitivity, respectively.

To validate the tri-modal imaging capabilities, we placed two tubes shaped in a spiral around the catheter in the blood-mimicking solution, as seen in Fig. 3-5(b). The diameter of the spiral was about 5 mm. Tubes were made of low density polyethylene (LDPE) with an internal diameter of 1.2 mm. To generate photoacoustic and fluorescence contrasts, one of the tubes was filled with ICG at 1 μ M and the other with black ink.

To evaluate the capability of performing ultrasound elastography imaging, a tissue-mimicking phantom was made using a mix of 10% polyvinyl alcohol (PVA, #CAS7732-18-5, Beacon, NY, USA) dissolved in pure water and ethanol homopolymer (#CAS9002-89-5), and 2% of Sigmacell cellulose particles (type 20, Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA). Sigmacell acted as both acoustic and optical scatterers. Black ink was added to the PVA solution for optical absorption. The phantom is shown in Fig. 3-5(c). It was shaped as a hollow cylinder with an outer diameter of 15 mm, an inner diameter of 4 mm and a length of 30 mm. A 3D printer (Replicator 2X, Makerbot, Brooklyn, NY, USA) was used to make the moulds and allowed the construction of reproducible phantoms. The phantom underwent 6 freeze-thaw cycles to induce the desired solidification and polymerization of the PVA (Fromageau *et al.*, 2007). It contained a sub-section that underwent a single freeze-thaw cycle, which led to a softer region. This region represented

90 degrees of a slice, positioned from 3 mm to 5 mm radial distance from the center. During experiments, this phantom was filled with a blood-mimicking solution and connected to a dynamic pump simulating the pulsatile blood pressure of the heart at 100 beats per minute (model #1421, Harvard, Holliston, MA, USA). Since the number of freeze-thaw cycles has little effect on the echogenicity of the phantom, the sub-section was not expected to be visible in B-mode. However, elastography aimed to detect changes in stiffness of the phantom by analysing consecutive RF images during pulsation with the Lagrangian speckle model estimator (R.L. Maurice *et al.*, 2008). The sub-section was also injected with $1\mu\text{M}$ of ICG, to allow fluorescence co-localization.

In all phantom experiments, the blood-mimicking solution was 1% intralipid and 0.1% black ink diluted in water to obtain a reduced scattering coefficient of $\mu_s' = 1 \text{ mm}^{-1}$ and an absorption coefficient of $\mu_a = 0.5 \text{ mm}^{-1}$ (Cubeddu, Pifferi, Taroni, Torricelli et Valentini, 1997). No ultrasound scatterers were present in the lumen of the phantom (*i.e.*, in the circulating blood-mimicking fluid of Fig. 3-5c).

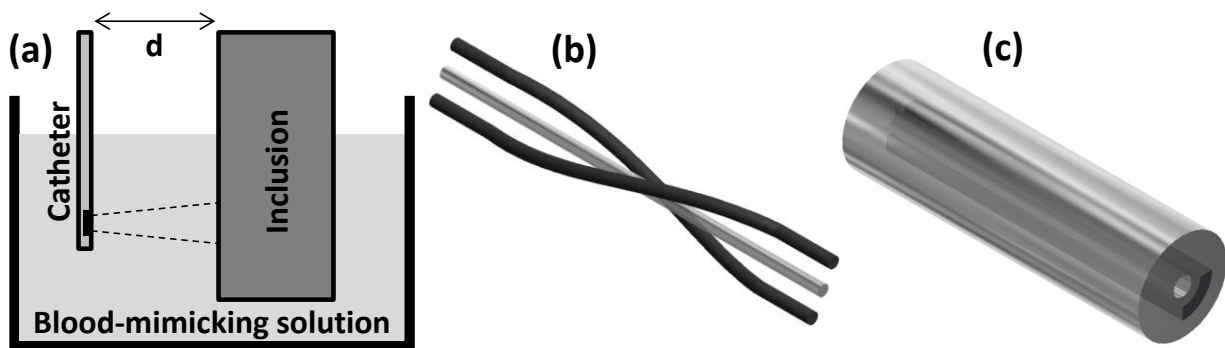


Figure 3-5: 3D depiction of the phantoms. (a) Phantom for fluorescence and photoacoustic sensitivity tests ('d' is an adjustable distance from the outer layer of the catheter to the thin film of the surface of the inclusion). The inclusion contained either ICG or black ink at different concentrations. (b) Two tubes in a spiral shape (one filled with ICG and the other with black ink) around the imaging catheter for tri-modal validation. (c) PVA phantom with a softer region on one quarter of a slice for ultrasound elastography measures. This region was injected with ICG for fluorescence validation.

3.3 Results

3.3.1 Sensitivity measurements

Sensitivity measurements in photoacoustic and fluorescence imaging were performed with an inclusion at various distances from the catheter in a blood-mimicking solution. Signal-to-noise ratios (SNR) were calculated and the results are shown in Fig. 3-6. The catheter was rotating at 30 revolutions/second and both SNRs were calculated using the signal of a single frame (no averaging). Higher SNR could be achieved by averaging multiple frames (results not shown). SNR was calculated by dividing the signal amplitude by the standard deviation of the background in a region where there were no inclusions.

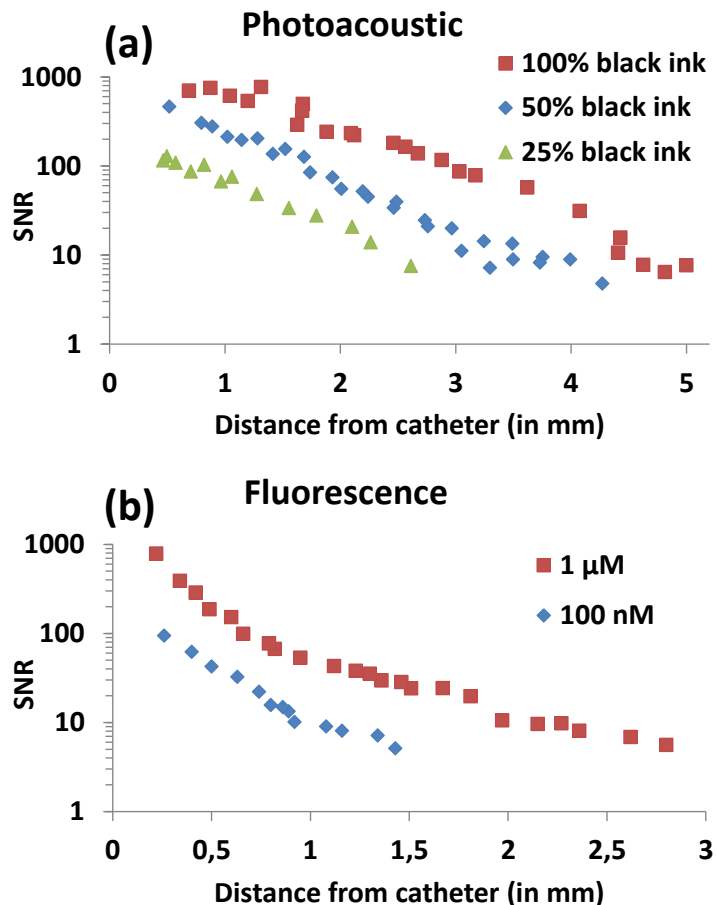


Figure 3-6: Sensitivity in photoacoustic with black ink at different concentrations. The ink was diluted in water for the 50 and 25% concentrations. (b) Sensitivity in fluorescence with different concentrations of indocyanine green. Dilutions were made with dimethyl sulfoxide.

In fluorescence, 100 nM & 1 μM of ICG were detected through a blood-mimicking solution at up to 1.4 mm and 2.8 mm, respectively. Black ink was visible in photoacoustic through 5 mm of blood-mimicking solution. IVUS images were used to measure the distance between the outer layer of the catheter and the beginning of the inclusion.

In the sensitivity measurements shown above, we used a blood-mimicking solution with $\mu_s' = 1 \text{ mm}^{-1}$ to gather results comparable with previous work (Razansky *et al.*, 2010), but this value slightly underestimated blood scattering. We performed Monte Carlo photon propagation simulations with a more realistic value of $\mu_s' = 3 \text{ mm}^{-1}$ to assess the impact on our sensitivity measures. Using higher scattering, the fluorescence signal intensity is expected to be reduced by 65% according to simulations. Therefore, an average of 8 frames would be required to obtain the SNR shown. However, in an *in vivo* experiment, this would not be detrimental, as it corresponds to a longitudinal length of 0.13 mm, well below the resolution achievable by this modality, at a pullback speed of 0.5 mm/s and given our rotation speed of 30 revolutions/second.

Tri-modal 3D imaging validation

In Fig. 3-7, simultaneous photoacoustic, fluorescence and ultrasound imaging on a slice of the phantom in Fig. 3-5(b) is shown.

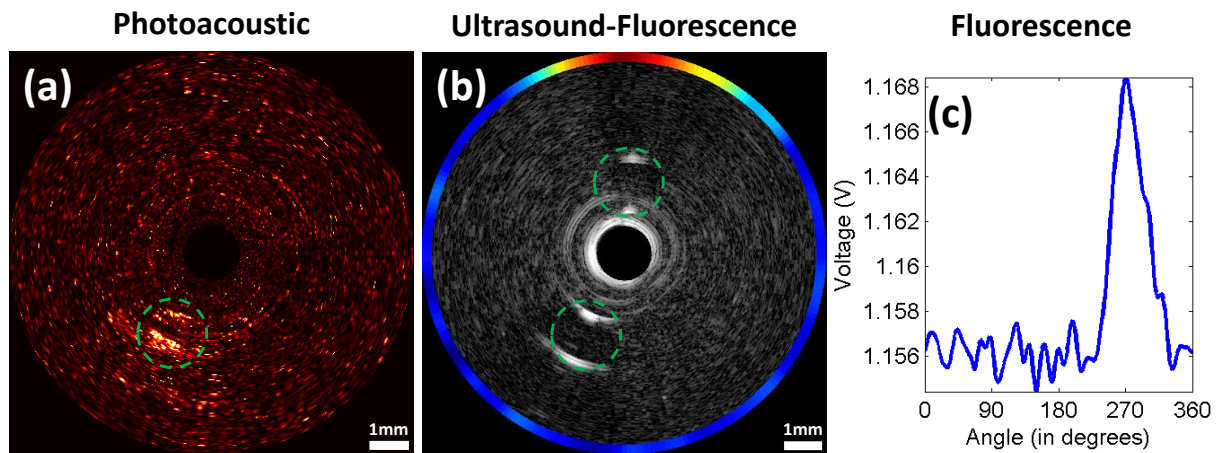


Figure 3-7: Simultaneous photoacoustic, ultrasound and superimposed fluorescence imaging. (a) The bottom inclusion (tube filled with black ink) is visible in photoacoustic. (b) Both inclusions are visible in IVUS. The contour in the IVUS image represents the fluorescence intensity signal.

The top inclusion (tube filled with 1 μM of ICG) is visible in fluorescence. (c) Fluorescence signal is shown. 0° is at the right of the IVUS image, with a clockwise rotation.

It took 13 seconds to acquire the photoacoustic signal without averaging (single shot for each angle), while the ultrasound and fluorescence signals were from a single frame acquired at 30 frames/second. The system differentiated photoacoustic and fluorescent contrasts without any apparent crosstalk. In IVPA, the signal is not as strong closer to the catheter, due to the overlapping region of the illumination and ultrasound beam, which starts at 1.5 mm from the catheter. We measured an axial resolution of 80 μm in IVUS. The phantom used for tri-modal imaging validation was not the same as the one used for sensitivity measurements. Therefore, obtained SNRs differ between both results as they are dependent on the spatial sensitivity associated with light propagation.

To demonstrate the feasibility of three-dimensional imaging, the same phantom was imaged, while performing a 30 mm pullback. Fig. 3-8 shows a 3D reconstruction obtained from photoacoustic, fluorescence and ultrasound images.

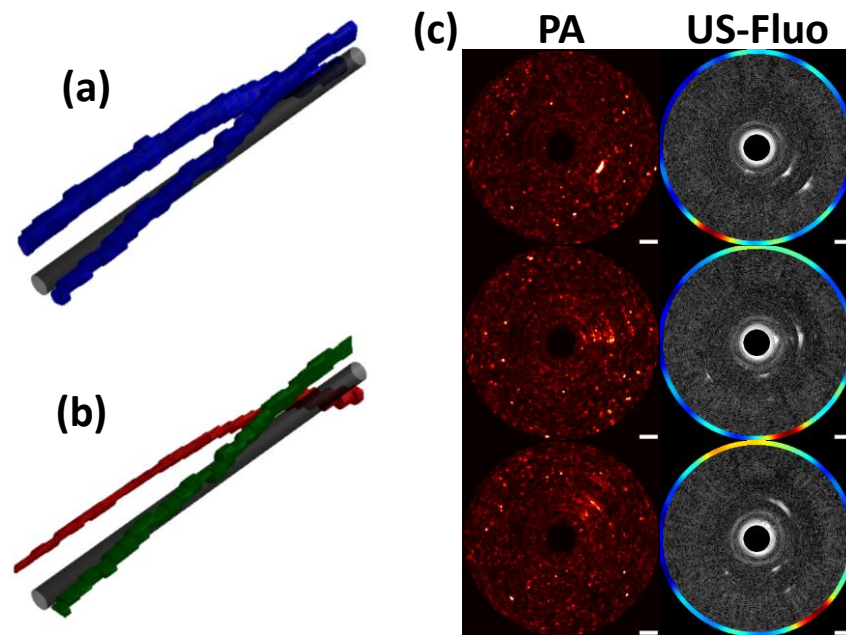


Figure 3-8: 3D reconstructions from a tri-modal acquisition. The catheter is shown in gray. (a) Ultrasound signal of both inclusions is in blue. (b) Photoacoustic signal is in red and fluorescence signal in green. (c) 3 frames along the phantom in all three imaging modalities. Scale bar is 1 mm.

The 3D images were built using 30 slices taken at every 1 mm. The total acquisition time was 7 minutes (effective pullback speed of 0.07 mm/s). 3D fluorescence was achieved by using the ultrasound image as a prior to obtain the depth of the inclusion (B. Li *et al.*, 2011).

3.3.2 Elastography

The inner and outer contours of the phantom images were segmented using a fast marching algorithm based on a combination of gray level gradient and mixtures of gamma probability density functions (PDFs) to model the log-compressed envelop gray level distribution of the IVUS (Destrempes, Roy Cardinal, Allard, Tardif et Cloutier, 2014).

IVE elastograms were computed for the segmented phantom wall according to the polar domain Lagrangian speckle model estimator that provides the radial and circumferential strains and shears (Majdouline *et al.*, 2014). The latter implementation compensated possible artifacts attributed to the eccentricity of the catheter within the vessel lumen. Vessel wall deformations were estimated in percent between two consecutive temporal RF IVUS images. For each elastogram, tissue displacements and their spatial derivatives were computed with an optical flow algorithm between corresponding cross-correlated small regions of interest (ROIs) from both images. The radial and circumferential strains and shears were then determined from those values; see (Majdouline *et al.*, 2014) for additional details.

In this study, the radial strain ε_{rr} was used to characterize the phantom elastic properties, as depicted in Fig. 3-9(b). ROIs of 0.58 mm radially and 0.74 radian circumferentially were used. As expected, larger radial strains were computed close to the lumen contour; these strains decreased in magnitude as a function of depth (strain decay phenomenon) except for the softer inclusion shown at 6 o'clock where higher radial strains were measured.

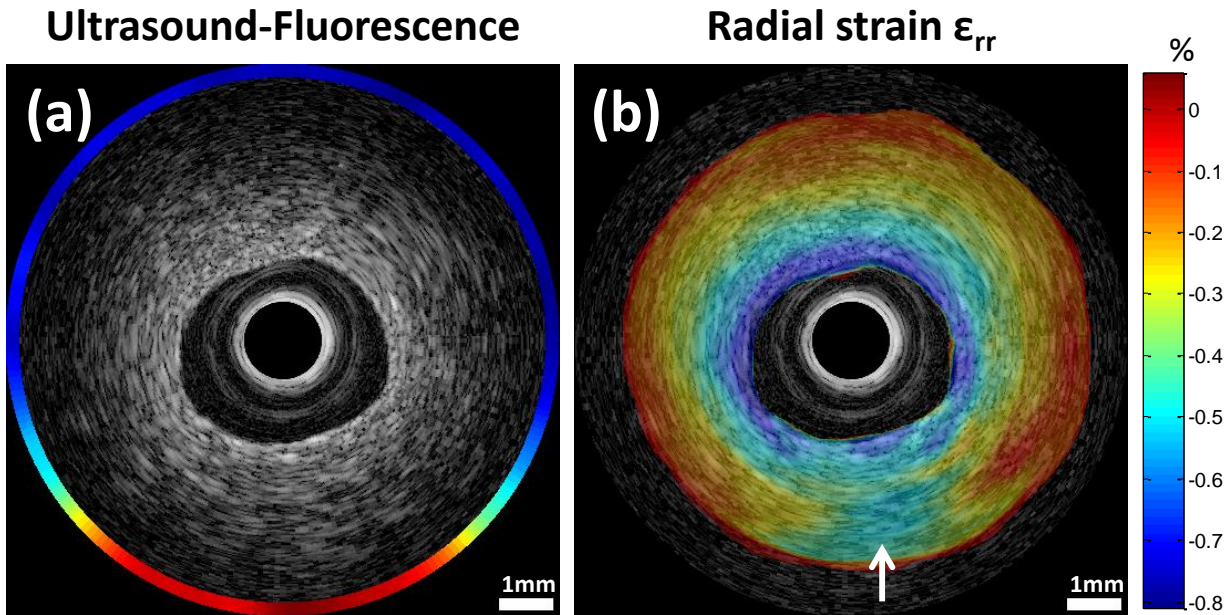


Figure 3-9: (a) Combined IVUS-fluorescence image of a slice of the phantom. (b) Radial strain deformation in %. The softer region is shown by the white arrow. Negative strains correspond to the compression of the phantom.

As expected, the soft inclusion was not visible in a static B-mode IVUS image because the number of freeze-thaw cycles had little effect on the density and compressibility of the PVA (*i.e.*, on the acoustic impedance). However, the elastography analysis could detect the inclusion zone and co-localization was seen with fluorescence imaging.

3.4 Conclusion

In this work, we demonstrated a tri-modal acquisition system and catheter providing simultaneous images in all tested modalities, RF IVUS data of good quality for elastography measures, and a design ready for *in vivo* acquisitions. Two imaging modalities can be used for molecular imaging (fluorescence and photoacoustic) and, when combined to an IVUS catheter, this technique may be amenable to image multiple molecular targets *in vivo*.

In fluorescence and photoacoustic, the sensitivity measurements and the penetration depth suggested that *in vivo* intravascular imaging may be possible. With photoacoustic imaging, the frame rate remained realistic for *in vivo* pre-clinical use (13 seconds/frame) but this could be

improved by the use of more powerful and faster excitation sources, available on the market, to help increase IVPA SNR and frame rate.

Previous multimodal catheters reported frame rates of less than 10 images/second in fluorescence imaging with a larger catheter than us (Bec *et al.*, 2012; Dixon et Hossack, 2013; Stephens *et al.*, 2009). Our scanning system and catheter allowed colocalized acquisitions of fluorescence and ultrasound at a frame rate of 30 images/second. We further integrated the optical fiber inside the catheter, reducing the diameter to 1.4 mm, which is small enough to fit inside a 5 French introducer and image the aorta of a rabbit. To our knowledge, we presented the first intravascular catheter combining fluorescence and elastography imaging, the latter requiring a high frame rate.

The sensitivity of the system with molecular probes *in vivo* remains to be evaluated. Our next steps will be to extend this work to *in vivo* studies and confirm the potential of this technology for atherosclerotic plaque characterization.

3.5 References

- Bec, J., Xie, H., Yankelevich, D. R., Zhou, F., Sun, Y., Ghata, N., ... Marcu, L. (2012). Design, construction, and validation of a rotary multifunctional intravascular diagnostic catheter combining multispectral fluorescence lifetime imaging and intravascular ultrasound. *Journal of Biomedical Optics*, 17(10), 1060121-10601210. doi:10.1117/1.JBO.17.10.106012
- Burtea, C., Laurent, S., Murariu, O., Rattat, D., Toubeau, G., Verbruggen, A., ... Muller, R. N. (2008). Molecular imaging of alpha v beta3 integrin expression in atherosclerotic plaques with a mimetic of RGD peptide grafted to Gd-DTPA. *Cardiovascular Research*, 78(1), 148-157. doi:10.1093/cvr/cvm115
- Cubeddu, R., Pifferi, A., Taroni, P., Torricelli, A. et Valentini, G. (1997). A solid tissue phantom for photon migration studies. *Physics in Medicine and Biology*, 42(10), 1971. doi:10.1088/0031-9155/42/10/011

- Deguchi, J., Aikawa, M., Tung, C.-H., Aikawa, E., Kim, D.-E., Ntziachristos, V., ... Libby, P. (2006). Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation*, *114*(1), 55-62. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.619056
- Destrempe, F., Roy Cardinal, M.-H., Allard, L., Tardif, J.-C. et Cloutier, G. (2014). Segmentation method of intravascular ultrasound images of human coronary arteries. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, *38*(2), 91-103. doi:10.1016/j.compmedimag.2013.09.004
- Dixon, A. J. et Hossack, J. A. (2013). Intravascular near-infrared fluorescence catheter with ultrasound guidance and blood attenuation correction. *Journal of Biomedical Optics*, *18*(5), 56009. doi:10.1117/1.JBO.18.5.056009
- Fromageau, J., Gennisson, J.-L., Schmitt, C., Maurice, R. L., Mongrain, R. et Cloutier, G. (2007). Estimation of polyvinyl alcohol cryogel mechanical properties with four ultrasound elastography methods and comparison with gold standard testings. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, *54*(3), 498-509.
- Jaffer, F. A., Calfon, M. A., Rosenthal, A., Mallas, G., Razansky, R. N., Mauskapf, A., ... Ntziachristos, V. (2011). Two-Dimensional Intravascular Near-Infrared Fluorescence Molecular Imaging of Inflammation in Atherosclerosis and Stent-Induced Vascular Injury. *J Am Coll Cardiol*, *57*(25), 2516-2526. doi:10.1016/j.jacc.2011.02.036
- Jaffer, F. A., Kim, D.-E., Quinti, L., Tung, C.-H., Aikawa, E., Pande, A. N., ... Weissleder, R. (2007). Optical Visualization of Cathepsin K Activity in Atherosclerosis With a Novel,

Protease-Activatable Fluorescence Sensor. *Circulation*, 115(17), 2292 -2298.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660340

Jansen, K., van der Steen, A. F., Wu, M., van Beusekom, H. M., Springeling, G., Li, X., ... van Soest, G. (2014). Spectroscopic intravascular photoacoustic imaging of lipids in atherosclerosis. *Journal of Biomedical Optics*, 19(2), 026006-026006.
doi:10.1117/1.JBO.19.2.026006

Jansen, K., van der Steen, A. F. W., van Beusekom, H. M. M., Oosterhuis, J. W. et van Soest, G. (2011). Intravascular photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis. *Optics Letters*, 36(5), 597-599. doi:10.1364/OL.36.000597

Jansen, K., Wu, M., van der Steen, A. F. W. et van Soest, G. (2014). Photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis in two spectral bands. *Photoacoustics*, 2(1), 12-20.
doi:10.1016/j.pacs.2013.11.003

Karpiouk, A. B., Wang, B. et Emelianov, S. Y. (2010). Development of a catheter for combined intravascular ultrasound and photoacoustic imaging. *The Review of Scientific Instruments*, 81(1), 014901. doi:10.1063/1.3274197

Korte, C. L. de, Pasterkamp, G., Steen, A. F. W. van der, Woutman, H. A. et Bom, N. (2000). Characterization of Plaque Components With Intravascular Ultrasound Elastography in Human Femoral and Coronary Arteries In Vitro. *Circulation*, 102(6), 617-623.
doi:10.1161/01.CIR.102.6.617

Li, B., Abran, M., Matteau-Pelletier, C., Rouleau, L., Lam, T., Sharma, R., ... Lesage, F. (2011). Low-cost three-dimensional imaging system combining fluorescence and ultrasound. *Journal of Biomedical Optics*, 16(12), 126010. doi:10.1117/1.3662455

- Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T. et Murray, C. J. (27 May). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet*, 367(9524), 1747-1757. doi:10.1016/S0140-6736(06)68770-9
- Majdouline, Y., Ohayon, J., Keshavarz-Motamed, Z., Roy Cardinal, M.-H., Garcia, D., Allard, L., ... Cloutier, G. (2014). Endovascular Shear Strain Elastography for the Detection and Characterization of the Severity of Atherosclerotic Plaques: In Vitro Validation and In Vivo Evaluation. *Ultrasound in Medicine & Biology*. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.12.008
- Maurice, R. L., Fromageau, J., Cardinal, M.-H., Doyley, M., de Muinck, E., Robb, J. et Cloutier, G. (2008). Characterization of Atherosclerotic Plaques and Mural Thrombi With Intravascular Ultrasound Elastography: A Potential Method Evaluated in an Aortic Rabbit Model and a Human Coronary Artery. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 12(3), 290 -298. doi:10.1109/TITB.2008.917905
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S. W., Litovsky, S., Rumberger, J., ... Willerson, J. T. (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*, 108(14), 1664-1672. doi:10.1161/01.CIR.0000087480.94275.97
- Nahrendorf, M., Jaffer, F. A., Kelly, K. A., Sosnovik, D. E., Aikawa, E., Libby, P. et Weissleder, R. (2006). Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation*, 114(14), 1504-1511. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646380

- Pinto, T. L. et Waksman, R. (2006). Clinical Applications of Optical Coherence Tomography. *Journal of Interventional Cardiology*, 19(6), 566-573. doi:10.1111/j.1540-8183.2006.00201.x
- Razansky, R. N., Rosenthal, A., Mallas, G., Razansky, D., Jaffer, F. A. et Ntziachristos, V. (2010). Near-infrared fluorescence catheter system for two-dimensional intravascular imaging in vivo. *Optics Express*, 18(11), 11372-11381. doi:10.1364/OE.18.011372
- Rouleau, L., Berti, R., Ng, V. W. K., Matteau-Pelletier, C., Lam, T., Saboural, P., ... Tardif, J.-C. (2013). VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 8(1), 27-39. doi:10.1002/cmml.1491
- Sethuraman, S., Mallidi, S., Aglyamov, S. R., Amirian, J. H., Litovsky, S., Smalling, R. W. et Emelianov, S. Y. (2007). Intravascular photoacoustic imaging of atherosclerotic plaques: ex-vivo study using a rabbit model of atherosclerosis. *Proceedings of SPIE*, 6437(1), 643729-643729-9. doi:doi:10.1117/12.701111
- Stephens, D. N., Park, J., Sun, Y., Papaioannou, T. et Marcu, L. (2009). Intraluminal fluorescence spectroscopy catheter with ultrasound guidance. *Journal of Biomedical Optics*, 14(3), 030505. doi:10.1117/1.3146813
- Tardif, J.-C., Lesage, F., Harel, F., Romeo, P. et Pressacco, J. (2011). Imaging Biomarkers in Atherosclerosis Trials. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 4(3), 319 -333. doi:10.1161/CIRCIMAGING.110.962001
- Vinegoni, C., Botnaru, I., Aikawa, E., Calfon, M. A., Iwamoto, Y., Folco, E. J., ... Jaffer, F. A. (2011). Indocyanine Green Enables Near-Infrared Fluorescence Imaging of Lipid-Rich,

- Inflamed Atherosclerotic Plaques. *Science Translational Medicine*, 3(84), 84ra45. doi:10.1126/scitranslmed.3001577
- Wang, B., Karpiouk, A., Yeager, D., Amirian, J., Litovsky, S., Smalling, R. et Emelianov, S. (2012a). Intravascular photoacoustic imaging of lipid in atherosclerotic plaques in the presence of luminal blood. *Optics Letters*, 37(7), 1244-1246. doi:10.1364/OL.37.001244
- Wang, B., Karpiouk, A., Yeager, D., Amirian, J., Litovsky, S., Smalling, R. et Emelianov, S. (2012b). In vivo Intravascular Ultrasound-guided Photoacoustic Imaging of Lipid in Plaques Using an Animal Model of Atherosclerosis. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 38(12), 2098-2103. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2012.08.006
- Wang, B., Su, J. L., Karpiouk, A. B., Sokolov, K. V., Smalling, R. W. et Emelianov, S. Y. (2010). Intravascular Photoacoustic Imaging. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 16(3), 588-599. doi:10.1109/JSTQE.2009.2037023
- Wang, B., Yantsen, E., Larson, T., Karpiouk, A. B., Sethuraman, S., Su, J. L., ... Emelianov, S. Y. (2009). Plasmonic Intravascular Photoacoustic Imaging for Detection of Macrophages in Atherosclerotic Plaques. *Nano Letters*, 9(6), 2212-2217. doi:10.1021/nl801852e
- Yeager, D., Karpiouk, A., Wang, B., Amirian, J., Sokolov, K., Smalling, R. et Emelianov, S. (2012). Intravascular photoacoustic imaging of exogenously labeled atherosclerotic plaque through luminal blood. *Journal of Biomedical Optics*, 17(10), 106016-106016. doi:10.1117/1.JBO.17.10.106016

CHAPITRE 4 ARTICLE 2 : ATHEROSCLEROTIC PLAQUE DETECTION USING A BIMODAL INTRAVASCULAR ULTRASOUND (IVUS) AND NEAR-INFRARED FLUORESCENCE (NIRF) CATHETER IN RABBITS

Cet article a été soumis à la revue Biomedical Optics Express le 4 février 2015. Le système d'imagerie par cathéter conçu a été validé *in vivo* sur des lapins, avec l'IVUS et la NIRF. Les lapins ont reçus une diète riche en cholestérol et/ou ont subi une dénudation endothéliale de l'aorte abdominale et de l'artère iliaque droite, le tout afin de favoriser le développement de la plaque d'athérosclérose. De l'ICG a été injecté chez les lapins, afin de détecter la plaque en fluorescence. Les résultats *in vivo* ont été comparés avec l'imagerie de fluorescence *ex vivo* des artères excisées.

Authors : Maxime Abran, Barbara E. Stähli, Nolwenn Merlet, Teodora Mihalache-Avram, Mélanie Mecteau, Eric Rhéaume, David Busseuil, Jean-Claude Tardif, and Frédéric Lesage

Abstract : Coronary artery disease is characterized by atherosclerotic plaque formation. Despite impressive advances in intravascular imaging modalities, *in vivo* molecular plaque characterization remains challenging, and different multimodality imaging systems have been proposed. We validated an engineered bimodal intravascular ultrasound imaging (IVUS) / near-infrared fluorescence (NIRF) imaging catheter *in vivo* using a balloon injury atherosclerosis rabbit model. Rabbit aortas and right iliac arteries were scanned *in vivo* after indocyanine green (ICG) injection, and compared to corresponding *ex vivo* fluorescence and white light images. Areas of ICG accumulation were colocalized with macroscopic atherosclerotic plaque formation. *In vivo* imaging was performed with the bimodal catheter integrating ICG-induced fluorescence signals into cross-sectional IVUS imaging. *In vivo* ICG accumulation corresponded to *ex vivo* fluorescence signal intensity and IVUS identified plaques.

