



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1295

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED-160
(Electrotechnique Electronique Automatique)

LabEX PRIMES

Spécialité de doctorat : Ingénierie pour le vivant

Soutenue le 11/12/2017 par :

Laure ALSTON

Spectroscopie de fluorescence et imagerie optique pour l'assistance à la résection de gliomes : conception et caractérisation de systèmes de mesure et modèles de traitement des données associées, sur fantômes et au bloc opératoire

Devant le jury composé de :

DA SILVA , Anabela	Chargée de recherche	CNRS, Institut Fresnel, Marseille	Rapporteure
GIOUX , Sylvain	Professeur des Universités	Université de Strasbourg	Rapporteur
LAHRECH , Hana	Chercheure	CEA-Clnatec	Examinatrice
LE BOUQUIN JEANNES , Régine	Professeure des Universités	Université Rennes I	Examinatrice
ROUSSEAU , David	Professeur des Universités	Université D'Angers	Directeur de thèse
MONTCEL , Bruno	Maître de Conférences	Université Lyon 1	CoDirecteur de thèse
HEBERT , Mathieu	Maître de Conférences	Université Jean-Monnet	CoDirecteur de thèse
GUYOTAT , Jacques	Praticien Hospitalier	Hospices Civils de Lyon	Invité
MAHIEU-WILLIAME , Laurent	Ingénieur de recherche	CNRS, Creatis, Lyon	Invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G. RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

A la fin d'une thèse, seule une personne reçoit le titre de Docteur, et c'est ainsi que ça s'est passé pour moi le 11 décembre 2017. Et pourtant, j'en suis convaincue, la réussite de mes travaux fut uniquement possible grâce à un travail d'équipe incroyable pendant ces 3 ans. Je souhaite donc remercier ici tous ceux qui m'ont aidée dans cette aventure et j'espère que chacun, collègues, amis et famille, saura se reconnaître quelque part dans les lignes qui suivent.

Je souhaite commencer cette liste de remerciements en m'adressant à mes encadrants de thèse, grâce à qui j'ai pu mener à bien ce travail. Bruno, merci de m'avoir choisie pour le stage, proposé la thèse et surtout de m'avoir fait confiance ! Merci aussi pour ta rigueur et ton exigence scientifique qui m'ont obligée à creuser toujours plus les différents points qui me bloquaient et à être toujours exacte et précise dans ce que je disais et faisais. Je vois déjà dans mon nouveau travail les fruits de ces qualités transmises, merci à toi ! David, merci d'avoir dirigé cette thèse, merci pour tes conseils et ton dynamisme. Mathieu, merci pour ton regard bienveillant et efficace, notamment en tant que relecteur d'écrits et de présentations. Laurent, tu n'étais pas encadrant officiellement, mais merci pour le travail d'encadrement fourni officieusement, pour ton aide et pour ton exigence aussi.

Merci aux membres du jury qui ont lu et évalué ce manuscrit et ma présentation orale : merci Madame Da Silva et Monsieur Gioux pour vos rapports sur mon manuscrit et vos retours lors de ma soutenance. Merci aussi Mesdames Le Bouquin Jeannès et Lahrech pour vos remarques lors de la soutenance. Merci à chacun de vous pour nos échanges qui ont permis de bien clôturer ces travaux.

Merci Jacques d'avoir initié cette collaboration avec les HCL. Non seulement j'ai apprécié travailler avec toi et découvrir le monde de la neurochirurgie mais en plus, j'ai vraiment apprécié mon sujet de thèse. Je crois que je peux même dire qu'il m'a passionnée, merci à toi pour cette opportunité ! Merci Pascal pour ton aide sur cette étude clinique, merci Xavier et Julien pour votre aide notamment sur les aspects réglementaires, merci aussi aux Ibodes, aux anesthésistes, aux docteurs Meyronnet, Signorelli, Corvaisier et à tous les membres des HCL que j'oublie... Pensées aussi pour les patients dont les données ont servi pour cette thèse.

Merci aussi aux coups de pouces sur différents points du projet : Michaël, pour cette introduction au recalage, aux machines virtuelles, à git et pour le travail effectué ensemble, j'ai appris plein de choses grâce à toi et ce fut un plaisir de travailler avec toi ! Merci aux stagiaires, à ceux qui ont bossé sur le projet : Louis, Eloïse, Diana, Kevin et à ceux qui ont partagé quelques mois de notre quotidien : Médéric et Morgan. Merci aux différentes

personnes avec qui j'ai pu collaborer : merci Darine et Fanny, merci Cédric, Christian et Estelle. Merci aussi à Anne et Christophe (LMRN) pour votre aide en chimie.

Enfin, merci à mes compagnons du quotidien dont la présence fut si agréable ! Merci aux permanents de l'équipe 5 et à ceux de la plateforme. Spéciale dédicace au fournisseur de chocolats et de cafés : Kevin, merci pour ton écoute et ton sens du service. Merci Olivier de m'avoir acceptée dans l'équipe et au sein du laboratoire Creatis. Merci aux post-doctorants : Lorena, Eric et Benjamin pour vos conseils avisés, scientifiques ou non. Merci aux doctorants : merci à la « vieille » équipe qui a tracé la route, avec une mention particulière pour Fred et Hugo. Merci aussi à la jeune génération, arrivée après nous et avec qui les pauses petit-dej/dej/café/goûté ou même sans raison furent si agréables : Angéline, Eloïse, Mathilde, Clément, Jabrane et Hamza. Merci pour vos coups de pouces, merci pour votre amitié en somme. Merci Sophie pour ton aide lors des manips et merci à toutes les petites mains qui m'ont aidée, au labo ou au bloc. Merci Marion, Nadzeu et Sylvie, de m'avoir donné les conditions matérielles idéales pour réaliser ma thèse. Merci au LabEx PRIMES pour le financement de ces travaux, avec un merci spécial à Jean-Baptiste et Béatrice pour votre aide efficace et sympa ! Le travail de l'ombre n'est pas toujours souligné mais vous avez tous contribué à la réussite de ce projet. Merci aux collègues d'enseignement, avec une mention particulière pour toi Fabien, qui a réussi à me « geekiser » plus que je ne pensais et qui a réussi à me faire comprendre le traitement du signal, ce n'était pas gagné. Enfin, last but not least, merci au « trio labo » : merci Pauline et Isabelle ! Ces quelques lignes ne représentent pas grand-chose à côté de tout ce qu'on a partagé, et ce qu'on partage encore. Vous me connaissez, je ne me lancerai pas dans une séquence émotion, mais du fond du cœur, MERCI ! Merci pour votre amitié partagée quotidiennement, « tout simplement ».

Merci à vous, la branche CPE de Creatis en fait, pour la joie de venir travailler tous les matins. Grâce à vous, sur 3 ans et demi, pas une fois je suis venue travailler à reculons, c'est une chance inouïe ! Merci pour les discussions scientifiques qui m'ont permis d'apprendre plein de choses en imagerie médicale, et merci aussi pour les différentes pauses prises ensemble ; pour les discussions sur le quotidien ; pour les soirées binouzes, raclettes, barbeuc' ; pour la grimpe, le basket, le bad, le tennis et pour tous les autres moments tant agréables partagés ensemble.

Merci à vous, compagnons et amis du quotidien au laboratoire, de m'avoir permis d'apprendre tant de choses, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain !

Je n'allais pas conclure ses remerciements sans avoir une pensée pour tous ceux qui ont participé au bonheur de ces dernières années en étant hors des murs du laboratoire. Je ne ferai pas de liste ici, sinon les remerciements seraient plus longs que certaines parties de ce manuscrit... Merci aux différents groupes : amis de la CC, du CAF, TGTDM, Ste Marie

power, compas chéris, Team Me Voici, Lyon !, co-voit qui eut plus ou moins lieu... Merci aux compagnons de sorties ski de rando, ski, rando, soirées, weekends, EVJF ou mariages, merci aux amis de voyage (oui en thèse on a le temps de voyager), merci pour les déjeuners à Charpennes, merci pour les moments du quotidien partagés avec vous. Je souhaite remercier particulièrement celles et ceux qui m'ont préparé des repas, changé les idées, écrit et gâtée pendant la période de rédaction un peu laborieuse et celles et ceux qui ont posé un jour (ou une soirée ;))pour partager avec moi l'aboutissement de ces travaux. Vous vous reconnaîtrez j'espère. Dédicace spéciale à mes différents colocos pour le quotidien partagé : Albane, Camille, Anne-Ma, Agathe et Alexis. Merci enfin au soutien familial : les parents bien sûr, pour les conseils durant la thèse mais surtout pour tout ce que vous m'avez transmis. On ne le dit pas souvent, alors MERCI. Les garçons aussi, Thom Greg et Steph : merci de vous être intéressés à mon sujet de thèse et à son déroulement, merci Thom et Greg d'avoir fait le déplacement à Lyon pour ma soutenance. Enfin, merci à « Fagosse Family » pour les temps de vacances et les mille messages reçus.

Bref, merci à vous, famille et amis pour votre présence et pour tout ce que vous m'apportez, je suis gâtée !

Enfin, merci à toi cher lecteur qui ouvre ce manuscrit résumant 3 ans et demi de travail parfois compliqué mais toujours passionnant. J'espère que tu y trouveras tout ce que tu cherches. Bonne lecture !

Résumé

Les gliomes sont des tumeurs cérébrales infiltrantes difficilement curables, notamment à cause de la difficulté à visualiser toutes les infiltrations tumorales au bloc opératoire. Dans cette thèse, nous réalisons une étude clinique de spectroscopie de fluorescence de la protoporphyrine IX (PpIX) dans les gliomes de 10 patients. Notre hypothèse innovante est que les spectres collectés proviennent de la contribution de deux états de la PpIX dont les proportions varient suivant la densité en cellules tumorales. Après avoir présenté le développement du système interventionnel proposant une excitation multi-longueurs d'onde, nous présentons son utilisation sur fantômes de PpIX mimant les propriétés des gliomes. Cette étude sur fantômes permet tout d'abord d'obtenir les spectres de référence émis par les deux états séparément puis de proposer un modèle d'ajustement des spectres comme une combinaison linéaire de ces deux spectres de référence sur la bande spectrale 608-637 nm. Ensuite, nous présentons la mise en place de l'étude clinique, notamment l'analyse de risques, avant d'appliquer ce système *in vivo*. Les résultats *in vivo* montrent que nous détectons de la fluorescence dans des tissus où le microscope chirurgical n'en détecte pas et que ceci pourrait s'expliquer par un changement d'état de la PpIX entre le cœur des gliomes et leurs infiltrations, confirmant la présence et l'importance de ces deux états. Nous montrons par ailleurs l'intérêt de l'excitation multi-longueurs d'onde en montrant que la corrélation des spectres acquis aux trois excitations décroît avec la densité en cellules tumorale. Enfin, nous soulevons des pistes d'étude de l'identification peropératoire des zones de fonctionnalité cérébrale à l'aide d'une caméra optique ainsi que l'étude du temps de vie de fluorescence et de la fluorescence deux photons de la PpIX sur fantômes.

Mots clefs: gliomes, spectroscopie de fluorescence, protoporphyrine IX, neurochirurgie, développement instrumental, étude clinique, traitement du signal, traitement d'image, recalage d'image, imagerie RVB

Abstract

Gliomas are infiltrative tumors of the brain which are currently rarely curable, notably because of the difficulty to precisely delimitate their margins during surgery. Intraoperative 5-ALA induced protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence microscopy has shown its relevance to assist neurosurgeons but lacks sensitivity. In this thesis, we perform a spectroscopic clinical trial on 10 patients with the assumption that collected fluorescence is a linear combination of the contribution of two states of PpIX whose proportions vary with the density of tumor cells. This work starts with the development of the intraoperative, portable and real-time fluorescence spectroscopic device that provides multi-wavelength excitation. Then we show its use on PpIX phantoms with tissue mimicking properties. This first enables us to obtain a reference emitted spectrum for each state separately and then permits the development of a fitting model to adjust any emitted spectrum as a linear combination of the references in the spectral band 608-637 nm. Next, we present the steps undertaken to obtain approvals for the clinical trial, especially the risk analysis. *In vivo* data analysis is then presented, showing that we detect fluorescence where current microscopes cannot, which could exhibit a change in PpIX state from glioma center to its margins. Besides, the relevance of multi-wavelength excitation is highlighted as the correlation between the three measured spectra of a same sample decreases with the density of tumor cells. Finally, the complementary need to intraoperatively identify cerebral functional areas is tackled with optical measurements as a perspective and other properties of PpIX on phantoms are also raised.

Keywords: Glioma, neurosurgery, fluorescence spectroscopy, protoporphyrin IX, optics, instrumental development, clinical study, image registration, RGB imaging

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
RESUME	7
ABSTRACT	8
TABLE DES MATIÈRES	9
LISTE DES ABREVIATIONS	13
LEXIQUE MEDICAL	15
INTRODUCTION GENERALE.....	17
CHAPITRE 1 CONTEXTE ET ETAT DE L'ART : BESOIN D'ASSISTANCE PEROPERATOIRE POUR LA RESECTION DE GLIOMES	21
1.1 - LE CERVEAU SAIN ET LES GLIOMES.....	21
1.1.1 - <i>Le cerveau sain</i>	21
1.1.2 - <i>Les gliomes</i>	23
1.1.3 - <i>Problématique clinique</i>	24
1.2 - BASES DE L'INTERACTION LUMIERE-MATIERE DANS LES TISSUS BIOLOGIQUES	26
1.2.1 - <i>Absorption</i>	26
1.2.2 - <i>Diffusion</i>	27
1.2.3 - <i>Fluorescence</i>	27
1.3 - LES TECHNIQUES ACTUELLES D'ASSISTANCE PEROPERATOIRE POUR L'IDENTIFICATION DES MARGES TUMORALES ET LEURS LIMITES	33
1.3.1 - <i>Techniques non optiques actuellement utilisées en routine clinique</i>	33
1.3.2 - <i>Techniques optiques : Microscopie de fluorescence</i>	35
1.3.3 - <i>Conclusion sur les techniques actuelles</i>	36
1.4 - TECHNIQUES D'ASSISTANCE EN COURS DE DEVELOPPEMENT UTILISEES AU BLOC OPERATOIRE	37
1.4.1 - <i>Spectroscopie de fluorescence de la PpIX</i>	37
1.4.2 - <i>Spectroscopie Raman</i>	43
1.4.3 - <i>Etude de l'autofluorescence</i>	44
1.4.4 - <i>Récapitulatif des techniques en cours de développement déjà testées au bloc opératoire</i>	45
1.5 - PRESENCE D'UN DEUXIEME ETAT DE FLUORESCENCE DE LA PpIX	47
1.5.1 - <i>Variabilité du spectre émis par la PpIX dans la littérature</i>	47
1.5.2 - <i>Etude préliminaire sur biopsies en considérant les deux états de fluorescence de la PpIX</i>	51
1.5.3 - <i>Propriétés de fluorescence de ces deux états</i>	52
1.6 - CONCLUSION	53
CHAPITRE 2 CONCEPTION, DEVELOPPEMENT ET CARACTERISATION DU SYSTEME DE SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE	55
2.1 - CAHIER DES CHARGES ET DESCRIPTION GENERALE	55
2.2 - PRESENTATION ET CARACTERISATION DES PRINCIPAUX COMPOSANTS.....	59
2.2.1 - <i>Partie commande : Ordinateur et interface Labview®</i>	59
2.2.2 - <i>Système d'excitation</i> :.....	60

2.2.3 - Sonde	63
2.2.4 - Système de détection	66
2.3 - ASSEMBLAGE ET CARACTERISATION DU SYSTEME COMPLET	67
2.3.1 - Puissance en sortie du système	67
2.3.2 - Spectres en sortie du système	68
2.3.3 - Fonction de transfert du système	69
2.4 - CONCLUSION	70
CHAPITRE 3 ETUDE SUR FANTOMES ET DEVELOPPEMENT DU MODELE D'AJUSTEMENT DES SPECTRES	71
3.1 - SYSTEME DE MESURE SUR FANTOMES	71
3.2 - OBTENTION DES SPECTRES D'EMISSION DE REFERENCE POUR CHAQUE ETAT	72
3.3 - PROTOCOLE DE MESURE SUR FANTOMES PRESENTANT LES DEUX ETATS DE FLUORESCENCE	75
3.4 - DEVELOPPEMENT DU MODELE D'AJUSTEMENT DES SPECTRES MESURES SUR FANTOMES OPTIQUES	76
3.4.1 - Traitement préliminaire : obtention des spectres bruts	77
3.4.2 - Développement du modèle d'ajustement	77
3.4.3 - Modèle retenu	80
3.5 - RESULTATS ET DISCUSSION : CONTRIBUTION DES DEUX ETATS A LA FLUORESCENCE EMISE	80
3.5.1 - Variation des contributions suivant la source d'excitation	81
3.5.2 - Allure des spectres émis en fonction du microenvironnement	82
3.5.3 - Contribution de chaque état de fluorescence en fonction du microenvironnement	83
3.6 - ETUDE DE LA LONGUEUR D'ONDE CENTRALE ET COMPARAISON AVEC DES SIMULATIONS	87
3.6.1 - Modèle	87
3.6.2 - Résultats	88
3.7 - CONCLUSION	89
CHAPITRE 4 MISE EN PLACE DE L'ETUDE CLINIQUE	91
4.1 - ETABLISSEMENT DU PROTOCOLE D'ETUDE CLINIQUE	91
4.1.1 - Justification de la mise en place d'une étude clinique	91
4.1.2 - Classement du dispositif médical étudié	91
4.1.3 - Objectifs de l'étude	92
4.1.4 - Inclusion des patients	92
4.1.5 - Protocole de mesure au bloc opératoire	92
4.1.6 - Comparaison au gold standard : étude anatomo-histopathologique	94
4.1.7 - Analyse de risque	94
4.1.8 - Autorisations obtenues	101
4.1.9 - Evénements Indésirables Graves et arrêts temporaires de l'étude	101
4.2 - REPONSE AUX OBJECTIFS DE L'ETUDE CLINIQUE	102
4.2.1 - Faisabilité technique	102
4.2.2 - Sécurité d'utilisation	103
4.2.3 - Faisabilité scientifique	103
CHAPITRE 5 SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE DE LA PPIX SUR GLIOMES HUMAINS AVEC EXCITATION MULTI-LONGUEURS D'ONDE	105
5.1 - DES DONNEES BRUTES AU SPECTRE DE PPIX NORMALISE	105
5.1.1 - Obtention d'un spectre par DEL et par échantillon	106
5.1.2 - Retrait de l'autofluorescence	106

5.1.3 - Normalisation.....	107
5.2 - ALLURE DES SPECTRES DE PPIX ET EXCLUSION D'ÉCHANTILLONS	108
5.2.1 - Observation des spectres et comparaison à la classification anatomo-histopathologique	108
5.2.2 - Calcul du rapport signal à bruit	113
5.2.3 - Conclusion : échantillons exclus.....	114
5.3 - TRAITEMENT PARAMÉTRIQUE : AJUSTEMENT DES SPECTRES OBTENUS A L'AIDE DES DEUX ETATS DE REFERENCE.....	115
5.3.1 - Ratio 620/634 : comparaison avec l'étude de 2013	116
5.3.2 - Graphes 2D des paramètres renvoyés par l'ajustement des spectres sous excitation à 405 nm..	119
5.3.3 - Comparaison aux autres longueurs d'onde d'excitation in vivo	127
5.3.4 - Comparaison des mesures in vivo avec les mesures ex vivo.....	129
5.3.5 - Conclusion de l'analyse paramétrique et perspectives	132
5.4 - INTERET DE L'EXCITATION MULTI-LONGUEURS D'ONDE : REPRESENTATION 3D	134
5.4.1 - Allure des graphes 3D	134
5.4.2 - Calcul du volume occupé par le nuage de points de tous les échantillons d'une même classe	136
5.4.3 - Biomarqueurs associés à une analyse en composantes principales	140
5.4.4 - Conclusion et perspectives de l'intérêt de l'excitation multi-longueurs d'onde.....	144
5.5 - CONCLUSION	146
CHAPITRE 6 PERSPECTIVES INITIEES DURANT LA THESE.....	149
6.1 - ETUDE COMPLÉMENTAIRE : VERS UNE IDENTIFICATION PEROPERATOIRE ET TEMPS-REEL DE LA FONCTIONNALITE CEREBRALE A L'AIDE D'UNE CAMERA	149
6.1.1 - Bases de physiologie cérébrale.....	150
6.1.2 - Introduction des techniques peropératoires d'assistance pour l'identification de la fonctionnalité cérébrale en neurochirurgie	150
6.1.3 - Modèle de traitement des variations colorimétriques basé sur la loi de Beer Lambert modifiée.	152
6.1.4 - Etude préliminaire avec caméra RVB du microscope opératoire.....	153
6.2 - ETUDE DES PROPRIETES NON LINEAIRES DES DEUX ETATS DE LA PPIX	161
6.2.1 - Matériel et méthodes	161
6.2.2 - Résultats et discussion	162
6.3 - RECHERCHE DU TEMPS DE VIE DE CHAQUE ETAT DE LA PPIX	164
6.3.1 - Matériel et méthode.....	164
6.3.2 - Résultats et discussion	165
6.4 - COMPARAISON AVEC L'ESTER DE PPIX.....	166
6.5 - CONCLUSION	167
CONCLUSION GENERALE	169
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	173
REVUES INTERNATIONALES AVEC COMITE DE LECTURE	173
CONFERENCES INTERNATIONALES AVEC COMITE DE LECTURE ET PUBLICATION DES ACTES.....	173
CONFERENCES NATIONALES AVEC COMITE DE LECTURE	173
BIBLIOGRAPHIE	175
.....	

Liste des abréviations

5-ALA :	Acide 5 Aminulevulonic
ACP :	Analyse en Composantes Principales
AF :	Anisotropie Fractionnelle
ANSM :	l'Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé
ATNC :	Agent Transmissible Non Conventionnel
BHE :	Barrière Hémato-Encéphalique
CCD :	Charge Coupled Device
CpIII :	CoProporphyrine III
CPP :	Comité de Protection de la Personne
DEL :	Diode Electro Luminescente
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
EIG :	Evènement Indésirable Grave
EOR :	Extent Of Resection
FT :	Fonction de Transfert
GBG :	Gliome de Bas Grade
GBM :	Glioblastome Multiforme
GHG :	Gliome de Haut Grade
Hb :	Hémoglobine désoxygénée
HbO ₂ :	Hémoglobine oxygénée
HES :	Hématéine-Eosine-Safran
IRM :	Imagerie par Résonance magnétique
IRMf :	IRM fonctionnel
ICG :	Indo Cyanine Green
IDH :	Isocitrate DesHydrogénase
IRLS :	Iterative Reweighted Least Square
LK :	Lucas and Kanade
NADH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NaOH :	Hydroxyde de sodium
OMS :	Organisation Mondiale de le Santé
PA :	Potentiel d'Action
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PDT :	Photo Dynamic Therapy
PpIX :	Protoporphyrine IX
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire (image provenant d'une IRM)
RVB :	Rouge Vert Bleu
SMA :	SubMiniature version A
UpIII :	Uroporphyrine III
ULS :	Unweighted Least Square

Lexique médical

Les termes médicaux suivis d'un astérisque dans ce mémoire de thèse sont définis ici à partir du dictionnaire Larousse.

- Anaplasique :** Se dit de certains néoplasmes dont l'absence de différenciation histologique rend difficile le diagnostic d'origine. Les tumeurs anaplasiques présentent donc des cellules tumorales très différentes des cellules saines initiales.
- Cortex :** Partie externe qui forme l'enveloppe d'un organe
- Cytonucléique :** Qui a trait aux caractères morphologiques des noyaux
- Encéphale :** Partie du système nerveux central et de ses enveloppes contenues dans la boîte crânienne des vertébrés
- Endothélial :** Relatif à l'endothélium
- Endothélium :** Fine couche de cellules tapissant la face interne de la paroi des vaisseaux sanguins et lymphatiques
- Exérèse :** Opération consistant à enlever un organe, un ensemble de tissus ou un corps étranger par voie chirurgicale
- Girus :** Circonvolution cérébrale
- Homéostasie :** Processus de régulation par lequel l'organisme maintient les différentes constantes du milieu intérieur entre les limites des valeurs normales.
- Métabolisme :** Ensemble des processus complexes et incessants de transformation de matière et d'énergie par la cellule ou l'organisme.
- Mitotique :** Relatif à la mitose
- Mitose :** Mode général, assez complexe, de division de la cellule, caractérisé par la duplication de tous ses éléments et par leur répartition égale dans les deux cellules filles
- Nécrose :** Transformation d'ordre physico-chimique et chimique que subit la matière vivante et qui aboutit à sa mort
- Péricyte :** Cellule murale de l'endothélium
- Résection :** Opération consistant à enlever un organe, un ensemble de tissus ou un corps étranger par voie chirurgicale
- Technique peroxydase :** Technique immunologique de révélation d'antigènes
- Gliose :** Prolifération de cellules gliales, souvent pour former une cicatrice astrocytaire.
- Dessication :** Action de (se) dessécher

Introduction générale

Le cancer tue aujourd'hui 13 % de la population dans le monde et ce pourcentage ne cesse d'augmenter (WHO, 2008). Les tumeurs cérébrales ne représentent qu'une faible part des cancers (1% en France) mais un tiers d'entre elles sont malignes. Les gliomes représentent la moitié des tumeurs cérébrales et sont un enjeu majeur de santé publique. Ce sont des tumeurs infiltrantes, ce qui les rend difficilement curables. La majorité des gliomes sont des glioblastomes, tumeur dont l'espérance de vie dépasse à peine un an (American Brain Tumor Association). Outre le caractère malin de certains gliomes, leur présence peut impliquer différents symptômes tels que des maux de tête, des nausées, mais aussi des crises d'épilepsie, des changements de personnalité, des faiblesses musculaires, voire une semi-paralysie ou paralysie complète du patient (WebMD). Lorsque c'est possible, les patients présentant un gliome sont opérés dans le but d'éliminer un maximum de cellules tumorales pour diminuer les effets de la tumeur et éviter sa progression. Cependant, dans plus de 85 % des cas de glioblastomes, les patients opérés présentent une récurrence dans la cavité de la précédente opération (Petrecca et al., 2013). Ce fort risque de récurrence s'explique par le caractère infiltrant des gliomes et la difficulté de séparer les infiltrations tumorales du tissu sain en temps réel lors de l'opération. De plus, ces tumeurs apparaissent dans le tissu glial, qui est un tissu de soutien des neurones. Les gliomes peuvent donc être situés à côté d'une zone cérébrale fonctionnelle, voire dedans, ce qui complique l'exérèse du fait des lourds déficits post-opératoires qu'une résection de ces zones peut entraîner.

Ainsi, en présence d'un gliome, le neurochirurgien est confronté à un double défi : il doit d'une part identifier les infiltrations tumorales afin d'enlever un maximum de tumeur et ainsi augmenter l'espérance de vie et d'autre part identifier la fonctionnalité cérébrale afin de limiter les dommages post-opératoires et ainsi préserver la qualité de vie. Cette double identification doit être faite en temps réel, une fois le cerveau exposé, car les techniques d'imagerie préopératoires ne donnent pas de cartographies suffisamment fidèles à ce qu'observe le chirurgien lors de l'opération. En effet, l'ouverture de la boîte crânienne implique un changement de pression et un affaissement du cerveau, phénomène appelé « *brain shift* », qui génère un décalage pouvant aller jusqu'à 3 cm entre la disposition du tissu cérébral sur l'image avant craniectomie et celle dans le champ opératoire (Nabavi et al., 2009).

Différentes techniques peropératoires existent déjà pour guider le neurochirurgien et ont permis d'augmenter l'espérance de vie moyenne de quelques mois tout en améliorant la qualité de vie. Cependant, ces techniques présentent un certain nombre de limites qu'il est nécessaire aujourd'hui de dépasser. L'émergence des techniques optiques présente un fort potentiel puisqu'elles sont non invasives, non ionisantes, compatibles avec une analyse en temps réel et peu onéreuses (Valdés et al., 2016). Afin d'identifier les infiltrations tumorales en temps réel, l'exploitation des propriétés de fluorescence des tissus a notamment fait ses preuves depuis une vingtaine d'années et la microscopie de fluorescence de la

protoporphyrine IX (PpIX) est aujourd'hui utilisée en routine clinique (Stummer et al., 2006). De nombreux travaux continuent d'exploiter ce potentiel pour essayer d'identifier les marges tumorales, et c'est dans ce cadre que s'inscrit le principal objectif de cette thèse. Afin d'identifier la fonctionnalité cérébrale, l'IRM fonctionnelle étudie les variations hémodynamiques induites par la stimulation d'une zone cérébrale fonctionnelle. Le second objectif de cette thèse vise à identifier ces mêmes variations hémodynamiques en utilisant une caméra filmant le cerveau. En effet, les variations hémodynamiques impliquent des variations colorimétriques que nous cherchons à détecter via la caméra.

Dans cette thèse, nous présentons donc le développement, la caractérisation et l'utilisation au bloc opératoire de deux techniques optiques pour répondre au double défi qui se présente aux neurochirurgiens face aux gliomes. Les cinq premiers chapitres présentent les travaux associés au principal objectif de la thèse, qui est l'identification des marges tumorales, tandis que le sixième chapitre présente principalement l'étude complémentaire menée dans le but d'identifier la zone fonctionnelle associée au mouvement de la main.

Plus précisément, nous présenterons dans le premier chapitre le contexte de travail, à savoir les tissus d'étude, les fondements des interactions lumière-matière exploités dans la thèse et les méthodes optiques appliquées *in vivo* pour identifier les infiltrations tumorales des gliomes. Nous soulèverons ici le potentiel de la PpIX dans la discrimination des marges tumorales et l'intérêt de la spectroscopie de fluorescence de la PpIX pour obtenir une mesure objective et quantitative mais aussi la variabilité de son spectre d'émission suivant son microenvironnement. Ce chapitre nous permettra d'introduire la présence de deux états de la PpIX aux propriétés de fluorescence différentes.

Le deuxième chapitre présentera la conception, l'assemblage et la caractérisation du système interventionnel développé pour répondre à ce besoin. Les différents constituants seront présentés, avant de présenter le système dans son ensemble. Puisque nous cherchons à identifier deux états aux propriétés d'absorption différentes, nous avons choisi une excitation multi-longueurs d'onde adaptée aux deux états recherchés. L'excitation et la détection de lumière se fera via une sonde qui sera présentée dans ce chapitre. Enfin, la fonction de transfert du système sera proposée.

Le troisième chapitre propose la caractérisation de ce système sur des fantômes optiques de PpIX, afin de développer et valider un modèle de traitement des données dans un environnement connu, avant d'effectuer des mesures *in vivo*. Nous présenterons ainsi l'acquisition du spectre d'émission des deux états précédemment introduits avant de proposer différents fantômes dont le spectre d'émission est un mélange des deux spectres précédents, ce qui nous permettra d'établir un modèle d'ajustement de spectres. Ces mesures permettront par ailleurs de compléter la standardisation de fantômes optiques de PpIX déjà proposée (Marois et al., 2016).

Le quatrième chapitre est une étape préliminaire à l'étude *in vivo* puisqu'il propose l'établissement du protocole de recherche biomédicale nécessaire pour la mise en place technique et juridique de l'étude clinique.

Le cinquième chapitre présente les résultats des mesures effectuées *in vivo*, sur 10 patients. Nous commencerons par présenter l'allure des spectres collectés avant de proposer deux modèles de traitement et les résultats associés. Le premier modèle utilise l'ajustement développé dans le Chapitre 3 et vise à montrer la présence de ces deux états *in vivo* et leur intérêt pour dépasser les limites des techniques actuelles d'assistance peropératoire. Le deuxième modèle étudie la corrélation de l'information spectrale renvoyée par les trois sources d'excitation pour un même échantillon. Le but de ce chapitre est ainsi de mettre en évidence différents biomarqueurs potentiels pour discriminer les différentes classes de tissu.

Le sixième chapitre de ce manuscrit propose les perspectives de ces travaux. Ces perspectives sont tout d'abord une étude complémentaire à l'étude des zones tumorales en étudiant la fonctionnalité cérébrale à l'aide d'une caméra optique. Le traitement des vidéos acquises sera présenté, notamment le développement d'un algorithme de recalage de ces vidéos en temps réel. Des résultats préliminaires de l'identification de la zone motrice en temps réel seront ensuite proposés. Nous présenterons dans une seconde partie l'initiation de deux collaborations, l'une pour mesurer le temps de vie de fluorescence des deux états de la PpIX sur fantômes et l'autre pour étudier leurs propriétés non linéaires (génération de seconde harmonique et fluorescence deux-photon), toujours sur fantômes. Enfin, nous proposerons une ouverture sur l'utilisation de l'ester de PpIX.

Chapitre 1

Contexte et état de l'art : besoin d'assistance peropératoire pour la résection de gliomes

Nous avons vu dans l'introduction de ce manuscrit la nécessité de développer des techniques interventionnelles pour guider le neurochirurgien dans la résection de gliomes. Dans ce chapitre, nous présentons le contexte de ces travaux d'identification des infiltrations tumorales en temps réel, au bloc opératoire, en détectant la fluorescence émise par la protoporphyrine IX (PpIX) après ingestion de la molécule 5-ALA (acide 5-aminolévulinique).

Ainsi, nous commencerons par décrire les tissus biologiques d'étude, tant le cerveau sain que les gliomes. Ensuite, nous énoncerons les bases physiques des interactions entre la lumière et les tissus biologiques, notamment la fluorescence. Nous présenterons après les techniques d'assistance utilisées actuellement en routine clinique, puis les différentes techniques de spectroscopie optique en cours de développement déjà testées dans le bloc opératoire. Enfin, nous montrerons la variabilité du spectre émis par la PpIX et conclurons par une présentation du cadre de travail de cette thèse.

1.1 - Le cerveau sain et les gliomes

Dans cette partie, nous présenterons les deux types de tissus analysés au cours de ces travaux et la problématique clinique qui en découle. Durant la présentation des tissus, nous nous intéresserons uniquement aux éléments et propriétés d'intérêt pour la thèse.

1.1.1 - Le cerveau sain

Nous présentons dans cette partie la structure et les propriétés du tissu sain qui seront utilisées par la suite.

1.1.1.1 - Morphologie

Le cerveau est schématiquement séparé en deux hémisphères, droit et gauche, chacun sous divisé en 5 lobes et en gyri* individualisés par des sillons, visibles sur la Figure 1-1 A. Une cartographie fonctionnelle reposant sur une organisation en aires dédiées à des fonctions précises a été ébauchée par Gall et confirmée par Broca au XIX^{ème} siècle (Saban, 2002). Cette structuration est actuellement remise en cause pour faire place à une organisation en réseau (Duffau, 2017). Nous reviendrons rapidement sur la fonctionnalité cérébrale dans le

Chapitre 6 lorsque nous présenterons des pistes d'étude de cette fonctionnalité en temps réel au bloc opératoire.

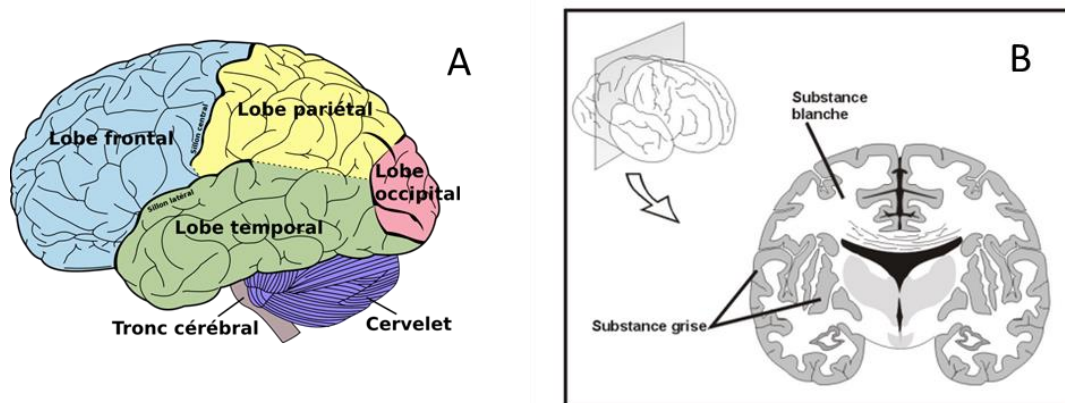


Figure 1-1 : Structure du cerveau. A) Lobes externes. Extrait de (Gray's Anatomy). B) Vue en coupe du cerveau. Extrait de (Leh, 2011).

Le cerveau est entouré de plusieurs tissus représentés sur la Figure 1-2. Nous observons d'abord des enveloppes protectrices, les méninges, composées de 3 feuillets : la dure mère (adhérente à l'endocrâne*), l'arachnoïde et la pie mère (collée au cortex). Entre l'arachnoïde et la pie-mère se trouve le liquide cérébro-spinal, liquide composé à 99% d'eau qui joue principalement un rôle dans le maintien de la stabilité des pressions intra crâniennes et de l'homéostasie* cellulaire du cerveau. Autour de ces enveloppes se trouvent la boîte crânienne (os et périoste), les muscles temporaux et occipitaux (non représentés sur la Figure 1-2) et la peau.

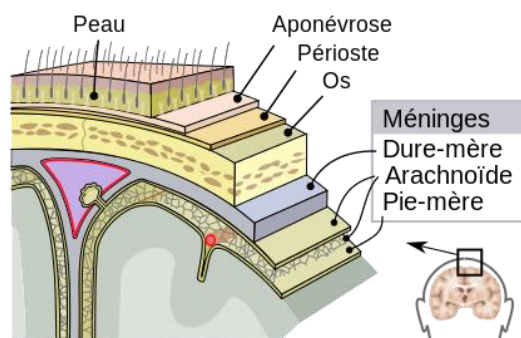


Figure 1-2: Enveloppes protectrices du cerveau (image libre de droit du « National Institute of Health »).

Lors d'une intervention chirurgicale, ces tissus sont incisés pour atteindre le cerveau. L'ouverture de la méninge entraîne une diminution de la pression intracrânienne par fuite du liquide cérébro-spinal, et donc un déplacement du tissu cérébral. Ce phénomène, appelé « *brain shift* », provoque un décalage entre la localisation des structures anatomiques ou les limites d'une tumeur visualisées en peropératoire et leur repérage sur l'imagerie préopératoire. Ce décalage peut aller jusqu' à 3 centimètres (Nabavi et al., 2001).

1.1.1.2 - Ultrastructure

Le cerveau contient plusieurs centaines de milliards de cellules, réparties en deux catégories : les neurones et les cellules gliales. Ces cellules sont localisées dans la substance

grise périphérique, aussi appelée « cortex cérébral » et dans la substance blanche sous corticale. Les substances blanches et grises sont visibles sur la Figure 1-1B.

Les neurones sont composés d'un corps cellulaire où est traitée l'information, localisé dans le cortex, et d'un axone, situé dans la substance blanche, assurant la transmission de l'influx nerveux entre le cortex et les différentes structures de l'encéphale*. Chaque neurone communique en moyenne avec 10 000 autres via des changements de potentiel électrique au niveau des synapses, à l'extrémité des axones.

Les cellules gliales forment le tissu de soutien des neurones, assurant notamment le métabolisme* cérébral. Elles sont mélangées aux neurones et sont cinq à dix fois plus nombreuses que les neurones dans le cortex (Azevedo et al., 2009). Cette interconnexion explique la complexité à retirer les tumeurs associées, les gliomes. Ces cellules gliales peuvent être divisées en deux groupes : la microglie et la macroglie. La microglie est composée de cellules qui interviennent dans la défense immunitaire du cerveau (macrophage et autres cellules de l'inflammation) ; la macroglie est composée des oligodendrocytes et des astrocytes. Les oligodendrocytes ont pour fonction la formation de la gaine de myéline qui entoure les axones, permettant d'augmenter la vitesse de propagation et la fréquence des influx nerveux. Les tumeurs associées sont les oligodendrogliomes. Les astrocytes assurent la nutrition des neurones et permettent une régulation du milieu extracellulaire (étant situés entre les neurones et le système vasculaire). La tumeur associée à ces cellules est l'astrocytome.

Ce sont les astrocytes, avec des péricytes* et des cellules endothéliales, qui forment la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). Cette barrière est un filtre physiologique sélectif qui protège le cerveau de l'attaque d'éléments extérieurs. Ce filtre laisse uniquement passer les nutriments nécessaires au fonctionnement du cerveau et permet l'élimination des déchets (Janzer 1993). De nombreuses molécules actives ne peuvent pas traverser cette BHE, et il semblerait que la molécule de 5-ALA la traverse difficilement dans les tissus sains. Toutefois la présence d'un gliome de haut grade implique une rupture de cette barrière, ce qui permet le passage passif de certaines molécules normalement bloquées, comme le gadolinium (marqueur utilisé en IRM pour l'identification de ces tumeurs), des molécules de chimiothérapie, le 5-ALA à plus haute dose (Novotny and Stummer, 2003) ou la fluorescéine.

1.1.2 - Les gliomes

Les gliomes représentent 50 % des tumeurs primitives cérébrales. Leur degré de malignité, donc leurs conséquences, peuvent être très différents. L'origine de ces tumeurs est inconnue, même si des recherches de mutations génétiques sont en cours (Louis et al., 2016; Marumoto and Saya, 2012) et si certains facteurs environnementaux sont avancés. En 2007, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a proposé une classification des tumeurs cérébrales fondée sur des critères histologiques (Louis et al., 2007) puis elle a amélioré cette classification en 2016 en prenant en compte des critères moléculaires en plus de l'histologie (Louis et al., 2016). L'objectif pratique de cette classification est de mieux prédire le pronostic de ces tumeurs et ainsi améliorer la prise en charge thérapeutique des patients en

leur proposant un protocole adapté. Cette classification sépare les gliomes en quatre grades, suivant leur malignité : le grade I bien circonscrit est curable par chirurgie, le grade II (gliome bénin) est une tumeur diffuse provenant des astrocytes ou des oligodendrocytes, le grade III est issu des mêmes cellules mais ces dernières ont acquis des propriétés de malignité et le grade IV ou glioblastome multiforme (GBM) est issu d'emblée d'une cellule indifférenciée (glioblastome primaire) ou provient de la dégénérescence maligne d'un gliome de grade II ou de grade III (glioblastome secondaire) (Louis et al., 2016). Toutefois, dans notre étude comme dans de nombreuses autres, nous séparerons les gliomes en deux classes : d'une part les Gliomes de Haut Grade (GHG) de grade IV (GBM) ou de grade III et d'autre part les Gliomes de Bas Grade (GBG) de grades I et II.

Les gliomes de grade II sont considérés comme histologiquement bénins mais peuvent être qualifiés d'état précancéreux. Ils apparaissent chez des patients plus jeunes (vers 40 ans contre 60 ans pour les GBM) et sont hautement surveillés puisqu'ils se transforment pratiquement toujours en gliomes malins après 5 à 10 ans (Gilbert and Lang, 2007). Par ailleurs, ce sont des tumeurs très diffuses dont les limites sont difficiles à préciser par les techniques actuelles d'imagerie (Fouke et al., 2015; Pouratian and Schiff, 2010; Prabhu et al., 2010; Sanai et al., 2011a).

Les GBM sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes, représentant 80 % des gliomes. Ce sont aussi les plus malignes : l'espérance de vie du patient présentant un GBM ne dépasse pas 1 an et demi, avec un taux de survie à 5 ans de moins de 10 % (American Brain Tumor Association). Ces tumeurs apparaissent à tout âge mais préférentiellement chez les personnes âgées, ce qui soulève la question du risque d'une chirurgie. Devant leur haute incidence et leur faible taux de survie, de nombreuses études s'intéressent particulièrement à ces tumeurs, comme le prouve par exemple le nombre conséquent d'études bibliographiques récentes (Acerbi et al., 2014; Kubben et al., 2011; Leroy et al., 2015; Li et al., 2014; Su et al., 2014). Outre la rupture de la BHE déjà énoncée, la présence de cette tumeur modifie d'autres propriétés des tissus, tels que leur pH (Estrella et al., 2013), leur vascularisation (Khalfaoui-Bendriss, 2010), l'allure des cellules et leur densité ou encore les propriétés d'absorption et d'émission de lumière des tissus. Les différentes techniques d'assistance utilisent donc ces différentes modifications de propriétés pour essayer de discriminer le tissu sain du tissu tumoral.

1.1.3 - Problématique clinique

La particularité des gliomes est leur caractère infiltrant. C'est ce qui les rend difficilement résécables microscopiquement puisqu'une partie de l'infiltration est invisible par les techniques actuelles d'imagerie et donc par le neurochirurgien. La Figure 1-3 présente la concentration en cellules tumorales selon la distance à la zone visible sur l'IRM pour les astrocytomes de haut grade (grade III). Nous observons sur cette figure la présence de cellules tumorales à plus de 4 cm de la prise de contraste IRM. Une identification de ces cellules en

temps réel au bloc opératoire est donc indispensable pour améliorer l'exérèse et prévenir la récurrence.

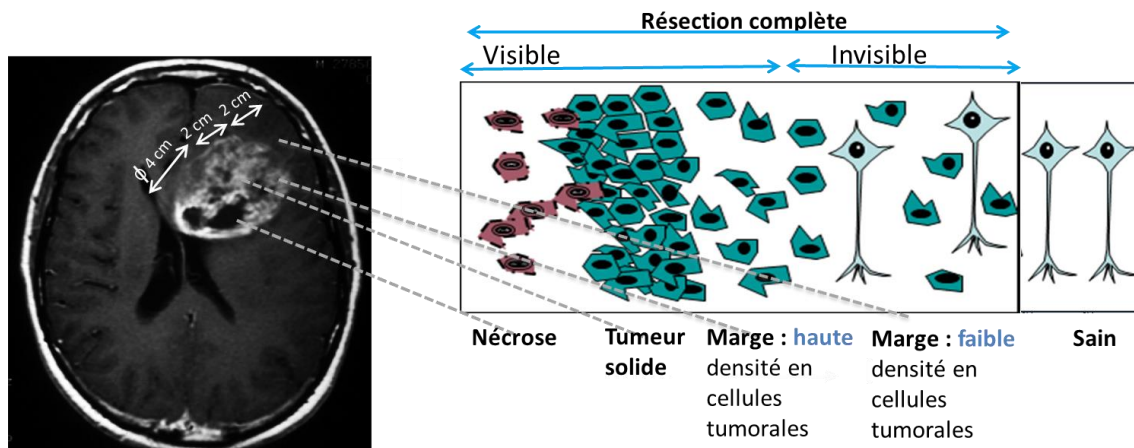


Figure 1-3 : Modélisation des infiltrations des gliomes de haut grade.

Le but de cette thèse est de développer une technique d'assistance dans la visualisation des cellules tumorales des tissus où leur densité est faible, afin de maximiser la résection de gliomes. L'hypothèse sous-jacente étant qu'une maximisation de l'exérèse augmentera l'espérance de vie et la qualité de vie du patient, il est pertinent de se demander si la maximisation de l'étendue de la résection (Extent Of Resection, EOR) permet réellement une augmentation du taux de survie. Cette question était controversée dans les années 1990 (Kreth et al., 1999; Nitta and Sato, 1995; Quigley and Maroon, 1991) et aucune étude prospective et aléatoire ne semble avoir été effectuée afin de clore le débat. La difficulté de conclure sur l'intérêt de la maximisation de l'exérèse est notamment due à la quantité de critères corrélés à l'EOR qui influencent aussi le taux de survie, tels que l'âge du patient, la localisation de la tumeur ou le degré de nécrose. Les arguments contre une exérèse sont le coût, les risques de dommages post-opératoires et la source de stress induite chez le patient. Cette controverse fut résolue à partir des années 2000, où l'intérêt de la chirurgie a été démontré, tant pour enlever un maximum de tumeur que pour favoriser la thérapie par adjuvant ensuite dans les grades III et IV (Chaichana et al., 2011; Lacroix and Toms, 2014; Lacroix et al., 2001; Sanai et al., 2011b; Stummer et al., 2011; Stupp et al., 2005). Récemment, l'étude de Li sur 1229 patients porteurs de GBM a prouvé l'intérêt d'une résection allant au-delà de la prise de contraste de la tumeur à l'IRM (Li et al., 2016). Ainsi aujourd'hui, toutes les études s'accordent pour maximiser l'exérèse quand c'est possible, c'est-à-dire quand la fonctionnalité cérébrale n'est pas menacée.

Un protocole standard de traitement a été établi en 2005 pour les GBM : le protocole de Stupp. Ce protocole implique une chirurgie quand c'est possible, suivie, toujours si possible, de radio et/ou chimiothérapie (Stupp et al., 2005). Lorsque la chirurgie n'est pas possible ou pas souhaitée, une biopsie peut être effectuée afin d'identifier le grade de la tumeur pour la classer selon les grades de l'OMS et adapter le traitement. Si nécessaire, une identification de la fonctionnalité cérébrale est effectuée au cours de l'opération, afin de préserver les zones

fonctionnelles. Cette identification de la fonctionnalité cérébrale sera présentée plus en détail dans le Chapitre 6.

Dans cette partie, nous avons présenté uniquement les propriétés des gliomes qui seront exploitées dans ce manuscrit. Pour une présentation des autres tumeurs cérébrales ainsi que des autres propriétés des gliomes, le lecteur intéressé pourra par exemple aller voir le premier chapitre du mémoire de thèse de Leh (Leh, 2011).

1.2 - Bases de l'interaction lumière-matière dans les tissus biologiques

Nous présentons maintenant les bases de l'interaction lumière-matière des tissus biologiques. Nous commençons par présenter l'absorption et la diffusion de la lumière, phénomènes qui ont lieu quels que soient la source lumineuse et le tissu. Nous présentons ensuite le phénomène de fluorescence, qui a lieu uniquement lors de l'arrivée de photons sur certaines molécules : les fluorophores.

1.2.1 - Absorption

L'absorption de la lumière se produit lorsque l'énergie d'un photon incident correspond à une transition électronique d'un chromophore (molécule capable d'absorber une radiation). Cette énergie est ensuite principalement dissipée dans les tissus sous forme de chaleur. Chaque chromophore peut être modélisé par une sphère d'une taille proportionnelle à son pouvoir d'absorption à laquelle on associe une section efficace d'absorption. Pour un milieu contenant un ensemble de chromophores, on calcule le coefficient d'absorption μ_a du milieu comme une combinaison linéaire du produit des densités de chromophores par leurs sections efficaces d'absorption. L'inverse de ce coefficient définit le libre parcours moyen d'absorption, soit la distance moyenne parcourue par un photon avant d'être absorbé. Les principaux absorbeurs des tissus biologiques sont présentés sur la Figure 1-4. Nous observons sur cette Figure 1-4 que la zone 600-1000 nm est la zone où l'absorption des tissus est la plus faible, avec notamment une absorption par l'eau très limitée. Cette zone est appelée « fenêtre optique » ou « fenêtre thérapeutique » et c'est la zone de travail de nombreuses techniques, qualifiées de techniques proche infrarouge (Scholkmann et al., 2014). Par ailleurs, nous observons que, sur la plage spectrale 500-1000 nm, les propriétés d'absorption de l'hémoglobine désoxygénée (Hb, courbe bleue) et de l'hémoglobine oxygénée (HbO₂, courbe rouge) ont des sens de variation opposés, avec notamment un point isobestique (point où leurs coefficients d'absorption sont égaux).

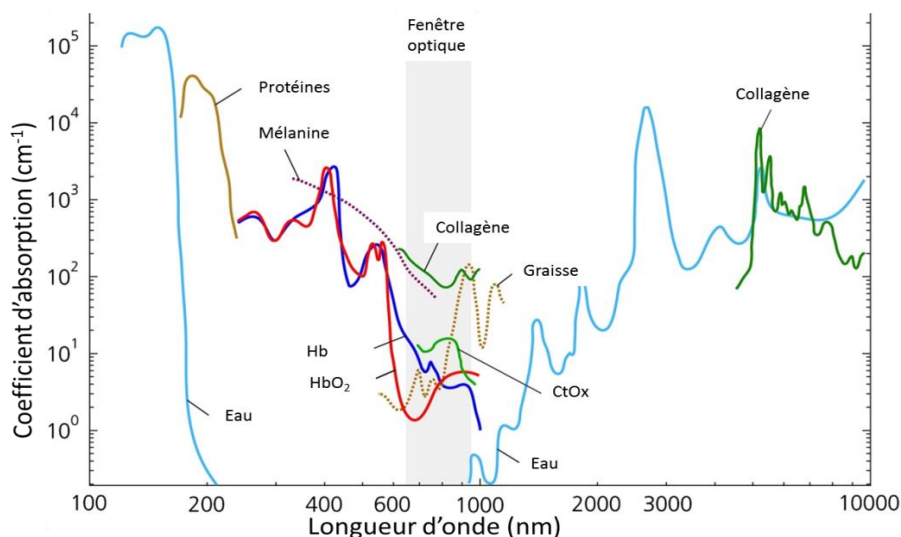


Figure 1-4 : Coefficient d'absorption de différents chromophores des tissus biologiques. Extrait et traduit de (Scholkmann et al., 2014).

Nous verrons dans le Chapitre 6 l'intérêt de travailler dans cette fenêtre optique pour analyser la fonctionnalité cérébrale en temps réel. Dans le cas d'un travail avec la PpIX, cette dernière ayant des propriétés d'absorption vers 405 nm et d'émission de fluorescence sur la bande spectrale 600-800 nm, nous travaillons sur ces bandes spectrales bien précises.

1.2.2 - Diffusion

La diffusion de la lumière est due à des changements d'indices de réfraction des milieux. L'indice de réfraction d'un milieu est défini comme le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et la vitesse de la lumière dans le milieu qu'elle traverse. Différents modèles traduisent le phénomène de diffusion élastique, en fonction de la taille des particules diffusantes (diffusion de Mie, de Rayleigh). Dans cette thèse, nous ne proposons pas de modèle de diffusion donc nous ne présentons pas les différents modèles existants. Notons cependant que, comme pour l'absorption, on définit le coefficient de diffusion μ_s d'un tissu comme une combinaison linéaire du produit de la densité de chaque chromophore avec sa section efficace de diffusion. L'inverse de ce coefficient représente la longueur moyenne parcourue par un photon avant deux événements de diffusion. Puisque la diffusion n'est pas toujours isotrope, on introduit le facteur d'anisotropie g qui varie de -1 pour une diffusion principalement vers l'arrière, à 1 pour une diffusion principalement vers l'avant, en passant par 0 pour une diffusion isotrope, c'est-à-dire uniforme sur l'ensemble des directions. Le produit $\mu'_s = \mu_s(1-g)$ est le coefficient de diffusion réduit.

1.2.3 - Fluorescence

Le projet de thèse que nous proposons exploite les propriétés de fluorescence des tissus, et particulièrement celles de la PpIX. Nous présentons ici le principe de la fluorescence linéaire, avant de présenter les propriétés d'émission et d'absorption des différents fluorophores présents dans les tissus cérébraux.

1.2.3.1 - Principe

La fluorescence est l'une des propriétés de certaines molécules qui, absorbant un photon incident, passent de l'état énergétique de repos à un état excité. Afin de revenir à l'état de repos, différents phénomènes sont possibles, dont la fluorescence. La Figure 1-5 présente le diagramme de Jablonski, illustrant les différents phénomènes de retour à l'état fondamental après absorption d'un photon incident, par processus linéaire. La molécule fluorescente absorbe l'énergie d'un photon incident, ce qui la fait passer de l'état de repos S_0 à un état excité S_1 ou S_2 par exemple. Après une étape de reversion interne de l'énergie captée, le retour à l'équilibre de la molécule s'effectue soit par une libération non radiative d'énergie, soit par une émission de photons moins énergétiques, donc de longueur d'onde plus grande que le photon initialement absorbé. Ce phénomène de réémission de lumière est appelé fluorescence si la molécule excitée se trouvait dans un état singulet, ou phosphorescence si la molécule excitée se trouvait dans un état triplet. L'état singulet ou triplet dépend des spins des électrons de la molécule. L'émission de fluorescence est plus rapide que l'émission de phosphorescence.

L'énergie nécessaire pour exciter une molécule dépend de ses niveaux d'énergie. L'absorption d'un photon à la fréquence ν par une molécule est régie par la relation $E=h\nu$ où E est cette énergie nécessaire, h la constante de Planck et ν la fréquence du photon incident. Un spectre d'absorption permet d'identifier les longueurs d'ondes optimales pour exciter une molécule. Celui de la PpIX sera présenté dans la partie 1.5.3 -. Pour certaines molécules fluorescentes, notamment les porphyrines, on définit la bande de Soret comme la longueur d'onde UV où l'absorption est maximale.

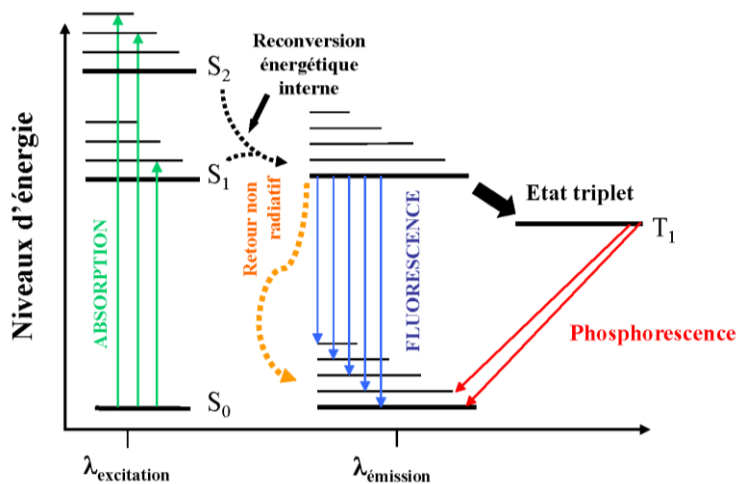


Figure 1-5 : Diagramme de Jablonski illustrant les phénomènes de fluorescence et phosphorescence (wikimédia).

Différentes propriétés de fluorescence caractérisent un fluorophore. On définit le rendement quantique d'une molécule fluorescente comme le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Le coefficient d'extinction, lui, révèle la probabilité d'absorption de photons par une molécule. Le spectre de fluorescence émis par une molécule représente le nombre de photons émis en fonction de leur longueur d'onde et sa forme est

souvent indépendante de la source d'excitation. Ce spectre est propre à une molécule et le spectre de fluorescence d'un tissu peut être considéré comme la somme des spectres de fluorescence de chacun des constituants, pondérés par leurs propriétés (rendement quantique, coefficient d'extinction, concentration, absorption...). L'étude des spectres de fluorescence des tissus biologiques permet donc d'en identifier des propriétés, comme nous le présenterons dans cette thèse.

L'émission de fluorescence est ainsi caractéristique d'une molécule donnée. Afin de déterminer la présence d'une molécule dans un échantillon, plusieurs paramètres peuvent être étudiés. Dans cette thèse, nous nous intéresserons particulièrement à l'étude du spectre de fluorescence sous excitation par un photon, qui est un processus linéaire. Néanmoins, nous proposerons dans les perspectives (Chapitre 6) des pistes d'étude de la fluorescence de la PpIX sous excitation deux-photons ou encore suivant son temps de vie de fluorescence. Par la suite, nous présentons les propriétés d'émission et d'absorption des différents fluorophores présents dans les tissus tumoraux.

1.2.3.2 - Les différents fluorophores endogènes

Le fluorophore d'intérêt dans cette thèse est la PpIX. La PpIX fait partie de la famille des porphyrines qui sont des précurseurs de la molécule d'hème. Le cycle de biosynthèse de l'hème est présenté sur la Figure 1-6 et nous observons que la PpIX est le dernier élément du cycle avant l'hème. Nous observons par ailleurs que la molécule de 5-ALA est un précurseur naturel de la PpIX, présente au début du cycle. Dans ce cycle, la transformation d'un élément à l'autre se fait par succession d'actions enzymatiques, tantôt dans la mitochondrie, tantôt dans le cytoplasme de la cellule. Pour plus de lisibilité, les enzymes ne sont pas présentées sur le graphique, sauf la ferrochélatase, qui permet de transformer la PpIX en hème. Notons par ailleurs qu'une déficience dans l'une de ces étapes provoque une maladie appelée porphyrie, et que différents travaux utilisent la fluorescence des porphyrines pour diagnostiquer ces maladies (Lang et al., 2015).

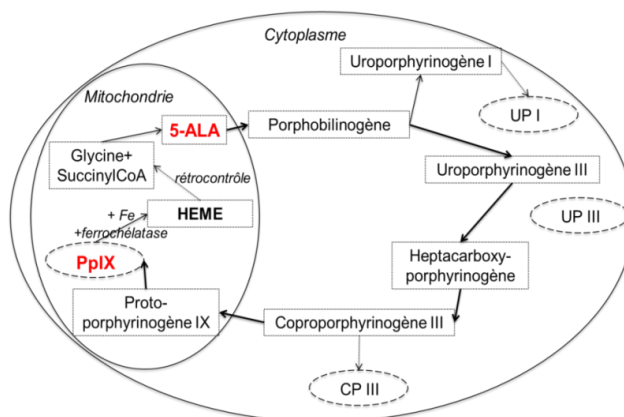


Figure 1-6 : Cycle de biosynthèse de l'hème dans une cellule humaine à partir de 5-ALA. Les substrats sont encadrés et les produits sont encerclés. En rouge, les deux molécules d'intérêt dans la thèse.

La Figure 1-7 présente la structure de la PpIX. On observe la présence d'un cycle au milieu duquel peuvent se lier des atomes tels que Fe, Zn ou de Mn. L'association avec ces atomes crée des métallo-porphyrines et modifie les propriétés de la PpIX comme par exemple son spectre d'émission de fluorescence. (Corwin et al., 1968; Richter and Rienits, 1980).

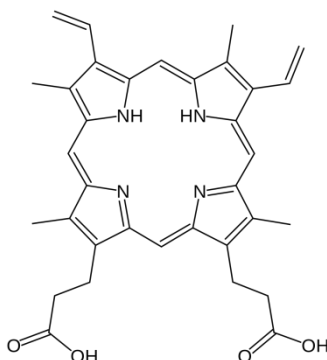


Figure 1-7 : Structure chimique de la PpIX.

La PpIX a la particularité de s'accumuler dans les cellules de différentes tumeurs, notamment les glioblastomes, lorsqu'elle est apportée en excès par voie exogène. Ceci permet de les visualiser par différentes techniques d'imagerie. La cause de cette accumulation de la PpIX dans les cellules tumorales des GHG n'est pas encore bien établie (Collaud et al., 2004) mais les deux hypothèses principales sont la rupture de la BHE permettant au 5-ALA de pénétrer dans les tissus tumoraux puis d'être synthétisé en PpIX et une carence enzymatique empêchant la transformation de la PpIX en hème (Dailey and Smith, 1984). L'enzyme déficiente est la ferrochélatase, notée sur la Figure 1-6. Ainsi, d'un point de vue pratique, le patient ingère du 5-ALA (et non de la PpIX) quelques heures avant l'opération. Ce dernier franchit la BHE et est alors transformé en PpIX qui s'accumule dans les cellules tumorales.

De nombreuses autres molécules endogènes sont fluorescentes et la Figure 1-8 présente les spectres d'absorption (en haut) et d'émission (en bas) de ces molécules (Leh, 2011). Pour exciter la PpIX, la Figure 1-8 nous montre que, comme toutes les porphyrines, une excitation autour de 405 nm dans la partie bleue du spectre visible à la limite du domaine ultraviolet est optimale. Ceci est confirmé par différentes études citées au cours du mémoire. Par ailleurs, la détection du spectre émis par la PpIX est effectuée sur la bande spectrale 600-800 nm environ.

D'après la Figure 1-8, les autres fluorophores endogènes également excités dans le bleu à la limite de l'UV sont les NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit), les flavines, les lipopigments et d'autres porphyrines. L'élastine est également excitée vers 380-400 nm mais cette protéine étant peu présente dans le cerveau (Neuman and Logan, 1950), nous ne la présenterons pas par la suite.

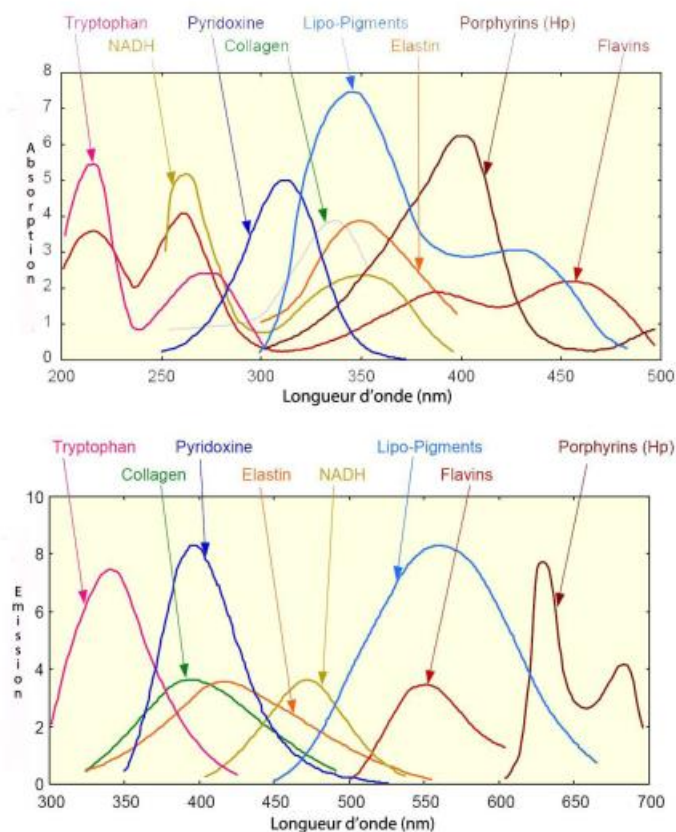


Figure 1-8 : Spectres d'absorption (en haut) et d'émission (en bas) de différents fluorophores endogènes. Extrait de (Leh, 2011).

Le NADH et les flavines sont des protéines qui participent à la production de l'énergie cellulaire. La quantité de NADH est diminuée dans les cellules tumorales car la production d'énergie est altérée. Ainsi, la détection de son intensité de fluorescence est une indication de la présence ou non de cellules tumorales, avec une diminution d'intensité pouvant atteindre 25 % (Croce et al., 2003). D'après la Figure 1-8, le NADH peut être excité vers 260 nm mais aussi autour de 340 nm et la fluorescence émise se trouve dans la bande spectrale que nous détectons, après 450 nm. De même pour les flavines qui sont globalement excitées dans une large gamme de longueurs d'onde, avec toutefois un pic d'absorption un peu avant 400 nm. Ces protéines émettent sur la bande spectrale 500-750 nm, donc se superposent au spectre émis par la PpIX.

Les lipopigments sont un groupe de dérivés des lipides, constitués d'un pigment autofluorescent et d'une composante lipidique. La quantité de lipopigments diminue avec l'âge (Wisniewski et al., 1988), donc sa participation à la fluorescence totale est corrélée à l'âge du patient. D'après la Figure 1-8, les propriétés de fluorescence des lipopigments sont proches de celles de la PpIX (avec une absorption forte vers 400 nm et une émission centrée autour de 570 nm).