4.1 Introduction

Cardiovascular diseases are the leading cause of morbidity and mortality worldwide,(Huffman *et al.*, 2013) and their burden is expected to rise in the near future given the aging of the population and the increasing rates of obesity and diabetes. Cardiovascular diseases are mainly due to atherosclerotic changes within the vessel wall,(Libby, 2002) with lipoprotein accumulation and

inflammatory cell proliferation considered as key factors in atherosclerotic plaque formation.(Libby, 2006, 2012)

Despite impressive advances in non-invasive and invasive imaging approaches, the identification of high-risk coronary artery plaques prior to their rupture, and thereby identification of patients at risk for acute events, remains an unmet challenge. As vulnerable plaques are often not flow-limited, they remain undetected by conventional coronary angiography.(Libby, 2006) Different imaging modalities including intravascular ultrasound (IVUS) and optical coherence tomography (OCT) have been established to overcome these limitations.(Kang *et al.*, 2011; S. Tahara *et al.*, 2012; Tardif *et al.*, 2006) Although such catheter-based technologies provide high-resolution cross-sectional images of the coronary artery wall, allowing for a detailed visualization of atherosclerotic plaques and corresponding vessel responses,(S. E. Nissen et Yock, 2001) information with regard to plaque composition and activity is limited. In recent years, emerging molecular imaging approaches such as near-infrared fluorescence (NIRF) imaging have been proposed for an improved plaque characterization at a cellular or molecular level. Utilizing a variety of molecular probes, fluorescence imaging has been demonstrated to provide complementary information with regard to plaque activity and inflammation.(Jaffer *et al.*, 2008, 2011; Nahrendorf *et al.*, 2006; Rouleau *et al.*, 2013; Wallis de Vries *et al.*, 2009) Among others, indocyanine green (ICG), given its ability to target lipids and macrophages and its established clinical applications,(Caesar, Shaldon, Chiandussi, Guevara et Sherlock, 1961; Flower et Hochheimer, 1976) has been proposed as an attractive molecular agent for fluorescence imaging of cardiovascular diseases.(Ughi *et al.*, 2014; Vinegoni *et al.*, 2011) However, for *in vivo* imaging, sensitive molecular technologies need to be combined with high-resolution microstructural imaging tools to allow for a correct interpretation of the fluorescence signal. Advantages of integrated multimodality catheter designs and simultaneous imaging have been recognized.(Tardif *et al.*, 2011; Ughi *et al.*, 2014) Fluorescence imaging catheters with integrated ultrasound guidance have been designed previously(Dixon et Hossack, 2013; Stephens *et al.*, 2009) and validated *in vivo* in swine arteries.(Bec *et al.*, 2014) However, previous *in vivo* applications relied on balloon occlusion to remove blood from the field of view.

In this study, we validated our recently engineered bimodal IVUS/NIRF imaging catheter without balloon occlusion *in vivo* using a rabbit model of atherosclerosis.(Abran *et al.*, 2014) Further, *in vivo* fluorescence imaging was compared to *ex vivo* ICG accumulation and macroscopic plaque

formation, and a blood attenuation compensation algorithm for fluorescence imaging was proposed.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Animal model of atherosclerosis

Inflamed atheroma formation was induced in 9 male New Zealand White rabbits (2.8-3 kg, aged 12-13 weeks; Charles River Laboratories, Bilmington, MA) using a 14-week-cholesterol-enriched diet (0.5% cholesterol, Harlan Techlad Diets, Madison, WI; n=3) or an artery balloon injury (n=3), or both (n=3). Balloon injury was performed in the abdominal aorta and the right iliac artery at week 2. At week 14, *in vivo* and *ex vivo* imaging procedures were performed, and the animals were sacrificed thereafter by exsanguination under anesthesia.

The experimental protocol was approved by the animal ethics committee of the Montreal Heart Institute Research Center according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

4.2.2 Balloon dilation procedures

For balloon injury procedures, anesthesia was induced with intramuscular injections of ketamine (35 mg/kg) and buprenorphine (10 µg/kg), and maintained with inhaled isoflurane (3 to 5% v/v, Baxter, Deerfield, IL) and supplemental oxygen.(Jaffer *et al.*, 2008) Then, a 5F transradial introducer (Cordis Corporation, Fremont, CA) was installed into the right carotid artery, and a 0.014” guidewire (Abbott Vascular, Santa Clara, CA) advanced to the aorta. Balloon injury was performed under fluoroscopic guidance utilizing a percutaneous transluminal coronary angiography (PTCA) balloon dilatation catheter (Boston Scientific, Marlborough, MA) inflated to tension. Balloon injury was performed in the proximal 20 mm of the right iliac artery (2.5-mm balloon), and in the distal 40 mm of the abdominal aorta above the iliac bifurcation (4-mm balloon). Three pullbacks were performed in each arterial segment. The left iliac artery served as non-injured controls. After balloon injury and removal of the introducer, the right carotid artery was ligated.

4.2.3 Bimodal intravascular ultrasound (IVUS) / near-infrared fluorescence (NIRF) catheter system

The imaging system consisting of an imaging catheter linked to an optical assembly and custom-made electronics, has previously been described.(Abran *et al.*, 2014) It combines an optical fiber for 2-dimensional, 360-degree fluorescence imaging and photoacoustic excitation, and an ultrasound transducer (extracted from a commercially available IVUS 45 MHz catheter; Revolution, Volcano Therapeutics, Rancho Cordova, CA), for acoustic imaging and photoacoustic signal detection at frame rates of up to 30 images/second. With a diameter of 1.4 mm, the system was utilized with 5F introducers. A dedicated electronic circuit synchronized acquisition of the different imaging modalities with 2 motors driving the rotating/translating catheter assembly. A custom Matlab (The MathWorks, Inc, Natick, MA) user interface was used for real-time signal filtering, reconstruction, and image display. In this work, we focused exclusively on IVUS and NIRF.

4.2.4 *In vivo* intravascular imaging procedures

Imaging procedures were performed as previously described. Animals were anesthetized with intramuscular injections of ketamine (35 mg/kg) and buprenorphine (10 µg/kg), followed by isoflurane (3 to 5% v/v) inhalation. For intravascular imaging procedures, the molecular agent ICG (10 mg/kg) was utilized, and injected via the right ear vein. A 5F introducer was inserted into the left carotid artery, and the bimodal imaging catheter was advanced over the 0.014” guide wire under fluoroscopic guidance. The guide wire was removed prior to image acquisition. Forty minutes after ICG injection, automated imaging pullbacks were performed using the bimodal IVUS/NIRF imaging catheter both in the right iliac artery and the abdominal aorta (pullback speed of 0.5 mm/second, pullback frame rate of 10 images/second, total pullback length of 100 mm). Excitation was performed with a 780 nm laser diode and emission was detected by a photomultiplier tube (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) combined with a narrow-band optical filter (832 ± 19 nm).

4.2.5 Intravascular ultrasound (IVUS)/ near-infrared fluorescence (NIRF) image analysis

For the 100 mm pullback, manual segmentation of the vessel wall was performed on recorded IVUS images using 1 slice/mm, and interpolation was used to obtain the distance for the remaining slices in between (1900 slices). A dedicated fluorescence compensation algorithm based on the Beer-Lambert law (Delpy *et al.*, 1988) was developed to compensate the fluorescence signal amplitude for the calculated distance between the imaging catheter and the arterial wall. We observed compensation to be dependent on vessel size. Utilizing an effective extinction coefficient of 2 mm^{-1} was found to be optimal for the vessel sizes that were imaged. For fluorescence detection, a minimum catheter-vessel wall distance of 0.1 mm based on the limitation of IVUS imaging, and a maximum distance of 0.75 mm to avoid background noise were utilized. The compensation algorithm was applied to all the results presented below, unless otherwise specified.

4.2.6 *Ex vivo* imaging

After the sacrifice, animals were perfused with Lactated Ringers solution. Aortas and iliac arteries were excised, conserved in 4% formaldehyde and imaged in a fluorescence imaging scanner (IVIS Lumina II, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). The abdominal aorta and iliac arteries of one randomly chosen rabbit per group were opened longitudinally, and imaged *en face*. White light images captured with a camera (D3100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) at an exposure time of 1/15 second for macroscopic atherosclerotic plaque visualization and fluorescence imaging utilizing the fluorescence scanner for *ex vivo* ICG accumulation detection were performed. For fluorescence, excitation and emission wavelengths were set to 745 nm and 800 nm, respectively. The exposure time was 1 second and no binning was applied.

4.3 Results

4.3.1 *Ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) imaging: validation of the model

Ex vivo fluorescence imaging was performed for the entire aorta, as well as for the right balloon-injured and the left non-injured iliac arteries (Fig. 4-1). An increased NIRF signal in balloon-injured arterial segments was observed both for rabbits fed a regular diet and rabbits fed a cholesterol-enriched diet (3 per group; Fig. 4-1 a-c and g-i, respectively) as compared to non-injured arterial segments of rabbits fed a cholesterol-enriched diet (Fig. 4-1 d-e). The strongest NIRF signal was observed in balloon-injured arterial segments of rabbits fed a cholesterol-enriched diet (Fig. 4-1 g-i). The increased NIRF signal was quantified and is illustrated in Fig. 4-2, where the mean signal in each arterial segment is compared for each group.

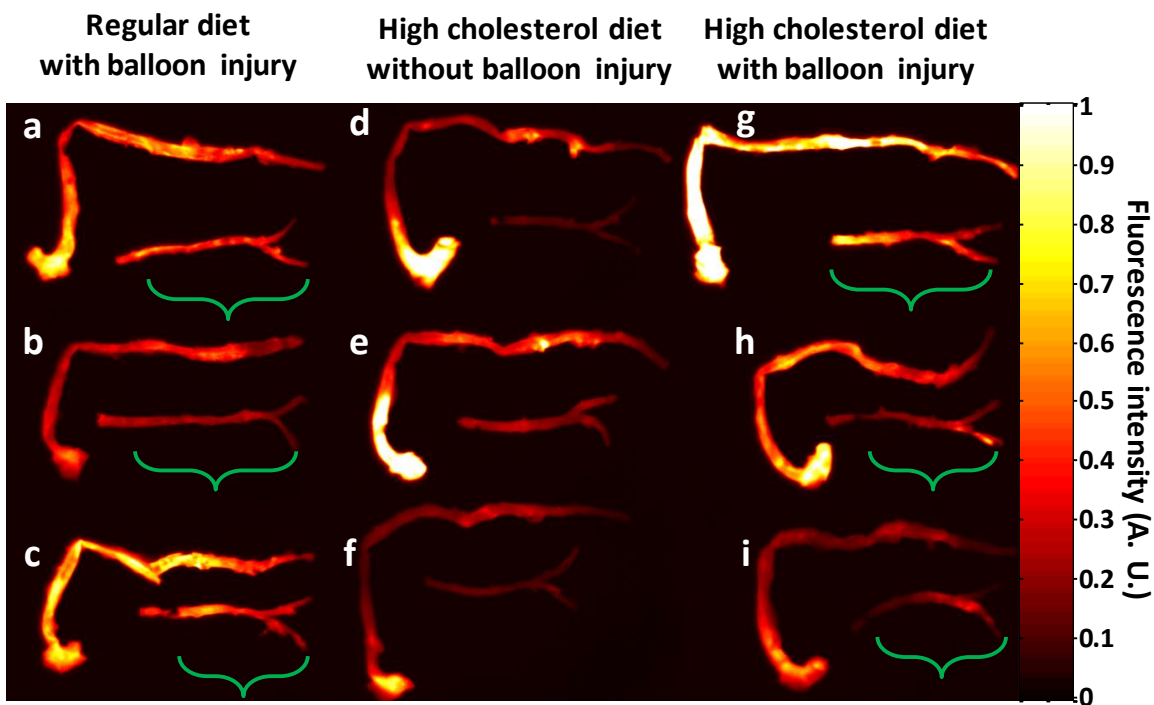


Figure 4-1 : *Ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) images of rabbit aortas. Rabbit aortas were cut in two sections to fit in the field of view of the imaging system. For each panel, the upper part represents the aortic arch, the thoracic aorta and the proximal abdominal aorta. The lower part represents the continuation of the abdominal aorta and the left (top) and right (bottom) iliac arteries. Green brackets indicate areas of balloon injury. A.U., arbitrary units.

Substantial ICG accumulation was observed in the aortic arch and the descending thoracic aorta (Fig. 4-1 a-i), as both regions are prone to atherosclerotic plaque formation given the increased shear stress oscillation. (D. N. Ku, Giddens, Zarins et Glagov, 1985) The ICG accumulation in these arterial segments was further enhanced in the cholesterol-enriched diet group.

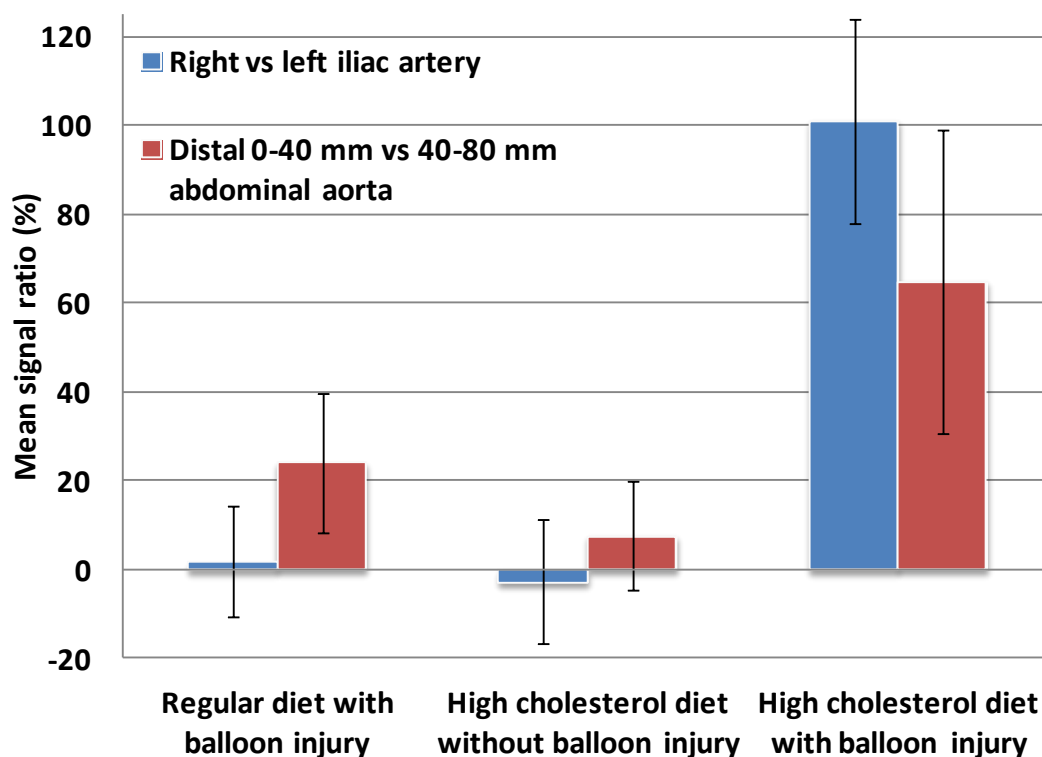


Figure 4-2 : Signal comparison for selected arterial segments in *ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) images. The distal 0-40 mm abdominal aorta and the right iliac artery are the balloon-injured regions, when performed. The ratios were obtained by dividing the mean right iliac artery (or distal 0-40 mm abdominal aorta) signal by the mean left iliac artery (or distal 40-80 mm abdominal aorta) signal for each animal. The error bars are the standard errors on the mean for the three rabbits of each group.

En face fluorescence and white light imaging are shown in Fig. 4-3. In rabbits fed a cholesterol-enriched diet, ICG-induced signal enhancement on fluorescence imaging was colocalized with severely diseased atherosclerotic vessel regions as identified by their opaque and white macroscopic appearance on white light (Fig. 4-3 c-f). Similarly, at sites of balloon injury, increased ICG accumulation was observed at sites of scar tissue formation (Fig. 4-3 a-b, and e-f).

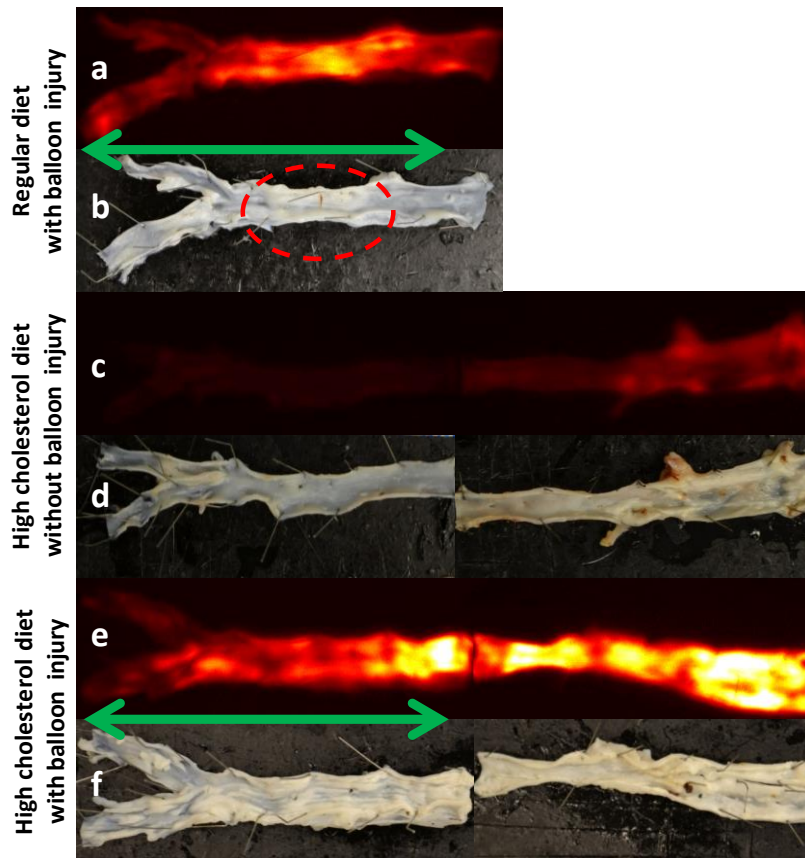


Figure 4-3 : Paired *ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) and white light images of three rabbit aortas, one for each group. (a, c, e) *Ex vivo* fluorescence images of excised aorta and iliac arteries showing increased ICG-accumulation in balloon-injured areas and in rabbits fed a cholesterol-enriched diet. (b, d, f) White light images of excised aorta and iliac arteries showing corresponding macroscopic plaque formation. The red circle shows scar tissue caused by the balloon injury. The green arrows show the regions that underwent balloon injury, including the right iliac artery (bottom).

4.3.2 *In vivo* intravascular ultrasound (IVUS) / near-infrared fluorescence (NIRF) imaging

The integration of fluorescence and IVUS imaging in a single catheter allows for simultaneous *in vivo* molecular and anatomical imaging of the vessel wall. The previously engineered dual-modality IVUS/NIRF imaging catheter system was utilized to assess whether ICG-induced fluorescence can be integrated into IVUS cross-sectional arterial images. Indocyanine green-induced 360-degree fluorescence signals, known to target macrophage-rich inflamed plaque

areas,(Vinegoni *et al.*, 2011) were integrated into cross-sectional IVUS images of the vessel wall (Fig. 4-4). NIRF signal enhancement was mainly observed at sites of increased echogenicity on IVUS imaging.

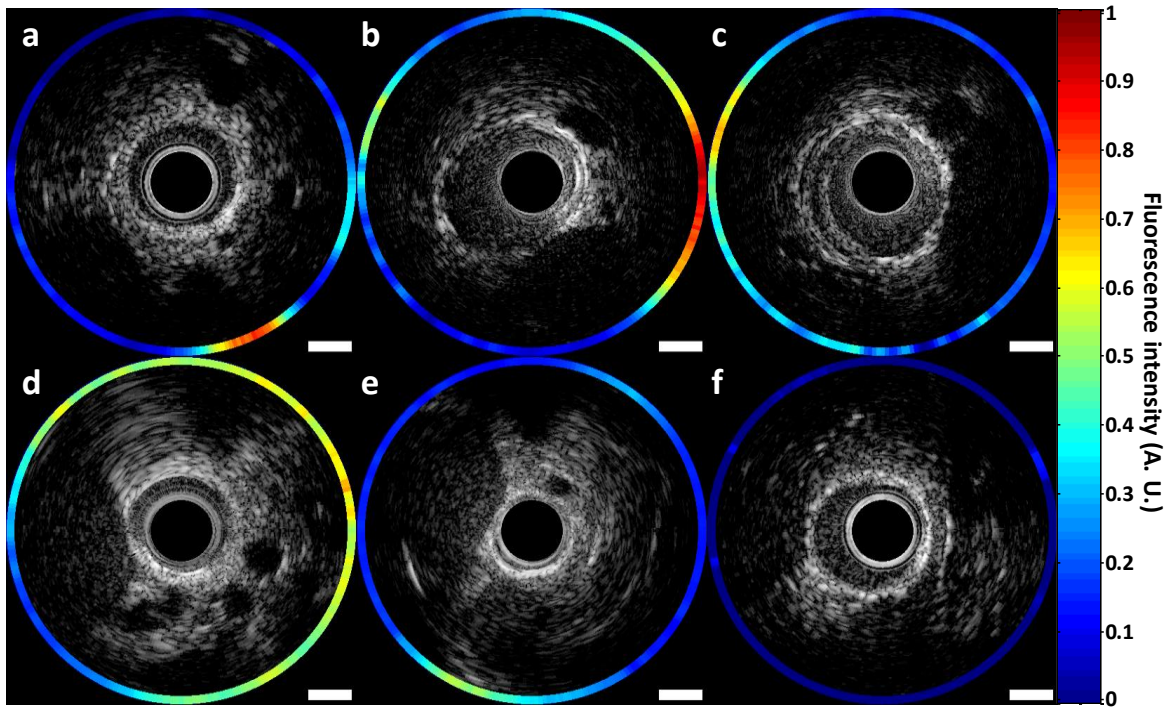


Figure 4-4 : Integrated intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) imaging *in vivo*. (a-e) Integrated IVUS/NIRF images of aortic segments of rabbits fed a cholesterol-enriched diet; (f) image of a rabbit on a regular diet, outside balloon-dilated area. The contour in the IVUS image represents the fluorescence signal intensity. Scale bar is 1 mm. A.U., arbitrary units.

Indocyanine green-induced signal enhancement *in vivo* was colocalized with fluorescence *ex vivo* as illustrated in Fig. 4-5. The cholesterol-enriched diet group that did not undergo balloon injury was excluded from this analysis as in this group, neither macroscopic plaque formation nor significant ICG-accumulation was observed in the abdominal aorta.

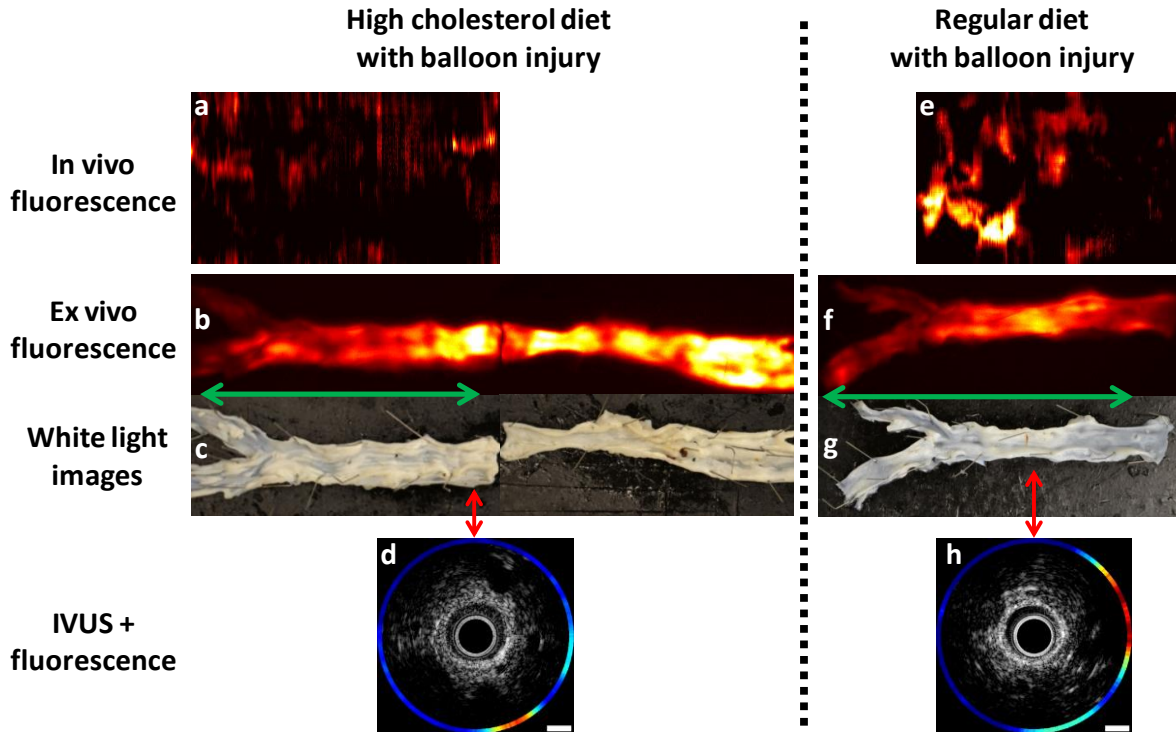


Figure 4-5 : Comparison of *in vivo* and *ex vivo* near-infrared fluorescence (NIRF) images and corresponding white light images of rabbit aortas. (a, e) *In vivo* fluorescence imaging; (b, f) corresponding *ex vivo* fluorescence imaging; (c, g) white light images of the abdominal aorta and iliac arteries of 2 balloon-injured rabbits. The green arrows show the regions that underwent balloon injury, including the right iliac artery (bottom). The red arrows show corresponding enhanced ICG-accumulation visible in both *in vivo* and *ex vivo* fluorescence imaging. (d, h) Integrated intravascular ultrasound (IVUS)/NIRF cross-sectional images at the locations indicated by the red arrows.

We observed that in some arterial segments, *in vivo* ICG-accumulation was stronger as compared to *ex vivo* fluorescence signal intensity while in others it was weaker (Fig. 4-6 a, c, d, f). These false positive signals may be due, at least in part, to blood attenuation given an increased distance between the catheter and the vessel wall due to increased vessel dimensions or an eccentric position of the catheter within the artery. Therefore, a compensation algorithm to adjust the fluorescence signal amplitude for blood attenuation was developed, and IVUS images were used to measure the distance between the catheter and the vessel wall at any angle and pullback position. Corrected ICG-induced fluorescence signals are shown in Fig. 4-6 (b, e and h). False

positive fluorescence detection was reduced after applying the signal compensation algorithm for *in vivo* fluorescence imaging.

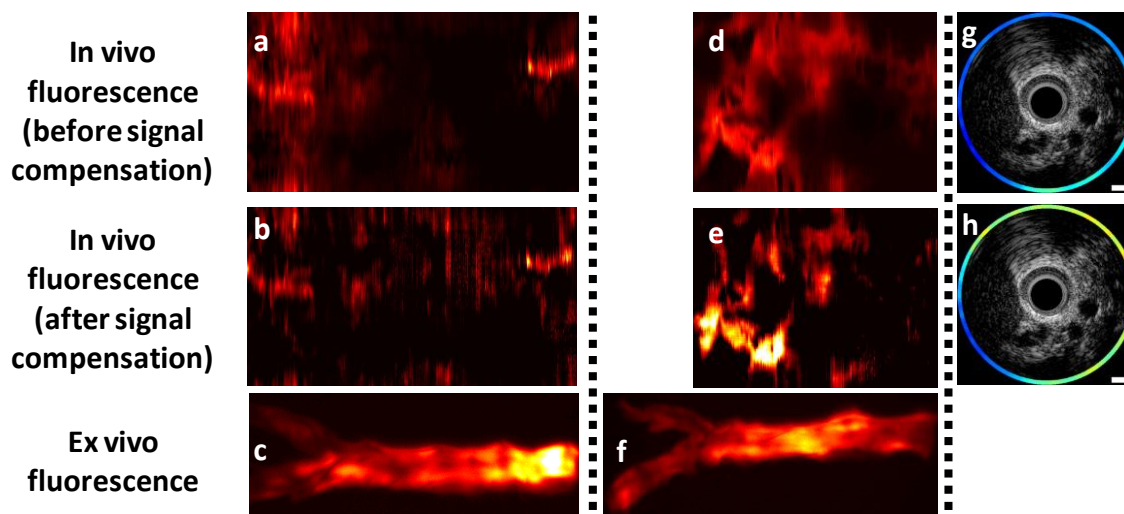


Figure 4-6 : Effect of blood attenuation compensation on *in vivo* fluorescence images. (a, d, g) *In vivo* fluorescence images of the abdominal aortas of 3 rabbits without blood attenuation compensation; (b, e, h) Corresponding *in vivo* fluorescence images after blood attenuation compensation; (c, f) Corresponding *ex vivo* fluorescence images; (g, h) Integrated intravascular ultrasound (IVUS)/near-infrared fluorescence (NIRF) cross-sectional images (g) without and (h) with blood attenuation compensation.

4.4 Discussion

This study validates our recently developed bimodal IVUS/NIRF catheter imaging system for *in vivo* plaque imaging in a rabbit model of atherosclerosis. The bimodal intravascular imaging system integrating both ICG-induced fluorescence and ultrasound imaging provided the capability to simultaneously acquire molecular and structural plaque characteristics. Further, a blood attenuation compensation algorithm to normalize the fluorescence signal intensity to the distance between the catheter and the arterial wall as measured by IVUS was introduced to enhance the accuracy of the imaging system. Indocyanine green fluorescence signal intensity *in vivo* was corroborated by corresponding *ex vivo* fluorescence and white light images of macroscopic atherosclerotic plaques.

4.4.1 Indocyanine green (ICG) and molecular plaque imaging

Acute coronary syndromes are mainly due to atherosclerotic plaque rupture, thrombus formation, and subsequent vessel occlusion.(M. Naghavi, 2003) Emerging molecular imaging strategies aim at identifying inflammatory plaque features, and thereby detecting high-risk plaques prone to rupture, and different molecular agents have been proposed. For over three decades, the fluorophore ICG has been widely used for different clinical applications including retinal and choroidal vessel imaging or intraoperative evaluation of coronary artery bypass graft patency with proven safety and efficacy.(Desai *et al.*, 2005; Desmettre, Devoisselle et Mordon, 2000) Moreover, ICG has previously been demonstrated to target lipid-loaded macrophages *in vitro*, and when utilized as molecular imaging agent to detect lipid-rich, inflamed coronary-sized plaques containing abundant macrophages in atherosclerotic rabbits *in vivo*.(Sunki Lee *et al.*, 2014; Ughi *et al.*, 2014; Vinegoni *et al.*, 2011; Yoneya *et al.*, 1998) Different animal models of atherosclerosis have been established, and are mainly based on pro-atherogenic diets and different types of vessel injury.(Jaffer *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2011) Since rabbit abdominal aorta and iliac arteries suit the typical dimensions of human coronary arteries, rabbit atherosclerosis models are widely used for intravascular imaging studies.(Busseuil *et al.*, 2008) Therefore, in this study, different rabbit atherosclerosis models, consisting of cholesterol-enriched diet and/or balloon injury, were utilized to investigate ICG imaging with our bimodal catheter. Balloon injury substantially enhanced ICG accumulation within the vessel wall, and, as expected, the combination of both atherosclerosis inducers was the most effective with this regard. However, ICG accumulation was also correlated with plaques in animals that did not undergo the balloon procedure confirming its potential to image macrophages in this model despite the absence of scar tissue. This is in distinction to previous studies using ICG with balloon-injured aortas,(Vinegoni *et al.*, 2011) as we demonstrated ICG accumulation in a more natural plaque development environment. Moreover, *ex vivo* ICG accumulation, corresponding with *in vivo* fluorescence signals, was colocalized with visible macroscopic plaque formation on aorta specimen. When integrating *in vivo* fluorescence into cross-sectional IVUS images of the arterial wall, enhanced fluorescence was mainly observed at sites of increased echogenicity, but some regions with lower echogenicity also displayed increased fluorescence. As plaque characterization solely by IVUS imaging is limited, fluorescence imaging adds important information on top of structural plaque characterization.

4.4.2 Bimodal imaging systems

With traditional fluorescence imaging systems, morphological information about arterial dimensions is lacking. The combination of both fluorescence and IVUS imaging allows for plaque visualization both at the molecular and morphological level, and thereby provides anatomical guidance for fluorescence signal interpretation. With the engineered catheter imaging system, simultaneous image acquisition with high temporo-spatial resolution at frame rates of 10 images/second were achieved,(Abran *et al.*, 2014) while previously reported multimodality imaging systems mainly utilized lower frame rates for fluorescence imaging with larger diameter catheters.

During *in vivo* fluorescence imaging, blood absorption of the fluorescence signal occurs depending on the distance between the catheter and the vessel wall. In the iliac arteries, intense ICG-induced fluorescence signals were observed *in vivo* which were not confirmed *ex vivo*. Separately, in larger arteries and when the imaging catheter was not centered in the vessel, despite substantial ICG accumulation *ex vivo*, only low signal intensity was observed *in vivo* given the increased distance between the catheter and the vessel wall. Hence, molecular and morphological imaging data need to be integrated to allow for an accurate interpretation of *in vivo* measured fluorescence signal intensity. In particular, as the intensity of the fluorescence signal attenuates with increasing distance from the catheter, fluorescence signals need to be adjusted for vessel dimensions. In this study, a blood attenuation compensation algorithm was developed based on measurements of the distance between the imaging catheter and the vessel wall to adjust fluorescence signals not only for vessel dimensions, but also for eccentric catheter positions. Application of the compensation algorithm clearly reduced false positive, and enhanced true positive fluorescence signals. Similarly, a distance-correction algorithm has previously been proposed for a bimodal OCT/NIRF imaging system.(Ughi *et al.*, 2014)

4.4.3 Limitations

The proposed compensation algorithm based on IVUS co-registration aimed at reducing the above-described inherent technical limitations, but was not able to overcome them completely. With the engineered catheter system and ICG as fluorophore, fluorescence could not be detected at catheter-vessel wall distance exceeding 1 mm, because the signal was too low. Therefore,

plaque analysis in both modalities together could be assessed only where the distance between the catheter and the arterial wall was below 1 mm, and vessels with a diameter between 2 mm and 3 mm were ideal for this experiment. SNR improvements could resolve this issue. Vessel occlusion and saline flushing might also be considered to increase the sensitivity of the catheter imaging system in larger arteries, and an over-the-wire approach may favor a centered catheter position. As only modest abdominal aorta and iliac plaque formation was observed in the cholesterol-enriched diet group, a more aggressive diet could have been used to further enhance plaque formation.

4.5 Conclusion

The bimodal IVUS/NIRF imaging catheter system, previously engineered by our group, was validated for *in vivo* plaque imaging in a rabbit atherosclerosis model. Simultaneously acquired IVUS/NIRF images of the vessel wall were acquired and allowed for an integrated molecular and structural analysis. Integrating molecular and IVUS imaging in a single catheter, ICG-based fluorescence for *in vivo* molecular imaging was further advanced, and in near future, the identification of lipid-rich, inflamed plaques prone to rupture might become possible. Thereby, high-resolution multimodality imaging technologies may provide new avenues for coronary plaque characterization utilized both in clinical practice and research applications.

4.6 Acknowledgments

Maxime Abran was supported by a doctoral scholarship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Barbara E. Stähli was supported by the Gottfried-und-Julia-Bangerter-Rhyner Foundation, the Novartis Foundation for Medical-Biological Research (13B067), and the Swiss Foundation for Medical-Biological Scholarships (SSMBS; No P3SMP3_151740/1).

This work was funded by a Canadian Institutes of Health Research (Lesage, and Tardif, #273578) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, 239876-2011) discovery grant to F. Lesage.

4.7 References

- M. D. Huffman, D. M. Lloyd-Jones, H. Ning, D. R. Labarthe, M. G. Castillo, M. O'Flaherty, E. S. Ford, and S. Capewell, "Quantifying Options for Reducing Coronary Heart Disease Mortality By 2020," *Circulation* 127, 2477–2484 (2013).
- P. Libby, "Inflammation in atherosclerosis," *Nature* 420, 868–874 (2002).
- P. Libby, "Atherosclerosis: Disease Biology Affecting the Coronary Vasculature," *Am. J. Cardiol.* 98, S3–S9 (2006).
- P. Libby, "Inflammation in atherosclerosis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2045–2051 (2012).
- J.-C. Tardif, J. Grégoire, P. L. L'Allier, R. Ibrahim, M.-A. Lavoie, M. LeMay, E. Cohen, S. Levesque, P.-F. Keller, T. Heinonen, and M.-C. Guertin, "Effect of atherosclerotic regression on total luminal size of coronary arteries as determined by intravascular ultrasound," *Am. J. Cardiol.* 98, 23–27 (2006).
- S.-J. Kang, G. S. Mintz, T. Akasaka, D.-W. Park, J.-Y. Lee, W.-J. Kim, S.-W. Lee, Y.-H. Kim, C. Whan Lee, S.-W. Park, and S.-J. Park, "Optical coherence tomographic analysis of in-stent neoatherosclerosis after drug-eluting stent implantation," *Circulation* 123, 2954–2963 (2011).
- S. Tahara, T. Morooka, Z. Wang, H. G. Bezerra, A. M. Rollins, D. I. Simon, and M. A. Costa, "Intravascular optical coherence tomography detection of atherosclerosis and inflammation in murine aorta," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1150–1157 (2012).
- S. E. Nissen and P. Yock, "Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications," *Circulation* 103, 604–616 (2001).

- F. A. Jaffer, M. A. Calfon, A. Rosenthal, G. Mallas, R. N. Razansky, A. Mauskopf, R. Weissleder, P. Libby, and V. Ntziachristos, "Two-Dimensional Intravascular Near-Infrared Fluorescence Molecular Imaging of Inflammation in Atherosclerosis and Stent-Induced Vascular Injury," *J Am Coll Cardiol* 57, 2516–2526 (2011).
- F. A. Jaffer, C. Vinegoni, M. C. John, E. Aikawa, H. K. Gold, A. V. Finn, V. Ntziachristos, P. Libby, and R. Weissleder, "Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis," *Circulation* 118, 1802–1809 (2008).
- M. Nahrendorf, F. A. Jaffer, K. A. Kelly, D. E. Sosnovik, E. Aikawa, P. Libby, and R. Weissleder, "Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis," *Circulation* 114, 1504–1511 (2006).
- L. Rouleau, R. Berti, V. W. K. Ng, C. Matteau-Pelletier, T. Lam, P. Saboural, A. K. Kakkar, F. Lesage, E. Rhéaume, and J.-C. Tardif, "VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice," *Contrast Media Mol. Imaging* 8, 27–39 (2013).
- B. M. Wallis de Vries, J.-L. Hillebrands, G. M. van Dam, R. A. Tio, J. S. de Jong, R. H. J. A. Slart, and C. J. Zeebregts, "Images in cardiovascular medicine. Multispectral near-infrared fluorescence molecular imaging of matrix metalloproteinases in a human carotid plaque using a matrix-degrading metalloproteinase-sensitive activatable fluorescent probe," *Circulation* 119, e534–536 (2009).
- J. Caesar, S. Shaldon, L. Chiandussi, L. Guevara, and S. Sherlock, "The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function," *Clin. Sci.* 21, 43–57 (1961).

- R. W. Flower and B. F. Hochheimer, "Indocyanine green dye fluorescence and infrared absorption choroidal angiography performed simultaneously with fluorescein angiography," *Johns Hopkins Med. J.* 138, 33–42 (1976).
- C. Vinegoni, I. Botnaru, E. Aikawa, M. A. Calfon, Y. Iwamoto, E. J. Folco, V. Ntziachristos, R. Weissleder, P. Libby, and F. A. Jaffer, "Indocyanine Green Enables Near-Infrared Fluorescence Imaging of Lipid-Rich, Inflamed Atherosclerotic Plaques," *Sci. Transl. Med.* 3, 84ra45 (2011).
- G. J. Ughi, J. Verjans, A. M. Fard, H. Wang, E. Osborn, T. Hara, A. Mauskapf, F. A. Jaffer, and G. J. Tearney, "Dual modality intravascular optical coherence tomography (OCT) and near-infrared fluorescence (NIRF) imaging: a fully automated algorithm for the distance-calibration of NIRF signal intensity for quantitative molecular imaging," *Int. J. Cardiovasc. Imaging* (2014).
- J.-C. Tardif, F. Lesage, F. Harel, P. Romeo, and J. Pressacco, "Imaging Biomarkers in Atherosclerosis Trials," *Circ. Cardiovasc. Imaging* 4, 319–333 (2011).
- D. N. Stephens, J. Park, Y. Sun, T. Papaioannou, and L. Marcu, "Intraluminal fluorescence spectroscopy catheter with ultrasound guidance," *J. Biomed. Opt.* 14, 030505 (2009).
- A. J. Dixon and J. A. Hossack, "Intravascular near-infrared fluorescence catheter with ultrasound guidance and blood attenuation correction," *J. Biomed. Opt.* 18, 56009 (2013).
- J. Bec, D. M. Ma, D. R. Yankelevich, J. Liu, W. T. Ferrier, J. Southard, and L. Marcu, "Multispectral fluorescence lifetime imaging system for intravascular diagnostics with ultrasound guidance: in vivo validation in swine arteries," *J. Biophotonics* 7, 281–285 (2014).

- M. Abran, G. Cloutier, M.-H. R. Cardinal, B. Chayer, J.-C. Tardif, and F. Lesage, "Development of a Photoacoustic, Ultrasound and Fluorescence Imaging Catheter for the Study of Atherosclerotic Plaque," *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* 8, 696–703 (2014).
- D. T. Delpy, M. Cope, P. van der Zee, S. Arridge, S. Wray, and J. Wyatt, "Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement," *Phys. Med. Biol.* 33, 1433 (1988).
- D. N. Ku, D. P. Giddens, C. K. Zarins, and S. Glagov, "Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 5, 293–302 (1985).
- M. Naghavi, "From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient: A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part II," *Circulation* 108, 1772–1778 (2003).
- T. Desmettre, J. M. Devoisselle, and S. Mordon, "Fluorescence Properties and Metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as Related to Angiography," *Surv. Ophthalmol.* 45, 15–27 (2000).
- N. D. Desai, S. Miwa, D. Kodama, G. Cohen, G. T. Christakis, B. S. Goldman, M. O. Baerlocher, M. P. Pelletier, and S. E. Fremes, "Improving the Quality of Coronary Bypass Surgery With Intraoperative Angiography Validation of a New Technique," *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 1521–1525 (2005).
- S. Yoneya, T. Saito, Y. Komatsu, I. Koyama, K. Takahashi, and J. Duvoll-Young, "Binding properties of indocyanine green in human blood," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 1286–1290 (1998).

- S. Lee, M. W. Lee, H. S. Cho, J. W. Song, H. S. Nam, D. J. Oh, K. Park, W.-Y. Oh, H. Yoo, and J. W. Kim, "Fully Integrated High-Speed Intravascular Optical Coherence Tomography/Near-Infrared Fluorescence Structural/Molecular Imaging In Vivo Using a Clinically Available Near-Infrared Fluorescence-Emitting Indocyanine Green to Detect Inflamed Lipid-Rich Atheromata in Coronary-Sized Vessels," *Circ. Cardiovasc. Interv.* 7, 560–569 (2014).
- H. Yoo, J. W. Kim, M. Shishkov, E. Namati, T. Morse, R. Shubochkin, J. R. McCarthy, V. Ntziachristos, B. E. Bouma, F. A. Jaffer, and G. J. Tearney, "Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging in vivo," *Nat. Med.* 17, 1680–1684 (2011).
- D. Busseuil, Y. Shi, M. Mecteau, G. Brand, A.-E. Kernaleguen, E. Thorin, J.-G. Latour, E. Rhéaume, and J.-C. Tardif, "Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits," *Br. J. Pharmacol.* 154, 765–773 (2008).

CHAPITRE 5 ARTICLE 3 : VALIDATING INTRAVASCULAR IMAGING WITH SERIAL OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY AND CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPY

Cette lettre a été soumise à la revue *Optics Letters* le 10 mars 2015. Les images obtenues en IVUS et en NIRF avec le système d'imagerie par cathéter conçu sont comparées avec un système d'histologie sérielle *ex vivo* à haute résolution en OCT et en microscopie confocale en fluorescence. Un lapin ayant reçu une diète riche en cholestérol afin de favoriser le développement de la plaque d'athérosclérose a été imagé *in vivo* avec le système par cathéter, puis *ex vivo* avec le système d'histologie sérielle. De l'ICG avait été injecté chez le lapin, afin de détecter la plaque en fluorescence. Une colocalisation précise a été effectuée entre les images IVUS et OCT.

Authors : Maxime Abran, Alexandre Castonguay, Barbara E. Stähli, Nolwenn Merlet, Teodora Mihalache-Avram, Mélanie Mecteau, Eric Rhéaume, David Busseuil, Jean-Claude Tardif, and Frédéric Lesage

Abstract : Atherosclerotic cardiovascular diseases are characterized by the formation of a plaque in the arterial wall. Intravascular ultrasound (IVUS) provides high-resolution images allowing delineation of atherosclerotic plaques. When combined with near infrared fluorescence (NIRF), the plaque can also be studied at a molecular level with a large variety of biomarkers. In this work, we present a system enabling automated volumetric histology imaging of excised aortas and correlate spatially results with combined IVUS/NIRF imaging of lipid-rich atheroma on a cholesterol-fed rabbit. Ex-vivo three-dimensional (3D) histology is performed combining optical coherence tomography and confocal fluorescence microscopy, providing high-resolution anatomical and molecular information. Colocalization of *in vivo* and *ex vivo* results is demonstrated.

Intravascular ultrasound (IVUS) imaging has been established as an adjunct imaging technology to coronary angiography, widely utilized both in clinical and research applications (Berry *et al.*, 2007; Mintz *et al.*, 2011). By generating *in vivo* cross-sectional images of the vessel wall and lumen, IVUS allows for a detailed characterization of atherosclerotic vessel segments, incorporating not only luminal dimensions and plaque burden, but also concomitant adaptive vessel responses. IVUS yields detailed information on morphological plaque features with

limited characterization of plaque composition, and emerging molecular imaging technologies, such as fluorescence imaging, have been developed to overcome these limitations. Multimodality imaging systems, such as the dual-modality IVUS/near-infrared fluorescence (NIRF) imaging catheter engineered by our group and others (Abran *et al.*, 2014; Bec *et al.*, 2012; Dixon et Hossack, 2013; Mallas *et al.*, 2012), have been designed for integrated microstructural and molecular plaque imaging, allowing for a more detailed plaque characterization.

Despite impressive advances in *in vivo* intravascular imaging, histology remains the gold standard for the identification of cellular and molecular components of the atherosclerotic plaque. Histology provides high-resolution cross-sectional images of the arterial wall, however, information is restricted to the limited number of cut sections analyzed, and colocalization with *in vivo* imaging is often challenged by the lack of anatomical landmarks and the limited resolution of IVUS imaging. Hence, as optical coherence tomography (OCT) provides structural information similar to ultrasound, but at higher spatial resolution (Tardif *et al.*, 2011), and confocal fluorescence microscopy visualizes the same molecular markers as NIRF (Pande, Kohler, Aikawa, Weissleder et Jaffer, 2006), an automated dual-modality imaging system incorporating both OCT and confocal fluorescence microscopy engineered by our group (Castonguay *et al.*, 2015) was used here for *ex vivo* imaging of an entire arterial segment.

In this work, we validate *in vivo* IVUS/NIRF and *ex vivo* OCT/confocal fluorescence microscopy imaging colocalization in a rabbit model of atherosclerosis and aim to evaluate the potential of the automated serial histology platform for the evaluation of intravascular molecular imaging techniques.

One male New Zealand White rabbit (3 kg, aged 12-13 weeks; Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada) was fed a cholesterol-enriched diet (0.5% cholesterol) for 14 weeks. The experimental protocol was approved by the animal ethics committee of the Montreal Heart Institute Research Center according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

For *in vivo* imaging, anesthesia was induced with intramuscular injections of ketamine (35 mg/kg) and buprenorphine (10 µg/kg), and maintained with inhaled isoflurane (3 to 5% v/v, Baxter, Deerfield, IL) and supplemental oxygen. Forty minutes after intravenous indocyanine green (ICG, 10 mg/kg) injection, the IVUS/NIRF imaging catheter was advanced under fluoroscopic guidance via a 5F introducer (Cordis Corporation, Fremont, CA), installed in the

right carotid artery. Automated imaging pullbacks were performed both in the abdominal aorta and the right iliac artery at a pullback speed of 0.5 mm/second and a frame rate of 10 images/second over a total length of 100 mm. The *in vivo* imaging system (Fig. 5-1), designed as an ultrasound-optical imaging catheter linked to an optical assembly and custom-made electronics, has previously been described (Abran *et al.*, 2014). The catheter combined an optical fiber for fluorescence imaging and an ultrasound transducer for acoustic imaging. The electronic circuit synchronized the acquisition with the two motors driving the rotating/translating catheter assembly. The raw data was then transferred to a laptop via a USB connection at rates up to 250 Mbps. A custom Matlab (The MathWorks, Inc, Natick, MA) user interface filtered the signals, reconstructed, and displayed the images in real time during acquisition.

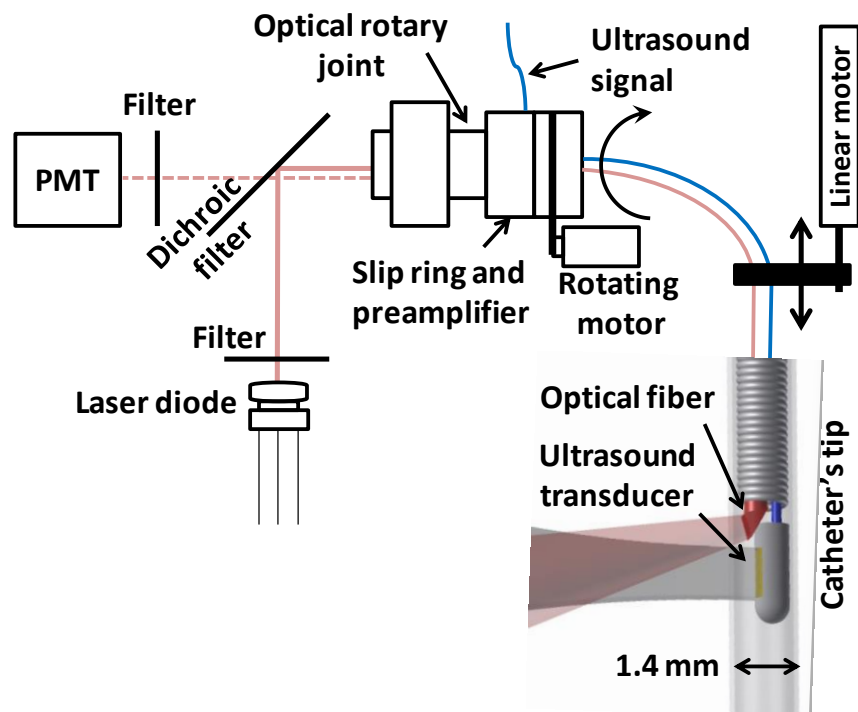


Figure 5-1: *In vivo* imaging system. Overview of the bimodal catheter system with a detailed view of the catheter's tip. PMT stands for photomultiplier tube.

Fluorescence excitation was performed using a 780 nm laser diode and emission was detected by a photomultiplier tube (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) combined with a bandpass optical filter (832 ± 19 nm). A compensation algorithm was used to adjust the fluorescence signal amplitude for blood attenuation.

After the *in vivo* imaging procedure, the animal was sacrificed by exsanguination under anesthesia, and tissues were perfused with Lactated Ringer's solution. The abdominal aorta and iliac arteries were harvested, immediately fixed in 4% formaldehyde, and kept at 4°C. The day of the *ex vivo* imaging procedures, the distal 20 mm of the abdominal aorta and the iliac arteries were installed in a 4% cylindrical agarose block, and 0.5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) added for tissue conservation. *Ex vivo* imaging was performed using a custom made automated serialized dual-modality setup for OCT and confocal fluorescence microscopy, incorporating a swept-source laser with a central wavelength of 1310 nm and a tuning bandwidth of 100 nm for OCT. The confocal laser passed through a filter cube before being reflected at 90° by a long pass dichroic mirror at 875 nm which allowed combining it to the OCT laser beam (Fig. 5-2), and permitting simultaneous acquisition of OCT and confocal data. Tissue samples embedded in agarose blocks were placed underneath a 10X water immersion objective. To overcome limited light penetration in the tissue and scattering from microscopic imaging, a vibratome allowed sequential sectioning of the tissue block face in order to reveal new tissue region to image. Following a previously described design (Ragan *et al.*, 2012), a dual flexure part isolated vibration of the blade from a DC motor on a one axis yielding precise cutting of the tissue. X and Y stages allowed moving the sample relative to the objective and imaging every sub-region (1 by 1 mm). After an entire section was imaged, a 200 µm slice of tissue was removed and the process was repeated automatically. For each slice, the Z position of the sample was adjusted in order to have the focus approximately 50 µm under the tissue surface, thus avoiding imaging of deformed tissue due to its slicing.

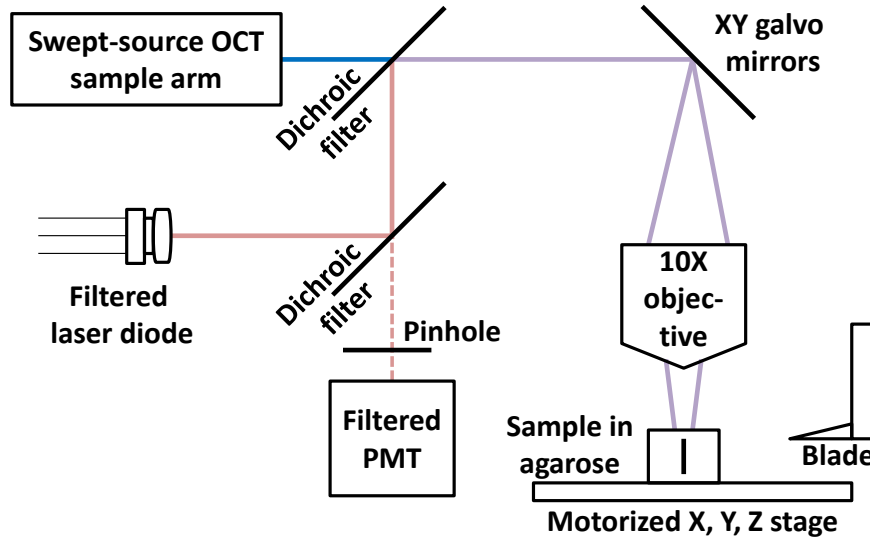


Figure 5-2: *Ex vivo* imaging system. Overview of the serial histology imaging system. PMT stands for photomultiplier tube.

The *ex vivo* imaging system generated cross-sectional OCT image slices with a pixel size of $2\ \mu\text{m}$ by $2\ \mu\text{m}$ and a depth of $6.5\ \mu\text{m}$. The resulting dataset had a size of over 500 GB. In fluorescence confocal microscopy, one cross-sectional image was obtained for each $200\ \mu\text{m}$ depth.

The images from both *in vivo* and *ex vivo* systems were analyzed using Matlab. Anatomical landmarks allowed for a precise sub-millimeter colocalization of *in vivo* and *ex vivo* images, along with the calculation of the shrinkage ratio of the excised tissue. To obtain three-dimensional (3D) reconstructions, imaging data was downsampled to a voxel size of $4\ \mu\text{m}$ by $4\ \mu\text{m}$ by $200\ \mu\text{m}$, converted in DICOM and loaded with Osirix (Pixmeo, Geneva, Switzerland). A maximum intensity projection algorithm was applied to generate a three-dimensional view of the vessels.

Ex vivo OCT imaging and confocal fluorescence microscopy were performed to validate the colocalization with *in vivo* images. When comparing *in vivo* and corresponding *ex vivo* vessel segments, an average shrink ratio of 61% was calculated. Using this ratio, a longitudinal colocalization with a precision of $200\ \mu\text{m}$ on the full imaged segment was achieved, as illustrated in Fig. 5-3 (a-h). Further, 3D vessel reconstruction in OCT was performed as shown in Fig. 5-3 (i).

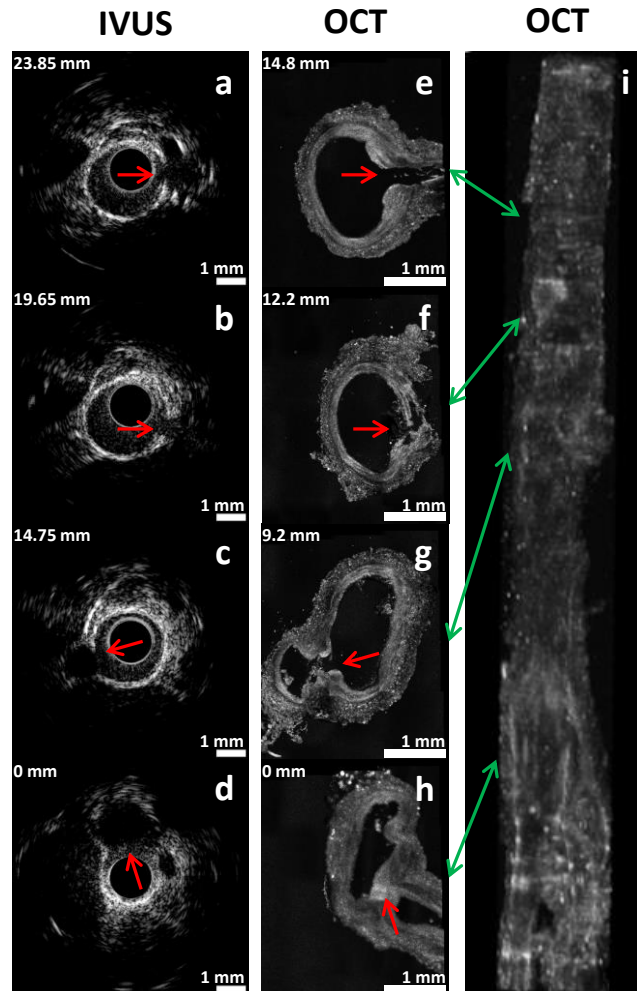


Figure 5-3: IVUS and OCT colocalization of anatomical landmarks. (a, b, c, d) *In vivo* IVUS cross-sectional images; (e, f, g, h) *Ex vivo* OCT cross-sectional images; (i) 3D reconstruction in OCT using a maximum intensity projection algorithm. Indicated numbers in mm (upper left of each image) represent the distances between the cross-section and the iliac bifurcation. The catheter was introduced in the right iliac artery, the bottom-right one in the OCT image in (h, i). Green arrows indicate the location of the cross-section slices on 3D reconstruction. Red arrows denote side branches (anatomical landmarks) used for colocalization.

Longitudinal views in both IVUS and OCT anatomical imaging are presented in Fig. 5-4. The abdominal aorta and iliac arteries are visible in both modalities. In *ex vivo* OCT imaging, the arterial wall is highly distorted given the lack of blood flow in fixed tissues.

In vivo ICG deposition identified with NIRF imaging was confirmed using high-resolution fluorescence confocal imaging, as shown in Fig. 5-5. The region presented in the figure

corresponded to intimal thickening as illustrated in OCT, which is an indication of the presence of plaque. Our rabbit atherosclerosis model generated thin fatty streaks in this section of the aorta, often not detectable with IVUS. As an example, in Fig. 5-5 (b), the intimal thickness varied from 100 μm to 200 μm (red arrows), a difference not perceptible in IVUS, which has a resolution of about 100 μm .

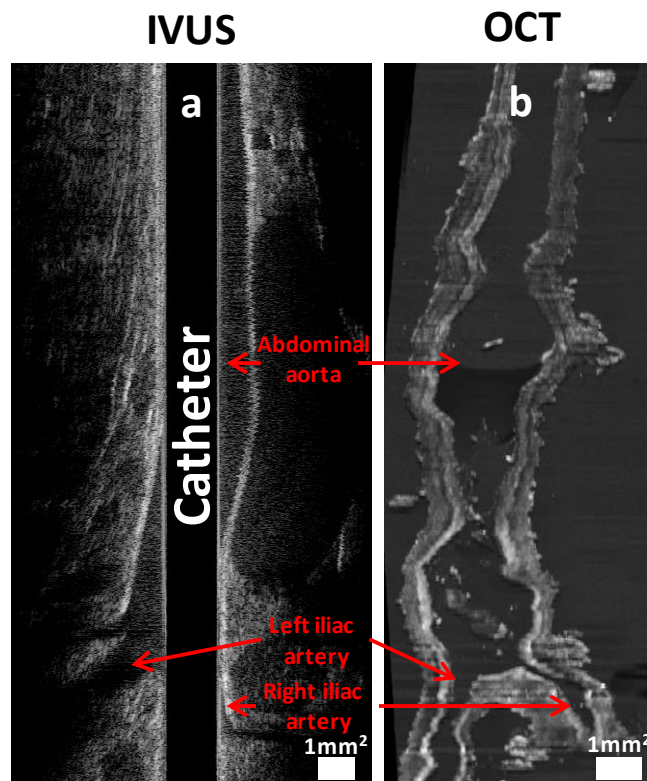


Figure 5-4: Longitudinal view of the abdominal aorta and iliac arteries in IVUS and OCT imaging. (a) *In vivo* IVUS image of a 50 mm long artery segment; (b) *Ex vivo* OCT image of the same segment, which shrunk to a length of 30 mm. Scale bars represent a region of 1 mm by 1 mm.

Enlarged region in the cross-sectional views in Fig. 5-5 clearly shows intimal thickening in *ex vivo* OCT images, as well as ICG accumulation on fluorescence confocal microscopy. Fluorescence confocal microscopy enabled a clear identification of ICG deposition in the arterial wall, providing a validation platform for *in vivo* measures that are often confounded by blood absorption and the lack of depth information.

In this study, we demonstrated the feasibility of colocalizing *in vivo* IVUS/NIRF and *ex vivo* OCT/confocal fluorescence microscopy imaging of inflamed arterial wall in a rabbit model of atherosclerosis. We were able to precisely colocalize ICG accumulation in *in vivo* and corresponding *ex vivo* images, and to achieve 3D image reconstruction for OCT.

The *in vivo* imaging system generated simultaneous IVUS and fluorescence images at a frame rate of 10 images per second with a catheter system compatible with a 5F introducer sheath. Similar multimodality catheters for *in vivo* plaque imaging combining IVUS and fluorescence have recently been presented (Bec *et al.*, 2012; Dixon et Hossack, 2013), but *ex vivo* imaging tools are required to validate their *in vivo* capabilities to precisely localize the fluorescence signal and to evaluate the blood attenuation compensation algorithms used for quantification.

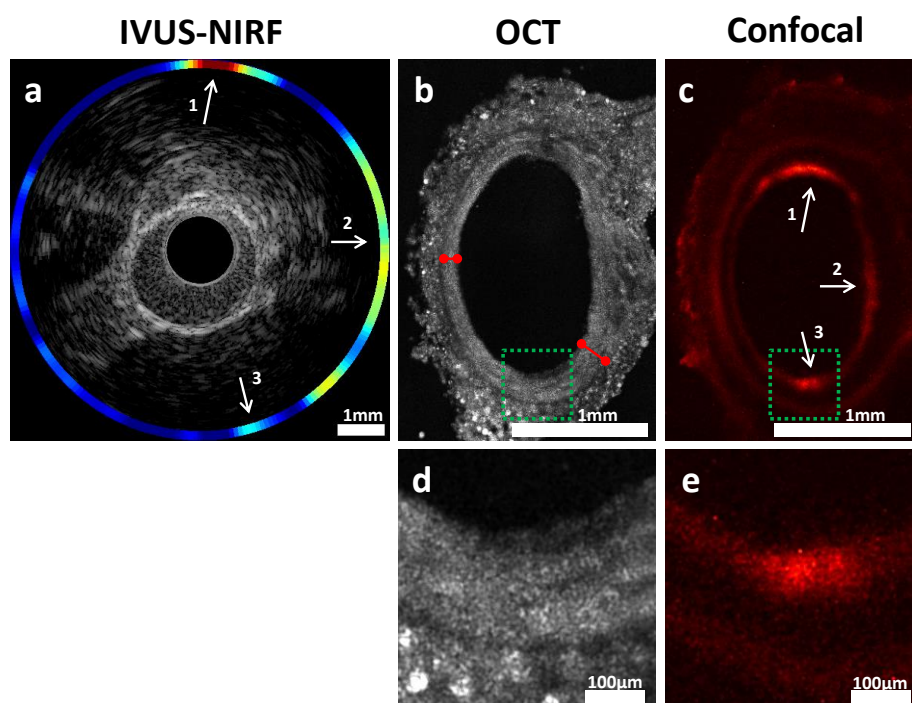


Figure 5-5: Cross-sectional view of the abdominal aorta. (a) IVUS-NIRF imaging *in vivo*; (b) OCT imaging *ex vivo*; (c) Confocal fluorescence microscopy imaging *ex vivo*; (d, e) Enlarged sections of the green region of (b, c). Red arrows identify the intimal thickness at two locations in the OCT image. White arrows indicate colocalization between *in vivo* and *ex vivo* fluorescence.