Parmi les porphyrines, outre la PpIX, nous considérons aussi l'UpIII et la CpIII. Ces molécules fluorescentes sont des précurseurs de la PpIX visibles sur le cycle de biosynthèse de l'hème de la Figure 1-6. Leur concentration dans le tissu cérébral est donc probablement

augmentée lors de l'exérèse puisque le patient ingère du 5-ALA. Toutefois, les études suggèrent principalement une accumulation de PpIX, avec un rapport 50 fois plus fort entre l'accumulation dans les GHG par rapport au tissu sain (Collaud et al., 2004; Johansson et al., 2010). Contrairement à la PpIX, ces deux porphyrines sont hydrophiles (Dietel et al., 2007). Leur spectre d'absorption est centré autour de la bande spectrale 380-400 nm et leur spectre d'émission présente une allure du spectre Hp visible sur la Figure 1-8, soit une double bosse sur la bande spectrale 600-750 nm, avec un pic principal vers 620 nm et une bosse secondaire vers 680 nm (Dietel et al., 2007).

L'étude de la fluorescence endogène, appelée aussi « autofluorescence », est un outil de discrimination du tissu tumoral du tissu sain, comme le montrent Croce, Toms ou Butte dans leurs études *in vivo* (Butte et al., 2011; Croce et al., 2003; Toms et al., 2005) et comme l'étudient de nombreuses équipes *ex vivo* (Pascu et al., 2009; Yong, 2006; Zanello et al., 2017). Dans nos travaux, nous étudions la fluorescence des tissus après ingestion de 5-ALA, donc dans une configuration où la contribution de la fluorescence de la PpIX est dominante dans les gliomes et augmentée dans le tissu sain.

Par ailleurs, la fluorescence des dérivés du 5-ALA est aussi utilisée en thérapie photodynamique (Photo Dynamic Therapy, PDT), et la PpIX est ici aussi largement utilisée. Cette technique se base sur l'accumulation d'un photosensibilisateur (ici un dérivé du 5-ALA) dans les cellules cancéreuses. Le tissu est irradié à une longueur d'onde adaptée au photosensibilisateur, ce qui entraîne une réaction entre l'oxygène, la lumière et les tissus et tue la cellule (Krammer and Plaetzer, 2008). Une étude pilote a été proposée en 2007 en neurochirurgie (Beck et al., 2007), mais cette technique est surtout utilisée en dermatologie.

1.2.3.3 - *Les fluorophores exogènes utilisés en neurochirurgie : l'Indocyanine green et la fluorescéine*

Outre la fluorescence de la PpIX induite par 5-ALA, d'autres fluorophores sont disponibles et étudiés pour guider le neurochirurgien. Les études bibliographiques de Belykh et Senders recensent les différentes études en cours utilisant des marqueurs fluorescents en neurochirurgie (Belykh et al., 2016; Senders et al., 2017). Selon ces études, trois agents de contraste sont couramment utilisés en neurochirurgie : la PpIX, l'IndoCyanine Green (ICG) et la fluorescéine. L'ICG est une molécule légère et hydrophile, excitée vers 780 nm et émettant sur la bande spectrale proche infrarouge 700-850 nm. L'ICG se lie au plasma et forme donc un marqueur de vascularisation. Comme nous l'avons vu dans la partie 1.1.2 -, la présence d'un gliome peut impliquer un phénomène de néo angiogenèse visible par ICG (Ferroli et al., 2011). Toutefois, cette fluorescence n'est pas spécifique à la tumeur et ne dure pas longtemps, rendant ainsi difficile l'utilisation de l'ICG pour discriminer les gliomes (Belykh et al., 2016).

La fluorescéine est un autre marqueur excité entre 460 et 490 nm et émettant de la lumière vers 510-530 nm. D'après l'étude de Diaz (Diaz et al., 2015), la fluorescéine franchit

la BHE et est donc un marqueur de gliomes de haut grade. La première utilisation de la fluorescéine en neurochirurgie date de 1948 où Moore et son équipe donnent une valeur prédictive de 96 % pour localiser les tumeurs cérébrales (Moore et al., 1948). L'exploitation de cette fluorescence sera comparée à celle de la PpIX dans la suite de ce chapitre.

1.3 - Les techniques actuelles d'assistance peropératoire pour l'identification des marges tumorales et leurs limites

Dans cette partie, nous présentons les techniques actuellement utilisées pour assister le neurochirurgien dans la résection de gliomes, en séparant les techniques optiques ou non. La présentation de ces techniques sera utile dans le Chapitre 5 lors de la comparaison des résultats de la technique développée pendant la thèse avec les résultats des techniques présentées ici.

1.3.1 - Techniques non optiques actuellement utilisées en routine clinique

Dans le but d'identifier le tissu tumoral, le neurochirurgien utilise tout d'abord ses sens : sa vue, son toucher et son expérience, le tissu tumoral ayant des caractéristiques (transparence, élasticité) différentes de celles du tissu sain. En complément de l'expérience du neurochirurgien, deux techniques sont couramment utilisées : l'IRM ou l'échographie. Le PET scan peut aussi être utilisé mais son utilisation est moins courante en neurochirurgie, nous ne le présenterons pas ici.

1.3.1.1 - IRM préopératoire et neuronavigation

L'IRM préopératoire permet d'obtenir une image du cerveau sur laquelle la tumeur est visible. Pour les gliomes de haut grade, la prise de contraste sur les séquences T1 gadolinium préopératoire représente les limites de la tumeur à réséquer pour parler d'exérèse macroscopiquement complète. Cette prise de contraste s'explique par le passage du produit de contraste dans les cellules tumorales du fait de la rupture de la BHE (Wu et al., 2006). En revanche, dans les gliomes de bas grade, il n'y a pas de prise de contraste tumorale puisque la BHE n'est pas rompue. Néanmoins, la séquence FLAIR pondérée T₂ est le reflet de l'infiltration tumorale dans les GBG (Li et al., 2016; Sanai et al., 2011a). La corrélation de cette image préopératoire avec la neuronavigation (peropératoire) permet au neurochirurgien de localiser ses outils dans le champ opératoire par rapport à l'image préopératoire. Les limites de cette technique sont principalement les limites de sensibilité de l'IRM à détecter les marges de faible densité en cellules tumorales et le phénomène de *brain shift*, qui peut induire un décalage significatif entre la localisation préopératoire de la tumeur et celle constatée en peropératoire. La Figure 1-9 présente différentes coupes d'une IRM préopératoire de GHG. La croix rouge indique sur l'image préopératoire la localisation de la sonde dans le champ opératoire par rapport à la tumeur et permet donc la géolocalisation. En bas à droite est une image d'IRM fonctionnelle que nous n'exploitons pas ici.

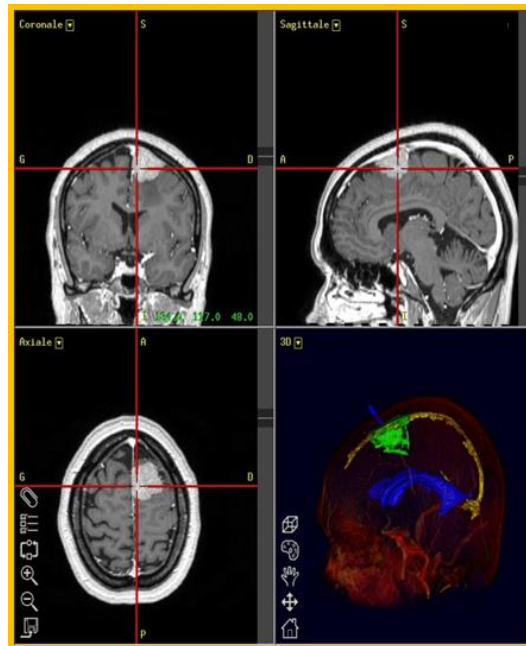


Figure 1-9 : IRM préopératoire et neuronavigation avant craniectomie. La tumeur (GHG) a pris le contraste (blanc) sur l'image. La croix rouge indique la position de la sonde de géolocalisation et les trois coupes présentées sont la vue coronale, sagittale et axiale.

1.3.1.2 - *IRM peropératoire*

Afin de dépasser le problème du *brain shift*, l'utilisation d'une IRM peropératoire a été proposée. Si cette technique a démontré son potentiel pour maximiser l'exérèse (Kubben et al., 2011; Senft et al., 2011), ceci augmente considérablement la durée de l'opération, voire nécessite un changement de salle. Ceci augmente aussi les coûts, complique l'installation du patient et nécessite l'utilisation d'outils chirurgicaux non magnétiques en cas d'opération dans l'IRM (Kubben et al., 2011; Senft et al., 2011). Par ailleurs, il y a encore peu d'IRM interventionnelles en France.

1.3.1.3 - *Ultrasons*

L'échographie peropératoire (ultrasons) peut être utilisée pour guider le neurochirurgien, par son caractère non ionisant, portable, temps réel et beaucoup moins coûteux que l'IRM peropératoire. Cette technique permet de s'affranchir du phénomène de *brain shift* et identifie bien le centre de la tumeur. Cependant, la capacité à discriminer le tissu sain du tissu tumoral est limitée (Mahboob et al., 2016; Mursch et al., 2016; van Velthoven and Auer, 1990). L'étude bibliographique de Mahboob montre en outre que plus on s'éloigne du cœur de la tumeur, plus la sensibilité et la spécificité des ultrasons diminuent, limitant leur intérêt pour l'identification des marges tumorales. Ainsi, si l'échographie permet de visualiser les marges relativement denses et donc de guider le neurochirurgien, elle ne semble pas permettre d'identifier les infiltrations peu denses et donc de maximiser l'exérèse (Unsgaard et al., 2002).

L'apport des techniques optiques a émergé au milieu du XX^{ème} siècle avec l'utilisation de la fluorescéine (Moore et al., 1948). L'assistance peropératoire par technique optique s'est fortement développée depuis une vingtaine d'années avec l'utilisation du 5-ALA et la mise au point de filtres spécifiques inclus dans les microscopes opératoires. Aujourd'hui, l'utilisation de la fluorescence pour guider la chirurgie a déjà fait ses preuves, comme le montrent des revues bibliographiques récentes (Belykh et al., 2016; Senders et al., 2017). L'intérêt de ces techniques étant leur aspect non invasif, non ionisant, temps réel et peu onéreux (Valdés et al., 2016).

1.3.2 - Techniques optiques : Microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence est couramment utilisée pour guider le neurochirurgien depuis le début des années 2000, à l'aide de modules adaptés ajoutés au microscope chirurgical. De nombreuses études bibliographiques soulignent l'intérêt de ces techniques pour maximiser l'exérèse des gliomes de haut grade (Behbahaninia et al., 2013; Ewelt et al., 2015; Hefti, 2013; Leroy et al., 2015) et nous présentons par la suite l'utilisation clinique de la PpIX et de la fluorescéine.

1.3.2.1 - Microscopie de fluorescence de la PpIX

Dans les cas des GHG, le patient ingère du 5-ALA trois heures avant l'opération à la dose de 20 mg/kg. Ce dernier est biosynthétisé en PpIX qui elle-même s'accumule dans les cellules tumorales et permet de les visualiser en temps réel à l'aide du microscope chirurgical équipé de filtres spécifiques. Le principe de cette technique a été présenté par Stummer en 1998 (Stummer et al., 1998). Lorsque c'est nécessaire, le neurochirurgien illumine le tissu à l'aide d'une source intégrée au microscope excitant les tissus dans la bande spectrale 400-410 nm. Les cellules tumorales apparaissent en rose, comme le montre la Figure 1-10

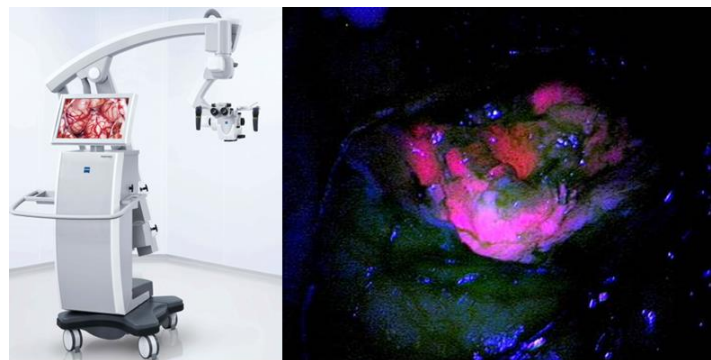


Figure 1-10 : Microscope peropératoire (à gauche) et cortex cérébral présentant une tumeur, sous excitation à 405 nm (à droite).

D'après la notice du microscope Zeiss (OPMI pentero) dont disposait le neurochirurgien au moment de nos travaux, le signal fluorescent est filtré sur la bande spectrale 620-710 nm, collectant principalement la fluorescence émise par la PpIX mais aussi celle des différents fluorophores endogènes présentés dans la partie 1.2.3.2 -. Cette technique est une technique plein champ, permettant au neurochirurgien de voir tout le cerveau en temps réel. Cependant, cette mesure est subjective et qualitative. En outre, cette mesure peut être biaisée d'une part

par la fluorescence d'autres composants, et d'autre part par les propriétés optiques des tissus (absorption et diffusion) qui distordent le signal collecté par le microscope.

Cette technique a fait ses preuves pour améliorer l'ablation des GHG puisqu'elle a permis de doubler le nombre d'exérèses « maximales », passant de 25 % à 65 %, et d'augmenter de six mois le taux de survie (Stummer et al., 2006). Cette technique n'est cependant pas utilisable pour les gliomes de bas grade, notamment car la BHE n'est pas rompue et car ces tumeurs ne présentent pas de fluorescence visible sous excitation à 405 nm (HAS, 2010). De plus, toutes les études s'accordent pour montrer les limites de la technique pour identifier les marges peu infiltrées des tumeurs de haut grade (Bravo et al., 2017; Hadjipanayis et al., 2015; Stummer et al., 2006; Toms et al., 2005). Afin de dépasser ces limites de sensibilité, différents projets sont en cours de développement, que nous présenterons dans la partie 1.4.1 -

1.3.2.2 - *Microscopie de fluorescence de la fluorescéine*

Comme présenté dans la partie 1.2.3.3 -, la fluorescéine est un fluorophore qui s'accumule dans les cellules cérébrales lorsque la BHE est rompue, ce qui en fait un marqueur intéressant pour guider la résection de gliomes de haut grade (Acerbi et al., 2014; Murray, 1982). Ceci a été implémenté dans le microscope chirurgical via le module Yellow560 (Kuroiwa et al., 1998), permettant une visualisation directe de la fluorescence à un coût très réduit (Acerbi et al., 2013; Hamamcioğlu et al., 2016; Koc et al., 2008; Schebesch et al., 2013). L'étude de Koc montre par exemple que la fluorescéine permet de passer de 55 % de résection totale à 83 % en utilisant ce marqueur pour les GHG. Si ces chiffres semblent plus élevés que ceux de l'étude de Stummer et son équipe pour l'intérêt du 5-ALA (Stummer et al., 2006), les méthodologies d'étude diffèrent et l'équipe de Koc conclut que leurs résultats sont comparables à ceux de Stummer. L'équipe d'Acerbi a réalisé une étude de Phase III pour conclure sur l'intérêt de la fluorescéine pour les GHG mais ne propose pas de l'utiliser pour les GBG.

L'avantage de la fluorescéine par rapport au 5-ALA est son coût, le 5-ALA coûtant 900€ par flacon de 1.5 gramme là où la fluorescéine coûte 5€ par gramme (Bongetta et al., 2016). Toutefois, les techniques fondées sur la fluorescence de la fluorescéine sont limitées pour identifier les marges des GHG ainsi que les GBG, pour les mêmes raisons que les limitations de la prise de contraste du gadolinium. Enfin, l'équipe de Diaz a récemment prouvé que la fluorescéine n'était pas un marqueur spécifique de tumoralité mais uniquement de déficit de BHE, limitant son utilisation aux cœurs des GHG (Diaz et al., 2015).

1.3.3 - Conclusion sur les techniques actuelles

En conclusion, différentes études bibliographiques soulignent la diversité des techniques d'assistance, leurs avantages et inconvénients, s'accordant toutes sur la difficulté d'identifier les marges peu infiltrées des GHG et les GBG (Krivosheya et al., 2016; Liu et al., 2014; Morone et al., 2017; Valdés et al., 2016; Vasefi et al., 2016). Dans une étude récente,

Coburger et son équipe montrent l'intérêt de la microscopie de fluorescence avec 5-ALA devant l'IRM peropératoire pour identifier les marges tumorales (Coburger et al., 2014) et concluent en 2015 que l'association des deux pourrait être encore plus bénéfique que l'utilisation de l'une ou l'autre technique seule (Coburger et al., 2015). L'étude de Stummer de 2014 conclut aussi que la microscopie de fluorescence est plus sensible que l'IRM (Stummer et al., 2014).

Dans cette thèse, nous comparerons les résultats obtenus avec notre système avec ceux obtenus selon les différentes techniques présentées dans cette partie. Nous comparerons d'abord nos résultats avec la fluorescence visible via le microscope, qualifiée par le neurochirurgien, avant de les comparer avec la localisation de la tumeur sur l'IRM préopératoire. Enfin, nous comparerons nos résultats avec l'analyse anatomohistopathologique des tissus sondés, technique de référence aujourd'hui

1.4 - Techniques d'assistance en cours de développement utilisées au bloc opératoire

Afin d'obtenir une information quantitative, objective, et de dépasser les limites des techniques actuelles, différentes techniques optiques ont d'abord été proposées *in vitro*, sur petit animal ou sur biopsies. Depuis les années 2000 apparaissent des études directement sur le cerveau humain, au bloc opératoire. Dans cette partie, nous présenterons uniquement les études effectuées directement sur le cerveau humain, *in vivo* (donc au bloc opératoire). En effet, la contrainte du bloc opératoire étant forte, celle-ci limite les possibilités techniques et ces dernières ne peuvent donc pas être comparées à certaines techniques utilisées *in vitro*, sur fantômes, ou *ex vivo*. Par ailleurs, le passage du modèle préclinique au modèle clinique étant compliqué, nous positionnons nos travaux uniquement par rapport à ceux qui sont aussi sur tissus humains. Nous présenterons d'abord les techniques étudiant la fluorescence induite de la PpIX après ingestion de 5-ALA, puisque notre modèle utilise aussi cette fluorescence, puis d'autres techniques spectroscopiques qui visent aussi à discriminer le tissu tumoral du tissu sain, en temps réel, au bloc opératoire et qui ont déjà été testées dans ce cadre.

1.4.1 - Spectroscopie de fluorescence de la PpIX

Afin de dépasser les limites de la microscopie de fluorescence, l'utilisation de la spectroscopie de fluorescence de la PpIX a été proposée à la fin des années 2000, d'abord sous forme de « pointeurs optiques ». Ces « pointeurs optiques » sont des sondes spectroscopiques déposées par le neurochirurgien sur le tissu d'intérêt. Différents modèles de traitement des spectres existent, nous allons en présenter quelques-uns, avec leurs limites. Notons que les travaux présentés par la suite qui ajustent un spectre reposent sur le modèle de l'équation (1.1) :

$$S(\lambda) = \sum_{i=1}^N \alpha_i S_i(\lambda) \quad (1.1)$$

où $S(\lambda)$ est le spectre mesuré par le système, $S_i(\lambda)$ le spectre d'émission de fluorescence du fluorophore i et α_i tous les paramètres qui contribuent à l'amplitude de fluorescence de ce fluorophore i (sa concentration, son rendement quantique, son coefficient d'extinction molaire, la géométrie du système, l'intensité incidente...). i représente chaque fluorophore présent dans l'échantillon sondé et $S_i(\lambda)$ peut être mesuré expérimentalement ou modélisé. Le nombre N de fluorophores présents dans l'échantillon sondé est généralement compris entre 1 et 8.

L'équipe de Dartmouth a initialement développé une sonde collectant à la fois le spectre de fluorescence émis par le tissu et le spectre de réflectance afin de corriger les distorsions du spectre de fluorescence à l'aide d'un modèle de transport de la lumière (Kim et al., 2010a, 2010b, Valdés et al., 2011a, 2011b). Le but de leurs travaux est de remonter à la concentration en PpIX afin d'avoir une mesure quantitative et objective, par opposition à la mesure qualitative, subjective et biaisée par la propagation de la fluorescence dans les tissus avant de parvenir au capteur.

Dans ces travaux, des mesures de réflectance sont effectuées à différentes distances de la source, afin d'obtenir les propriétés optiques des tissus (μ_a , μ'_s), ce qui permet de corriger les distorsions du spectre de fluorescence collecté en parallèle. Les propriétés des tissus sont obtenues selon l'hypothèse que le transport de la lumière peut être décrit dans les tissus par l'équation de diffusion résolue avec les conditions limites d'un milieu semi-infini, homogène et optiquement turbide, avec par ailleurs plusieurs distances source-détecteur pour augmenter la dynamique où l'algorithme est valide (Kim et al., 2010a).

La Figure 1-11 montre le dispositif instrumental développé pour appliquer cet algorithme à la problématique de la quantification de la PpIX (Kim et al., 2010b). On y observe une source d'excitation bleue pour obtenir le spectre de fluorescence et deux sources d'excitation blanches pour mesurer la réflectance.

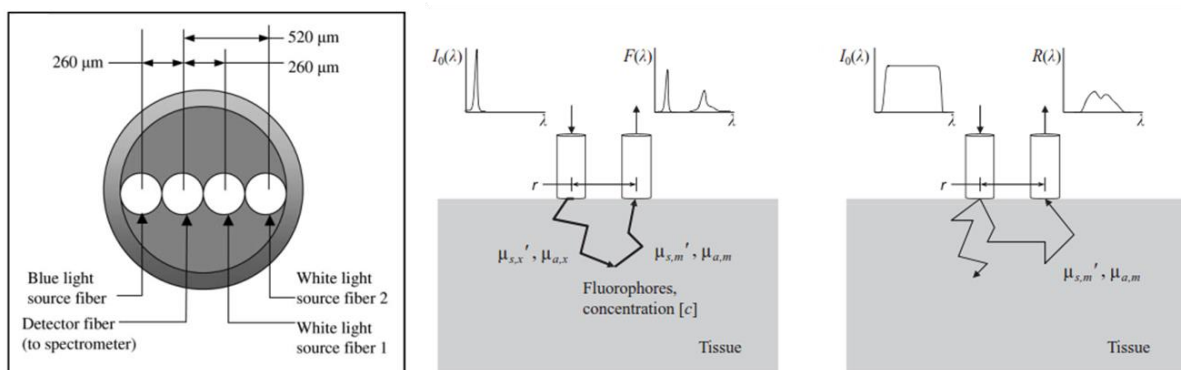


Figure 1-11 : Sonde mesurant à la fois la fluorescence et la réflectance diffusion pour corriger les effets d'absorption et de diffusion induits par les tissus sur la mesure de fluorescence. Extrait de (Kim et al., 2010b).

L'application de cet algorithme à la quantification de la PpIX suppose en outre que le libre parcours moyen des photons émis par fluorescence est le même que celui des photons collectés par réflectance diffuse à la même longueur d'onde et qu'il y a donc un lien de proportionnalité entre le spectre de fluorescence mesuré et la réflectance diffuse mesurée sur le même échantillon. Le spectre de fluorescence mesuré est alors corrigé suivant les propriétés d'absorption et de diffusion des tissus obtenus grâce à la mesure de réflectance et le modèle de transport de la lumière. Ce spectre corrigé est alors ajusté à l'aide d'une combinaison linéaire des différents fluorophores présents dans les tissus cérébraux selon l'équation (1.1), utilisant pour la PpIX un spectre de référence fixe et unique obtenu *in vitro*. Cet ajustement leur permet de remonter à la concentration en PpIX et ainsi d'obtenir un diagnostic plus approprié du tissu sondé.

Cette technique a été appliquée une première fois sur 14 patients présentant des tumeurs cérébrales (Valdés et al., 2011b). Au cours de la chirurgie, la sonde est déposée sur le tissu d'étude, une mesure de 0.5 seconde est effectuée et la concentration en PpIX est renvoyée en moins de 2 secondes. Une biopsie du tissu est ensuite effectuée pour envoi à l'analyse histopathologique et la fluorescence visible est qualitativement évaluée par le neurochirurgien en parallèle. Les biopsies sont classées en GBG, GHG, méningiome, tissu sain ou métastase. Les résultats de cette étude proposent une augmentation significative de la concentration en PpIX dans les différents tissus tumoraux par rapport au tissu sain, avec une valeur seuil de 100 ng / ml pour laquelle 40 % des biopsies tumorales ne fluorescent pas (Valdés et al., 2011c). La pertinence de la concentration obtenue a été comparée aux paramètres proposés dans les études du spectre de fluorescence non corrigé et la concentration est la meilleure métrique de classification. La Figure 1-12 présente une comparaison entre la mesure brute de fluorescence, le spectre mesuré et ajusté et la coupe histologique pour le tissu sain (A-C), un GBG (D-F) et un GHG (G-I). Nous observons une augmentation significative de la concentration en PpIX entre le tissu sain et le GHG en passant par le GBG.

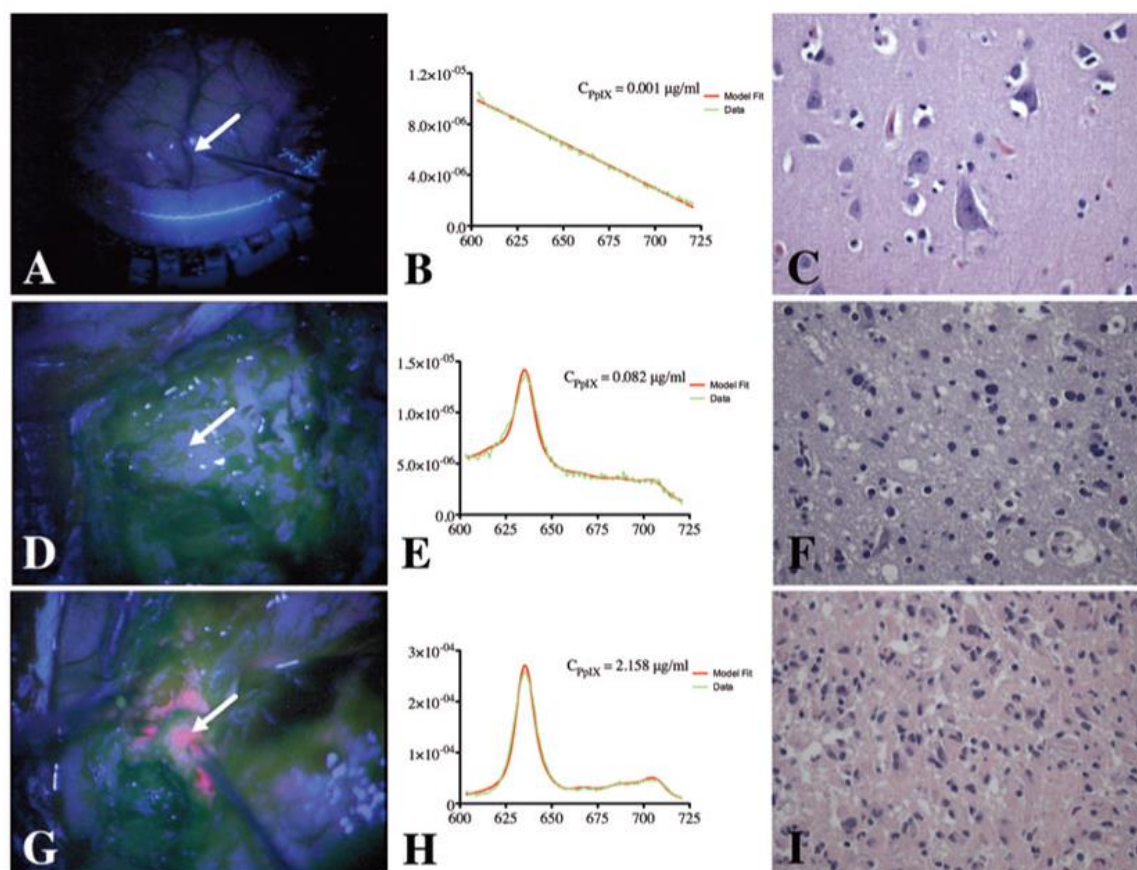


Figure 1-12 : Mesures spectroscopiques de fluorescence durant la résection de gliomes. A gauche, la fluorescence visible sous microscope. Au centre, la mesure et l'ajustement. A droite, coupe histologique. A-C : tissu sain. D-F: GBG. G-I. GHG. Extrait de (Valdés et al., 2011b).

Dans une autre étude (Valdés et al., 2011a), cette équipe propose un classifieur SVM (*Support Vector Machines*) prenant en entrée différents biomarqueurs quantitatifs pour affiner la détection des cellules tumorales et proposant d'améliorer la quantification à l'aide d'une normalisation à deux bandes spectralement contraintes (Valdés et al., 2012a). Les marqueurs proposés sont la concentration totale en hémoglobine, la saturation en oxygène, la diffusion (obtenue par une mesure de réflectance), la concentration en PpIX et photoproduits associés. Cet algorithme est développé par apprentissage et propose des paramètres de spécificité, sensibilité, valeur positive, valeur négative supérieurs à ceux donnés par la fluorescence quantitative obtenue par leur modèle proposé précédemment, eux-mêmes supérieurs à ceux donnés par la fluorescence visible.

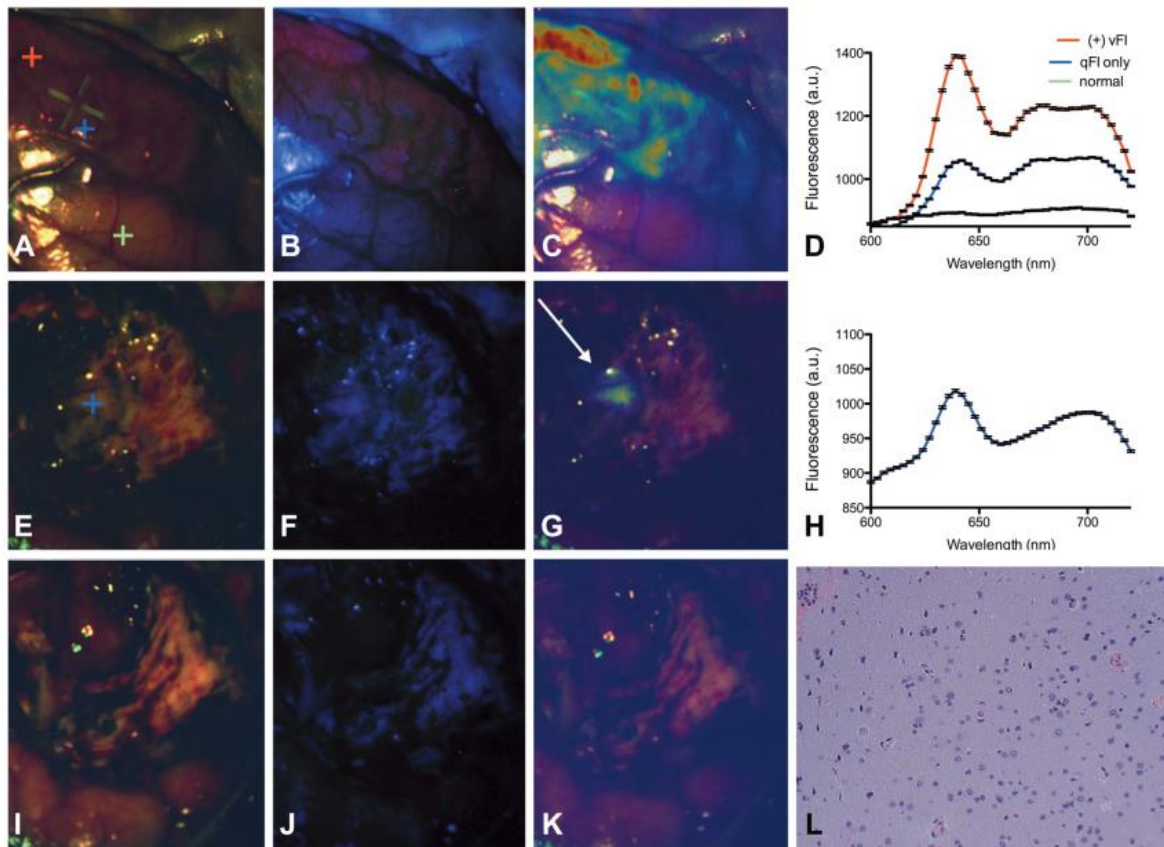


Figure 1-13: Imagerie plein champ de la quantification de la concentration en PpIX lors d'une résection de GBM. (A-D): Au début de l'opération. (E-H) vers la fin de l'opération. (I-K) à la fin de l'opération. Extrait de (Valdés et al., 2012b).

Développée selon un système ponctuel, cette technique a été proposée en imagerie plein champ pour les GBM, à l'aide d'un filtre variable positionné devant une caméra CCD (Charge Coupled Device) (Valdés et al., 2012b). Cette étude est la première à proposer une fluorescence plein champ quantitative et permet donc d'apporter au neurochirurgien une information globale comparable à celle donnée par le microscope, en étant toutefois beaucoup plus sensible. Cette imagerie plein champ est plus simple d'utilisation pour le neurochirurgien que les techniques ponctuelles. La Figure 1-13 propose les résultats *in vivo* de la première utilisation plein champ de ce modèle. Nous voyons sur la première ligne le début de l'opération : (A) champ opératoire en lumière blanche, (B) détection de la tumeur en microscopie de fluorescence (C) quantification de la concentration en PpIX et (D) spectres associés aux points de mesure de la figure (A). La deuxième ligne présente les images vers la fin de la chirurgie. On observe que la quantification de la fluorescence permet d'identifier de la PpIX (G) là où la tumeur n'est pas visible en microscopie de fluorescence (F). Les résultats de cette étude confirment que la fluorescence corrigée est plus sensible que celle brute, avec un facteur 10, et cette méthode propose une valeur prédictive positive supérieure à 90% pour un seuil de PpIX autour de 100 ng/ml. Ce seuil est cohérent avec leurs mesures de 2011 (Valdés et al., 2011c), et avec les concentrations obtenues par Johansson (Johansson et al., 2010). Par ailleurs, cette étude propose une image hyperspectrale, ce qui permet de suivre différents fluorophores en même temps.

Enfin, cette technique a été appliquée sur des biopsies de gliomes de bas grade (Valdés et al., 2015), afin d'étudier l'intérêt du 5-ALA pour ces tumeurs sans fluorescence visible. Les résultats montrent que la quantification de la fluorescence permet de doubler la pertinence de diagnostic, passant de 38% de pertinence de diagnostic en fluorescence visible à 67% en quantifiant la concentration en PpIX. Toutefois, cette technique n'identifie pour l'instant que 45% des échantillons provenant de GBG. Cette technique ponctuelle a aussi été appliquée sur des méningiomes alors que l'intérêt du 5-ALA est discuté pour ces tumeurs et les résultats soutiennent l'intérêt de quantifier la fluorescence induite de la PpIX dans les méningiomes (Valdés et al., 2014a). Devant la faible cohorte, ces résultats n'avaient pas pour but de faire un lien entre la classification histologique de la tumeur et la concentration en PpIX mais de montrer la possibilité de détecter des $\mu\text{g/L}$ de PpIX dans les méningiomes et d'utiliser cette technique pour maximiser l'exérèse.

En parallèle, les travaux d'Utsuki (Utsuki et al., 2006) montrent l'intérêt de la spectroscopie de fluorescence dans des tissus où la prise de contraste au gadolinium n'a pas eu lieu et où il n'y a pas de fluorescence visible. L'étude inclut six patients. Trois d'entre eux présentent une faible fluorescence visible et trois n'en présentent pas. Le système développé excite les tissus à l'aide d'un laser à 405 nm et recherche la fluorescence à 636 nm. Dans cette étude, les propriétés des tissus ne sont pas corrigées. Leur méthode propose une spécificité de 100% pour identifier les tissus tumoraux sans fluorescence visible. Toutefois, l'analyse histopathologique de 16 échantillons sans pic à 636 nm indique la présence de cellules tumorales dans au moins sept d'entre eux. La sensibilité de cette méthode peut donc encore être augmentée. Cette équipe semble ensuite s'être intéressée à l'étude de la PpIX dans les tumeurs cérébrales métastasées (Utsuki et al., 2007). Par ailleurs, leurs travaux de 2008 améliorent les travaux de 2006 en proposant de travailler sur le rapport entre l'intensité à 636 nm et celle à 632 nm. Leur système propose une alerte auditive quand ce rapport dépasse 500 (Utsuki et al., 2008).

De même, les travaux de Haj-Hosseini (Haj-Hosseini et al., 2010; Richter et al., 2011) montrent l'intérêt d'un pointeur optique utilisant une source laser à 405 nm et collectant le spectre de fluorescence. La discrimination des tissus se fait par un rapport entre l'intensité à 635 nm après retrait de l'autofluorescence ($I_{PpIX-I_{base}}$) et la valeur maximale de l'autofluorescence (I_{auto}). Ces paramètres sont illustrés sur la Figure 1-14.

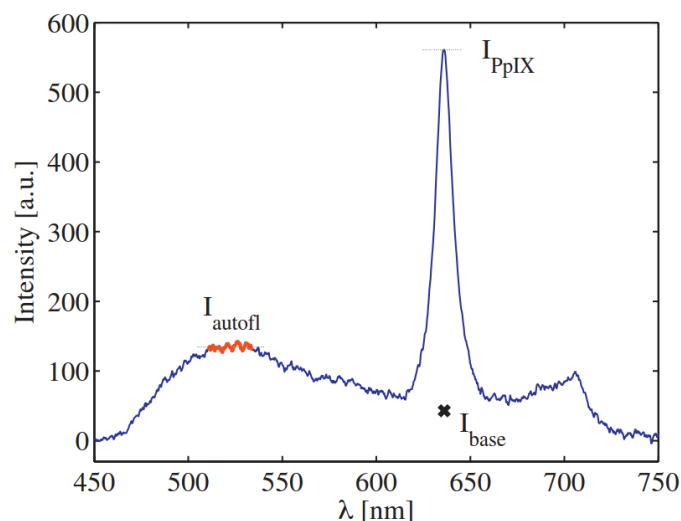


Figure 1-14 : Rapport entre le maximum de fluorescence de la PpIX et l'auto fluorescence pour discriminer les tissus tumoraux. Extrait de (Haj-Hosseini et al., 2010).

Si ces dernières techniques (Haj-Hosseini et al., 2010; Utsuki et al., 2006) sont qualitatives et permettent de dépasser les limites de la microscopie de fluorescence, des travaux de recherche sont encore nécessaires pour proposer une classification inter patients et obtenir la concentration en PpIX. En outre, ces pointeurs optiques donnent une information ponctuelle uniquement, excitent les tissus avec des sources lasers et ne travaillent que sur l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée, n'exploitant qu'une partie de l'information du spectre de PpIX.

L'étude de Stummer (Stummer et al., 2014) montre enfin que, si la spectroscopie de fluorescence est plus sensible que la microscopie de fluorescence, elle est moins spécifique, entraînant le risque d'enlever du tissu sain, ce qui peut générer des déficits post-opératoires.

Par ailleurs, le développement et l'utilisation d'un exoscope est proposé par l'équipe de Piquer (Belloch et al., 2014; Piquer et al., 2014), permettant de guider l'exérèse en détectant la fluorescence de la PpIX à un coût moindre que le microscope. Cependant, le principe utilisé est le même que celui du microscope présenté précédemment. Ainsi, même si leur système est aussi performant que le microscope en étant plus léger et moins encombrant, il ne peut que guider la résection des GHG et reste qualitatif.

1.4.2 - Spectroscopie Raman

En utilisant l'hypothèse que la composition des cellules tumorales est différente de celle du tissu sain, l'équipe de Jermyn effectue des mesures de spectroscopie Raman *in vivo* sur gliomes humains (Desroches et al., 2015; Jermyn et al., 2015). La spectroscopie Raman se base sur la diffusion inélastique de la lumière dans les tissus, ce qui induit un décalage de longueur d'onde à cause des interactions de la lumière incidente avec différents groupes biochimiques fonctionnels. Le système excite les tissus à l'aide d'un laser à 758 nm et un spectromètre collecte le spectre Raman afin d'identifier les différences dans la signature

moléculaire des tissus sondés par un modèle d'apprentissage détaillé dans l'article. La spécificité et la sensibilité de cette technique sont prometteuses, dépassant les 90% pour les gliomes de grades II à IV. La Figure 1-15 présente la sonde en cours d'utilisation (à gauche) et les spectres Raman moyens (à droite) permettant de discriminer le tissu sain du tissu tumoral.

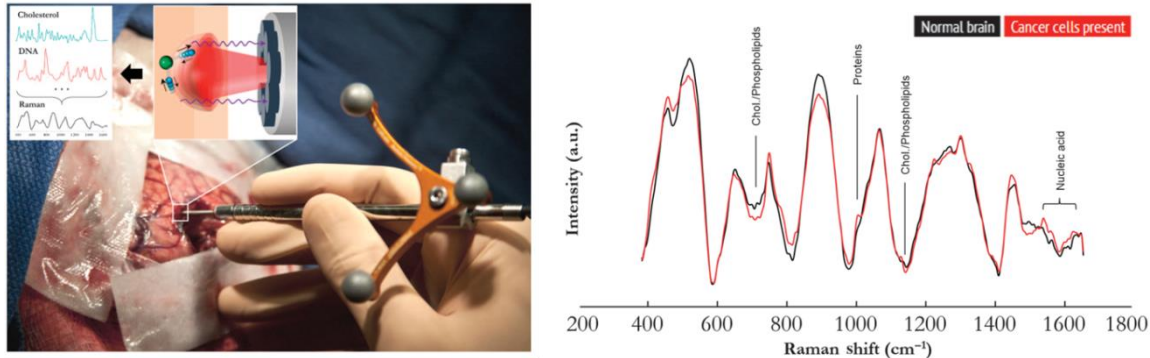


Figure 1-15 : Sonde Raman (à gauche) et spectres Raman mesurés *in vivo* (à droite) pour la discrimination de tissus tumoraux. Sur la figure de droite, en rouge, le spectre moyen de 95 échantillons tumoraux et en noir le spectre moyen de 66 échantillons sains. Extraits de (Jermyn et al., 2015)

Toutefois, le signal Raman est rare et très faible devant la diffusion élastique de la lumière, ce qui rend cette technique difficile à mettre en place. Les signaux provenant des autres fluorophores perturbent aussi la mesure. Afin d'avoir un meilleur rapport signal à bruit, une augmentation du temps d'acquisition, l'utilisation de pulses laser ultracourts, de nanoparticules métalliques et le développement de modèle d'analyse de données plus complexes ont été proposés mais ceci est problématique dans l'utilisation pratique dans le cadre du bloc opératoire (Jermyn et al., 2016).

1.4.3 - Etude de l'autofluorescence

De son côté, l'équipe de Mahadevan-Jansen a développé une sonde de spectroscopie mesurant l'autofluorescence des tissus ainsi que leur réflectance, et l'a utilisée au bloc opératoire sur gliomes humains (Toms et al., 2005). Cette sonde excite les tissus avec un laser à 337 nm d'une part (dans le but de mesurer la fluorescence) puis avec une source halogène d'autre part (dans le but de mesurer la réflectance associée) (Lin et al., 2001). Le modèle de traitement proposé fonctionne par apprentissage et nécessite la classification préalable du tissu par analyse anatomo-histopathologique. Pour chaque classe, des caractéristiques spectrales (intensité totale, position des pics et forme) sont recherchées par des t-test de Student. Les tests les plus discriminatoires permettent de faire sortir les marqueurs les plus intéressants. Ces marqueurs sont présentés sur le Tableau 1-1 et sont ensuite implémentés dans un algorithme de discrimination pour les prochaines mesures. Ceci donne un algorithme empirique en deux étapes, la première étant une étape d'apprentissage.

Spectral components used in tissue discrimination analysis ^a			
Gray matter versus ITMs			
A	B	C	D
F_{430}/F_{460}	F_{485}/Area	Rd_{655}/Rd_{650}	$(F_{420}/F_{460})^2/Rd_{420}/Rd_{460}$
Final components used in the 2-D nonlinear discrimination scheme: $A * D$ and $C - B$			
White matter versus ITMs			
A	B	C	D
F_{640}/F_{650}	Rd_{515}/Rd_{460}	$(F_{640}/F_{650})/(Rd_{640}/Rd_{650})$	$(F_{640}/F_{650})^2/(Rd_{640}/Rd_{650})$
Final components used in the 2-D nonlinear discrimination scheme: $A - B$ and $C + D$			
Gray matter versus solid tumor			
A	B	C	
F_{640}/F_{650}	Rd_{670}/Rd_{650}	$(F_{495}/F_{460})/(Rd_{495}/Rd_{460})$	
Final components used in the 2-D nonlinear discrimination scheme: $A - B$ and $A + C$			
White matter versus solid tumor			
A	B	C	
F_{625}/F_{650}	$(F_{520}/F_{460})^2/(Rd_{520}/Rd_{460})$	$(F_{625}/F_{650})^2/(Rd_{625}/Rd_{650})$	
Final components used in the 2-D nonlinear discrimination scheme: $A + B$ and $A * C$			
^a ITM, infiltrating tumor margin; 2-D, two-dimensional.			

Tableau 1-1: Marqueurs de discriminations pour autofluorescence. F_i est le spectre de fluorescence à la longueur d'onde i et Rd_i est l'intensité du spectre de réflectance diffuse à la longueur d'onde i . Extrait de (Toms et al., 2005).

La sensibilité et la spécificité de cette méthode dépassent 90% pour discriminer les marges des tissus sains. L'intérêt de cette méthode est l'absence d'utilisation de fluorophores ou autre agent. On peut cependant recenser quelques inconvénients : la nécessité d'une étape d'apprentissage ne permet pas de remplacer l'analyse anatomo-histopathologique ; la présence de sang biaise les données sans que ceci ne soit corrigé ; le temps d'acquisition de 30 secondes est long, même si des travaux en cours visent à le réduire à 5 secondes ; l'algorithme n'utilise pas toute l'information spectrale mais seulement certaines longueurs d'onde.

En parallèle, l'équipe de Marcu étudie le temps de vie de fluorescence des tissus cérébraux et la première étude *in vivo* est rapportée par Butte (Butte et al., 2011). Dans cette étude, les tissus sont excités à 337 nm avec un laser pulsé de 700 ps de pulse. La réponse impulsionnelle de fluorescence est ici calculée en déconvoluant le pulse d'entrée du laser de la fluorescence mesurée. Cette déconvolution est faite par technique Laguerre et renvoie à la fois la réponse impulsionnelle déconvoluée et des coefficients de Laguerre. Les résultats obtenus proposent une spécificité de 98% et sensibilité de 100% pour les GBG et une sensibilité de 47% et spécificité de 94% pour les GHG. Les valeurs plus faibles obtenues par les GHG seraient dues à la forte hétérogénéité de ces tumeurs.

1.4.4 - Récapitulatif des techniques en cours de développement déjà testées au bloc opératoire

Nous avons cité dans cette partie les travaux effectués *in vivo*, sur gliome humain, dans une salle d'opération. Le **Tableau 1-2** propose une revue de ces techniques.

Référence	Champ de vue	Technique utilisée // marqueur	Quantitatif
(Senft et al., 2011)	Plein champ	IRM peropératoire // Gadolinium	Non
(Mahboob et al., 2016)	Ponctuel	Echographie (ultrasons) // aucun	Non
(Stummer et al., 2006)	Plein champ	Microscopie de fluorescence (PpIX) // fluorescence visible qualifiée par le neurochirurgien	Non
(Acerbi et al., 2013)	Plein champ	Microscopie de fluorescence (fluorescéine) // fluorescence visible qualifiée par le neurochirurgien	Non
(Valdés et al., 2011b, 2012b)	Initialement ponctuel, plein champ ensuite	Spectroscopie de fluorescence et réflectance. // Concentration en PpIX après correction du spectre brut par les propriétés obtenues par mesures de réflectance	Oui
(Utsuki et al., 2006)	Ponctuel	Spectroscopie de fluorescence // Intensité de fluorescence brute de la PpIX à 636 nm	Oui
(Haj-Hosseini et al., 2010)	Ponctuel	Spectroscopie de fluorescence // Rapport entre le maximum de fluorescence de la PpIX divisé par l'autofluorescence	Oui
(Piquer et al., 2014)	Plein champ	Exoscope // fluorescence visible qualifiée par le neurochirurgien	Non
(Jermyn et al., 2015)	Ponctuel	Spectroscopie Raman // signatures moléculaires dans le spectre	Oui
(Butte et al., 2011)	Ponctuel	Spectroscopie de fluorescence // Mesure de temps de vie d'autofluorescence	Oui
(Toms et al., 2005)	Ponctuel	Spectroscopie de fluorescence // Intensités d'autofluorescence	Oui

Tableau 1-2: Récapitulatif des études menées *in vivo*, au bloc opératoire, pour identifier les infiltrations tumorales des gliomes.

La liste des techniques optiques en cours de développement *ex vivo* (Ando et al., 2011; Johansson et al., 2010; Leh, 2011; Zanello et al., 2017), sur fantômes (Anastasopoulou et al., 2016; Gardner et al., 1996; Marois et al., 2016; Pogue and Patterson, 2006) ou *in vitro* (Lawrence et al.; Moan et al., 1999; Russell et al., 2008) est très longue et le lecteur intéressé peut se rapprocher des différentes revues bibliographiques récentes pour approfondir ces études (Bahreini, 2015; Behbahaninia et al., 2013; Ewelt et al., 2015; Hefti, 2013; Leroy et al., 2015; Liu et al., 2014; Oelschlägel et al., 2013; Toms et al., 2006; Valdés et al., 2016). Enfin, des techniques non optiques sont aussi en cours de développement, toujours dans le but de traiter les infiltrations tumorales. La piste de la biologie et génétique moléculaire s'ouvre

(Mischel and Cloughesy, 2003), tout comme des vaccins, même si ces travaux sont encore loin de l'application clinique (GFME, 2001). Par ailleurs, les techniques optiques citées précédemment sont appliquées à d'autres tumeurs, qu'elles soient cérébrales (Motekallemi et al., 2015; Utsuki et al., 2007; Valdés et al., 2014a) ou non (Seo et al., 2009; Yuvaraj et al., 2014).

Le travail de thèse que nous proposons par la suite s'inspire des études de spectroscopie de fluorescence déjà effectuées en travaillant sur la fluorescence de la PpIX induite après ingestion de 5-ALA. Toutefois, nos premières mesures sur biopsies ont fait apparaître un épaulement vers 620 nm, qui nous a incité à étudier la variabilité du spectre émis par la PpIX et à remettre en question l'hypothèse d'un unique spectre de référence émis par la PpIX. La partie suivante présente différentes études faisant apparaître une variation du spectre émis par la PpIX, avant de présenter l'étude préliminaire au travail de thèse effectuée sur biopsies.

1.5 - Présence d'un deuxième état de fluorescence de la PpIX

La microscopie de fluorescence ainsi que certaines techniques de spectroscopie de fluorescence de la PpIX se fondent sur l'hypothèse d'un unique spectre d'émission de la PpIX pour leur traitement de données. Dans cette thèse, nous formulons l'hypothèse que le spectre émis par la PpIX diffère selon son microenvironnement et qu'il semble judicieux de prendre en compte deux spectres caractéristiques de la PpIX pour ajuster les spectres mesurés au bloc opératoire. Cette idée sera le fil conducteur des prochains chapitres. Nous proposons d'introduire ici différents travaux qui illustrent la variation du spectre d'émission de la PpIX en fonction de son microenvironnement, tant sur fantômes que dans des bactéries. Ceci justifie notre hypothèse de considérer deux spectres de fluorescence pour la PpIX plutôt qu'un.

1.5.1 - Variabilité du spectre émis par la PpIX dans la littérature

En 1986, l'équipe de Melo (Melø and Reisaeter, 1986) étudie la structure de la PpIX en fonction du pH dans des solutions aqueuses, par spectroscopie de fluorescence et diffusion de la lumière dans ces solutions. Selon leur hypothèse, la PpIX peut être sous forme monomère, dimère ou micellaire, et ses propriétés de fluorescence, son rayon hydrodynamique et sa masse moléculaire seront alors différents. Ces travaux concluent que la PpIX, en milieu basique, forme de larges micelles et émet un spectre avec un maximum vers 620 nm alors qu'en milieu acide, l'émission de fluorescence est maximale vers 634 nm. Ces travaux nous permettent donc d'introduire la présence de deux « états » de PpIX puisque les variations d'émission de fluorescence sont corrélées à des variations de rayon hydrodynamique et de masse moléculaire, donc à la configuration de la PpIX. Cet effet du pH sur la PpIX en solution est aussi étudié par d'autres équipes, telles que (Fuchs et al., 1997; Tian et al., 2006).

En 1990, une étude faisant varier le microenvironnement de la PpIX dans des béchers confirme la variabilité du spectre émis par la PpIX en fonction de la présence de protéinoïdes ou d'albumine humaine (Lozovaya et al., 1990). La Figure 1-16, extraite de cette publication, présente les spectres d'absorption (à gauche) et d'émission (à droite) de la PpIX en fonction de son environnement.

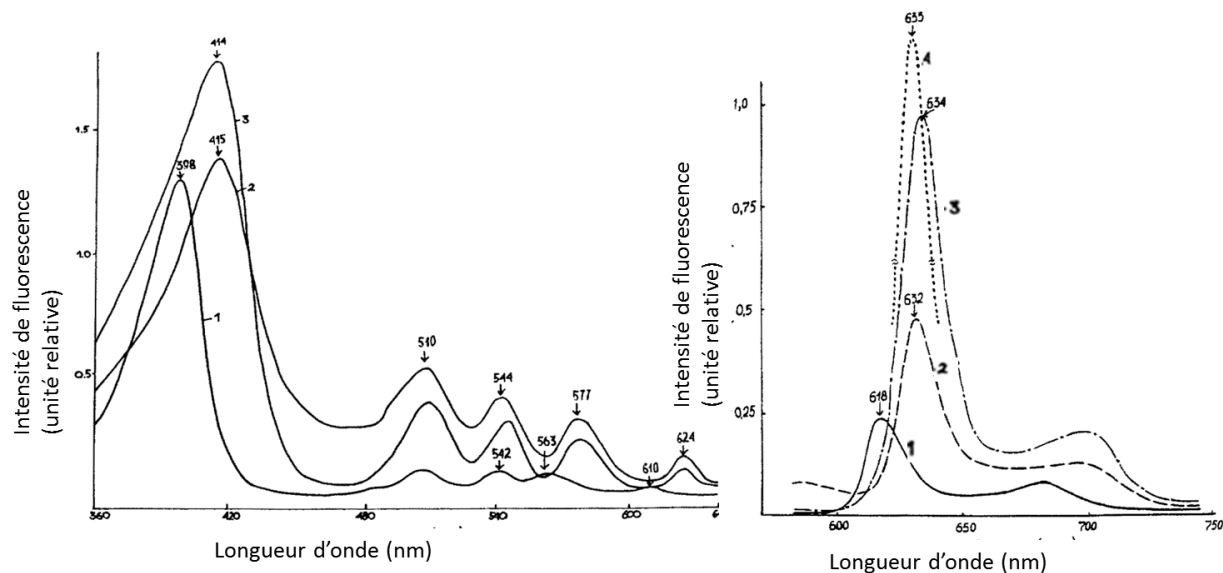


Figure 1-16: Spectres d'absorption (à gauche) et d'émission (à droite) de la PpIX suivant le microenvironnement. 1) pH 7 ; 2) pH 7 et ajout de protéinoïdes ; 3) pH 7 et ajout d'albumine humaine ; 4) dissolution de PpIX dans du méthanol. Traduit de (Lozovaya et al., 1990)

Les courbes (1) correspondent à la PpIX dissoute dans de l'acide chlorhydrique et diluée dans du PBS pour atteindre un pH de 7, sans autre additif. Les courbes (2) correspondent à la même solution dans laquelle on ajoute des protéinoïdes et les courbes (3) correspondent à la solution à pH 7 auquel on ajoute de l'albumine contenue dans du sérum humain. Enfin, la courbe (4) de la figure de droite présente le spectre d'émission de la PpIX dissoute dans du méthanol. On observe sur ces deux graphes de la Figure 1-16 que les spectres d'émission et d'absorption de la PpIX diffèrent suivant son micro environnement. Les courbes (1) des deux graphes mettent en évidence un spectre d'émission avec un pic principal à 618 nm et un spectre d'absorption avec une bande principale vers 398 nm. Ces spectres sont obtenus dans un bécher à pH de 7, sans autre composant. Les autres spectres d'émission (figure de droite) présentent un pic vers 633 nm et sont obtenus en modifiant l'environnement aqueux de la PpIX (en ajoutant de l'albumine provenant de sérum humain ou des protéinoïdes, ou bien en dissolvant la PpIX dans du méthanol). Sur la figure de gauche, on observe un décalage de 14 nm entre le maximum d'absorption de la solution émettant un spectre avec un maximum à 620 nm et celles émettant un spectre avec un maximum vers 633 nm. Ces expériences sur fantôme soutiennent que les propriétés de la PpIX dépendent de son environnement et corroborent les expériences avec variation de pH de l'équipe de Melo (Melø and Reisaeter, 1986). Cette étude montre en outre que le rendement quantique de ces différents « états » de PpIX varie, allant de 0.011 pour le spectre avec un maximum à 618 nm

à 0.155 pour le spectre avec un maximum à 633 nm. Il y a donc un rapport 15 entre les deux rendements quantiques.

Les deux études précédentes sont effectuées à partir de PpIX dissoute, en solution. Le spectre avec un maximum vers 620 nm peut donc difficilement être attribué à un autre composant que la PpIX. Dans la suite, nous présentons la variation du spectre émis par des cultures de bactéries ou de cellules humaines avec ingestion de 5-ALA.

Les travaux de Dietel et son équipe (Dietel et al., 1997, 2007) s'intéressent aux spectres émis par différentes porphyrines dans un modèle tumoral murin (Dietel et al., 1997) et dans 31 variétés de bactéries extraites de la cavité orale humaine et du tube digestif après exposition à la molécule de 5-ALA (Dietel et al., 2007). Ces études formulent l'hypothèse que la fluorescence à 620 nm est due aux porphyrines hydrophiles (uro- et co-proporphyrine) alors que la fluorescence à 634 nm serait due à la PpIX. Ces travaux soulèvent aussi la question de l'hydrophobicité de la PpIX, opposée à l'hydrophilité de ses précurseurs qui peuvent donc être évacués par « rinçage » abondant. Par ailleurs, l'étude de 2007 montre qu'avec le temps, une même bactérie peut émettre d'abord un spectre centré à 635 nm puis un spectre centré à 618 nm. Ces études soulèvent aussi la complexité des photoproduits créés par oxydation et irradiation des porphyrines. Effectuées cette fois-ci dans un environnement vivant, elles montrent la complexité de l'étude de la fluorescence émise par les porphyrines, et la difficulté d'associer un spectre à la porphyrine émettrice. Ceci ne contredit pas l'hypothèse d'une fluorescence à 620 nm induite par la PpIX mais souligne l'influence complexe du milieu d'étude.

De la même façon, les travaux de Barron et son équipe (Barron et al., 2013) montrent que pour une même quantité de 5-ALA ajoutée dans quatre lignées de cellules humaines, la quantité et le profil du spectre émis par la PpIX diffèrent selon les sites et le microenvironnement. Cette équipe met en évidence elle aussi un pic principal à 635 nm et un pic secondaire vers 620 nm, illustrant là encore la complexité du micro environnement.

La fluorescence de la PpIX est par ailleurs utilisée pour la visualisation des carries. Par exemple, Hope et son équipe ont étudié l'influence du pH sur des porphyrines dans des bactéries, dans le but de corréliser leurs résultats et l'étude de plaques dentaires (Hope and Higham, 2016). Les bactéries choisies contiennent à 83 % de la PpIX et 17 % de la CpIII. Les résultats de l'étude, illustrés sur la Figure 1-17, montrent tout d'abord un épaulement à 620 nm lorsque le pH est basique (8,63). La présence de cet épaulement peut être due à la CpIII puisque cette dernière émet vers 620 nm. Cependant, les auteurs soutiennent qu'il n'y a pas de raison que le changement de pH implique un changement de PpIX vers la CpIII. Ainsi, ces travaux concluent que le spectre émis par la PpIX dépend du pH et que cette dernière, sous certaines conditions, présente un spectre d'émission avec un pic principal vers 620 nm. Cette Figure 1-17 suggère deux autres phénomènes intéressants : le premier est qu'une variation de

la longueur d'onde d'excitation fait varier l'allure du spectre. Le second est que la fluorescence totale émise varie suivant le pH. Nous reviendrons sur ces deux phénomènes dans l'étude que nous proposons sur fantômes dans le Chapitre 3. Toutefois, notons ici que la variation du spectre émis avec la source d'excitation soutient notre hypothèse de la présence de deux états et l'intérêt du système que nous avons développé avec trois sources d'excitation.

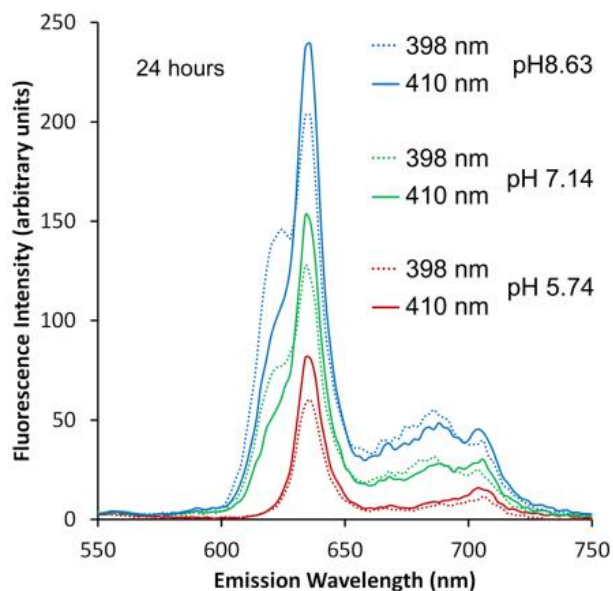


Figure 1-17 : Spectre d'émission de suspensions de *P. intermedia* (bactéries contenant principalement de la PpIX) sous excitation à 398 nm et 410 nm. En rouge, pH acide. En vert, pH neutre et en bleu, pH basique. Extrait de (Hope and Higham, 2016)

Ces travaux (Hope and Higham, 2016) soulèvent ainsi la question de la forme monomérique de la PpIX en fonction du microenvironnement : elle serait sous forme monomère en émettant avec un pic à 634 nm et sous forme dimère ou fortement agrégée lorsqu'elle émet à 620 nm. Ces résultats sont en adéquation avec l'étude de Melo qui effectue un titrage ph-métrique de solutions de PpIX (Melø and Reisaeter, 1986).

Une étude récente propose d'uniformiser les fantômes de PpIX pour la caractérisation de systèmes utilisés ensuite au bloc opératoire (Marois et al., 2016). Cette étude ne considère qu'un seul état de la PpIX. Le Chapitre 3 est consacré à l'extension de ces fantômes à des fantômes où les deux états contribuent à la fluorescence totale, mais nous pouvons d'ores et déjà noter que cette étude « voit » la fluorescence à 620 nm mais ne la considère pas et stipule qu'il est nécessaire d'ajouter un tensioactif ou des Intralipides pour obtenir une fluorescence plus intense à 634 nm, comme le montre la Figure 1-18. Ceci permet de lier les différentes études précédentes et de formuler l'hypothèse suivante : la fluorescence de la PpIX dépend de son microenvironnement et traduit probablement un changement d'agrégation. La configuration qui émet un spectre de fluorescence avec un fort rendement quantique présente un pic vers 634 nm mais nécessite l'ajout d'un tensioactif ou d'Intralipides pour fluorescer. Ceci pourrait donc être une forme non agrégée de la PpIX. A l'inverse, dans un milieu basique et sans autre constituant, la fluorescence de la PpIX présente un maximum autour de 620 nm mais son rendement de fluorescence est alors plus faible.

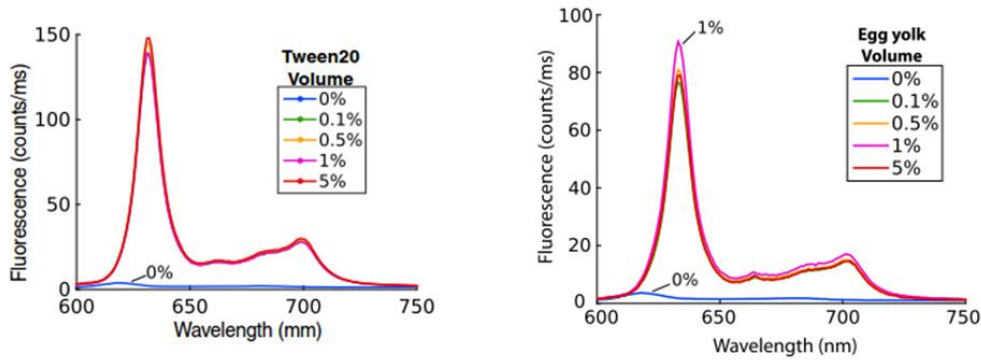


Figure 1-18 : Apparition de la fluorescence à 634 nm avec ajout de tensioactif (à gauche) ou jaune d'œuf (à droite). Extrait de (Marois et al., 2016).

Pour terminer, notons que la suite des travaux de l'équipe nord-américaine introduits dans la partie 1.4 - et ne considérant qu'un seul état de la PpIX (Kim et al., 2010b; Valdés et al., 2011a, 2011b, 2012b, 2015) propose cependant d'ajuster les spectres mesurés au bloc opératoire à l'aide de photoproduits de PpIX émettant avec un maximum vers 620 nm (Bravo et al., 2017). S'ils ne considèrent pas explicitement la présence de deux états, ils soulignent cependant la nécessité de considérer un deuxième spectre de fluorescence de la PpIX centré vers 620 nm dans leur ajustement, corroborant ainsi notre hypothèse.

1.5.2 - Etude préliminaire sur biopsies en considérant les deux états de fluorescence de la PpIX

Forts de l'hypothèse de la présence de deux états, nous avons mené une étude préliminaire sur biopsies de gliomes humains (Montcel et al., 2013). Les biopsies étaient excitées par un laser à 405 nm et le spectre collecté était ajusté comme une combinaison linéaire des spectres de référence des deux états et des photoproduits (représentés sur la Figure 1-19A) selon l'équation (1.2) :

$$S_{PpIX}(\lambda) = \alpha_{620}S_{620}(\lambda) + \alpha_{634}S_{634}(\lambda) + \alpha_{photoproduits}S_{photoproduits}(\lambda) \quad (1.2)$$

où $S_{PpIX}(\lambda)$ est le spectre émis par la PpIX (mesuré sur biopsie), $S_i(\lambda)$ est le spectre de référence d'un des fluorophores considérés et α_i sa contribution à la fluorescence mesurée, i étant 620, 634 ou *photoproduits*. La Figure 1-19A présente les spectres de références obtenus pour les deux états de fluorescence de la PpIX (en rouge, l'état avec un maximum vers 620 nm et en bleu celui avec un maximum vers 634 nm) ainsi que les photoproduits associés (en marron).