Arrow 3 shows a weaker colocalization due to the limitation of our blood attenuation compensation algorithm.

There are only a few studies providing simultaneous microstructural and molecular plaque imaging, both *in vivo* and *ex vivo* (Sunki Lee *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2012). The *ex vivo* imaging system engineered by our group comprises the advantages of OCT with a higher spatial resolution as compared to ultrasound, and renders possible an integrated 3D reconstruction algorithm for OCT. Vessel segments were colocalized on high-resolution IVUS and OCT images, and *in vivo* detection of ICG accumulation was validated by *ex vivo* imaging.

Our fixation and sacrifice technique led to tissue shrinkage and deformation due to the absence of blood flow. A perfusion-fixation technique to improve tissue preparation should benefit our serialized approach in future studies.

Given the comparable size of the rabbit aorta and human coronary arteries, the integrated *in vivo* imaging system could provide a new avenue for the visualization of inflamed vulnerable coronary plaques at increased risk of rupture. Another interesting avenue would be to perform intravascular OCT of a rabbit aorta and compare the images with *ex vivo* OCT. This would allow a better study of the origin of OCT contrast and the contrast dependence of the OCT beam direction when interrogating tissue.

Our next steps will be to extend the use of these imaging systems to different molecular probes for fluorescence imaging and other animal models of atherosclerosis. The advantage of *in vivo* characterization of atherosclerotic plaques, along with high-resolution *ex vivo* confirmation, renders the imaging system a promising approach for different research applications.

5.1 References

Abran, M., Cloutier, G., Cardinal, M.-H. R., Chayer, B., Tardif, J.-C. et Lesage, F. (2014).

Development of a Photoacoustic, Ultrasound and Fluorescence Imaging Catheter for the Study of Atherosclerotic Plaque. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 8(5), 696- 703. doi:10.1109/TBCAS.2014.2360560

Bec, J., Xie, H., Yankelevich, D. R., Zhou, F., Sun, Y., Ghata, N., ... Marcu, L. (2012). Design, construction, and validation of a rotary multifunctional intravascular diagnostic catheter combining multispectral fluorescence lifetime imaging and intravascular ultrasound.

Journal of Biomedical Optics, 17(10), 1060121- 10601210.

doi:10.1117/1.JBO.17.10.106012

Berry, C., L'Allier, P. L., Grégoire, J., Lespérance, J., Levesque, S., Ibrahim, R. et Tardif, J.-C. (2007). Comparison of intravascular ultrasound and quantitative coronary angiography for the assessment of coronary artery disease progression. *Circulation*, 115(14), 1851- 1857. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655654

Castonguay, A., Avti, P. K., Moeini, M., Pouliot, P., Tabatabaei, M. S., Bélanger, S. et Lesage, F. (2015). Investigating the correlation between white matter and microvasculature changes in aging using large scale optical coherence tomography and confocal fluorescence imaging combined with tissue sectioning. Dans *Proceedings of SPIE*. San Francisco (CA).

Dixon, A. J. et Hossack, J. A. (2013). Intravascular near-infrared fluorescence catheter with ultrasound guidance and blood attenuation correction. *Journal of Biomedical Optics*, 18(5), 56009. doi:10.1117/1.JBO.18.5.056009

Lee, S., Lee, M. W., Cho, H. S., Song, J. W., Nam, H. S., Oh, D. J., ... Kim, J. W. (2014). Fully Integrated High-Speed Intravascular Optical Coherence Tomography/Near-Infrared Fluorescence Structural/Molecular Imaging In Vivo Using a Clinically Available Near-Infrared Fluorescence-Emitting Indocyanine Green to Detect Inflamed Lipid-Rich Atheromata in Coronary-Sized Vessels. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 7(4), 560- 569. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.114.001498

Liang, S., Saidi, A., Jing, J., Liu, G., Li, J., Zhang, J., ... Chen, Z. (2012). Intravascular atherosclerotic imaging with combined fluorescence and optical coherence tomography

probe based on a double-clad fiber combiner. *Journal of Biomedical Optics*, 17(7), 070501. doi:10.1117/1.JBO.17.7.070501

Mallas, G., Brooks, D. H., Rosenthal, A., Nudelman, R. N., Mauskapf, A., Jaffer, F. A. et Ntziachristos, V. (2012). Improving quantification of intravascular fluorescence imaging using structural information. *Physics in Medicine and Biology*, 57(20), 6395- 6406. doi:10.1088/0031-9155/57/20/6395

Mintz, G. S., Garcia-Garcia, H. M., Nicholls, S. J., Weissman, N. J., Bruining, N., Crowe, T., ... Serruys, P. W. (2011). Clinical expert consensus document on standards for acquisition, measurement and reporting of intravascular ultrasound regression/progression studies. *EuroIntervention: Journal of EuroPCR in Collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*, 6(9), 1123- 1130, 9. doi:10.4244/EIJV6I9A195

Pande, A. N., Kohler, R. H., Aikawa, E., Weissleder, R. et Jaffer, F. A. (2006). Detection of macrophage activity in atherosclerosis in vivo using multichannel, high-resolution laser scanning fluorescence microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 11(2), 021009- 021009. doi:10.1117/1.2186337

Ragan, T., Kadiri, L. R., Venkataraju, K. U., Bahlmann, K., Sutin, J., Taranda, J., ... Osten, P. (2012). Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging. *Nature Methods*, 9(3), 255- 258. doi:10.1038/nmeth.1854

Tardif, J.-C., Lesage, F., Harel, F., Romeo, P. et Pressacco, J. (2011). Imaging Biomarkers in Atherosclerosis Trials. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 4(3), 319-333. doi:10.1161/CIRCIMAGING.110.962001

CHAPITRE 6 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

6.1 Résolution du cathéter

Les résolutions axiale, latérale et longitudinale ont été calculées pour les trois modalités d'imagerie. Puisque les résolutions varient avec la distance au cathéter, la mesure a été effectuée avec un objet placé à une distance de 2 mm du centre du cathéter. Comme le cathéter a un diamètre de 1,4 mm, l'objet était donc à 1,3 mm de la surface du cathéter. Les résultats sont présentés dans la figure suivante. En IVUS, la résolution a été obtenue en utilisant un fil de 15 μm de diamètre positionné parallèlement au cathéter dans un bassin d'eau. En photoacoustique et en fluorescence, des tubes ont été remplis d'encre et de fluorophore, respectivement, et déposés autour du cathéter dans un bassin d'intralipid et d'encre simulant les propriétés optiques du sang.

Tableau 6.1: Résolution mesurée à 2 mm du centre du cathéter pour les trois modalités d'imagerie.

	Axiale	Latérale	Longitudinale
IVUS	80 μm	200 μm	400 μm
Photoacoustique	100 μm	250 μm	500 μm
Fluorescence	Aucune	500 μm	500 μm

6.2 Aortes *ex vivo*

L'objectif 2 consistait à valider le système sur des fantômes et des tissus *ex vivo*. Les résultats sur fantômes ont été présentés dans le premier article. Des acquisitions en IVUS ont été effectuées sur des aortes excisées de lapins et conservées dans du paraformaldéhyde, qui étaient déposées dans un bassin de saline. La figure suivante représente des images IVUS de sections d'aorte abdominale sur des lapins ayant reçu une diète régulière ou riche en cholestérol.

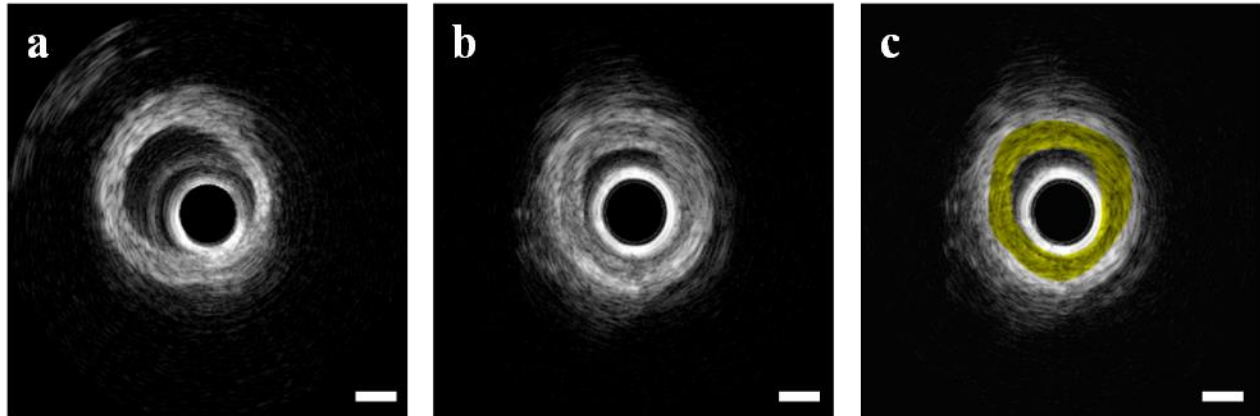


Figure 6-1: Images IVUS *ex vivo* d'aortes abdominales de lapin. (a) Aorte d'un lapin sain. (b) Aorte d'un lapin ayant reçu une diète riche en cholestérol. (c) Identique à (b), avec identification de la plaque en jaune.

Les deux aortes présentées dans la figure précédente diffèrent légèrement. On peut voir dans l'aorte du lapin ayant reçu une diète riche en cholestérol qu'il y a deux régions concentriques distinctes, ce qui est causé par un épaissement de l'intima de l'artère, caractérisé par la présence de plaque. Ainsi, en IVUS sur des tissus *ex vivo*, le système par cathéter conçu a la capacité de détecter la plaque d'athérosclérose.

6.3 Autre sonde fluorescente

L'ICG est la principale sonde fluorescente qui a été utilisée pour l'imagerie chez le lapin. Cependant, une autre sonde a été testée avec le cathéter. Il s'agit d'une sonde activable, ciblant les MMP-2 et MMP-9. Aucun résultat en NIRF n'a été obtenu *in vivo*. Les aortes excisées ont d'abord été coupées longitudinalement afin d'exposer la paroi interne, puis ont été imagées en fluorescence et les résultats sont présentés dans la figure suivante. L'appareil utilisé est un IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA).

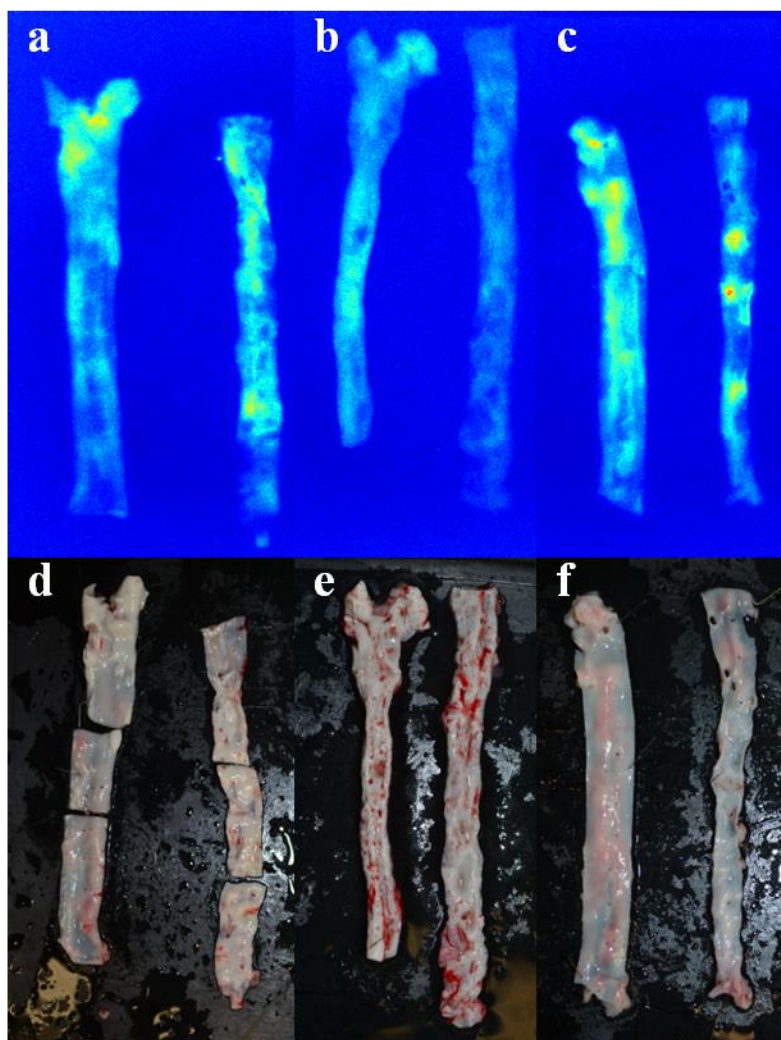


Figure 6-2: Analyse d'une sonde activable ciblant les MMP. (a), (b) et (c) représentent le signal de fluorescence sur les aortes de 3 lapins. (d), (e) et (f) sont les photographies correspondantes. Les lapins en (a), (b), (d) et (e) étaient sous une diète riche en cholestérol et le lapin en (c) et (f) était sous une diète régulière.

Ces résultats montrent que la sonde s'est fixée à la paroi artérielle des lapins à plusieurs endroits. Cependant, aucune colocalisation n'a été observée entre la présence de la sonde et la plaque visible.

6.4 Autres fonctionnalités du système

Les images IVUS typiques représentent des coupes transversales d'une artère. Cependant, le système conçu peut aussi afficher des coupes longitudinales, c'est-à-dire, afficher une position angulaire fixe tout au long de la distance de retrait, tel que montré à la figure suivante.

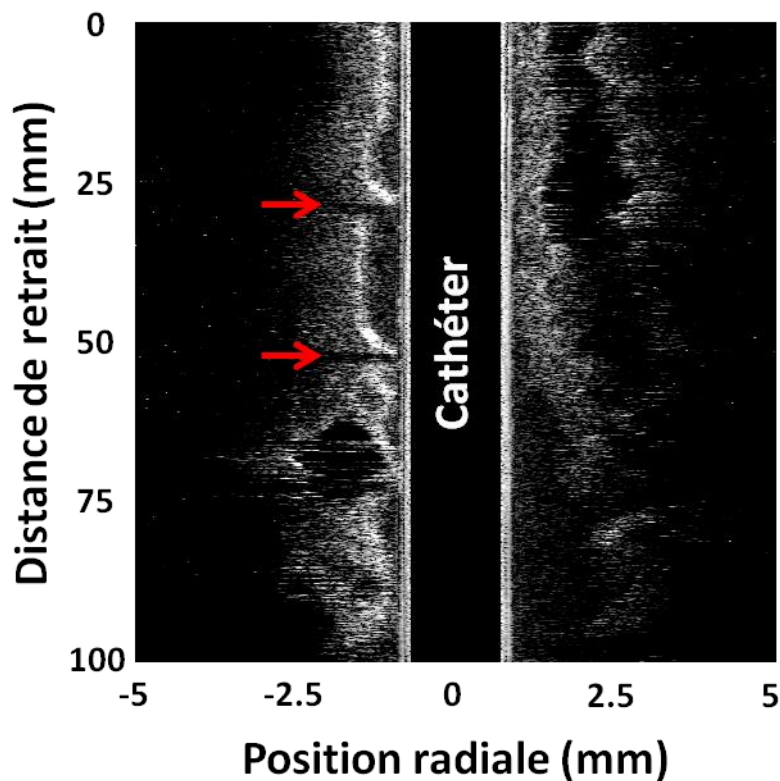


Figure 6-3: Coupe longitudinale en imagerie ultrasonore intravasculaire dans l'aorte d'un lapin.

Les flèches en rouge pointent sur des discontinuités dans la paroi et indiquent des artères connectées à l'aorte.

L'IVUS peut aussi être utilisée afin de calculer le rythme cardiaque du sujet. Pour ceci, on peut afficher l'évolution dans le temps de la mesure à un angle donné.

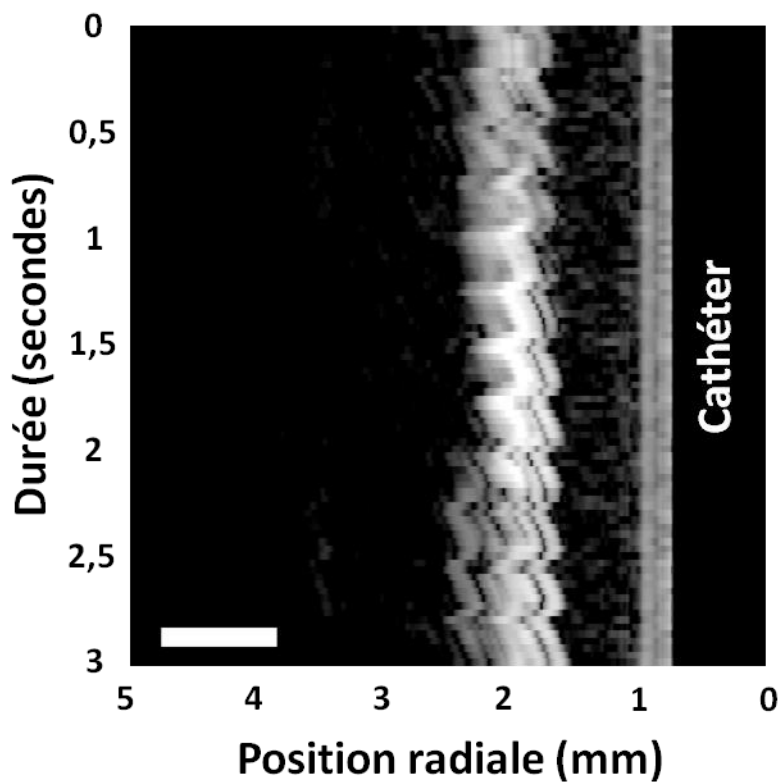


Figure 6-4: Évolution du signal à un angle donné en fonction du temps dans l'aorte d'un lapin.

Pour la figure précédente, l'acquisition était effectuée à 30 images/seconde. Puisqu'un cycle cardiaque durait en moyenne sept images, on peut calculer que le battement cardiaque du lapin était de 260 battements/minute.

CHAPITRE 7 DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME

7.1 Présentation du système conçu

La figure qui suit reprend le schéma-bloc de l'électronique du système, tel que présenté dans le premier article.

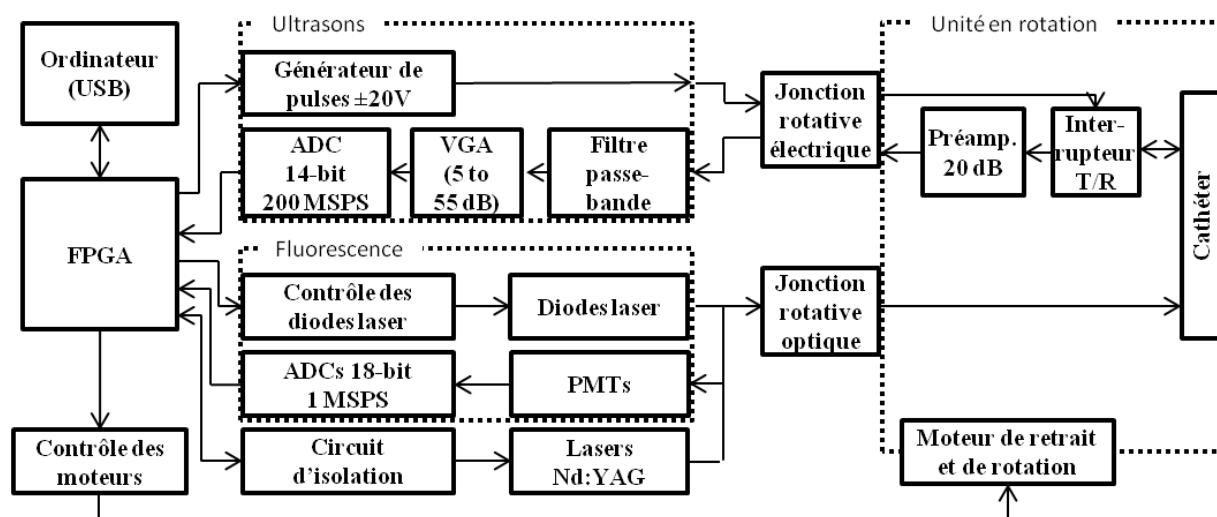


Figure 7-1: Schéma-bloc de l'électronique.

La photographie suivante expose l'intérieur du boîtier électronique. On y retrouve deux alimentations, dont une dédiée aux moteurs afin de limiter la propagation de bruit électronique vers les composants sensibles. Le système est composé de deux circuits imprimés. Le premier est une carte avec un FPGA, un lien USB et une mémoire SDRAM et le second est une carte qui contient toutes les composantes pour l'acquisition des signaux.

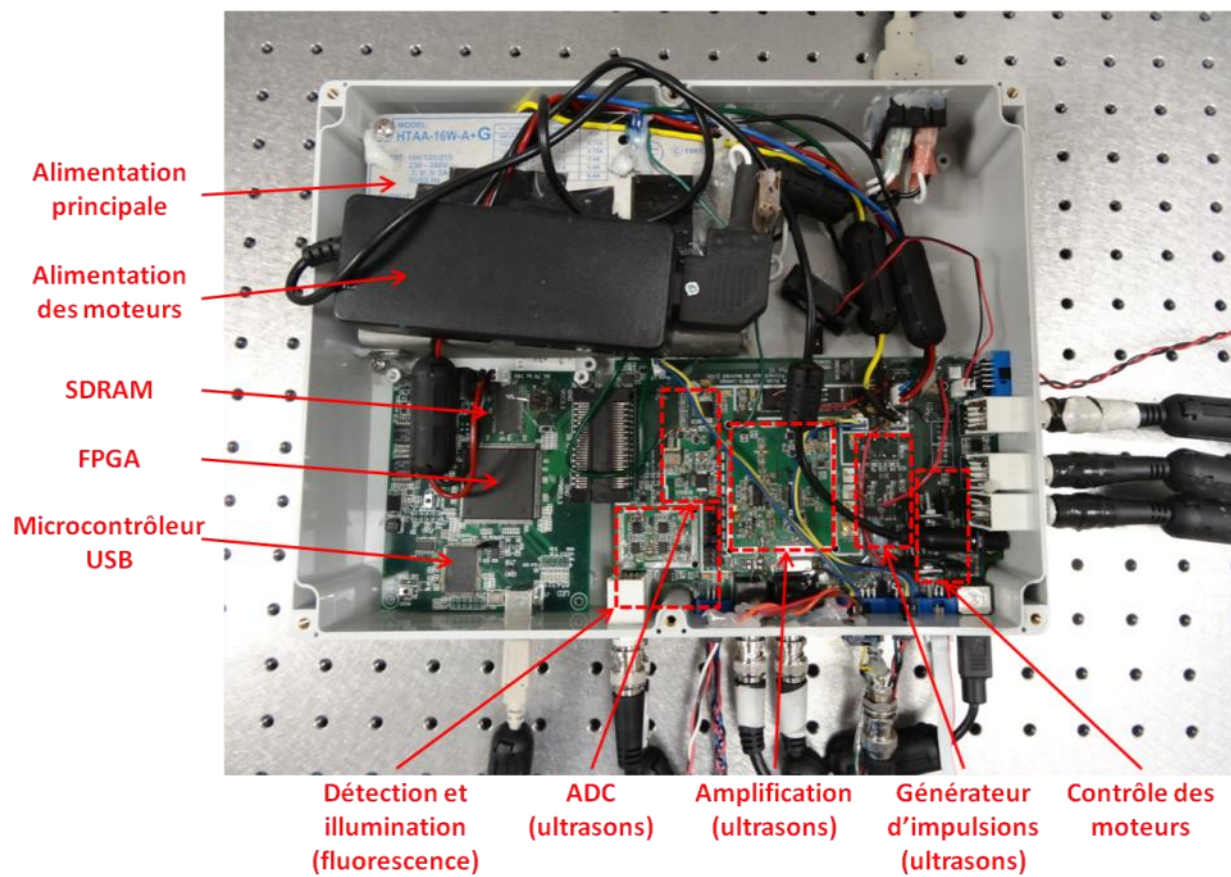


Figure 7-2: Photographie de l'intérieur du boîtier électronique.

Le boîtier électronique principal est relié à la base du cathéter qui est présentée dans la photo suivante. On y retrouve toute la partie optique pour l'imagerie de fluorescence, avec la possibilité d'ajouter le laser photoacoustique, qui n'est pas montré ici. Les moteurs sont assemblés à la base du cathéter, qui contient aussi un autre circuit imprimé, afin de préamplifier de 20 dB le signal ultrasonore. Le seuil de détection au niveau du cathéter est de $1,8 \mu\text{V}$, avec un gain total de 60 dB. Après le préamplificateur, ce seuil est de $10 \mu\text{V}$, soit une augmentation inférieure au gain de 20 dB, ce qui démontre bien l'intérêt de ce préamplificateur. Deux composantes primordiales au système sont les jonctions rotatives optiques et électriques qui permettent le passage du faisceau lumineux et des signaux électriques du cathéter en rotation vers le reste du montage qui est fixe.

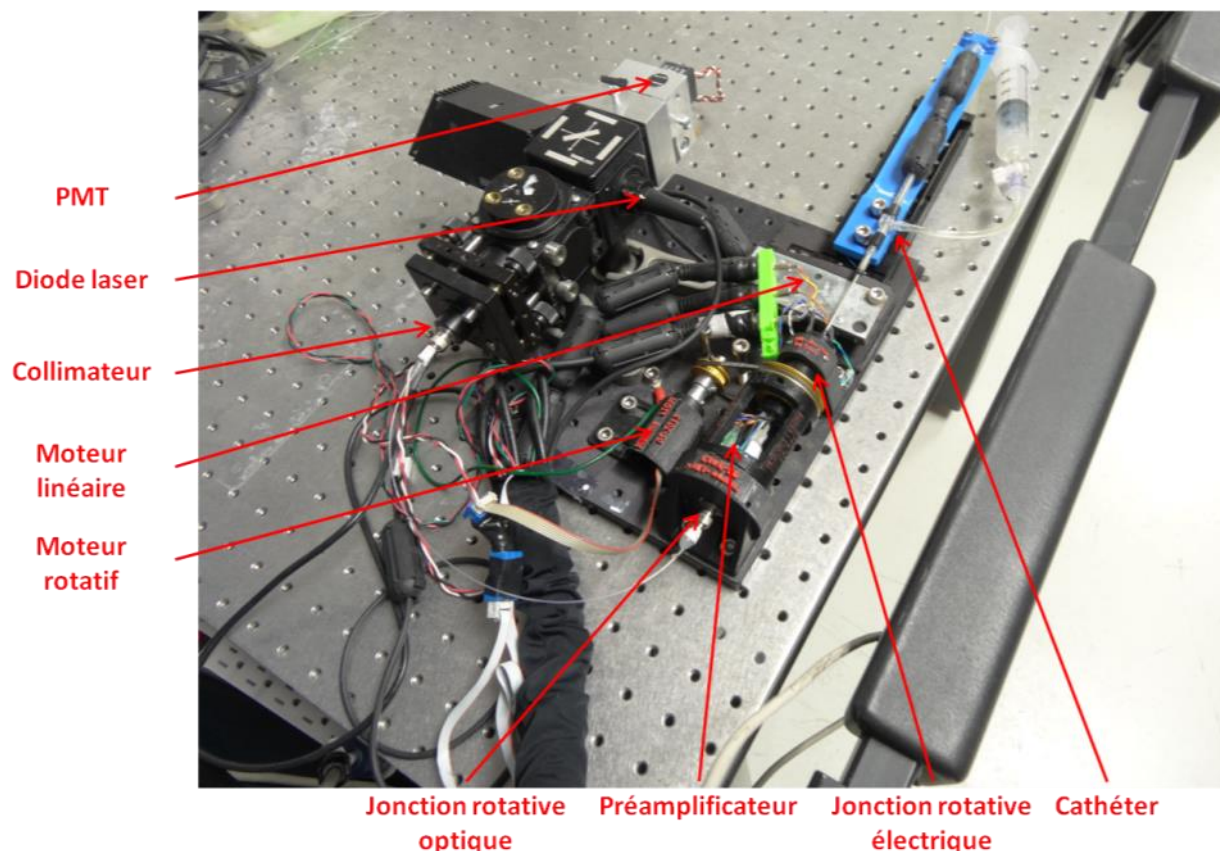


Figure 7-3: Photographie de la base du cathéter et du montage opto-mécanique.

Plusieurs pertes sont présentes sur le chemin optique. À travers le collimateur, la jonction rotative et le miroir au bout du cathéter, les pertes sont de 15%, 50% et 30% respectivement. Ainsi, le laser à 90 mW a une puissance d'environ 25 mW au bout du cathéter. Il en est de même pour le chemin inverse du signal de fluorescence.

Le seuil de détection optique de la PMT est 0,9 pW dans les conditions d'une acquisition, c'est-à-dire avec un temps d'exposition de 230 μ s et le laser en fonction.

7.2 Interface graphique

L'interface graphique a été programmée sur Matlab, compte tenu du grand nombre de calculs mathématiques à effectuer sur les données avant l'affichage. La figure suivante montre l'interface graphique suite à l'acquisition sur un fantôme dans les trois modalités d'imagerie.

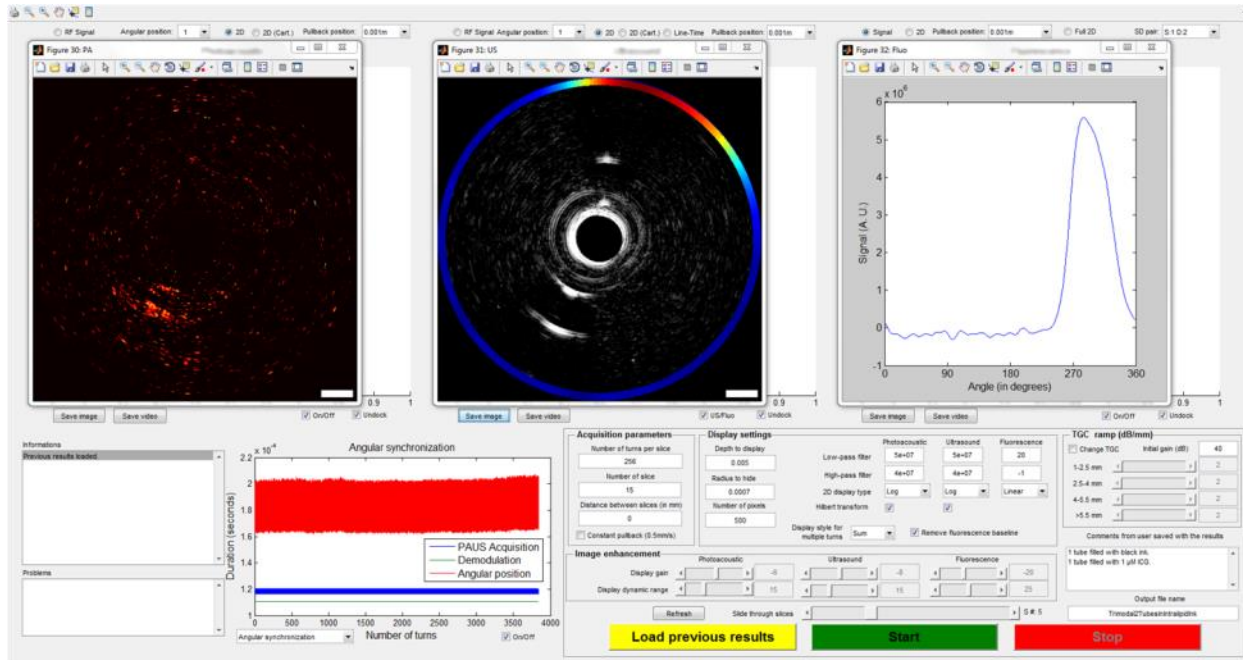


Figure 7-4: Capture d'écran de l'interface graphique.

En bas à droite, l'utilisateur peut sélectionner les paramètres de la prochaine acquisition ainsi que les paramètres d'affichage. Des boutons permettent de démarrer l'acquisition ou de charger les résultats d'une acquisition précédente. Pour cette dernière option, l'utilisateur peut naviguer parmi l'ensemble des données sauvegardées.

Trois graphiques permettent d'afficher les trois modalités d'imagerie en simultanément. Un quatrième graphique permet d'afficher des informations complémentaires, comme la vitesse du moteur, la mesure du temps passé à chaque position angulaire et d'autres informations utiles à l'utilisateur. Une boîte de texte permet également l'affichage de messages d'erreurs ou d'avertissements durant l'acquisition. Des options permettent de sauvegarder des images ou des séries d'images sous forme de vidéos des trois modalités d'imagerie.

7.3 Synchronisation avec les moteurs

Le système comporte deux moteurs. Le premier est un moteur rotatif à courant continu doté d'un encodeur optique pour connaître sa position angulaire. Le second est un stage motorisé avec un contrôleur intégré. L'acquisition des signaux a été synchronisée avec ces moteurs et ceci a été fait dans le code du FPGA.

La vitesse du moteur rotatif devait être la plus constante possible afin d'obtenir des acquisitions de qualité. La puissance envoyée au moteur était contrôlée par le FPGA. Cependant, cette puissance n'est pas directement proportionnelle à la vitesse de rotation, elle dépend beaucoup des variations de température et de charge. Ainsi, un contrôleur a été développé afin de maintenir une vitesse de rotation stable.

Chaque tour de cathéter a été divisé en 256 positions angulaires. Pour la vitesse de rotation de 30 tours/seconde, le cathéter était à une position angulaire donnée pour une durée moyenne de 130 μ s. Compte tenu de l'instabilité de la vitesse, cette durée variait de 100 à 140 μ s. Afin d'assurer une bonne détection de la position angulaire suivante, le moyennage des signaux en imagerie ultrasonore et en fluorescence durait au plus 95 μ s. En imagerie ultrasonore, ceci était suffisant pour effectuer 5 impulsion-écho pour chaque position angulaire.

Pour ce qui est du moteur linéaire, deux modes de déplacement étaient disponibles. Tout d'abord, le mode le plus simple était de déplacer le moteur d'une distance fixe, par exemple 0,1 mm, puis de prendre une image entre chaque déplacement. Ce mode permettait d'acquérir plusieurs images au même endroit, mais l'acquisition devait être interrompue durant le déplacement du moteur. Le second mode de déplacement a été privilégié pour les acquisitions *in vivo*. Au démarrage, le moteur était activé à une vitesse constante de 0,5 mm/s, puis l'acquisition était effectuée en continu. À 30 images/seconde, une image était acquise à chaque 17 μ m de tissu.

7.4 Synchronisation avec le laser photoacoustique

Un des principaux défis au niveau de l'imagerie photoacoustique a été la synchronisation du laser avec le moteur de rotation. Le laser pour la photoacoustique génère des impulsions de lumière à une fréquence de répétition de 20 Hz. Il peut prendre en entrée un signal de synchronisation, mais le laser doit tout de même être déclenché à 20 Hz \pm 5%. Afin de faciliter la synchronisation, le moteur rotatif était généralement employé à une vitesse de 20 tours/seconde. Ainsi, pour chaque tour, l'impulsion laser et l'acquisition photoacoustique était effectuée sur une seule position angulaire. Au premier tour, l'impulsion était appliqué à la position 1, au deuxième tour à la position 2 et ainsi de suite, jusqu'au 256e tour à la position 256. Le 257e tour n'avait aucune impulsion et l'acquisition pouvait reprendre au 258e tour avec la position 1.

Le même processus a aussi été programmé pour des vitesses de rotation de 5, 10 et 30 tours/seconde. Pour cette dernière vitesse, une acquisition photoacoustique était effectuée à chaque tour et demi.

L'acquisition ultrasonore et de fluorescence était effectuée à toutes les positions angulaires, contrairement à la photoacoustique. Le diagramme temporel suivant montre la synchronisation de l'acquisition tri-modale avec les moteurs et le laser.

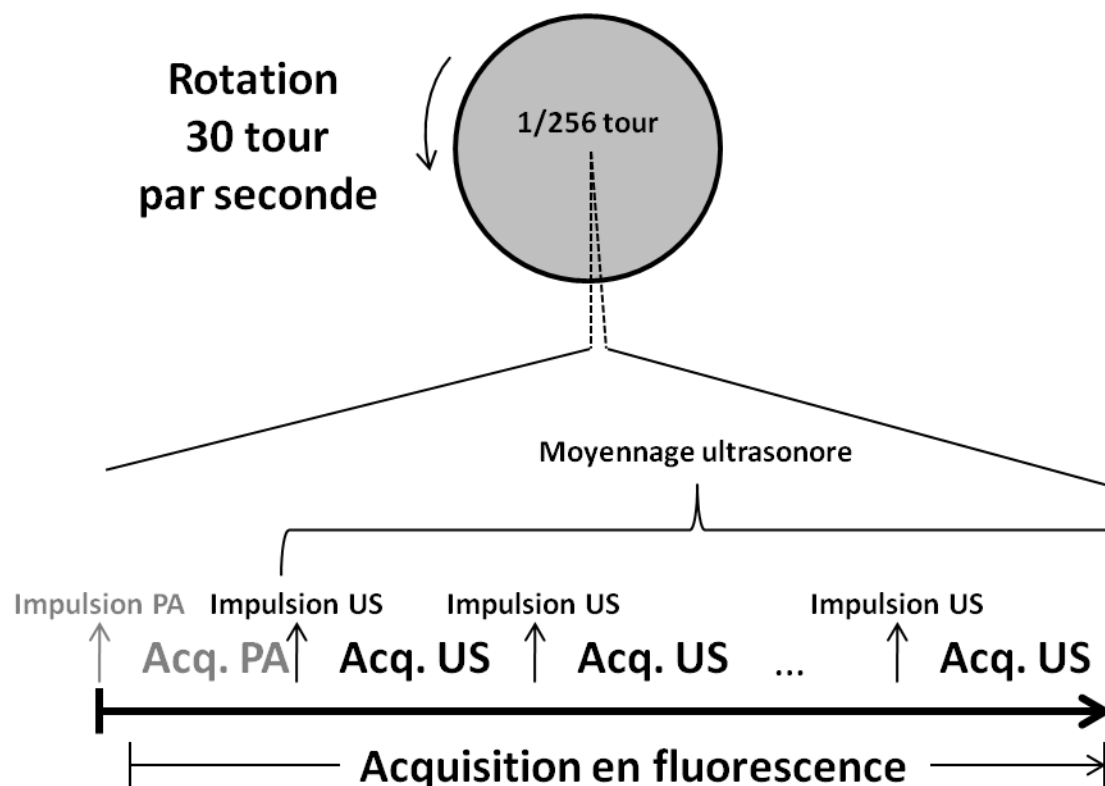


Figure 7-5: Diagramme temporel de l'acquisition tri-modale. L'impulsion et l'acquisition photoacoustique n'étaient pas effectuées à chaque position angulaire, mais plutôt à une moyenne de 20 Hz.

CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE

8.1 Objectif 1

L'objectif 1, soit de développer un système d'imagerie multimodal par cathéter, a été atteint en entier. L'hypothèse reliée à cet objectif était que l'intégration de trois modalités d'imagerie dans un cathéter était possible, pour l'utilisation chez le lapin. Le cathéter a un diamètre externe de 1,4 mm, ce qui est effectivement suffisamment petit pour l'imagerie de l'aorte abdominale du lapin. Le système permet d'effectuer l'imagerie des trois modalités d'imagerie en simultanément, soit l'IVUS, l'IVPA et la NIRF, avec un affichage en temps réel. L'IVE nécessite une analyse des signaux radiofréquences acquis en IVUS, ce qui est effectué après les acquisitions.

La description complète et détaillée du système est présentée dans le premier article. La technique de conception du cathéter, soit la composante principale du système, est décrite en annexe. Des instructions y sont fournies, ainsi que la liste des pièces qui ont été nécessaires. Les schémas des trois circuits imprimés sont aussi présentés en annexe.

Plusieurs modifications peuvent être apportées au niveau électronique, optique et mécanique. Quelques exemples sont présentés ici, pour une prochaine itération du système.

Le couplage électrique entre le cathéter en rotation et l'électronique se fait par une jonction rotative, alors que les cathéters commerciaux emploient un couplage inductif. Cette modification devrait être apportée pour une prochaine itération du cathéter, puisque les jonctions rotatives sont une source de bruit électronique non négligeable.

Le moteur rotatif causait des vibrations du montage opto-mécanique, ce qui était à la source de problèmes de stabilité de la diode laser en imagerie de fluorescence. Les pièces de support et le moteur pourraient être mieux assemblés, afin de réduire au minimum les vibrations. Le problème avait été partiellement réglé en déposant le montage opto-mécanique sur un coussin d'air.

Le laser employé pour l'imagerie photoacoustique durant ce projet comportait plusieurs défauts. Il était difficilement portable, compte tenu de sa taille, et la fréquence de répétition des impulsions était faible, ce qui augmentait la durée d'acquisition. L'investissement dans un laser plus petit et plus rapide serait à considérer pour l'imagerie *in vivo*. De plus, l'énergie des impulsions lasers à l'extrémité du cathéter était faible et pourrait être augmentée, afin d'obtenir

des images IVPA de meilleure qualité. Pour ce faire, des fibres optiques supportant une plus grande puissance devraient être employées.

L'utilisation de fibres optiques plus grosses permettait aussi de détecter plus de lumière en NIRF et ainsi atteindre une profondeur de pénétration supérieure. Cependant, il serait difficile d'effectuer ceci sans augmenter la taille du cathéter. Un détecteur optique plus sensible permettrait aussi d'augmenter le signal en fluorescence.

Afin d'augmenter la profondeur de détection en NIRF et en IVPA, le cathéter pourrait subir une modification afin de permettre de purger le lumen du vaisseau avec de la saline. Ceci permettrait de réduire la présence de sang dans le champ de vue optique du cathéter.

Finalement, la quantité de données qui est transférée du système à l'ordinateur est énorme, soit 250 Mbps. La connexion USB 2.0 est donc utilisée à pleine capacité. À quelques rares occasions, certains paquets de données ont été perdus durant une acquisition, en raison de la limite de cette connexion, principalement lorsqu'un autre appareil USB était branché à l'ordinateur. Pour une prochaine itération des circuits électroniques, une carte d'acquisition ayant une connexion USB 3.0 devrait être envisagée.

8.2 Objectif 2

L'objectif 2 consistait à valider le système sur fantômes et tissus *ex vivo*. Le système a été caractérisé grâce à divers fantômes simulant les propriétés acoustiques et optiques des tissus biologiques. Les seuils de détection ont été évalués en IVPA et en NIRF et la résolution spatiale a été mesurée pour l'IVUS. Il a également été démontré que les trois modalités d'imagerie peuvent être effectuées en simultané. L'IVE a été testée sur un fantôme dynamique, avec des résultats encourageants. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans le premier article, en combinaison avec la description du système.

L'hypothèse reliée à cette objectif était que la combinaison de marqueurs moléculaires et morphologiques, tels que défini par les trois modalités d'imagerie, devrait être plus avantageuse que l'utilisation d'une seule modalité. Les validations sur fantôme qui ont été effectuées ont permis de démontrer que le système pouvait mesurer plusieurs marqueurs moléculaires simultanément, tout en obtenant des images anatomiques dans des conditions similaires aux expériences *in vivo*. Il est clair que l'ajout de l'imagerie moléculaire, soit la photoacoustique et la

fluorescence, apporte un avantage significatif par rapport à l'utilisation de l'imagerie ultrasonore seule.

Les fantômes conçus simulaient les propriétés optiques du sang avec de l'encre et de l'intralipid ajoutés à de l'eau. Cependant, l'absorption de l'encre varie grandement selon le manufacturier et le spectre d'absorption est différent du sang. L'utilisation de sang complet hépariné provenant de lapins de laboratoire permettrait d'obtenir des fantômes beaucoup plus réalistes.

8.3 Objectif 3

L'objectif 3 vise la validation du système en imageant la plaque d'athérosclérose chez le lapin. Plusieurs lapins ont été imagés avec le cathéter et la plaque d'athérosclérose a été détectée en IVUS et en NIRF, après injection de la sonde ICG. Ces résultats sont présentés dans les articles 2 et 3 de ce projet. La combinaison de l'imagerie anatomique et moléculaire a permis une meilleure caractérisation de la plaque en corrigeant l'amplitude du signal de fluorescence pour l'absorption du sang, en utilisant la distance entre le cathéter et la paroi du vaisseau imagé, obtenue en IVUS. Les résultats *in vivo* avec le cathéter ont été comparés avec les images d'un système d'imagerie *ex vivo* à très haute résolution.

L'hypothèse de l'objectif 3 était que la détection de sondes moléculaires ciblées ou activables permettait de détecter et caractériser le développement de la plaque. L'ICG, une sonde fluorescente, a permis la détection de la plaque dans l'aorte de plusieurs lapins. Il a également été démontré que le système possède la capacité de détecter des sondes photoacoustiques, mais ceci n'a pas été validé *in vivo*, puisqu'aucune sonde moléculaire ayant un contraste photoacoustique n'était disponible durant le projet.

L'imagerie optique par cathéter représente un défi de taille, compte tenu de la grande absorption optique du sang. Il a été nécessaire de travailler dans les longueurs d'onde de la fenêtre optique, où le sang est moins absorbant. Malgré cela, en NIRF, la sonde ICG injectée chez le lapin n'a été détectée qu'à une profondeur maximale de 1 mm. En IVPA, la même profondeur de pénétration est prévue. Bien que plusieurs améliorations soient possibles au niveau du système, l'imagerie optique par cathéter reste une technique limitée aux petits vaisseaux.

La validation du cathéter *in vivo* chez le lapin n'a pas été possible en photoacoustique, puisqu'aucune sonde moléculaire compatible n'était disponible. La conception de sondes

photoacoustiques est une tâche complexe qui sort du contexte de cette thèse. Des sondes photoacoustiques pour la souris ont été développées et pourraient éventuellement être adaptées au lapin afin de procéder à cette validation. Toutefois, il a été démontré sur fantômes que le système a la capacité d'imager de tels marqueurs. L'étude de la plaque d'athérosclérose profiterait grandement de ces sondes, grâce à l'excellente résolution de l'imagerie photoacoustique.

En fluorescence, l'ICG a été le principal agent de contraste utilisé. Tel que montré dans les résultats, cette sonde est peu spécifique, puisqu'elle se fixe à la paroi artérielle saine. L'utilisation d'une sonde plus spécifique permettrait une meilleure étude de la plaque.

Une sonde activable ciblant les MMP-2 et MMP-9 a été développée par des collaborateurs. D'abord conçue pour la souris, elle a été adaptée pour le lapin. Dans le cadre de ce projet, elle a été testée sur 3 lapins, mais aucune colocalisation avec la plaque d'athérosclérose n'a été observée. Les recherches à propos de cette sonde méritent d'être approfondies, puisque la détection des MMPs *in vivo* avec un cathéter fournirait une information intéressante à propos de la plaque.

CHAPITRE 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Durant ce projet, un système d'imagerie par cathéter a été conçu et validé. Le système novateur combine plusieurs modalités d'imagerie dans le but d'étudier la plaque d'athérosclérose sur plusieurs aspects : IVUS, IVPA, NIRF et IVE. Cette thèse décrit en détail toutes les composantes du système, tant au niveau électronique, optique que mécanique. Puis, la caractérisation du système a été faite sur des fantômes adaptés aux modalités d'imagerie. Finalement, la capacité du système à imager la plaque d'athérosclérose chez le lapin a été démontrée.

Les résultats de cette thèse montrent que la combinaison de l'imagerie anatomique et moléculaire permet une étude plus détaillée de la plaque d'athérosclérose. En effet, l'imagerie moléculaire a le potentiel de détecter des plaques qui sont à un stade d'évolution plus précoce, alors que le dépôt lipidique est trop faible pour être visible en IVUS. L'imagerie moléculaire pourrait également permettre de localiser les plaques vulnérables, qui sont plus susceptibles de se rompre et mener à une thrombose et un infarctus du myocarde.

L'imagerie intravasculaire de la plaque chez l'humain se fait principalement en IVUS. À long terme, il serait avantageux de combiner une technique d'imagerie moléculaire, comme la fluorescence, afin de mieux étudier l'effet de médicaments. L'ICG est un fluorophore approuvé par la FDA pour une utilisation clinique, qui marque les macrophages gorgés de lipides et qui a permis la détection de plaques d'athérosclérose chez le lapin. Il serait intéressant d'évaluer son potentiel d'identification de plaques chez l'humain. Cependant, la translation chez l'humain nécessiterait un cathéter combinant l'imagerie de fluorescence et l'imagerie ultrasonore approuvé pour une utilisation clinique. Un travail d'ingénierie complexe serait requis pour s'assurer de la sécurité de l'électronique et du cathéter. Par exemple, une double isolation électrique devrait être ajoutée au circuit électronique. Pour le cathéter, un meilleur design serait requis pour s'assurer qu'aucune pièce ne se détache, comme le miroir, et n'aille obstruer les vaisseaux du patient. Le cathéter conçu pourrait par exemple être utilisé pour l'imagerie des coronaires en IVUS pour le suivi opératoire et post-opératoire de l'angioplastie et de la pose de stent, afin de vérifier la progression de la lésion.

Toutefois, les modèles animaux, tel que le lapin utilisé dans cette thèse, restent une option prometteuse pour étudier le développement de la plaque d'athérosclérose et pour valider de

nouveaux médicaments. Les études futures chez l'animal gagneraient à utiliser un cathéter multimodal, tel que celui conçu dans cette thèse.

BIBLIOGRAPHIE

- Abran, M., Cloutier, G., Roy Cardinal, M.-H., Chayer, B., Tardif, J.-C. et Lesage, F. (2014). Development of a Photoacoustic, Ultrasound and Fluorescence Imaging Catheter for the Study of Atherosclerotic Plaque. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 8(5), 696-703. doi:10.1109/TBCAS.2014.2360560
- Balamurugan, S., Agrawal, A., Kato, Y. et Sano, H. (2011). Intra operative indocyanine green video-angiography in cerebrovascular surgery: An overview with review of literature. *Asian Journal of Neurosurgery*, 6(2), 88-93. doi:10.4103/1793-5482.92168
- Ballou, B., Fisher, G. W., Hakala, T. R. et Farkas, D. L. (1997). Tumor detection and visualization using cyanine fluorochrome-labeled antibodies. *Biotechnology Progress*, 13(5), 649-658. doi:10.1021/bp970088t
- Barnett, P. A., Spence, J. D., Manuck, S. B. et Jennings, J. R. (1997). Psychological stress and the progression of carotid artery disease. *Journal of hypertension*, 15(1), 49-55.
- Bec, J., Ma, D. M., Yankelevich, D. R., Liu, J., Ferrier, W. T., Southard, J. et Marcu, L. (2014). Multispectral fluorescence lifetime imaging system for intravascular diagnostics with ultrasound guidance: in vivo validation in swine arteries. *Journal of Biophotonics*, 7(5), 281-285. doi:10.1002/jbio.201200220
- Bec, J., Xie, H., Yankelevich, D. R., Zhou, F., Sun, Y., Ghata, N., ... Marcu, L. (2012). Design, construction, and validation of a rotary multifunctional intravascular diagnostic catheter combining multispectral fluorescence lifetime imaging and intravascular ultrasound.

Journal of Biomedical Optics, 17(10), 1060121-10601210.
doi:10.1117/1.JBO.17.10.106012

Bec, J., Xie, H., Yankelevich, D., Zhou, F., Sun, Y., Ghata, N., ... Marcu, L. (2011). Design, construction, and validation of a multimodal intravascular diagnostic catheter combining IVUS and fluorescence lifetime spectroscopy detection channels (pp. 788337-788337-6).
doi:10.1117/12.875095

Becker, A., Riefke, B., Ebert, B., Sukowski, U., Rinneberg, H., Semmler, W. et Licha, K. (2000). Macromolecular contrast agents for optical imaging of tumors: comparison of indotricarbocyanine-labeled human serum albumin and transferrin. *Photochemistry and Photobiology*, 72(2), 234-241.

Berry, C., L'Allier, P. L., Grégoire, J., Lespérance, J., Levesque, S., Ibrahim, R. et Tardif, J.-C. (2007). Comparison of intravascular ultrasound and quantitative coronary angiography for the assessment of coronary artery disease progression. *Circulation*, 115(14), 1851-1857.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655654

Blank, A., Alexandrowicz, G., Muchnik, L., Tidhar, G., Schneiderman, J., Virmani, R. et Golan, E. (2005). Miniature self-contained intravascular magnetic resonance (IVMI) probe for clinical applications. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 54(1), 105-112. doi:10.1002/mrm.20537

Bloch, S., Lesage, F., McIntosh, L., Gandjbakhche, A., Liang, K. et Achilefu, S. (2005). Whole-body fluorescence lifetime imaging of a tumor-targeted near-infrared molecular probe in mice. *Journal of Biomedical Optics*, 10(5), 054003. doi:10.1117/1.2070148

- Bots, M. L., Hoes, A. W., Koudstaal, P. J., Hofman, A. et Grobbee, D. E. (1997). Common Carotid Intima-Media Thickness and Risk of Stroke and Myocardial Infarction The Rotterdam Study. *Circulation*, 96(5), 1432-1437. doi:10.1161/01.CIR.96.5.1432
- Bulte, J. et Arifin, D. R. (2010). Nanobiomaterials for Molecular Imaging. Dans *Nanobiomaterials Handbook*. Taylor & Francis US.
- Burtea, C., Laurent, S., Murariu, O., Rattat, D., Toubeau, G., Verbruggen, A., ... Muller, R. N. (2008). Molecular imaging of alpha v beta3 integrin expression in atherosclerotic plaques with a mimetic of RGD peptide grafted to Gd-DTPA. *Cardiovascular Research*, 78(1), 148-157. doi:10.1093/cvr/cvm115
- Busseuil, D., Shi, Y., Mecteau, M., Brand, G., Kernaleguen, A.-E., Thorin, E., ... Tardif, J.-C. (2008). Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits. *British Journal of Pharmacology*, 154(4), 765-773. doi:10.1038/bjp.2008.122
- Caballero, K., Barajas, J., Pujol, O., Salvatella, N. et Radeva, P. (2006). In-Vivo IVUS Tissue Classification: A Comparison Between RF Signal Analysis and Reconstructed Images. Dans J. Martínez-Trinidad, J. Carrasco Ochoa et J. Kittler (dir.), *Progress in Pattern Recognition, Image Analysis and Applications* (vol. 4225, pp. 137-146). Springer Berlin / Heidelberg. Repéré à <http://www.springerlink.com/content/72t6677853571027/abstract/>
- Caesar, J., Shaldon, S., Chiandussi, L., Guevara, L. et Sherlock, S. (1961). The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. *Clinical Science*, 21, 43-57.
- Cai, J.-M., Hatsukami, T. S., Ferguson, M. S., Small, R., Polissar, N. L. et Yuan, C. (2002). Classification of Human Carotid Atherosclerotic Lesions With In Vivo Multicontrast

Magnetic Resonance Imaging. *Circulation*, 106(11), 1368-1373.
doi:10.1161/01.CIR.0000028591.44554.F9

Calfon, M. A., Vinegoni, C., Ntziachristos, V. et Jaffer, F. A. (2010). Intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of atherosclerosis: toward coronary arterial visualization of biologically high-risk plaques. *Journal of Biomedical Optics*, 15(1), 011107.
doi:10.1117/1.3280282

Castonguay, A., Avti, P. K., Moeini, M., Pouliot, P., Tabatabaei, M. S., Bélanger, S. et Lesage, F. (2015). Investigating the correlation between white matter and microvasculature changes in aging using large scale optical coherence tomography and confocal fluorescence imaging combined with tissue sectioning. Dans *Proceedings of SPIE*. San Francisco (CA).

Catheline, S., Wu, F. et Fink, M. (1999). A solution to diffraction biases in sonoelasticity: The acoustic impulse technique. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 105(5), 2941-2950. doi:10.1121/1.426907

Chau, Y.-F., Yeh, H.-H., Liao, C.-C., Ho, H.-F., Liu, C.-Y. et Tsai, D. P. (2010). Controlling surface plasmon of several pair arrays of silver-shell nanocylinders. *Applied Optics*, 49(7), 1163-1169. doi:10.1364/AO.49.001163

Chen, J., Tung, C.-H., Mahmood, U., Ntziachristos, V., Gyurko, R., Fishman, M. C., ... Weissleder, R. (2002). In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation*, 105(23), 2766-2771.

Cochlin, D. L., Ganatra, R. H. et Griffiths, D. F. R. (2002). Elastography in the detection of prostatic cancer. *Clinical Radiology*, 57(11), 1014-1020.

- Cubeddu, R., Pifferi, A., Taroni, P., Torricelli, A. et Valentini, G. (1997). A solid tissue phantom for photon migration studies. *Physics in Medicine and Biology*, 42(10), 1971.
doi:10.1088/0031-9155/42/10/011
- Deftereos, S., Giannopoulos, G., Kossyvakis, C. et Pyrgakis, V. N. (2010). Virtual histology. *Hellenic journal of cardiology: HJC = Hellēnikē kardiologikē epitheōrēsē*, 51(3), 235-244.
- Deguchi, J., Aikawa, M., Tung, C.-H., Aikawa, E., Kim, D.-E., Ntziachristos, V., ... Libby, P. (2006). Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation*, 114(1), 55-62.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.619056
- De Korte, C. L., Lopata, R. G. ., Hansen, H. H. ., Nillesen, M. M., Idzenga, T., Kapusta, L. et Thijssen, J. M. (2011). Functional cardiovascular ultrasound imaging: Quantification of plaque vulnerability and cardiac function. Dans *2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro* (pp. 1610-1613). IEEE.
doi:10.1109/ISBI.2011.5872711
- De Korte, C. L., Pasterkamp, G., van der Steen, A. F., Woutman, H. A. et Bom, N. (2000). Characterization of plaque components with intravascular ultrasound elastography in human femoral and coronary arteries in vitro. *Circulation*, 102(6), 617-623.
- De Korte, C. L., van der Steen, A. F., Cépedes, E. I., Pasterkamp, G., Carlier, S. G., Mastik, F., ... Bom, N. (2000). Characterization of plaque components and vulnerability with intravascular ultrasound elastography. *Physics in Medicine and Biology*, 45(6), 1465-1475.

- De Korte, C. L., van der Steen, A. F. W., Céspedes, E. I. et Pasterkamp, G. (1998). Intravascular Ultrasound Elastography in Human Arteries: Initial Experience In Vitro. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 24(3), 401-408. doi:10.1016/S0301-5629(97)00280-9
- De la Zerda, A., Bodapati, S., Teed, R., May, S. Y., Tabakman, S. M., Liu, Z., ... Gambhir, S. S. (2012). Family of enhanced photoacoustic imaging agents for high-sensitivity and multiplexing studies in living mice. *ACS Nano*, 6(6), 4694-4701. doi:10.1021/nn204352r
- Delpy, D. T., Cope, M., Zee, P. van der, Arridge, S., Wray, S. et Wyatt, J. (1988). Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement. *Physics in Medicine and Biology*, 33(12), 1433. doi:10.1088/0031-9155/33/12/008
- Desai, N. D., Miwa, S., Kodama, D., Cohen, G., Christakis, G. T., Goldman, B. S., ... Frenes, S. E. (2005). Improving the Quality of Coronary Bypass Surgery With Intraoperative Angiography Validation of a New Technique. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(8), 1521-1525. doi:10.1016/j.jacc.2005.05.081
- Desmettre, T., Devoisselle, J. M. et Mordon, S. (2000). Fluorescence Properties and Metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as Related to Angiography. *Survey of Ophthalmology*, 45(1), 15-27. doi:10.1016/S0039-6257(00)00123-5
- Destrempe, F., Roy Cardinal, M.-H., Allard, L., Tardif, J.-C. et Cloutier, G. (2014). Segmentation method of intravascular ultrasound images of human coronary arteries. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 38(2), 91-103. doi:10.1016/j.compmedimag.2013.09.004

- Di Carli, M. F. (2004). Advances in positron emission tomography. *Journal of nuclear cardiology: official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*, 11(6), 719-732.
- Dickinson, M. E., Bearman, G., Tille, S., Lansford, R. et Fraser, S. E. (2001). Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy. *BioTechniques*, 31(6), 1272, 1274-1276, 1278.
- Dixon, A. J. et Hossack, J. A. (2013). Intravascular near-infrared fluorescence catheter with ultrasound guidance and blood attenuation correction. *Journal of Biomedical Optics*, 18(5), 56009. doi:10.1117/1.JBO.18.5.056009
- Elliott, M. R. et Thrush, A. J. (1996). Measurement of resolution in intravascular ultrasound images. *Physiological Measurement*, 17(4), 259. doi:10.1088/0967-3334/17/4/003
- Fenster, A., Downey, D. B. et Cardinal, H. N. (2001). Three-dimensional ultrasound imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 46(5), R67. doi:10.1088/0031-9155/46/5/201
- Finn, A. V., Kolodgie, F. D. et Virmani, R. (2010). Correlation Between Carotid Intimal/Medial Thickness and Atherosclerosis A Point of View From Pathology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(2), 177-181. doi:10.1161/ATVBAHA.108.173609
- Flower, R. W. et Hochheimer, B. F. (1976). Indocyanine green dye fluorescence and infrared absorption choroidal angiography performed simultaneously with fluorescein angiography. *The Johns Hopkins Medical Journal*, 138(2), 33-42.
- Fromageau, J., Gennisson, J.-L., Schmitt, C., Maurice, R. L., Mongrain, R. et Cloutier, G. (2007). Estimation of polyvinyl alcohol cryogel mechanical properties with four ultrasound

elastography methods and comparison with gold standard testings. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 54(3), 498-509.

Galanzha, E. I., Shashkov, E. V., Tuchin, V. V. et Zharov, V. P. (2008). In vivo multispectral, multiparameter, photoacoustic lymph flow cytometry with natural cell focusing, label-free detection and multicolor nanoparticle probes. *Cytometry Part A*, 73A(10), 884-894. doi:10.1002/cyto.a.20587

Garcia, M. A. (2011). Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(28), 283001. doi:10.1088/0022-3727/44/28/283001

Goss, S. A., Johnston, R. L. et Dunn, F. (1980). Compilation of empirical ultrasonic properties of mammalian tissues. II. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 68(1), 93-108.