Lors de cette étude, le paramètre proposé pour la classification des tissus fut le rapport entre les contributions des deux états obtenus lors de l'ajustement des données spectrales:

$$Ratio_{620/634} = \frac{\alpha_{620}}{\alpha_{634}} \quad (1.3)$$

La Figure 1-19B présente les résultats obtenus lors de cette étude. Nous observons que ce ratio tend vers 0 dans les cœurs des gliomes de haut grade et vers 1 sinon. Les tests de

Kolmogorov-Smirnov indiqués montrent que ce biomarqueur est pertinent pour discriminer les cœurs des GHG de leurs marges et des GBG sur biopsies.

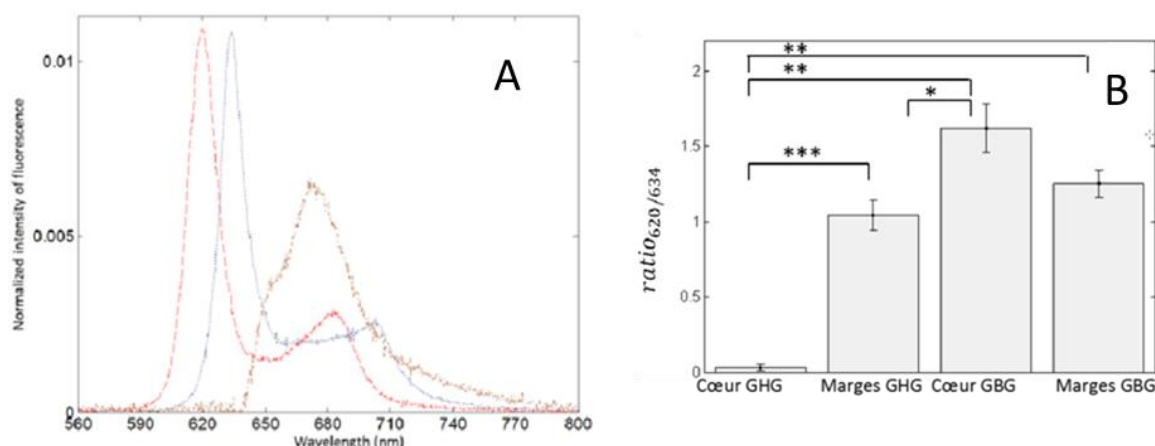


Figure 1-19 : (A) Spectres d'émission des deux états de PpIX et des photoproduits associés considérés comme références (B). Rapport de la contribution des deux états à la fluorescence totale en fonction de la catégorie de tissu. Extrait de (Montcel et al., 2013).

Cette étude sur biopsie étant prometteuse, une étude *in vivo* a été proposée, qui a fait l'objet du travail de thèse rapporté dans ce mémoire. L'objectif de ces travaux de thèse est donc double : il s'agit tout d'abord de montrer la faisabilité technique de faire des mesures de spectroscopie de fluorescence directement sur le cerveau, sous excitation multi-longueurs d'onde, avec suffisamment de signal. Il s'agit ensuite de prouver qu'on retrouve ces deux états *in vivo* et de discuter de leur intérêt dans la discrimination des marges des gliomes.

1.5.3 - Propriétés de fluorescence de ces deux états

Dans la suite de ce manuscrit, nous considérons deux états de la PpIX aux propriétés de fluorescence différentes. Nous présentons ici leurs spectres d'absorption et d'émission utilisés tout au long de la thèse. La Figure 1-20 présente le spectre d'absorption de l'état 620 (en rouge) et celui de l'état 634 (en bleu) avec des marqueurs sur les longueurs d'ondes maximales d'absorption. Ces spectres ont été obtenus sur des solutions de PpIX dissoute dans du DMSO et diluée dans du PBS. Les concentrations initiales en PpIX sont identiques. Nous reviendrons sur l'obtention de ces références dans le Chapitre 3 mais nous observons ici un pic d'absorption (première bande de Soret) vers 378 nm pour l'état 620 et 408 nm pour l'état 634. Nous observons par ailleurs que l'état 634 absorbe beaucoup plus la lumière que l'état 620 et notons un rapport 10 entre leurs deux maxima d'absorption.

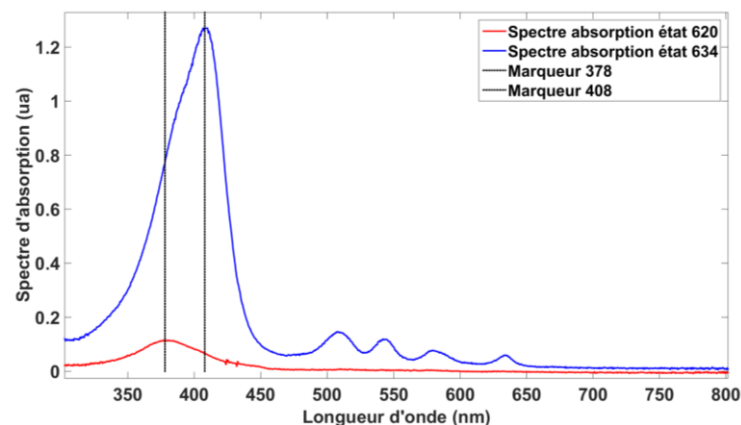


Figure 1-20 : Spectres d'absorption UV-visible des deux états de la PpIX obtenus expérimentalement.

Les spectres d'émission des deux états sont présentés sur la Figure 1-21, avec en rouge celui de l'état 620 et en bleu celui de l'état 634 et des marqueurs aux longueurs d'ondes maximales (620 nm et 633.5 nm). Pour plus de lisibilité, le spectre rouge a été multiplié par 10. Nous observons ici un rapport 55 entre les deux maxima.

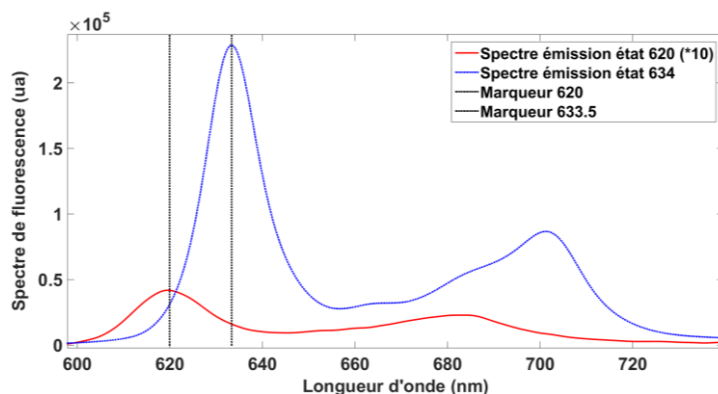


Figure 1-21 : Spectres d'émission des deux états de la PpIX obtenus expérimentalement. En rouge, émission avec un maximum vers 620 (nm) et en bleu émission avec un maximum vers 634 nm. Pour plus de lisibilité, le spectre rouge a été multiplié par 10.

La Figure 1-20 montre que la PpIX peut aussi être excitée à 634 nm. Cette longueur d'onde d'excitation, choisie par certaines équipes de recherche (Markwardt et al., 2016; Potapov et al., 2013), permet une meilleure pénétration des tissus puisque l'absorption y est plus faible. Cependant, avec cette longueur d'onde d'excitation, il est difficile de différencier les photons collectés provenant de l'excitation de ceux provenant de la fluorescence. C'est pourquoi nous choisissons d'exciter la PpIX selon sa bande de Soret vers 405 nm.

1.6 - Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté le contexte de la thèse. Nous avons d'abord décrit les tissus d'étude, tant le tissu sain que les gliomes. Nous avons ensuite présenté la problématique clinique de cette thèse, à savoir la difficulté d'identifier les infiltrations tumorales, en temps réel, au bloc opératoire et donc le besoin d'assistance. Avant de présenter dans le détail les techniques d'assistance, nous avons présenté les phénomènes basiques de

l'interaction lumière-matière utiles à la compréhension des prochains chapitres, notamment le phénomène de fluorescence. Ensuite, nous avons présenté les techniques actuellement utilisées pour guider le neurochirurgien dans la résection de gliomes et leurs limites puis nous avons présenté les différents travaux de recherche déjà testés *in vivo* pour dépasser ces limites. Nous avons ainsi identifié que la fluorescence de la PpIX semblait être un outil prometteur pour discriminer les cellules tumorales. Nous avons cependant montré que le spectre émis par la PpIX dépendait de son microenvironnement tant sur fantômes que dans des bactéries et nous avons montré que le microenvironnement variait dans les tissus en fonction de la densité en cellules tumorales (pH, vascularisation...).

Ceci nous a permis de proposer le cadre de travail de cette thèse : la présence et l'intérêt de deux spectres d'émission de la PpIX en fonction de son environnement, dans les tissus cérébraux tumoraux après ingestion de 5-ALA. Nous avons introduit deux états, émettant des spectres respectivement centrés autour de 620 nm et de 634 nm et avec des propriétés de fluorescence très différentes. Ces deux états seront appelés « état 620 » et « état 634 » dans la suite du manuscrit, même si leur maximum peut être légèrement décalés suivant les mesures. Enfin, nous avons relevé une différence d'efficacité de fluorescence des deux états, ce qui soulève la question de la cause de la diminution de fluorescence relevée dans les marges tumorales. Nous pouvons nous demander si cette diminution est uniquement due à la diminution de la concentration en PpIX ou si elle n'est pas aussi due à un changement d'état impliquant la présence de l'état 620. C'est ce que nous proposons d'étudier dans la suite de ce manuscrit de thèse.

Chapitre 2

Conception, développement et caractérisation du système de spectroscopie de fluorescence

Nous avons vu dans le chapitre précédent le potentiel de la spectroscopie de fluorescence de la PpIX pour identifier les infiltrations tumorales des gliomes. Nous avons aussi introduit la présence de deux états de la PpIX avec des propriétés de fluorescence différentes. Dans ce chapitre, nous présentons le développement et la caractérisation d'un système interventionnel de spectroscopie de fluorescence dont le but est l'identification des deux états de fluorescence de la PpIX *in vivo*. Ce système, doté de 3 DELs, excite séquentiellement les tissus avec 3 longueurs d'onde et collecte le spectre de fluorescence émis, via une sonde optique fibrée. Nous commencerons par présenter les différents composants utilisés et leurs caractéristiques avant de proposer la caractérisation du système complet.

2.1 - Cahier des charges et description générale

Le système développé a pour but la mesure de spectres de fluorescence de tissus cérébraux *in vivo*, au bloc opératoire de neurochirurgie. Ceci impose un cahier des charges strict dans le choix des composants et leur assemblage. Afin de pouvoir être utilisé au bloc opératoire, l'appareil développé doit être approuvé par l'Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Il doit notamment répondre aux normes d'irradiation et de stérilisation (une présentation détaillée du dossier ANSM sera faite dans le Chapitre 4) ; être transportable et robuste au transport (pas trop encombrant ni trop lourd) ; fermé ; et ses différents blocs doivent rapidement s'assembler. Par ailleurs, afin d'exciter les deux états d'intérêt de la PpIX, nous avons choisi une excitation multi-longueurs d'onde des tissus, avec des longueurs d'ondes adaptées aux propriétés des deux états recherchés. Ceci distingue ce prototype de ceux présentés dans le Chapitre 1, qui n'ont qu'une source d'excitation de fluorescence.

La Figure 2-1 présente un schéma du système. On y observe que le système se décompose en 3 blocs : l'interface de commande, les composants opto-électriques et enfin la sonde.

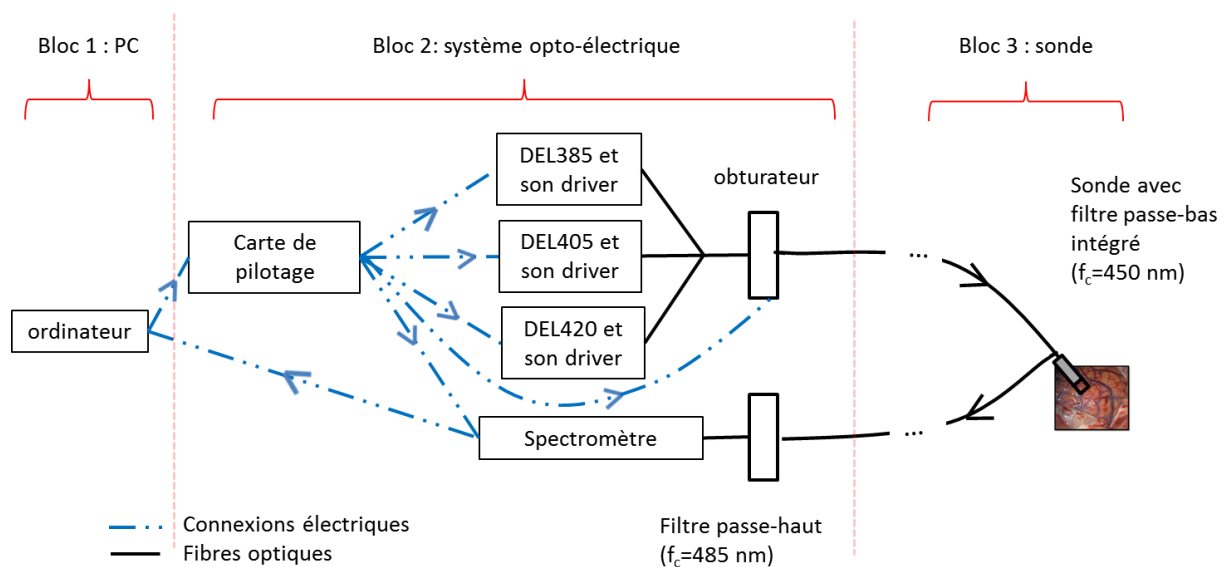


Figure 2-1 : Schéma du système.

Plus précisément les trois blocs sont :

Bloc 1. L'ordinateur, unité centrale d'où est commandé tout le système depuis une interface Labview®. Cette interface est présentée en détail dans la partie 2.2.1 - et apparaît sur la Figure 2-5.

Bloc 2. Une boîte noire confectionnée à partir de plaques de PVC compact de différentes épaisseurs (3 mm, 5 mm et 10 mm) contenant tous les composants électriques et optiques. Le choix de l'épaisseur dépend du rôle de la plaque (fermeture, support...). De cette boîte sortent un nombre minimal de connexions, soit 2 connexions USB vers l'ordinateur (l'une pour la carte de pilotage, l'autre pour le spectromètre), 1 prise électrique 220V standard pour l'alimentation des composants et 2 connexions optiques SMA vers la sonde. La boîte mesure 47x37x23 cm³, pèse 15.5 kg et contient 3 étages. La Figure 2-2 présente des photographies légendées de ces trois étages. Tous les composants sont fixés pour éviter leur mouvement lors du transport et nous ajoutons des poignées sur la boîte, pour un transport plus facile. Les parois sont vissées entre elles pour garantir une fermeture hermétique mais le nombre de vis est restreint afin de pouvoir ôter n'importe quelle paroi rapidement pour accéder aux composants du système si nécessaire.

Bloc 3. La sonde, d'une longueur de 3 mètres, connectée au bloc 2 par deux connexions SMA. Cet élément est décrit dans le détail dans la partie 2.2.3 -.

La Figure 2-2 présente une photographie de chaque étage du bloc 2 vu de dessus. Nous y observons que l'étage 2 contient les sources d'excitation et les connexions vers la sonde. L'étage 1 contient les drivers des diodes électroluminescentes (DELs) ainsi que le système de détection. L'étage 0 présente la multiprise et la carte de pilotage.

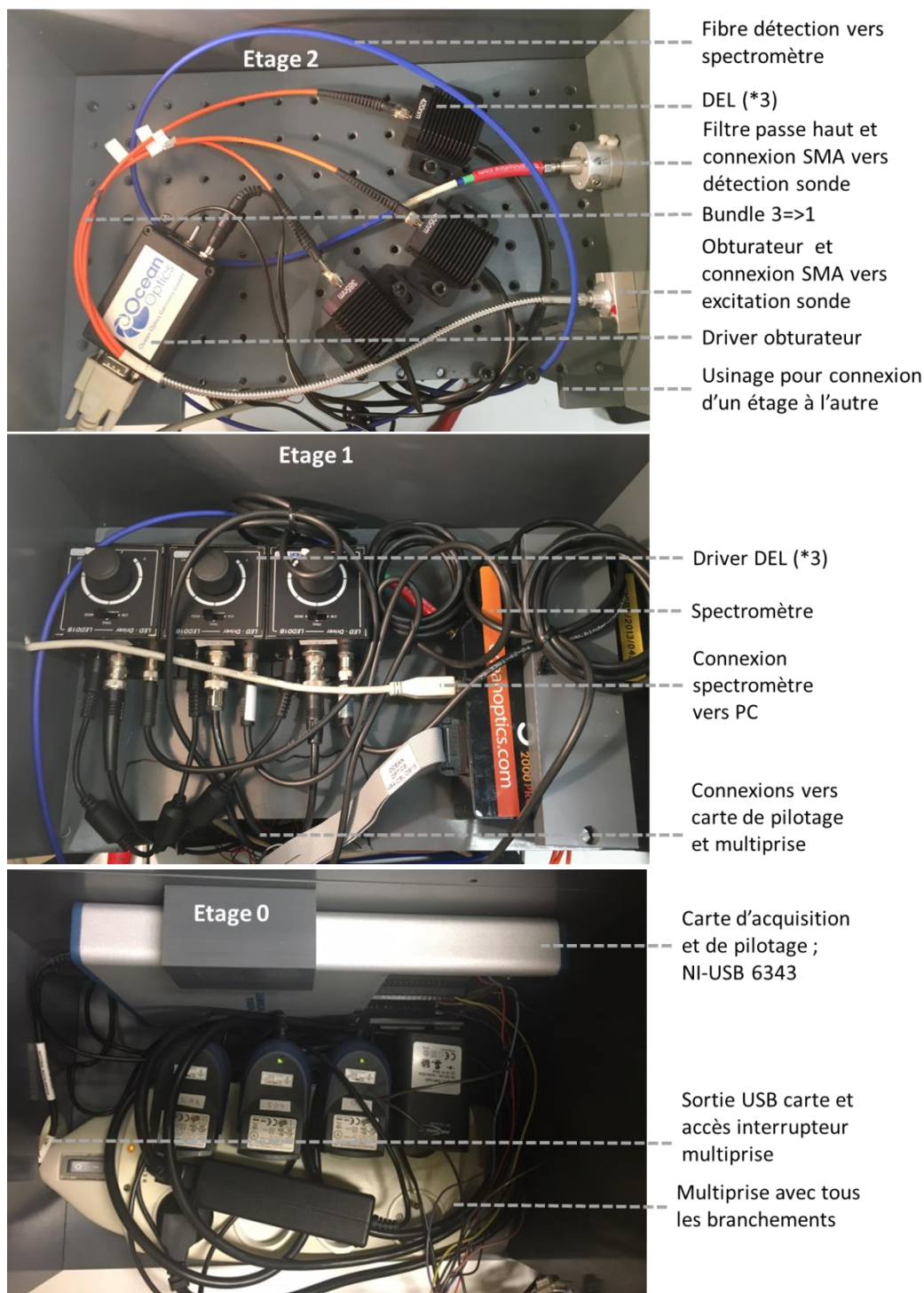


Figure 2-2 : Photos légendées de chaque étage du bloc 2 vu de dessus.

La Figure 2-3 présente le système assemblé avec ses dimensions (à gauche) et le système au bloc opératoire (à droite). Cette figure montre l'allure générale du système conçu et l'aspect ergonomique des blocs 1 et 2, petits, facilement déplaçables et nettoyables, qui s'intègrent donc bien dans le bloc opératoire.

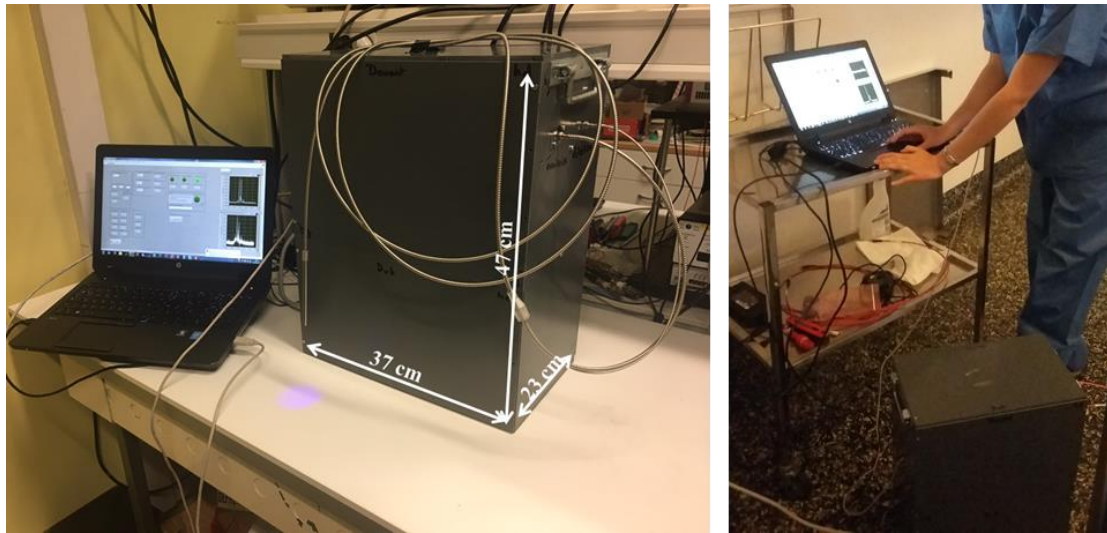


Figure 2-3 : Photographie du système assemblé au laboratoire (à gauche) et dans le cadre d'une utilisation au bloc opératoire (à droite).

Enfin, le schéma de la Figure 2-4 présente le contexte interventionnel dans lequel s'insère le système. Cette figure montre la zone stérile (hachurée en orange), dans laquelle la sonde sera utilisée, ainsi que les différents acteurs du bloc opératoire (1 à 3 par métier) et l'agencement de la salle. Nous pouvons observer la nécessité d'un appareil compact et transportable devant la faible place disponible.

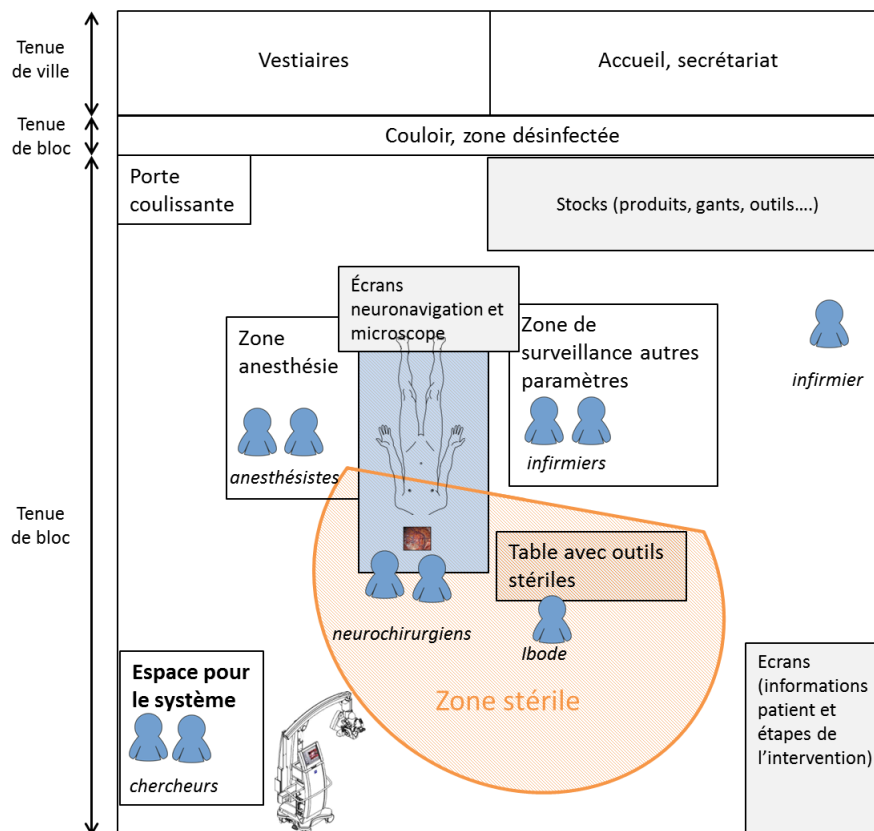


Figure 2-4 : Schéma du bloc opératoire. En orange, la zone stérile, en bleu les personnes présentes, en gris les zones occupées par des outils (microscope opératoire, écrans, système de neuronavigation, stocks...)

L'espace dédié au prototype est dans la zone désinfectée, avec la sonde qui entre dans la zone stérile.

2.2 - Présentation et caractérisation des principaux composants

Après avoir vu la description générale du système, cette partie présente les principaux composants, selon le trajet de l'information visible sur le schéma de la Figure 2-1 et décrit ci-après. L'acquisition des spectres est initiée par un utilisateur sur l'interface Labview, qui transmet l'information à la carte de pilotage. Cette dernière pilote d'une part les drivers des DELs et l'obturateur pour laisser passer la lumière et d'autre part le spectromètre. La lumière est transmise des DELs vers la sonde via un bundle de fibres optiques fabriqué en interne. La lumière excite le tissu par le biais de la sonde posée sur le cerveau et la fluorescence émise est collectée par cette même sonde. Le signal de fluorescence est filtré par un filtre passe-haut de longueur d'onde de coupure 485 nm, avant d'être collecté par un spectromètre qui renvoie les données sur l'ordinateur. Nous présentons ici les différents composants et leurs caractéristiques plus en détails.

2.2.1 - Partie commande : Ordinateur et interface Labview®

L'ordinateur présente l'interface homme/machine depuis laquelle est piloté tout le système à l'aide du logiciel Labview®. L'interface utilisateur développée est présentée sur la Figure 2-5. L'utilisateur choisit (1) la durée d'une acquisition, (2) le nombre d'acquisitions par DEL, (3) la puissance en sortie de chaque DEL et (4) le nom du fichier à enregistrer. Il lance alors l'acquisition et l'interface permet de suivre le déroulement du programme ((5) numéro de l'acquisition en cours, (6) état des DELs et (7) spectres dernièrement acquis, (8) vérification des différents paramètres non modifiables). Si nécessaire, un arrêt d'urgence (9) permet de stopper le programme.

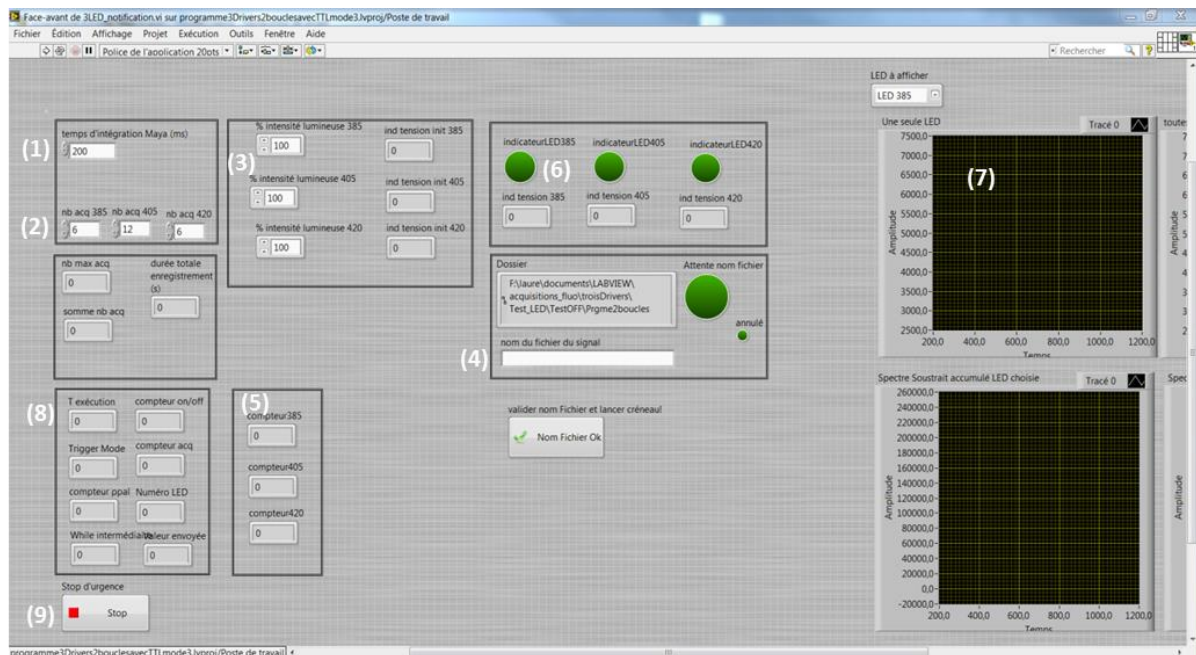


Figure 2-5: Interface homme/machine développée.

La programmation de cette interface se fait donc en langage graphique Labview®. Après une étape d'initialisation de toutes les variables, les différentes tâches sont effectuées

selon le parcours du signal (commande d'ouverture de l'obturateur, envoi de la commande d'intensité au driver de la DEL de travail, commutation de la DEL et acquisition du spectre en même temps, changement d'état de la DEL, acquisition d'un spectre etc...). Nous observons dans ce parcours la contrainte de synchronisation entre l'activation des DELs et le début de l'acquisition par le spectromètre. Pour répondre à ce besoin, nous avons codé un programme avec deux boucles fonctionnant en parallèle. La première boucle du programme commande la partie émission tandis que la seconde commande la partie détection (le spectromètre). Les deux boucles sont synchronisées par une notification envoyée de la boucle 1 vers la boucle 2 après un délai de 300 μ s depuis la commutation d'une des DELs. Ce délai correspond au temps de commutation des DELs et est détaillé dans la partie 2.2.2.1 -. Ceci implique par ailleurs le branchement d'un signal TTL sur le spectromètre. Enfin, à la première acquisition, une étape d'initialisation est nécessaire pour le spectromètre, rajoutant un délai double du temps d'acquisition (soit 400 ms). Ces différentes actions sont pilotées par des tâches DAQmx (*National Instrument*) assignées spécialement pour ce programme.

2.2.2 - Système d'excitation :

Le système que nous proposons effectue une excitation multi-longueurs d'onde avec 3 DELs, ce qui nous présentons ici. De plus, afin de ne pas avoir à changer manuellement la source d'excitation à chaque fois, nous avons fabriqué un bundle de fibres optiques qui sera aussi présenté.

2.2.2.1 - Sources d'excitation

Le système excite le tissu à l'aide de 3 DELs, centrées respectivement à 385 nm, 405nm et 420 nm. En effet, puisque nous cherchons à identifier deux états de fluorescence de la PpIX avec des propriétés d'absorption différentes, nous choisissons d'effectuer une excitation multi-longueurs d'onde avec des sources adaptées aux deux états. Comme nous l'avons présenté dans le Chapitre 1, conformément à la littérature et à au spectre d'absorption de l'état 634, nous choisissons pour l'excitation une DEL dont le spectre d'émission est centré autour de 405 nm (M405F1, *Thorlabs*). L'état 620 étant moins étudié, il n'y a pas de données sur la longueur d'onde optimale d'excitation mais nous avons mesuré une bande d'absorption autour de 385 nm sur son spectre d'absorption présenté dans le Chapitre 1. Ainsi, nous choisissons une DEL centrée sur 385 nm comme deuxième source d'excitation (M385F1, *Thorlabs*). Enfin, en complément de ces deux sources nous choisissons une troisième source d'excitation centrée à 420 nm (M4205F1, *Thorlabs*). Afin de faciliter le respect des normes d'irradiation (voir Chapitre 4), nous choisissons de travailler avec des DELs plutôt que des sources lasers. Ces DELs peuvent être pilotées manuellement ou automatiquement via la carte de pilotage, qui est l'option retenue pour notre protocole. Par la suite, ces DELs seront notées DEL385, DEL405 et DEL420. La Figure 2-6 présente les spectres d'émission de chacune des DELs choisies.

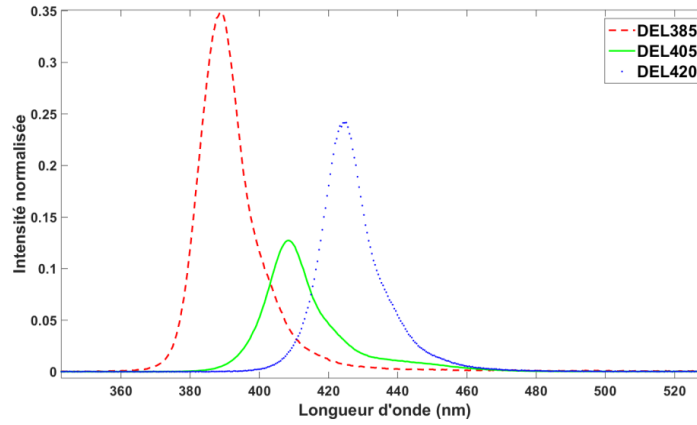


Figure 2-6 : Spectre d'émission des DELs utilisées, normalisé par leur puissance respective.

Sur cette Figure 2-6, les spectres collectés sont normalisés par la puissance mesurée en sortie de chaque DEL. Nous observons tout d'abord sur la Figure 2-6 que les spectres sont relativement larges, avec une largeur à mi-hauteur de 14, 16 et 15 nm respectivement aux DEL385, DEL405 et DEL420. Par ailleurs, le spectre des DELs est dissymétrique, présentant une réminiscence de lumière vers les hautes longueurs d'onde pour les trois DELs. Afin de couper la réminiscence de lumière et de garder une excitation centrée sur les longueurs d'onde d'intérêt, un filtre passe-bas est inséré dans la sonde avant que la lumière n'arrive sur les tissus (voir partie 2.2.3 -).

La puissance en sortie des DELs branchées à une fibre optique de 550 μm de cœur et d'ouverture numérique 0.22 a été mesurée sur le capteur S130VC (*Thorlabs*) du puissance-mètre PM100D (*Thorlabs*). Cette mesure renvoie une puissance de 14.1 mW, 5.86 mW et 10 mW respectivement à la DEL385, DEL405 et DEL420. La documentation technique des DELs fournit la puissance en sortie d'une fibre de 400 μm de cœur et 0.39 d'ouverture numérique. La comparaison entre la puissance mesurée (fibre de 550 μm de cœur et 0.22 d'ouverture numérique, notée FO550 par la suite) et la puissance donnée par la documentation (fibre de 400 μm de cœur et 0.39 d'ouverture numérique, notée FO400 par la suite) est effectuée en connaissant la puissance en sortie des deux types de fibres pour une DEL illuminant à 530 nm (DEL530). Le calcul de la puissance théorique en sortie de FO550 pour une DEL_{*i*} est donné par l'équation :

$$P_{calc}^{FO550}(DEL_i) = \frac{P_{th}^{FO550}(DEL530)}{P_{th}^{FO400}(DEL530)} \cdot P_{th}^{FO400}(DEL_i) \quad (2.1)$$

où P_{th} représente la puissance théorique, P_{calc} la puissance calculée et i la longueur d'onde centrale d'une des DELs de travail, soit 385, 405 ou 420. D'après la documentation technique, les valeurs minimales de $P_{th}^{FO400}(DEL530)$ et $P_{th}^{FO550}(DEL530)$ valent respectivement 4.0 mW et 6.86 mW.

Le Tableau 2-1 présente les résultats des mesures et calculs selon les mêmes notations que précédemment, avec P_{exp} la puissance mesurée.

	DEL385	DEL405	DEL420
P_{th} minimale FO400 (mW)	9.0	3.0	1.6
P_{th} typique FO400 (mW)	10.7	3.7	1.7
P_{calc} minimale FO550 (mW)	15.4	5.1	2.7
P_{calc} typique FO550 (mW)	18.4	6.3	2.9
P_{exp} FO550 (mW)	14.1	5.86	10

Tableau 2-1 : Puissance théorique et expérimentale en sortie des DELs.

Nous concluons de l'observation de ce tableau que la puissance en sortie des DEL385 et DEL405 est conforme à la documentation technique. En revanche, la puissance en sortie de la DEL420 est supérieure à la puissance théorique. Nous tiendrons donc compte de cette information dans les calculs d'irradiation du Chapitre 4.

Enfin, les temps de montée et de descente des drivers des DELs sont étudiés puisqu'il est nécessaire d'avoir un temps de réaction quasiment instantané, ou du moins négligeable devant la durée d'acquisition de 200 ms. Pour atteindre la puissance maximale (qui est celle utilisée dans les mesures), nous observons un temps de montée d'environ 30 μs et un temps de descente d'environ 250 μs pour chaque DEL. L'obtention des temps de montée ou de descente est effectuée en cherchant l'instant t_1 où le signal vaut 10% de la tension maximale et l'instant t_2 où le signal vaut 90% de cette tension maximale. Le temps de réaction est alors la différence $t_2 - t_1$. La Figure 2-7 présente des captures d'écran d'un oscilloscope utilisé pour identifier les temps de montée (A-C) et de descente (D-F) pour la DEL385 (A-D), DEL405 (B-E) et DEL420 (C-F). Les droites rouges représentent les tensions de 10% et 90% du maximum et les droites bleues les temps t_1 et t_2 . Sont notées en haut à droite des vitesses de balayage (V_b).

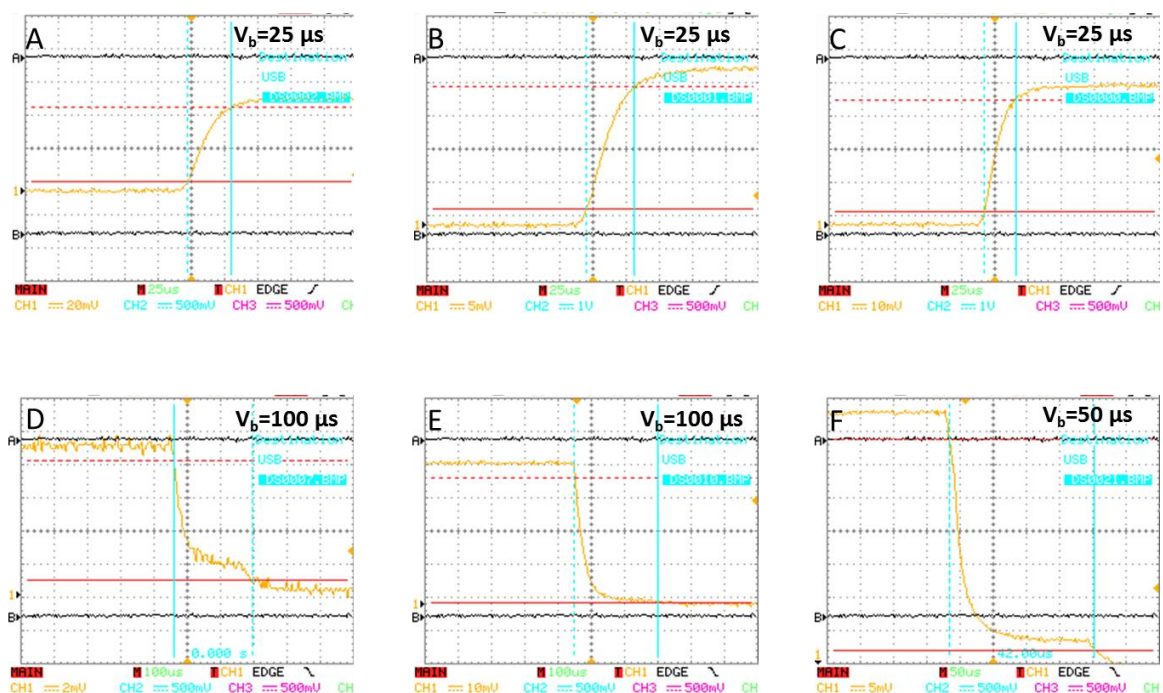


Figure 2-7 : Calcul des temps de montée (A-C) et descente (D-F) des DEL385 (A-D), DEL405 (B-E) et DEL420 (C-F).

Nous observons des temps de montée (A-C) d'environ 30 μ s pour les trois DELs. Les temps de descente tels que définis auparavant valent environ 250 μ s. Toutefois, nous remarquons une perte de 85% du signal en 50 μ s environ. Ces temps sont satisfaisants pour nos besoins et intégrés dans le programme de commande en instaurant un délai de 300 μ s entre la commutation de la DEL et le début de l'acquisition par le spectromètre.

2.2.2.2 - *Bundle de fibres optiques*

Une fois les sources d'excitation choisies, un bundle de fibres avec terminaisons SMA est construit afin de pouvoir exciter le tissu avec chacune des DELs sans avoir à déplacer manuellement la sonde en face d'une nouvelle source d'excitation. Nous assemblons donc trois fibres optiques de 600 μ m de coeur (HCG M0600T, *sedi-fibres*). Chaque fibre est branchée à une DEL d'un côté et les trois fibres sont assemblées côte à côte de l'autre côté pour former une connexion unique SMA de 1500 μ m de diamètre, reliée à la sonde par l'intermédiaire de l'obturateur (INLINE-TTL-S, *Ocean Optics*). Le bundle et les connexions sont visibles en orange sur l'étage 2 de la Figure 2-2.

2.2.2.3 - *Obturateur*

Le schéma de la Figure 2-1 présente un obturateur entre ce bundle de fibres optiques et la sonde. Initialement, nous souhaitons l'utiliser pour bloquer mécaniquement le passage de la lumière lors de l'acquisition du spectre de background. Malheureusement, sa fréquence de commutation maximale est de 5 Hz, soit 200 ms, ce qui est plus lent que le temps de commutation des DELs. Ce temps de commutation est rapide (inférieur à 250 μ s) et la puissance en sortie de DELs est rapidement stable en intensité. Cet obturateur sera utilisé en sécurité, pour bloquer toute émission lumineuse accidentelle dans le bloc pendant que le neurochirurgien manie la sonde. Ainsi, nous attendons que la sonde soit déposée sur le tissu pour déclencher l'ouverture de cet obturateur et ce dernier se ferme automatiquement à la fin de la mesure. La documentation technique de cet obturateur indique par ailleurs une transmission maximale autour de 75%.

2.2.3 - **Sonde**

La sonde permet de transmettre la lumière d'excitation au tissu et de collecter le spectre de fluorescence émis. Cette sonde a été réalisée par l'entreprise IDIL, selon des spécifications optiques énoncées dans le Tableau 2-2. Outre les spécifications optiques, la sonde doit résister à la stérilisation et être un isolant électrique (entre l'alimentation du système et le patient). La partie distale de la sonde n'est bien évidemment pas reliée directement à l'alimentation, mais une isolation électrique supplémentaire de sécurité est effectuée grâce à une gaine PTFE. La résistance à la stérilisation est testée par un cycle d'autoclave. L'étude détaillée de la stérilisation sera présentée dans le Chapitre 4.

La conception de la sonde a été pensée de manière à optimiser la transmission lumineuse tout en permettant une maniabilité optimale par le chirurgien.

Paramètres	Spécifications
Longueur d'onde d'émission (7 fibres périphériques)	385 nm – 420 nm
Longueur d'onde réception (1 fibre centrale)	450 nm – 720 nm
Filtre passe-bas pour l'émission. Réf : 84691	Transmission : 300 nm-441 nm. OD4.0, usinage nécessaire pour laisser passer la fibre de collection
Longueur des 8 fibres	3.50 m
Fibres émission	Fibre multimode BFH22-365, Ouverture numérique= 0.22, Diamètre cœur= 365 µm, diamètre gaine optique=400 µm, fibre High OH
Fibre réception	Fibre multimode BFL22-365, Ouverture numérique= 0.22, Diamètre cœur= 365 µm, diamètre gaine optique=400 µm, fibre Low OH
Diamètre de la zone de recouvrement	6 à 7 mm
Angle du biseau des fibres optiques d'émission	A définir, suivant l'usinage réalisé sur le filtre dictant la distance fibres émissions-fibre réception. Les zones de détection et d'éclairement se recouvrent en sortie de fenêtre
Distance fibres - fenêtre	16 mm
Connecteur réception	SMA
Connecteur émission	SMA avec les fibres disposées suivant le schéma de la Figure 2-9

Tableau 2-2 : Spécifications optiques pour le développement de la sonde.

Le schéma de la Figure 2-8 présente les dimensions de la sonde. La longueur totale de 3 mètres permet de brancher la sonde au système en minimisant la gêne stérique dans le bloc opératoire. Le choix d'une gaine flexible permet aussi d'augmenter la maniabilité de la sonde par le neurochirurgien et les infirmiers. La séparation en deux bras (émission/réception) se fait le plus loin possible du champ opératoire toujours pour minimiser la gêne stérique. Seule la partie tenue par le neurochirurgien (partie terminale de la sonde) est rigide, sur 10 cm. On choisit pour cette partie rigide un diamètre intérieur de 5 mm et extérieur de 8 mm, conformément au diamètre typique des outils de travail du neurochirurgien. Les dimensions de cette sonde sont similaires à celles des sondes présentées dans le Chapitre 1. Nous définissons pour cette sonde le côté proximal, en contact avec le tissu, et le côté distal, branché au bloc 2.

Enfin, puisque la sonde doit subir des cycles de stérilisation (voir Chapitre 4), les composants et les systèmes de fixation doivent résister à une stérilisation par autoclave, donc à un cycle de pression de 3 bars relatifs et à une température de 134 °C.

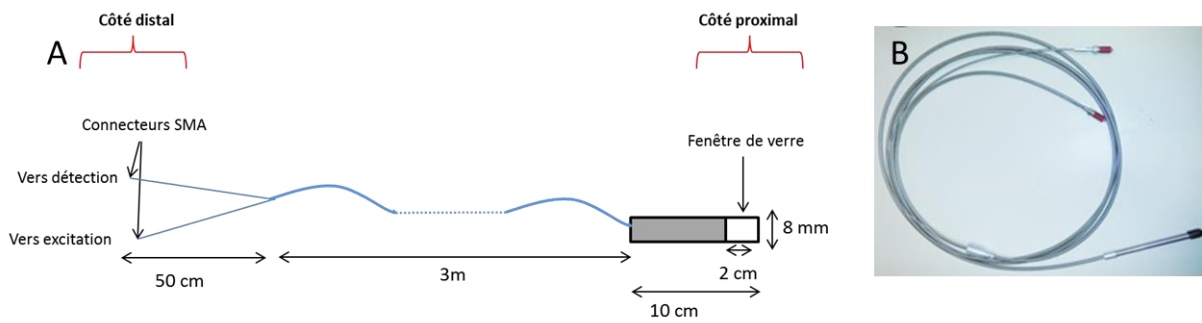


Figure 2-8 : Schéma (A) et photo (B) de la sonde initiale.

A l'intérieur de la sonde, l'excitation lumineuse est réalisée via 7 fibres optiques (BFH22-365, High OH, 365 μ m de cœur, ouverture numérique 0.22) et la détection se fait à l'aide d'une fibre centrale (BFL22-365, Low OH, 365 μ m de cœur, ouverture numérique 0.22). Les fibres d'excitation sont clivées du côté du tissu selon un angle de biseau optimisé pour que la surface illuminée corresponde à la surface de détection. L'agencement des fibres a été choisi de façon à homogénéiser au maximum l'excitation des tissus quelle que soit la source lumineuse d'excitation. Ainsi, les 7 fibres sont agencées de façon à ce que deux fibres transmettant la lumière d'une même DEL (juxtaposées du côté distal) ne soient pas juxtaposées du côté proximal. Cela signifie que les fibres se croisent dans la gaine. Le schéma de la Figure 2-9 montre l'agencement des DELs et celui des fibres aux deux extrémités de la sonde. Les numéros correspondent aux fibres d'excitation et « D » est la fibre de détection. En vert apparaissent les fibres transmettant la lumière à 385 nm. En rouge celle à 405 nm et en bleu celle à 420 nm. A) sortie du bundle ; B) extrémité distale de la sonde (côté émission) ; C) et D) extrémité proximale de la sonde. L'extrémité distale côté détection ne comporte qu'une fibre et n'est donc pas représentée.

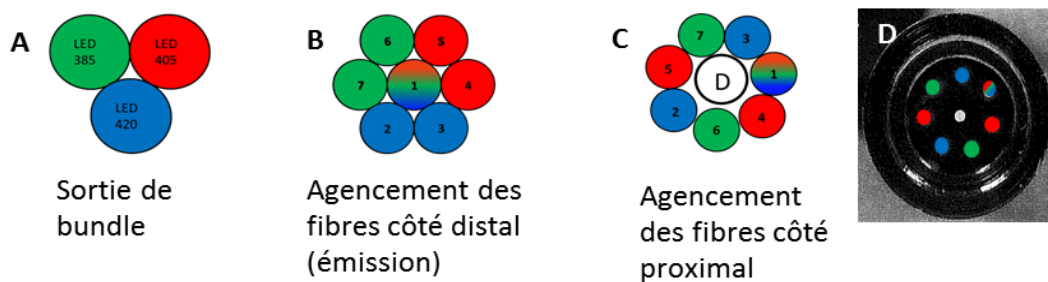


Figure 2-9 : Schémas et photo (à droite) de l'agencement des fibres dans la sonde. Sur tous ces schémas, les numéros correspondent aux fibres d'excitation et « D » est la fibre de détection. En vert apparaissent les fibres transmettant la lumière à 385 nm. En rouge celle à 405 nm et en bleu celle à 420 nm. A) sortie du bundle relié au côté distal de la sonde. B) Agencement des fibres à l'extrémité distale de la sonde C) Agencement des fibres à l'extrémité proximale de la sonde D) Photo du côté proximal de la sonde avec superposition du code couleur.

En sortie de sonde côté proximal, un filtre passe-bas coupant à 450 nm (49824, *Edmund Optics*) a été usiné et déposé devant les fibres d'excitation afin de limiter le spectre d'illumination des tissus (spectres d'émission très larges des DELs, potentielle fluorescence des fibres optiques ou de la colle utilisée). Une caractérisation de ce filtre montre cependant qu'il présente des oscillations après 700 nm, ce qui n'était pas indiqué sur la documentation

technique initiale et perturbe certains signaux acquis. Ces oscillations sont visibles sur la Figure 2-10.

Par soucis d'ergonomie, une fenêtre de verre de 2 cm a été ajoutée à la fin de la sonde, afin de permettre au neurochirurgien de déposer la sonde sur le tissu à étudier plutôt que d'essayer de rester immobile pendant plusieurs secondes à une distance fixe du tissu qui, en sus, doit être la même d'un échantillon à l'autre. Cette fenêtre de verre permet en outre d'assurer l'étanchéité de la sonde.

La gaine protectrice de la sonde a initialement été choisie en PTFE, pour sa flexibilité, l'isolation électrique et sa stérilisation facile. Cependant, la jonction entre la gaine PTFE et la partie rigide de la sonde s'est décollée entre le Patient02 et la Patient03 et la nouvelle jonction proposée fut une bague en aluminium, collée et sertie sur la partie rigide de la sonde. Afin de mieux fixer la bague sur la gaine des fibres optiques, la nouvelle gaine proposée est en acier inoxydable flexible.

La fonction de transfert de la sonde en émission (TF_e) est proposée sur la Figure 2-10. Cette fonction de transfert est calculée depuis l'une des entrées du bundle jusqu'à la sortie de la sonde. Nous observons tout d'abord un signal croissant bruité entre 300 et 450 nm. Le bruit est dû au faible signal émis par la lampe de calibration dans cette bande spectrale, cumulé avec la faible sensibilité du spectromètre dans cette même bande spectrale (comme nous le verrons dans la partie 2.2.4 -). Nous observons ensuite la coupure induite par le filtre passe-bas vers 450 nm. Toutefois, nous observons des oscillations à partir de 700 nm. Ceci n'était pas attendu mais après des recherches sur le filtre fourni, nous concluons que ces oscillations proviennent du filtre passe-bas choisi par l'entreprise qui a confectionné la sonde. Ce filtre est plutôt un filtre coupe-bande et ces oscillations sont un artéfact lié à sa conception.

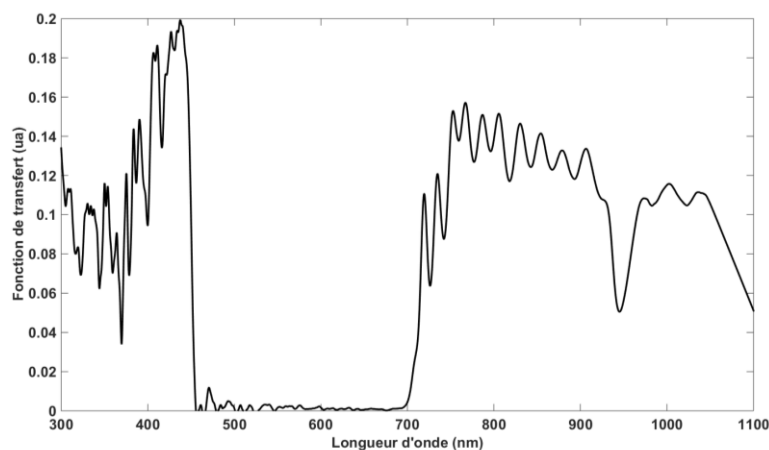


Figure 2-10 : Fonction de transfert de la partie émission {bundle+obturateur+sonde émission}.

2.2.4 - Système de détection

Le spectre de fluorescence émis par le tissu est collecté par la fibre de détection centrale de la sonde. Cette lumière est ensuite transmise au spectromètre par l'intermédiaire d'un filtre passe-haut de longueur d'onde de coupure 485 nm (HQ485LP, *LOT-QunatumDesign*), qui coupe ainsi la potentielle réminiscence de signal d'excitation. Le signal filtré est transmis au spectromètre (Maya 2000 Pro, *ocean optics*) via un bundle de fibres de 7 fibres de 100 μm de

cœur, « round to linear » (PL100-2-UV-VIS, *ocean optics*) créant un flux collimaté des photons arrivant sur la fente du spectromètre et permettant ainsi une optimisation de la transmittance. Le capteur du spectromètre est un capteur CCD (S10420, *Hamamatsu*), choisi pour sa résolution <4 nm ; sa haute sensibilité ; la possibilité d'un déclenchement synchronisé quasiment temps réel ; les temps d'acquisition très courts disponibles (6 ms-5 s) ; et pour la communication USB temps réel avec l'ordinateur. Le réseau de diffraction couplé à la fente d'entrée de 100 μm permet une résolution d'environ 8 pixels sur le capteur. La lumière est collectée entre 220 nm et 1100 nm, sur une barrette présentant 2068 pixels, soit un intervalle d'environ 0,43 nm par pixel. Ceci donne une résolution légèrement inférieure à 4 nm.

La Figure 2-11 présente la fonction de transfert du spectromètre. Nous observons toujours du bruit avant 400 nm qui provient du faible signal de la lampe de calibration dans cette zone. Nous retrouvons bien l'allure proposée par le constructeur du spectromètre, qui propose une excellente sensibilité dans la bande spectrale 600-900 nm, qui est notre zone d'étude.

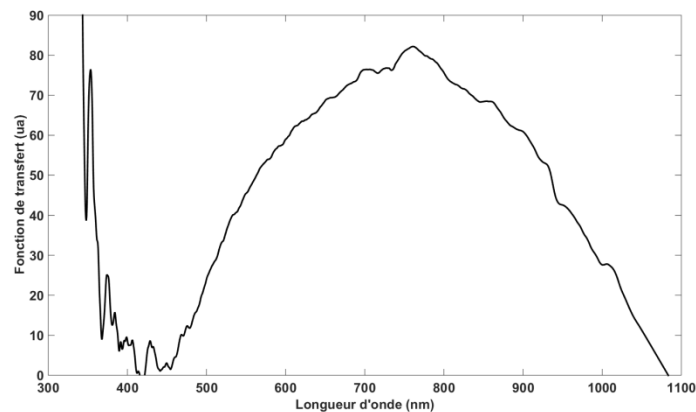


Figure 2-11 : Fonction de transfert du spectromètre.

2.3 - Assemblage et caractérisation du système complet

Comme énoncé dans la description générale du système, tous les composants sont fixés dans la boîte, installés par étage et branchés à la multiprise et à la carte de pilotage à l'étage 0. Les deux autres étages sont usinés pour laisser passer les fils d'un étage à l'autre. L'utilisation d'une multiprise dans le système permet d'éviter de multiplier les fils en sortie de boîte et les branchements à faire au bloc opératoire : seule la multiprise sera à brancher et allumer une fois le système introduit au bloc opératoire. Une ouverture dans la boîte permet d'atteindre l'interrupteur de la multiprise pour allumer tous les composants. Les étages, glissés dans des rainures faites sur les parois, sont ensuite vissés aux parois pour éviter tout mouvement. Deux plaques de PVC sont vissées sur l'avant pour fermer le système.

2.3.1 - Puissance en sortie du système

Une fois le système assemblé, des tests de puissance en sortie de sonde sont effectués, afin de vérifier la puissance envoyée sur les tissus. Nous utilisons le même capteur que pour les mesures directement en sortie de DEL (PM100D, *Thorlabs* et le capteur S130VC). Nous

observons une puissance de 1.5, 0.5 et 1 mW respectivement aux DEL385, DEL405 et DEL420 et donc une puissance surfacique maximale de 80 W/m², 30 W/m² et 50 W/m² respectivement aux 3 DELs. Cette illumination permet de respecter la norme d'irradiation exposée dans le Chapitre 4. En comparant la puissance reçue sur le capteur avec celle mesurée en sortie de DEL, nous observons une perte d'un ordre de grandeur entre la sortie de DEL avec fibre optique et la sortie de sonde. Cet écart s'explique tout d'abord par l'utilisation de l'obturbateur (transmission maximale de 75%), mais aussi par l'utilisation de deux filtres (dont la documentation indique une transmission de 90% à 95% à chaque fois) et par des problèmes d'alignement. L'optimisation de la puissance en sortie de système est un point perfectible.

2.3.2 - Spectres en sortie du système

Les spectres des DELs en sortie du système d'excitation ont été mesurés et sont visibles sur la Figure 2-12. Comme pour les tracés de la Figure 2-6, les spectres mesurés sont normalisés par la puissance. Nous observons ici la contribution du filtre passe-bas qui coupe les spectres après 450 nm et atténue bien la réminiscence de signal observée sur la Figure 2-6.

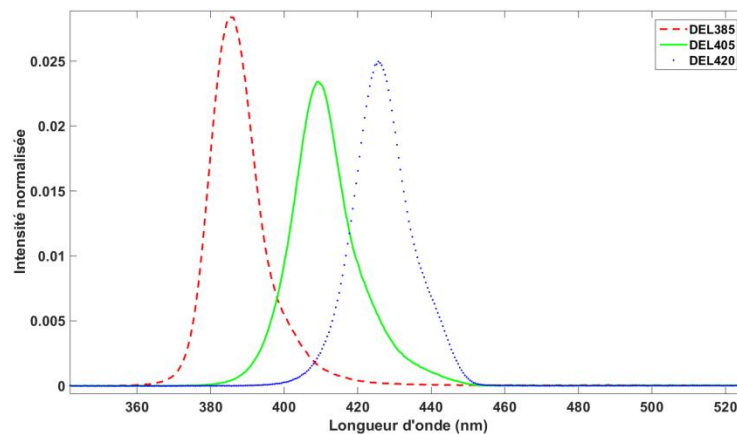


Figure 2-12 : Spectres d'excitation, mesurés en sortie de sonde d'émission.

Par ailleurs, la Figure 2-13 présente les spectres mesurés après réflexion sur un miroir. Nous observons sur cette figure la coupure réalisée par le filtre passe-haut, mais aussi un pic spectral parasite vers 693 nm, de largeur à mi-hauteur d'environ 5 nm. Nous observons aussi les oscillations du filtre passe-bas de la sonde, introduites dans la partie 2.2.4 -. Si la cause des oscillations est évidente, celle du pic n'a pas été identifiée précisément, malgré des mesures de fluorescence sur les fibres de la sonde isolées, sur la colle utilisée, et sur les chemins d'émission et de réception séparément. Toutefois ces mesures semblent indiquer une cause dans la fenêtre de verre. Par ailleurs, ce pic n'apparaît pas avec l'utilisation de fibres optiques à la place de la sonde ce qui confirme que sa cause est liée à la sonde.

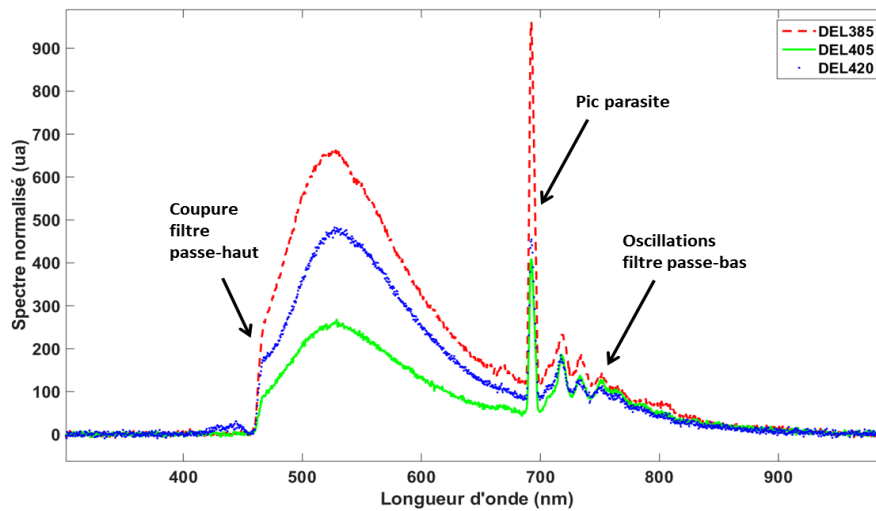


Figure 2-13 : Spectres en sortie du système complet, après réflexion sur un miroir.

2.3.3 - Fonction de transfert du système

La Fonction de Transfert (FT) du système complet a été mesurée grâce à une lampe de calibration. Une mesure de la FT de chaque composant a aussi été effectuée, en commençant par le spectromètre puis en mesurant la FT de chaque élément avec le spectromètre. En divisant par la FT du spectromètre, on peut obtenir la FT de chaque composant.

En utilisation clinique, la fonction de transfert totale (FT_t) correspond à la somme de deux FTs, celle du signal de fluorescence (FT_f) et celle du signal réfléchi (FT_r) selon l'équation (2.2)

$$FT_t = FT_f + FT_r \quad (2.2)$$

Or FT_r peut se décomposer comme la FT de la partie détection (FT_d) multipliée par celle de la partie émission (FT_e) et par un coefficient de réflexion α propre au tissu sondé. Par ailleurs, FT_f est égale à la fonction de transfert de la partie de détection. L'équation (2.2) peut donc s'écrire selon l'équation (2.3):

$$FT_t = FT_d + \alpha FT_d \cdot FT_e \quad (2.3)$$

Ainsi, la fonction de transfert totale du système est dépendante du tissu et ne peut donc pas être obtenue facilement, même si les FT de détection et d'émission ont été mesurées. La Figure 2-14 présente la FT_t mesurée après réflexion sur un miroir. Nous observons une coupure des signaux avant 485 nm due au filtre passe-haut et une diminution des oscillations après 800 nm due à la diminution de sensibilité du spectromètre. Notons ici que le pic à 693 nm n'apparaît pas, ce qui atteste l'hypothèse de la fluorescence d'un composant de la sonde, non excité par la source blanche utilisée pour calculer les fonctions de transfert mais excité par les différentes DELs.

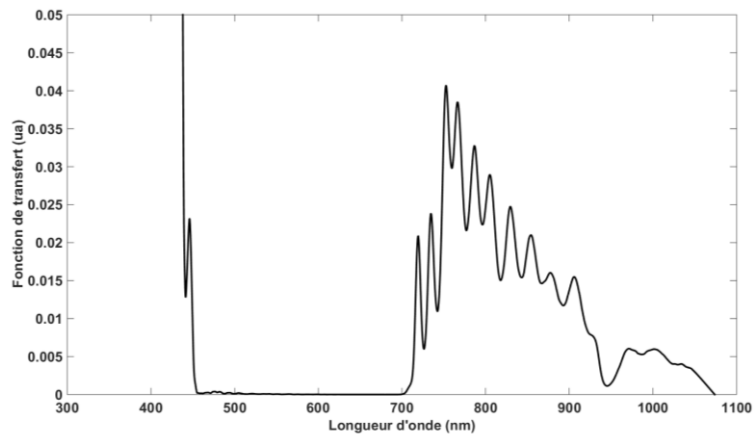


Figure 2-14: Fonction de transfert du système avec réflexion sur un miroir.

Devant la difficulté d'obtenir α et puisque le système utilisé est toujours le même entre deux patients, nous n'incluons pas la FT du système dans l'analyse de données proposée par la suite.

2.4 - Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté le système conçu, assemblé et caractérisé dans le cadre de cette thèse. Destiné à un usage interventionnel, le système proposé est composé de trois blocs : l'ordinateur, présentant l'interface de commande, un bloc électro-optique contenant tous les composants optiques et électriques hormis la sonde, et enfin la sonde. Ce prototype excite les tissus avec trois longueurs d'onde adaptées aux deux états de PpIX recherchés (385 nm, 405 nm, 420 nm) via une sonde confectionnée selon des spécifications optiques ajustées. Cette sonde comporte sept fibres d'excitation et une fibre de détection. Les fibres d'excitation sont clivées afin de mesurer le spectre émis par la même surface de tissu que celle excitée. Le spectre de fluorescence émis par le tissu sondé est collecté par cette même sonde avant d'être transmis au spectromètre. Pour commander le système, nous avons développé une interface Labview® avec programmation parallèle, afin de synchroniser le début de l'acquisition par le spectromètre avec la commutation des DELs, en intégrant un délai pour le temps de réaction des DELs. Les fonctions de transfert en émission et réception ont été acquises et nous notons la présence d'artefacts sur les spectres mesurés, avec à la fois la présence d'un pic spectral indésirable vers 693 nm et des oscillations induites par le filtre passe-bas utilisé. La caractérisation de ce système ayant été faite sans échantillon, le Chapitre 3 présente la caractérisation du système sur fantômes de PpIX.

Chapitre 3

Etude sur fantômes et développement du modèle d'ajustement des spectres

Après avoir présenté la conception du système interventionnel de spectroscopie de fluorescence dans le Chapitre 2, nous présentons dans ce chapitre la caractérisation et l'utilisation de ce système sur des fantômes optiques de PpIX. Pour rappel, ce système irradie l'échantillon à trois longueurs d'onde adaptées aux deux états de PpIX recherchés et collecte le spectre de fluorescence émis. Cette étude sur fantôme permet d'une part d'effectuer des mesures optiques sur des échantillons de composition connue, et ainsi de caractériser le système sur des mesures de PpIX. D'autre part, cette étude permet de proposer des fantômes optiques de PpIX mimant les propriétés des tissus cérébraux qui sont complémentaires d'une série de fantômes déjà proposés (Marois et al., 2016). Enfin, cette étude permet de développer le modèle de traitement paramétrique que nous appliquerons ensuite sur les mesures effectuées sur tissus lors de l'étude clinique (présentée dans le Chapitre 5).

Dans ce chapitre, nous commencerons par présenter le système de mesure sur fantômes, légèrement différent de celui présenté dans le chapitre précédent. Nous présenterons ensuite l'obtention de spectres d'émission de référence de chaque état, nécessaire pour l'exploitation des résultats. Par la suite, nous présenterons la réalisation de fantômes optiques de concentration fixée en PpIX pour lesquels nous étudierons l'influence du pH, d'un tensio-actif (Tween 20), de macromolécules (Intralipides) et du sang (sang bovin) sur le spectre de fluorescence. Nous présenterons alors l'établissement du modèle d'ajustement pour analyser les spectres collectés. Enfin, nous présenterons des simulations afin de valider le modèle de traitement proposé.

3.1 - Système de mesure sur fantômes

Cette étude sur fantômes ayant été menée en parallèle de l'étude clinique, la sonde n'était pas utilisable car conservée stérile au bloc opératoire. Le système de mesure utilisé est donc composé des blocs 1 et 2 du système de mesure présenté dans le Chapitre 2 mais le bloc 3 (la sonde) est remplacé par un filtre passe-bas et deux fibres de 550 μm de diamètre, l'une pour l'excitation et l'autre pour la détection du signal lumineux (voir Figure 3-1). La puissance lumineuse qui arrive sur la solution est de 110 μW , 30 μW et 80 μW respectivement aux DEL385, DEL405, DEL420, ce qui donne un éclairement de 450 W/m^2 , 130 W/m^2 et 330 W/m^2 respectivement aux trois DELs. Les terminaisons des fibres sont

distantes de 2 mm et forment entre elles un angle de 30 degrés. Cet assemblage donne un chemin optique moyen de 4 mm. Les fibres sont directement immergées dans les solutions étudiées. Une agitation faible mais continue permet d'homogénéiser les solutions et de limiter le risque de photoblanchiment. Puisque les deux états sont sensibles au pH de la solution (Hope and Higham, 2016; Melø and Reisaeter, 1986), nous utilisons tout au long de l'étude un pH-mètre (boîtier HI 9125 ; sonde HI 2230, *Hanna Instruments*) pour relever sa valeur.

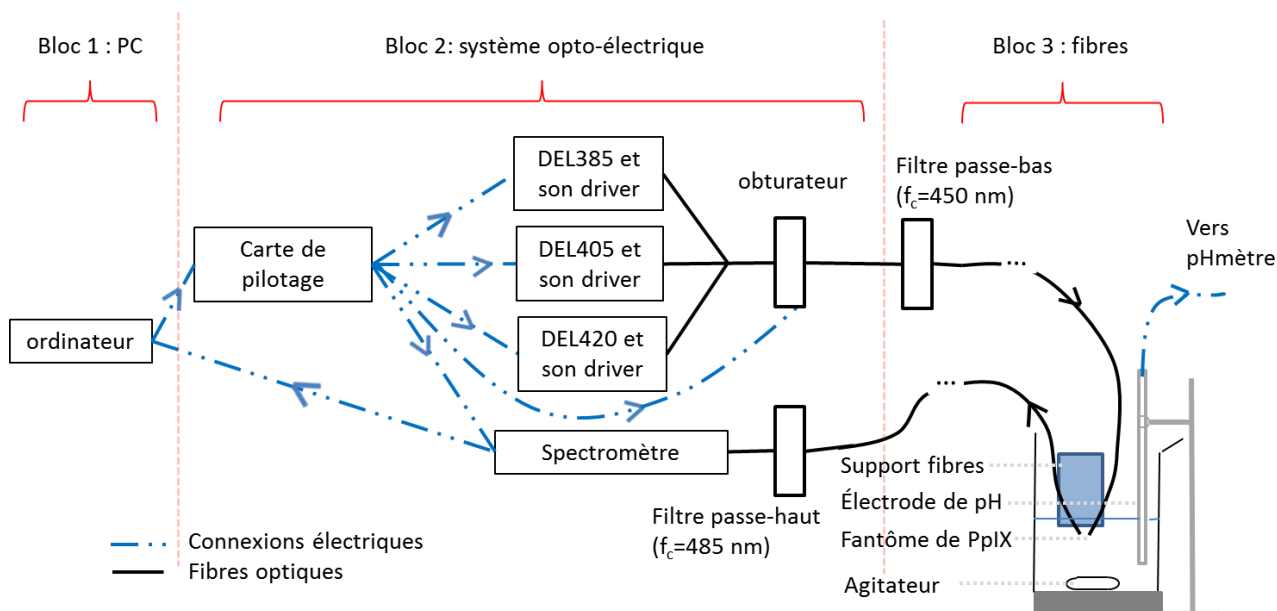


Figure 3-1 : Schéma du montage expérimental des mesures sur fantômes.

3.2 - Obtention des spectres d'émission de référence pour chaque état

L'obtention des spectres d'émission de référence de chaque état est primordiale pour l'exploitation de nos données à l'aide d'un modèle d'ajustement selon l'équation (1.1). Afin d'obtenir ces spectres, nous proposons deux solutions dont la concentration en PpIX est proche de celle *in vivo* (Johansson et al., 2010; Valdés et al., 2011c). Nous établissons cette concentration autour de 10^{-5} mol/L et dissolvons donc 6 mg de PpIX solide (*sigma aldrich*) dans 10 mL de DMSO puis nous diluons 1 mL de cette solution mère dans 99 mL de PBS. Ce protocole permet d'obtenir des solutions S1 à pH neutre et à la concentration désirée. Il est aussi possible de dissoudre la PpIX dans l'éthanol et de diluer le tout dans de l'eau (Melø and Reisaeter, 1986; Montcel et al., 2013). Toutefois, une étude proposant d'uniformiser les fantômes de PpIX dissout la PpIX dans du DMSO et la dilue dans du PBS (Marois et al., 2016). Dans notre étude, nous dissolvons donc la PpIX dans du DMSO avec dilution dans du PBS pour pouvoir ensuite comparer nos résultats à la standardisation proposée par l'équipe de Marois.

L'émission de fluorescence induite uniquement par l'état 620 se fait par ajout de NaOH à cette solution S1, afin d'obtenir un pH basique, comme proposé par Melo (Melø and Reisaeter, 1986). La Figure 3-2 présente les spectres émis par des fantômes avec différents pH

basiques, sous excitation à 405 nm. Les spectres rouges ont un pH autour de 9, les spectres orange ont un pH autour de 11 et les spectres marrons ont un pH autour de 12.

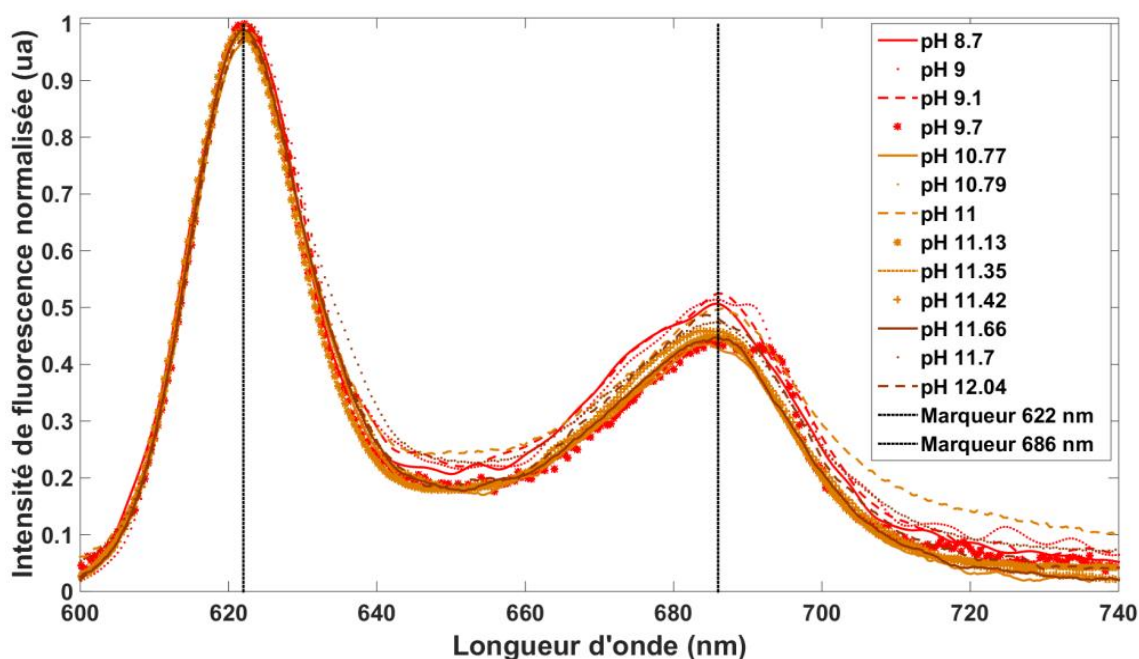


Figure 3-2: Spectres de fluorescence émis par 13 fantômes de PpIX en milieu basique, sous excitation à 405 nm et présentant un maximum vers 622 nm et une seconde bosse vers 686 nm (marqueurs noirs).

Nous observons sur cette Figure 3-2 un maximum d'émission de fluorescence à 622 nm et une seconde bosse autour de 686 nm pour tous les spectres. Ces longueurs d'onde sont indiquées par les deux lignes verticales noires pointillées. Nous observons une légère variation des premiers centres (0.5 nm) en fonction du fantôme mais cette variation est inférieure à la résolution du spectromètre. La largeur à mi-hauteur associée à ce pic semble varier d'un fantôme à l'autre (entre 18.5 nm et 21 nm), avec par ailleurs une dissymétrie (8.4 nm à gauche et jusqu'à 11.9 nm à droite). Ces variations sont de l'ordre de grandeur de la résolution de spectromètre. Néanmoins cette dissymétrie apparaît vers 634 nm (bien visible sur la courbe au pH 11.7) et soulève la problématique d'isoler l'état 620. Enfin, nous observons une variation d'allure des spectres à partir de 645 nm.

L'émission de fluorescence induite uniquement par l'état 634 se fait par ajout d'Intralipides (IL), de tensioactifs (T20) ou de sang dans des concentrations supérieures à 0.5 g/L pour les IL, 5 g/L pour le T20 et inférieures à 20 g/L pour le sang (Marois et al., 2016). La Figure 3-3 présente les spectres émis par 7 fantômes différents, sous excitation à 405 nm et avec ajout d'IL, de T20, de sang ou de mélange de plusieurs de ces éléments. Tous les spectres tracés Figure 3-2 et Figure 3-3 ont été normalisés par leur maximum, afin de mettre en évidence les variations des rapports des deux principales bosses.

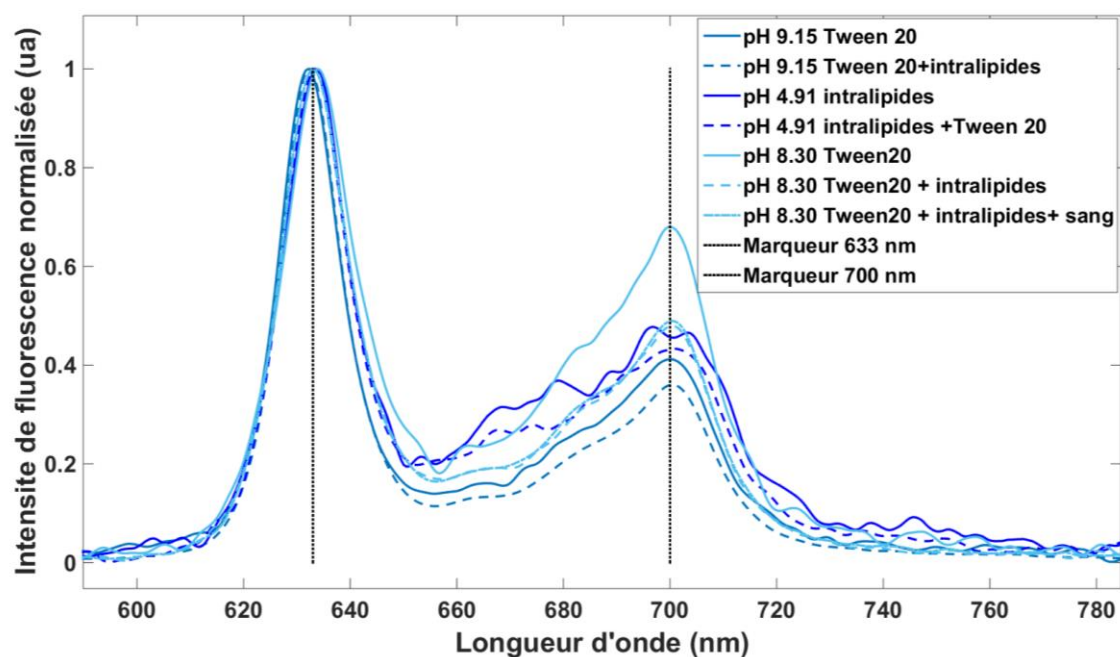


Figure 3-3: Spectres de fluorescence émis par 7 fantômes de compositions différentes, sous excitation à 405 nm et présentant un maximum vers 633 nm et une seconde bosse vers 700 nm (marqueurs noirs).

Nous observons sur la Figure 3-3 la variabilité des spectres émis par des fantômes de PpIX présentant un maximum vers 633 nm. En effet, si l'amplitude du maximum est normalisée à 1 pour tous les spectres, nous observons un léger décalage de la longueur d'onde du pic (entre 632 nm et 635 nm) suivant la composition du fantôme. Nous observons par ailleurs que l'amplitude de la seconde bosse (vers 700 nm) diffère suivant le microenvironnement. Enfin, nous observons sur les mesures à pH 4,9 (courbes en bleu roi) la présence d'une bosse dans la bande 660-680 nm, qui est probablement due à l'apparition de photoproduits (Bagdonas et al., 2000; Montcel et al., 2013). Ces observations sont très importantes pour la suite puisqu'elles vont participer au choix de réduire la bande spectrale d'ajustement des données de 600-800 nm à 608-637 nm. Ceci sera détaillé dans la partie 3.4.2 -.

Le modèle d'ajustement proposé dans cette thèse considère une combinaison linéaire de ces deux états. Nous avons choisi de conserver une seule référence par état pour ce modèle. Les fantômes émettant ces références seront qualifiés d'« optimaux » par la suite. Nous conservons le spectre obtenu dans une solution à pH 9,7 pour l'état 620 et le spectre obtenu dans une solution avec un pH de 8.3, une concentration de 110 g/L en Tween 20, de 200 mg/L en Intralipides et 15g/L en sang pour l'état 634. La composition du fantôme optimal pour l'état 620 est en accord avec l'étude de Melo (Melø and Reisaeter, 1986) et celle pour l'état 634 correspond à l'un des fantômes optimaux proposés par Marois (soit 1% en fraction volumique de T20, IL et sang), (Marois et al., 2016). Puisque ces spectres semblent très sensibles au microenvironnement, nous choisissons par ailleurs de conserver, pour chaque état, un spectre de référence par source d'excitation. La Figure 3-4 présente les spectres émis par les fantômes optimaux pour chacun des deux états, sous excitation aux 3 longueurs

d'onde. Nous y observons de légères variations de longueur d'onde centrale, d'amplitude et de largeur à mi-hauteur en changeant de source d'excitation. Ces variations sont plus marquées pour l'état 620. Ceci justifie le choix de garder un spectre de référence par DEL et par état mais illustre aussi la difficulté d'isoler un état dans les solutions : comme dit précédemment, nous ne pouvons garantir d'être en présence d'un seul état dans ces fantômes. En effet, l'allure du spectre émis par le fantôme optimal pour l'état 620 diffère autour de 633 nm en fonction de la source d'excitation. On peut ainsi se demander si cela ne traduirait pas la présence de l'état 634 qui serait plus ou moins excité suivant la source d'excitation.

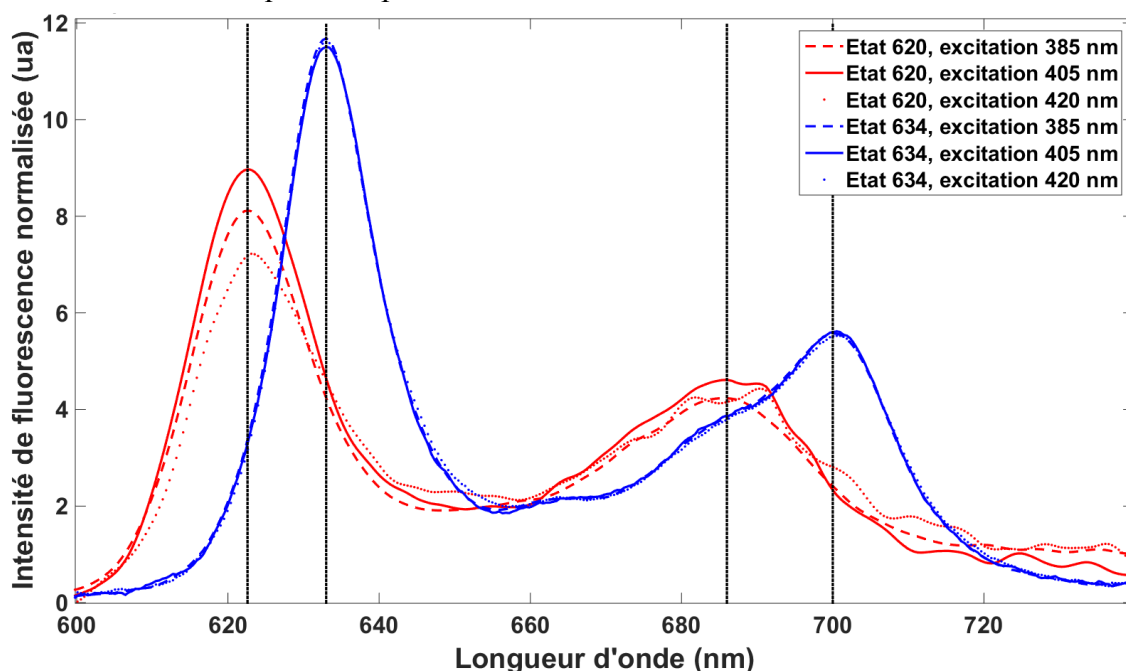


Figure 3-4 : Spectres de fluorescence de référence de l'état 620 (rouge) et de l'état 634 (bleu) sous trois excitations : 385 nm (tirets), 405 nm (traits plein) et 420 nm (pointillés). En noir, marqueurs des maxima 622.5 nm ; 633 nm ; 686 nm ; 700 nm.

3.3 - Protocole de mesure sur fantômes présentant les deux états de fluorescence

Dans la partie précédente, nous avons étudié la variabilité du spectre d'émission de chaque état isolé afin d'obtenir un spectre de référence par DEL et par état, utile par la suite dans notre modèle d'ajustement. Dans cette partie, nous préparons des fantômes de PpIX avec différentes contributions des deux états mélangés, en utilisant des composants mimant les propriétés des tissus. Nous nous inspirons des fantômes optimaux proposés par Marois (Marois et al., 2016) mais, puisque ces fantômes optimaux négligent la présence de l'état 620, nous ne travaillons pas dans le même intervalle de concentration en chacun des items, afin de faire apparaître la présence des deux états. Nous étudions donc dans cette partie l'impact de faibles variations en concentration d'un tensioactif (Tween 20, *sigma aldrich*), d'Intralipides (*Frenesisus kabi*), de sang bovin (obtenu chez le boucher) et l'impact d'une variation de pH sur le spectre émis par des fantômes de PpIX. Ceci permet par ailleurs de développer notre modèle d'ajustement sur fantômes, avant de l'appliquer aux spectres mesurés dans l'étude

clinique. Notons ici que nous ne cherchons pas à modéliser les tissus mais bien à proposer des fantômes mimant leurs différentes propriétés de fluorescence.

La préparation de ces fantômes se fait comme dans la partie 3.2 -, dans le but d'obtenir des solutions S1 de 80 ml. Une fois la solution S1 obtenue, l'ajout de NaOH permet d'obtenir un pH autour de 9.5 et donc de faire apparaître l'état 620 (Melø and Reisaeter, 1986). Une mesure de spectres de fluorescence est alors effectuée pour cette solution, afin d'obtenir la contribution initiale de l'état 620 qui servira de référence. Le protocole de mesure proposé est volontairement proche de celui mis en place dans l'étude *in vivo* puisque le but de cette étude sur fantômes est de mimer les variations de fluorescence mesurées dans les spectres émis par les tissus cérébraux. Toutefois, n'ayant pas de contraintes d'irradiations, le nombre d'acquisitions et la durée d'une acquisition sont augmentés par rapport aux paramètres choisis *in vivo*. Ce protocole *in vitro* consiste en l'acquisition de 20 couples de spectres par DEL, un couple de spectres comprenant l'acquisition d'un spectre émis par le fantôme sous excitation avec la DEL allumée, immédiatement suivi de l'acquisition d'un spectre sans excitation (DEL éteinte). Ceci permet ensuite de retirer le bruit de fond lumineux (« background ») par soustraction des deux spectres acquis. Nous choisissons un temps d'acquisition de 500 millisecondes par spectre. Cette durée d'acquisition est légèrement plus longue que celle mise en place *in vivo* puisqu'il n'y a pas de contraintes d'irradiation mais reste limitée par le risque de création de photoproduits. En effet, nous mesurons des photoproduits dans certaines solutions irradiées trop longtemps, même avec une agitation continue des solutions, comme l'illustre par exemple la courbe pH 4,91 + Intralipides de la Figure 3-3, avec un temps d'acquisition de 2 secondes. Ainsi, nous limitons la durée d'illumination à 500 ms. Avec deux fois 20 spectres de 0.5 seconde par DEL, cela donne une durée de 1 minute par point de mesure.

Après chaque mesure, la concentration en l'item étudié est augmentée. Le pas de variation en concentration est de 70 µg/L pour le Tween 20, 7 µg/L pour les Intralipides, 100 mg/L pour le sang. Nous étudions aussi l'impact du pH en ajoutant de l'acide chlorhydrique ou de la soude. Les variations de pH sont d'environ 0.5 dans un intervalle entre 5 et 11. Pour toutes ces expériences, les variations de volume induites par l'ajout goutte à goutte de l'item étudié sont négligées devant le volume de la solution, puisque ces variations sont inférieures à 0,5 ml au total, pour des solutions S1 de 80 ml initialement. Ce protocole de mesure est réitéré soit jusqu'à stabilisation du spectre collecté, soit jusqu'à une trop forte dégradation du signal collecté.

3.4 - Développement du modèle d'ajustement des spectres mesurés sur fantômes optiques

Le modèle de traitement s'inspire du modèle utilisé dans l'étude préliminaire de 2013 et se base donc sur un ajustement par combinaison linéaire de spectres de références selon

l'équation (1.1). Cette étude sur fantôme nous a permis d'optimiser ce modèle et c'est ce que nous présentons dans cette partie.

3.4.1 - Traitement préliminaire : obtention des spectres bruts

Les données acquises sont séparées en trois matrices, une par source d'excitation. Ceci permet d'obtenir trois matrices 40 x 2068. Le background lumineux est ensuite retiré en soustrayant du spectre acquis avec la DEL allumée le spectre suivant acquis avec la DEL éteinte. Au final, ceci donne 3 matrices de 20 spectres par DEL. Ensuite, ces spectres sont sommés afin d'obtenir un spectre par condition de mesure et par DEL. Afin de prendre en compte la résolution du spectromètre, les spectres sont filtrés par une fonction sinus cardinal au carré de 4 nm de largeur à mi-hauteur, modélisant la diffraction induite par le réseau du spectromètre, comme proposé par la documentation technique de ce dernier.

3.4.2 - Développement du modèle d'ajustement

L'analyse que nous proposons est un ajustement de ces spectres selon la théorie présentée dans le Chapitre 1 par l'équation (1.1), dont nous allons empiriquement ajuster la bande spectrale d'étude, ce qui contraindra l'inclusion des différents fluorophores. Dans cette étude sur fantômes, nous commençons par travailler sur la bande spectrale 600-800 nm et considérons donc 3 fluorophores : les deux états de la PpIX ainsi que ses photoproduits.

3.4.2.1 - Choix de la bande spectrale d'étude

Le premier modèle d'ajustement que nous proposons pour l'étude sur fantôme s'inspire de notre étude de 2013 (Montcel et al., 2013) et suppose donc que le spectre mesuré est une combinaison linéaire des spectres de référence des deux états de la PpIX acquis *in vitro* ainsi que du spectre des photoproduits de la PpIX (aussi acquis *in vitro*) sur la bande spectrale 600-800nm. Nous avons d'abord choisi de travailler sur la bande spectrale caractéristique de la PpIX, c'est-à-dire entre 600 nm et 800 nm, comme les autres équipes travaillant sur la fluorescence de la PpIX (Haidar et al., 2015; Valdés et al., 2014b). Cependant, la variabilité des spectres émis par la PpIX après 650 nm et présentée partie 3.2 - nous a mené à exclure ce modèle, aucun spectre de référence ne pouvant traduire cette variabilité.

Afin de prendre en compte la variabilité de la deuxième bosse des spectres des deux états, nous avons alors choisi de modéliser les spectres de la PpIX par des gaussiennes dont les paramètres seraient variables, comme effectué par Haidar par exemple (Haidar et al., 2015; Leh, 2011). La détermination du nombre de gaussiennes nécessaires et de leurs propriétés a été faite sur les spectres de référence présentés sur les Figure 3-2 et Figure 3-3. D'après ces figures, quatre centres de fluorescence apparaissent pour chaque état entre 600 nm et 800 nm. Toutefois, l'ajustement des spectres de référence avec 4 gaussiennes renvoie des gaussiennes centrées respectivement à 620 nm, 647 nm, 657 nm et 683 nm pour l'état 620 et centrées à 633 nm, 681 nm, 684 nm et 699 nm pour l'état 634. Nous constatons ici un chevauchement de la 4^{ième} gaussienne de l'état 620 avec les 2^{ième} et 3^{ième} gaussiennes de l'état 634, ce qui a conduit à l'exclusion de ce modèle.

La superposition des spectres des deux états entre 670 nm et 700 nm, leur variabilité dans la bande spectrale 640-700 nm, la variabilité du spectre émis par les photoproduits dans cette même bande (Bagdonas et al., 2000), cumulé à la présence du bruit expérimental à 693 nm lors des mesures avec la sonde (bruit introduit dans le Chapitre 2) nous ont poussés à restreindre l'intervalle spectral d'étude. Nous avons alors choisi d'ajuster nos données uniquement sur la bande spectrale 608 – 637 nm, ce qui nous différencie de tous les ajustements effectués aujourd'hui dans la littérature (Haidar et al., 2015; Leh, 2011; Valdés et al., 2014b). Cet intervalle a été déterminé empiriquement sur les fantômes dont les spectres de fluorescence présentent une contribution de chaque état. La variabilité du spectre émis par l'état 634 après 638 nm (cf. Figure 3-3) nous a conduit à couper l'intervalle d'étude dès 637 nm. Nous avons par ailleurs choisi d'établir la borne inférieure de l'ajustement à 608 nm afin de nous affranchir, *in vivo*, de la contribution des lipopigments (centrés à 580 +/- 5 nm, de largeur à mi-hauteur de 25 nm (Leh, 2011) et ainsi d'avoir un intervalle à peu près symétrique autour des maxima des spectres des deux états.

3.4.2.2 - Etablissement du modèle sur la bande spectrale 608-637 nm

Sur cette nouvelle bande spectrale, et afin de laisser plus de degrés de liberté au modèle d'ajustement que la seule amplitude des spectres de référence mesurés sur fantômes, nous avons proposé un modèle d'ajustement modélisant chaque état par une gaussienne. Les paramètres de chaque gaussienne modèle (centre, amplitude et largeur à mi-hauteur) sont obtenus à partir des spectres de référence présentés sur les Figure 3-2 et Figure 3-3. Ces paramètres sont alors implémentés dans l'ajustement, imposant une valeur et ses bornes associées pour chaque paramètre de la gaussienne. Nous définissons ainsi une gaussienne centrée à 623.4 +/- 0.8 nm et de largeur à mi-hauteur 27 nm +/- 4 nm pour l'état 620, et une gaussienne centrée à 633.6 +/- 1 nm, de largeur à mi-hauteur 20 nm +/- 2 nm pour l'état 634. Par ailleurs, différentes équipes proposent de modéliser la fluorescence des porphyrines à l'aide de gaussiennes dont la largeur à mi-hauteur est moins contrainte. Par exemple, les travaux de Leh (Leh, 2011) proposent une largeur maximale de 25 nm. Nous étudierons donc aussi l'ajustement de nos données avec des gaussiennes dont la largeur à mi-hauteur n'est pas contrainte. La Figure 3-5 illustre les résultats de ces différents ajustements pour un fantôme de PpIX avec 50 µg/L d'Intralipides. Les mesures expérimentales sont en pointillés bleus. Sur les graphes A-C, la référence de l'état 620 est en tirets rouges et la référence de l'état 634 est en trait bleu. L'ajustement total est en noir. Nous observons sur la Figure 3-5A l'ajustement obtenu avec les spectres de référence acquis *in vitro*, sur la Figure 3-5B l'ajustement obtenu avec les gaussiennes modélisées à partir des références acquises *in vitro* et enfin sur la Figure 3-5C l'ajustement obtenu avec des gaussiennes dont seul le centre est contraint (ce qui renvoie les mêmes résultats que les contraintes proposées par (Leh, 2011)). Enfin, la Figure 3-5D propose la superposition de ces différents ajustements. Les traits noirs pointillés à 608 nm et 637 nm délimitent la zone d'ajustement.

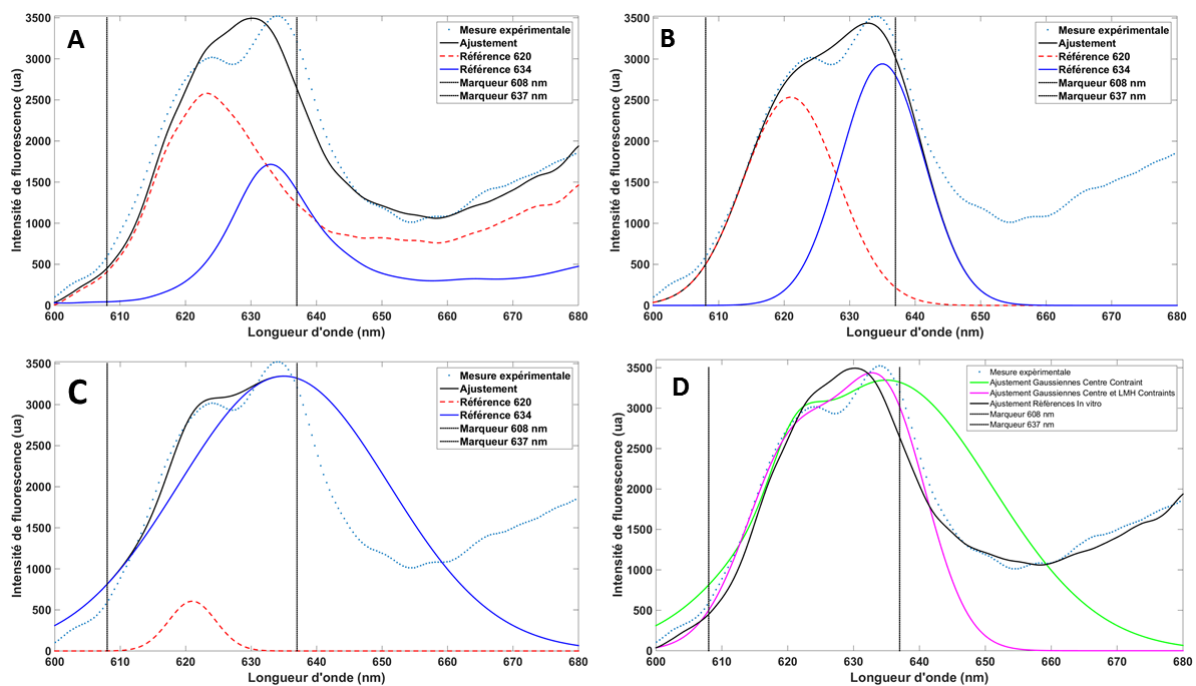


Figure 3-5 : Comparaison de 3 modèles d'ajustement d'un spectre de fluorescence émis par un fantôme avec 50 µg/L d'Intralipides. (A) Ajustement par les spectres de référence acquis *in vitro*, présentés Figure 3-4. (B) Ajustement par des spectres modélisés par des gaussiennes dont les paramètres sont obtenus à partir des spectres de référence acquis *in vitro*. (C) Ajustement par des gaussiennes dont seul le centre est contraint. (D) Superposition de ces ajustements pour comparaison : mesures expérimentales (pointillés bleus), ajustement A (noir), ajustement B (magenta), ajustement C (vert).

Nous observons sur cette Figure 3-5 la difficulté de trouver un modèle qui traduise toutes les subtilités du spectre collecté, notamment de suivre la double bosse entre 620 nm et 640 nm. La Figure 3-5D montre que c'est l'ajustement avec des gaussiennes dont seul le centre est contraint qui suit le mieux cet épaulement (courbe verte) mais les références associées aux deux états sont trop éloignées de la réalité physique, comme le montre le graphe C. Nous observons ainsi la difficulté de bien choisir les bornes des paramètres des gaussiennes. Si l'on exclut cet ajustement trop loin de la réalité physique, la comparaison d'un ajustement avec modèle gaussien ou avec spectres de référence sur différents fantômes a montré que l'apport des gaussiennes permettait de diminuer légèrement les résidus mais cet ajustement renvoie alors 6 paramètres (2 centres, 2 amplitudes et 2 largeurs à mi-hauteur) alors que l'ajustement avec des spectres de référence fixés ne renvoie que 2 paramètres. Pour des raisons d'interprétation des résultats, nous choisissons donc de rester avec des spectres de référence acquis *in vitro* qui minimisent le nombre de paramètres renvoyés sans trop augmenter les résidus.

Enfin, la Figure 3-6 présente ces mêmes ajustements sur la bande spectrale 600-650 nm. Si le modèle avec gaussiennes de largeur à mi-hauteur libre (courbe verte) est meilleur que sur la Figure 3-5D, nous observons ici qu'aucun des modèles gaussiens ne traduit la double bosse (courbes verte et magenta). En comparaison avec la Figure 3-5, ceci confirme qu'un

ajustement sur une bande spectrale plus restreinte traduit mieux les subtilités d'intérêt du spectre mesuré.

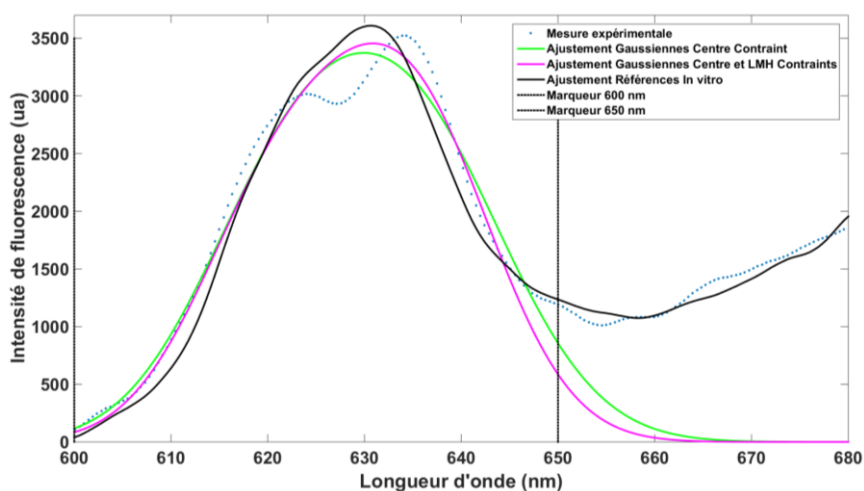


Figure 3-6 : Comparaison des différents modèles d'ajustement sur la bande spectrale 600-650 nm. Mesures expérimentales (pointillés bleus) et ajustements avec les références acquises *in vitro* (en noir) ; modélisées par un gaussienne dont le centre et la largeur à mi-hauteur sont contraints (en magenta) ; modélisées par une gaussienne dont seul le centre est contraint (en vert).

3.4.3 - Modèle retenu

Le modèle retenu pour l'ajustement des spectres est donc une combinaison linéaire des spectres de référence émis par les deux états de la PpIX, acquis sur des fantômes et présentés sur la Figure 3-4, sur la zone 608 - 637 nm. Sur cette bande spectrale, il ne reste plus que deux fluorophores d'intérêt qui sont les deux états de la PpIX. L'équation (1.1) devient alors l'équation (3.1)

$$S(\lambda) = \alpha_{620}S_{620}(\lambda) + \alpha_{634}S_{634}(\lambda) \quad (3.1)$$

où $S(\lambda)$ est le spectre de fluorescence de la PpIX collecté sur fantôme, $S_i(\lambda)$ est le spectre de référence d'un des fluorophores considérés et α_i sa contribution à la fluorescence mesurée, i étant 620, 634 ou *photoproduits*.

3.5 - Résultats et discussion : contribution des deux états à la fluorescence émise

Le modèle d'ajustement étant établi, nous présentons maintenant les résultats de l'analyse des spectres émis par les différents fantômes. Nous présentons tout d'abord l'intérêt d'utiliser plusieurs sources d'excitation, avant de ne travailler qu'avec la DEL405 pour comparer nos résultats au reste des données de la littérature. Nous montrerons alors l'allure des spectres émis par les différents fantômes puis les résultats de l'ajustement proposé selon l'équation (3.1), qui renvoie la contribution de chaque état dans ces différents fantômes, sous excitation à 405 nm.

3.5.1 - Variation des contributions suivant la source d'excitation

Nous présentons dans cette partie la variation du spectre émis par une solution fixe, suivant les trois sources d'excitation. La solution de travail a une concentration de 1.5×10^{-5} mol/L en PpIX et 50 $\mu\text{g/L}$ en Intralipides. La Figure 3-7 présente le spectre émis et l'ajustement associé, suivant la source d'excitation : A) excitation 385 nm, B) excitation 405 nm, C) excitation 420 nm. En pointillés sont les mesures expérimentales, en noir l'ajustement, en tirets rouge le spectre de référence de l'état 620 et en trait bleu le spectre de référence de l'état 634.

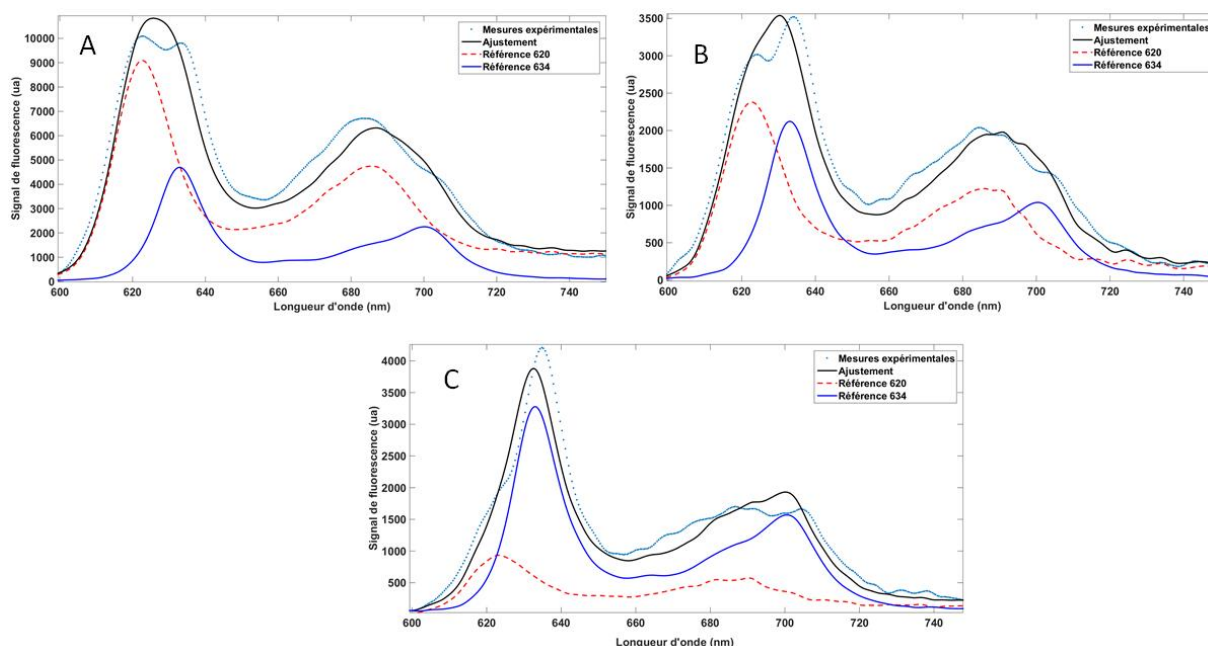


Figure 3-7 : Comparaison de l'ajustement du spectre de fluorescence émis par un fantôme de 50 $\mu\text{g/L}$ en Intralipides en fonction de la longueur d'onde d'excitation (A) 385 nm (B) 405 nm et (C) 420 nm. Les mesures expérimentales sont représentées par les points bleus, la courbe rouge pointillée représente le spectre de référence de l'état 620 et la courbe bleue continue celui de l'état 634. La courbe noire est le résultat de l'ajustement.

Nous observons sur cette Figure 3-7 une variation des contributions des deux états, alors que le fantôme est inchangé : on passe d'une dominance de l'état 620 sous excitation à 385 nm (figure A) à une dominance de l'état 634 sous excitation à 420 nm (figure C). Ceci traduit les différentes propriétés d'absorption des deux états suivant la longueur d'onde d'excitation et se retrouve dans le paramètre renvoyé par l'ajustement. En effet, la contribution de l'état 620 diminue alors que la longueur d'onde d'excitation augmente, ce qui est conforme à son spectre d'absorption présenté sur la Figure 1-20. A l'inverse la contribution relative de l'état 634 (par rapport à la quantité totale de fluorescence) augmente avec l'augmentation de la longueur d'onde d'excitation. Si la contribution absolue de l'état 634 est la plus faible sous excitation à 405 nm, ceci est influencé par la puissance en sortie de DEL. Ainsi, en divisant chaque contribution par la puissance incidente (qui est comprise dans la valeur du paramètre issu de l'ajustement), on obtient pour les deux états une contribution qui varie dans le même

sens que leurs spectres d'absorption et on retrouve donc bien pour l'état 634 une contribution plus élevée sous excitation à 405 nm.

Le Tableau 3-1 recense la contribution de chaque état sous les différentes excitations, sans et avec normalisation par la puissance lumineuse incidente. On y retrouve les propriétés attendues des deux états, comme l'illustrent les cellules rouges (contribution maximale sous excitation à 405 nm pour l'état 634 et sous excitation à 385 nm pour l'état 620).

DEL	Puissance lumineuse (μW)	Contribution de l'état 620 (α_{620})	Contribution de l'état 634 (α_{634})	Contribution normalisée de l'état 620 ($\alpha_{620}/P_{\text{DEL}}$)	Contribution normalisée de l'état 634 ($\alpha_{634}/P_{\text{DEL}}$)
385	112	$3,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$3,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
405	30	$1,0 \times 10^5$	$5,9 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
420	78	$4,1 \times 10^4$	$9,0 \times 10^4$	$0,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$

Tableau 3-1 : Contribution de chaque état à la fluorescence émise par un fantôme contenant 50 $\mu\text{g/L}$ d'IL, suivant la source d'excitation, normalisée ou non par la puissance incidente. En rouge, la contribution maximale de chaque état.

Ces résultats justifient notre hypothèse d'une excitation à plusieurs longueurs d'onde. Pour la suite du chapitre, afin de comparer nos données à la littérature, nous présenterons uniquement les résultats obtenus avec la DEL405.

3.5.2 - Allure des spectres émis en fonction du microenvironnement

Nous proposons ici d'analyser l'allure des spectres émis par les fantômes présentant les deux états de fluorescence de la PpIX dans des proportions variables selon le microenvironnement. On observe par exemple sur la Figure 3-8 trois allures de spectres différents émis par un fantôme de concentration fixe en PpIX mais dont la quantité d'Intralipides augmente. La courbe rouge pointillée montre le spectre émis pour un pH à 9,5 sans Intralipides. On observe un maximum du spectre à 622 nm. La courbe verte en trait plein montre la double bosse induite, selon notre hypothèse, par l'apparition de l'état 634 avec l'augmentation de la concentration en Intralipides. La courbe bleue pointillée montre enfin un spectre avec un maximum à 634 nm et un épaulement à 620 nm, que nous interprétons comme la présence principalement de l'état 634 mais aussi de l'état 620. Ainsi, l'observation des spectres émis par un fantôme composé initialement uniquement de PpIX à un pH de 9,5 duquel on augmente la concentration en IL montre qu'on passe d'un spectre avec un pic à 622 nm à un spectre présentant un pic à 634 nm en passant par une multitude de spectres avec des épaulements (pour des raisons de lisibilité nous n'en présentons qu'un sur la Figure 3-8 mais tous sont visibles sur la Figure 3-9). Sur cette Figure 3-8, on peut aussi observer le décalage de la deuxième bosse de PpIX, dont le maximum est vers 680 nm sur la courbe rouge (sans IL), un épaulement apparaît sur la courbe verte et le maximum à 700 nm apparaît sur la courbe bleue. Comme expliqué dans la partie 3.4.3 - , cette zone spectrale est difficilement

exploitable et est donc exclue du modèle d'ajustement retenu mais ce décalage de la deuxième bosse est cohérent avec l'hypothèse d'un changement d'état avec le microenvironnement.

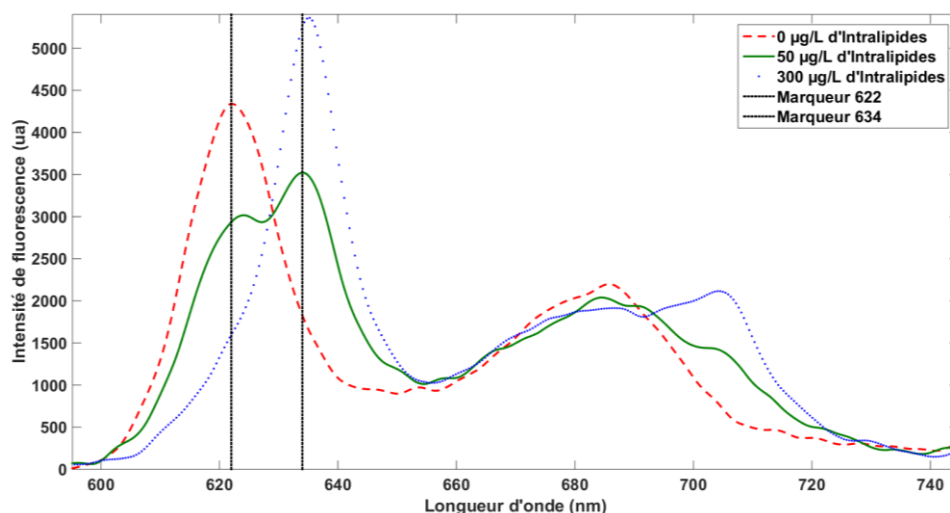


Figure 3-8 : Variation du spectre émis par un fantôme de PpIX avec augmentation de la concentration en Intralipides. En rouge (tirets), le spectre émis sans Intralipides. En vert (trait plein), le spectre émis avec 50 µg/L d'Intralipides. En bleu (pointillés), le spectre émis avec 300 µg/L d'Intralipides. En noir, les marqueurs des longueurs d'onde 622 nm et 634 nm.

3.5.3 - Contribution de chaque état de fluorescence en fonction du microenvironnement

Dans cette partie, nous étudions la contribution de chaque état sous excitation à 405 nm pour différents fantômes, selon le modèle d'ajustement présenté dans la partie 3.4.3 -. Dans cette étude, l'ajustement est effectué sur le spectre moyen des 20 acquisitions mais aussi sur chacun des spectres acquis afin d'étudier l'écart-type des mesures. Les Figure 3-9, Figure 3-10, Figure 3-11 et Figure 3-12 présentent la contribution de chaque état à la fluorescence totale émise par quatre fantômes en fonction de leur concentration en Intralipides (Figure 3-9), en Tween 20 (Figure 3-10), en sang (Figure 3-11) et en fonction du pH (Figure 3-12). En rouge est tracée la contribution normalisée de l'état 620 et en bleu celle de l'état 634. Pour une meilleure lisibilité, nous avons choisi de normaliser ces contributions (α_{620} et α_{634} dans l'équation (3.1)) par la contribution initiale de l'état 620. L'écart-type des contributions renvoyées par les 20 ajustements est présenté par les barres d'erreurs associées.

On observe sur la Figure 3-9 que la contribution de l'état 620 décroît avec l'augmentation de la concentration en Intralipides. A l'inverse, la contribution de l'état 634 augmente mais n'atteint pas la contribution initiale de l'état 620. Ces variations se font rapidement au début (pente raide) et ralentissent après le changement de dominance des deux états (pour une concentration du fantôme en IL autour de 70 µg/L). Ce ralentissement de l'augmentation de la contribution de l'état 634 avec l'augmentation de la concentration en IL peut s'interpréter comme le début des conditions d'application du modèle linéaire avec un seul état proposé par Marois par exemple. Cette augmentation semble en effet tendre vers une asymptote qui pourrait traduire que la quantité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la concentration en PpIX (qui est fixée).

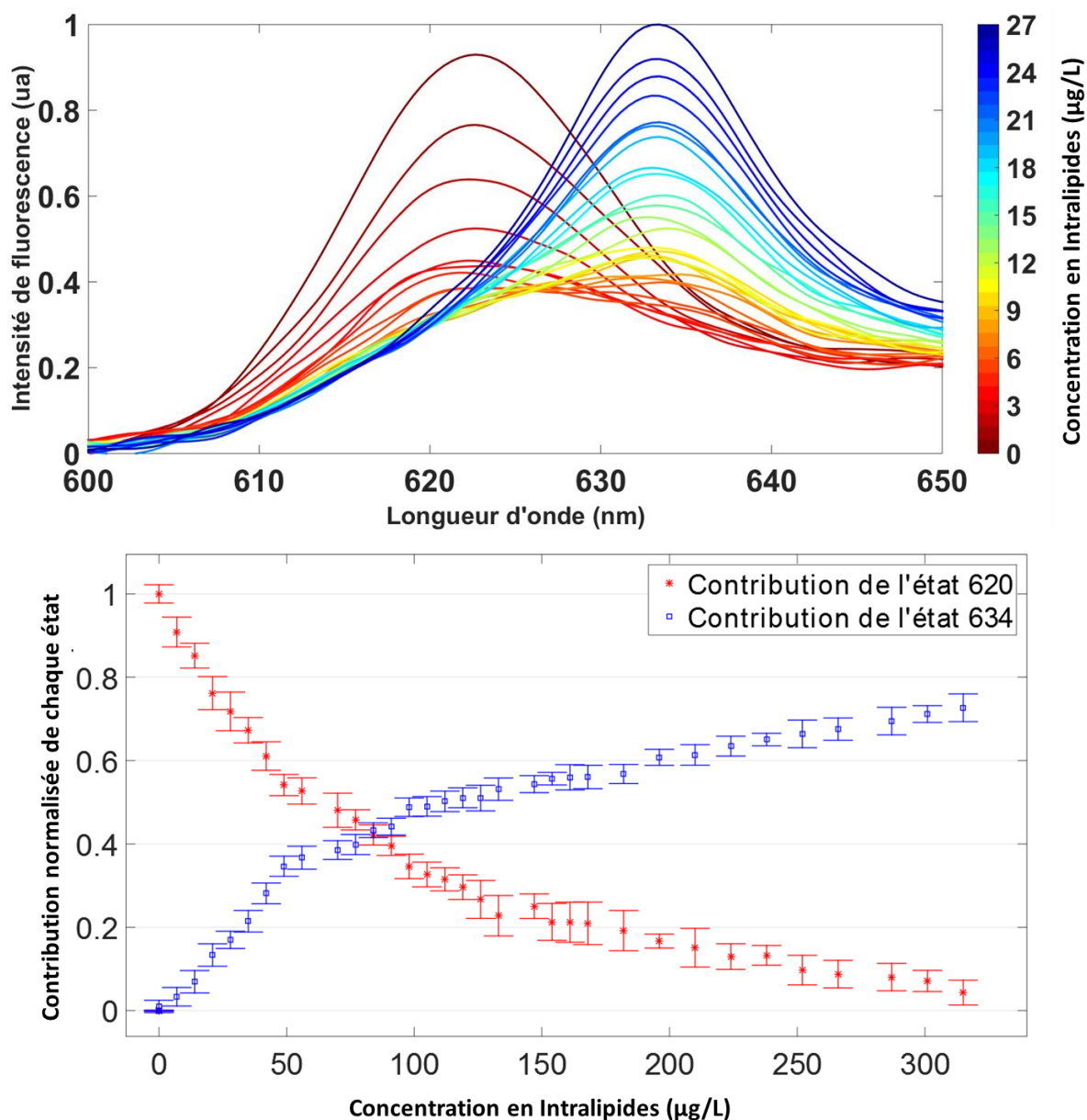


Figure 3-9 : Spectres de fluorescence (en haut) et contribution normalisée de chaque état à la fluorescence totale (en bas), pour un fantôme liquide de PpIX dont la concentration en Intralipides augmente. Sur le graphique de droite, la contribution normalisée de l'état 620 est notée en rouge et celle de l'état 634 en bleu. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des contributions des 20 spectres mesurés à chaque fois.

Une étude similaire a été effectuée en augmentant cette fois la concentration en tensioactif et dont les résultats sont présentés sur la Figure 3-10. On remarque ici la même tendance, à savoir une diminution rapide de la contribution de l'état 620 et une augmentation rapide de la contribution de l'état 634 jusqu'au changement de dominance. Après ce changement, la contribution de l'état 634 continue d'augmenter avec la même vitesse qu'avant le changement alors que la diminution de contribution de l'état 620 se fait plus lentement. Enfin, on observe que la contribution finale de l'état 634 dépasse cette fois la contribution initiale de l'état 620. L'observation d'une augmentation linéaire de la contribution de l'état 634 ne traduit pas une proportionnalité entre la fluorescence de l'état

634 et la concentration en PpIX puisque cette dernière est fixe. Cette variation linéaire pourrait être liée à l'hydrophobicité de la PpIX et donc à la formation de micelles ou d'agrégats avec l'introduction d'un tensio-actif, comme cela a déjà été discuté (Johansson et al., 2010; Marois et al., 2016; Melø and Reisaeter, 1986; Montcel et al., 2013)

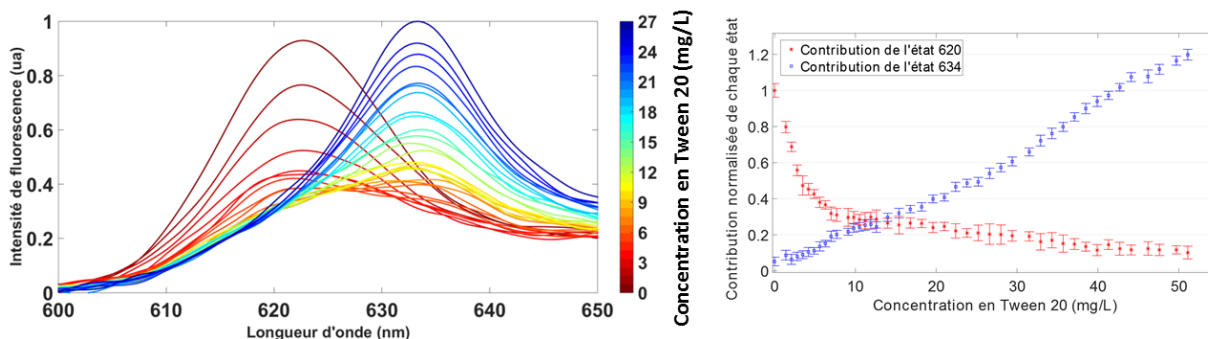


Figure 3-10 : Spectres de fluorescence (à gauche) et contribution normalisée de chaque état à la fluorescence totale (à droite), pour un fantôme liquide de PpIX dont la concentration en tensio-actif (Tween 20) augmente. Sur le graphique de droite, la contribution normalisée de l'état 620 est notée en rouge et celle de l'état 634 en bleu. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des contributions des 20 spectres mesurés à chaque fois.

Ce travail d'ajustement est aussi réalisé dans un fantôme de PpIX dont la concentration en sang bovin augmente et les résultats sont présentés sur la Figure 3-11. On observe toujours sur cette figure une diminution rapide de la contribution de l'état 620 et une augmentation légère de la contribution de l'état 634. On observe ici cependant une décroissance de la contribution de l'état 634 à partir de 2.5 mg/mL de sang, ce qui s'explique par la chute de signal observée dans ces échantillons, ne permettant plus de distinguer les deux contributions. Ceci est dû à l'absorption de la lumière par le sang.

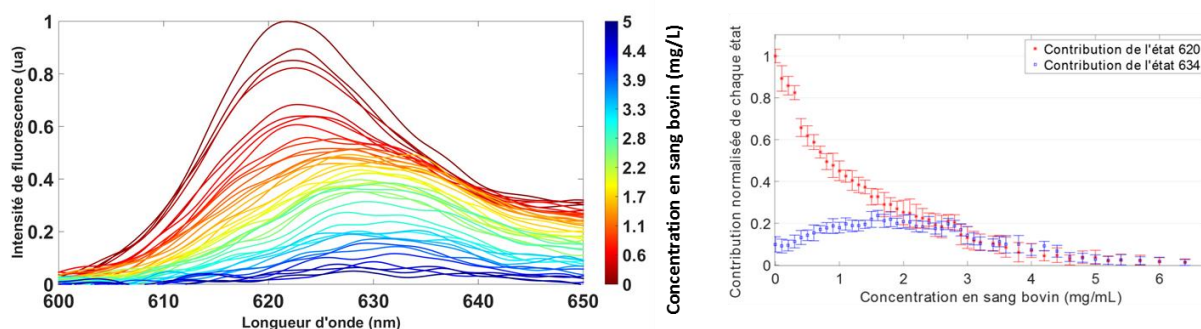


Figure 3-11 : Spectres de fluorescence (à gauche) et contribution normalisée de chaque état à la fluorescence totale (à droite), pour un fantôme liquide de PpIX dont la concentration en sang augmente. Sur le graphique de droite, la contribution normalisée de l'état 620 est notée en rouge et celle de l'état 634 en bleu. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des contributions des 20 spectres mesurés à chaque fois.

Enfin, nous avons étudié la sensibilité des deux états au pH. Les résultats sont présentés Figure 3-12. On observe que lorsque le pH décroît, la contribution de l'état 620 diminue et la contribution de l'état 634 domine mais n'arrive pas à plus de 15 % de la contribution initiale de l'état 620. Par ailleurs, comme pour les autres expériences, les mesures ont été initiées

dans une solution au pH 9. Une augmentation de pH confirme qu'un milieu basique favorise la contribution de l'état 620 puisque sa contribution moyenne dans le fantôme au pH 11 vaut environ 1,07 fois celle au pH 9 et 5 fois celle à pH 7. On remarque ici qu'un milieu acide favorise l'apparition de l'état 634 mais que sa contribution reste largement inférieure à celle initiale de l'état 620. Ceci est conforme avec les données de la littérature et c'est l'ajout de tensioactifs ou d'Intralipides qui permettra de révéler la fluorescence intense de l'état 634, comme cela a déjà été soulevé (Marois et al., 2016; Melø and Reisaeter, 1986).

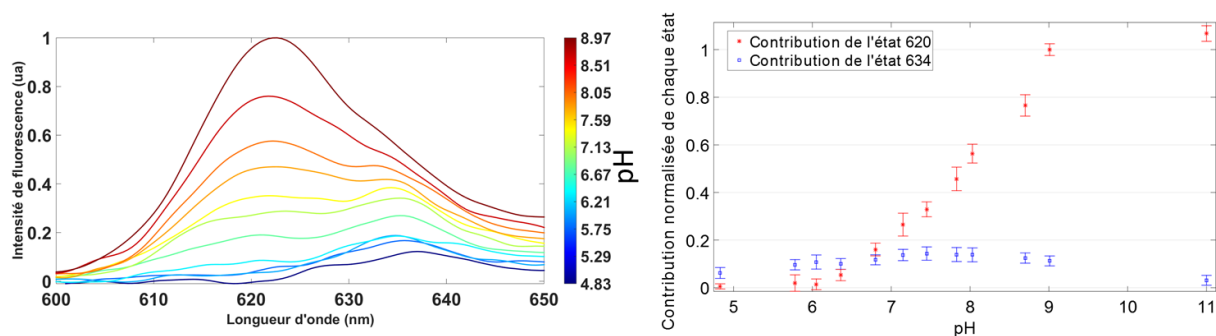


Figure 3-12 : Spectres de fluorescence (à gauche) et contribution normalisée de chaque état à la fluorescence totale (à droite), pour un fantôme liquide de PpIX dont le pH diminue. Sur le graphique de droite, la contribution normalisée de l'état 620 est notée en rouge et celle de l'état 634 en bleu. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des contributions des 20 spectres mesurés à chaque fois.

Ainsi, sur ces quatre figures, nous observons d'une part que, pour une concentration en PpIX fixée, la fluorescence émise varie (variation de l'allure des spectres) et d'autre part que ceci se traduit par une variation de contribution des deux états dans le modèle d'ajustement proposé. Nous en concluons que, dans ces fantômes, l'établissement d'un lien linéaire entre la concentration en PpIX et l'intensité de fluorescence mesurée est discutable. Ces quatre figures confirment ainsi la pertinence d'un modèle avec deux spectres de référence. En outre, l'efficacité de fluorescence de l'état 620 étant largement inférieure à celle de l'état 634 (Lozovaya et al., 1990), une faible contribution de cet état peut cependant traduire une forte concentration en PpIX et cet état ne doit donc pas être négligé, comme le prouvent ces résultats ainsi que l'étude de Melo (Melø and Reisaeter, 1986). Cette observation se retrouve par ailleurs dans l'étude de Marois (Marois et al., 2016), puisqu'ils montrent que pour une concentration en PpIX fixée, et sous certaines conditions, on a une décroissance de 98% du signal de PpIX.

Comme nous l'avons dit en début de cette partie, notre concentration en PpIX appartient à la plage de concentrations proposée par Marois et son équipe (Marois et al., 2016) dans les fantômes uniformisés qu'ils proposent. Cependant, nous cherchons à concevoir des fantômes présentant la fluorescence des deux états pour mimer les conditions observées dans les marges des gliomes de haut grade, là où la littérature souhaite concevoir des fantômes optimaux et uniformisés où la fluorescence de l'état 634 est maximisée et celle de l'état 620 est donc négligée. Les concentrations des différents composants ajoutés dans cette étude diffèrent donc de celles considérées par l'équipe de Marois, et notre proposition vient donc compléter la base

de fantômes qu'ils proposent. En effet, en travaillant entre 0 et 0,5% d'ajout de T20 en fraction volumique, l'équipe de Marois travaille à des concentrations en T20 d'environ 5 g/L, largement supérieur à nos concentrations d'étude (entre 0 et 300 µg/L). De même pour les Intralipides, ils ajoutent 1% en fraction volumique là où nous ajoutons 0,14% au maximum. Enfin pour le sang, l'équipe de Marois montre un rapport signal à bruit limite pour une fraction volumique de 2%, là où nous avons un mauvais rapport signal à bruit dès l'ajout de 2 mg/mL, soit moins de 0,1% en fraction volumique. Cela peut s'expliquer par la différence de composition du sang utilisé (nombre et propriété des hématocrites, animal de provenance...). Ainsi, notre modèle est complémentaire de celui qu'ils proposent, et montre que dans les zones où une relation linéaire entre la quantité de fluorescence mesurée et la concentration en PpIX n'est pas possible, la considération de deux états permet d'ajuster les spectres.

3.6 - Etude de la longueur d'onde centrale et comparaison avec des simulations

Enfin, l'équipe d'Ando a observé une variation de la longueur d'onde du pic principal des spectres émis par des tissus cérébraux (Ando et al., 2011). Dans cette partie, nous étudions donc la valeur de la longueur d'onde centrale des spectres émis par des fantômes dont la concentration en T20 augmente, mais aussi de spectres simulés comme une combinaison linéaire des deux spectres de référence obtenus dans la partie 3.2 -. La corrélation entre les longueurs d'onde centrales simulées et mesurées permet d'appuyer la pertinence de notre modèle par l'étude d'un autre paramètre. L'étude de la longueur d'onde centrale se fait en cherchant l'intervalle de longueurs d'onde pour lesquelles l'intensité reçue vaut 80% du maximum, autour de ce dernier. On cherche ensuite la longueur d'onde moyenne de cet intervalle.

3.6.1 - Modèle

Les spectres simulés sont des combinaisons linéaires des deux états de référence selon l'équation (3.2)

$$S(\lambda) = (1 - \gamma) \cdot S_{620}(\lambda) + \gamma S_{634}(\lambda) \quad (3.2)$$

où

$$\gamma = \alpha_{634} / (\alpha_{620} + \alpha_{634}) \quad (3.3)$$

γ est donc la contribution relative de l'état 634 donnée par l'équation (3.3) et $(1 - \gamma)$ la contribution relative de l'état 620.

Les spectres mesurés sont émis par le fantôme de PpIX dont on ajoute du T20 par pas de 70 µg/ml. Le modèle d'ajustement proposé par l'équation (3.1) permet d'obtenir la contribution de chaque état. La contribution relative de l'état 634 (γ) est ensuite calculée comme la contribution de l'état 634 renvoyée par l'ajustement, divisée par la somme des deux contributions, selon l'équation (3.3). L'écart type des mesures de longueur d'onde centrale est calculé sur les 20 spectres acquis pour chaque concentration en T20.

Ainsi, pour chaque spectre simulé ou mesuré, nous affichons la valeur de la longueur d'onde centrale mesurée en fonction de la contribution relative de l'état 634 (connue dans la simulation et calculée par ajustement dans les expériences).

3.6.2 - Résultats

La Figure 3-13 présente la comparaison de la longueur d'onde centrale du spectre simulé (courbe noire) avec celle mesurée sur fantômes (points bleus), en fonction de la contribution relative de l'état 634. On observe que les deux courbes suivent la même tendance, avec une contribution de l'état 634 quasiment nulle au début, un point d'inflexion lorsque l'état 634 contribue à 30%-40% de la fluorescence totale et enfin un plateau, où même si l'on augmente la contribution de l'état 634, la longueur d'onde centrale n'évolue presque plus.