Herbort, C. P., LeHoang, P. et Guex-Crosier, Y. (1998). Schematic interpretation of indocyanine green angiography in posterior uveitis using a standard angiographic protocol. *Ophthalmology*, 105(3), 432-440. doi:10.1016/S0161-6420(98)93024-X

Hiro, T., Leung, C. Y., De Guzman, S., Caiozzo, V. J., Farvid, A. R., Karimi, H., ... Tobis, J. M. (1997). Are soft echoes really soft? Intravascular ultrasound assessment of mechanical properties in human atherosclerotic tissue. *American Heart Journal*, 133(1), 1-7. doi:10.1016/S0002-8703(97)70241-2

Hoelen, C. G. A., de Mul, F. F. M., Pongers, R. et Dekker, A. (1998). Three-dimensional photoacoustic imaging of blood vessels in tissue. *Optics Letters*, 23(8), 648-650. doi:10.1364/OL.23.000648

- Hosomi, N., Mizushige, K., Ohyama, H., Takahashi, T., Kitadai, M., Hatanaka, Y., ... Koziol, J. A. (2001). Angiotensin-converting enzyme inhibition with enalapril slows progressive intima-media thickening of the common carotid artery in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 32(7), 1539-1545.
- Huffman, M. D., Lloyd-Jones, D. M., Ning, H., Labarthe, D. R., Castillo, M. G., O'Flaherty, M., ... Capewell, S. (2013). Quantifying Options for Reducing Coronary Heart Disease Mortality By 2020. *Circulation*, 127(25), 2477-2484. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000769
- Jaffer, F. A., Calfon, M. A., Rosenthal, A., Mallas, G., Razansky, R. N., Mauskapf, A., ... Ntziachristos, V. (2011). Two-Dimensional Intravascular Near-Infrared Fluorescence Molecular Imaging of Inflammation in Atherosclerosis and Stent-Induced Vascular Injury. *J Am Coll Cardiol*, 57(25), 2516-2526. doi:10.1016/j.jacc.2011.02.036
- Jaffer, F. A., Kim, D.-E., Quinti, L., Tung, C.-H., Aikawa, E., Pande, A. N., ... Weissleder, R. (2007). Optical Visualization of Cathepsin K Activity in Atherosclerosis With a Novel, Protease-Activatable Fluorescence Sensor. *Circulation*, 115(17), 2292 -2298. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660340
- Jaffer, F. A., Vinegoni, C., John, M. C., Aikawa, E., Gold, H. K., Finn, A. V., ... Weissleder, R. (2008). Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis. *Circulation*, 118(18), 1802-1809. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.785881

- Jain, P. K. et El-Sayed, M. A. (2007). Universal Scaling of Plasmon Coupling in Metal Nanostructures: Extension from Particle Pairs to Nanoshells. *Nano Letters*, 7(9), 2854-2858. doi:10.1021/nl071496m
- Jansen, K., van der Steen, A. F., Wu, M., van Beusekom, H. M., Springeling, G., Li, X., ... van Soest, G. (2014). Spectroscopic intravascular photoacoustic imaging of lipids in atherosclerosis. *Journal of Biomedical Optics*, 19(2), 026006-026006. doi:10.1117/1.JBO.19.2.026006
- Jansen, K., van der Steen, A. F. W., van Beusekom, H. M. M., Oosterhuis, J. W. et van Soest, G. (2011). Intravascular photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis. *Optics Letters*, 36(5), 597-599. doi:10.1364/OL.36.000597
- Jansen, K., Wu, M., van der Steen, A. F. W. et van Soest, G. (2014). Photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis in two spectral bands. *Photoacoustics*, 2(1), 12-20. doi:10.1016/j.pacs.2013.11.003
- Kang, S.-J., Mintz, G. S., Akasaka, T., Park, D.-W., Lee, J.-Y., Kim, W.-J., ... Park, S.-J. (2011). Optical coherence tomographic analysis of in-stent neoatherosclerosis after drug-eluting stent implantation. *Circulation*, 123(25), 2954-2963. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.988436
- Karpiouk, A. B., Wang, B. et Emelianov, S. Y. (2010). Development of a catheter for combined intravascular ultrasound and photoacoustic imaging. *The Review of Scientific Instruments*, 81(1), 014901. doi:10.1063/1.3274197
- Khaing Oo, M. K., Du, H. et Wang, H. (2010). Multifunctional Gold Nanoparticles for Cancer Therapy. Dans *Nanobiomaterials Handbook*. Taylor & Francis US.

- Kim, K., Huang, S.-W., Ashkenazi, S., O'Donnell, M., Agarwal, A., Kotov, N. A., ... Kaplan, M. J. (2007). Photoacoustic imaging of early inflammatory response using gold nanorods. *Applied Physics Letters*, 90, 3901. doi:DOI: 10.1063/1.2743752
- König, A. et Klauss, V. (2007). Virtual histology. *Heart*, 93(8), 977-982. doi:10.1136/hrt.2007.116384
- Ku, D. N., Giddens, D. P., Zarins, C. K. et Glagov, S. (1985). Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 5(3), 293-302. doi:10.1161/01.ATV.5.3.293
- Ku, G., Wang, X., Xie, X., Stoica, G. et Wang, L. V. (2005). Imaging of tumor angiogenesis in rat brains in vivo by photoacoustic tomography. *Applied optics*, 44(5), 770-775.
- Laufer, J., Delpy, D., Elwell, C. et Beard, P. (2007). Quantitative spatially resolved measurement of tissue chromophore concentrations using photoacoustic spectroscopy: application to the measurement of blood oxygenation and haemoglobin concentration. *Physics in Medicine and Biology*, 52(1), 141-168. doi:10.1088/0031-9155/52/1/010
- Lee, S., Cha, E.-J., Park, K., Lee, S.-Y., Hong, J.-K., Sun, I.-C., ... Ahn, C.-H. (2008). A near-infrared-fluorescence-quenched gold-nanoparticle imaging probe for in vivo drug screening and protease activity determination. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 47(15), 2804-2807. doi:10.1002/anie.200705240
- Lee, S., Lee, M. W., Cho, H. S., Song, J. W., Nam, H. S., Oh, D. J., ... Kim, J. W. (2014). Fully Integrated High-Speed Intravascular Optical Coherence Tomography/Near-Infrared Fluorescence Structural/Molecular Imaging In Vivo Using a Clinically Available Near-

- Infrared Fluorescence-Emitting Indocyanine Green to Detect Inflamed Lipid-Rich Atheromata in Coronary-Sized Vessels. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 7(4), 560-569. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.114.001498
- Lerner, R. M., Huang, S. R. et Parker, K. J. (1990). « Sonoelasticity » images derived from ultrasound signals in mechanically vibrated tissues. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 16(3), 231-239. doi:10.1016/0301-5629(90)90002-T
- Liang, S., Saidi, A., Jing, J., Liu, G., Li, J., Zhang, J., ... Chen, Z. (2012). Intravascular atherosclerotic imaging with combined fluorescence and optical coherence tomography probe based on a double-clad fiber combiner. *Journal of Biomedical Optics*, 17(7), 070501. doi:10.1117/1.JBO.17.7.070501
- Li, B., Abran, M., Matteau-Pelletier, C., Rouleau, L., Lam, T., Sharma, R., ... Lesage, F. (2011). Low-cost three-dimensional imaging system combining fluorescence and ultrasound. *Journal of Biomedical Optics*, 16(12), 126010. doi:10.1117/1.3662455
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), 868-874. doi:10.1038/nature01323
- Libby, P. (2006). Atherosclerosis: Disease Biology Affecting the Coronary Vasculature. *The American Journal of Cardiology*, 98(12, Supplement 1), S3-S9. doi:10.1016/j.amjcard.2006.09.020
- Libby, P. (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), 2045-2051. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179705

- Li, L., Yeh, C., Hu, S., Wang, L., Soetikno, B. T., Chen, R., ... Wang, L. V. (2014). Fully motorized optical-resolution photoacoustic microscopy. *Optics letters*, *39*(7), 2117-2120.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., ... Wylie-Rosett, J. (2010). Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, *121*(7), 948-954.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192666
- Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T. et Murray, C. J. (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet*, *367*(9524), 1747-1757. doi:10.1016/S0140-6736(06)68770-9
- Lorenz, M. W., Markus, H. S., Bots, M. L., Rosvall, M. et Sitzer, M. (2007). Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation*, *115*(4), 459-467.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.628875
- Mahmood, U., Tung, C.-H., Tang, Y. et Weissleder, R. (2002). Feasibility of in vivo multichannel optical imaging of gene expression: experimental study in mice. *Radiology*, *224*(2), 446-451.
- Majdouline, Y., Ohayon, J., Keshavarz-Motamed, Z., Roy Cardinal, M.-H., Garcia, D., Allard, L., ... Cloutier, G. (2014). Endovascular Shear Strain Elastography for the Detection and Characterization of the Severity of Atherosclerotic Plaques: In Vitro Validation and In Vivo Evaluation. *Ultrasound in Medicine & Biology*.
doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.12.008

- Mallas, G., Brooks, D. H., Rosenthal, A., Nudelman, R. N., Mauskapf, A., Jaffer, F. A. et Ntziachristos, V. (2012). Improving quantification of intravascular fluorescence imaging using structural information. *Physics in Medicine and Biology*, 57(20), 6395-6406. doi:10.1088/0031-9155/57/20/6395
- Mansor, M., Okasha, H., Esmat, S., Hashem, A. M., Attia, K. A. et El-din Hussein, H. (2012). Role of ultrasound elastography in prediction of malignancy in thyroid nodules. *Endocrine Research*, 37(2), 67-77. doi:10.3109/07435800.2011.633952
- Maurice, R. L., Fromageau, J., Cardinal, M.-H., Doyley, M., de Muinck, E., Robb, J. et Cloutier, G. (2008). Characterization of Atherosclerotic Plaques and Mural Thrombi With Intravascular Ultrasound Elastography: A Potential Method Evaluated in an Aortic Rabbit Model and a Human Coronary Artery. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 12(3), 290 -298. doi:10.1109/TITB.2008.917905
- Maurice, R. L., Ohayon, J., Finet, G. et Cloutier, G. (2004). Adapting the Lagrangian speckle model estimator for endovascular elastography: theory and validation with simulated radio-frequency data. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 116(2), 1276-1286.
- McConnell, M. V., Aikawa, M., Maier, S. E., Ganz, P., Libby, P. et Lee, R. T. (1999). MRI of Rabbit Atherosclerosis in Response to Dietary Cholesterol Lowering. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(8), 1956-1959. doi:10.1161/01.ATV.19.8.1956
- Mintz, G. S., Garcia-Garcia, H. M., Nicholls, S. J., Weissman, N. J., Bruining, N., Crowe, T., ... Serruys, P. W. (2011). Clinical expert consensus document on standards for acquisition, measurement and reporting of intravascular ultrasound regression/progression studies.

EuroIntervention: Journal of EuroPCR in Collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology, 6(9), 1123-1130, 9.
doi:10.4244/EIJV6I9A195

Moore, K. J. et Tabas, I. (2011). Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Cell*, 145(3), 341-355. doi:10.1016/j.cell.2011.04.005

Naghavi, M. (2003). From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient: A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part II. *Circulation*, 108(15), 1772-1778.
doi:10.1161/01.CIR.0000087481.55887.C9

Naghavi, M. et Falk, E. (2010). From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient. Dans M. Naghavi (dir.), *Asymptomatic Atherosclerosis* (pp. 13-38). Totowa, NJ: Humana Press. Repéré à <http://www.springerlink.com/content/x86162025257x372/>

Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S. W., Litovsky, S., Rumberger, J., ... Willerson, J. T. (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*, 108(14), 1664-1672.
doi:10.1161/01.CIR.0000087480.94275.97

Nahrendorf, M., Jaffer, F. A., Kelly, K. A., Sosnovik, D. E., Aikawa, E., Libby, P. et Weissleder, R. (2006). Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation*, 114(14), 1504-1511.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646380

Napoli, C., D'Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G. et Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly

enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation*, 100(11), 2680-2690.

Napoli, C., Witztum, J. L., de Nigris, F., Palumbo, G., D'Armiento, F. P. et Palinski, W. (1999). Intracranial arteries of human fetuses are more resistant to hypercholesterolemia-induced fatty streak formation than extracranial arteries. *Circulation*, 99(15), 2003-2010.

Ng, V. W. K., Berti, R., Lesage, F. et Kakkar, A. (2012). Gold: a versatile tool for in vivo imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(1), 9-25. doi:10.1039/C2TB00020B

Nissen, S. E., Tuzcu, E. M., Schoenhagen, P., Brown, B. G., Ganz, P., Vogel, R. A., ... for the REVERSAL Investigators. (2004). Effect of Intensive Compared With Moderate Lipid-Lowering Therapy on Progression of Coronary Atherosclerosis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 291(9), 1071 - 1080. doi:10.1001/jama.291.9.1071

Nissen, S. E. et Yock, P. (2001). Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation*, 103(4), 604-616.

North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. (1991). Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *The New England Journal of Medicine*, 325(7), 445-453. doi:10.1056/NEJM199108153250701

Ophir, J., Céspedes, I., Ponnekanti, H., Yazdi, Y. et Li, X. (1991). Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrasonic Imaging*, 13(2), 111-134.

- Ozaki, Y., Okumura, M., Ismail, T. F., Naruse, H., Hattori, K., Kan, S., ... Serruys, P. W. (2010). The fate of incomplete stent apposition with drug-eluting stents: an optical coherence tomography-based natural history study. *European Heart Journal*, *31*(12), 1470-1476. doi:10.1093/eurheartj/ehq066
- Palinski, W. et Napoli, C. (2002). The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *16*(11), 1348-1360. doi:10.1096/fj.02-0226rev
- Pande, A. N., Kohler, R. H., Aikawa, E., Weissleder, R. et Jaffer, F. A. (2006). Detection of macrophage activity in atherosclerosis in vivo using multichannel, high-resolution laser scanning fluorescence microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *11*(2), 021009-021009. doi:10.1117/1.2186337
- Pignoli, P., Tremoli, E., Poli, A., Oreste, P. et Paoletti, R. (1986). Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation*, *74*(6), 1399-1406.
- Pinto, T. L. et Waksman, R. (2006). Clinical Applications of Optical Coherence Tomography. *Journal of Interventional Cardiology*, *19*(6), 566-573. doi:10.1111/j.1540-8183.2006.00201.x
- Prahl, S. (1999). Optical Absorption of Hemoglobin. <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/>.

- Raabe, A., Beck, J., Gerlach, R., Zimmermann, M. et Seifert, V. (2003). Near-infrared indocyanine green video angiography: a new method for intraoperative assessment of vascular flow. *Neurosurgery*, 52(1), 132-139; discussion 139.
- Ragan, T., Kadiri, L. R., Venkataraju, K. U., Bahlmann, K., Sutin, J., Taranda, J., ... Osten, P. (2012). Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging. *Nature Methods*, 9(3), 255-258. doi:10.1038/nmeth.1854
- Razansky, R. N., Rosenthal, A., Mallas, G., Razansky, D., Jaffer, F. A. et Ntziachristos, V. (2010). Near-infrared fluorescence catheter system for two-dimensional intravascular imaging in vivo. *Optics Express*, 18(11), 11372-11381. doi:10.1364/OE.18.011372
- Rouleau, L., Berti, R., Ng, V. W. K., Matteau-Pelletier, C., Lam, T., Saboural, P., ... Tardif, J.-C. (2013). VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 8(1), 27-39. doi:10.1002/cmml.1491
- Schaar, J. A., De Korte, C. L., Mastik, F., Strijder, C., Pasterkamp, G., Boersma, E., ... Van Der Steen, A. F. W. (2003). Characterizing vulnerable plaque features with intravascular elastography. *Circulation*, 108(21), 2636-2641. doi:10.1161/01.CIR.0000097067.96619.1F
- Sethuraman, S., Aglyamov, S., Amirian, J., Smalling, R. et Emelianov, S. (2005). Intravascular photoacoustic imaging to detect and differentiate atherosclerotic plaques. Dans 2005 *IEEE Ultrasonics Symposium* (vol. 1, pp. 133- 136). IEEE. doi:10.1109/ULTSYM.2005.1602814

- Sethuraman, S., Aglyamov, S. R., Amirian, J. H., Smalling, R. W. et Emelianov, S. Y. (2006). Development of a combined intravascular ultrasound and photoacoustic imaging system. Dans *Proceedings of SPIE* (p. 60860F-60860F-10). San Jose, CA, USA. doi:10.1117/12.646372
- Sethuraman, S., Aglyamov, S. R., Amirian, J. H., Smalling, R. W. et Emelianov, S. Y. (2007). Intravascular photoacoustic imaging using an IVUS imaging catheter. *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, 54(5), 978-986. doi:10.1109/TUFFFC.2007.343
- Sethuraman, S., Amirian, J. H., Litovsky, S. H., Smalling, R. W. et Emelianov, S. Y. (2007). Ex vivo Characterization of Atherosclerosis using Intravascular Photoacoustic Imaging. *Optics Express*, 15(25), 16657-16666.
- Sethuraman, S., Amirian, J. H., Litovsky, S. H., Smalling, R. W. et Emelianov, S. Y. (2008). Spectroscopic intravascular photoacoustic imaging to differentiate atherosclerotic plaques. *Optics Express*, 16(5), 3362-3367.
- Sethuraman, S., Mallidi, S., Aglyamov, S. R., Amirian, J. H., Litovsky, S., Smalling, R. W. et Emelianov, S. Y. (2007). Intravascular photoacoustic imaging of atherosclerotic plaques: ex-vivo study using a rabbit model of atherosclerosis (vol. 6437, pp. 643729-643729-9). doi:10.1117/12.701111
- Shung, K. K. et Reid, J. M. (1978). Ultrasound velocity in major bovine blood vessel walls. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 64(2), 692-694. doi:10.1121/1.381996

- Sosnovik, D. E., Nahrendorf, M., Deliolanis, N., Novikov, M., Aikawa, E., Josephson, L., ... Ntziachristos, V. (2007). Fluorescence Tomography and Magnetic Resonance Imaging of Myocardial Macrophage Infiltration in Infarcted Myocardium In Vivo. *Circulation*, *115*(11), 1384-1391. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.663351
- Spence, J. D. (2006). Technology Insight: ultrasound measurement of carotid plaque—patient management, genetic research, and therapy evaluation. *Nature Clinical Practice Neurology*, *2*(11), 611-619. doi:10.1038/ncpneuro0324
- Stephens, D. N., Park, J., Sun, Y., Papaioannou, T. et Marcu, L. (2009). Intraluminal fluorescence spectroscopy catheter with ultrasound guidance. *Journal of Biomedical Optics*, *14*(3), 030505. doi:10.1117/1.3146813
- Tahara, N., Kai, H., Ishibashi, M., Nakaura, H., Kaida, H., Baba, K., ... Imaizumi, T. (2006). Simvastatin attenuates plaque inflammation: evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Journal of the American College of Cardiology*, *48*(9), 1825-1831. doi:10.1016/j.jacc.2006.03.069
- Tahara, S., Morooka, T., Wang, Z., Bezerra, H. G., Rollins, A. M., Simon, D. I. et Costa, M. A. (2012). Intravascular optical coherence tomography detection of atherosclerosis and inflammation in murine aorta. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *32*(5), 1150-1157. doi:10.1161/ATVBAHA.111.243626
- Tardif, J.-C., Grégoire, J., L'Allier, P. L., Ibrahim, R., Lavoie, M.-A., LeMay, M., ... Guertin, M.-C. (2006). Effect of atherosclerotic regression on total luminal size of coronary arteries as determined by intravascular ultrasound. *The American Journal of Cardiology*, *98*(1), 23-27. doi:10.1016/j.amjcard.2006.01.052

- Tardif, J.-C., Lesage, F., Harel, F., Romeo, P. et Pressacco, J. (2011). Imaging Biomarkers in Atherosclerosis Trials. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 4(3), 319 -333. doi:10.1161/CIRCIMAGING.110.962001
- Tedgui, A. et Mallat, Z. (2006). Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiological Reviews*, 86(2), 515-581. doi:10.1152/physrev.00024.2005
- Ughi, G. J., Verjans, J., Fard, A. M., Wang, H., Osborn, E., Hara, T., ... Tearney, G. J. (2014). Dual modality intravascular optical coherence tomography (OCT) and near-infrared fluorescence (NIRF) imaging: a fully automated algorithm for the distance-calibration of NIRF signal intensity for quantitative molecular imaging. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*. doi:10.1007/s10554-014-0556-z
- Ugolini, P., Pressacco, J., Lespérance, J., Berry, C., L'Allier, P. L., Ibrahim, R., ... Tardif, J.-C. (2009). Evaluation of coronary atheroma by 64-slice multidetector computed tomography: Comparison with intravascular ultrasound and angiography. *Canadian Journal of Cardiology*, 25(11), 641-647. doi:10.1016/S0828-282X(09)70161-8
- Vinegoni, C., Botnaru, I., Aikawa, E., Calfon, M. A., Iwamoto, Y., Folco, E. J., ... Jaffer, F. A. (2011). Indocyanine Green Enables Near-Infrared Fluorescence Imaging of Lipid-Rich, Inflamed Atherosclerotic Plaques. *Science Translational Medicine*, 3(84), 84ra45. doi:10.1126/scitranslmed.3001577
- Wallis de Vries, B. M., Hillebrands, J.-L., van Dam, G. M., Tio, R. A., de Jong, J. S., Slart, R. H. J. A. et Zeebregts, C. J. (2009). Images in cardiovascular medicine. Multispectral near-infrared fluorescence molecular imaging of matrix metalloproteinases in a human carotid

- plaque using a matrix-degrading metalloproteinase-sensitive activatable fluorescent probe. *Circulation*, *119*(20), e534-536. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821389
- Wang, B., Karpiouk, A., Yeager, D., Amirian, J., Litovsky, S., Smalling, R. et Emelianov, S. (2012a). Intravascular photoacoustic imaging of lipid in atherosclerotic plaques in the presence of luminal blood. *Optics Letters*, *37*(7), 1244-1246. doi:10.1364/OL.37.001244
- Wang, B., Karpiouk, A., Yeager, D., Amirian, J., Litovsky, S., Smalling, R. et Emelianov, S. (2012b). In vivo Intravascular Ultrasound-guided Photoacoustic Imaging of Lipid in Plaques Using an Animal Model of Atherosclerosis. *Ultrasound in Medicine and Biology*, *38*(12), 2098-2103. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2012.08.006
- Wang, B., Su, J. L., Amirian, J., Litovsky, S. H., Smalling, R. et Emelianov, S. (2010). Detection of lipid in atherosclerotic vessels using ultrasound-guided spectroscopic intravascular photoacoustic imaging. *Optics Express*, *18*(5), 4889-4897. doi:10.1364/OE.18.004889
- Wang, B., Su, J. L., Karpiouk, A. B., Sokolov, K. V., Smalling, R. W. et Emelianov, S. Y. (2010). Intravascular Photoacoustic Imaging. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, *16*(3), 588-599. doi:10.1109/JSTQE.2009.2037023
- Wang, B., Yantsen, E., Larson, T., Karpiouk, A. B., Sethuraman, S., Su, J. L., ... Emelianov, S. Y. (2009). Plasmonic Intravascular Photoacoustic Imaging for Detection of Macrophages in Atherosclerotic Plaques. *Nano Letters*, *9*(6), 2212-2217. doi:10.1021/nl801852e
- Wells, P. N. T. (1999). Ultrasonic imaging of the human body. *Reports on Progress in Physics*, *62*(5), 671. doi:10.1088/0034-4885/62/5/201

- Wilensky, R. L., Song, H. K. et Ferrari, V. A. (2006). Role of Magnetic Resonance and Intravascular Magnetic Resonance in the Detection of Vulnerable Plaques. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8), C48-C56. doi:10.1016/j.jacc.2005.11.048
- Xu, M. et Wang, L. V. (2006). Photoacoustic imaging in biomedicine. *Review of Scientific Instruments*, 77(4), 041101. doi:10.1063/1.2195024
- Yeager, D., Karpiouk, A., Wang, B., Amirian, J., Sokolov, K., Smalling, R. et Emelianov, S. (2012). Intravascular photoacoustic imaging of exogenously labeled atherosclerotic plaque through luminal blood. *Journal of Biomedical Optics*, 17(10), 106016-106016. doi:10.1117/1.JBO.17.10.106016
- Yoneya, S., Saito, T., Komatsu, Y., Koyama, I., Takahashi, K. et Duvoll-Young, J. (1998). Binding properties of indocyanine green in human blood. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(7), 1286-1290.
- Yoo, H., Kim, J. W., Shishkov, M., Namati, E., Morse, T., Shubochkin, R., ... Tearney, G. J. (2011). Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging in vivo. *Nature Medicine*, 17(12), 1680-1684. doi:10.1038/nm.2555
- Yuan, C., Kerwin, W. S., Yarnykh, V. L., Cai, J., Saam, T., Chu, B., ... Hatsukami, T. S. (2006). MRI of atherosclerosis in clinical trials. *NMR in Biomedicine*, 19(6), 636-654. doi:10.1002/nbm.1065
- Zhang, E. Z., Laufer, J. G., Pedley, R. B. et Beard, P. C. (2009). In vivo high-resolution 3D photoacoustic imaging of superficial vascular anatomy. *Physics in Medicine and Biology*, 54(4), 1035-1046. doi:10.1088/0031-9155/54/4/014

- Zhang, H. F., Maslov, K., Stoica, G. et Wang, L. V. (2006). Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, 24(7), 848-851. doi:10.1038/nbt1220
- Zhang, J. et Xing, D. (2011). Intravascular photoacoustic detection of vulnerable plaque based on constituent selected imaging. *Journal of Physics: Conference Series*, 277, 012049. doi:10.1088/1742-6596/277/1/012049
- Zhang, Q., Iwakuma, N., Sharma, P., Moudgil, B. M., Wu, C., McNeill, J., ... Grobmyer, S. R. (2009). Gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo tumor imaging with photoacoustic tomography. *Nanotechnology*, 20(39), 395102. doi:10.1088/0957-4484/20/39/395102
- Zhi, H., Xiao, X.-Y., Yang, H.-Y., Ou, B., Wen, Y.-L. et Luo, B.-M. (2010). Ultrasonic elastography in breast cancer diagnosis: strain ratio vs 5-point scale. *Academic Radiology*, 17(10), 1227-1233. doi:10.1016/j.acra.2010.05.004
- Ziol, M., Handra-Luca, A., Kettaneh, A., Christidis, C., Mal, F., Kazemi, F., ... Beaugrand, M. (2005). Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 41(1), 48-54. doi:10.1002/hep.20506

ANNEXE A - CONCEPTION DU CATHÉTER

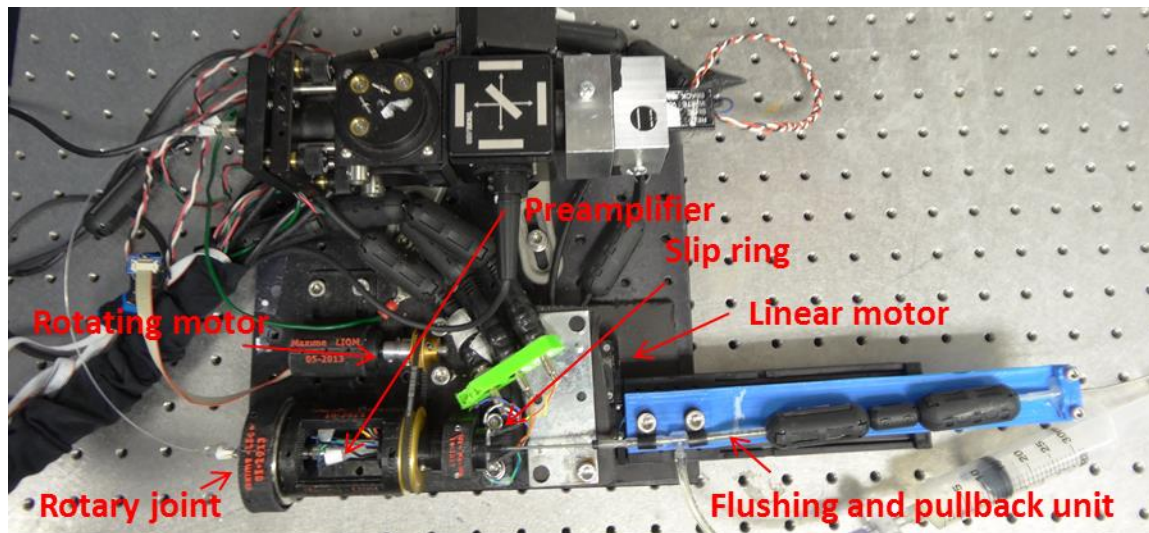
Le document suivant contient une description détaillée de toutes les composantes du cathéter, ainsi que les instructions d'assemblage.

Catheter overview

The catheter is a small plastic tube that can be inserted in a rabbit. Inside it, there is an optical fiber and an ultrasound transducer.

Catheter's handle

The following picture shows the complete catheter's handle, as well as the optical components of the system.



Motors

There are two motors to move the catheter: a linear motor and a rotating motor.

The rotating motor is 2232U012SRIE2-512 from MicroMo Electronics. It is enough powerful to make the catheter rotate at 40 turns/second. It is connected to the catheter through gears and a timing belt with a gear ratio 6:1.

The linear motor is T-LSM100B-KT04 from Zaber Technologies. It is used to move the catheter's probe linearly inside the catheter's sheath to perform a pullback acquisition and 3D imaging. It can move at up to 10 cm with a very high precision and at a programmable speed. With a constant pullback acquisition, the motor is moving at 0.5 mm/s.

3D printed components

The 3D printer (MakerBot Replicator 2X) is used to make custom components in ABS on the catheter's handle to hold all the parts together.

Preamplifier

A 20 dB preamplifier is connected directly to the ultrasound transducer of the catheter (it is therefore rotating with it). It is intended to amplify the low voltage signal, before it goes through the potentially noisy slip ring and the long BNC cables to the main electronic system.

The preamplifier PCB can be wrapped with electric tape and aluminum foil to protect it from liquids and to shield it from radiations. A 2-pin 0.1" Molex connector is used to connect the ultrasound transducer to the preamplifier. The slip ring is directly soldered to this PCB. An 8-pin connector can be used, but it is difficult to use it..

Slip ring

The slip ring is used to maintain an electrical link between the main electronic system and the rotating catheter. The model number is SRS022C-12 (previously SRH0317-8, but low life time) from Hangzhou Prosper Mechanical & Electrical Technology Co. It has 12 electric connections, but only 6 are used: Two for the ultrasound pulser, two for the ultrasound/photoacoustic receiving channel, two for power to the preamplifier (+12 V). On the static side, all three signals are connected to BNC connectors as close as possible to the slip ring to reduce noise. On the rotating side, the wires are connected to the preamplifier PCB. The wires must be as short as possible.

Color code: Red/Yellow: Signal/GND, Brown/Blue: Not used, Black/Purple: GND/+12V, Olive/Orange: GND/Pulser.