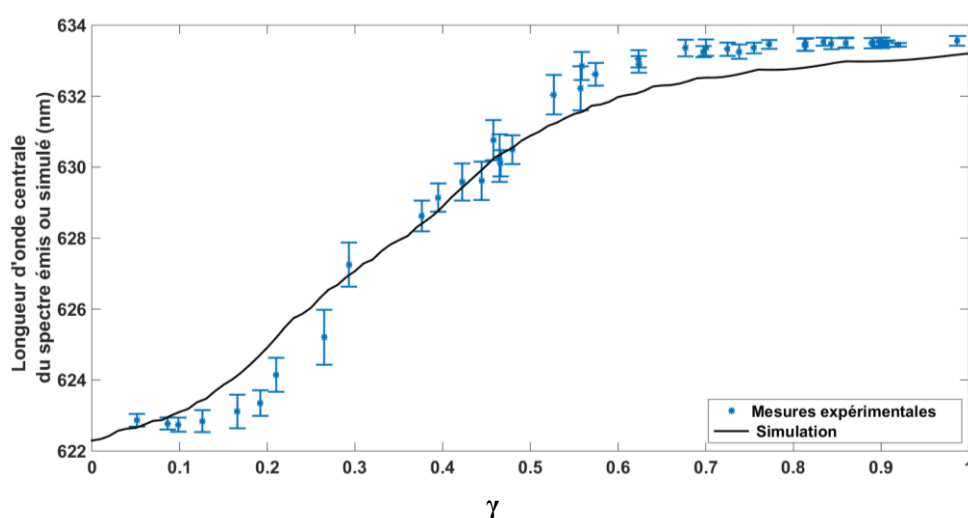


Figure 3-13 : Comparaison de la valeur de la longueur d'onde centrale expérimentale (points bleus) avec la simulation (courbe noire), en fonction de γ , la contribution relative de l'état 634. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des mesures sur les 20 spectres acquis à chaque fois.

L'allure de variation de longueur d'onde centrale identique pour les spectres simulés et pour ceux mesurés en fonction de la contribution de l'état 634 permet de soutenir le modèle d'ajustement proposé. Par ailleurs, l'apparition d'un plateau pour des fortes contributions de l'état 634 suggère que, pour une certaine contribution de l'état 634, une relation linéaire entre la quantité de fluorescence mesurée et la concentration en PpIX peut être établie (Marois et al., 2016; Valdés et al., 2012b). Au final, dans la zone précédant ce plateau, on observe que cette relation linéaire est limitée et notre modèle avec deux états est nécessaire. Ainsi, la quantification de la PpIX en ne considérant qu'un seul état semble compliquée dans des fantômes où le microenvironnement change. Ceci soulève la complexité de quantifier la concentration en PpIX dans certains tissus humains infiltrés en cellules tumorales en n'utilisant qu'un seul état. Nous proposons donc par la suite d'étudier la présence des deux états aussi dans les tissus cérébraux, *in vivo*.

3.7 - Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre l'utilisation, sur des fantômes liquides de PpIX, du système interventionnel que nous avons développé et présenté dans le chapitre précédent. Ces mesures ont permis dans un premier temps d'obtenir le spectre d'émission de référence de chacun des deux états, en proposant des fantômes optimaux pour chaque état. Nous avons ainsi confirmé que l'état 620 était prépondérant dans un environnement basique alors que l'état 634 dominait dans un environnement acide avec ajout d'un tensioactif ou d'Intralipides pour révéler sa fluorescence. Toutefois, ces mesures de spectres de référence soulèvent d'une part la complexité à isoler l'état 620, et d'autre part la variabilité des spectres émis entre 650 nm et 700 nm, notamment pour l'état 634. Nous avons ensuite proposé des fantômes mimant les propriétés des marges des gliomes, pour lesquels le lien entre la quantité de fluorescence mesurée et la concentration en PpIX ne peut être modélisé par une relation linéaire avec un seul état du fluorophore mais pour lesquels un modèle considérant une combinaison linéaire des deux états semble judicieux. Nous avons proposé et optimisé ce modèle sur ces différents fantômes. Les fantômes proposés ici sont complémentaires d'une étude déjà proposée (Marois et al., 2016) et une publication sur ces résultats est soumise dans le *Journal of Biomedical Optics*. Enfin, nous avons comparé nos mesures expérimentales de longueur d'onde centrale avec une simulation, ce qui permet de valider le modèle que nous proposons en étudiant un autre biomarqueur. Par ailleurs, nous avons confirmé la pertinence d'utiliser différentes longueurs d'onde d'excitation, adaptées aux propriétés de chaque état, afin de stimuler préférentiellement l'un ou l'autre état dans un même fantôme.

En conclusion, nous proposons un modèle d'ajustement des spectres mesurés sur la bande spectrale 608-637 nm qui est une combinaison linéaire des spectres de références des deux états acquis sur fantômes. Dans la suite de cette thèse, nous appliquons ce modèle de traitement aux données acquises *in vivo*.

Chapitre 4

Mise en place de l'étude clinique

Avant d'utiliser au bloc opératoire le système présenté dans les chapitres précédents, une étape administrative et juridique est nécessaire pour mettre en place l'étude clinique. L'étude clinique peut commencer une fois que les autorisations de l'ANSM et d'un Comité de Protection des Personnes (CPP) sont reçues. Afin d'obtenir ces autorisations, un dossier doit être soumis à ces organisations, dossier appelé « protocole de recherche biomédicale ». Nous présentons dans ce chapitre l'établissement de ce dossier ainsi que la réponse juridique aux objectifs de l'étude clinique.

4.1 - Etablissement du protocole d'étude clinique

Dans le but d'obtenir les autorisations nécessaires, nous avons mis en place un protocole de recherche biomédicale portant sur un dispositif médical intitulé « Utilisation d'une technique peropératoire de spectroscopie de fluorescence dans la résection des tumeurs gliales : étude de faisabilité chez l'homme – Etude GLIOSPECT ». Les principaux points de ce protocole sont présentés dans cette partie.

4.1.1 - Justification de la mise en place d'une étude clinique

La première partie du document consiste en la justification de la mise en place de l'étude clinique. Cette justification se fonde sur la recherche, *in vivo*, des deux états de PpIX identifiés sur biopsies en 2013 (Montcel et al., 2013) afin de confirmer ou infirmer leur intérêt. Cette première partie est un condensé du contexte de la thèse, présenté dans le Chapitre 1, que nous ne rappelons donc pas ici.

4.1.2 - Classement du dispositif médical étudié

Dans le cadre de l'étude clinique, le dispositif médical doit être classé selon la classification en vigueur (CEE, 1993). Le prototype est destiné à être utilisé en continu pendant moins de soixante minutes ; à pénétrer à l'intérieur du corps à travers la surface du corps dans le cadre d'un acte chirurgical ; à être utilisé pour fournir des informations en vue de détecter et diagnostiquer des états de santé et des maladies et à être en contact avec l'encéphale. Ainsi, selon les définitions pour les règles de classification le prototype peut être caractérisé de temporaire (§ I.1.1.) ; dispositif invasif de type chirurgical (§ I.1.2.) ; dispositif actif destiné au diagnostic (§ I.1.6.) ; dispositif en contact avec le système nerveux central (§ I.1.8.).

Par ailleurs, selon la classification des dispositifs invasifs règle n°6 (§ III-2.2) : « Tous les dispositifs invasifs de type chirurgical destinés à un usage temporaire font partie de la classe IIa ».

Par conséquent le prototype est classé comme un dispositif médical de classe IIa.

4.1.3 - Objectifs de l'étude

Les objectifs de cette étude sont triples : nous cherchons principalement à étudier la faisabilité technique de la mesure peropératoire et de l'analyse de spectres de fluorescence obtenus lors de cette mesure. Ceci implique que nous évaluons aussi la sécurité d'utilisation d'un système spectroscopique peropératoire effectuant des mesures de fluorescence dans le tissu nerveux. Enfin, nous souhaitons évaluer la faisabilité scientifique de la corrélation des paramètres obtenus par spectroscopie peropératoire avec la présence ou non de fluorescence sous microscope opératoire au niveau des régions prélevées et avec les données de l'examen anatomo-histopathologique.

4.1.4 - Inclusion des patients

Les patients inclus doivent être majeurs ; présenter des signes cliniques ou une histoire clinique en faveur d'un gliome de haut grade ou de bas grade ; présenter une IRM évoquant un gliome de haut grade ou de bas grade ; être affiliés ou bénéficiaires d'une couverture par un régime de sécurité sociale et avoir apporté un consentement éclairé pour la participation à l'étude. En revanche, sont exclus de l'étude les patients présentant des antécédents de réactions allergiques ayant menacé le pronostic vital ou d'hypersensibilité connue ; les femmes enceintes, allaitantes ou n'utilisant pas de contraception efficace ; les patients avec une fonction rénale altérée ou sous traitement par bêtabloquant et les patients présentant une contre-indication à l'utilisation du 5-ALA : porphyrie aigue ou chronique, hypersensibilité.

Dix patients sont inclus pour cette étude de faisabilité, six présentant un gliome de haut grade et quatre présentant un gliome de bas grade.

4.1.5 - Protocole de mesure au bloc opératoire

Les mesures *in vivo* se déroulent de façon chronologique avec l'opération, et la chronologie de ces mesures est illustrée sur la Figure 4-1. Le patient commence par ingérer un comprimé de gliolan® (contenant le 5-ALA), 3h avant l'opération. Ceci est automatiquement effectué dans le cadre de la procédure standard de traitement des patients présentant un GHG. En revanche, pour les patients présentant un GBG, ceci n'est pas demandé dans le cadre de la procédure standard mais ajouté dans le cadre de notre étude. Le patient est ensuite installé dans le bloc opératoire et la procédure chirurgicale classique commence.

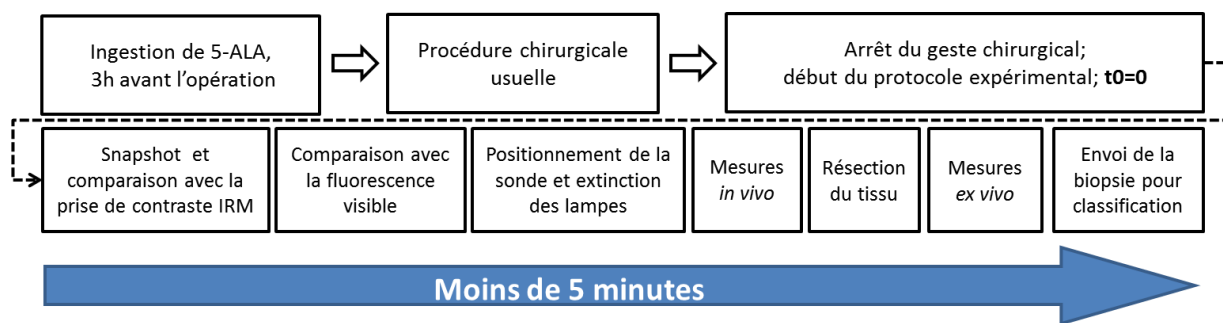


Figure 4-1 : Chronologie du protocole de mesure sur gliomes humains.

Le neurochirurgien commence par ouvrir les différentes enveloppes protégeant le cerveau (visibles sur la Figure 1-2) afin d'atteindre la zone tissulaire de travail. Si nécessaire, une partie du tissu sain est ôtée pour atteindre la tumeur. Ceci est guidé par l'IRM préopératoire et le système de neuronavigation. Une fois le gliome exposé, la résection commence. Lorsque le neurochirurgien souhaite étudier une zone tissulaire à l'aide du système de mesure de spectroscopie, le geste chirurgical est interrompu, une localisation de la zone étudiée est effectuée à l'aide d'une capture d'écran (snapshot) sur l'IRM couplée au système de neuronavigation. La fluorescence visible via le microscope de fluorescence est ensuite évaluée par le neurochirurgien. Pour les GHG, l'intensité de fluorescence est classifiée par « pas de fluorescence », « - », « + », et « ++ ». Pour les GBG, le microscope n'est pas utilisé donc la fluorescence n'est pas évaluée et est alors classifiée en « Non Applicable (NA) ». Le protocole de mesures spectroscopiques commence ensuite.

Pour ces mesures, la sonde est posée sur le tissu à analyser, toutes les lumières du bloc (lampes du bloc opératoire, du microscope, du champ opératoire) sont éteintes et le protocole d'acquisition commence. Le protocole commence par une excitation des tissus avec séquentiellement la DEL385 allumée puis éteinte, puis la DEL405 allumée/éteinte, puis la DEL420 allumée/éteinte. Ce cycle est répété six fois sans pause. Puisque les études présentées dans le Chapitre 1 utilisent une source à 405 nm, nous acquerrons six couples de spectres de plus à cette longueur d'onde d'excitation, afin d'augmenter le rapport signal à bruit de cette longueur d'onde d'excitation et donc de comparer plus facilement nos résultats avec ceux de la littérature. Le temps d'acquisition est de 200 ms par spectre. En ayant ainsi respectivement 6, 12 et 6 couples on/off d'acquisition par DEL, cela donne une durée de 9,6 s durant laquelle le neurochirurgien doit tenir la sonde immobile. Le découpage en acquisition de 200 ms permet un équilibre entre le bruit électronique présent dans le système de mesure (qui nécessite un long temps d'acquisition) et un éventuel signal parasite induit par un potentiel mouvement du neurochirurgien, une variation de la lumière ambiante ou le déplacement du personnel (qui implique un court temps d'acquisition). Une fois les mesures *in vivo* terminées, le neurochirurgien découpe le tissu sondé, la biopsie est déposée sur une compresse, la sonde et la biopsie sont rincées et le protocole est réappliqué sur la biopsie prélevée. Lorsque les mesures *ex vivo* sont terminées, la biopsie est envoyée pour analyse anatomo-histopathologique et la procédure chirurgicale reprend. Au total, l'interruption du geste

opératoire dure moins de 5 minutes et est répétée entre 6 et 8 fois par patient, de façon non consécutive, ce qui perturbe faiblement le geste opératoire standard.

4.1.6 - Comparaison au gold standard : étude anatomo-histopathologique

Une fois prélevée, la biopsie est analysée afin d'obtenir d'une part le grade de la tumeur (afin de confirmer ou d'infirmer la classification préopératoire en GBG ou GHG), et d'autre part la densité en cellules tumorales. Pour cette analyse, la biopsie est tout d'abord fixée dans le formol de zinc et colorée par la technique de coloration usuelle par HES (Hématéine-Eosine-Safran) pour une étude morphologique. Elle est alors analysée au microscope et les cellules observées sont décrites (forme, allure, densité). Les critères suivants sont évalués : atypie cytonucléaire*, présence de nécrose*, activité mitotique* et prolifération endothéliale*. Par ailleurs, une coupe de la biopsie subit une étude d'immunohistochimie, révélée par technique peroxydase* UltraView (ventana). Différentes mutations génétiques sont recherchées, nous retiendrons particulièrement la recherche d'une mutation IDH, qui semble réduire la production de NADPH*, donc influencer la fluorescence collectée (Meyronet, 2009).

Les catégories proposées pour les GHG sont « tissu sain » (aucune cellule tumorale n'est observée) ; « marge peu dense » (quelques rares cellules tumorales dans l'ensemble de l'échantillon) ; « marge » (cellules tumorales bien visibles mais disjointes) et « cœur tumoral » (cellules tumorales très proches et jointives). Les GBG ne présentant généralement pas de masse tumorale mais uniquement des infiltrations plus ou moins denses, leurs biopsies sont classées selon 2 catégories : « tissu sain » et « marge ». La variabilité entre deux biopsies et la continuité de la densité en cellules tumorales dans les zones infiltrées rendent impossible une classification plus fine, qui induirait un risque de variabilité inter- et intra-observateur. Les limites de la classification retenue sont ainsi subjectives et dépendantes du médecin qui effectue l'analyse anatomo-histopathologique. Dans notre analyse, les tissus sains sont ensuite regroupés en une unique classe, quel que soit le grade du gliome. Ceci donne au final 5 classes que nous comparerons dans le Chapitre 5. Une sixième classe est ajoutée mais ne sera pas incluse dans l'étude du Chapitre 5. Cette classe, « hétérogène », regroupe d'une part les prélèvements qui se présentent sous plusieurs morceaux dont la densité de l'infiltration diffère et d'autre part les biopsies au sein desquelles la classification varie (passage du cœur de la tumeur au début de la zone infiltrée par exemple, ou passage de quelques cellules infiltrées à la zone saine).

4.1.7 - Analyse de risque

L'un des objectifs de l'étude est d' « évaluer la sécurité d'utilisation d'un système spectroscopique peropératoire effectuant des mesures de fluorescence dans le tissu nerveux ». Une analyse de risques est donc nécessaire pour ce dispositif médical ne disposant pas d'un marquage CE (Conformité Européenne). Les risques associés à l'utilisation du prototype sont

de plusieurs ordres. Ces risques ont été identifiés pour le dépôt du dossier ANSM et sont : le risque photo-biologique ; le risque infectieux ; le risque toxique ; les risques traumatiques et thérapeutiques ; et enfin le risque de fuites électriques. Ces risques et leur prévention sont détaillés dans cette partie.

4.1.7.1 - Risque photo-biologique

Les DELs choisies illuminent les tissus dans la limite de l'ultraviolet, soit dans la zone des UV-A (315-400 nm). Le risque photo-biologique serait donc une exposition trop élevée des tissus. On rappelle que l'éclairement est une quantité photométrique définie comme la densité de puissance lumineuse par unité de surface, qui s'exprime en $W.m^{-2}$, et que l'exposition est définie comme l'éclairement pendant une certaine durée. L'utilisation de DELs plutôt que de sources lasers permet de diminuer considérablement le risque d'exposition élevée mais des calculs photométriques sont néanmoins nécessaires pour confirmer que le protocole d'illumination proposé respecte les normes internationales. La norme CEI 62471 est la norme internationale pour limiter les risques photo-biologiques pour les yeux et la peau. Elle définit « les limites d'exposition, les techniques de mesures de référence et le schéma de classification pour l'évaluation et le contrôle des risques photo-biologiques d'une source de radiation optique, alimentée électriquement, incohérente, à spectre large, y compris les DELs, à l'exclusion des lasers dans un domaine de longueurs d'ondes de 200 nm à 3000 nm ». Le cerveau n'étant normalement pas exposé aux irradiations, il n'y a pas de norme relative à son exposition. Nous suivons donc les limites les plus contraignantes de la norme CEI 62471. Parmi toutes les limites d'exposition présentées dans la norme, les risques associés à notre étude sont le risque UV-actinique et le risque thermique. Ces risques sont calculés suivant les formules proposées par la norme et présentées dans les équations (4.1) et (4.2), en considérant que le tissu est illuminé selon le protocole présenté partie 4.1.5 - et résumé ici : 6 illuminations de 200 ms avec les DEL385 et DEL420 et 12 illuminations de 200 ms avec la DEL405.

4.1.7.1.1 - Limites du risque des expositions selon la norme CEI 62471

Selon la norme, afin de protéger les tissus contre des lésions produites par l'exposition aux radiations ultraviolettes générées par une source polychromatique, le produit de l'éclairement énergétique efficace intégré de la source de lumière, E_s (en $W.m^{-2}$), et de la durée d'exposition, t (en s), ne doit pas excéder la valeur d'exposition donnée par l'équation (4.1), en J/m^2 :

$$E_s . t = \left[\sum_{\lambda=200}^{400} E_{\Lambda}(\lambda) . S_{UV}(\lambda) . \Delta\lambda \right] . t \leq 30 \text{ (J.m}^{-2}\text{)} \quad (4.1)$$

où $E_{\Lambda}(\lambda)$ est l'éclairement spectrique en $W.m^{-2}.nm^{-1}$ (calculé dans la partie suivante), $S_{UV}(\lambda)$ est la fonction pondérée du risque actinique UV (indiquée dans la norme) et $\Delta\lambda$ est l'intervalle des longueurs d'onde en nm.

En parallèle, l'éclairement énergétique efficace intégré (E_{th} , en W/m²) doit satisfaire la contrainte donnée par l'équation (4.2) sur la plage spectrale 380 – 3000 nm :

$$E_{th}.t^{0.75} = \left[\sum_{\lambda=380}^{3000} E_{\lambda}(\lambda).\Delta\lambda \right].t^{0.75} \leq 20000 \quad (\text{J.m}^{-2}). \quad (4.2)$$

La première contrainte concerne l'œil et la peau, et correspond à la limite d'exposition aux radiations ultraviolettes pendant une durée de moins de 8 heures. La seconde correspond à l'agression cutanée qui peut provenir à cause de l'augmentation de température des tissus.

4.1.7.1.2 - Calculs des expositions engendrées par le système

L'éclairement spectrique $E_{\lambda}(\lambda)$ est calculé selon le protocole suivant :

- i) mesure, pour chaque DEL, de son spectre $S(\lambda)$ à l'aide d'un spectromètre ;
- ii) mesure, pour chaque DEL, de sa puissance surfacique P en sortie du système complet ;
- iii) normalisation du spectre de la DEL par son aire sous la courbe sur l'intervalle 200 – 1100 nm ($A_{200-1100}$) et multiplication de ce spectre normalisé par la puissance mesurée.

Ces mesures ont été détaillées dans le Chapitre 2, le spectre normalisé de chaque DEL a été présenté sur la Figure 2-12 et les puissances surfaciques obtenues sont de 80 W.m², 30 W.m² et 50 W.m² respectivement aux DEL385, DEL405 et DEL420. Ces trois étapes permettent d'obtenir l'éclairement spectrique de la surface éclairée par chaque DEL, $E_{\lambda}(\lambda)$ en W.m². nm⁻¹, donné par l'équation (4.3).

$$E_{\lambda}(\lambda) = \frac{S(\lambda)}{A_{200-1100}}.P \quad (4.3)$$

L'application des formules (4.1) et (4.2) donne la puissance énergétique efficace et la puissance thermique pour chaque DEL. La somme des puissances respectives calculées pour chaque DEL pondérées par le nombre respectif d'acquisitions donne la puissance totale UV actinique et thermique. La multiplication par la durée d'acquisition donne les expositions énergétiques.

Lors de la soumission du dossier à l'ANSM, la sonde n'était pas encore développée et l'éclairement en sortie de sonde n'a donc pu être mesuré à cette époque. Le calcul de ces expositions a volontairement été surestimé en minimisant les pertes. Ainsi, les pertes induites par les décalages de l'alignement des différents composants optiques n'ont pas été prises en compte dans ces calculs. L'éclairement surfacique propre à chaque DEL estimé en sortie de sonde a été établi comme le flux en sortie de DEL divisé par la surface en sortie de sonde. Des pertes ont ensuite été proposées, mais uniquement celles dues à l'obturateur (perte de 20% du signal). Ainsi, les expositions réellement engendrées par le système sont inférieures d'un facteur 10 à celles soumises à l'ANSM, elles-mêmes largement dans les normes. Le Tableau 4-1 résume ces résultats et montre que, par la suite, la puissance des DEL peut être augmentée sans risque photo-biologique. Les expositions proposées sont en J.m⁻² et incluent donc le temps d'exposition choisi dans le protocole expérimental (1.2s pour les DEL385 et DEL420

et 2.4s pour la DEL405). Si une nouvelle étude était menée, il semblerait plus judicieux d'utiliser des DELs plus puissantes, plutôt que d'augmenter le temps d'acquisition, afin de ne pas trop rallonger la durée de l'opération ni celle durant laquelle le neurochirurgien doit rester immobile en tenant la sonde (actuellement de l'ordre de 10 secondes).

Test	Exposition énergétique estimée sans la sonde (J.m ⁻²)	Exposition énergétique mesurée avec la sonde (J.m ⁻²)				Limite d'exposition imposée par la norme (J.m ⁻²)	Conclusion
		385	405	420	Les 3		
DEL	Combinaison linéaire des 3 DELs					Combinaison linéaire des 3 DELs	
Risque UV-actinique	6 ± 0.5	0.25 ± 5e ⁻³	0.12 ± 5e ⁻³	0.08 ± 5e ⁻³	0.44 ± 0.01	<30	Conforme
Risque Thermique	2000 ± 100	132 ± 1	107 ± 1	90 ± 1	330 ± 5	<20 000	Conforme

Tableau 4-1: Tableau bilan des limites d'exposition des tissus calculées et comparées à la norme de sécurité photo-biologique CEI62471.

On observe dans ce tableau que la DEL385 est celle qui contribue le plus aux risques photo-biologiques mais que, malgré cette contribution, il est largement possible d'augmenter la puissance des DELs et les temps d'acquisition pour une potentielle prochaine étude. Comme nous le verrons dans le Chapitre 5, les intensités collectées sont parfois faibles par rapport au bruit, une augmentation de puissance serait utile pour augmenter le rapport signal à bruit des mesures. D'après les calculs présentés dans cette partie, gardant la même durée d'acquisition et le même pourcentage des nombres d'acquisitions, on pourrait choisir des DELs 60 fois plus puissantes tout en restant sous les limites d'exposition imposées par la norme. Si l'on choisit d'augmenter le temps d'acquisition, en gardant le même rapport de nombre d'acquisitions (25% pour les DEL385 et DEL420 et 50% pour la DEL405), on pourrait augmenter le temps d'acquisition jusqu'à 2,5 secondes par acquisition.

4.1.7.2 - Risque infectieux : processus de stérilisation de la sonde

Il existe un risque infectieux lié à l'introduction dans le bloc opératoire d'éléments contaminés. Avant toute entrée au bloc opératoire, nous désinfectons les éléments qui n'entrent pas dans la zone stérile (cf. Figure 2-4), soit les blocs 1 et 2 du système développé. Cette désinfection se fait entre l'accueil et le couloir, à l'aide du détergent-désinfectant « surfanios premium » (*anios*) avec une dilution de 2.5 ml /litre. Ce produit étant disponible à l'hôpital déjà dilué, nous l'utilisons sur les éléments qui entrent dans la zone désinfectée de l'hôpital. Nous, chercheurs associés à l'étude, entrons au bloc dans une tenue de bloc (pyjama jetable complet, sur-chaussures, masque et charlotte) fournie par l'hôpital. La sonde (bloc 3

du système développé) étant en contact direct avec le cerveau, elle doit subir un cycle complet de stérilisation avant chaque utilisation. En outre, la sonde étant réutilisée d'un patient à l'autre après contact avec le cerveau, le risque prion apparaît et la sonde doit donc aussi subir le cycle d'inactivation du risque prion, conformément à l'instruction DGS/RI3/2011/449 du 01/12/2011 actualisant la circulaire 138 de l'ANSM et prévoyant une étape d'inactivation totale des ATNC (Agent Transmissible Non Conventionnel). Ces étapes sont décrites ci-dessous. Entre deux patients, la sonde est conservée au bloc dans un panier spécial qui subira aussi une partie du cycle de stérilisation (voir Figure 4-2).

Aux HCl, la stérilisation de la sonde peut s'effectuer soit dans un Sterrad®, stérilisateur vendu par l'entreprise Johnson et Johnson, soit dans un autoclave. Le Sterrad® utilise comme agent stérilisant le peroxyde d'hydrogène, au cours d'un cycle comportant une phase plasma. Le cycle se déroule à basse température (50°C) (CCLIN Sud-Est, 2010). Le Sterrad permet de stériliser des dispositifs thermosensibles et peut donc être intéressant pour notre sonde comportant de la colle. L'autoclave est une stérilisation à la vapeur, avec une température de 134°C et une pression de 3 bars absolus (moins forte que dans le Sterrad®). La stérilisation par autoclave est recommandée par la loi. Dans les deux cas, un traitement du risque prion doit être appliqué en plus. Le traitement peut être manuel, à l'aide du produit « ALKA100 » ou bien en machine, avec le « Septoclean ». Les deux détergents ont été testés sur la sonde pour vérifier qu'ils ne la détériorent pas. Dans le cadre de l'étude de faisabilité sur 10 patients, nous choisissons une stérilisation par autoclave, recommandée par la loi, avec traitement manuel pour le risque prion (solution ALKA100). Nous appliquons ainsi « un procédé qualifié de stérilisation vapeur, avec libération paramétrique des dispositifs stérilisés sans contrôle possible de la stérilité des produits traités. » Pour la suite, dans l'optique d'une commercialisation du dispositif, une validation de l'efficacité du procédé devra être effectuée, par exemple par l'entreprise NAMSA pour une stérilisation par autoclave ou par l'entreprise Johnson&Johnson si une stérilisation par Sterrad® est choisie.



Figure 4-2 : Sonde dans son panier de stockage entre deux patients.

Entre deux patients, le cycle de nettoyage/stérilisation/inactivation du risque prion se déroule en 4 étapes :

- a) Pré-nettoyage au service de stérilisation de l'hôpital : après utilisation au bloc, la sonde subit une étape de pré-nettoyage dans les locaux de l'hôpital. Elle est ensuite envoyée à la stérilisation centrale des Hospices Civils de Lyon avec le reste du matériel opératoire.
- b) Pré-désinfection : la sonde subit une pré-désinfection dans une solution d'ALKA100.
- c) Lavage manuel : nettoyage manuel délicat des parties métalliques et de la gaine de la sonde à l'aide d'un chiffon imbibé d'ALKA100 puis immersion de la sonde dans une solution d'ALKA100 pendant au moins 15 minutes. Rinçage à l'eau douce et inspection visuelle : s'il reste des traces de salissure, cette étape de nettoyage est réitérée. Séchage délicat de la sonde, rangement dans son panier et séchage du tout dans l'armoire séchante. Le tout est ensuite emballé dans un double ensachage ULTRA® avant le passage dans l'autoclave.
- d) Stérilisation : cycle de stérilisation à la vapeur dans un autoclave atteignant une température de 134°C et imposant des variations de pression relative de +2 bars et -1 bar (voir Figure 4-3).

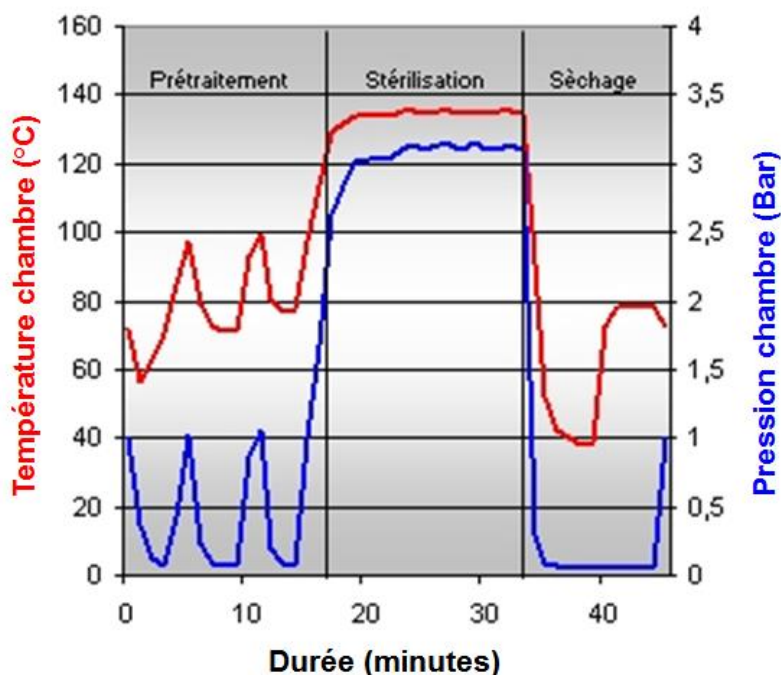


Figure 4-3 : Cycle de stérilisation dans un autoclave.

Une fois stérile, la sonde rangée dans son panier et dans son double ensachage ULTRA® est transmise et conservée stérile au bloc opératoire dans l'attente de l'inclusion du prochain patient de l'étude.

4.1.7.3 - Risque toxique

Un risque toxique est apparu au cours de l'utilisation de la sonde, entre le Patient08 et le Patient09 (donc en fin d'étude). Ce risque est lié à l'utilisation d'une bague en aluminium ajoutée lors de la réparation de la sonde après l'inclusion du Patient02, permettant de lier la partie solide de la sonde à la gaine. En effet, cette jonction était effectuée au préalable par une

colle, qui n'a pas résisté à la stérilisation et la partie solide de la sonde s'est désolidarisée de la gaine. Nous avons donc remplacé la colle par une bague en aluminium collée et sertie sur une nouvelle gaine en acier inox. Ce choix de système de collage résiste à l'autoclave. En revanche, des taches sont apparues sur cette bague, que nous avons identifiées comme des taches d'oxydation, engendrant un risque de chute d'éléments oxydés dans le champ opératoire. Pour limiter ce risque, un gant stérile est noué autour de la bague de façon à envelopper cette dernière. La sonde est ainsi glissée dans l'index du gant, dont l'extrémité est découpée, ce qui permet d'épouser la forme de la sonde tout en laissant ressortir son extrémité pour les mesures. La partie opposée du gant est nouée sur la gaine flexible, de l'autre côté de la bague, l'englobant totalement dans le gant. Ce risque, apparu en fin d'étude, peut probablement être limité lors de la conception d'un nouveau prototype en changeant de nouveau le système de serrage de la gaine sur la partie rigide de la sonde.

4.1.7.4 - *Risques traumatiques et thérapeutiques*

Le design de la sonde a été pensé pour éviter tout risque traumatique, comme une perforation du tissu. Un risque peut être envisagé en cas de manœuvre accidentelle de la sonde au cours de son application sur le tissu cérébral, même si ce risque paraît très limité dans la mesure où la sonde n'est pas un instrument chirurgical coupant ou tranchant, et dans la mesure où le médecin participant à l'étude est un neurochirurgien confirmé.

Un éventuel risque thérapeutique serait lié à une modification du geste chirurgical du fait des informations apportées au cours de la procédure opératoire par le système expérimental. Compte tenu du fait qu'il s'agit d'une étude de faisabilité dont l'intérêt n'a pas encore été démontré, l'équipe scientifique s'est engagée à ne donner aucune information au neurochirurgien lors de l'opération. Par ailleurs, l'analyse complète des données ayant été faite en postopératoire, le chirurgien n'y a eu réellement accès qu'une fois le geste chirurgical terminé. Le risque thérapeutique peut donc être qualifié de nul.

4.1.7.5 - *Risque de fuites électriques*

Un risque électrique peut provenir par la transmission d'un courant non désiré entre le système et le patient. Afin de prévenir de potentielles fuites électriques, le système a été initialement conçu à l'aide de matériaux isolants (boîte en PVC, gaine de la sonde en PTFE). Cependant, comme précisé dans le paragraphe 4.1.7.3 -, la gaine PTFE a été remplacée par une gaine en inox après l'inclusion du Patient02. L'isolation électrique entre le patient et le corps de l'appareil n'étant alors plus effectuée par la sonde, nous choisissons d'intercaler des fibres optiques avec gaine PTFE (donc isolantes) entre la nouvelle sonde et le corps de l'appareil. Dans les deux configurations, des tests électriques ont été effectués à l'aide de l'appareil Rigel 288 selon la norme CEI60601 pour confirmer l'absence de courants de fuite. Cet appareil mesure un éventuel courant entre la prise secteur et le dispositif médical à tester. Les tests et leurs résultats sont donnés dans le Tableau 4-2, confirmant l'absence de fuites électriques. Les tests sont décrits après le tableau.

Test	Mesure	Limite	Etat
Inspection visuelle	N/A	N/A	Conforme
Fuite à l'enveloppe	<4μA	100 μA	Conforme
Fuite à l'enveloppe premier défaut	<4μA	500 μA	Conforme
Fuite au patient, méthode alternative	<4μA	10 μA	Conforme
Fuite au patient méthode continu	<4μA	10 μA	Conforme
CONCLUSION			CONFORME

Tableau 4-2 : Test de sécurité électrique : mesure des fuites électriques à l'aide de l'appareil Rigel 288 selon la norme CEI60601.

L'inspection visuelle est la recherche de défaut visuel (choc, fil dénudé...). La fuite à l'enveloppe est la recherche de courant de fuite sur la carcasse de l'appareil (ici les poignées du bloc 2, conductrices électriquement). La fuite à l'enveloppe recherche le défaut électrique qui ferait sauter le disjoncteur du bloc opératoire alors que la fuite à l'enveloppe « premier défaut » recherche le premier défaut électrique qui ferait sauter le disjoncteur d'une maison, mais pas celui du bloc opératoire. En effet, le seuil de disjonction au bloc opératoire est plus élevé que celui d'une maison car on ne peut prendre le risque d'avoir facilement l'électricité qui se coupe au cours d'une opération. Enfin, la fuite au patient est mesurée sur l'extrémité rigide de la sonde, celle qui sera posée sur le cerveau. La méthode alternative implique que l'appareil soit branché sur secteur et la méthode continue implique une mesure alors que l'appareil n'est pas alimenté.

4.1.8 - Autorisations obtenues

L'accord du CPP de Lyon sud-est IV et l'autorisation de l'ANSM, nécessaires pour démarrer l'étude, ont été obtenus respectivement les 18 novembre 2014 et 22 décembre 2014.

4.1.9 - Evénements Indésirables Graves et arrêts temporaires de l'étude

Deux Evénements Indésirables Graves (EIG) ont été signalés lors de l'étude, mais aucun n'est lié à l'utilisation du dispositif médical étudié. En revanche, deux arrêts temporaires ont été demandés par l'ANSM. Le premier a eu lieu juste après le deuxième EIG et est dû à l'observation du décollement de la jonction entre la partie solide de la sonde et la gaine PTFE à la fin de l'inclusion du Patient02. Cette observation a entraîné un arrêt de l'étude, une réflexion sur les voies d'amélioration du système et la solution technique retenue a été de mettre une gaine flexible en acier inoxydable reliée à la partie solide de la sonde par une bague aluminium collée et sertie (cf. partie 4.1.7.3-). Une demande de reprise a été effectuée, et l'ANSM et le CPP ont donné leur accord à la reprise de l'étude après une interruption de quatre mois.

Par la suite, de petites taches d'oxydation sur la bague en aluminium ont été signalées lors de la stérilisation de la sonde entre le Patient08 et le Patient09. Cet événement a entraîné un nouvel arrêt de l'étude, la solution proposée pour le corriger fut d'envelopper la bague d'un gant stérile lors de son utilisation, afin de prévenir d'un potentiel risque toxique comme

présenté partie 4.1.7.3 -. Là encore, l'accord de l'ANSM et du CPP ont permis une reprise de l'étude après un arrêt d'un mois.

4.2 - Réponse aux objectifs de l'étude clinique

Pour cette étude, nous avons introduit 3 objectifs. Avant de présenter les résultats détaillés des mesures de spectroscopie dans le Chapitre 5, nous montrons ici la réponse juridique aux objectifs proposés.

4.2.1 - Faisabilité technique

La mesure peropératoire de spectres de fluorescence a été réalisée pour les 10 patients et nous avons pu retrouver les deux états recherchés, sans trop perturber le geste opératoire (moins de 5 minutes par mesure). Ceci valide la faisabilité technique de réaliser des mesures de spectroscopies de fluorescence peropératoires sur l'homme, premier objectif de cette étude. Cependant, ceci a été plus long que prévu, pour plusieurs raisons illustrées sur la Figure 4-4.

La Figure 4-4 présente une chronologie des différentes étapes de l'étude clinique liées à sa faisabilité technique. Cette chronologie montre que l'étude s'est déroulée sur 18 mois au lieu des six mois annoncés, que deux arrêts de l'étude ont eu lieu et qu'un onzième patient apparaît. L'inclusion d'un 11^{ème} patient s'explique par un problème de communication : la sonde n'était pas disponible lors de l'opération du Patient03. Ce dernier ayant signé le formulaire de consentement, il reste donc inclus dans l'étude mais nous avons inclus en plus le Patient11, afin d'obtenir 10 patients sur lesquels des mesures spectroscopiques ont été effectuées. L'allongement de la durée de l'étude s'explique par trois raisons : tout d'abord, la sonde a été livrée en retard, retardant le début effectif de l'étude. Ensuite, l'inclusion des patients était en confrontation avec une autre étude, ce qui a rallongé le temps d'attente entre deux patients éligibles. Enfin, différents incidents techniques sur la sonde ont imposé deux arrêts, présentés dans la partie 4.1.9 -. Cette Figure 4-4 souligne ainsi les différentes difficultés techniques ou organisationnelles rencontrées et dépassées, confirmant au final la faisabilité technique d'utilisation du système.

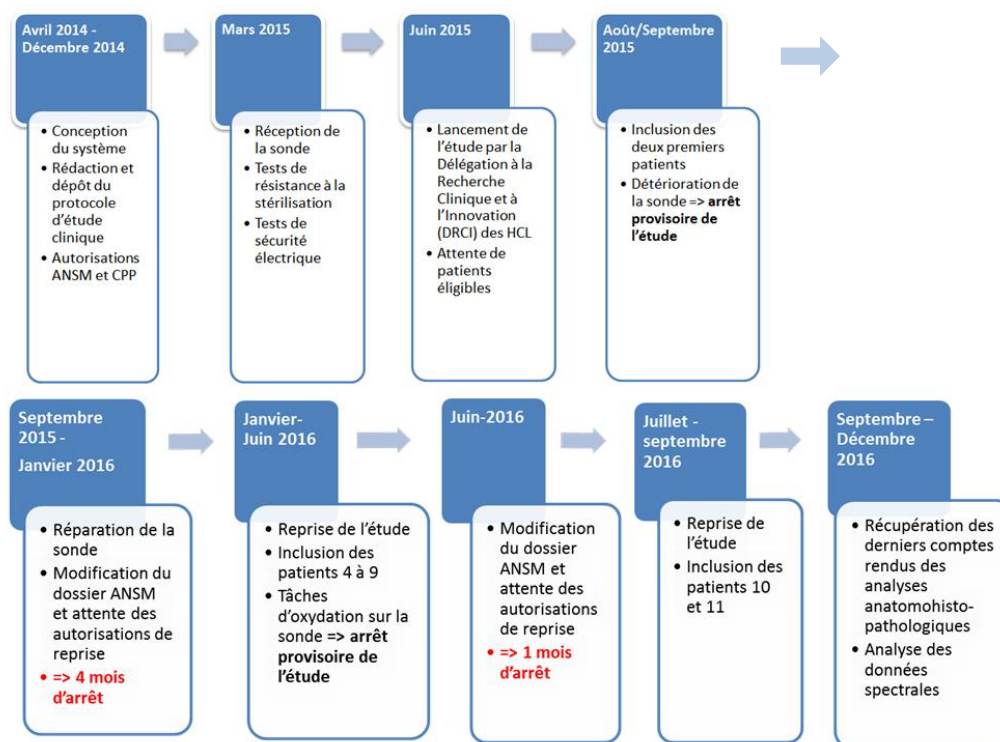


Figure 4-4 : Chronologie des étapes de l'étude clinique liées à sa faisabilité technique : de la rédaction du dossier ANSM à l'inclusion des 10 patients ; entre avril 2014 et septembre 2016.

4.2.2 - Sécurité d'utilisation

Les risques potentiels liés à la sécurité d'utilisation du système ont été présentés dans la partie 4.1.7 - et tout a donc été mis en place pour les prévenir. L'utilisation du système n'a ainsi provoqué aucun accident lors des expériences. Nous avons cependant observé un risque non listé en amont, qui est lié à la longueur de la sonde et à l'agencement spatial. En effet, il est important d'optimiser l'agencement spatial pour éviter de laisser traîner la sonde au sol dans le bloc, ce qui peut entraîner un risque de chute d'une personne et/ou un risque de dommage de la sonde. La solution trouvée fut de faire passer la gaine sur les appareils présents dans le bloc, ce qui permet de faire passer la gaine par en haut et donc d'éviter qu'elle ne traîne au sol. Une augmentation de la longueur de la gaine pourrait aider à bien passer en hauteur si un prochain prototype est envisagé, mais la contrepartie serait une perte de signal. Par ailleurs, les deux incidents précédemment soulignés sont liés aux matériaux de la sonde et à la stérilisation. Le choix de ces matériaux peut être optimisé pour limiter les risques sanitaires, notamment le risque d'oxydation apparu sur la fin d'utilisation du système. Enfin, l'utilisation de sources lumineuses limite UV n'a soulevé aucun risque, l'obturateur étant ouvert uniquement quand la sonde était en contact avec le tissu, donc il n'y a pas eu de risque d'irradiation accidentelle.

4.2.3 - Faisabilité scientifique

La faisabilité scientifique est présentée en détail dans le Chapitre 5. Nous pouvons cependant conclure ici que cette faisabilité a tout d'abord été validée par la présence *in vivo*

du biomarqueur proposé en 2013. En outre, l'étude *in vivo* dépasse les résultats de l'étude *ex vivo* puisqu'elle propose de nouvelles observations, basées sur la corrélation entre les résultats des mesures de spectroscopie, la fluorescence visuelle, la localisation sur l'image RM et l'analyse anatomo-histopathologique. Ces résultats, présentés en détail dans le Chapitre 5, valident la faisabilité scientifique du système et du modèle de traitement de données proposés.

Chapitre 5

Spectroscopie de fluorescence de la PpIX sur gliomes humains avec excitation multi-longueurs d'onde

Le chapitre que nous présentons maintenant est l'analyse des données de spectroscopie acquises *in vivo*, sur tissus humains au bloc opératoire, avec le système que nous avons présenté dans les chapitres précédents. Nous commencerons par présenter le post-traitement nécessaire pour obtenir le spectre émis par la PpIX à partir du spectre mesuré au bloc opératoire. Ensuite, nous étudierons les résultats renvoyés par un ajustement des spectres selon le modèle développé dans le Chapitre 3. Les paramètres renvoyés par cet ajustement seront comparés avec les résultats des techniques actuelles, afin de montrer que la considération de deux états de la PpIX permet de repousser les limites de sensibilité de la microscopie de fluorescence de la PpIX. Ainsi, à partir des résultats de cet ajustement sur 10 patients, nous proposerons une piste de classification d'un tissu cérébral inconnu. Dans un dernier temps, nous présenterons un deuxième modèle d'analyse, qui se fonde toujours sur la présence des deux états mais exploite cette fois-ci simultanément l'information renvoyée par l'excitation multi-longueurs d'onde. Ce traitement sans à priori permet de proposer d'autres paramètres variant avec la densité d'infiltration tumorale.

5.1 - Des données brutes au spectre de PpIX normalisé

Les données acquises au bloc opératoire sont des spectres de fluorescence émis par chaque échantillon, sous excitation multi-longueurs d'onde. Un échantillon est soit une zone de tissu cérébral non prélevé (mesure *in vivo*), soit une biopsie (mesure *ex vivo*). Pour rappel, nous mesurons pour chaque échantillon 6, 12 et 6 couples de spectres respectivement aux DEL385, DEL405 et DEL420. Ceci a été effectué *in vivo* puis *ex vivo* pour tous les échantillons sauf les 5 premiers pour lesquels uniquement la mesure *in vivo* a été effectuée. La puissance utilisée est la puissance maximale disponible en sortie de système et la durée totale d'une mesure est de moins de 10 secondes puisque chaque acquisition dure 200 ms.

Avant d'analyser la présence de la PpIX dans les échantillons, et ainsi de rechercher un marqueur de densité en cellules tumorales, il est nécessaire d'isoler le spectre émis par la PpIX. Nous présentons donc dans cette partie le retrait de l'autofluorescence et la normalisation des spectres, avant de présenter l'allure des spectres obtenus et la liste des échantillons exclus de l'étude.

5.1.1 - Obtention d'un spectre par DEL et par échantillon

Le post-traitement des spectres acquis au bloc opératoire commence comme celui des spectres acquis sur fantômes : pour chaque spectre « *on* » acquis, le background associé est retiré puis tous les spectres obtenus sous une même longueur d'onde d'excitation sont sommés et ce spectre final est convolué à une fonction sinus cardinal au carré afin de prendre en compte la résolution du spectromètre. Dans ces mesures avec la sonde apparaît un pic spectral parasite à 693 nm, que nous supprimons par une interpolation cubique. La longueur d'onde de ce pic est détectée automatiquement entre 690 et 695 nm puis l'interpolation est effectuée sur les zones de 16 nm, situées à - 3 nm et + 3 nm de la longueur d'onde de ce pic. Cette étape permet une meilleure visualisation des résultats même si cette partie du spectre n'est pas exploitée dans l'analyse.

Une fois les spectres obtenus, pour chaque échantillon, chaque DEL et chaque condition de mesure (*in vivo* ou *ex vivo*), toutes les informations sont stockées dans une structure Matlab présentant le numéro du patient, le numéro de l'échantillon, sa classification par l'analyse anatomo-histopathologique et les 3 spectres (1 par DEL) pour les 2 conditions de mesure étudiées. Chaque étape de traitement décrite ci-après sera stockée dans cette même structure afin d'avoir une base de données unique et complète pour le protocole GLIOSPECT. L'utilisation d'une structure Matlab permet de limiter les sources d'erreurs comme un décalage d'échantillon par exemple.

5.1.2 - Retrait de l'autofluorescence

Comme nous l'avons introduit dans le Chapitre 1, d'autres fluorophores endogènes contribuent à la fluorescence mesurée et leur fluorescence est appelée « autofluorescence ». Il est donc nécessaire de retirer leur contribution pour conserver uniquement l'information spectrale de la PpIX. Dans la zone spectrale d'émission de fluorescence par la PpIX (600 nm-800 nm), nous estimons qu'on peut modéliser l'autofluorescence par une exponentielle décroissante, comme proposé par Ando (Ando et al., 2011) et effectué sur biopsies en 2013 (Montcel et al., 2013). Cet ajustement exponentiel est effectué dans une bande spectrale où la PpIX ne contribue pas à la fluorescence mesurée, soit dans l'union des zones 480-530 nm et 950-1100 nm. Les différentes étapes de cet ajustement sont décrites ci-après et illustrées sur la Figure 5-1.

Puisque le signal mesuré est filtré avant 485 nm, nous cherchons automatiquement le maximum de ce signal dans la zone 480 nm-520 nm, dans le but de déterminer la borne inférieure de l'ajustement. Afin de ne pas détecter un maximum induit par le bruit mais le début de la décroissance exponentielle, nous lisons le spectre pour la recherche du maximum par une fenêtre glissante de 8 nm de largeur renvoyant la moyenne des points inclus. Le premier intervalle d'ajustement exponentiel est alors défini entre le maximum trouvé à l'étape précédente et 528 nm. Pour un traitement automatique efficace, une initialisation de l'ajustement est nécessaire. Nous lisons fortement le spectre sur l'intervalle inférieur de l'ajustement (fenêtre glissante de 25 nm) et nous recherchons une exponentielle décroissante

sur cet intervalle uniquement. Cela donne des paramètres initiaux pour l'ajustement final de l'autofluorescence. Cet ajustement final est effectué sur les deux intervalles (début et fin) avec la fonction 'fit' de Matlab et les paramètres initiaux trouvés précédemment. Une vérification visuelle est effectuée pour chaque échantillon et ce retrait automatique de l'autofluorescence est corrigé manuellement pour les patients problématiques. Les problèmes sont dus soit à la présence d'une bosse vers 950 nm (trouvée dans tous les patients présentant de la gliose*), soit à une bosse vers 530 nm donnant un ajustement trop incurvé, soit à une bosse vers 510 nm empêchant l'ajustement. Pour corriger ces ajustements problématiques, nous décalons légèrement la zone d'ajustement exponentiel (de 10-20 nm environ). Au total, nous effectuons cette correction manuelle pour 6 spectres sur 193 acquis *ex vivo* et 17 spectres sur 198 acquis *in vivo*. Une fois l'autofluorescence modélisée, nous la soustrayons du spectre mesuré et obtenons alors le spectre émis par la PpIX.

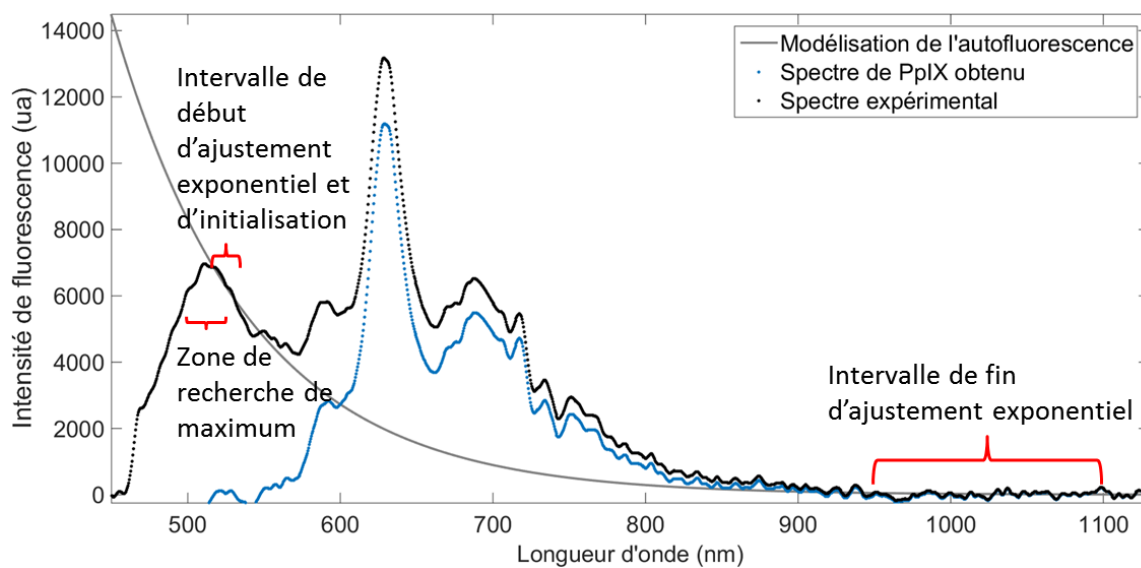


Figure 5-1: Modélisation de l'autofluorescence par une exponentielle décroissante. En noir pointillés, la somme des spectres mesurés expérimentalement pour une DEL, après convolution par une fonction sinus cardinal. En noir plein, le modèle de l'autofluorescence : une exponentielle décroissante. En bleu le spectre de PpIX après soustraction de l'autofluorescence. En rouge, les intervalles d'ajustement pour définir l'exponentielle décroissante.

5.1.3 - Normalisation

Afin de comparer les mesures intra- et inter-patients, nous souhaitons normaliser les données. Cette normalisation doit permettre de minimiser les variations des spectres dues aux variations de géométrie (disposition de la sonde), aux propriétés des tissus, à l'absorption par le sang... Nous choisissons de normaliser nos données par la quantité d'autofluorescence collectée dans la zone d'ajustement, soit entre 608 nm et 637 nm. Ceci est discutable puisque, comme nous l'avons introduit dans le Chapitre 1, la quantité d'autofluorescence dépend de la densité en infiltration tumorale, de la longueur d'onde d'excitation, et légèrement de l'âge du patient, la production de lipopigments diminuant avec l'âge. Toutefois, ce paramètre reste intéressant dans le contexte de cette thèse, avec le développement d'un système volontairement simple mesurant uniquement la fluorescence.

La dépendance de ce critère de normalisation avec la classification du tissu est à noter pour les comparaisons interclasses mais peu importante au sein d'une même classe. Cette dépendance aura tendance à surestimer les valeurs associées aux cœurs tumoraux, car l'autofluorescence des tissus tumoraux est réduite de 25% par rapport à celle du tissu sain (Croce et al., 2003). Les cœurs tumoraux n'étant pas la classe d'intérêt de la thèse, cette observation n'est pas problématique. Dans cette étude, nous cherchons principalement à discriminer le tissu sain des marges peu denses des GHG et GBG. Dans ces cas d'intérêt, il y a peu de cellules tumorales, donc la normalisation est très faiblement dépendante de la classe de l'échantillon. La dépendance à la source d'excitation sera reprise dans les parties 5.3.3 - et 5.4 -, lorsque nous comparerons les données des 3 DELs mais celle-ci n'influence pas la validation du modèle sous excitation à 405 nm. La dépendance à l'âge du patient (Wisniewski et al., 1988) est négligée dans notre étude. Nous considérons dans notre modèle que l'autofluorescence collectée provient essentiellement du NADH et non des lipopigments, comme nous le supposions déjà dans les travaux de 2013. Au final, l'autofluorescence reste un paramètre intéressant pour normaliser les données dans le but de les comparer. Notons ici que le calcul de l'autofluorescence dans la zone 608-637 nm est cependant très influencé par le modèle exponentiel et que pour les GBG (dont le signal est plus bruité), ce modèle semble s'éloigner des données spectrales collectées, donnant une valeur de normalisation faible pour ces patients.

5.2 - Allure des spectres de PpIX et exclusion d'échantillons

Avant d'analyser les spectres de façon quantitative, nous observons les spectres post-traités et nous retirons les échantillons problématiques. Nous étudierons dans cette partie l'allure des spectres de tous les échantillons, en comparaison avec leur classification anatomo-histopathologique. Nous calculerons ensuite le rapport signal à bruit (RSB) de chaque échantillon afin de retirer de l'étude ceux dont le RSB est trop faible. Le choix du RSB critique se fait de façon empirique.

5.2.1 - Observation des spectres et comparaison à la classification anatomo-histopathologique

Au final, nous avons effectué 83 mesures sur du tissu cérébral *in vivo* et 78 mesures *ex vivo* associées. Nous proposons ici d'observer l'allure des spectres émis sous excitation à 405 nm en fonction de leur classification anatomo-histopathologique.

L'observation des spectres fait ressortir une allure globale spécifique pour chaque classe. La Figure 5-2 présente le spectre moyen de chaque classe, issu de mesures *in vivo* sous excitation à 405 nm. Nous ajoutons sur cette figure un marqueur à 622 nm (maximum de l'état 620 observé sur fantôme) et un marqueur sur le maximum visible de l'état 634. On observe sur cette figure une décroissance du signal de PpIX avec la décroissance du nombre de cellules tumorales ainsi qu'un décalage dans la longueur d'onde des maxima de ces

spectres. En effet, le maximum du spectre représentant les cœurs tumoraux des GHG (courbe rouge, trait plein) est autour de 1.6 (ua), alors que le maximum de fluorescence diminue à environ 0.2 pour les marges des GHG (courbe mauve, trait tirets), environ 0.15 pour les marges des GBG (courbe grise) et environ 0.05 pour les marges peu denses des GHG (courbe cyan, trait pointillé). Enfin, la présence de PpIX est très faible dans le tissu sain et sa bosse est donc très légère sur la courbe verte pointillée, représentative du tissu sain. La longueur d'onde des maxima des cœurs et marges GHG est autour de 635 nm alors qu'elle est entre 622 nm et 635 nm pour les marges moins denses des GHG, les GBG et le tissu sain. Par ailleurs, on observe sur cette figure que le spectre émis par les marges des GBG semble présenter un « offset » vers 600 nm. Ceci peut s'expliquer par la contribution des lipopigments, négligée dans le retrait de l'autofluorescence mais qui semble ici participer au signal collecté. La présence des lipopigments pour les patients présentant un GBG est cohérente avec leur âge moyen (26,5 ans), en comparaison avec l'âge moyen des GHG inclus dans l'étude (57 ans). Ainsi, pour les GBG, il peut être pertinent d'ajouter une gaussienne centrée vers 580 nm pour modéliser la contribution des lipopigments à l'autofluorescence et corriger ce léger décalage d'amplitude. Par ailleurs, la valeur de normalisation de ces signaux étant faible, cela amplifie l'amplitude du spectre mais aussi du bruit, ce qui explique les oscillations visibles pour les GBG. Enfin, pour les signaux de faible intensité (tissu sain, marges GBG, marges peu denses GHG), nous observons sur cette Figure 5-2 les oscillations dues au filtre passe-bas du système après 700 nm et l'interpolation cubique autour de 693 nm implémentée pour supprimer le signal parasite à 693nm.

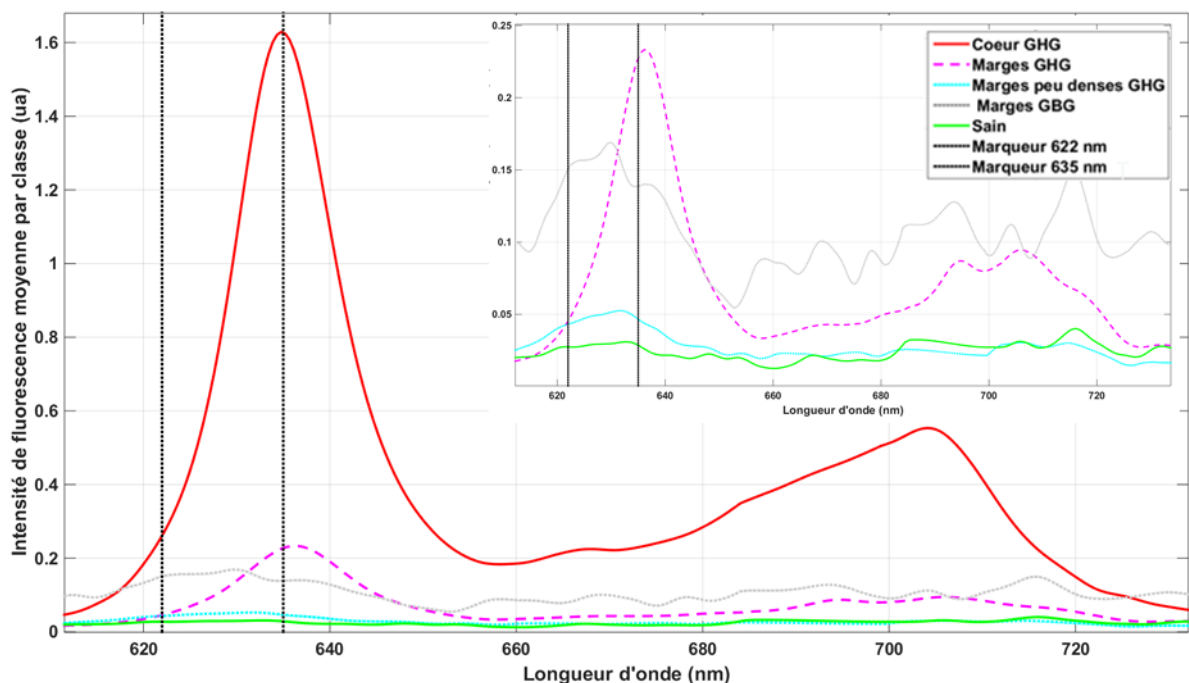


Figure 5-2 : Spectre de fluorescence moyen par classe après post-traitement. En rouge, le spectre moyen émis par les cœurs des GHG ; en mauve, celui émis par les marges des GHG ; en cyan celui émis par les marges peu denses des GHG ; en gris le spectre moyen émis par les marges des GBG et en vert le spectre moyen émis par les échantillons sains. On ajoute en noir pointillé un marqueur à 620 nm et un autre à 634 nm. L'encadré noir présente un zoom de cette figure, sans le spectre moyen émis par les cœurs des GHG.

La Figure 5-3 propose ces mêmes spectres divisés par l'écart type du bruit de ces spectres entre 1050 nm et 1100 nm. Nous observons sur cette figure que le spectre des GBG est maintenant comparable à celui des marges peu denses des GHG et du tissu sain pour une même quantité de bruit. Nous observons ainsi que le spectre moyen des cœurs et marges GHG est différenciable des spectres moyens de leurs marges peu denses, des marges de GBG et du tissu sain. Dans la suite de ce manuscrit, nous travaillons sur les données non normalisées par le bruit car cette normalisation n'a pas de signification physiologique.

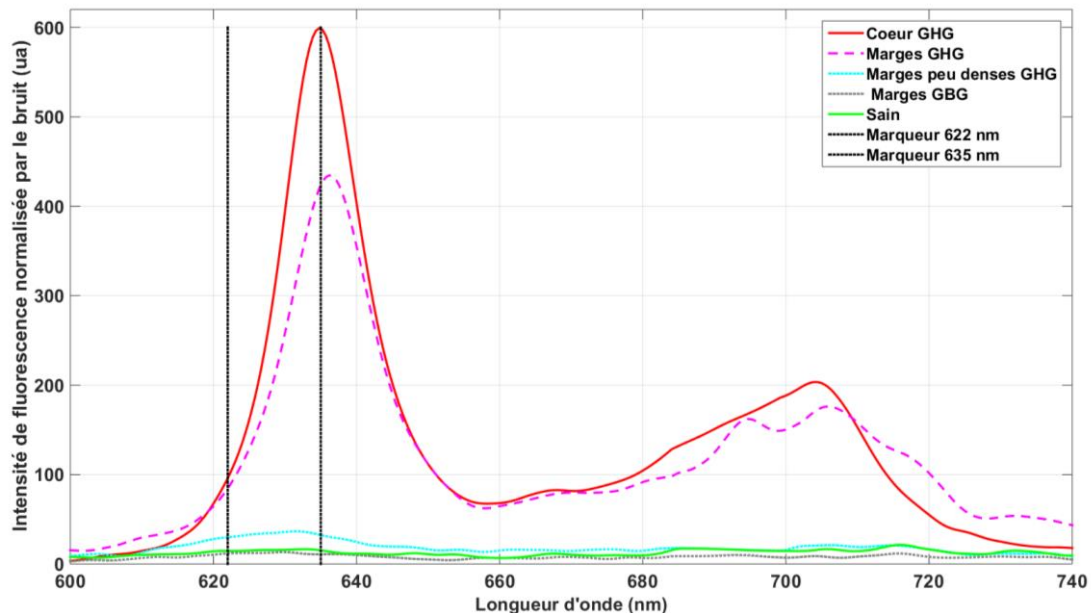


Figure 5-3 : Spectre moyen de chaque classe divisé par l'écart type du bruit de ce spectre entre 1050 nm et 1100 nm.

Les spectres présentés sur la Figure 5-2 sont les spectres moyens de chaque classe et permettent une comparaison inter classes. La Figure 5-4 présente les spectres émis par tous les échantillons de chaque classe, illustrant la variabilité des spectres émis au sein des différentes classes. Les marqueurs sont situés à 622 nm et 634 nm, qui sont les maxima des deux états observés sur fantômes. Les spectres associés aux cœurs des GHG sont tracés en rouge sur la figure A, ceux associés aux marges des GHG en mauve sur la figure B, ceux associés aux marges des GBG en gris sur la figure C, ceux associés aux marges peu denses des GHG en cyan sur la figure D, et ceux associés aux échantillons sains en vert sur la figure E. La figure F présente une superposition de tous ces spectres suivant le même code couleur. Cette Figure 5-4 soutient l'observation de la diminution de la quantité de signal de fluorescence provenant de la PpIX suivant la classe de l'échantillon, mais montre aussi la difficulté de discriminer les marges du tissu sain par une simple observation des spectres. En effet, la figure F montre que l'allure et l'amplitude des spectres des cœurs des GHG diffèrent de ceux de la majorité des marges des GHG, des marges peu denses des GHG, des marges des GBG et du tissu sain, ce qui est déjà observé par la microscopie de fluorescence qui parvient à discriminer ces cœurs du reste. En revanche, les autres spectres (marges GBG et GHG, tissu sain) se superposent.