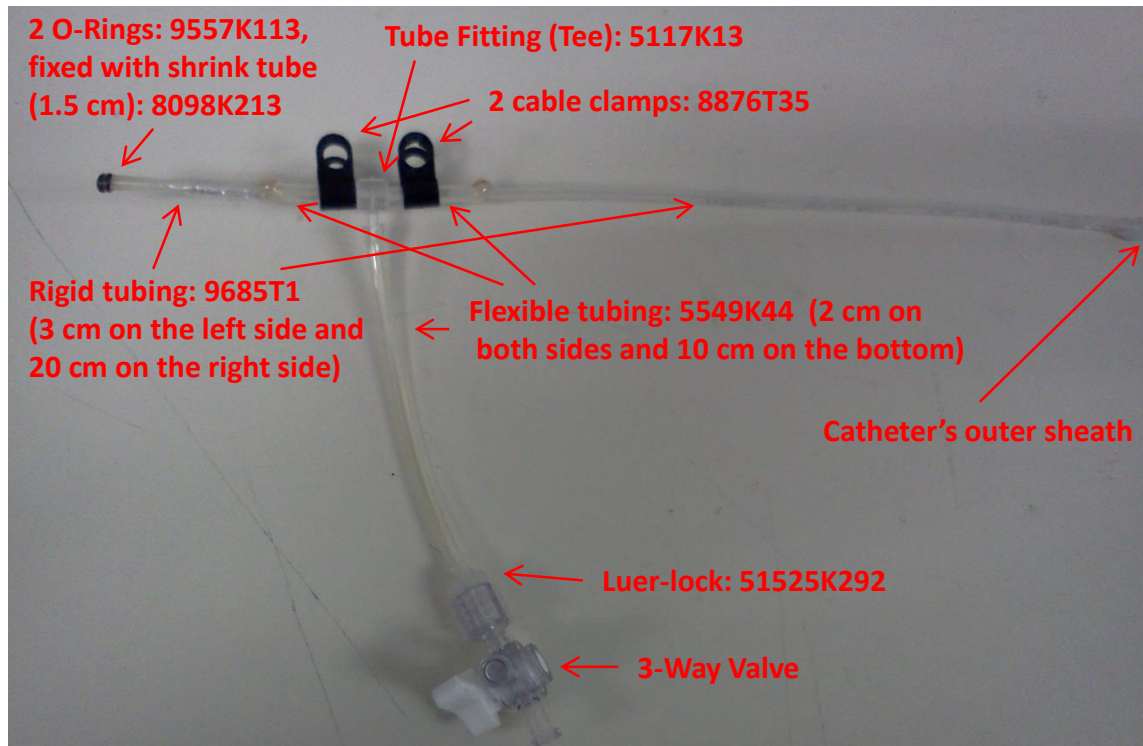
Rotary joint

The rotary joint allows connecting a fixed optical fiber to the rotating optical fiber of the catheter by keeping a good transmission ratio. It is from Doric Lenses and the model number is FRJ_SMA905-SMA905. A special rotary joint was bought with no AR coating for photoacoustic imaging (the laser could burn the coating).

Flushing and pullback unit

The inside of the catheter's sheath must be watertight. Otherwise, the blood pressure would push the blood out of the animal. The flushing and pullback unit allows connecting a syringe to the inside of the catheter to flush it with saline. It is watertight, rubber seals and glue are used. The unit is screwed to the linear motor which allows the pullback of the catheter (the catheter's sheath and the pullback unit will move, while the catheter probe remains in place).

The following picture shows the flushing and pullback unit without the catheter.



Outer sheath



The catheter's outer sheath is made of low density polyethylene (LDPE) by Zeus Corporation. It has an internal diameter of 47 mils (tolerance: - 2mils, +4 mils) and an external diameter of 55 mils (wall tolerance: ± 2 mils). The length is typically 118 cm. During fabrication, it is recommended to cut 10 cm more and adjust the length after making the hole and shrinking the tip.

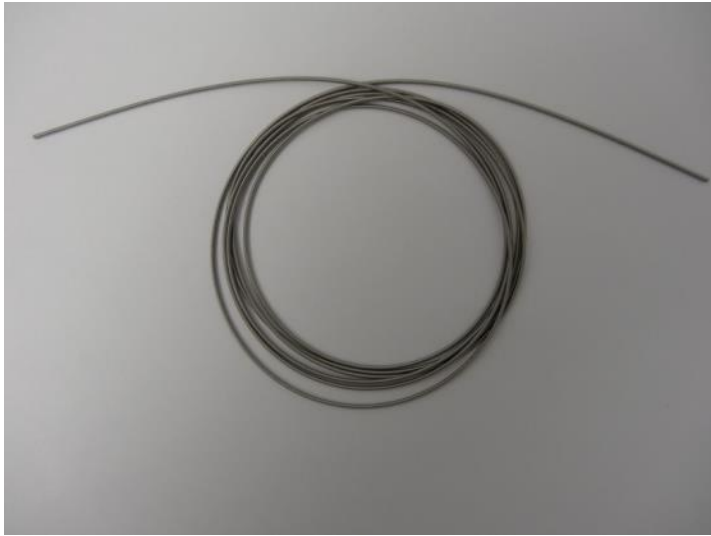
The tip of the outer sheath must be shrunk to ease the insertion in the animal. This is done by squeezing the end of the sheath under a heavy object, heating it with the heat gun at maximum power and at 20 cm away. When the tube becomes transparent (1-2 seconds), pull on the tube and remove the heat. Hold the sheath until it cools down and cut it at the minimum diameter (must be less than 2 cm of shrunk length). A small hole (less than 1 mm diameter) must be made at 2 cm from the tip of the sheath with a solder iron.

At the base of the catheter's sheath, a 1 cm stainless steel tubing (5560K425) is inserted about 2 mm inside the LDPE tubing. Use a heated tooth pick to expand the tip of the LDPE tubing to ease the insertion of the stainless steel tubing. Then, it is covered with cyanoacrylate for watertight and next with epoxy for rigidity. It will ease the inserting in the flushing and pullback unit.

Torque coil

A 152 cm coil is covering the optical fiber and the ultrasound transducer to get a uniform rotation. It has an outer diameter of 1.06 mm and an inner diameter of 0.76 mm and it is from Asahi Intecc. Similar torque coils were also bought from Fort Wayne Metal.

The tip of the coil sometimes doesn't respect the outer diameter tolerance. If that is the case, the other side can be used instead, or it can be cut with good scissors. A small amount of cyanoacrylate should be put at the tip to avoid any filars from moving during manipulation.



Optical fiber



Various optical fibers have been used. The current fiber is 57-081 from Edmund Optics. It has a core of 400 μm . The length is 155 cm, a bit less than the ultrasound transducer wire. The fiber must be polished on both sides.

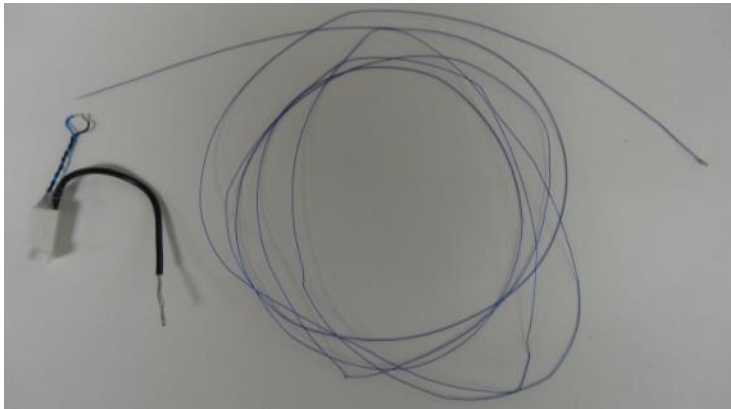
To polish the fiber, both ends must be put in a SMA connector (10440A). Use a little bit of removable hot glue for both side. At the end of the polishing process, one SMA connector has to be removed and the hot glue must be completely removed.

Start polishing by hand with a 5 μm polishing film. Then, the automatic polisher is used for 5 minutes with a 1 μm disc. Use water when polishing and stay close to the machine to check if the disc moves.

Prism

A 0.5 mm N-BK7 right-angle prism, aluminum coated is glued at the tip of the fiber under a microscope. The model number is 66-771 from Edmund Optics. A small drop of UV-Curing Optical Adhesive from Thorlabs (NOA81) is used followed by a few layers of cyanoacrylate.

Ultrasound transducer



The ultrasound transducer must be removed from a new Volcano Corporation's catheter (45 MHz Revolution). The torque coil of the original transducer must be carefully removed using a knife with a new blade. Add cyanoacrylate glue between the blue coaxial wire and the transducer assembly to solidify the junction. The blue coaxial wire must be carefully connected to a 2-pin Molex connector. This is done by soldering under the microscope and covering with epoxy glue.

The original ultrasound transducer has a torque coil with an external diameter of 26 mils. The coil is braided in a 8 by 8 pattern (8 wires wrapped in one direction covered by 8 wires wrapped in the other direction). Each wire has a diameter of 2 mils (approx.). The wire has a resistivity of 1.5 Ohms/cm. The coil has a total resistance of 50 Ohms.

Reinforcement tube at the tip



The tip of the catheter must be protected by a tube (Vita Needle, 37.5 mils ID, 42.5 mils OD). Cut approximately 20 mm in length. Cut a small window in it under the microscope with a rotary tool. Then, adjust the length to 8 mm.

Reinforcement base tube



A 30.5 cm stainless steel tube (5560K425) must be partly covered with layers of shrink tube. It is used to solidify the catheter. One layer of each shrink tube (7856K111 covered with 7856K121, then 7132K73 is added at the tip of the stainless steel tubing (60 mm length at 5 mm of the tip). Shrink tubes don't always have the same size, so adjustments might be needed. The shrink tubes will allow to perfectly fit inside the slip ring hole. It also allows to easily be tightened to the rotating assembly with screws. For the last layer of the shrink tube, it is recommended to use a longer length (2 mm less) to ease the insertion in the slip ring.

Assembly instructions

Under the microscope, align the transducer and the fiber. Make sure to leave enough space for the prism. Glue them together with cyanoacrylate at 10 mm from the tip. Wait until the glue dries and glue them at every 10 cm. Don't put too much glue and make sure they are touching, otherwise it won't fit in the torque coil.

Next, insert the glued transducer and fiber inside the torque coil. The base SMA connector of the fiber must be removed and the glue must be cleaned out of the fiber.

Put the SMA connector back and test the optical transmission (it should be around 80%). Solder the 2 pin Molex connector to the transducer wire and test the transducer on a phantom.

Pass the reinforcement tube through the tip of the catheter (because it is difficult to install it after gluing the prism). Glue the prism under the microscope with cyanoacrylate. Then, glue the fiber to the transducer by making sure they are aligned correctly. Install the reinforcement tube in place to protect the tip and glue it with cyanoacrylate. Make sure not to put too much glue, otherwise it could leak on the prism or the transducer. Move the torque coil in place at 1 mm from the reinforcement tube and glue them together.

The reinforcement base tube must be glued to the catheter at 4 cm from the tip of the SMA connector. Conductive epoxy is used to glue the torque coil, which should be out of the tube by about 5 mm. It is also glued to a ground wire connected to the ground of the transducer connector. Use cyanoacrylate before and after using conductive epoxy to make sure it is watertight.

Then, insert it in the rotating assembly, in the flushing and pullback assembly and in the catheter's outer sheath. To do so, the rotary joint must be removed.

The catheter must be connected to the rotary joint and the preamplifier PCB. It must also be attached to the rotating assembly with screws.

At the end of the assembly, the catheter should be tested for watertight, which is extremely important. Also, image the plastic container in a square shape to validate NURD.

Protection tubes



Protection tubes are used to carry the catheters. The tubes are 8359K13 and are approximately 5 feet long. A Luer-lock is glued with hot glue at one end. A 30 mL syringe (without the plunger) is attached to the Luer-lock. The rubber head is detached from the plunger and is used to close the syringe.

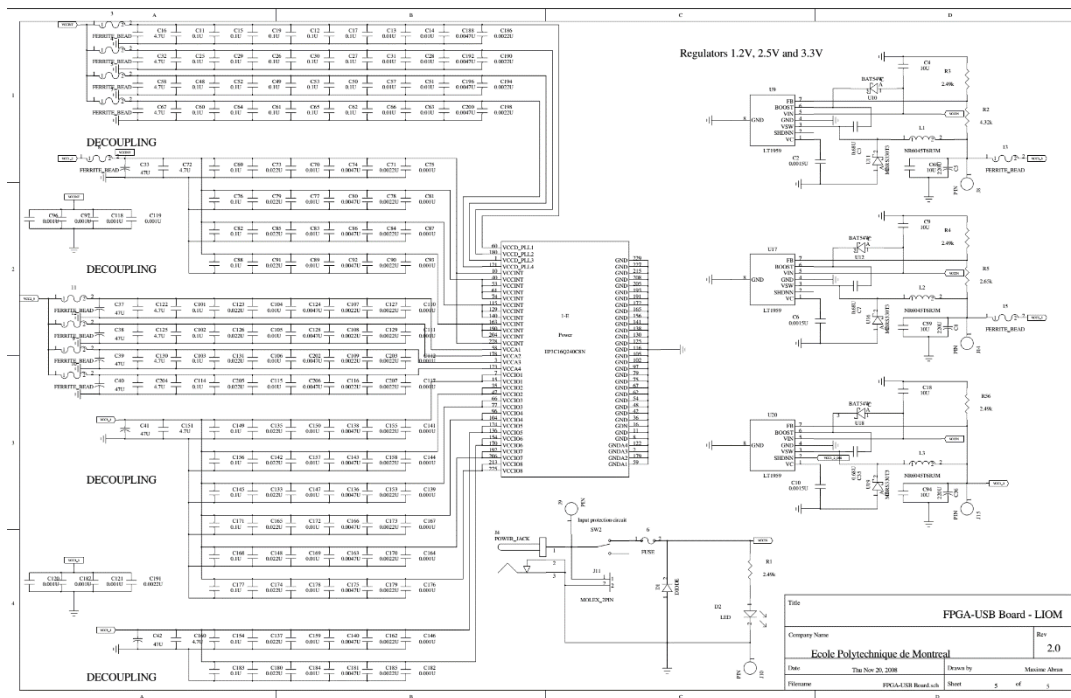
The catheter (with or without the PTFE sheath) is inserted in the protection tube and the base of the catheter fits in the syringe.

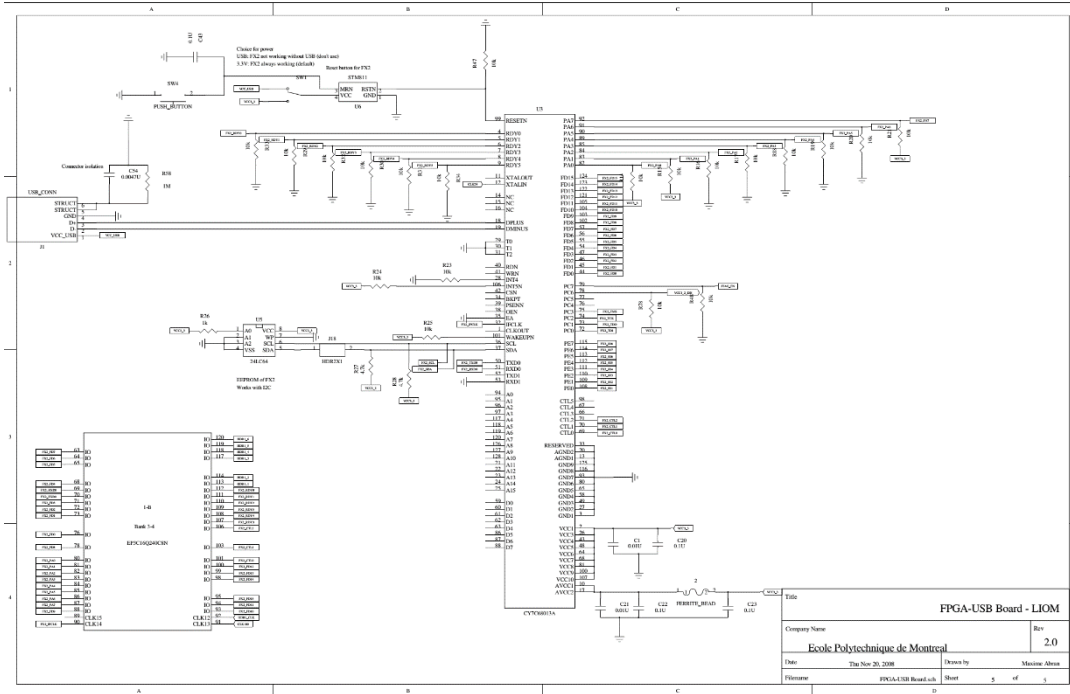
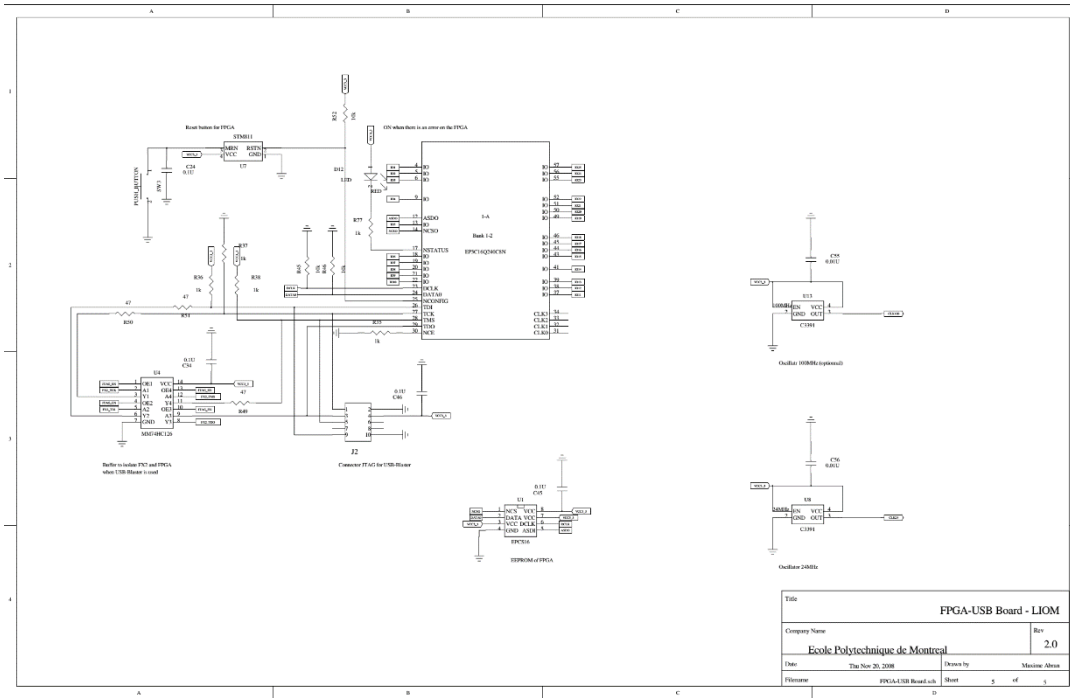
A special base replacing the syringe was made using the 3D printer to protect a catheter attached to the system.

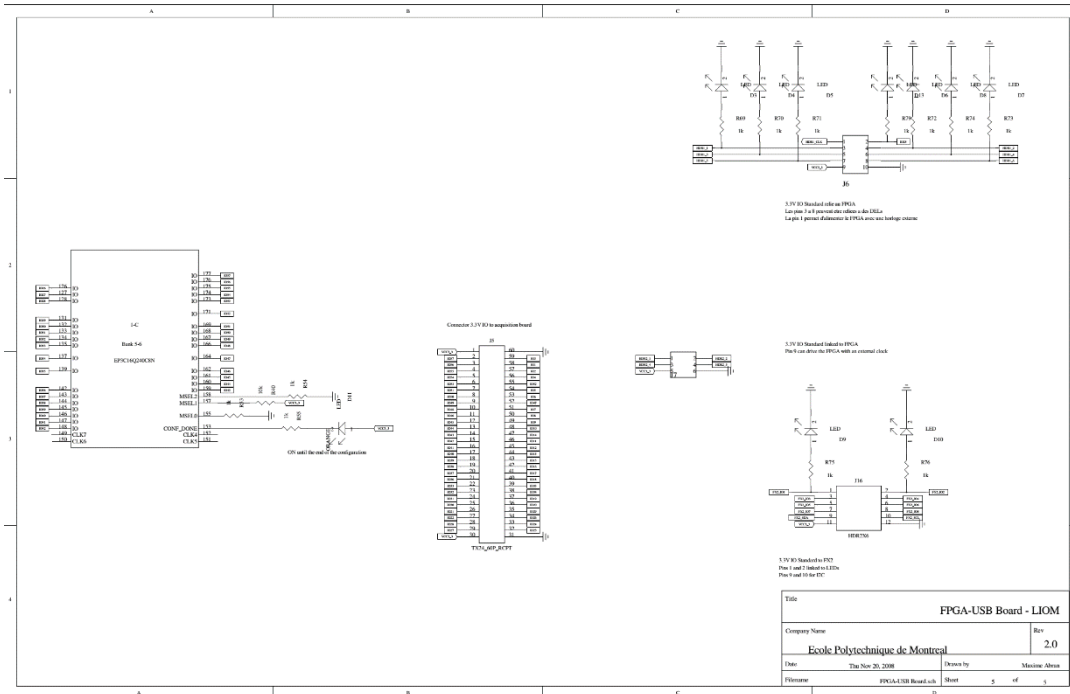
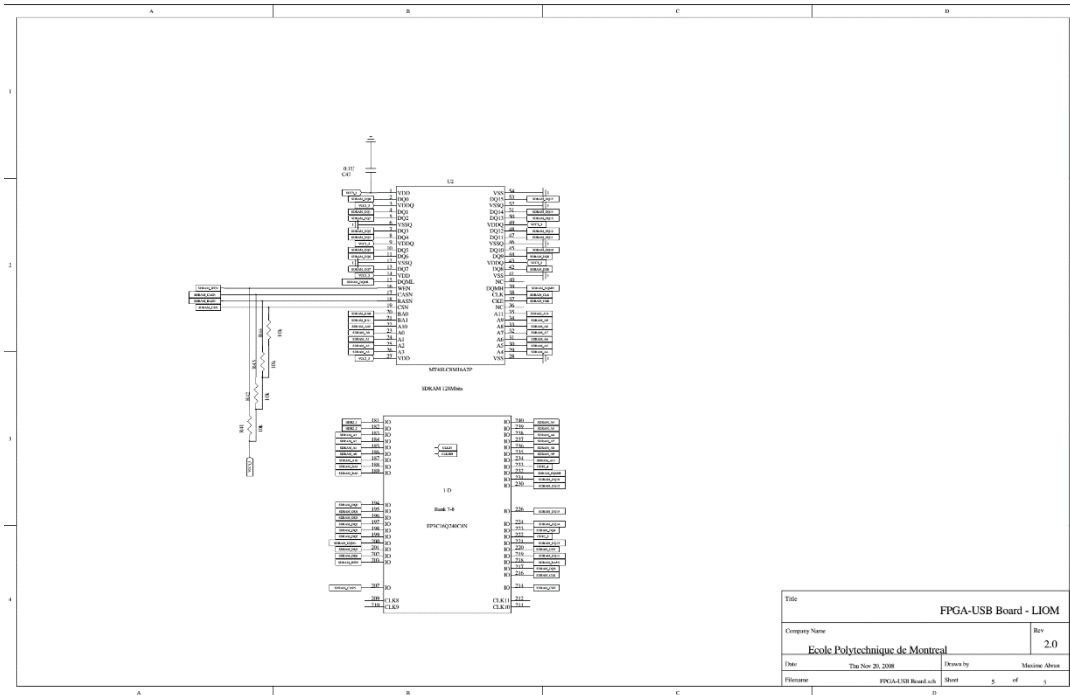
ANNEXE B - SCHÉMAS ÉLECTRIQUES DES CIRCUITS IMPRIMÉS

Trois principaux circuits imprimés ont été conçu pour ce projet. Le premier est une carte FPGA avec un lien USB et une mémoire SDRAM. Celui-ci est connecté à la carte d'acquisition, qui contient toutes les composantes pour l'acquisition des signaux. Le dernier circuit est un préamplificateur à ultrasons, qui est installé à la base du cathéter.

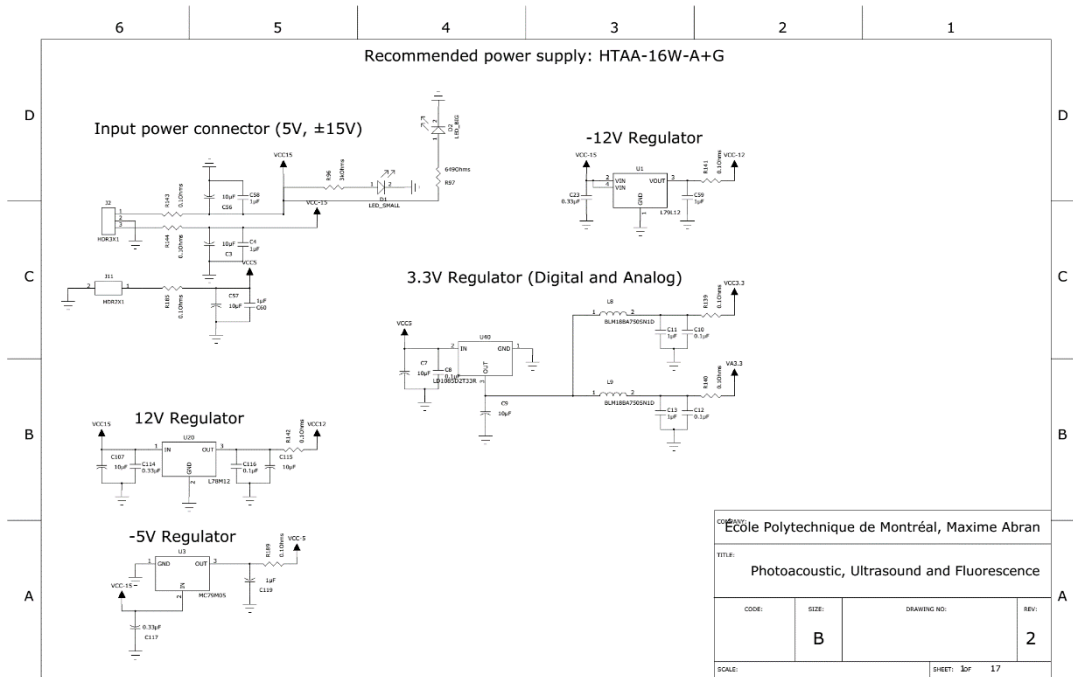
Les figures suivantes montrent le circuit imprimé de la carte FPGA.

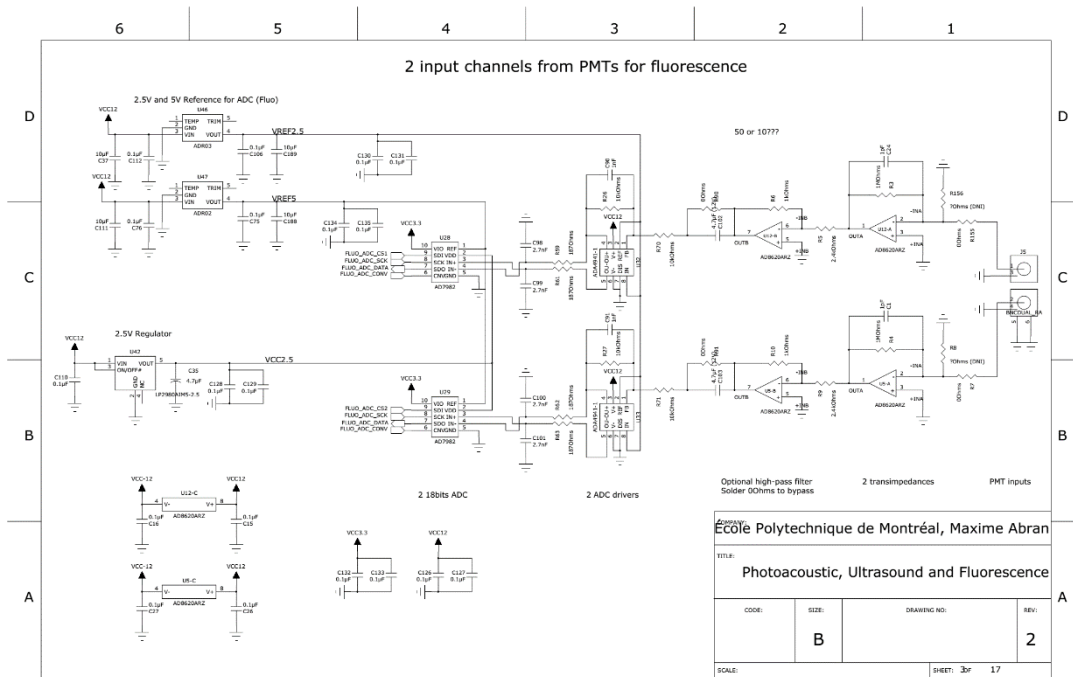
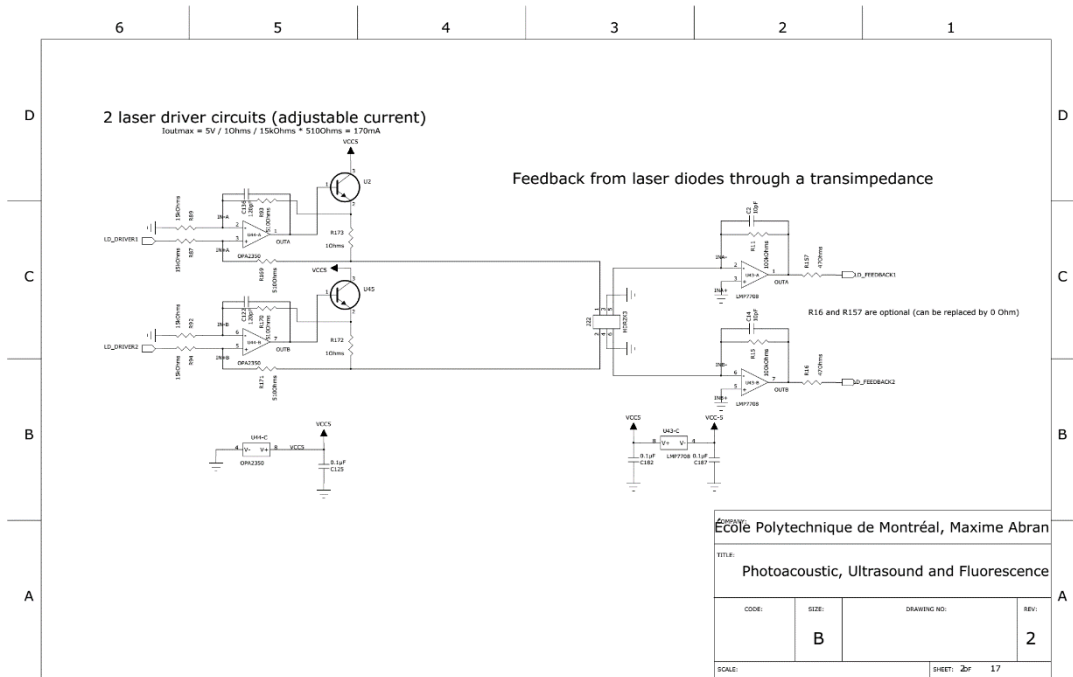