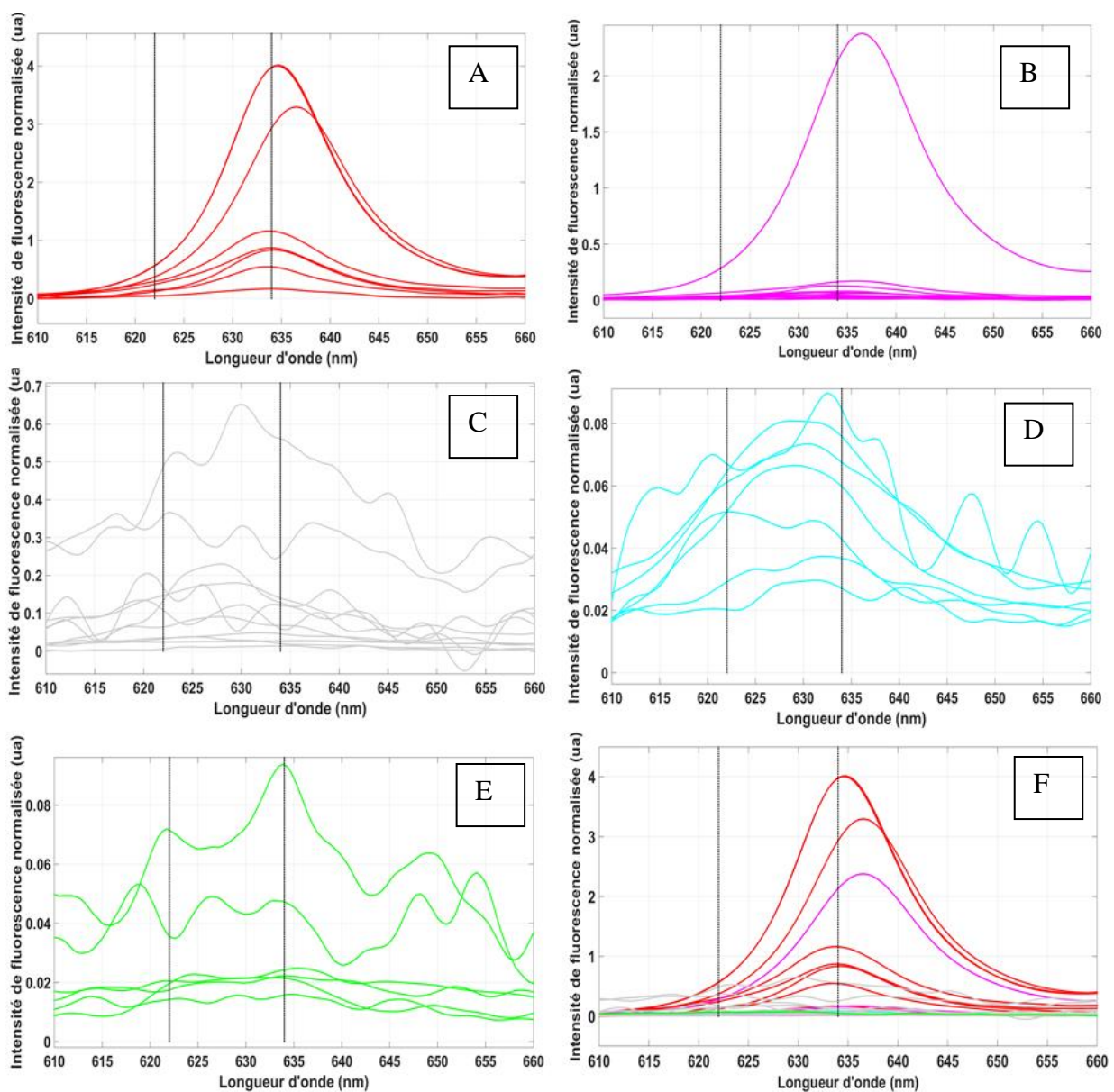


Figure 5-4 : Spectre émis par tous les échantillons sondés et classés, en fonction de leur densité en cellules tumorales. A) cœurs des GHG (rouge) ; B) marges des GHG (mauve) ; C) marges des GBG (gris); D) marges peu denses des GHG (cyan) ; E) tissu sain (vert) ; F) Superposition de tous les spectres en fonction de leur classe avec le même code couleur que précédemment. Sur chaque graphe, on ajoute un marqueur à 620 nm et un autre à 634 nm.

Nous pouvons observer sur cette Figure 5-4 un décalage de la longueur d'onde centrale du pic de PpIX avec la diminution de la densité en cellules tumorales. Ce décalage de la longueur d'onde du maximum des spectres varie d'environ 634 nm pour les cœurs, vers une valeur entre 620 et 634 pour les marges et le tissu sain. Afin de quantifier ce décalage, un calcul de la longueur d'onde centrale en fonction de la classe est effectué et ces résultats sont présentés sur la Figure 5-5. Pour rappel, l'étude de la longueur d'onde centrale se fait en cherchant l'intervalle de longueurs d'onde pour lesquelles l'intensité reçue vaut 80% du maximum, autour de ce dernier. Nous cherchons ensuite la longueur d'onde moyenne de cet intervalle. Ceci a déjà été appliqué sur fantôme et dans les simulations (Chapitre 3).

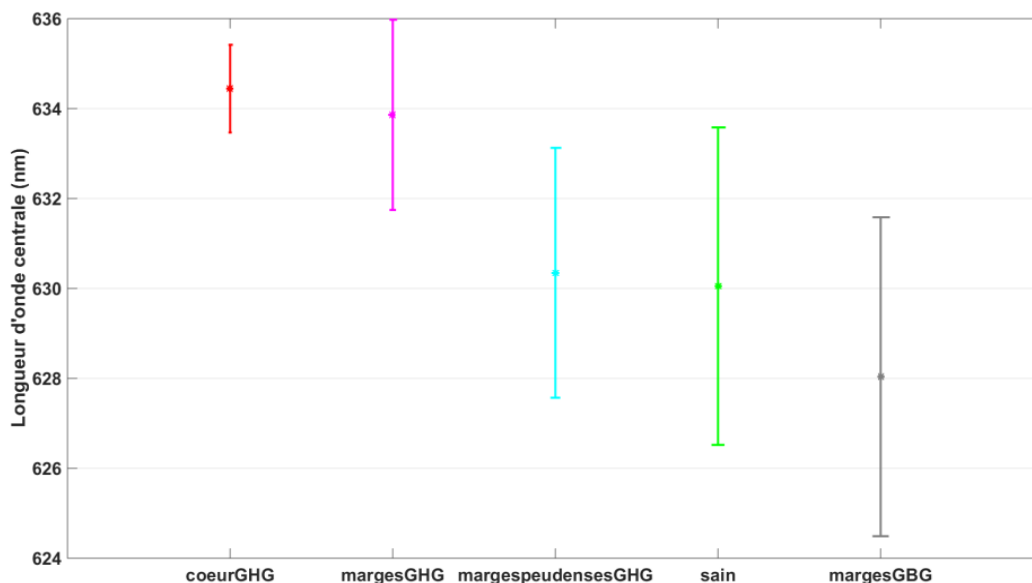


Figure 5-5 : Evolution de la longueur d'onde centrale des spectres en fonction de la classe du tissu. En rouge, les cœurs tumoraux GHG. En mauve, les marges GHG et en cyan leurs marges peu denses. En vert, les échantillons sains GHG auxquels on associe l'unique échantillon sain GBG. En gris, les marges des GBG.

On observe sur la Figure 5-5 que la longueur d'onde centrale moyenne diminue avec la quantité de cellules tumorales, avec un écart qui semble légèrement plus important entre les cœurs et marges des GHG et le reste. Ainsi, ce décalage de la longueur d'onde moyenne du maximum du spectre, observé sur les Figure 5-2 et Figure 5-4 et quantifié sur la Figure 5-5, soutient la nécessité de considérer la présence de deux états pour discriminer les différentes classes de tissu. Cette considération des deux états peut se faire soit dans la méthode d'analyse des résultats (ajustement avec deux références spectrales), soit dans le protocole d'acquisition des données (excitation à différentes longueurs d'ondes), soit en combinant les deux.

Les Figure 5-2 à Figure 5-4 illustrent que la PpIX s'accumule dans les cœurs tumoraux, provoquant un spectre avec un signal de PpIX dense et qu'à l'inverse, les échantillons sains et marges peu denses émettent un spectre avec une bosse très faible dans la zone 600-650 nm. Nous avons cependant retiré de ces figures les spectres émis par 6 échantillons, dont la comparaison entre la classification anatomo-histopathologique et la qualification du chirurgien à partir du microscope de fluorescence était trop différente. Ces 6 échantillons exclus sont :

- 4 échantillons qui présentent de la fluorescence visible par le neurochirurgien alors qu'ils sont classés en « sain » ou « marge très peu dense ».
- 2 échantillons où la fluorescence visible par le neurochirurgien est très faible alors que l'échantillon est classé en « cœur ».

Nous avons remarqué que les deux échantillons classés en « cœur » alors qu'ils présentent un faible signal sont chacun consécutifs à un échantillon classé en « sain » ou « marge peu dense » alors que ce dernier présente un fort signal de fluorescence. Ceci permet

de formuler l'hypothèse d'une inversion d'échantillons lors de la transmission pour analyse anatomo-histopathologique. Nous observons sinon une forte prolifération endothéliale dans trois échantillons très fluorescents, ce qui permet de formuler une autre hypothèse. Dans ce cas-là, le signal mesuré pourrait provenir de la PpIX circulante dans le sang. Par ailleurs, l'un des échantillons classés en « cœur » mais pour lequel une faible fluorescence a été mesurée présente un œdème, qui pourrait être le lieu de mesure et expliquer l'absence de fluorescence. L'autre échantillon présente beaucoup de sang, qui peut absorber la fluorescence. Ces 6 échantillons sont définitivement exclus de l'étude.

Enfin, les spectres obtenus pour le Patient04 sont inexploitable car les lumières du bloc opératoire n'ont pas été éteintes et saturent le capteur. Les 9 échantillons de ce patient sont donc exclus de l'analyse.

5.2.2 - Calcul du rapport signal à bruit

Le rapport signal à bruit des spectres est d'abord observé sur les différentes mesures, ce qui permet d'identifier certains échantillons dont les résultats seront à nuancer, voire à exclure des analyses lorsque le bruit est trop important. Afin de valider l'exclusion de ces mesures, nous calculons le RSB de chaque mesure selon la formule de l'équation (5.1):

$$RSB = \frac{\sum_{\lambda=608}^{\lambda=637} S(\lambda)}{\text{std}[S_{250-350}(\lambda) - (a\lambda + b)]} \quad (5.1)$$

où $S(\lambda)$ est le spectre post traité avec conservation de l'autofluorescence et normalisation par cette dernière. std est la fonction qui calcule l'écart type d'un signal. $S_{250-350}(\lambda)$ est le spectre collecté après retrait du background, sur la plage 250-350 nm et a et b sont les paramètres renvoyés par un ajustement linéaire de ce spectre dans cette zone.

Le RSB critique est un seuil choisi empiriquement par analyse visuelle des spectres. La Figure 5-6 présente la définition de ce seuil et les mesures pour la DEL405 *in vivo*. Nous traçons le RSB de tous les échantillons (en noir les GBG, en rouge les GHG) et la ligne bleue est le seuil critique au-dessus duquel un échantillon est conservé dans l'analyse proposée ci-après. Le seuil que nous retenons est 145.

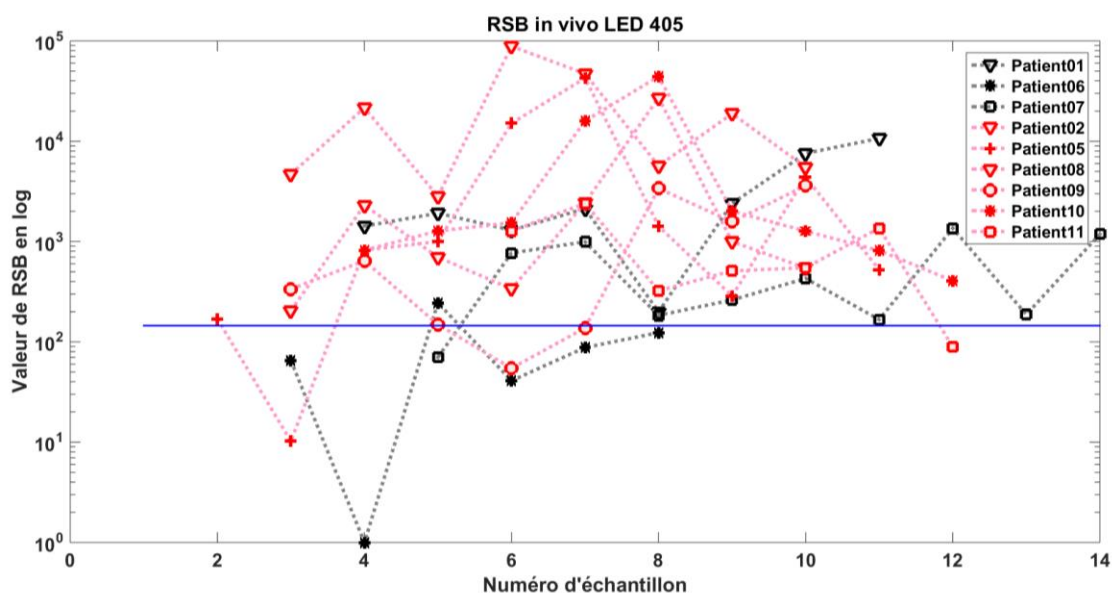


Figure 5-6: Tracé logarithmique du RSB de chaque patient sous excitation à 405 nm en fonction du grade du gliome. En rouge, les GHG. En noir, les GBG. En bleu, le RSB critique.

Nous observons sur cette Figure 5-6 que le RSB des mesures des GBG est plus faible que celui des GHG. Ceci traduit la perte d'intensité de fluorescence de PpIX collectée pour les GBG. Nous observons aussi que les mesures du Patient06 sont presque toutes exclues et que celles du Patient07 sont proches du RSB critique.

5.2.3 - Conclusion : échantillons exclus

Au final, le nombre d'échantillons exclus de l'analyse suivant la condition de mesure est résumé dans le Tableau 5-1.

Condition	In vivo				Ex vivo			
	385	405	420	Les 3	385	405	420	Les 3
Nombre échantillons exclus par comparaison entre la fluorescence visible et l'analyse anatomo-histopathologique	6							
Nombre échantillons exclus par RSB (sans compter ceux déjà exclus précédemment)	3	10	11	12	0	4	5	7
Total	9	16	17	18	6	10	11	13

Tableau 5-1 : Liste du nombre d'échantillons exclus suivant la condition de mesure.

On remarque sur le Tableau 5-1 qu'il y a plus d'échantillons exclus des mesures *in vivo* qu'*ex vivo*. Ceci pourrait s'expliquer par l'accessibilité plus facile de la biopsie, qui permet probablement une meilleure installation de la sonde que lors de la mesure *in vivo* et/ou par le rinçage de l'échantillon avant la mesure. Nous remarquons aussi qu'il y a plus d'échantillons exclus pour les DEL405 et DEL420 que pour la DEL385. Ceci est cohérent avec la puissance

d'excitation de ces DELs qui varie dans le même sens, la DEL385 étant la plus puissante. Enfin, le RSB de seuil est le même pour les 3 DELs mais nous observons qu'il n'exclut pas les mêmes échantillons, ce qui fait que le nombre d'échantillons exclus en prenant en compte les 3 DELs est plus élevé.

Si nous répartissons les échantillons exclus suivant leur classification anatomohistopathologique, nous observons que ce sont surtout des échantillons en provenance de GBG ou des marges de GHG qui sont exclus. Cela est cohérent avec la faible quantité de PpIX attendue dans ces échantillons, qui génère un faible signal de fluorescence donc un faible RSB. Ceci présente donc les limites du protocole mis en place, notamment pour l'étude des GBG. Le Tableau 5-2 présente les échantillons exclus suivant leur classe, le type de gliomes (GHG+GBG) et le nombre d'échantillons total, notés sous forme N=nombre total d'échantillons pour cette classe, les deux grades confondus. On y observe l'exclusion d'un seul échantillon classé en « cœur », pour un patient qui présentait beaucoup de sang, ce qui explique le mauvais RSB. Les autres échantillons exclus sont des marges ou du tissu sain provenant principalement des GBG.

	In vivo				Ex vivo			
	Sain (N=10)	Marge peu dense (N=7)	Marge (N=28)	Cœur (N=9)	Sain (N=10)	Marge peu dense (N=7)	Marge (N=25)	Cœur (N=9)
DEL385	(0+1)	(0+NA)	(1+1)	(0+NA)	(0+0)	(0+NA)	(0+01)	(0+NA)
DEL405	(0+3)	(0+NA)	(3+3)	(1+NA)	(0+1)	(0+NA)	(0+2)	(1+NA)
DEL420	(0+2)	(0+NA)	(5+3)	(1+NA)	(0+1)	(0+NA)	(0+3)	(1+NA)

Tableau 5-2: Nombre d'échantillons exclus par classes, suivant le type de gliome (GHG+GBG) et la condition de mesure. N indique le nombre total d'échantillons de cette classe. NA=Non Appliqué.

Après avoir observé les spectres et mis en évidence un décalage de la longueur d'onde du maximum de ces spectres suivant la classification, nous présentons maintenant deux analyses de ces spectres fondées sur l'hypothèse de la présence de deux états.

5.3 - Traitement paramétrique : ajustement des spectres obtenus à l'aide des deux états de référence

Nous avons proposé dans l'équation (3.1) un modèle d'ajustement utilisant une référence acquise sur fantôme pour chaque état, dans la bande spectrale 608-637 nm. Ce modèle est rappelé ici : $S(\lambda) = \alpha_{620} S_{620}(\lambda) + \alpha_{634} S_{634}(\lambda)$. Nous appliquons maintenant ce modèle d'ajustement sur les données *in vivo* de RSB supérieur au RSB critique et nous étudions dans cette partie les contributions de chaque état. Nous étudierons tout d'abord le ratio des deux contributions suivant la classification du tissu, biomarqueur proposé en 2013 lors de l'étude préliminaire sur biopsies. Ensuite, nous proposons d'étudier une représentation

graphique de la contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 dans différentes configurations : en fonction de la fluorescence visible ; en fonction de la localisation par rapport à la prise de contraste du gadolinium ou à la variation de T2 d'une séquence Flair et enfin en fonction de la classification donnée par l'analyse anatomo-histopathologique. Ces tracés permettront de comparer nos résultats aux techniques actuelles présentées dans le Chapitre 1.

5.3.1 - Ratio 620/634 : comparaison avec l'étude de 2013

L'étude de 2013 sur biopsies (Montcel et al., 2013) a mis en avant le ratio des deux contributions déduites de l'ajustement proposé. Ce ratio s'écrit :

$$Ratio_{620/634} = \frac{\alpha_{620}}{\alpha_{634}}. \quad (5.2)$$

Dans cette étude, nous avons montré que ce ratio tendait vers 0 dans les cœurs des GHG et vers 1 dans leurs marges et dans les GBG. Nous avons tracé sur la Figure 5-7 la moyenne des ratios au sein d'une même classe pour l'étude de 2013 (à gauche) et pour l'étude de 2017 (à droite) sous excitation à 405 nm *in vivo* (en rouge) et *ex vivo* (en bleu). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne, soit l'écart type divisé par le nombre d'échantillons. Les tests statistiques présentés sur cette figure sont des tests de Kolmogorov-Smirnov qui vérifient si deux populations suivent la même loi (*P<0.1, **P < 0.01, ***P < 0.001). Dans la thèse, les GBG n'ayant pas de catégorie « cœur », nous n'étudions que 3 groupes pour ce ratio : cœur des GHG, marges des GHG et marges des GBG. Enfin, l'étude de 2013 ne proposant pas de ratio pour les tissus sains, nous ne le présentons pas non plus sur la Figure 5-7 mais nous l'analyserons sur la Figure 5-8.

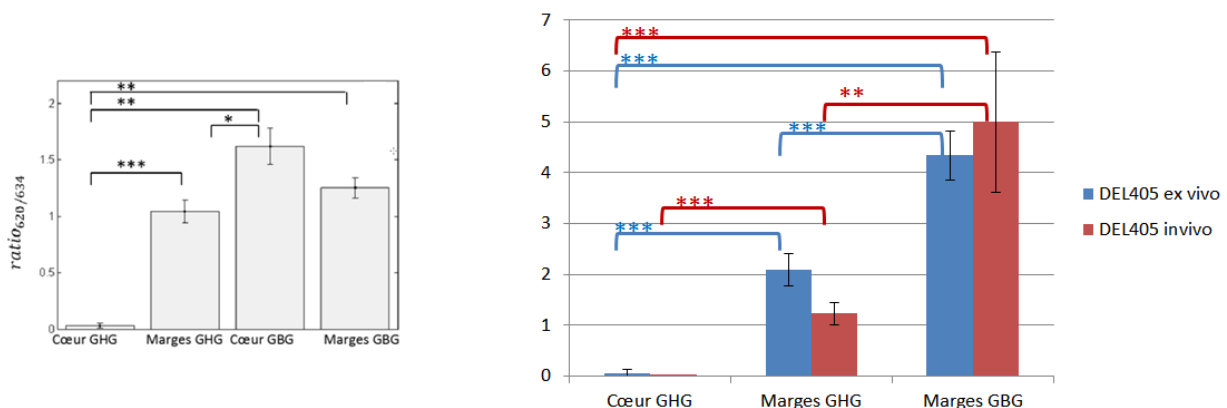


Figure 5-7: Comparaison du Ratio_{620/634} en fonction de la densité en cellules tumorales, entre l'étude de 2013 (à gauche, mesures *ex vivo*) et l'étude clinique menée pendant la thèse (à droite, mesures *in vivo* (rouge) et *ex vivo* (bleu)).

Les tracés de la Figure 5-7 valident tout d'abord la répétabilité *in vivo* de l'étude *ex vivo* puisque nous retrouvons les résultats de l'étude de 2013, avec un ratio qui tend vers 0 dans les cœurs des GHG et supérieur à 1 sinon. Les tests de Kolmogorov-Smirnov montrent une meilleure discrimination entre les cœurs des GHG et les GBG tant dans les mesures *in vivo* que *ex vivo*, en comparaison avec les tests de 2013. Nous remarquons cependant que les

incertitudes de mesure sont légèrement plus élevées dans les mesures avec le système développé pendant la thèse. Ceci s'explique par un meilleur RSB lors de l'étude *ex vivo* : utilisation d'un laser à 405 nm avec un éclairage en sortie de système de presque 10 000 W/m² de 2013, alors que notre système envoie un éclairage de 50 W/m² avec la DEL 405. Par ailleurs, nous remarquons aussi que le ratio est un peu plus élevé dans les marges des GHG et beaucoup plus élevé dans les GBG dans l'étude de 2017. Une explication à cette variation pourrait provenir des tissus sondés : les mesures de l'étude de 2013 ayant été effectuées dans le but d'étudier les marges tumorales, les mesures ont principalement été effectuées dans des zones d'infiltration plus denses. Dans l'étude de 2017, le but final était de différencier les marges du tissu sain. Les mesures ont donc probablement été effectuées dans des zones moins infiltrées, plus proches du tissu sain.

Le tracé de ce ratio pour les deux autres sources d'excitation soutient l'augmentation du ratio avec la diminution de la quantité de cellules tumorales, comme l'illustre la Figure 5-8. Sur cette figure, nous ajoutons la catégorie « sain ». Il est important de noter que nous avons retiré de ce tracé quatre échantillons dont les ratios étaient trop élevés. Ce retrait d'échantillons permet une meilleure lisibilité du graphique mais n'a pas de sens physique donc est à nuancer. Les échantillons retirés sont : une marge de GBG qui renvoie des ratios largement supérieurs aux autres ratios de la catégorie (57 avec la DEL385 et 310 avec la DEL420). Cet échantillon présente un très bon RSB qui ne peut donc pas expliquer ces hauts ratios ; une marge de GHG et un échantillon sain pour la DEL420. Ces échantillons ont des RSB légèrement supérieurs au RSB critique et ces faibles RSB pourraient expliquer les grands ratios (5700 et 90) ; un échantillon sain pour la DEL385 qui a aussi un RSB légèrement supérieur au RSB critique mais qui renvoie un ratio de 38 alors que les autres échantillons de sa catégorie valent entre 2 et 6. Au final, nous avons retiré 4 échantillons de ratio supérieur à 40, sur les 138 ratios calculés, sachant qu'après exclusion de ces 4 échantillons, la valeur maximale de ratio vaut 15. Les tests présentés sur cette Figure 5-8 ont été faits avec et sans exclusion de ces échantillons.

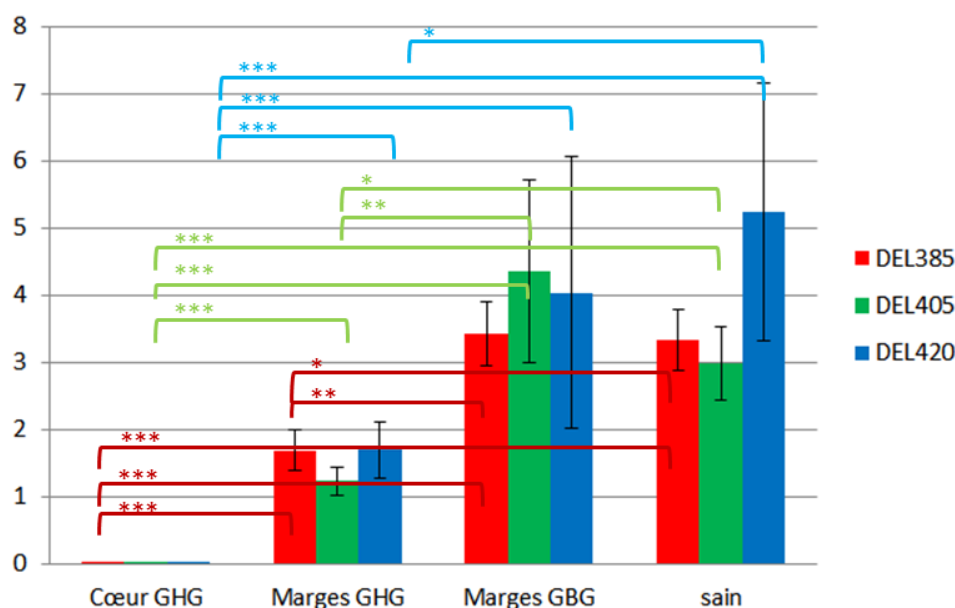


Figure 5-8: Ratio des deux contributions en fonction de la classe du tissu pour les trois sources d'excitation : DEL385 (bleu), DEL405 (rouge), DEL420 (vert).

Nous observons sur cette Figure 5-8 que les ratios moyens augmentent avec la diminution en cellule tumorale pour les GHG, quelle que soit la DEL d'excitation : nous passons d'un ratio de 0 dans les cœurs des GHG à un ratio d'environ 1,5 dans leurs marges et environ 3.5 dans le tissu sain. Le ratio moyen des GBG est proche de celui du tissu sain et présente des barres d'erreur plus élevées qui soulignent la variabilité de ce ratio pour ces tumeurs. Notons ici que si l'on conserve la marge de GBG présentant un bon RSB, nous observons alors que le ratio est plus élevé dans les marges des GBG que dans le tissu sain pour les trois DELs. Les tests de Kolmogorov-Smirnov présentés sur ce tracé ont été faits avec et sans exclusion des échantillons précédemment cités et les valeurs de test restent du même ordre de grandeur. Ces tests confirment que le ratio discrimine largement les cœurs des GHG du reste pour les trois DELs et qu'il discrimine aussi les marges des GHG des marges des GBG pour les DEL385 et DEL405, même si cette discrimination n'a pas d'intérêt clinique. La nouveauté de cette étude inclut les tissus sains et montre que ce ratio discrimine les marges des GHG du tissu sain avec une valeur de $P < 0.1$ pour toutes les DELs. Précisément, nous obtenons une valeur de $P = 0.012$ pour les DEL385 et DEL405 et une valeur de $P = 0.09$ pour la DEL420. Ceci confirme l'intérêt de la DEL385 puisque nous obtenons une discrimination comparable à celle donnée par la DEL405 selon les tests de Kolmogorov-Smirnov mais avec des barres d'erreur plus faibles. Ce résultat prometteur est à nuancer devant le faible nombre d'échantillons sains mais est encourageant pour repousser les limites des techniques actuelles. Enfin, nous observons que l'erreur type augmente avec la diminution de la densité en cellules tumorales, ce qui peut s'expliquer par le faible RSB d'une part, et la variabilité des tissus sondés d'autre part. La diminution des barres d'erreur pour la DEL385 peut s'expliquer par le plus grand nombre d'échantillons conservés grâce au meilleur RSB.

5.3.2 - Graphes 2D des paramètres renvoyés par l'ajustement des spectres sous excitation à 405 nm

Le ratio des deux contributions permet de séparer le cœur des GHG de leurs marges et des marges des GBG mais perd de l'information puisque nous n'étudions plus qu'un paramètre au lieu de deux. Un tracé d'une contribution en fonction de l'autre permet de garder toute l'information renvoyée par l'ajustement. Nous considérons ici que chaque échantillon E peut être représenté sur un graphe selon ses coordonnées $E(\alpha_{620}, \alpha_{634})$. Nous traçons donc la contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 et comparons ce tracé avec les résultats des différentes techniques actuelles. Nous commencerons par comparer les résultats de l'analyse paramétrique avec la microscopie de fluorescence (qualification de la fluorescence visible par le neurochirurgien), puis nous comparerons ces résultats avec la localisation de l'échantillon par rapport à l'hypersignal de l'IRM préopératoire. Enfin nous comparerons ces résultats avec la méthode de référence : l'analyse anatomo-histopathologique. Ces comparaisons avec les techniques actuelles seront détaillées pour les mesures *in vivo* sous excitation à 405 nm puis nous présenterons les résultats de l'ajustement des mesures *in vivo* sous excitation aux deux autres DELs avant de présenter les résultats des mesures *ex vivo* pour les trois sources d'excitation.

5.3.2.1 - Comparaison avec la fluorescence visible

Lors de la résection de gliomes de bas grade, le neurochirurgien n'utilise pas le module de fluorescence du microscope opératoire, puisque l'intérêt de cette technique pour les GBG n'a pas été démontré. En revanche, ce module est utilisé pour les GHG et nous pouvons donc tracer la contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 suivant la qualification de la fluorescence visible des échantillons des GHG. C'est ce qui est représenté sur la Figure 5-9, avec une excitation des tissus à 405 nm. Sur cette figure, les échantillons présentant de la fluorescence visible (qualifiée de « + ou - », « + », « ++ » ou « +++ » par le neurochirurgien au moment de l'exérèse) sont tracés sous forme d'étoiles (★) et ceux qui ne présentent pas ou peu de fluorescence visible (qualifiée de « pas de fluo » ou « -») sont marqués par des triangles (▼). La ligne en pointillé représente la droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$, soit la démarcation entre les deux contributions. Sous cette ligne, l'état 620 contribue plus à la fluorescence totale, au-dessus de cette ligne, c'est la contribution de l'état 634 qui domine. On observe sur cette figure que tous les échantillons présentant une fluorescence visible ont une contribution de l'état 634 dominante, et une contribution de l'état 620 quasiment nulle. Seul un échantillon présente une dominance de l'état 620 et de la fluorescence visible, mais cette fluorescence est qualifiée de « + ou - » par le neurochirurgien. A l'inverse, les échantillons ne présentant pas ou peu de fluorescence présentent une égalité des deux contributions, voire une légère dominance de l'état 620. Seul un échantillon présente peu de fluorescence mais une dominance de l'état 634.

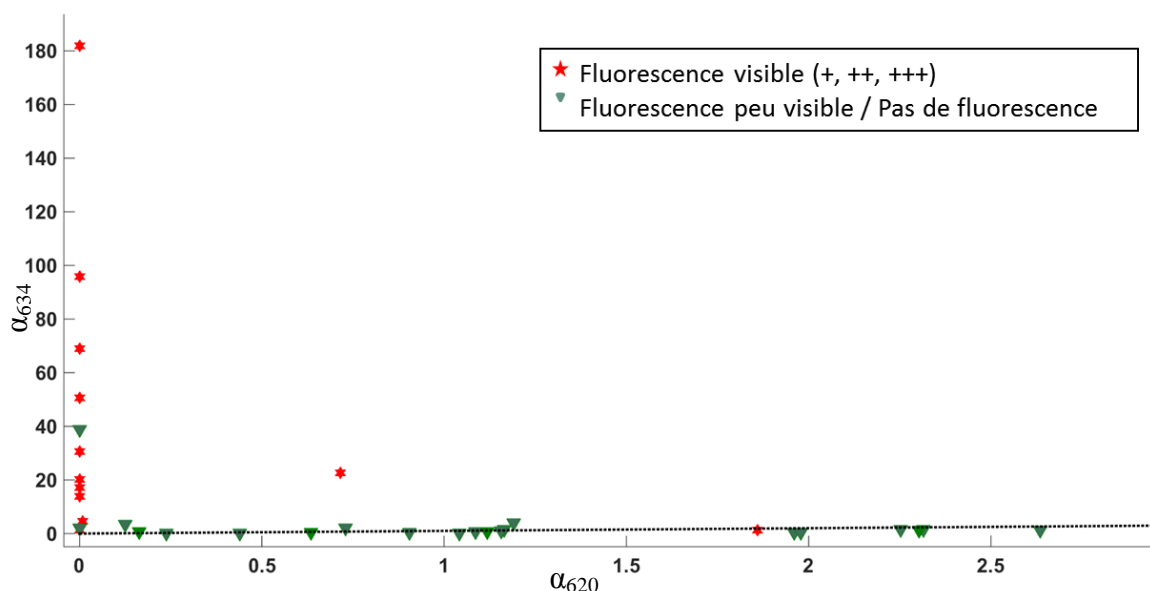


Figure 5-9: Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour les GHG sous excitation à 405 nm et comparaison avec la fluorescence visible : les étoiles rouges représentent les échantillons présentant de la fluorescence visible et les triangles verts représentent les échantillons présentant peu ou pas de fluorescence visible. La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ en pointillés sépare la zone de prédominance de l'état 620 (en bas du graphique) de celle de l'état 634 (en haut du graphique).

Sur la Figure 5-10, nous discriminons les échantillons ne présentant pas de fluorescence, marqués par des triangles (▼) et ceux présentant une fluorescence faible (« → » et « + ou - »), marqués par des carrés (■). Nous conservons une étoile (★) pour les échantillons présentant de la fluorescence forte. Nous ajoutons un zoom de ce tracé dans la partie où la fluorescence de la PpIX est faible. On observe sur cette figure que la majorité des échantillons ne présentant pas de fluorescence visible (▼) indiquent une dominance de l'état 620. Sur les quatre échantillons qui présentent une dominance de l'état 634 là où il n'y a pas de fluorescence visible, l'un est à nuancer car le signal est très bruité. Les échantillons présentant une fluorescence très faible (■) présentent presque tous une contribution sensiblement identique des deux états, avec dominance légère d'un état ou de l'autre. Nous observons cependant dans ces échantillons une contribution de l'état 634 largement inférieure à la contribution de l'état 634 dans la majorité des échantillons présentant une forte fluorescence (★). Ceci est cohérent avec l'hypothèse que la fluorescence visible est liée à la dominance de l'état 634, sachant que le microscope collecte la lumière sur la bande spectrale 620-710 nm.

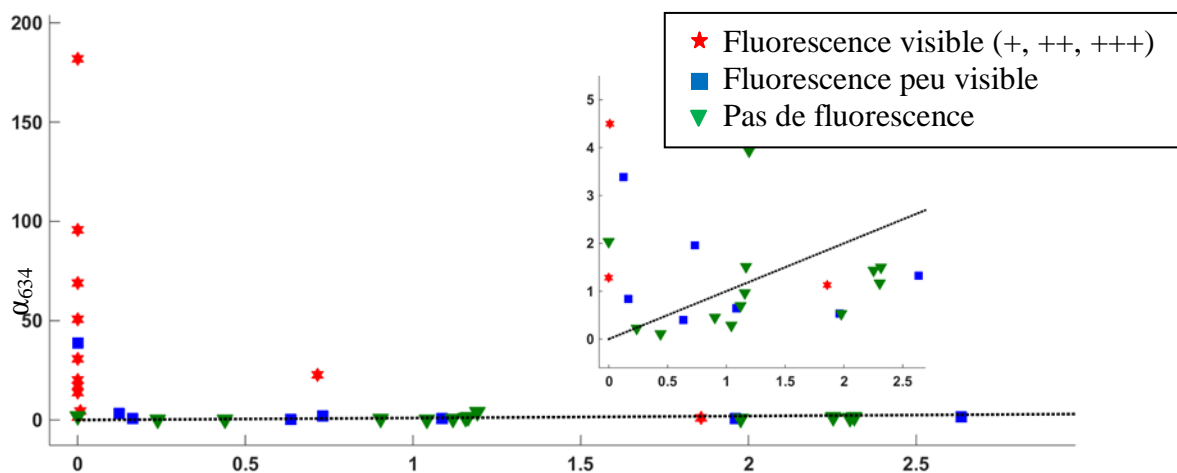


Figure 5-10 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour les GHG sous excitation à 405 nm en fonction de l'intensité de fluorescence visible par microscopie : fluorescence visible (étoiles rouges), peu visible (carrés bleus) ou pas visible (triangles verts). La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions.

Sur la Figure 5-11, nous ajoutons d'un rond noir les échantillons pour lesquels la fluorescence visible n'a pas été évaluée. Il s'agit des échantillons des quatre GBG inclus dans l'étude et d'un GHG qui n'avait pas pris le contraste à l'IRM, donc qui a été classé comme GBG initialement. On remarque sur la Figure 5-11 l'intérêt de notre modèle pour les échantillons dont la fluorescence n'a pas été évaluée. En effet, pour ces échantillons, notre modèle montre une dominance de l'état 620. L'adaptation de notre modèle au microscope actuel permettrait donc d'étendre l'utilisation de la fluorescence de la PpIX à ces échantillons-là, en observant non pas la fluorescence à 634 nm mais celle à 620 nm. Cela permettrait ainsi d'accroître fortement l'utilisation du microscope, en l'ouvrant notamment aux patients souffrant d'un GBG.

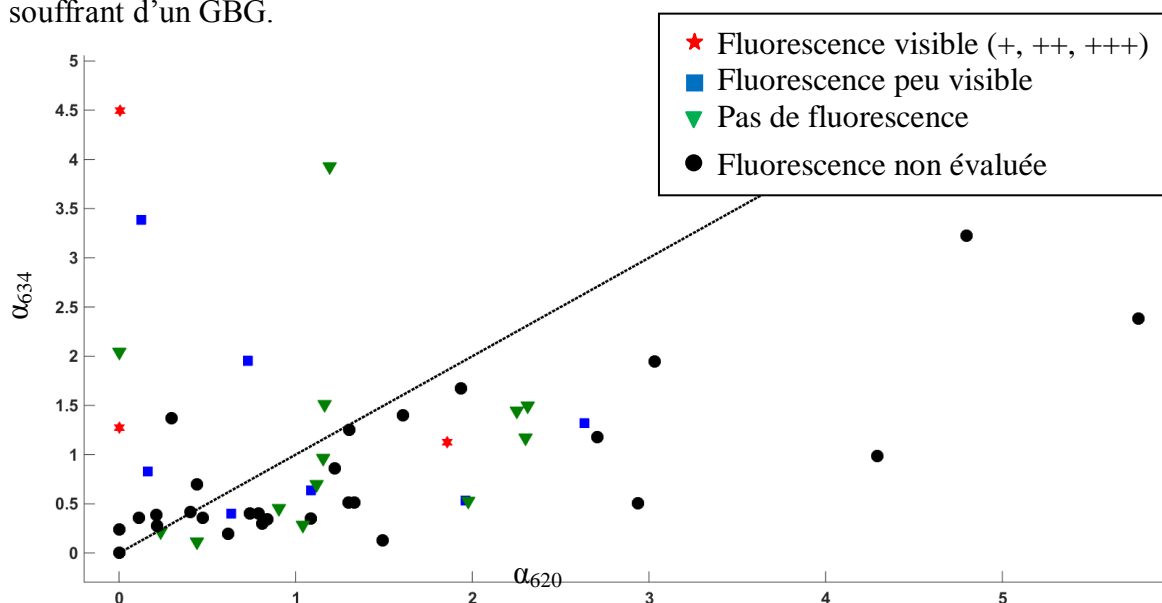


Figure 5-11 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons sous excitation à 405 nm, dans la zone où les échantillons présentent peu (carrés bleus) ou pas (triangles verts) de fluorescence visible, avec ajout des échantillons pour lesquels le microscope n'a pas été utilisé (ronds noirs). La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions.

5.3.2.2 - Comparaison avec la prise de contraste

En complément de la microscopie de fluorescence, et pour l'assister dans l'identification des marges tumorales, le neurochirurgien dispose d'une image RMN préopératoire présentant un hypersignal localisant la tumeur (voir Chapitre 1). Cette image, couplée à un système de neuronavigation, permet au neurochirurgien de localiser la tumeur et ses outils et ainsi de se repérer dans le champ opératoire par rapport à l'hypersignal. Nous utilisons cette technique « GPS » pour localiser aussi nos mesures par rapport à cet hypersignal. Nous séparons les échantillons localisés « dans » l'hypersignal, « à la limite » de l'hypersignal et « hors » de l'hypersignal. La Figure 5-12 présente la contribution de chaque état en fonction de la prise de contraste du gadolinium pour les GHG. On remarque que tous les échantillons localisés « dans » la prise de contraste (★) présentent une dominance de l'état 634, sauf un qui présente une faible contribution de chaque état, avec une légère dominance de l'état 620, comme présenté sur le zoom dans l'encart de la Figure 5-12. Ceci pourrait être corrélé au phénomène de *brain shift*, cet échantillon est peut-être en limite de prise de contraste. On remarque sur cette Figure 5-12 que la majorité des échantillons à la limite de l'hypersignal (■) présentent une forte contribution de l'état 634. Enfin, le zoom dans la zone où la contribution de l'état 634 est faible atteste la domination de l'état 620 dans les échantillons qui sont localisés hors de la zone de contraste (▼). Ceci montre l'intérêt du modèle par rapport à l'IRM préopératoire puisque nous détectons de la fluorescence de l'état 620 dans les échantillons localisés hors de la prise de contraste. Il faut maintenant prouver que cette fluorescence est caractéristique du tissu tumoral, ce qui sera discuté dans la partie 5.3.2.3 -. Par ailleurs, lors de l'analyse d'un échantillon par rapport à sa localisation sur l'image RMN préopératoire, il est important de prendre en considération le phénomène de *brain shift* qui n'est pas corrigé, et qui peut donc expliquer la dominance de l'état 620 dans l'échantillon situé théoriquement dans la prise de contraste. En effet, le décalage de localisation pouvant atteindre 2 à 3 cm, cet échantillon était peut-être en réalité en limite de prise de contraste.

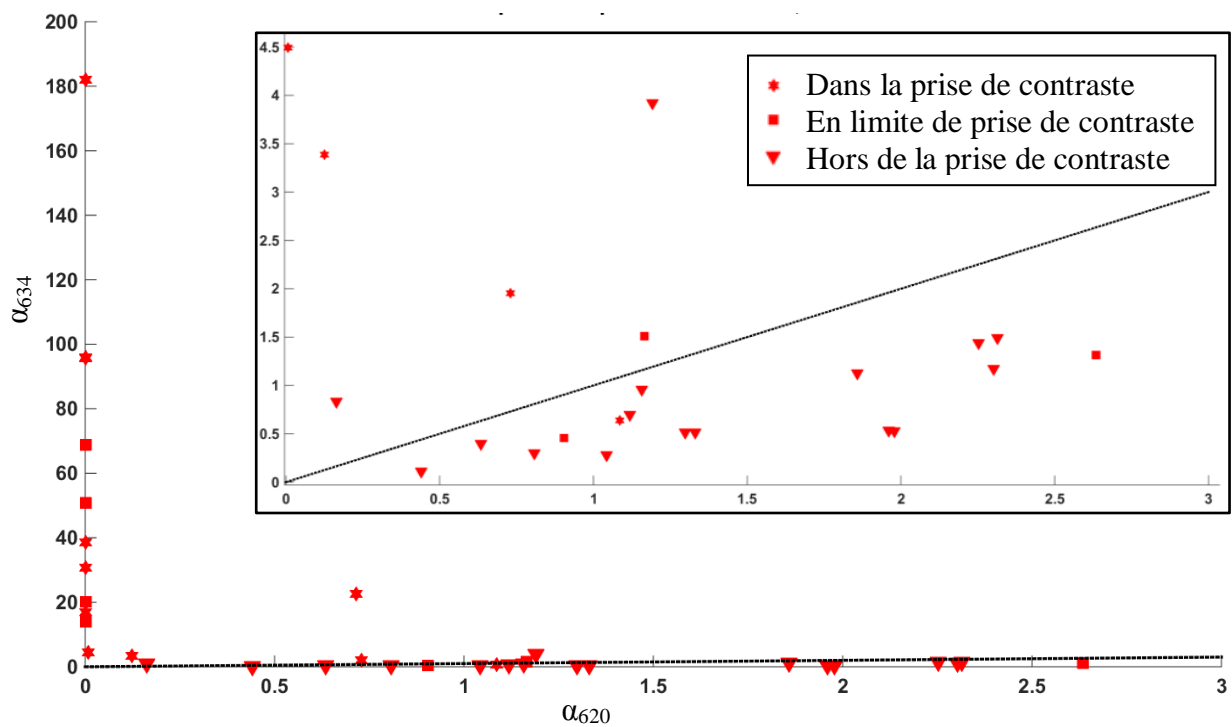


Figure 5-12 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons des GHG sous excitation à 405 nm et comparaison avec la localisation de la mesure par rapport à la prise de contraste de l'image RM préopératoire. Les étoiles représentent les échantillons dans la prise de contraste, les carrés ceux en limite de prise de contraste et les triangles ceux hors de la prise de contraste. L'encadré présente un zoom de la zone de faible contribution des deux états et la droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions.

La Figure 5-13 présente la contribution de chaque état en fonction du temps T2 renvoyé par la séquence FLAIR pour les GBG. On observe que la contribution de l'état 634 est inférieure à celle de l'état 620 dans tous ces échantillons. Toutefois, aucune classification suivant l'hypersignal ne semble possible avec notre modèle. Les variations de temps T2 ne semblent donc pas liées aux variations de fluorescence.

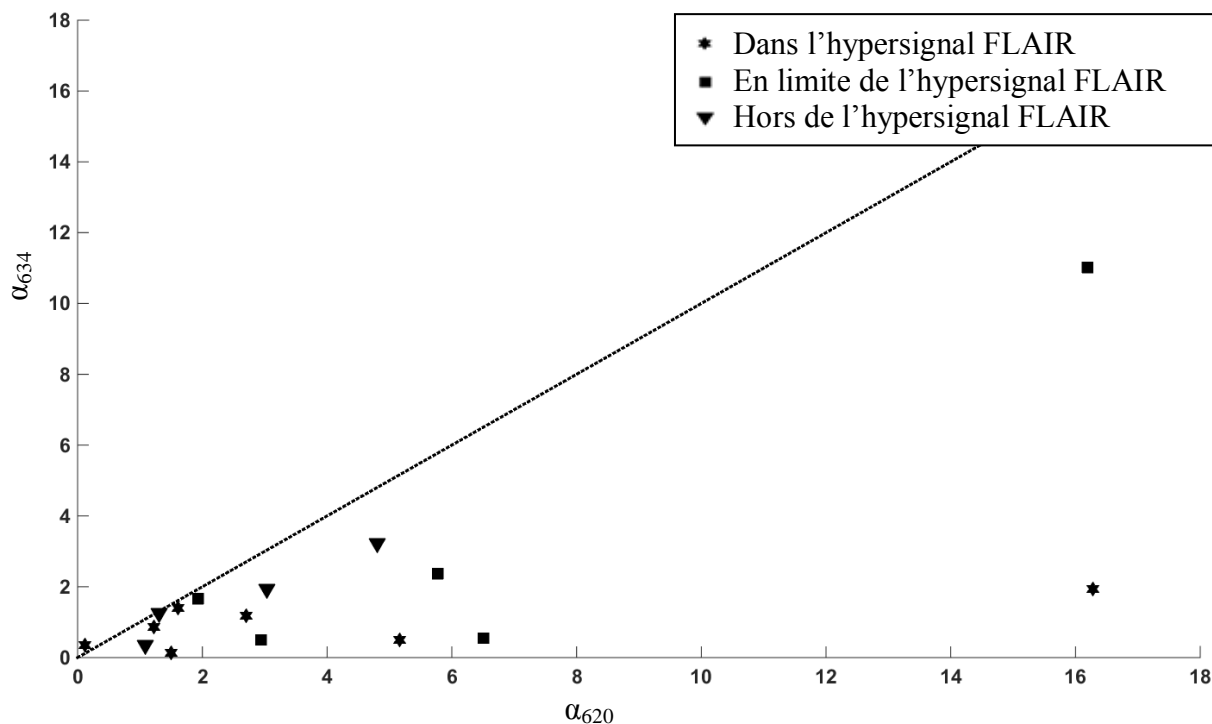


Figure 5-13 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons des GBG sous excitation à 405 nm et comparaison avec la localisation de la mesure par rapport à l'hypersignal FLAIR de l'image RM préopératoire. Les étoiles représentent les échantillons situés dans l'hypersignal, les carrés ceux en limite d'hypersignal et les triangles ceux hors de l'hypersignal. La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions.

5.3.2.3 - Comparaison avec la classification anatomo-histopathologique

Si la localisation sur l'hypersignal de l'image RMN préopératoire donne une information temps réel intéressante mais nuancée par le phénomène de *brain shift*, la technique de référence aujourd'hui est la classification par l'étude anatomo-histopathologique. Il est donc intéressant de confronter le tracé des deux contributions avec la classification anatomo-histopathologique. Cette classification des tissus sondés par 'l'analyse anatomo-histopathologique a été présentée dans le Chapitre 4. Nous étudions donc maintenant la même représentation 2D d'une contribution en fonction de l'autre que dans les paragraphes précédents, mais avec des marqueurs différents en fonction de la classe des échantillons. C'est ce qui est représenté sur les Figure 5-14, Figure 5-15 et Figure 5-16, toujours sous excitation à 405 nm et mesure *in vivo*.

La Figure 5-14 présente la contribution de chaque état renvoyée par l'ajustement des spectres émis par les GHG sous excitation à 405 nm. On y observe que l'état 634 domine largement dans les cœurs tumoraux (✚), ce qui est cohérent avec les données de la littérature qui utilisent uniquement cet état pour ajuster leurs spectres. Dans leurs marges (◆), on observe une contribution majoritaire de l'état 634 ce qui reste cohérent avec l'utilisation de cet état pour identifier les infiltrations à l'aide du microscope actuel. En revanche, nous observons une prédominance de l'état 620 dans leurs marges peu denses (◻) et le tissu sain (▼).

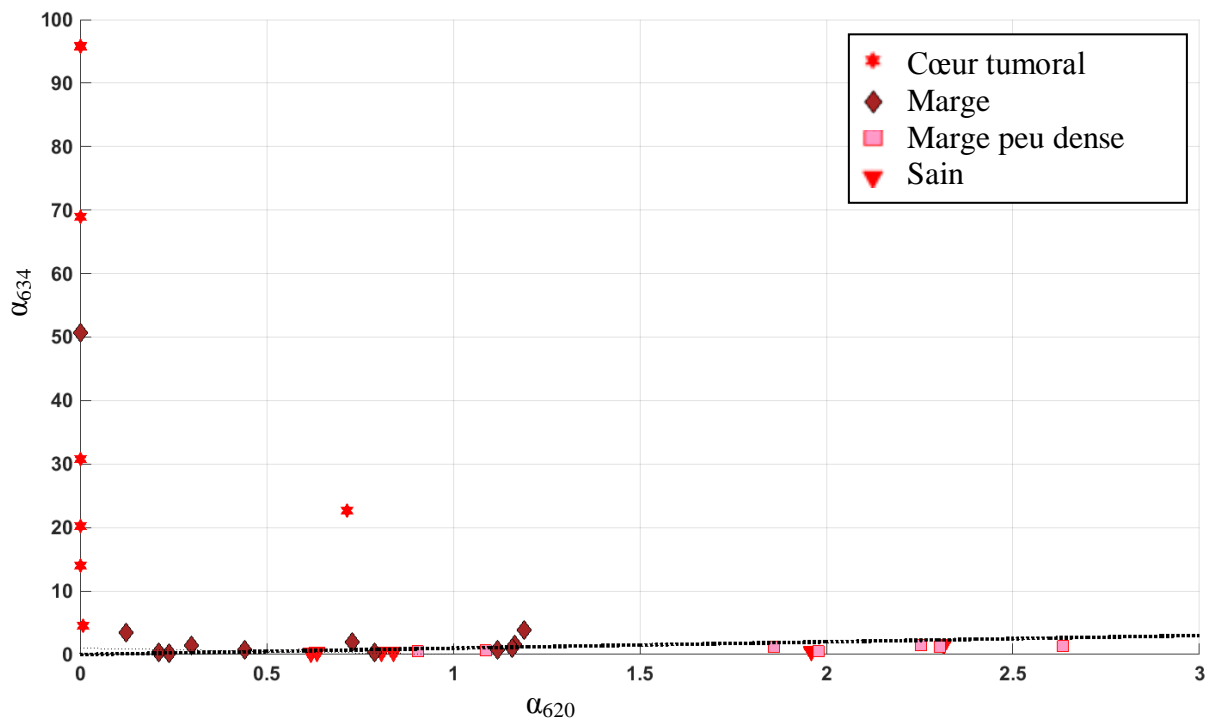


Figure 5-14 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons des GHG sous excitation à 405 nm et comparaison avec leur classification anatomo-histopathologique. Les étoiles rouges représentent les cœurs tumoraux, les losanges bordeaux représentent les marges, les carrés roses représentent les marges peu denses et les triangles rouges le tissu sain. La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions.

Par ailleurs, en comparaison avec la Figure 5-9, nous observons que les cœurs et certaines marges tumorales des GHG sont les échantillons qui présentaient de la fluorescence visuelle (échantillons alignés avec l'axe des ordonnées). Ainsi, pour ces échantillons, notre modèle est cohérent avec les résultats existants. En revanche, alors qu'elles ne présentent pas de fluorescence visible par microscopie, les marges peu denses des GHG présentent une dominance de l'état 620, ce qui montre l'intérêt de notre modèle pour identifier ces marges.

La Figure 5-15 propose les résultats de l'ajustement des GBG. On remarque que leurs marges (\diamond) présentent elles aussi une légère domination de l'état 620 alors qu'elles ne présentent pas de fluorescence visible, comme l'illustre la Figure 5-11.

Ainsi, les Figure 5-14 et Figure 5-15 démontrent l'intérêt du modèle pour identifier les marges peu denses des GHG et les marges des GBG, qui ne sont pas identifiables par les techniques actuelles.

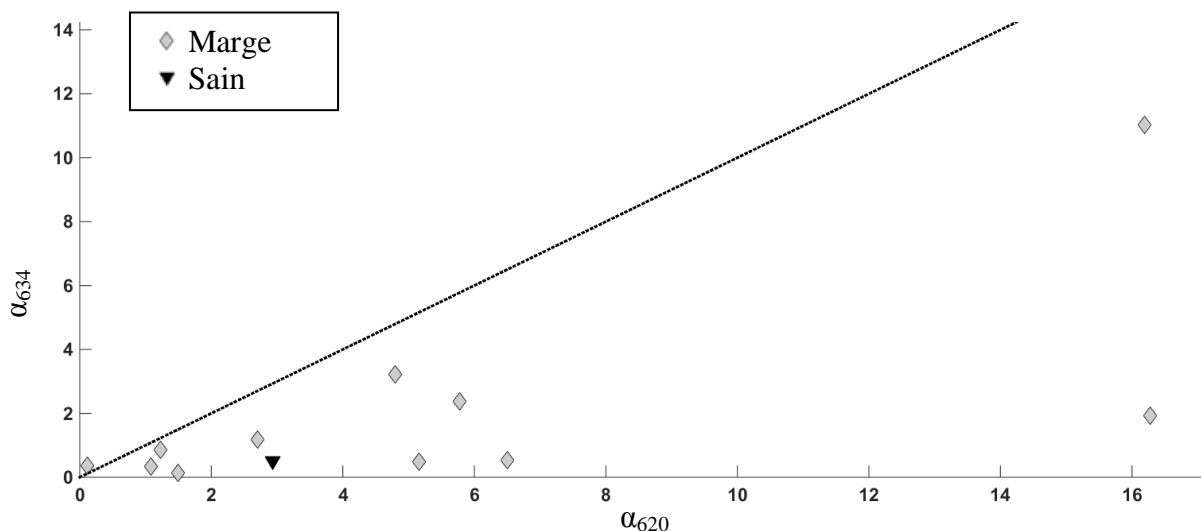


Figure 5-15 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons des GBG sous excitation à 405 nm et comparaison avec leur classification anatomo-histopathologique. Les losanges gris représentent les marges et le triangle noir le tissu sain. La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions.

Le but final de la méthode est de réussir à discriminer le tissu sain des marges peu denses. Sur la Figure 5-16, nous nous intéressons particulièrement aux échantillons sains (\blacktriangledown en provenance des GHG et \blacktriangledown en provenance des GBG). On peut observer qu'ils présentent aussi une légère prédominance de l'état 620 et qu'on ne peut donc pas les discriminer des marges seulement en fonction de la contribution des deux états.

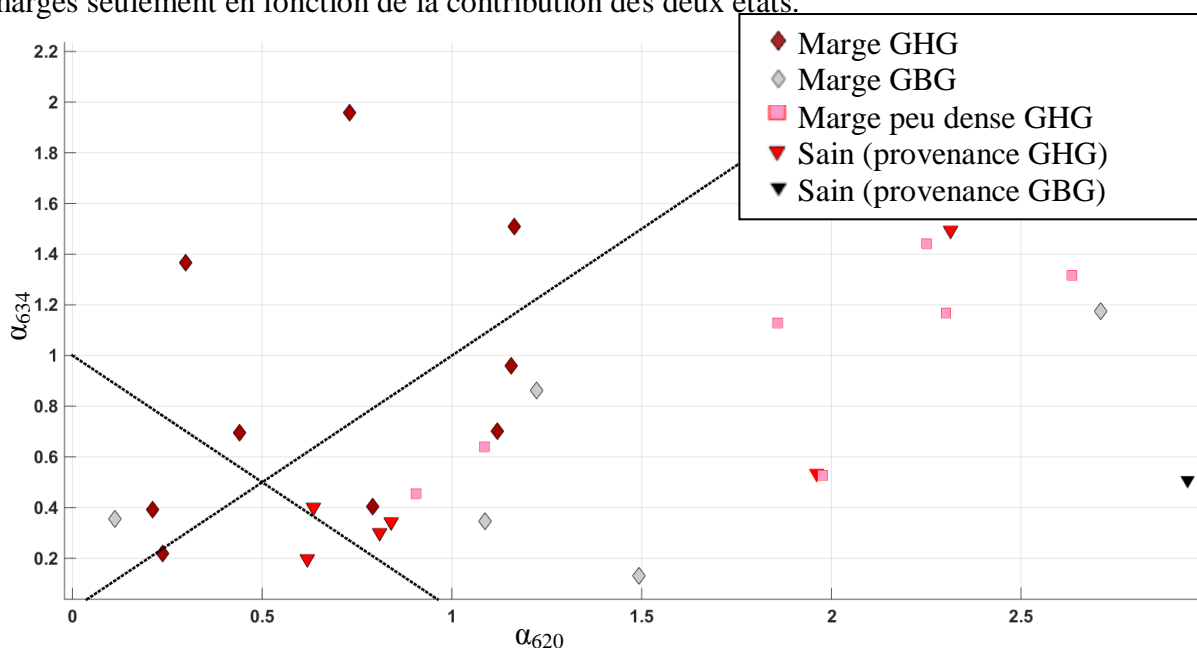


Figure 5-16 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons dans la zone de faible concentration en PpIX et comparaison avec leur classification anatomo-histopathologique, sous excitation à 405 nm. Les losanges bordeaux représentent les marges des GHG, les losanges gris représentent les marges des GBG, les carrés roses représentent les marges peu denses des GHG et les triangles rouges le tissu sain provenant d'un GHG et le triangle noir le tissu sain provenant d'un GBG. La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions et l'autre ligne dénote la séparation de domination de fluorescence émise par la PpIX (au-dessus) de celle induite par l'autofluorescence (en dessous).

La présence de PpIX dans les tissus sains était attendue puisque la PpIX fait partie du cycle de biosynthèse de l'hème et est donc présente dans toutes les cellules du corps humain. Une prédominance de l'état 634 dans les cellules tumorales est bien documentée dans la littérature et nous avons montré la prédominance de l'état 620 dans certaines marges. Il faut maintenant trouver un biomarqueur pour discriminer ces marges du tissu sain. Nous proposons de comparer la quantité de fluorescence due à la PpIX avec l'autofluorescence (i.e, la quantité de fluorescence due aux autres fluorophores). La ligne reliant les points (0,1) et (1,0) présente sur la Figure 5-16 permet de séparer la zone où la fluorescence due à la PpIX est plus importante (au-dessus de la ligne) de la zone où l'autofluorescence domine (sous cette ligne). On observe sur cette figure que les échantillons tumoraux sont principalement situés au-dessus de la ligne $y=1-x$ et que quatre échantillons sains sur sept sont situés sur cette ligne. Ainsi, les échantillons sains présentent une quantité de fluorescence due à la PpIX similaire à la quantité d'autofluorescence du tissu. On observe que deux échantillons sains situés dans la zone où la PpIX domine présentent un phénomène de gliose. Enfin, les échantillons tumoraux situés sous cette ligne présentent un faible RSB, néanmoins au-dessus du seuil proposé empiriquement.

5.3.3 - Comparaison aux autres longueurs d'onde d'excitation *in vivo*

Les résultats présentés dans la partie 5.3.2 - ont été présentés pour une excitation à 405 nm et mesures *in vivo*. Les Figure 5-17 et Figure 5-18 présentent les résultats des mesures *in vivo* avec une excitation respectivement à 385 nm et 420 nm. Ces figures présentent la contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 avec des marqueurs représentatifs de la classe et du grade du gliome et un encadré présentant un zoom de la zone de faible contribution des deux états selon le même code couleur que celui utilisé pour présenter les résultats obtenus sous excitation à 405 nm.

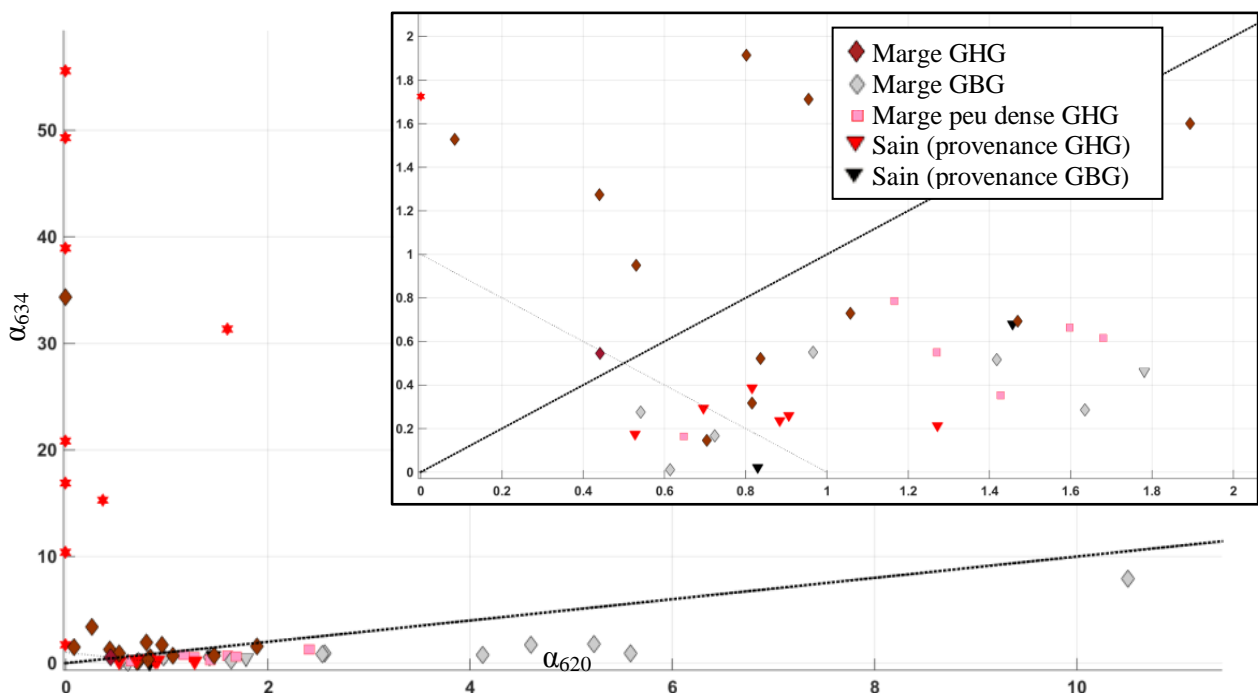


Figure 5-17 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons sous excitation à 385 nm avec un zoom dans la zone de faible contribution des deux états. Les échantillons sont représentés en fonction de leur classification anatomo-histopathologique (classe et grade). La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions et la droite reliant les points (1,0) et (0,1) présente la séparation de la zone où il y a plus d'autofluorescence (sous cette droite) de la zone où il y a plus de signal provenant de la PpIX.

On observe sur la Figure 5-17 la même tendance que sur les Figure 5-14, Figure 5-15 et Figure 5-16 : l'état 634 domine dans les cœurs tumoraux et marges denses des GHG alors que l'état 620 domine dans les marges peu denses et les échantillons sains des GHG ainsi que dans les marges des GBG. Nous confirmons ici la tendance relevée pour discriminer le tissu sain : ces derniers échantillons se situent autour de la droite où la fluorescence induite par les autres fluorophores est égale à celle induite par la PpIX, comme nous pouvons l'observer sur l'encadré de la Figure 5-17. Toutefois, on observe sur cette même figure que l'état 634 est moins excité par la DEL385 puisque sa contribution dans les cœurs tumoraux vaut 55 au maximum (en unité arbitraires) alors qu'elle vaut presque 100 sous excitation à 405 nm.

Nous avons précédemment souligné que la quantité d'autofluorescence variait suivant la source d'excitation et que, parmi nos trois sources d'excitation, la longueur d'onde 385 nm était optimale pour exciter le NADH. Ceci donne une autofluorescence plus élevée sous excitation à 385 nm pour une même concentration en PpIX. Les spectres étant normalisés par cette autofluorescence plus élevée, les résultats de l'ajustement sont minimisés en comparaison avec ceux renvoyés par la DEL405. Ainsi, la division par l'autofluorescence induit donc un biais dans la comparaison inter DEL.

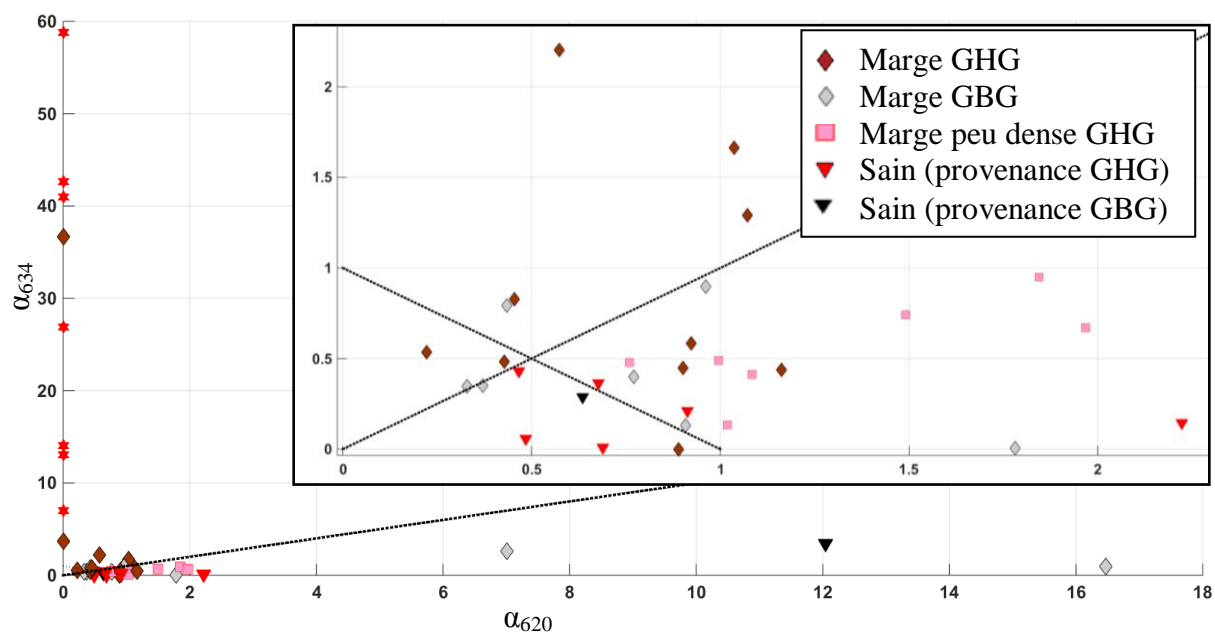


Figure 5-18 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons sous excitation à 420 nm avec un zoom dans la zone de faible contribution des deux états. Les échantillons sont représentés en fonction de leur classification anatomo-histopathologique (classe et grade). La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions et la droite reliant les points (1,0) et (0,1) présente la séparation de la zone où il y a plus d'autofluorescence (sous cette droite) de la zone où il y a plus de signal provenant de la PpIX.

On observe sur la Figure 5-18 qu'une excitation à 420 nm permet aussi d'exciter la PpIX et d'obtenir des tendances proches de ce qui a été observé sous excitation à 405 nm. On remarque ainsi qu'on peut toujours discriminer les cœurs et marges des GHG, même si la contribution de l'état 634 dans ces échantillons est moins élevée qu'à 405 nm. En effet, le maximum de contribution de l'état 634 vaut 60 sous excitation à 420 nm et presque 100 sous excitation à 405 nm. En revanche, on observe ici que la discrimination des gliomes de bas grade est moins nette (certains présentant une égalité des contributions, voire une dominance de la contribution de l'état 634). On observe aussi une augmentation des échantillons pour lesquels la contribution de la PpIX est inférieure à celle des autres fluorophores.

Nous confirmons ici l'intérêt de la DEL385 dont le choix est fondé sur les spectres d'absorption des deux états puisqu'elle permet de retrouver des informations similaires à celles apportées par la DEL405. L'intérêt de la DEL420 est moins prononcé devant celui de la DEL405 même si elle permet de confirmer les tendances déjà observées. Nous montrons ici que l'information apportée par les 3 DELs présente la même tendance et donc que le modèle proposé ne permet pas, à ce stade, de justifier l'intérêt de l'excitation multi-longueurs d'onde. Cependant, nous avons montré sur fantômes que les trois DELs apportaient une information différente et certainement complémentaire, que ne nous retrouvons pas ici probablement à cause du choix de normalisation par l'autofluorescence et par une analyse séquentielle de l'information renvoyée par les trois DELs. L'intérêt de l'excitation multi-longueurs d'onde sera plus manifeste à travers une étude rapportée dans la partie 5.4 -.

5.3.4 - Comparaison des mesures *in vivo* avec les mesures *ex vivo*

Les mesures ont été réalisées *in vivo* puis *ex vivo* pour chaque échantillon. Dans le cadre de l'étude, la réalisation d'une mesure *ex vivo* permet d'obtenir une deuxième mesure par échantillon. Dans un but clinique, les limites réglementaires sont moins drastiques sur les biopsies que celles *in vivo* et on pourrait donc largement augmenter les temps d'acquisition et/ou la puissance des DELs afin d'augmenter le RSB. Ce n'est pas ce que nous avons étudié dans cette thèse mais peut être une piste pour la suite : si la mesure *in vivo* n'est pas assez discriminante, la mesure *ex vivo* pourrait remplacer les études anatomo-histopathologiques extemporanées. Dans le cadre de l'étude clinique, les mesures *ex vivo* ont été effectuées suivant le même protocole que les mesures *in vivo*, soit 6/12/6 couples d'acquisitions de 200 ms respectivement aux DEL385, DEL405 et DEL 420. La Figure 5-19 présente les résultats des mesures *ex vivo* sous excitation à 385 nm. La Figure 5-20 présente ces résultats *ex vivo* sous excitation à 405 nm et la Figure 5-21 présente les résultats *ex vivo* sous excitation à 420 nm. Sur ces 3 figures, l'encadré présente un zoom dans la zone où la contribution de la PpIX est faible, qui correspond à la zone avec peu ou pas de fluorescence visible. Sur ces figures, le code couleur utilisé reste le même que précédemment.

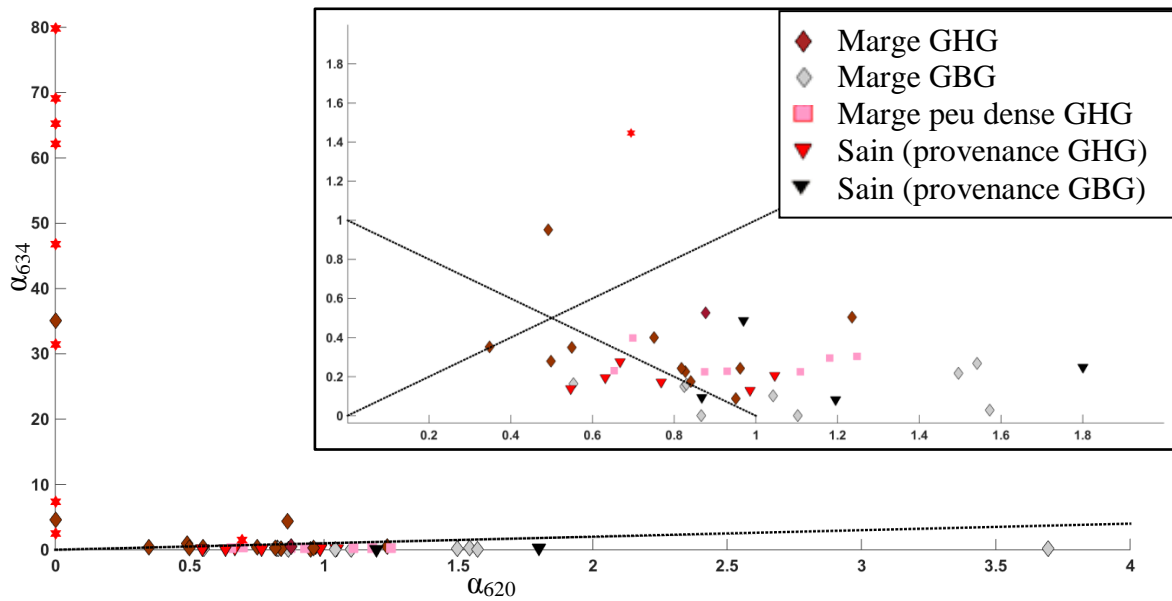


Figure 5-19 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons sous excitation à 385 nm et mesures *ex vivo*. L'encadré présente un zoom dans la zone de faible contribution des deux états. Les échantillons sont représentés en fonction de leur classification anatomo-histopathologique (classe et grade). La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions et la droite reliant les points (1,0) et (0,1) présente la séparation de la zone où il y a plus d'autofluorescence (sous cette droite) de la zone où il y a plus de signal provenant de la PpIX.

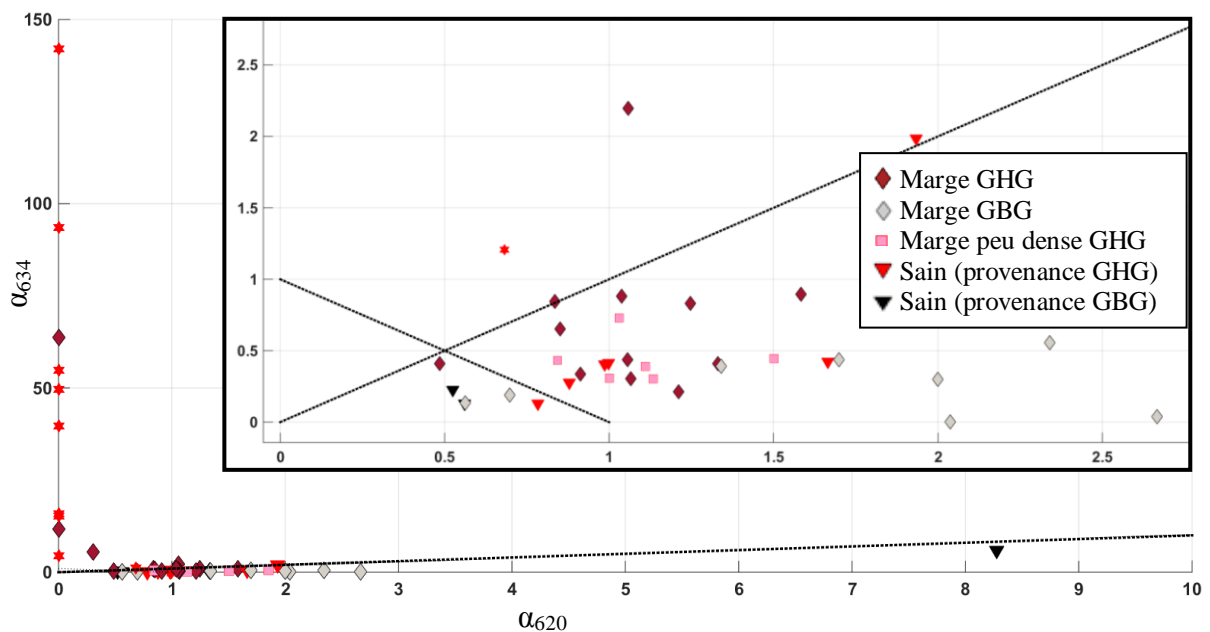


Figure 5-20 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons sous excitation à 405 nm et mesures *ex vivo*. L'encadré présente un zoom dans la zone de faible contribution des deux états. Les échantillons sont représentés en fonction de leur classification anatomo-histopathologique (classe et grade). La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions et la droite reliant les points (1,0) et (0,1) présente la séparation de la zone où il y a plus d'autofluorescence (sous cette droite) de la zone où il y a plus de signal provenant de la PpIX.

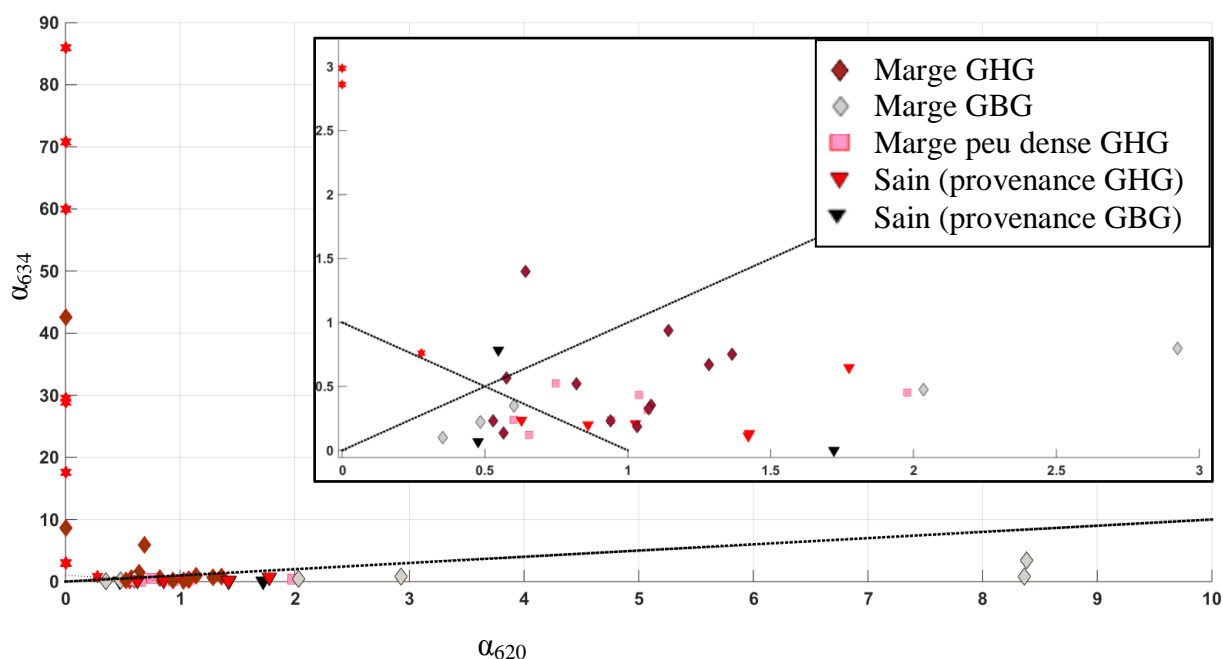


Figure 5-21 : Contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620 pour tous les échantillons sous excitation à 420 nm et mesures *ex vivo*. L'encadré présente un zoom dans la zone de faible contribution des deux états. Les échantillons sont représentés en fonction de leur classification anatomo-histopathologique (classe et grade La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions et la droite reliant les points (1,0) et (0,1) présente la séparation de la zone où il y a plus d'autofluorescence (sous cette droite) de la zone où il y a plus de signal provenant de la PpIX.

En comparant les Figure 5-19, Figure 5-20 et Figure 5-21 avec les Figure 5-17, Figure 5-16 et Figure 5-18 respectivement, nous remarquons que, pour un même échantillon, une même source d'excitation mais une condition de mesure qui change (*in vivo* ou *ex vivo*), les contributions des deux états varient en intensité, avec une intensité plus élevée *ex vivo*. On note par exemple une contribution maximale à 140 (ua) *ex vivo* et 95 (ua) *in vivo* sous excitation à 405 nm. Ceci peut s'expliquer par différents phénomènes. Tout d'abord, le prélèvement peut avoir été légèrement décalé par rapport à l'endroit de la mesure *in vivo*. Ensuite, l'échantillon peut avoir pivoté entre la mesure *in vivo* et celle *ex vivo*. La mesure sur biopsie peut donc avoir été effectuée à un endroit légèrement différent. Enfin, la mesure *in vivo* est plus compliquée à réaliser, l'échantillon étant moins accessible, ceci peut engendrer des différences de mesure, comme proposé dans la partie 5.2.2 -. Ces légères variations ne contredisent cependant pas nos hypothèses, les échantillons avec une large domination de l'état 634 restent les cœurs et les marges des GHG dans les mesures sur biopsies. Les GBG et marges peu denses des GHG restent sous la droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ donc dans la zone où l'état 620 domine. Enfin, les échantillons sains restent dans la zone où la contribution de la PpIX à la fluorescence totale est semblable à celle des autres fluorophores.

Le Tableau 5-1 montre que le RSB est meilleur sur les mesures *ex vivo*. Dans le but d'obtenir une classification anatomo-histopathologique extemporanée, l'utilisation de ce système avec des sources plus puissantes et un temps d'acquisition un peu plus long pourrait être envisagée afin d'améliorer encore plus le RSB pour obtenir une classification temps réel

de la biopsie, ce qui est une autre utilisation potentielle et grandement intéressante de notre système.

5.3.5 - Conclusion de l'analyse paramétrique et perspectives

Dans cette partie, nous avons utilisé le modèle d'ajustement développé sur fantômes dans le Chapitre 3 pour analyser les données spectrales collectées dans le cadre de l'étude clinique. Grâce à ce modèle d'ajustement, nous avons tout d'abord prouvé que nous pouvions retrouver *in vivo* les résultats de l'étude préliminaire *ex vivo* en montrant que le ratio des deux contributions tend vers 0 pour les cœurs des GHG et 1 ou plus sinon. Par ailleurs, nous avons montré les limites de ce ratio des deux contributions et proposé en complément une étude graphique des deux contributions. Ce graphique permet de conserver toute l'information renvoyée par le fit, contrairement à l'étude du ratio. En effet, si l'on étudie par exemple un échantillon $E_1(0.5,0.5)$ et un échantillon $E_2(4,4)$, le ratio des deux contributions vaut 1 donc on peut exclure la probabilité d'être dans un cœur tumoral mais on ne peut en dire plus. La représentation graphique permet de formuler l'hypothèse que l'échantillon E_1 est dans la zone saine alors que l'échantillon E_2 est dans la zone de marges tumorales.

Par ces graphes d'une contribution en fonction de l'autre, nous avons tout d'abord montré que notre modèle permettait de retrouver l'information donnée par les techniques actuelles pour les GHG (fluorescence visible et IRM). En effet, notre modèle nous permet de retrouver l'information donnée par la fluorescence visible (zone où la contribution de l'état 634 domine) et même de dépasser les limites de cette technique pour proposer une discrimination cohérente avec l'étude anatomo-histopathologique, qui est la technique de référence. Sur ce graphique, nous avons ainsi mis en évidence que la densité de cellules tumorales est liée à la proportion des deux états dans les échantillons tumoraux. Nous avons aussi proposé une piste de discrimination entre les marges tumorales et le tissu sain, même s'il faudrait plus d'échantillons pour confirmer cette tendance.

La Figure 5-22 présente les zones pressenties pour chaque classe après cette étude. Ces zones seront à valider avec plus d'échantillons mais cette classification semble prometteuse pour dépasser les limites de sensibilité des techniques actuelles, en détectant de la fluorescence de la PpIX dans tous les échantillons, sous la forme de deux états, et non uniquement dans les cœurs et marges relativement denses des GHG, sous la forme d'un seul état.

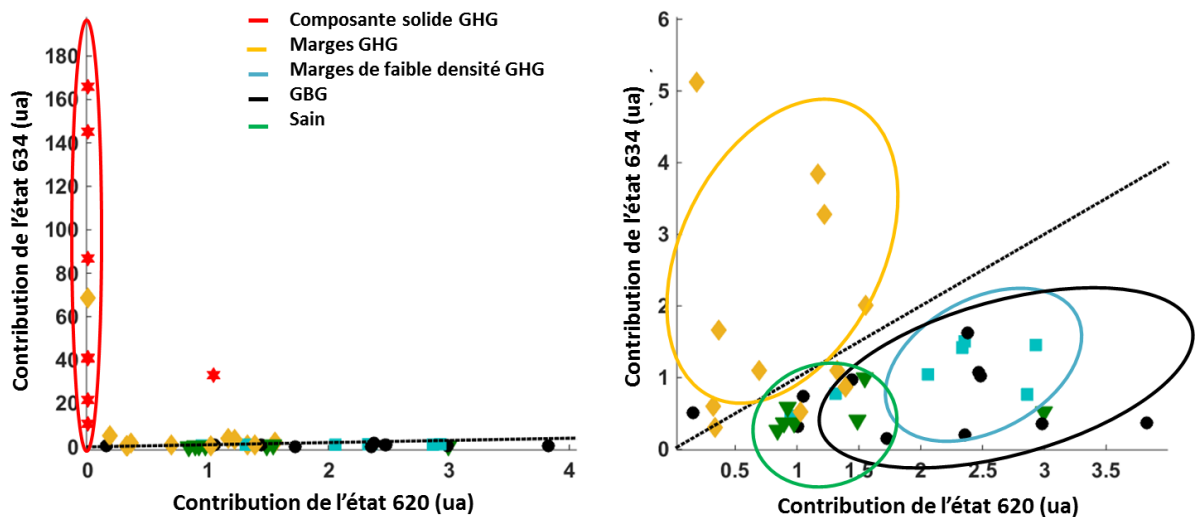


Figure 5-22 : Classification proposée pour les échantillons analysés, sous excitation à 405 nm, sur un graphique représentant la contribution de l'état 634 en fonction de celle de l'état 620. En vert, la zone saine. En bleu, la zone légèrement infiltrée des GHG, en jaune la zone avec infiltrations des GHG visibles par les techniques actuelles, en noir, les gliomes de bas grade et en rouge les cœurs tumoraux et marges denses des GHG. La droite $\alpha_{634}=\alpha_{620}$ dénote l'égalité des contributions.

Enfin, l'ébauche de classification proposée se fonde sur l'observation d'un graphe $\alpha_{634}=f(\alpha_{620})$ et propose donc des paramètres qualitatifs. Des paramètres quantitatifs traduisant ces zones pourraient être le module et la phase du nombre complexe z défini par $z = \alpha_{620} + i\alpha_{634}$. La Figure 5-23 propose le tracé du module en fonction de la phase sous excitation à 405 nm pour les mesures *in vivo*, avec des marqueurs pour chaque classe de tissu, toujours après retrait des patients de faible RSB. L'encadré présente un zoom dans la zone de faible phase et faible module.

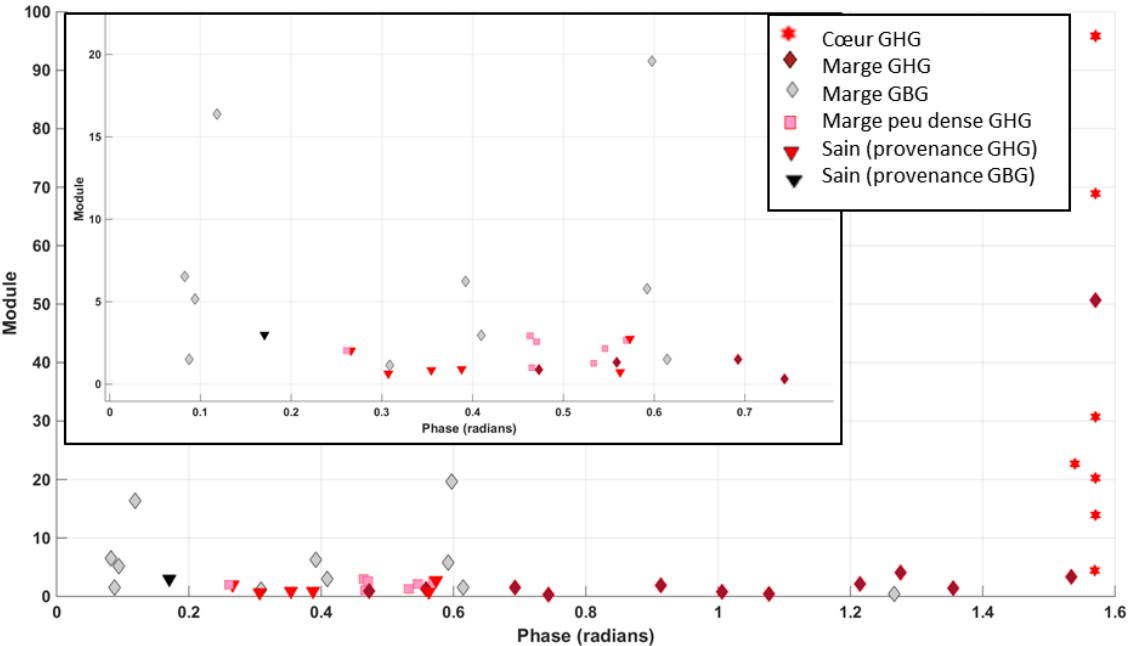


Figure 5-23 : Module et phase d'un nombre complexe défini comme $z = \alpha_{620} + i\alpha_{634}$ en fonction de la classe du tissu.

Nous observons sur cette Figure 5-23 que différentes zones semblent se détacher en fonction de la classe des tissus. Pour les GHG (rouge), on observe une décroissance de la phase avec la diminution en cellules tumorales, ce qui est cohérent avec les ratios observés sur la Figure 5-7. Pour les GBG (noir), on observe une phase qui varie mais qu'on ne peut séparer de la phase des tissus sains, ce qui corrobore les résultats du ratio. On observe cependant que le module de la majorité des marges des GBG est supérieur à celui des échantillons sains, ce qui permettrait de les discriminer.

5.4 - Intérêt de l'excitation multi-longueurs d'onde : représentation 3D

Dans la partie précédente, nous avons comparé les résultats de l'ajustement des spectres émis par un même échantillon en fonction de chaque source d'excitation séparément. Nous proposons dans cette partie d'étudier l'intérêt de l'excitation multi-longueurs d'onde en étudiant conjointement les spectres renvoyés par un même échantillon suivant les trois sources d'excitation. Dans ce but, nous proposons une représentation 3D des spectres obtenus après le post-traitement présenté partie 5.1 -. Pour chaque échantillon, les spectres obtenus pour chaque DEL entre 608 nm et 637 nm sont tracés en 3D. Les coordonnées S_k de chaque point k du spectre 3D sont représentées sous la forme : $S_k (I_m^{385}, I_m^{405}, I_m^{420})$ où I_m^j est l'intensité reçue à la longueur d'onde m , sous excitation à j nm. m varie entre 608 et 637 nm.

Ce tracé produit au final un nuage de points 3D pour chaque échantillon. Nous traçons ensuite tous les échantillons d'une même classe sur un même graphe, ce qui donne un nuage de points plus conséquent. Nous commencerons par présenter l'allure de ces graphes suivant la classe et le grade des échantillons. Ensuite, nous présenterons différents paramètres quantitatifs issus de ces graphes qui pourraient par la suite servir de biomarqueurs.

5.4.1 - Allure des graphes 3D

Nous observons dans cette partie l'allure des spectres 3D tracés dans la bande spectrale 608-637 nm en fonction de la classe et du grade des échantillons, en excluant les échantillons de faible RSB. La Figure 5-24 présente les graphes 3D pour chaque classe, après retrait des échantillons présentant un faible RSB. Nous ajoutons sur ces tracés un marqueur de la longueur d'onde 620 nm (▼) et un autre de la longueur d'onde 634 nm (★). Nous avons choisi des axes isométriques pour une meilleure visibilité du poids de chaque source d'excitation. Sur cette Figure 5-24, nous observons les spectres émis par les cœurs tumoraux des GHG (A, rouge), les marges des GHG (B, mauve), les marges des GBG (C, gris), les marges peu denses des GHG (D, cyan), les échantillons sains provenant des GHG (E, vert) et enfin des spectres 3D de bruit simulé (F, noir). Ces spectres de bruit simulés sont gaussiens, avec pour moyenne et écart type ceux du bruit des données saines. Ce bruit des données saines est calculé dans la zone 250-350 nm, comme décrit dans la partie 5.2.2 -. La Figure 5-25 représente le nuage de points des spectres émis par les marges des GHG à l'exception de

la marge très dense, bien visible sur la Figure 5-24B. Si nous avons rendu les axes isométriques au sein de chaque graphe, il est important de noter que les échelles sont très différentes d'un graphe à l'autre, ce qui soutient l'observation 1D des spectres proposée dans la partie 5.2.1 - En effet, nous confirmons ici que les amplitudes diminuent avec la quantité de cellules tumorales, avec un ordre de grandeur de 1 (ua) pour les maxima des intensités des cœurs de GHG et l'une de leurs marges ; 0.1 (ua) pour les marges des GBG et les autres marges des GHG (présentées sur la Figure 5-25) ; et entre 0.1 et 0.01 (ua) pour les marges peu denses et le tissu sain. Nous observons que cette diminution permet de discriminer les cœurs des zones peu ou pas infiltrées (certaines marges, les marges peu denses, le tissu sain) mais ne permet pas de dépasser les limites des techniques actuelles en discriminant les marges peu denses des GHG ou les marges des GBG du tissu sain.

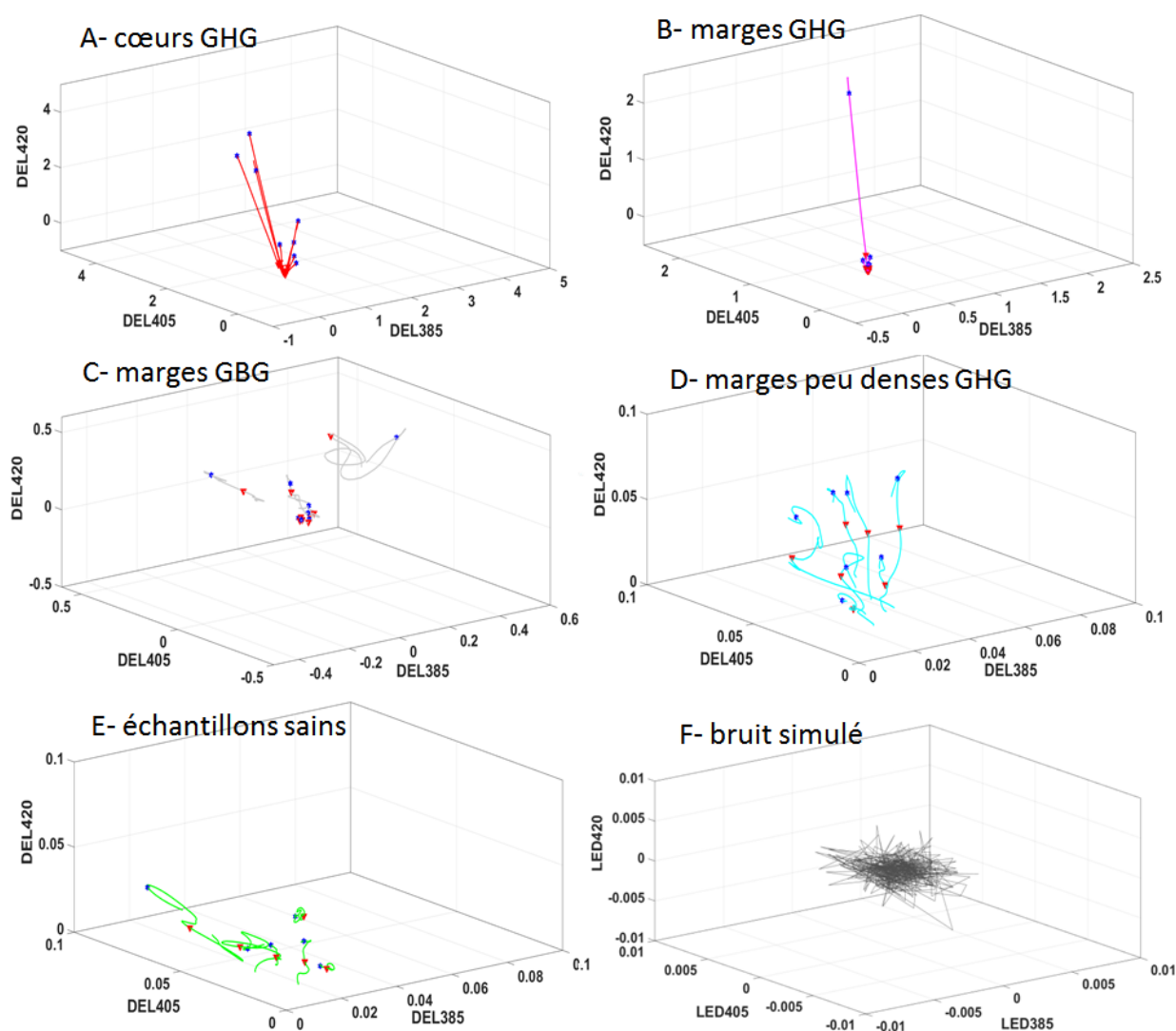


Figure 5-24 : Représentation 3D des spectres des échantillons en fonction de leur classe, acquis entre 608 nm et 637 nm. Les axes représentent l'intensité de fluorescence reçue sur la barrette du spectromètre pour chaque source d'excitation. Figure A : cœurs des GHG, B : marges des GHG, C : marges des GBG, D : marges peu denses des GHG, E : échantillons sains en provenance des GHG, F : bruit simulé. L'étoile bleue indique la longueur d'onde 634 nm et le triangle rouge celle 620 nm.

Par ailleurs, nous savons que des données parfaitement corrélées pour les 3 sources d'excitation apparaîtront comme des droites dans les graphes 3D, illustrant que l'excitation multi-longueurs d'onde a peu d'intérêt. A l'inverse, si les données sont décorrélées, le nuage du point sera plus dispersé, illustrant l'intérêt de l'excitation multi-longueurs d'onde. L'observation de la Figure 5-24 montre que moins l'infiltration en cellule tumorale est dense, moins les données sont alignées, donc moins elles sont corrélées. Nous passons d'un nuage de points proche d'une droite avec pour extrémité la longueur d'onde 634 nm dans les cœurs des GHG à des nuages de points proches de pelotes où les marqueurs des longueurs d'onde 620 nm et 634 nm semblent placés aléatoirement dans les zones moins infiltrées. Enfin, le graphe F montre l'allure de spectres de bruit simulé donc complètement décorrélés. La comparaison des données avec du bruit simulé montre que les données restent globalement corrélées car relativement alignées. Au final, nous observons sur cette Figure 5-24 que les données sont corrélées mais que cette corrélation décroît légèrement avec la quantité en cellules tumorales et donc que chaque mesure spectrale apporte une information différente.

La Figure 5-25 présente un zoom des marges des GHG qui ne sont pas visibles sur la Figure 5-24, en raison de la présence d'une marge très dense. On observe sur cette Figure 5-25 que les tracés présentent une direction privilégiée pointant vers la longueur d'onde 634 nm mais que les lignes sont plus courbes que dans les cœurs des GHG, ce qui traduit une légère décorrélation des spectres.

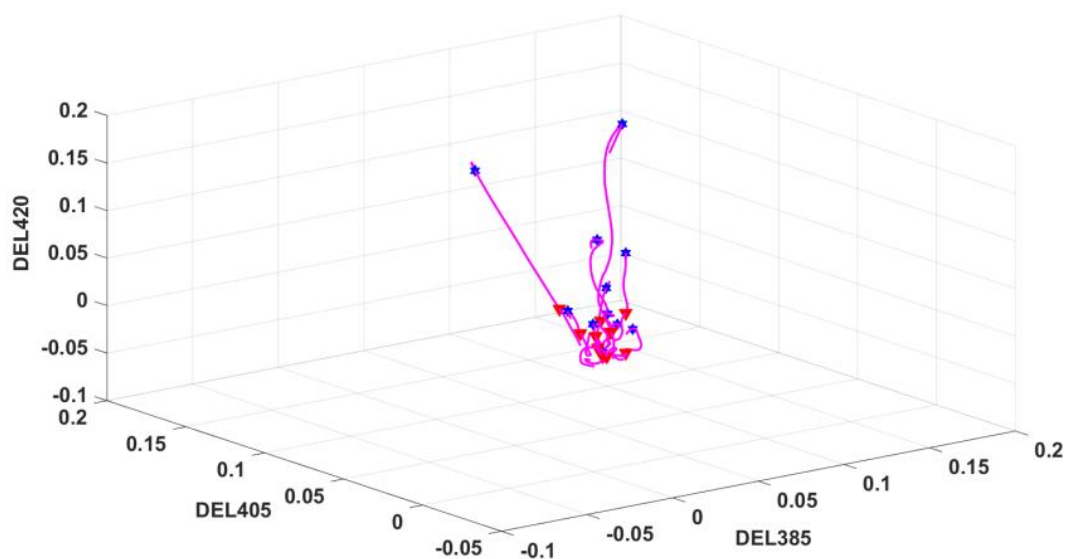


Figure 5-25 : Représentation 3D des spectres émis par les marges des GHG hormis une marge très dense.

5.4.2 - Calcul du volume occupé par le nuage de points de tous les échantillons d'une même classe

L'observation des tracés 3D des Figure 5-24 et Figure 5-25 confirme qualitativement l'intérêt de l'excitation multi-longueurs d'onde et la diminution de la corrélation des données

avec la diminution de la densité en cellules tumorales. Afin de quantifier ces observations, nous proposons tout d'abord de calculer le volume occupé par une classe.

Pour calculer ce volume, nous effectuons une triangulation délimitant les frontières 3D autour du nuage de points et calculons le volume inclus dans les frontières ainsi délimitées. Cette triangulation et le calcul de volume associé sont présentés sur la Figure 5-26.

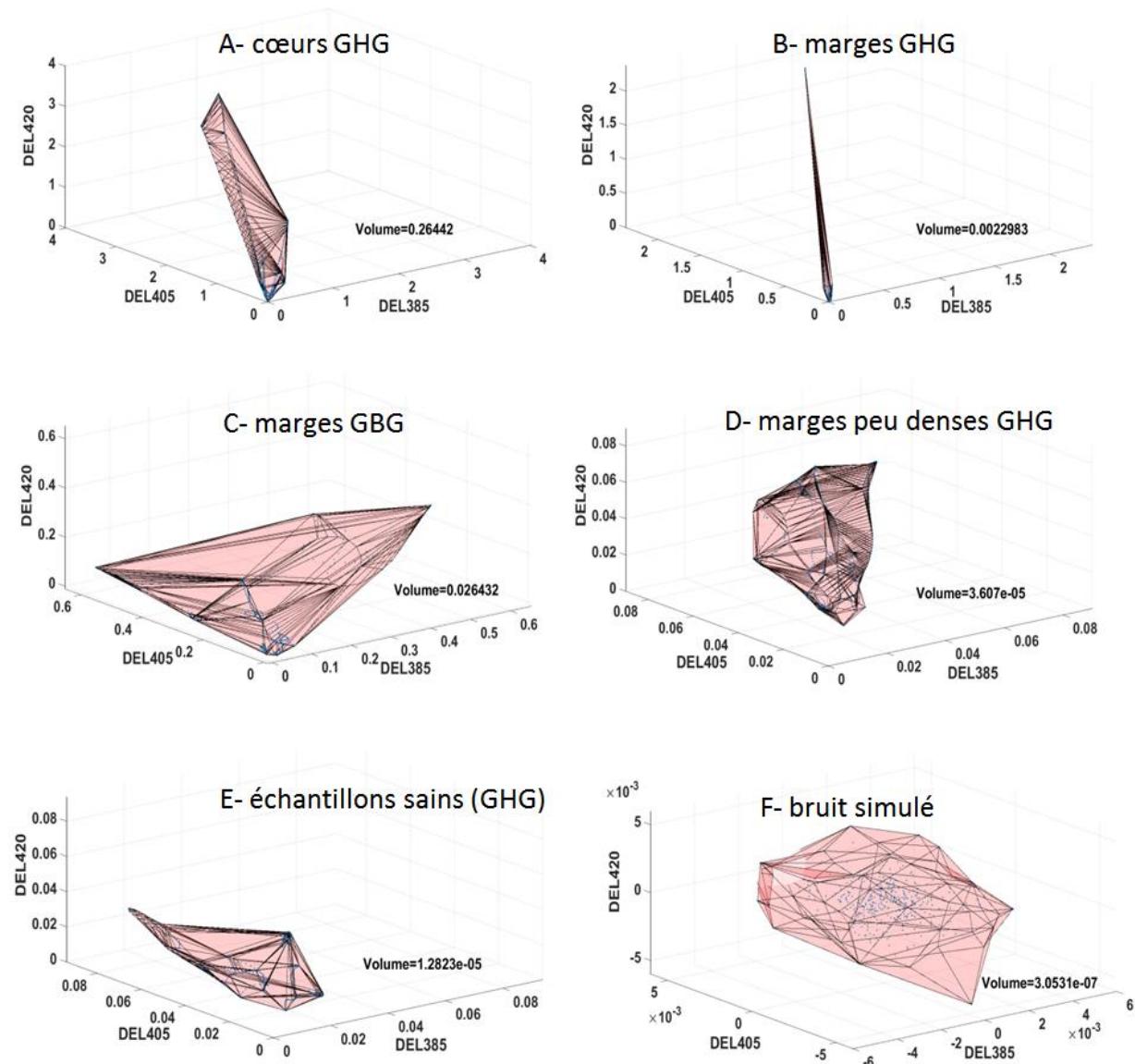


Figure 5-26 : Volume occupé par le nuage de points formé par les spectres 3D de tous les échantillons d'une même classe. A : cœurs des GHG ; B : marges des GHG ; C : marges des GBG ; D : marges peu denses des GH ; E : échantillons sains provenant des GHG ; F : bruit simulé gaussien.

La Figure 5-26 montre que le volume occupé par chaque classe décroît avec la quantité de cellules tumorales pour les GHG et que le volume occupé par les marges des GBG est supérieur à celui occupé par le tissu sain provenant des GHG. Ceci est cohérent avec la diminution de la bosse de PpIX relevée sur les Figure 5-4 et Figure 5-24 pour les GHG : moins il y a de signal, plus le volume décroît. Ces volumes corroborent que, s'il est aisé de discriminer les cœurs des GHG des autres classes, la discrimination des marges peu denses par rapport au tissu sain est plus compliquée en utilisant le volume.

Afin d'étudier la robustesse de ce paramètre à un échantillon bruité, nous conservons maintenant tous les échantillons d'une classe, y compris ceux de faible RSB et nous effectuons ce calcul de volume suivant la méthode du « leave one out » : pour une classe donnée, nous calculons le volume sur tous les échantillons sauf un, puis nous rajoutons cet échantillon et retirons un autre échantillon. Ceci est itéré pour tous les échantillons et le volume moyen de chaque classe est calculé, ainsi que l'écart type. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5-3.

											Moyenne	Ecart-type
Cœurs GHG	3.07 e ⁻¹	2.32 e ⁻¹	1.73 e ⁻¹	2.41 e ⁻¹	2.34 e ⁻¹	2.64 e ⁻¹	2.47 e ⁻¹	1.29 e ⁻¹	2.74 e ⁻¹		2.33e⁻¹	5.35e ⁻²
Marges GHG	3.69 e ⁻³	2.60 e ⁻⁴	3.25 e ⁻³	3.80 e ⁻³	3.80 e ⁻³	2.77 e ⁻³	3.80 e ⁻³	3.80 e ⁻³	3.76 e ⁻³		3.45e⁻³	9.27e ⁻⁴
	3.80 e ⁻³	3.80 e ⁻³	3.80 e ⁻³	3.80 e ⁻³	3.80 e ⁻³							
Marges GBG	2.86 e ⁻²	2.86 e ⁻²	2.86 e ⁻²	2.86 e ⁻²	2.80 e ⁻²	2.86 e ⁻²	2.82 e ⁻²	1.74 e ⁻²	2.86 e ⁻²		2.59e⁻²	6.6e ⁻³
	5.50 e ⁻³	2.85 e ⁻²	2.81 e ⁻²	2.87 e ⁻²	2.63 e ⁻²							
Marges peu denses GHG	1.92 e ⁻⁵	3.61 e ⁻⁵	3.20 e ⁻⁵	1.71 e ⁻⁵	3,19 e ⁻⁵	3,50 e ⁻⁵	3,89 e ⁻⁵				3.00e⁻⁵	8.46e ⁻⁶
tissu sain (GHG & GBG)	9.48 e ⁻⁴	9.48 e ⁻⁴	7.98 e ⁻⁴	9.48 e ⁻⁴	9.48 e ⁻⁴	9.48 e ⁻⁴	3.82 e ⁻⁴	7.87 e ⁻⁴	8.76 e ⁻⁴	2.06 e ⁻⁴	7.79e⁻⁴	2.66e ⁻⁴
Bruit simulé	2.54 e ⁻⁷	2.46 e ⁻⁷	2.68 e ⁻⁷	3.05 e ⁻⁷	3.05 e ⁻⁷	3.05 e ⁻⁷	2.67 e ⁻⁷				2.79e⁻⁷	2.6e ⁻⁸

Tableau 5-3 : Volume de chaque classe selon la méthode du "leave one out" : pour chaque classe, on calcule le volume occupé par le nuage de points représentant tous les échantillons sauf un (y compris ceux de faible RSB), puis on ajoute cet échantillon et retire un autre. Le volume moyen et l'écart-type associé sont aussi calculés.

L'observation du volume moyen sur le Tableau 5-3 soutient la décroissance du volume avec la quantité de cellules tumorales, sauf entre les marges peu denses des GHG et les échantillons sains. Cette différence peut s'expliquer par la présence de 3 échantillons sains provenant de GBG très bruités. Par ailleurs, ce Tableau 5-3 montre que le volume est un paramètre robuste à la présence d'un seul échantillon bruité. En effet, alors que nous avons conservé tous les échantillons pour obtenir ce tableau, y compris ceux de faible RSB, l'écart type est faible devant le volume moyen pour chaque classe. Nous remarquons cependant que le volume sans la deuxième marge des GHG (en gras) est 10 fois plus faible que les volumes calculés avec cet échantillon. Ceci soulève la dépendance du calcul du volume à un

échantillon (ici une marge très dense). Enfin, nous observons que le volume moyen des marges des GBG est supérieur au volume moyen des marges des GHG. Ceci peut tout d'abord s'expliquer par la contribution des lipopigments qui n'est probablement pas négligeable dans ces échantillons. Ce volume élevé pourrait aussi s'expliquer par une décorrélation des données plus forte pour les GBG, qu'on peut lier à la quantité plus restreinte de l'état 634 dans ces données. Enfin, le bruit mesuré dans les GBG étant plus élevé que dans les GHG et la normalisation choisie étant plus faible, la présence des oscillations visibles sur Figure 5-2 pourrait aussi expliquer cette augmentation de volume.

Sur la Figure 5-27, nous représentons le bruit simulé à partir des données saines, mais aussi le bruit provenant des spectres exclus des Figure 5-24 et Figure 5-26 à cause de leur faible RSB. Le bruit provenant des spectres expérimentaux est pris comme le signal collecté sur la bande spectrale 250-350 nm, après retrait de sa ligne de base par un ajustement linéaire, et normalisé par l'autofluorescence. On observe sur cette Figure 5-27 que le bruit provenant de spectres très bruités expérimentalement donne un volume de l'ordre de grandeur de celui des marges et du tissu sain mais 100 fois supérieur au volume du bruit simulé. Ainsi, si la méthode du « leave one out » valide la robustesse du volume à la présence d'un échantillon bruité, l'inclusion de plusieurs échantillons bruités peut perturber ce calcul et l'exclusion des spectres de faible RSB est alors nécessaire.

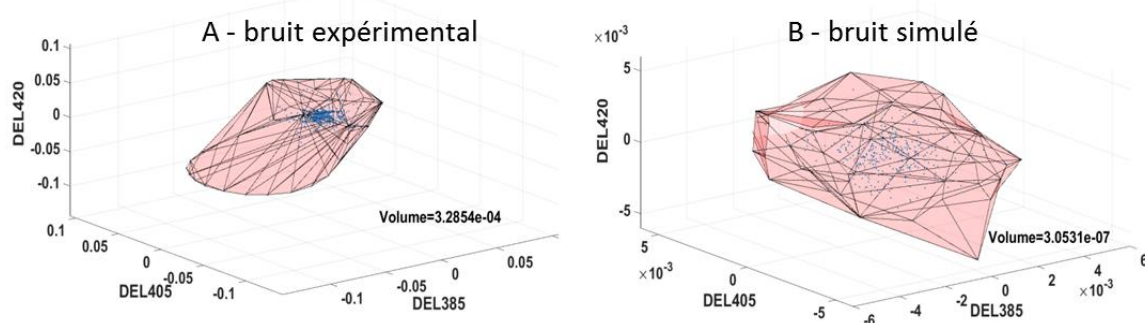


Figure 5-27 : Volume occupé par le nuage de points représentant les spectres exclus à cause du mauvais RSB (A) et volume occupé par le bruit simulé à partir de données de RSB accepté (B).

Le passage dans l'espace 3D permet de prendre en compte l'information apportée par les deux états, non pas à l'aide d'un ajustement, comme nous l'avons proposé dans la partie 5.3 - mais à l'aide de l'information apportée par les différentes sources d'excitation. Les Figure 5-24 et Figure 5-26 confirment que l'excitation multi-longueurs d'onde, liée à l'hypothèse de la présence des deux états, apporte de l'information qui semble pertinente et prometteuse pour avoir une meilleure discrimination des classes.

5.4.3 - Biomarqueurs associés à une analyse en composantes principales

Après avoir étudié la corrélation des données à l'échelle du nuage de points formé par les spectres émis par l'ensemble des membres d'une classe, nous étudions dans cette partie la corrélation à l'échelle de chaque membre de chaque classe. Nous commençons par réaliser une décomposition en valeurs singulières de la matrice de covariance associée au nuage de points de chaque échantillon. Ceci permet d'analyser la dispersion des points du nuage autour d'un axe principal, et donc d'analyser la dispersion des points dans l'espace 3D pour chaque échantillon.

Les coordonnées 3D des différents points du nuage sont disposées dans une matrice de dimension $3 \times n$ avec n le nombre de points du spectre (ici 65). Une décomposition en valeurs singulières de cette matrice donne 3 vecteurs singuliers. Les propriétés mathématiques de cette décomposition en valeurs singulières sont telles que le premier vecteur singulier correspond à l'axe selon lequel les points sont les plus dispersés (variance maximale), le deuxième vecteur singulier correspond à l'axe perpendiculaire au premier où les points sont à nouveau les plus dispersés (variance maximale dans le plan perpendiculaire au premier vecteur singulier), et le troisième vecteur correspond à l'axe perpendiculaire aux deux autres selon lequel les points sont les plus dispersés. La décomposition donne aussi trois valeurs singulières, qui correspondent aux écarts-type de la distribution des points selon les trois axes (leurs carrés correspondent donc aux variances) : la valeur singulière associée au premier axe est maximale, puisque c'est selon cet axe que la variance est maximale. Viennent ensuite, dans l'ordre décroissant, la deuxième valeur singulière et la troisième. En appliquant cette opération sur les nuages de points montrés dans la Figure 5-24, on obtient pour chaque nuage un axe de variance maximale, qu'on représente par un segment centré sur le centre du nuage et de longueur égale à la première valeur propre de sa matrice de covariance. Les graphes de la Figure 5-24 augmentés de ces segments sont présentés dans la Figure 5-28. Ces opérations vont nous permettre de quantifier la dispersion des nuages de points dans les différentes classes de tissu et étudier l'anisotropie fractionnelle.

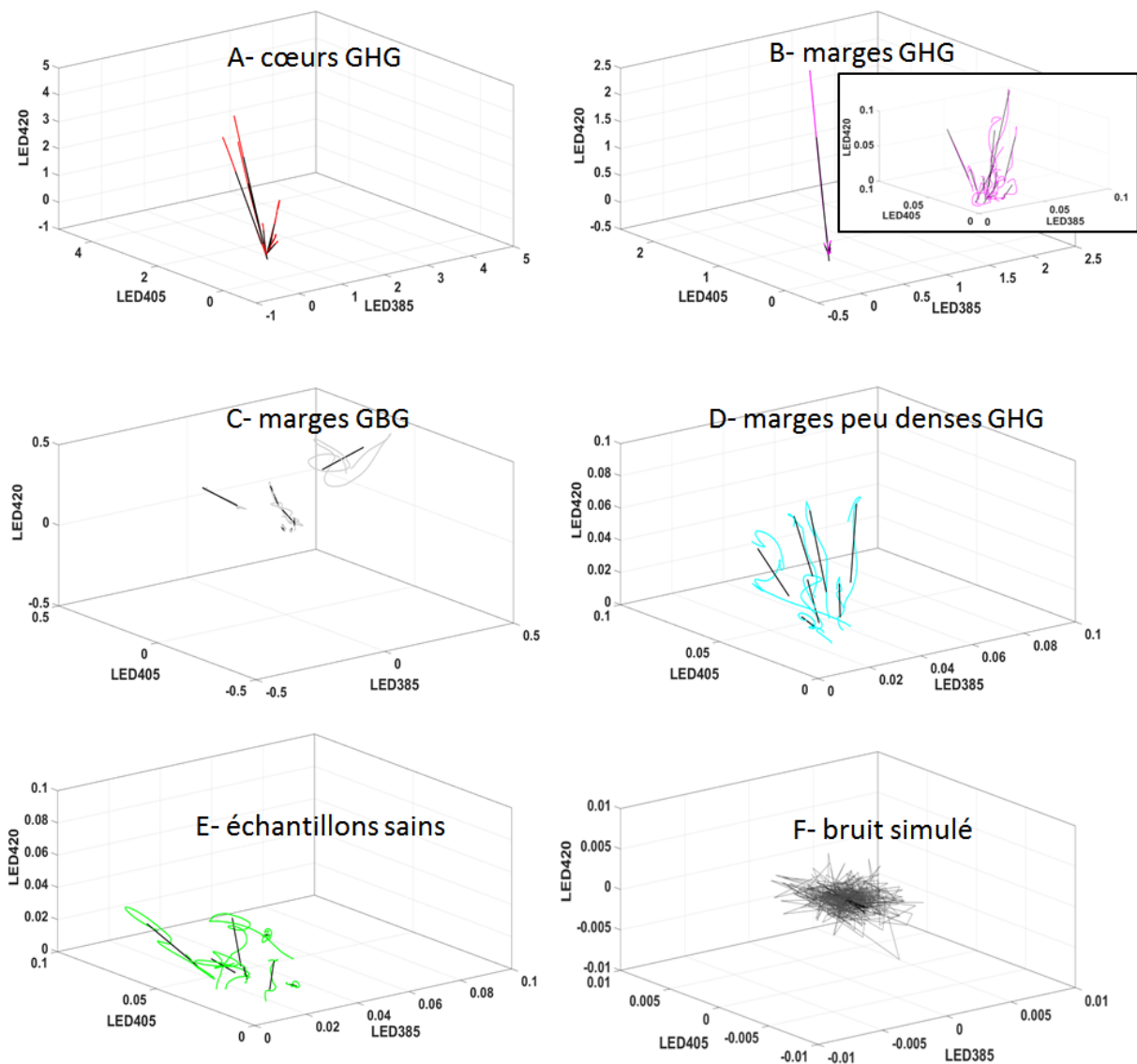


Figure 5-28 : Ajustement linéaire 3D du nuage de points représentant les spectres de chaque échantillon. Les axes des graphiques représentent les sources d'excitation du système. L'ajustement est tracé en noir. A : cœurs des GHG ; B : marges des GHG (avec un zoom sans l'unique marge dense) ; C : marges des GBG ; D : marges peu denses des GHG ; E : échantillons sains ; F : bruit simulé.

5.4.3.1 - Etude de la première composante principale

Dans le cas de notre étude, plus les spectres issus d'un échantillon selon les trois sources d'excitation sont corrélés, plus leur représentation dans le graphe 3D prend la forme d'un nuage de points alignés, donc de variance très importante dans une direction. La première valeur propre de la matrice de covariance associée à ce nuage de points est alors élevée. A l'inverse, des spectres peu corrélés vont générer un nuage de points dispersés et donner une première valeur propre faible. C'est pourquoi il nous paraît pertinent d'étudier, pour chaque échantillon de chaque classe, la première valeur propre du nuage de points. Nous ajoutons la classe « bruit », à partir des données de bruit simulées. Nous étudions ensuite la moyenne de cette première valeur propre et son écart type calculés sur l'ensemble des échantillons d'une même classe et les représentons sur la Figure 5-29.

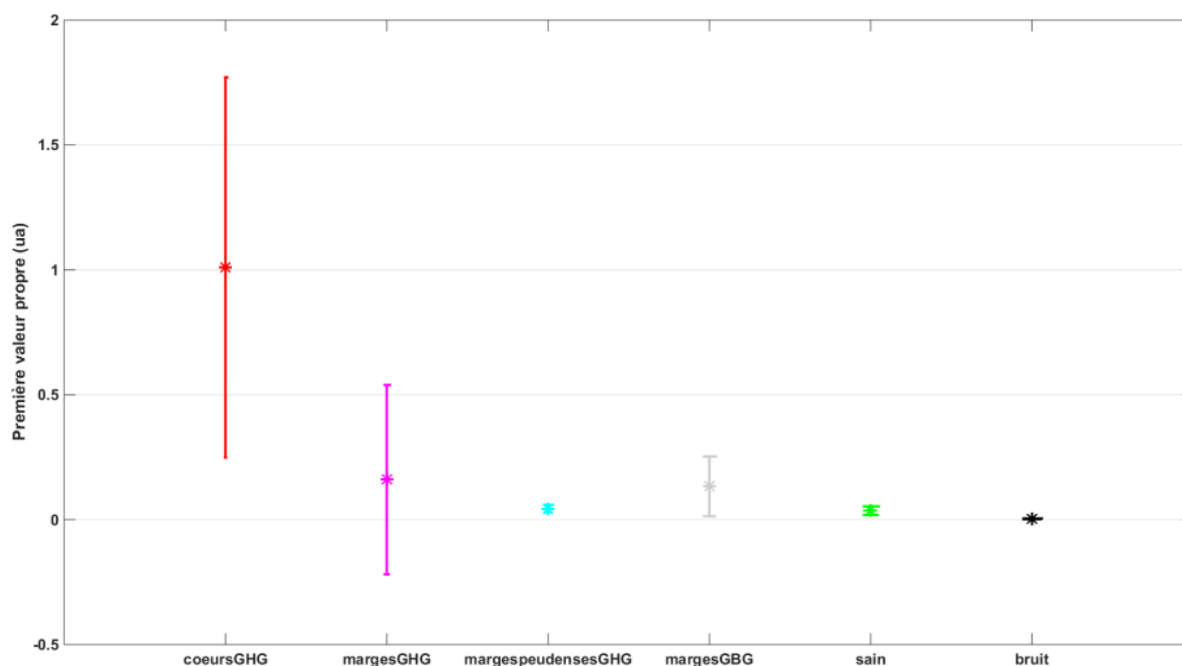


Figure 5-29 : Evolution de la première valeur propre de la matrice de covariance du nuage de points de représentant les spectres émis par tous les échantillons de chaque classe dans l'espace 3D.

Nous observons sur cette Figure 5-29 que la première VP diminue avec la classe, passant de 1 pour les cœurs des GHG, tendant vers 0 pour les zones peu infiltrées et atteignant 0 pour le bruit. Ceci signifie que la direction principale de dispersion des données a un poids faible dans l'analyse en composantes principales des classes peu infiltrées, donc que les données ne sont pas agencées majoritairement selon cette direction, contrairement aux cœurs de GHG. Cette observation soutient l'observation déjà faite sur les spectres 3D où on a montré que le nuage de points tendait vers une pelote de plus en plus dispersée pour les zones peu infiltrées. Ceci corrobore l'intérêt d'une excitation multi-longueurs d'onde pour obtenir des informations complémentaires à l'analyse suivant une seule source d'excitation.

Par ailleurs, la variabilité observée sur cette Figure 5-29 traduit la continuité en cellules tumorales : au sein d'une même classe, la densité en cellules tumorales varie aussi. Pour les cœurs des GHG, cette variabilité peut s'expliquer d'une part par cette discrétisation de la quantité en cellules tumorales mais par la différence de quantité de signal collecté dans les cœurs tumoraux, certains présentant beaucoup moins de fluorescence, à cause du sang ou de certaines zones nécrosées.

5.4.3.2 - Anisotropie fractionnelle (AF)

L'étude de la valeur propre est relative, elle permet de comparer les classes les unes par rapport aux autres mais n'a pas de référence absolue. En revanche, l'anisotropie fractionnelle (AF) est un paramètre absolu, permettant une comparaison des classes entre elles mais aussi une interprétation géométrique du résultat pour chaque échantillon. L'anisotropie fractionnelle a été introduite comme paramètre d'étude du tenseur de diffusion en IRM, afin de traduire que le mouvement de diffusion des molécules n'est pas identique dans toutes les directions. Le tenseur de diffusion comporte 9 coefficients traduisant les variations de

diffusion dans l'espace pour mettre en évidence la direction préférentielle du déplacement local des molécules d'eau, reflet de l'organisation tissulaire et cellulaire (Le Bihan, 2003). L'anisotropie fractionnelle de ce tenseur traduit alors le degré d'ellipticité en tendant vers 1 pour une diffusion anisotrope et vers 0 pour une diffusion isotrope. Ce biomarqueur permet de suivre l'évolution de certaines maladies (Oppenheim et al., 2004).

L'anisotropie fractionnelle est définie suivant l'équation (5.3)

$$AF = \sqrt{\frac{3}{2}} \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \lambda_m) + (\lambda_2 - \lambda_m) + (\lambda_3 - \lambda_m)}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}} \quad (5.3)$$

où

$$\lambda_m = (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)/3 \quad (5.4)$$

λ_i est la valeur propre 1, 2 ou 3 et λ_m la moyenne des valeurs propres du tenseur 3D.

Nous appliquons par analogie cette formule à la matrice de covariance du nuage de point représentant les trois spectres d'un échantillon et nous obtenons ainsi une valeur d'anisotropie fractionnelle pour chaque échantillon. Nous pouvons alors calculer la moyenne et l'écart type de l'anisotropie fractionnelle au sein d'une même classe. La Figure 5-30 présente ces résultats pour les différentes classes. On observe que l'anisotropie fractionnelle est concentrée dans une gamme de valeurs entre 0.8 et 1 pour les données collectées, et entre 0.30 et 0.55 pour le bruit simulé. Les valeurs obtenues (proche de 1) signifient que les données sont globalement réparties selon une direction principale et donc que les spectres associés aux trois sources d'excitations sont corrélés, ce qui est cohérent avec le fait que ces données proviennent d'un même échantillon. Le fait que l'anisotropie fractionnelle soit non nulle pour le bruit s'explique par la multiplication du bruit aléatoire par des constantes différentes pour chaque longueur d'onde, ce qui entraîne une légère anisotropie des nuages de points. On observe enfin que l'AF diminue avec la densité d'infiltration tumorale, ce qui est en accord avec les observations des figures précédentes de la partie 5.4 - : plus il y a de cellules tumorales, plus les données sont corrélées, donc plus elles sont réparties selon une direction. Cette diminution peut s'expliquer d'une part par la présence des deux états, donc la réponse différente de l'échantillon suivant la source d'excitation. Cette diminution peut s'expliquer d'autre part par la contribution de l'autofluorescence qui varie suivant la source d'excitation. L'allure des spectres étant influencée par l'autofluorescence et les deux états de la PpIX, une variation de contribution de l'autofluorescence fait varier l'allure spectrale en fonction de la source d'excitation et décorrèle donc légèrement les spectres.

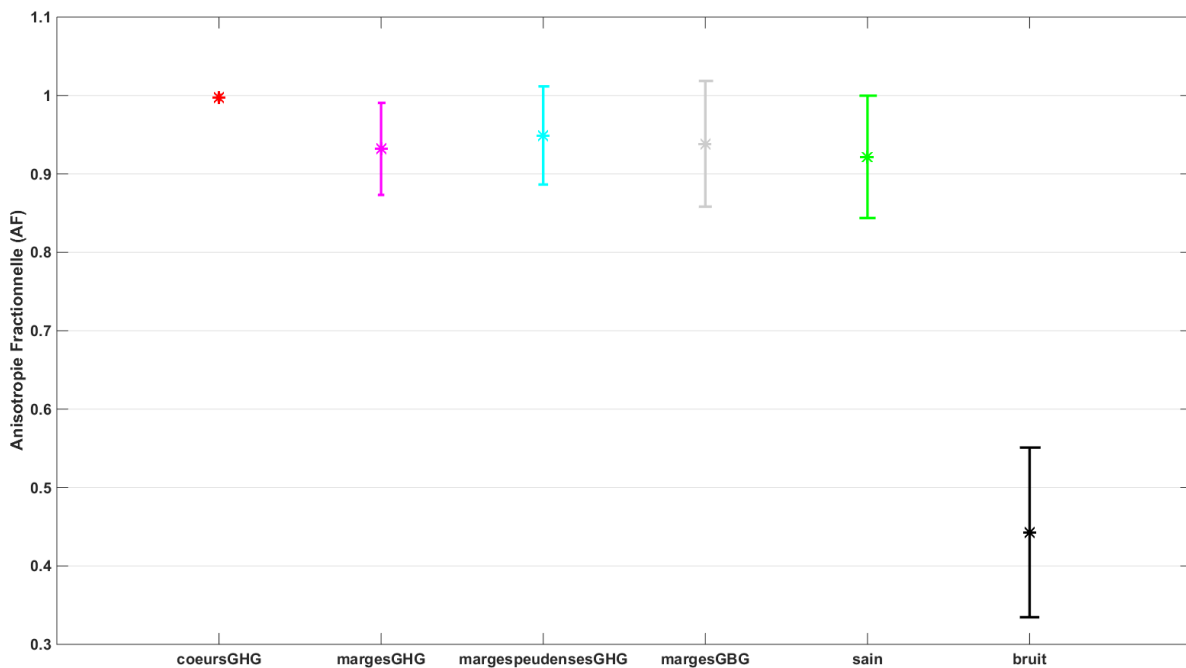


Figure 5-30 : Evolution de l'Anisotropie Fractionnelle en fonction de la classe des échantillons. En rouge, les cœurs des GHG, en mauve, leurs marges, en cyan leurs marges peu denses, en vert les échantillons sains, en gris les marges des GBG et en noir le bruit simulé.

5.4.4 - Conclusion et perspectives de l'intérêt de l'excitation multi-longueurs d'onde

En conclusion, nous avons proposé dans cette partie une analyse 3D du nuage de points représentant les spectres collectés, prenant en compte simultanément l'information apportée par les 3 DELs. Nous avons proposé différents biomarqueurs d'analyse 3D qui illustrent que la corrélation des données acquises pour un même échantillon avec 3 sources d'excitation diminue lorsque la densité en cellules tumorales diminue. Ceci est cohérent avec l'hypothèse que l'état 634 prédomine largement dans les échantillons avec de nombreuses cellules tumorales (renvoyant 3 spectres fortement corrélés car majoritairement constitués de l'état 634) et que les deux états sont présents dans les échantillons où la densité en cellules tumorales est plus faible (renvoyant 3 spectres moins corrélés car émis par un mélange des deux états, donc plus sensibles à la variation de la longueur d'onde d'excitation). En effet, les deux états ayant des propriétés d'absorption différentes, la contribution de chacun à la fluorescence totale dépend de la source d'excitation, ce qui diminue la corrélation dans les tissus où les deux états sont présents dans des proportions similaires.

L'analyse présentée jusque-là a été effectuée dans la bande spectrale 608-637 nm à cause du bruit du pic instrumental et des oscillations du filtre autour de 700 nm, qui sont indépendants de la source d'excitation et augmentent donc la corrélation des données. Par la suite, une étude sur la bande spectrale 600-800 nm permettrait de prendre en compte les deux bosses de la PpIX et donc de considérer plus d'information contenue dans les spectres mesurés. La Figure 5-31 présente les spectres 3D tracés sur la bande spectrale 600-800 nm.