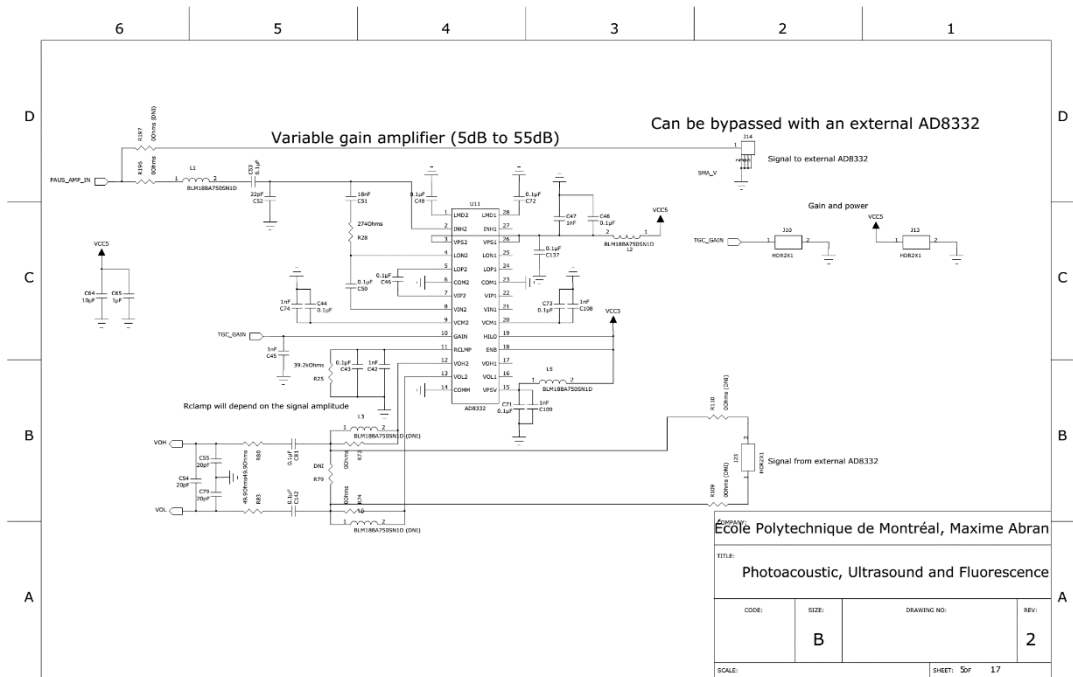
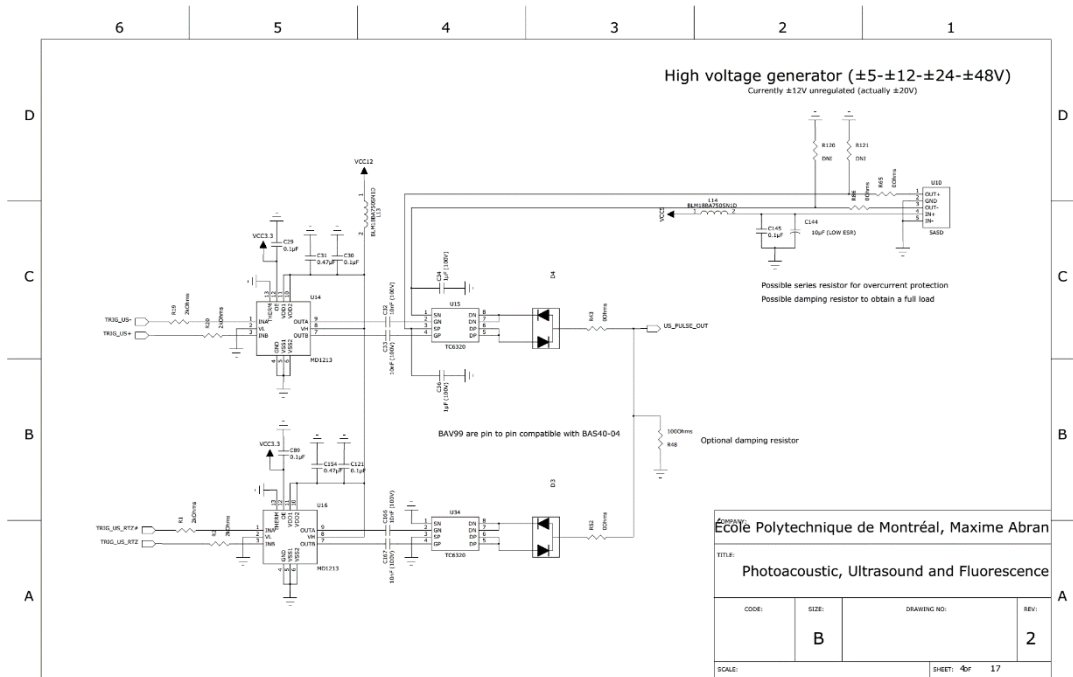


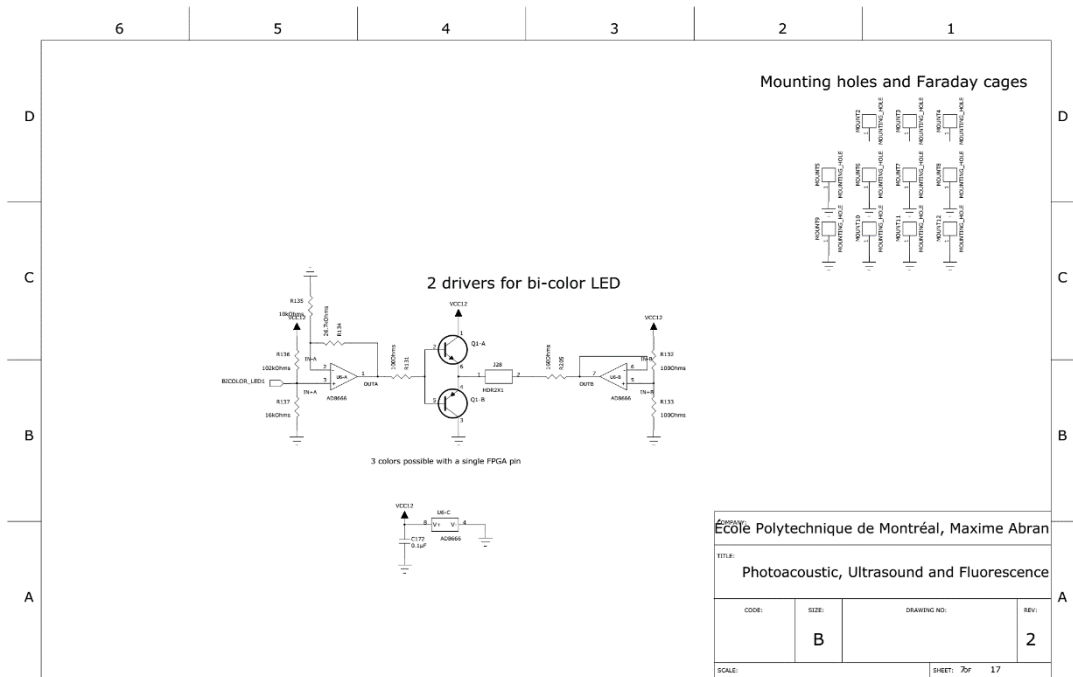
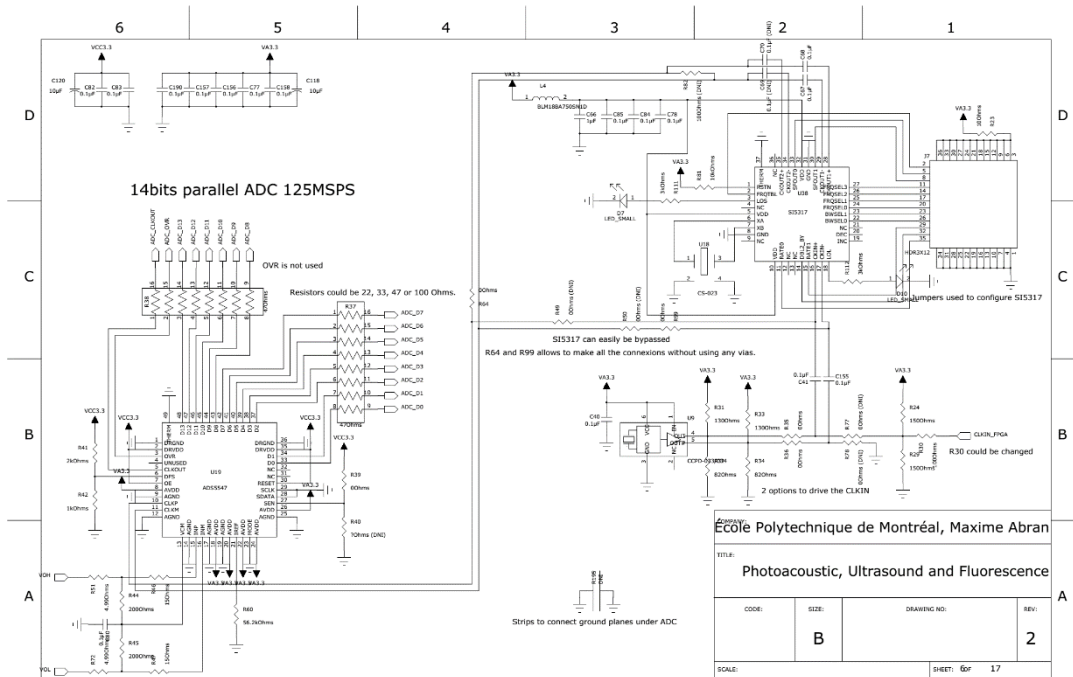


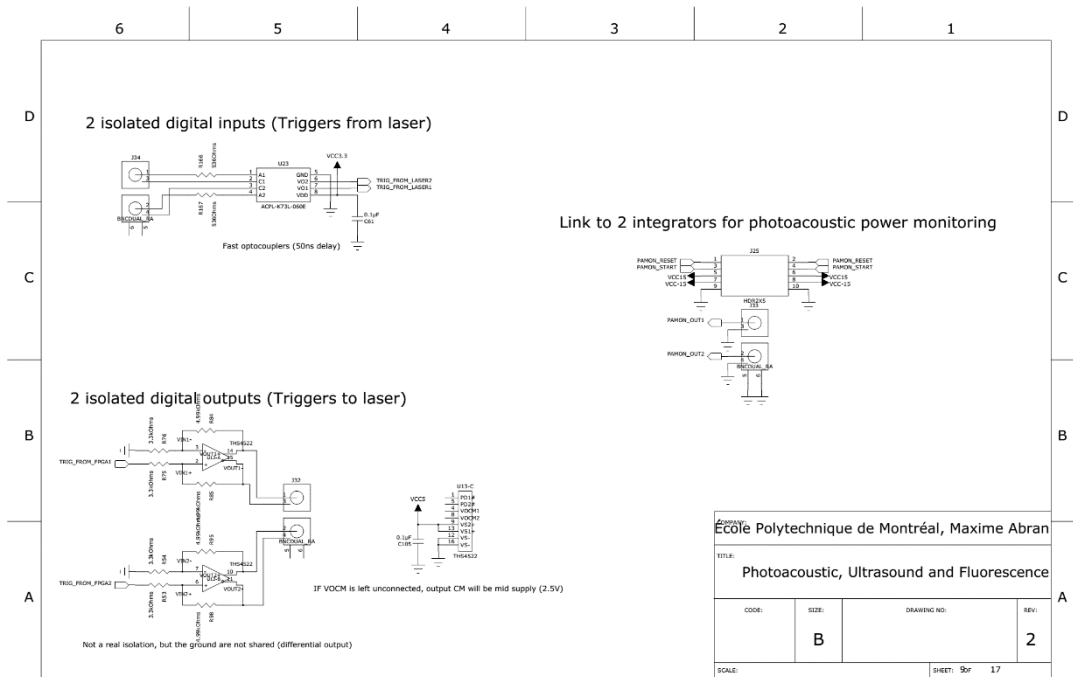
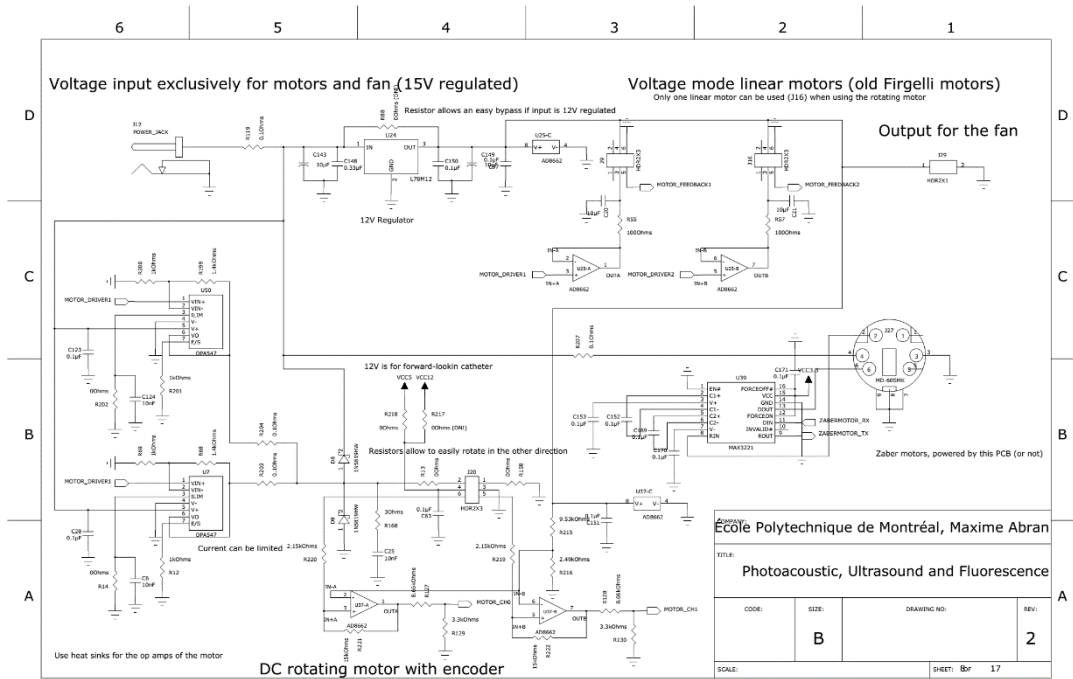
Les figures suivantes montrent le circuit imprimé de la carte d'acquisition.

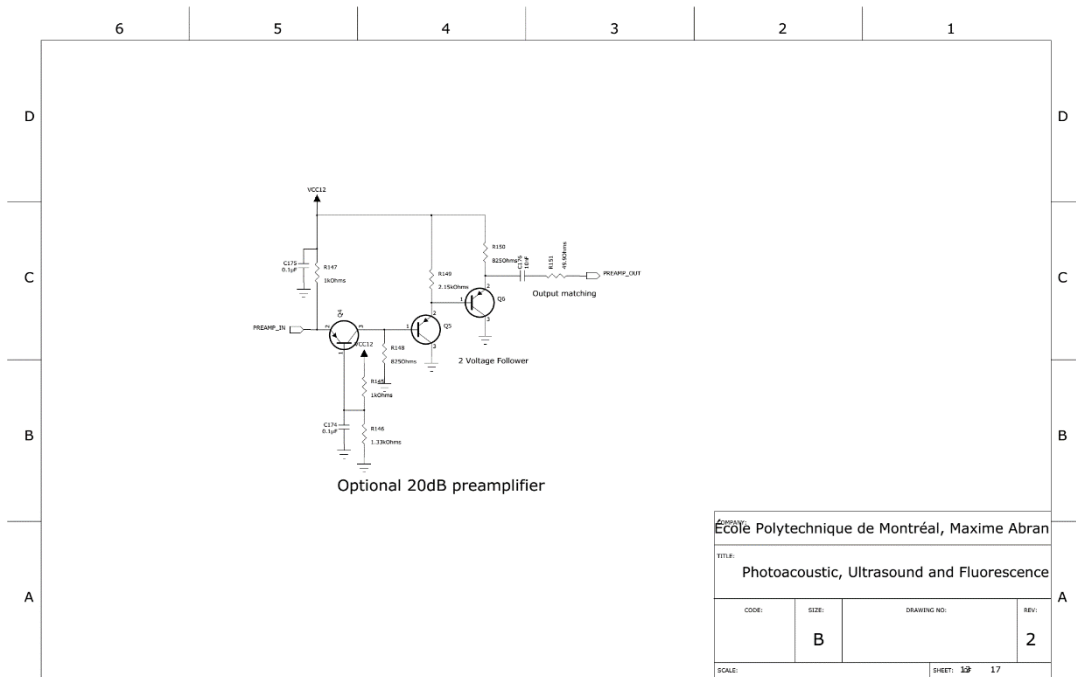
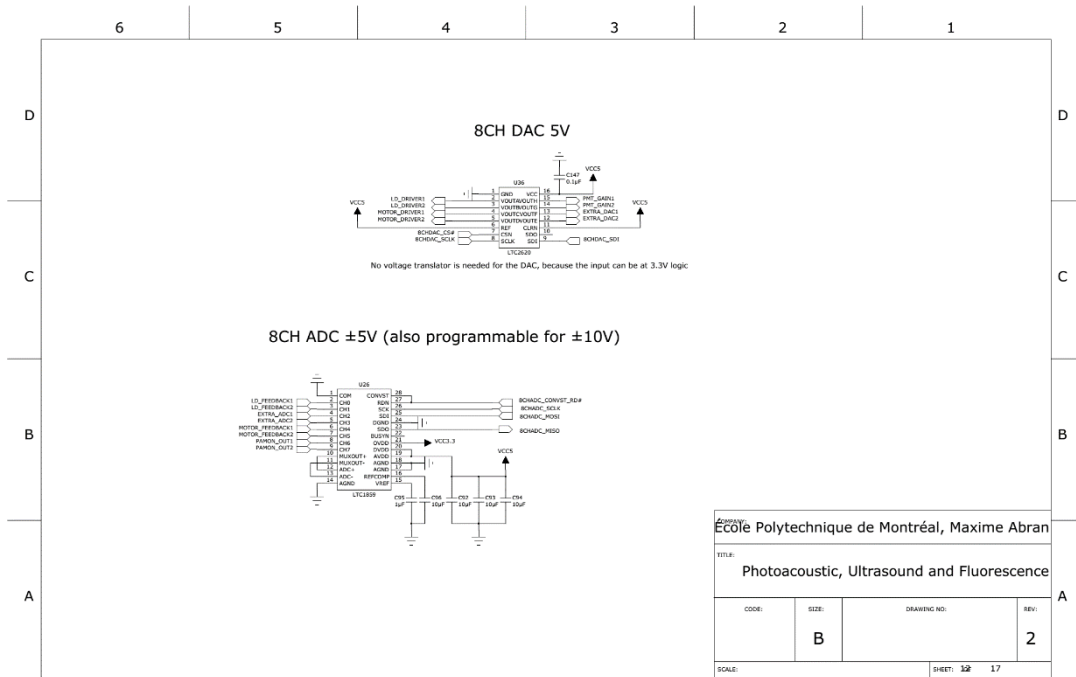






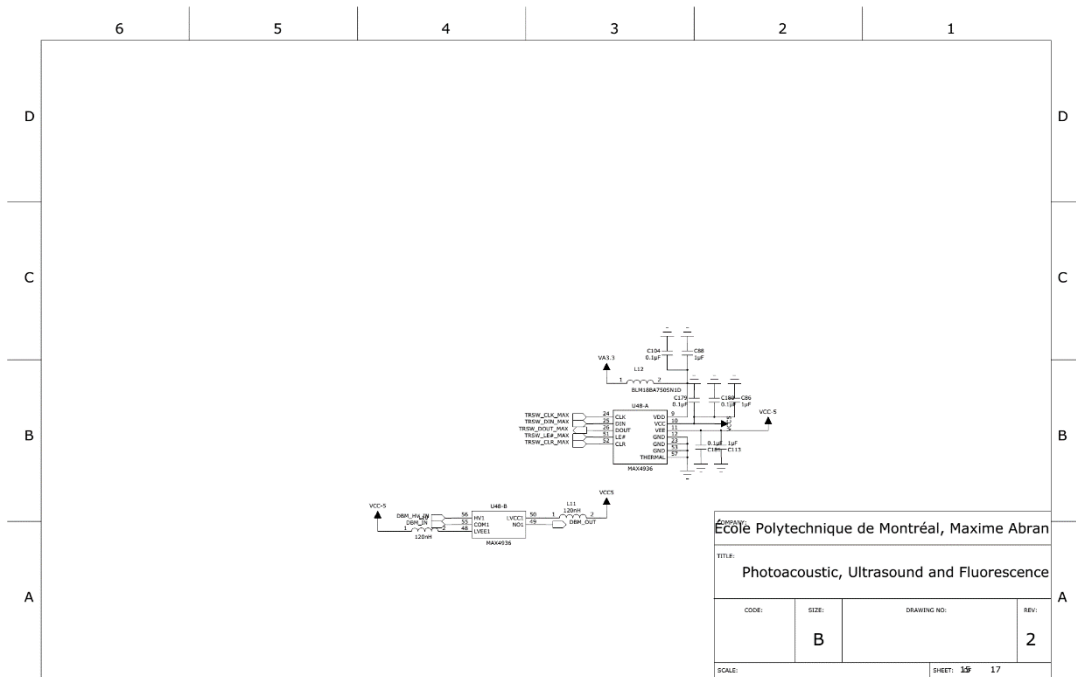




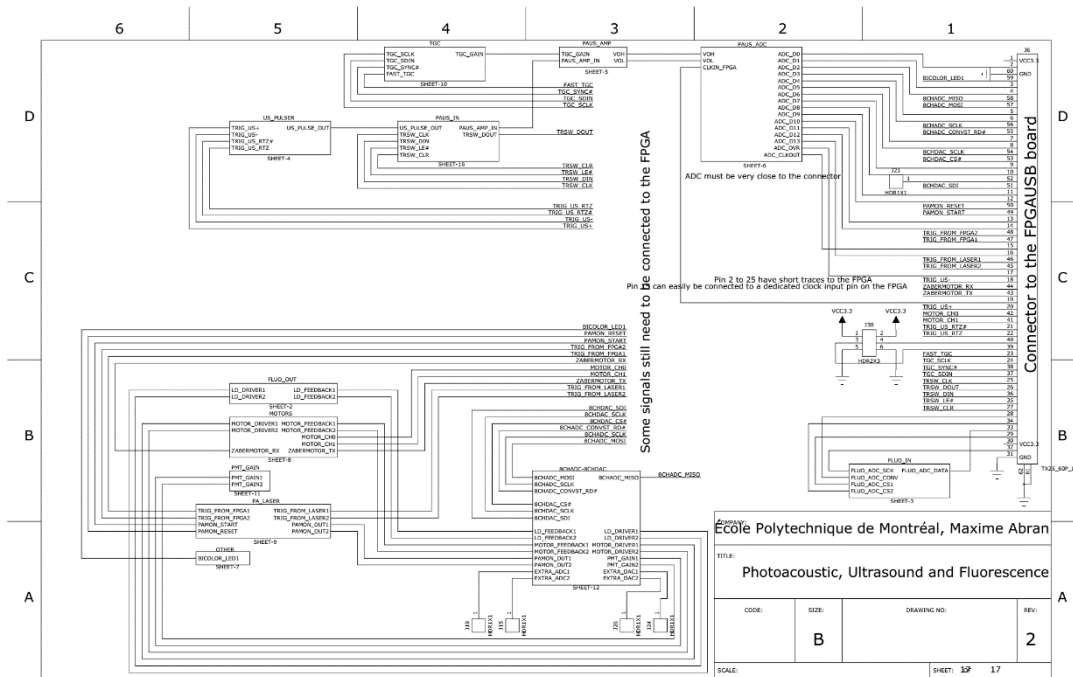
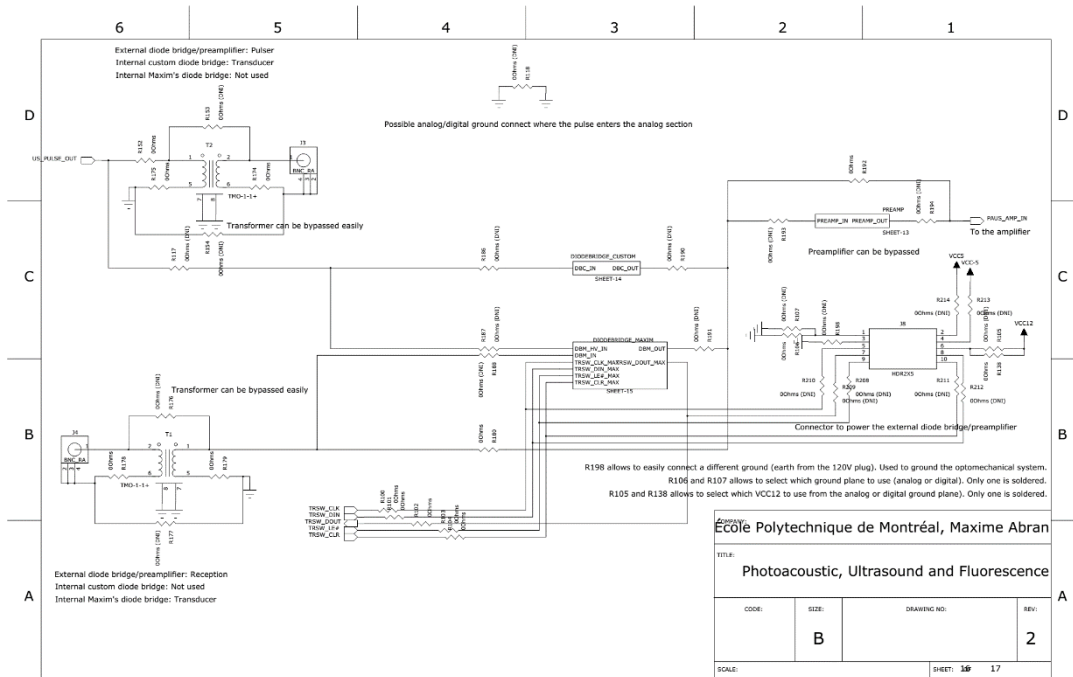




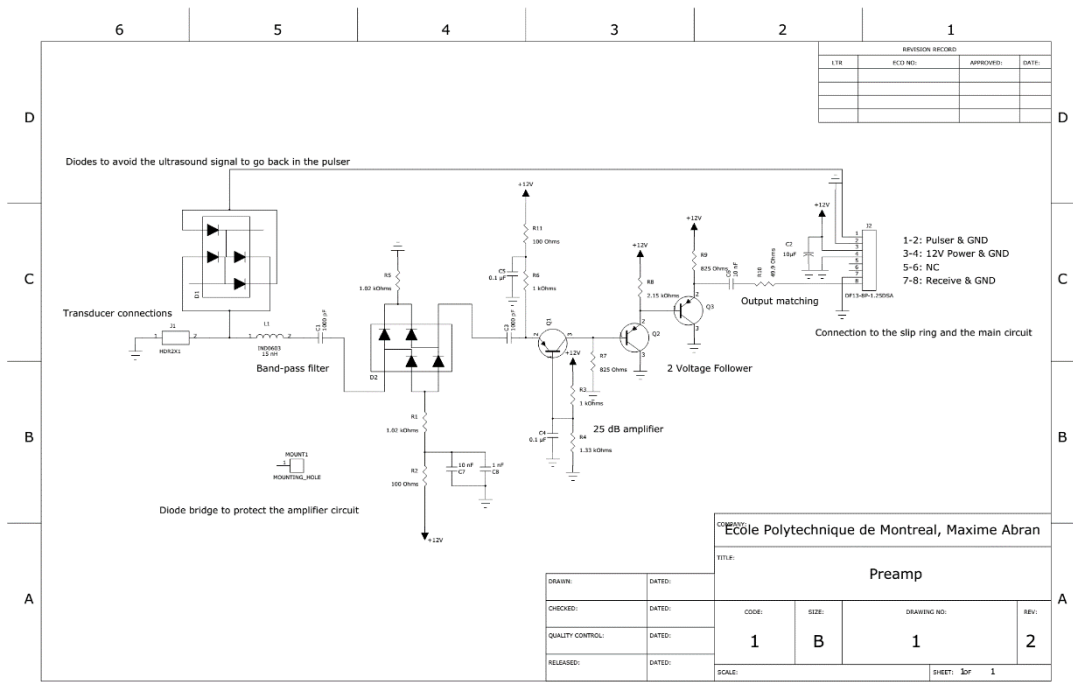
École Polytechnique de Montréal, Maxime Abran TITLE: Photoacoustic, Ultrasound and Fluorescence			
CODE:	SIZE:	DRAWING NO:	REV:
	B		2
SCALE:			SHEET: 17



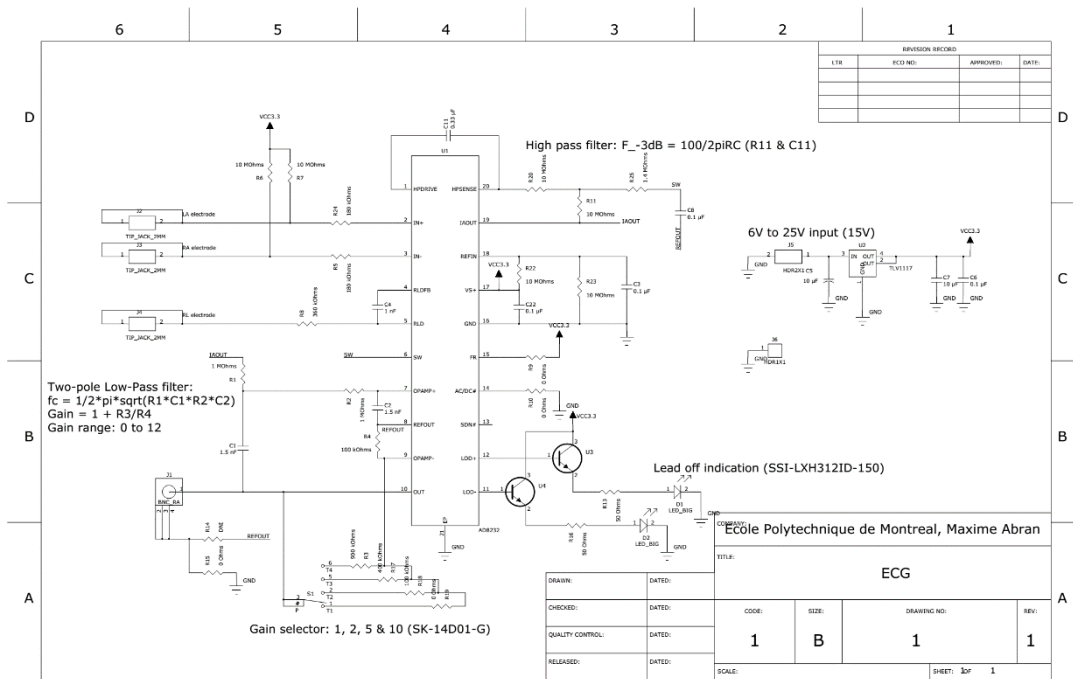
École Polytechnique de Montréal, Maxime Abran TITLE: Photoacoustic, Ultrasound and Fluorescence			
CODE:	SIZE:	DRAWING NO:	REV:
	B		2
SCALE:			SHEET: 17



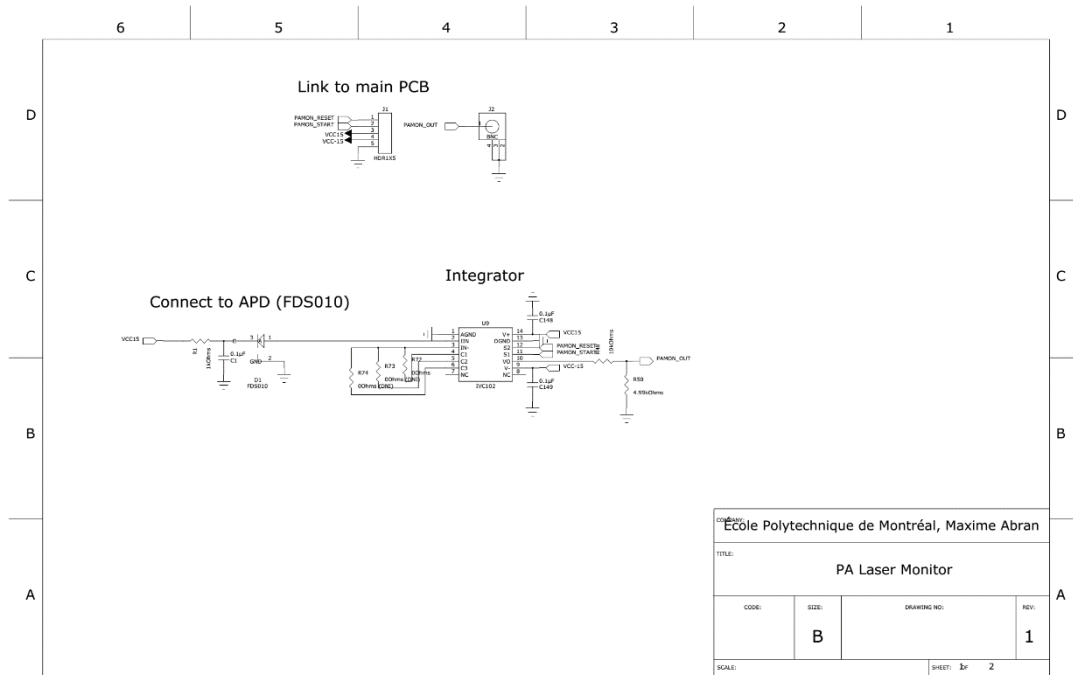
La figure suivante montre le circuit imprimé de la carte de préamplification.



La figure suivante montre le circuit imprimé permettant l'acquisition de l'électrocardiogramme.



La figure suivante montre le circuit imprimé permettant le suivi de l'amplitude des impulsions photoacoustiques.



Les figures suivantes montrent le circuit imprimé utilisé pour isoler électriquement l'alimentation des moteurs.