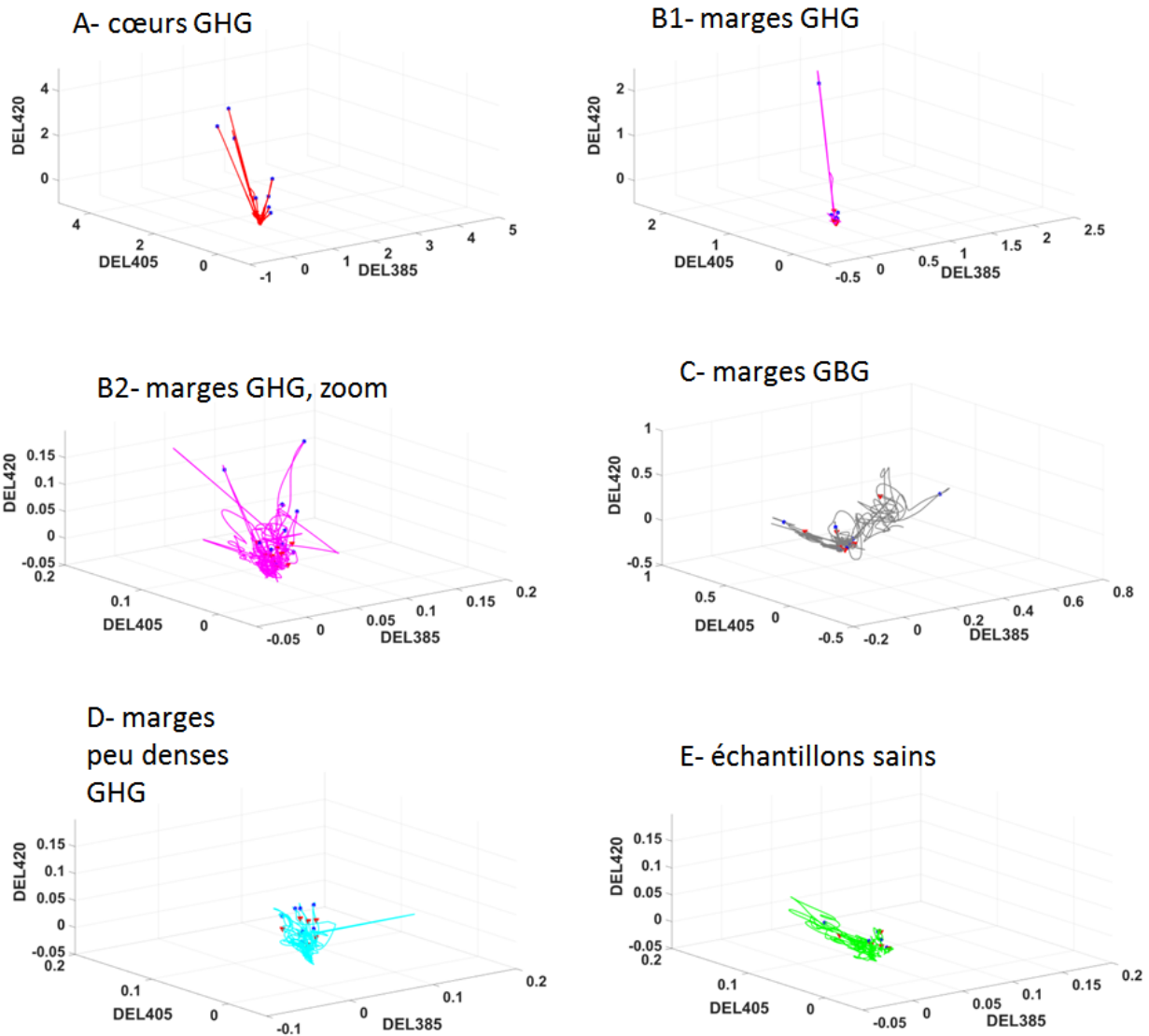


Figure 5-31 : Représentation 3D des spectres des échantillons en fonction de leur classe, acquis entre 600 nm et 800 nm. Les axes représentent l'intensité de fluorescence reçue sur la barrette du spectromètre pour chaque source d'excitation. Figure A : cœurs des GHG, B : marges des GHG, C : marges des GBG, D : marges peu denses des GHG, E : échantillons sains, F : bruit simulé. L'étoile bleue indique la longueur d'onde 634 nm et le triangle rouge celle 620 nm.

Sur cette Figure 5-31, nous observons tout d'abord que les données des cœurs des GHG semblent toujours corrélées puisque les tracés de la figure A ressemblent à des droites dont l'extrémité est la longueur d'onde 634 nm. Nous observons que les données des tissus moins infiltrés et sains sont toujours représentées sous forme de pelotes où les marqueurs 620 nm (rouge) et 634 nm (bleu) semblent placés aléatoirement. Nous observons cependant la présence du pic instrumental sur une marge des GHG (figure B2) et sur une marge peu dense des GHG (figure D). Afin de quantifier ces observations, nous avons calculé l'anisotropie fractionnelle de ces données. La Figure 5-32 présente l'AF pour les données spectrales acquises sur la bande 600-800 nm.

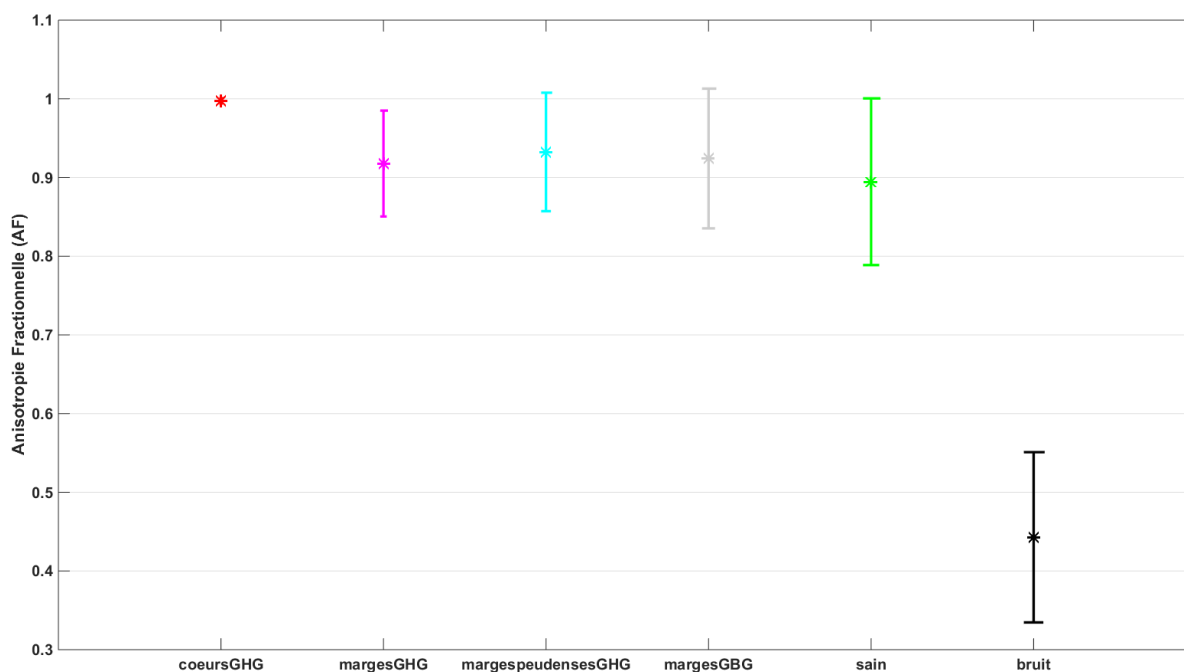


Figure 5-32 : Anisotropie Fractionnelle calculée sur les spectres obtenus sur la plage 600-800 nm en fonction de la classe des échantillons.

En comparant les Figure 5-30 et Figure 5-32, nous observons que l'AF est inchangée pour les cœurs des GHG avec l'augmentation de la bande spectrale d'étude. En revanche, elle diminue très légèrement pour les marges des GHG, leurs marges peu denses, le tissu sain et les marges des GBG. La diminution peut traduire la présence des deux états aussi dans la zone 650-800 nm, qui fait que les données sont dispersées dans cette zone et donc diminue l'AF.

5.5 - Conclusion

Ce chapitre présente l'analyse des données spectrales acquises *in vivo*. Le traitement des spectres que nous avons présenté dans ce chapitre a été effectué au laboratoire, mais les modèles ont été développés afin d'être exécutables en temps-réel et de pouvoir, à terme, être utilisés directement au bloc opératoire. Nous avons proposé deux modèles de traitement des spectres, tous les deux fondés sur l'hypothèse que deux états de la PpIX contribuent à la fluorescence des échantillons sondés, dans des quantités variables suivant la densité en cellules tumorales. Le premier modèle, utilisant une connaissance à priori, ajuste les spectres par une combinaison linéaire des deux états recherchés dans la bande spectrale 608-637 nm. Ceci permet de dépasser les limites des techniques existantes. Nous parvenons tout d'abord à identifier de la fluorescence émise par la PpIX là où la microscopie de fluorescence ne permet pas d'en détecter. En outre, nous proposons une ébauche de classification des différents échantillons en fonction de la densité en cellules tumorales, ce qui rend possible l'élaboration d'un modèle de classement de futurs échantillons, sans connaître leur classification anatomo-histopathologique, ce qui est le but de notre travail. Ce modèle est maintenant à confirmer par une étape de validation de l'efficacité clinique. En outre, si l'efficacité clinique était avérée mais l'étude *in vivo* compliquée par un RSB trop faible, l'application *ex vivo* de ce modèle

pourrait remplacer l'analyse anatomo-histopathologique extemporanée. Cette piste d'examen sur biopsie directement au bloc opératoire permettrait un gain de temps lors de l'opération. Enfin, le calcul du rapport des deux contributions permet une discrimination significative de l'ensemble des marges des GHG et du tissu sain. Ceci est un résultat novateur très encourageant car attendu des neurochirurgiens. Si ce biomarqueur est à confirmer avec plus d'échantillons et un meilleur RSB, nous proposons ici une piste de réponse à la problématique clinique. Le second modèle de traitement propose une représentation 3D des spectres acquis sur un échantillon par trois sources d'excitation. Ce modèle permet de prendre en considération conjointement l'information apportée par les trois sources d'excitation en s'affranchissant de l'utilisation d'un modèle de connaissance à priori. Ces tracés 3D ont démontré l'intérêt de l'excitation multi-longueurs d'onde, en soulignant que plus la densité en cellules tumorales diminue, moins l'information semble corrélée. Les résultats de ces deux modèles montrent que, dans les échantillons de faible densité en cellules tumorales, les deux états sont présents et le spectre émis est une combinaison linéaire de l'émission de chaque état. Ces résultats, novateurs, ouvrent des perspectives tant dans le traitement des marges des gliomes de haut grade que dans le traitement des gliomes de bas grade.

Chapitre 6

Perspectives initiées durant la thèse

Dans ce chapitre, nous présentons les recherches effectuées en parallèle de l'étude clinique détaillée dans les chapitres précédents. Nous commencerons par présenter la recherche des zones de fonctionnalité cérébrale à l'aide de la caméra RVB intégrée au microscope peropératoire. En effet, lors de la résection de tumeurs, le neurochirurgien doit identifier les zones cérébrales fonctionnelles afin de les préserver, et nous avons donc cherché à les identifier par une méthode optique, non invasive, non ionisante et peu onéreuse, dans l'objectif de donner une information en temps réel. Par ailleurs, nous avons cherché à caractériser d'autres propriétés discriminantes des deux états de PpIX présentés dans les chapitres précédents. Dans ce but, nous avons initié deux collaborations, l'une étant l'étude des propriétés non linéaires des deux états, l'autre étant l'étude du temps de vie de chacun d'eux. Enfin, nous avons observé un parallèle entre le spectre émis par l'ester de PpIX et les cœurs des gliomes, que nous présenterons ici.

Nous présentons donc dans ce chapitre ces quatre axes de recherche.

6.1 - Etude complémentaire : vers une identification peropératoire et temps-réel de la fonctionnalité cérébrale à l'aide d'une caméra

Nous avons vu dans l'introduction de la thèse que le neurochirurgien devait trouver un équilibre entre la résection d'un maximum de cellules tumorales et la préservation des zones de fonctionnalité cérébrale, pour éviter d'induire des déficits post-opératoires. Dans cette étude, nous nous intéresserons à l'identification en temps réel et de façon minimalement invasive de la fonctionnalité cérébrale. L'étude de la fonctionnalité cérébrale suppose aujourd'hui que le cerveau présente différentes zones associées à une fonction (motricité, vue, langage, mémoire...), même si cette hypothèse commence à être remise en cause (Duffau). Ces zones sont répertoriées dans un atlas (Toga and Mazziotta, 2002) mais varient légèrement d'un patient à l'autre. L'étude de la fonctionnalité cérébrale d'un patient peut être effectuée soit dans le but d'identifier les zones à préserver lors d'un geste opératoire, soit dans le cadre d'études de sciences cognitives. Dans ce chapitre, nous nous intéressons uniquement à l'identification des zones fonctionnelles motrices dans le but de les préserver en neurochirurgie. Dans ce but, l'utilisation d'une carte obtenue par une IRM fonctionnelle (IRMf) préopératoire est intéressante mais limitée, notamment à cause du phénomène de *brain shift*. Le développement d'outils peropératoires et temps réel est donc nécessaire, et ces outils s'appuient sur les deux phénomènes physiologiques présentés ci-après.

6.1.1 - Bases de physiologie cérébrale

Deux phénomènes physiologiques permettent d'identifier une zone fonctionnelle stimulée. Le premier est un phénomène électrique, lié à la polarisation de la membrane des neurones et le second est un phénomène hémodynamique lié au besoin en oxygène. En effet, une stimulation se traduit par un message cérébral, véhiculé comme tout message cérébral par des changements de potentiel membranaire neuronaux. Ces changements de polarisation de la membrane transmettent un Potentiel d'Action (PA), induit par le passage d'ions entre l'intérieur et l'extérieur du neurone via des canaux ioniques membranaires. Ce passage ionique à travers la membrane nécessite un apport d'énergie (glucose et oxygène (O₂)). L'oxygène, non stocké par le cerveau, est apporté par le sang, lié aux molécules d'hémoglobine (formant la molécule d'oxyhémoglobine, HbO₂). Ces molécules libèrent leur atome d'oxygène et sont évacuées dans le flux sanguin de sortie sous forme de désoxyhémoglobine (Hb). Ce besoin en oxygène implique une augmentation du flux sanguin de 30 % à 50 % et du volume sanguin de 5 % à 10 % (Stefanovic et al., 2008).

Ainsi, lors de l'activation d'une zone cérébrale, deux phénomènes physiologiques sont déclenchés. Le premier est une réponse électrique, rapide (5 ms) et locale. Le second, support du premier, est une réponse hémodynamique, plus lente (de l'ordre de la seconde) et plus diffuse spatialement (Lange, 2016).

Dans le cadre de notre étude, nous étudions la réponse hémodynamique de la zone motrice en faisant bouger la main du patient au bloc opératoire. Nous faisons ainsi l'hypothèse qu'un mouvement passif de la main déclenche une réponse hémodynamique de la zone cérébrale associée. Un protocole passif similaire a déjà été proposé par Ogg (Ogg et al., 2009) pour l'IRMf sous anesthésie et l'équipe de Gasser propose d'étudier la réponse hémodynamique à une stimulation électrique du nerf médian (Gasser et al., 2005a), toujours pour l'IRMf. L'étude récente de l'équipe d'Oealschlägel utilise aussi une stimulation électrique du nerf pour remonter aux variations hémodynamique captées cette fois-ci par caméra RVB (Oealschlägel et al., 2013; Sobottka et al., 2013).

6.1.2 - Introduction des techniques peropératoires d'assistance pour l'identification de la fonctionnalité cérébrale en neurochirurgie

L'identification des zones de fonctionnalité cérébrale peut donc s'effectuer soit de façon directe, en étudiant les variations de potentiel d'action soit de façon indirecte, en étudiant les variations hémodynamiques. De nombreuses techniques existent pour identifier cette fonctionnalité, avec chacune des avantages et inconvénients (résolution spatiale ou temporelle, coût, durée, matériel nécessaire, nocivité...). Un état de l'art des techniques existantes est proposé dans le mémoire de Lange (Lange, 2016). Dans notre étude, nous introduirons les deux techniques actuellement utilisables au bloc opératoire avant de présenter le modèle de traitement que nous proposons, étudiant les variations colorimétriques du cerveau filmées par une caméra optique.

6.1.2.1 - *Stimulation Corticale Electrique : variations de potentiel électrique*

La technique de référence (« gold standard ») pour la recherche des zones de fonctionnalité cérébrales au cours de la chirurgie est aujourd'hui la stimulation corticale électrique. Le principe de la stimulation électrique est d'exciter la membrane neuronale à l'aide d'un courant électrique, afin d'inverser sa polarisation et donc provoquer des potentiels d'action. Le fonctionnement de la stimulation électrique corticale ainsi que le protocole d'utilisation et certaines de ses limites sont décrits dans (Mandonnet et al., 2010). Notons toutefois que, si cette technique est actuellement le gold standard, le risque de provoquer des crises d'épilepsies au cours de l'opération (Sartorius and Berger, 1998) en est une limite, tout comme le risque de faux positifs (impliquant un arrêt prématuré de la chirurgie) ou de faux négatifs (impliquant des séquelles).

Pour valider le modèle que nous avons développé, nous avons besoin d'une identification de référence de la zone fonctionnelle, que nous obtenons par stimulation électrique. Pour obtenir cette référence, le neurochirurgien stimule le tissu dans la zone motrice théorique et ses alentours, tandis que les membres du patient sont observés. La stimulation de la zone motrice entraîne un mouvement du bras, ce qui permet de la localiser.

6.1.2.2 - *IRM fonctionnelle et signal BOLD, variations hémodynamiques*

Après la découverte de la réponse cérébrale hémodynamique, différentes études ont été menées à l'aide de l'IRM fonctionnelle peropératoire, fondées sur les variations hémodynamiques observées lors de l'activation d'une zone (Gasser et al., 2005b; Gering and Weber, 1998).

L'IRMf se fonde d'une part sur les propriétés magnétiques de la désoxyhémoglobine (différentes de celles de l'oxyhémoglobine) et d'autre part sur le fait que le flux sanguin augmente plus vite que le métabolisme de consommation de l'oxygène lorsqu'une zone est activée. Ces deux effets cumulés impliquent une légère variation du signal RMN local : effet BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent), traduisant l'activation de la zone cérébrale étudiée. Le fonctionnement de l'IRMf est décrit dans différents articles (Buxton, 2013; Kim and Ogawa, 2012).

L'utilisation de l'IRMf peropératoire se développe dans le but d'éviter le phénomène de *brain shift*, mais, tout comme l'utilisation de l'IRM peropératoire pour identifier les cellules tumorales, l'utilisation de l'IRMf peropératoire rallonge considérablement la durée de l'opération, nécessite l'utilisation d'outils chirurgicaux non magnétiques, parfois un changement de salle, et augmente les coûts de l'opération. Enfin, il y a très peu d'IRM peropératoire en France.

Depuis une vingtaine d'années, des méthodes basées sur le signal optique intrinsèque émergent pour identifier ces zones fonctionnelles (Cannestra et al., 2000; Morone et al., 2017; Villringer and Chance, 1997). Des travaux ont montré que les variations lumineuses dues au contraste hémodynamique étaient de l'ordre de 2%, ce qui les rend analysables sur des

caméras (Montcel, 2005). Ces méthodes utilisant la réponse hémodynamique sont peu onéreuses, non ionisantes, temps réel et demandent une logistique relativement simple.

6.1.3 - Modèle de traitement des variations colorimétriques basé sur la loi de Beer Lambert modifiée

L'étude bibliographique récente de Morone et le premier chapitre de la thèse de Lange (Lange, 2016; Morone et al., 2017) listent les nombreuses techniques optiques en cours de développement qui étudient les variations cérébrales. Dans notre étude, nous avons choisi de développer un système expérimental simple afin de pouvoir l'utiliser facilement au bloc opératoire. Ce système est composé principalement d'une caméra CCD qui capte les variations colorimétriques du cerveau au cours d'une stimulation. Nous présenterons donc uniquement les travaux émergents basés sur la même technique, à savoir la variation d'absorbance de la lumière mesurée sur des caméras et la conversion de ces données colorimétriques en variations oxymétriques selon la loi de Beer-Lambert Modifiée. Différents travaux ont été proposés dans ce but, soit sur cerveau de rat (Kohl-Bareis et al., 2010; Steimers et al., 2011), soit sur peau humaine (Jakovels and Spigulis, 2012; Nishidate et al., 2008).

Comme nous l'avons présenté dans le Chapitre 1, les propriétés d'absorption du cortex sont principalement dues à la présence des molécules Hb et HbO₂. Ainsi, une variation de leur concentration implique une variation d'intensité lumineuse collectée. En supposant que les variations d'intensité lumineuses ne sont dues qu'à l'absorption, mais que la diffusion lumineuse ne change pas, la loi de Beer-Lambert modifiée peut s'appliquer. Dans la suite de ce chapitre, nous exploitons donc ces propriétés optiques selon un modèle basé sur la loi de Beer-Lambert modifiée exposée dans l'équation (6.1):

$$A(\lambda) = \log_{10}\left(\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)}\right) = \left(\sum_j \varepsilon_j(\lambda)c_j\right)d \quad (6.1)$$

où A est l'absorbance du tissu, λ la longueur d'onde d'étude, I_0 l'intensité lumineuse incidente, I l'intensité transmise, ε_j le coefficient d'extinction molaire de l'absorbeur j , c_j sa concentration et d le chemin optique. Notre système étudie les variations de l'intensité réfléchie sur le capteur i de la caméra, entre les instants t_2 et t_1 , comme cela a été proposé par (Steimers et al., 2009) selon l'équation (6.2)

$$\Delta A_i = A_i(t_2) - A_i(t_1) = \log_{10}\left(\frac{I_i(t_1)}{I_i(t_2)}\right) = \sum_j E_{ij} \Delta C_j \quad (6.2)$$

où
$$E_{ij} = \int \varepsilon_j(\lambda) D_i(\lambda) S(\lambda) L(\lambda) d\lambda \quad (6.3)$$

avec $D_i(\lambda)$ la réponse spectrale du canal i de la caméra (soit R, V ou B), $S(\lambda)$ la réponse spectrale de la source, $L(\lambda)$ le chemin optique, ΔA_i la variation d'absorbance du canal i et ΔC_j la variation de concentration de l'absorbeur j . E_{ij} est intégré sur toute la bande spectrale du capteur. Nous formulons l'hypothèse que les variations colorimétriques induites par une

variation d'activité cérébrale sont liées uniquement aux variations d'Hb et HbO₂, soit respectivement les courbes bleue et rouge sur la Figure 1-4.

De façon matricielle, cette équation (6.2) simplifiée s'écrit :

$$\begin{bmatrix} \Delta A_R \\ \Delta A_V \\ \Delta A_B \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} E_{R,Hb} & E_{R,HbO_2} \\ E_{V,Hb} & E_{V,HbO_2} \\ E_{B,Hb} & E_{B,HbO_2} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Delta C_{Hb} \\ \Delta C_{HbO_2} \end{bmatrix} \quad (6.4)$$

L'obtention des variations de concentration totale en hémoglobine oxygénée et désoxygénée se fait alors en inversant le système (6.4). Nous calculons ensuite la variation totale de l'hémoglobine comme la somme des valeurs absolues des deux contributions selon l'équation (6.5)

$$\Delta C_{th} = |\Delta C_{Hb}| + |\Delta C_{HbO_2}| \quad (6.5)$$

6.1.4 - Etude préliminaire avec caméra RVB du microscope opératoire

Nous présentons dans cette partie l'étude réalisée à l'aide de la caméra intégrée au microscope peropératoire. Nous commencerons par présenter le protocole d'acquisition des données au bloc opératoire puis nous présenterons une étape de recalage avant de présenter les résultats de la conversion des variations colorimétriques en variations oxymétriques et les pistes d'amélioration de ces travaux.

6.1.4.1 - Protocole opératoire

Dans cette étude, nous recherchons la zone fonctionnelle associée à la motricité. Les patients sélectionnés présentent une tumeur proche de la zone théoriquement associée à la motricité, afin que cette dernière soit exposée après ouverture du volet crânien. La caméra du microscope est positionnée au-dessus de cette zone d'intérêt, en cherchant à limiter les zones de saturation et réflexion spéculaire. Puisque nous cherchons à mettre en évidence une réponse hémodynamique, nous filmons à la fois le tissu au repos et le tissu stimulé, afin de comparer les deux enregistrements par la suite. Ceci correspond au protocole de stimulation présenté sur la Figure 6-1. Durant les 30 premières secondes de l'acquisition, le patient est au repos. Dans les 30 secondes qui suivent, la stimulation est effectuée. Celle-ci peut être active si le patient est éveillé (doigts bougés par le patient) ou passive (doigts du patient bougés par un chercheur associé à l'étude). Enfin, dans les 30 dernières secondes nous filmons le retour au repos. Durant la phase d'activation, deux mouvements sont provoqués. L'un correspond au mouvement de pince effectué entre le pouce et l'index. L'autre correspond au mouvement de fermeture des doigts vers la paume (fermeture puis ouverture répétées).

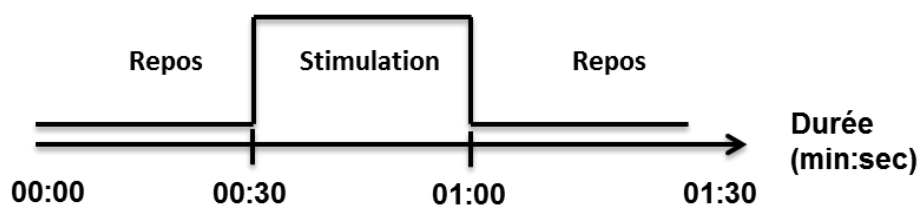


Figure 6-1 : Protocole de stimulation du patient dans la recherche de la zone fonctionnelle motrice.

6.1.4.2 - Nécessité de recalibrer les vidéos

Les vidéos enregistrées présentent plusieurs mouvements parasites du cerveau, de la tête et de la caméra, rendant nécessaire le recalibrage spatial des pixels afin que chacun d'entre eux corresponde à la même zone tissulaire tout au long de l'acquisition. Ces mouvements ont plusieurs causes, dont deux sont pseudopériodiques : la respiration et la pulsation cardiaque du patient. La présence de ces mouvements compromet l'algorithme de traitement proposé par Steimers (Steimers et al., 2009). En effet, cet algorithme compare l'intensité reçue sur le pixel ligne l , colonne c (noté $P(l,c)$) à l'instant t et l'intensité reçue sur ce même pixel à l'instant $t+1$. La présence de ces mouvements implique un potentiel décalage de l'échantillon étudié : le point de tissu présenté sur le pixel $P(l,c)$ à l'instant t est probablement représenté sur le pixel $P(l+dl, c+dc)$ à l'instant $t+1$. Ce problème n'apparaît pas dans les travaux de Steimers, puisqu'ils travaillent sur la peau, mais il apparaît dans ceux d'Oeschlagel. Une correction de ces mouvements par filtrage fréquentiel risquant de faire perdre de l'information combinée au fait que les mouvements ne sont pas tout à fait périodiques, nous choisissons plutôt de corriger ces mouvements par recalibrage d'images.

6.1.4.3 - Algorithme de recalibrage développé

De nombreux algorithmes de recalibrage d'images existent dans la littérature (Sotiras et al., 2013). Ceux applicables à la neurochirurgie ont surtout été développés pour reconstruire la surface 3D ou pour recalibrer l'image de la caméra du microscope par rapport à l'image RMN préopératoire (et compenser le phénomène de *brain shift*) (Marreiros et al., 2016; Paul et al., 2009). Certains algorithmes existants ont été appliqués aux premiers travaux sur caméra (Oeschlägel et al., 2015), mais aucun algorithme n'est temps réel. Nous avons donc proposé un algorithme de recalibrage détaillé ci-après, dont la première version a été présentée en conférence (Sdika et al., 2016) puis l'algorithme amélioré a été soumis au journal VISI.

Nous choisissons de recalibrer chaque image de la vidéo par rapport à l'image initiale et non par rapport à l'image précédente, afin d'éviter de cumuler des erreurs d'une image à l'autre. La transformation $T(x,t)$ du pixel x entre l'image initiale et l'image acquise à l'instant t est déterminée selon l'équation (6.6) :

$$T(x,t) = A(t)T_d(x,t) + b(t) \quad (6.6)$$

où la transformation affine $x \rightarrow A(t)x + b(t)$ modélise les transformations rigides globales de la caméra et du patient, et $T_d(x,t)$ représente les transformations déformables du cortex, principalement induites par les mouvements physiologiques. Nous faisons l'hypothèse que cette transformation déformable est contenue dans un petit espace de variations spatiales et temporelles et qu'elle peut donc se décomposer sur une base de vecteurs propres $p_k(x)$ selon l'équation (6.7) :

$$T_d(x,t) = x + T_\mu(x) + \sum_{k=1}^K \lambda_k(t) p_k(x) \quad (6.7)$$

où $T_\mu(x)$ représente le mouvement moyen du pixel de position x au cours du temps, l'ensemble des p_k est la base des vecteurs propres sur lesquels la déformation est décomposée et $\lambda_k(t)$ est la valeur propre 2D, dépendante du temps, associée à chaque vecteur propre. K est le nombre total de vecteurs propres. Dans la pratique, le nombre de vecteurs propres suffisants est autour de $K=5$.

Avec l'hypothèse d'un mouvement répétitif et dans le but de diminuer les temps de calcul, nous choisissons d'effectuer une étape d'apprentissage des déformations pour déterminer la base de décomposition des mouvements du cortex. Cette étape d'apprentissage est effectuée sur les N_{ap} premières images de la vidéo. Dans la pratique, nous avons choisi $N_{ap}=25$, l'apprentissage est effectué uniquement sur des images où le patient est au repos. Cette étape d'apprentissage permet de diminuer drastiquement le nombre de pixels de travail, permettant de proposer un algorithme temps réel.

Au final, l'algorithme développé se décompose en 3 étapes :

1) Estimation des vecteurs de base de la déformation :

Nous recherchons ici à modéliser la transformation $T_d(x,t)$, que nous pouvons donc écrire à partir de l'équation (6.6) comme :

$$T_d(x,t) = B(t)T(x,t) + a(t) \quad (6.8)$$

où $B(t)=A^{-1}(t)$ et $a(t)=-A^{-1}(t)b(t)$. Puisque cette déformation est supposée minime, nous recherchons, pour chaque image, des coefficients qui minimisent l'équation (6.9) :

$$\min_{B(t),a(t)} \frac{1}{2} \sum_{x \in P} \|B(t)T(x,t) + a(t)\|_2^2 . \quad (6.9)$$

Dans cette équation, $T(x,t)$ a été estimé auparavant par une routine de recalage par flux optique et P est un ensemble de pixels, pouvant être aussi bien l'ensemble des pixels de l'image qu'un set de pixels judicieusement choisis pour être représentatifs tout en réduisant le temps de calcul. Dans notre étude, nous choisissons un set de pixels de Harris (Harris and Stephens, 1988).

Cette première étape permet d'estimer les coefficients $B(t)$ et $a(t)$ des N_{ap} images et donc d'estimer $T_d(x,t)$ grâce à l'équation (6.8). Une fois cette estimation réalisée pour chaque image d'apprentissage, la base de transformation p_k et la transformation moyenne T_μ de chaque pixel peuvent être calculés par Analyse en Composantes Principales (ACP) sur ces N_{ap} images.

2) Estimation finale de la transformation :

Une fois les vecteurs $p_k(x)$ et la transformation moyenne de chaque pixel $T_\mu(x)$ obtenus, il reste à calculer $A(t)$, $b(t)$ et $\lambda_k(t)$ pour chaque instant t . Ceci implique de résoudre un système de $2K+6$ inconnues. Avec K autour de 5, il n'est pas nécessaire de travailler sur toute l'image. Nous travaillons donc sur les pixels de Harris précédemment cités, et estimons leur transformation grâce à la méthode d'estimation du mouvement de Lucas et Kanade

(algorithme LK) appliquée sur les pixels x_1 (Lucas and Kanade, 1981). La détermination de $A(t)$, $b(t)$ et $\lambda_k(t)$ revient à résoudre l'équation (6.10) par un algorithme des moindres carrés, noté ULS par la suite (Un-iterative Least Square), en sachant que $T(x_b, t)$ est connue par l'algorithme LK. Notons que nous résolvons un système de 2 équations par pixel, correspondant à ses coordonnées x et y .

$$B(t)T(x_l, t) + a(t) - \sum_{k=1}^K \lambda_k(t) p_k(x_l) = x_l + T_\mu(x_l) \quad (6.10)$$

La résolution de l'équation (6.10) permet de déterminer $A(t)$, $b(t)$ et $\lambda_k(t)$, et les équations (6.6) et (6.7) sont alors appliquées sur tous les pixels de l'image, permettant d'estimer la transformation finale.

3) Robustesse aux points aberrants

La résolution de l'équation (6.10) suivant la norme L_2 (minimisation des écarts au carré), la rend sensible aux points aberrants. Les points aberrants sont des pixels pour lesquels le suivi ne fonctionne pas bien, par exemple en raison de l'introduction d'un outil dans le champ opératoire. Notre modèle se basant sur certains pixels de Harris, si le mouvement de l'un d'eux est mal estimé, ceci induit une erreur sur le mouvement calculé pour tous les pixels de l'image. Il est donc impératif d'éliminer les pixels de Harris aberrants. Nous pondérons alors l'information des pixels de Harris selon l'hypothèse d'un mouvement régulier dans le temps. Ainsi, un pixel qui bouge trop vite, ou pas assez, sera considéré comme point aberrant et aura un poids faible. La pondération de l'équation (6.10) est effectuée en comparant la transformation à l'instant t et celle à l'instant $t-1$ avec un seuil de tolérance. Le nouveau modèle de recalage proposé est alors appelé IRLS (Iterative Reweighted Least Square).

6.1.4.4 - Validation de l'algorithme de recalage.

L'algorithme de recalage proposé dans la partie précédente est appliqué aux vidéos enregistrées au bloc opératoire, et nous proposons d'évaluer le temps de calcul, la robustesse aux points aberrants et la minimisation des déformations qui ressortent. Nous observons tout d'abord que cet algorithme permet de passer d'un temps de calcul de 0.45 seconde par image en utilisant l'algorithme LK sans apprentissage, à 0.04 seconde pour le modèle ULS et à 0.09 seconds pour le modèle IRLS.

Par ailleurs, la Figure 6-2 présente la robustesse de l'algorithme présenté à l'intrusion d'un outil.

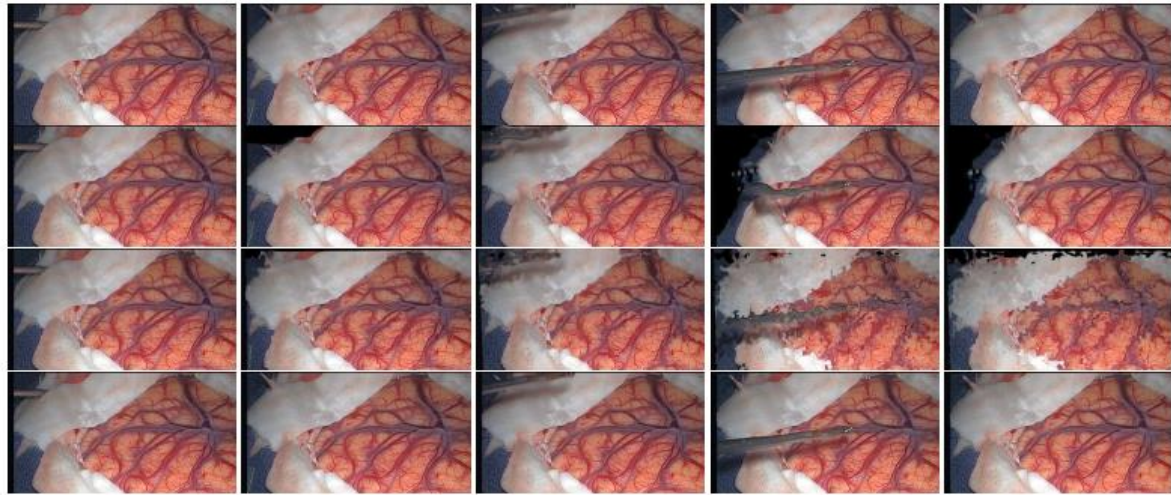


Figure 6-2 : Robustesse du modèle de recalage à l'intrusion d'un outil. Les différentes lignes présentent des captures d'écran des vidéos suivant la méthode de recalage : ligne 1, sans recalage ; ligne 2, recalage LK; ligne 3, recalage ULS; ligne 4, recalage IRLS.

Nous observons sur cette Figure 6-2 cinq captures d'écran de vidéos, la première ligne étant la vidéo brute, la seconde la vidéo recalée par l'algorithme LK, la troisième celle recalée par l'algorithme ULS et enfin la dernière ligne étant la vidéo recalée par l'algorithme IRLS. Nous observons l'intrusion d'un objet dans la 3^{ème} colonne, qui est distordu sur les images recalées par les algorithmes LK et ULS mais dont la distorsion est corrigée dans l'algorithme IRLS. Cette distorsion augmente dans les colonnes 4 et 5 pour les algorithmes LK et ULS, même si l'objet a disparu dans la 5^{ème} colonne. La correction est stable pour l'algorithme IRLS, ce qui valide la robustesse du modèle proposé.

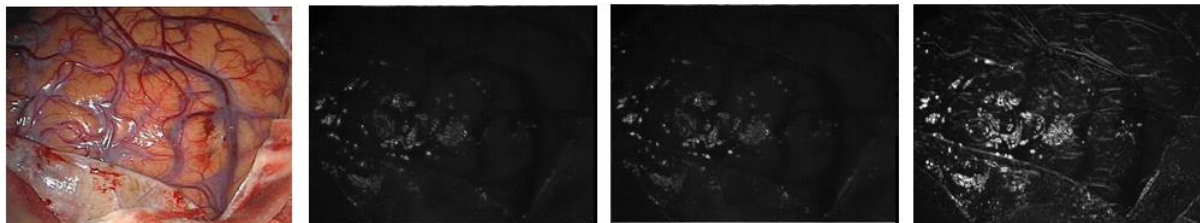


Figure 6-3 : Image différence avant/après recalage. En couleur, l'image RVB de l'échantillon. En noir et blanc, à gauche, image recalée par flux optique. Au centre, recalage ULS. A droite, sans recalage.

D'autre part, la Figure 6-3 propose l'écart type de la différence entre l'intensité d'un pixel à l'instant t , avec l'intensité du pixel à l'instant initial, et ce pour tous les pixels de l'image. En couleur se trouve une photo du cerveau. En noir et blanc sont présentés les différences d'intensité de chaque pixel, avant et après recalage : à gauche, recalage standard par flux optique, au centre, recalage ULS et à droite, sans recalage. Nous observons que le recalage permet de diminuer les variations d'intensité des pixels, et que notre méthode semble aussi performante qu'un recalage classique par flux optique.

6.1.4.5 - Conversion en variations oxymétriques

Une fois l'algorithme de recalage appliqué sur les vidéos, nous proposons d'inverser le système (6.4) pour obtenir les variations oxymétriques à partir des variations colorimétriques et afficher la variation de concentration totale de l'hémoglobine selon l'équation (6.5). L'équipe d'Oelschlger montre qu'en plus de la nécessité de recalibrer spatialement les vidéos pour corriger le mouvement physiologique, un traitement temporel est également nécessaire pour corriger la dessiccation* et uniformiser les données (Oelschläger et al., 2013). La dessiccation est un phénomène de déshydratation des tissus. La Figure 6-4 présente l'évolution temporelle de la composante rouge d'une zone placée sur les compresses (hors du cerveau). Nous observons deux phénomènes : une dessiccation (diminution lente du signal collecté) et un mouvement brusque entre les images 2400 et 2700 de la vidéo, probablement lié à un mouvement de la main. La dessiccation dépend de la longueur d'onde, du type de tissu et de l'angle entre la normale de la surface observée et l'axe de la caméra. Nous proposons un redressement de la pente par régression linéaire entre le début et la fin du signal pour chaque pixel. Ces deux derniers étant dans une situation identique (repos), le niveau de gris doit être le même. Nous ne proposons aucune correction pour l'artéfact de mouvement.

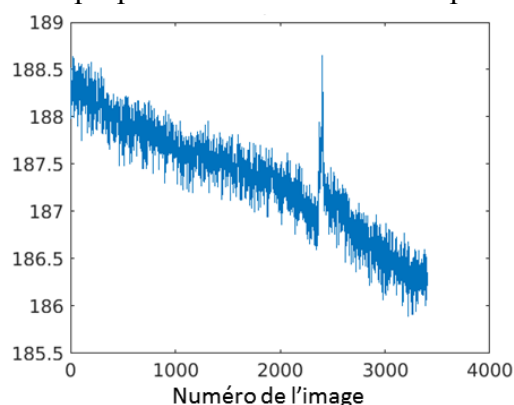


Figure 6-4: Illustration du phénomène de dessiccation.

Ensuite, nous proposons d'appliquer un filtre fréquentiel qui a pour but de minimiser les variations colorimétriques induites par la pulsation cardiaque et la respiration, car ces dernières peuvent couvrir le signal recherché, comme proposé par (Pichette et al., 2016). Nous utilisons un filtre de Butterworth d'ordre 3 avec une fréquence de coupure à 0.1 Hz. Ces valeurs ont été déterminées pour optimiser le compromis entre la stabilité du signal d'intérêt et la suppression du signal parasite. La Figure 6-5 présente la transformée de Fourier de l'intensité lumineuse réfléchie sur une zone du cortex et captée par la composante bleue de la caméra avant (bleu) et après filtrage (rouge).

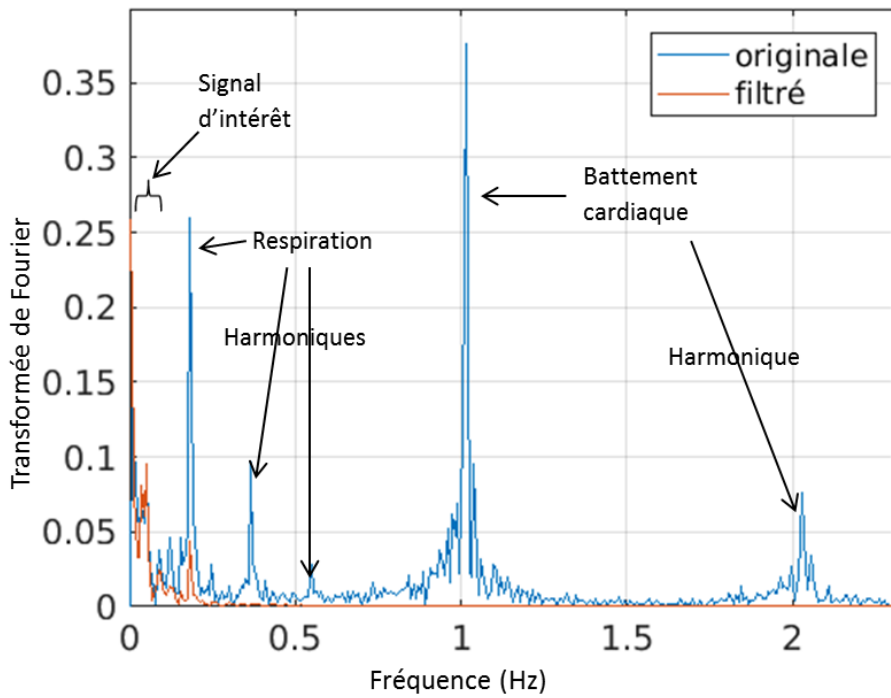


Figure 6-5: Transformée de Fourier du signal collecté sur une zone de cortex hors de la zone supposée fonctionnelle.

Nous observons sur cette Figure 6-5 une première fréquence autour de 0.19 Hz, traduisant le mouvement respiratoire du patient. L'autre fréquence apparaît vers 1 Hz, traduisant la pulsation cardiaque du patient. Des harmoniques de ces fréquences fondamentales apparaissent aussi. Enfin, nous observons des basses fréquences présentant le signal d'intérêt. Ces valeurs sont cohérentes avec la littérature, puisque la fréquence cardiaque éveillée vaut entre 1 et 1.3 Hz chez l'adulte mais l'usage de propofol la diminue de 25% à 40 % (Viviand, 1998). De même, la fréquence respiratoire éveillée vaut entre 0.2 Hz et 0.33Hz mais est aussi ralentie par l'anesthésie.

Une fois ces étapes de traitement effectuées, nous appliquons deux matrices de conversion des données colorimétriques en données oxymétriques disponibles dans la littérature (Jakovels and Spigulis, 2012; Kohl-Bareis et al., 2010) et traçons la variation de concentration en hémoglobine totale comme la somme des valeurs absolues des variations de concentration en hémoglobine oxygénée et désoxygénée selon l'équation (6.5). Une fois la variation de concentration en hémoglobine totale trouvée, nous appliquons un filtre 2D médian avec une taille de masque de 7x7 pixels pour éliminer les points chauds et uniformiser le signal. Pour finir, nous calculons la variation relative de l'hémoglobine totale (ΔC_{th}^{Rel}) selon l'équation (6.11) :

$$\Delta C_{th}^{Rel} = \frac{\overline{\Delta C_{th}^{Stimulation}} - \overline{\Delta C_{th}^{Re\ pos}}}{\overline{\Delta C_{th}^{Re\ pos}}} \quad (6.11)$$

où $\overline{\Delta C_{th}^{Stimulation}}$ est la moyenne des variations de concentration totale en hémoglobine au cours de la période de stimulation et $\overline{\Delta C_{th}^{Repos}}$ est la moyenne des variations de concentration

totale en hémoglobine au cours de la période initiale de repos. La Figure 6-6 présente ces variations sur toute l'image, avant seuillage (à gauche) puis ces variations seuillées à 3, superposées à l'image initiale du cerveau (à droite). Le rond rouge montre la zone fonctionnelle attendue. Les résultats présentés sont obtenus avec la matrice de conversion proposée par Jakovels (Jakovels and Spigulis, 2012). L'utilisation de la matrice développée par Kohl (Kohl-Bareis et al., 2010) identifie la même zone mais avec des variations plus faibles.

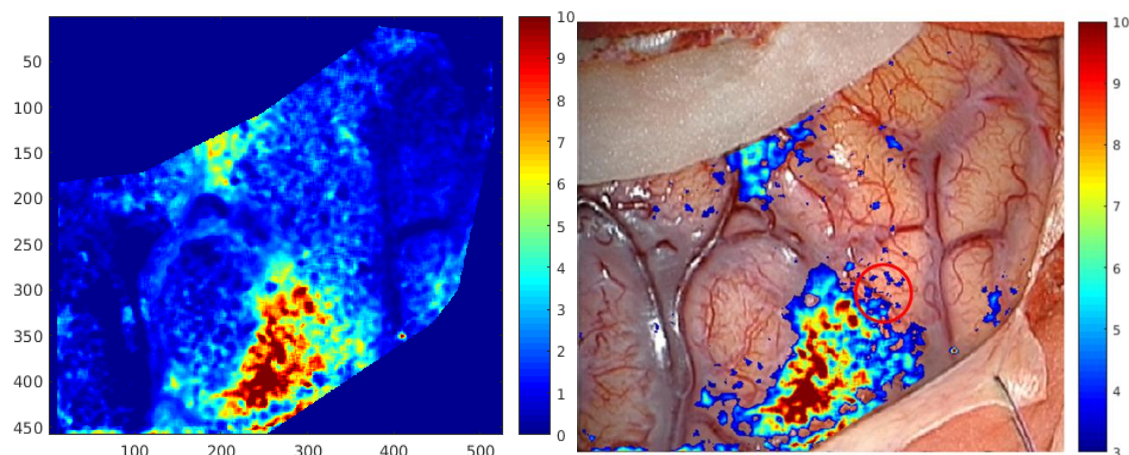


Figure 6-6: Variation relative de la concentration totale en hémoglobine lors d'une stimulation cérébrale, avec superposition à l'image du cerveau à droite.

Nous observons sur la Figure 6-6 une zone d'activation très prononcée proche de celle identifiée par le neurochirurgien lors de la stimulation électrique. Nous notons aussi que la zone d'activation décelée par notre technique optique est plus étendue que celle par la stimulation électrique. Ce décalage peut s'expliquer par la différence de phénomènes observés, l'un étant la réponse électrique (rapide et locale) et l'autre la réponse hémodynamique (diffuse et plus lente). Par ailleurs, ce léger décalage de zone détectée électriquement et optiquement pourrait être lié au sens de circulation du message (cerveau vers membre ou membre vers cerveau). Ainsi, de nombreuses hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces différences et nécessitent des travaux complémentaires. Nous notons également une zone active en haut de l'image de moins forte amplitude et qui se trouve dans une zone avec de nombreux gros vaisseaux.

6.1.4.6 - Conclusion et suite des travaux

En conclusion, nous avons pu identifier en toute fin de thèse une activité cérébrale proche de celle identifiée en routine clinique. Ces résultats sont prometteurs mais nécessitent d'être améliorés : d'autres expériences sont nécessaires pour valider notre technique, notamment sur l'étendue de la zone fonctionnelle. Par ailleurs, le traitement proposé a été effectué au laboratoire selon des modèles étudiés séparément mais qui visent à être exécutables en temps réel, ce qu'il faudra confirmer en appliquant séquentiellement les différentes étapes sans pause. En parallèle, nous recherchons d'autres pistes d'amélioration telles que l'utilisation d'une caméra hyperspectrale ou le développement d'autres modèles de traitement des données (étude temporelle de corrélation des signaux collectés avec le

paradigme envoyé, étude fréquentielle, étude en composantes principales...). Ces différents modèles sont étudiés par d'autres équipes, qui parviennent à identifier des variations hémodynamiques sur cerveau humain dans le cas de crises d'épilepsies par exemple (Pichette et al., 2016) ou lors d'une chirurgie cérébrale avec stimulation électrique du nerf médian (Oelschlägel et al., 2015).

Outre la nécessité d'identifier les zones fonctionnelles pendant l'opération, nous avons souhaité étudier d'autres propriétés des deux états de la PpIX pour mieux les caractériser. Ceci a été effectué dans le cadre de deux collaborations. L'une des collaborations a été réalisée avec le laboratoire ILM (Lyon) dans le but d'étudier les propriétés non linéaires des deux états. L'autre a été réalisée avec l'IMNC (Saclay) pour étudier le temps de vie de chacun des deux états. Les protocoles et résultats préliminaires de ces deux collaborations sont présentés dans la suite.

6.2 - Etude des propriétés non linéaires des deux états de la PpIX

Nous avons montré que la fluorescence linéaire de la PpIX présente deux bosses principales centrées autour de 620 nm et 634 nm. L'écart est faible, et nous avons vu que les centres de ces bosses, leurs largeurs à mi-hauteur ainsi que leurs formes générales diffèrent suivant le microenvironnement. Nous avons initié une collaboration avec le laboratoire ILM (Lyon) dans le but de déterminer si les deux états sont excitables en fluorescence à deux photons et d'étudier l'allure du spectre émis dans ces conditions. L'équipe de Lu (Lu et al., 2008) a déjà montré dans des cellules l'intérêt de cette technique par rapport à la fluorescence un photon (minimisation du photo-blanchiment de la PpIX et de l'autofluorescence) pour l'état 634 et nous étudions maintenant son intérêt pour discriminer davantage les deux états. La fluorescence à deux photons est un processus non linéaire qui excite une molécule par absorption de deux photons de longueur d'onde double de sa bande de Soret (soit vers 808 nm pour la PpIX). La molécule fluorescente est alors excitée et réémet de la lumière pour revenir à son état fondamental. L'un des intérêts est la plus grande pénétration dans les tissus de la source d'excitation, puisqu'elle est dans la fenêtre optique. Cette technique utilise des lasers impulsionnels d'énergie crête à crête élevée. L'application *in vivo* n'est ainsi pas envisageable pour l'instant mais une différence de réponse des deux états permettrait par exemple d'envisager la conception d'un système de mesure *ex vivo* qui pourrait être installé dans le bloc opératoire et remplacer l'analyse extemporanée. Nous présentons dans cette partie les points clefs de la méthode et les principaux résultats obtenus lors de cette collaboration. Ces premiers résultats sont en cours de publication et des travaux sur biopsies sont programmés.

6.2.1 - Matériel et méthodes

Une solution mère de PpIX de concentration initiale 1.9×10^{-3} M a été préparée, toujours dans le but d'être proche des concentrations présentes *in vivo*. L'addition de NaOH permet de faire apparaître l'état 620 tandis que l'addition de Tween 20 permet de faire apparaître l'état

634. Des mesures de fluorescence ont été effectuées sur ces solutions isolées puis nous avons ajouté du gel d'agarose aux solutions précédentes, pour obtenir un échantillon solide passant d'un état à l'autre. Ceci n'a pas permis d'obtenir de la fluorescence de l'état 620 donc nous avons confectionné un fantôme intermédiaire présenté sur la Figure 6-7 : dans la partie inférieure de l'échantillon (à gauche sur la photo) se trouve un gel contenant l'état 634 et dans la partie supérieure se trouve du liquide contenant l'état 620 (à droite sur la photo). Ce fantôme est présenté sur la Figure 6-7 (avec une rotation de 90° dans le sens trigonométrique) et nous pouvons observer une petite zone centrale où le gel de 634 possède un état de surface de mauvaise qualité et où l'état 620 sous forme liquide s'est infiltré.



Figure 6-7 : Fantôme des deux états de PpIX dans un gel d'agar. La photo est tournée de 90° dans le sens trigonométrique.

La méthode utilisée est décrite dans l'article (Perrenoud-Rinuy et al., 2002). Le fantôme est excité par un laser pulsé de longueur d'onde 808 nm, de largeur temporelle de 150 fs, opérant avec un taux de répétition de 76 MHz. Le fantôme est ensuite translaté selon l'axe z afin de mesurer sa réponse à différentes positions.

6.2.2 - Résultats et discussion

La Figure 6-8A présente le spectre de fluorescence émis par le fantôme pour deux positions z, sous excitation de longueur d'onde 808 nm. On observe la présence d'une bosse centrée à 631 nm pour l'échantillon contenant l'état 634 ($z = 5$ mm) et d'une bosse centrée à 618 nm pour l'état 620 ($z = 11$ mm). On observe par ailleurs que l'intensité de fluorescence des maxima présente un rapport 40 environ. Une stimulation deux photons excite donc chaque état de la PpIX puisqu'on obtient des spectres d'émission proches de ceux sous excitation un photon, avec une intensité de fluorescence de l'état 634 largement supérieure à celle de l'état 620 pour une même concentration initiale. La réponse des deux états peut être modélisée par une gaussienne pour chaque état, représentées sur la Figure 6-8A, centrée à 618 nm et de largeur à mi-hauteur 16 nm pour l'état 620 et centrée à 631 nm et de largeur à mi-hauteur 10 nm pour l'état 634. Le spectromètre possédant un décalage de 1 nm, les centres de ces spectres se situent à 619 nm et 632 nm respectivement.

La Figure 6-8B présente la mesure de 4 spectres de fluorescence en fonction de la position z sur le fantôme ($z=4$ en noir, $z=8$ en rouge, $z=9$ en vert et $z=10$ en bleu). Nous observons un décalage de longueur d'onde centrale autour de $z=9$ mm.

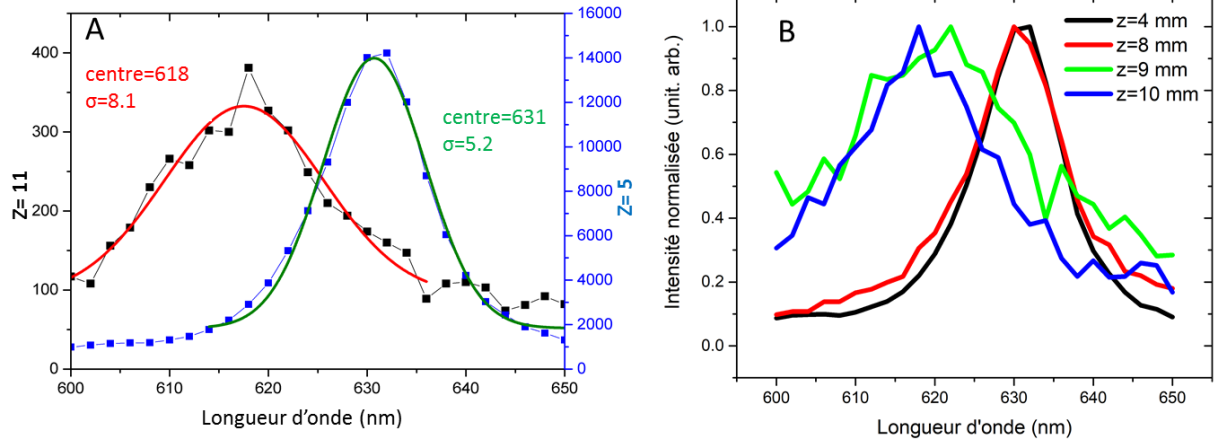


Figure 6-8: Spectre de fluorescence émis par chaque état sous excitation deux photos (à gauche) et spectres de fluorescence émis par un fantôme de PpIX présentant un état à chaque extrémité et un mélange des deux au centre, sous excitation deux photons (à droite).

Les spectres de fluorescence émis par l'échantillon en balayant l'axe z ont été ajustés à l'aide des deux gaussiennes précédemment citées et l'aire sous la courbe de chaque gaussienne a été obtenue. Nous avons alors tracé le ratio de ces deux aires en fonction de la position sur l'axe z pour différents intervalles de longueur d'onde. Ce ratio $\xi(z, \Delta\lambda)$ est exprimé par la formule :

$$\xi(z, \Delta\lambda) = \frac{\int_{\lambda_{620}-\Delta\lambda}^{\lambda_{620}+\Delta\lambda} I_{TPEF}(\lambda, z) \cdot d\lambda}{\int_{\lambda_{634}-\Delta\lambda}^{\lambda_{634}+\Delta\lambda} I_{TPEF}(\lambda, z) \cdot d\lambda} \quad (6.12)$$

où $\Delta\lambda$ est l'intervalle de longueur d'onde sur lequel est calculée l'aire, I_{TPEF} et l'intensité de fluorescence collectée sous excitation à deux photons. Sur la Figure 6-9 sont représentées en noir la valeur du ratio ξ pour $\Delta\lambda=4$ nm et en rouge la valeur du ratio pour un unique point de mesure ($\Delta\lambda=0$). La courbe en bleue présente un ajustement de Boltzmann des valeurs pour $\xi(z, 4)$.

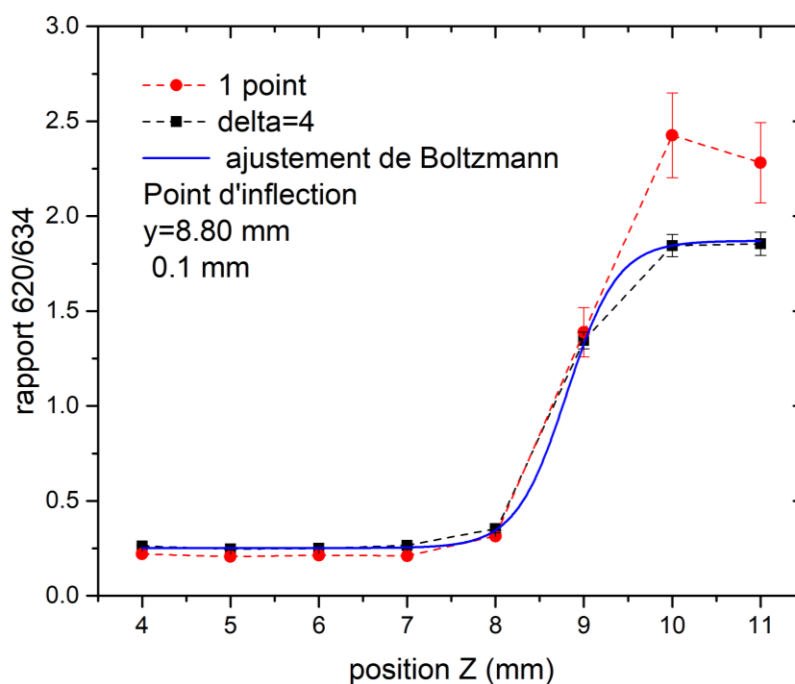


Figure 6-9 : $\xi(z, \Delta\lambda)$ en fonction de la position z pour $\Delta\lambda = 0$ (ronds rouges) et $\Delta\lambda = 4$ nm (carrés noirs). La courbe bleue représente un ajustement par une fonction de Boltzmann pour estimer la position de la zone de séparation des deux états de PpIX.

Nous observons sur cette Figure 6-9 que le ratio permet de retrouver l'abscisse de séparation des deux états, vers 8,8 mm. Ceci a été déterminé sur les mesures considérant une zone d'intégration plus grande (permettant d'augmenter le nombre de coup et donc de faire diminuer l'erreur statistique) mais nous observons que la position semble assez bien définie sur les mesures ne considérant qu'un seul point, ce qui permet un gain de temps. Ces premiers résultats sont en cours de publication et un post-doctorant a été recruté pour continuer cette étude préliminaire en préparant des fantômes qui soient des mélanges homogènes des deux états ainsi qu'en effectuant des travaux sur biopsies.

6.3 - Recherche du temps de vie de chaque état de la PpIX

Le but de cette collaboration est d'étudier le temps de vie de chacun des états et, s'il diffère, d'envisager de l'utiliser pour discriminer les tissus cérébraux sondés afin d'identifier leur densité en cellules tumorales. Le laboratoire associé, l'IMNC, parvient à discriminer des biopsies suivant les temps de vie de fluorescence endogène (Zanello et al., 2017). Nous souhaitons utiliser leur expertise pour déterminer les temps de vie des deux états.

6.3.1 - Matériel et méthode

Le système de mesure de temps de vie est décrit dans les articles de l'équipe d'Haidar (Zanello et al., 2017) et permet la mesure du temps de vie et du spectre de fluorescence des échantillons sondés. Le but de notre étude étant de mettre en évidence des temps de vie pour chaque état, nous étudions des fantômes de chaque état isolé, selon le protocole présenté dans le Chapitre 3 mais travaillons avec des concentrations beaucoup plus élevées (0.1g/L). La

solution est excitée par une diode laser pulsée centrée à 405 nm et de 60 ps de pulse. Le temps de vie de chaque solution est mesuré à l'aide d'un compteur de temps d'arrivée des photons (TimeHarp 200 *PicoQuant*) et le spectre de chaque solution est mesuré à l'aide du spectromètre QE 6500 (*Ocean Optics*) présent sur le montage. Pour chaque solution, 4 mesures spectrales et de temps de vie sont effectuées : l'une sans filtre, une autre avec un filtre passe-bande centré à 620 nm (filtre 620), une troisième avec un filtre passe-bande centré à 630 nm (filtre 630) et la dernière avec un filtre passe-bande centré à 680 nm.

L'observation des données collectées pour les fantômes de l'état 620 laisse supposer la présence de deux temps de vie, un court et un long. Ceci est corroboré par la littérature (Richards-Kortum and Sevick-Muraca, 1996) et nous ajustons donc les données collectées par deux exponentielles, après retrait du background. Nous ne présentons pour l'instant que les résultats sur les fantômes des deux états isolés : leurs temps de vie et spectres de fluorescence.

6.3.2 - Résultats et discussion

La Figure 6-10 présente les courbes en temps de vie d'une solution de l'état 620 filtrée avec le filtre 620 (A) et une solution de l'état 634 filtrée avec le filtre 630 (B) en utilisant une échelle semi-logarithmique.

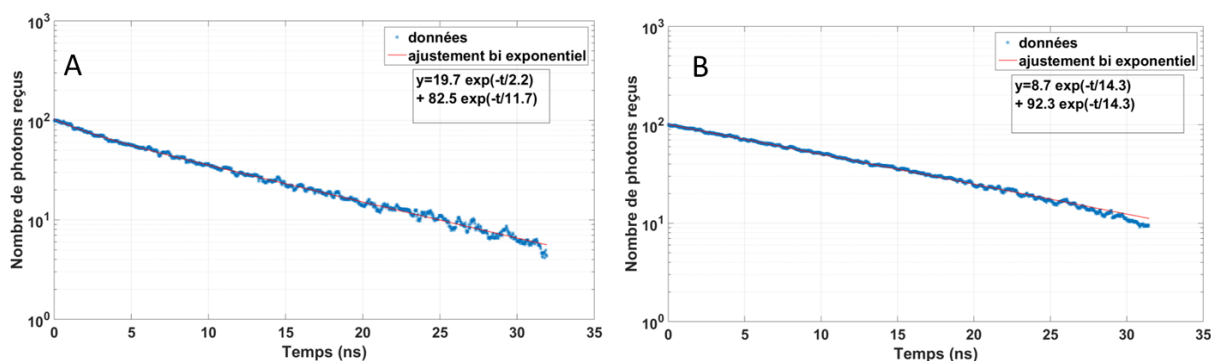


Figure 6-10 : Temps de vie d'une solution à pH basique (A) et avec ajout de T20 (B).

La Figure 6-10 montre que la décroissance exponentielle du temps de vie peut être ajustée par une double exponentielle avec un excellent ajustement. Les rapports d'amplitude des deux temps trouvés sont élevés, ce qui permet de supposer qu'il n'y a qu'un état dans chaque solution. Nous obtenons donc un temps de vie d'environ 11.5 +/- 1 ns pour l'état 620 (mesure sur 6 fantômes) et 14.3 +/- 0.05 ns pour l'état 634 (mesure sur 2 fantômes). Nous observons par ailleurs que l'ajustement renvoie soit deux temps de vie très proches (comme illustré sur la Figure 6-10B), soit un temps de vie très faible et un autre plus élevé (comme illustré sur la Figure 6-10A). Le court temps de vie renvoyé parfois est encore à interpréter, il pourrait par exemple être lié à un autre centre de fluorescence de la PpIX (par exemple la deuxième bosse de chaque état) ou bien lié au montage (puisque la mesure de temps de vie d'une solution tampon renvoie environ 2 ns). Par ailleurs, ces temps sont conformes à l'ordre de grandeur des temps de vie de la PpIX dans la littérature (Brancaleon et al., 2004). Enfin, l'équipe de Russell montre que le temps de vie de fluorescence de la PpIX dans les cellules

(6.3+-1.2 ns) est significativement plus court que dans des solutions organiques (16.4+-0.2 ns), ce qu'il sera important de considérer par la suite (Russell et al., 2008).

Ce traitement bi-exponentiel a été appliqué à des mesures effectuées sur fantômes présentant un mélange des deux états de PpIX mais les résultats sont encore à interpréter puisque les deux temps de vie renvoyés ne correspondent pas aux temps respectifs identifiés pour chaque état isolé. Les perspectives de ce travail sont donc l'analyse de ces données, afin de déterminer si l'on peut relier la contribution de chaque état renvoyée par l'analyse de temps de vie à celle renvoyée par l'analyse de spectre selon le modèle développé dans le Chapitre 3.

6.4 - Comparaison avec l'ester de PpIX

Lors de l'étude bibliographique sur la variabilité du spectre émis par la PpIX, nous avons noté que certaines équipes présentaient le spectre émis par son ester dissout dans du chloroforme (Marois et al., 2016). Nous avons donc étudié le spectre émis par la PpIX dissoute dans de l'éthanol avec ajout de T20 ou dans du DMSO avec ajout de T20 ainsi que par l'ester de PpIX dissout dans du chloroforme. Nous avons ajouté à cette comparaison différents spectres mesurés dans des cœurs de gliomes. Ces spectres sont tracés sur la Figure 6-11, avec en gris les mesures *in vivo*, en bleu, le spectre émis par l'ester de PpIX sous excitation laser, en vert le spectre émis par la PpIX dissoute dans l'éthanol et diluée dans l'eau, sous excitation laser (trait plein) et avec une DEL (pointillés) et en rouge le spectre émis par la PpIX dissoute dans du DMSO et diluée dans PBS sous excitation avec une DEL. Notons ici que non seulement le solvant et diluant de la PpIX changent, mais aussi la source d'excitation (laser ou DEL, toujours centrés à 405 nm).

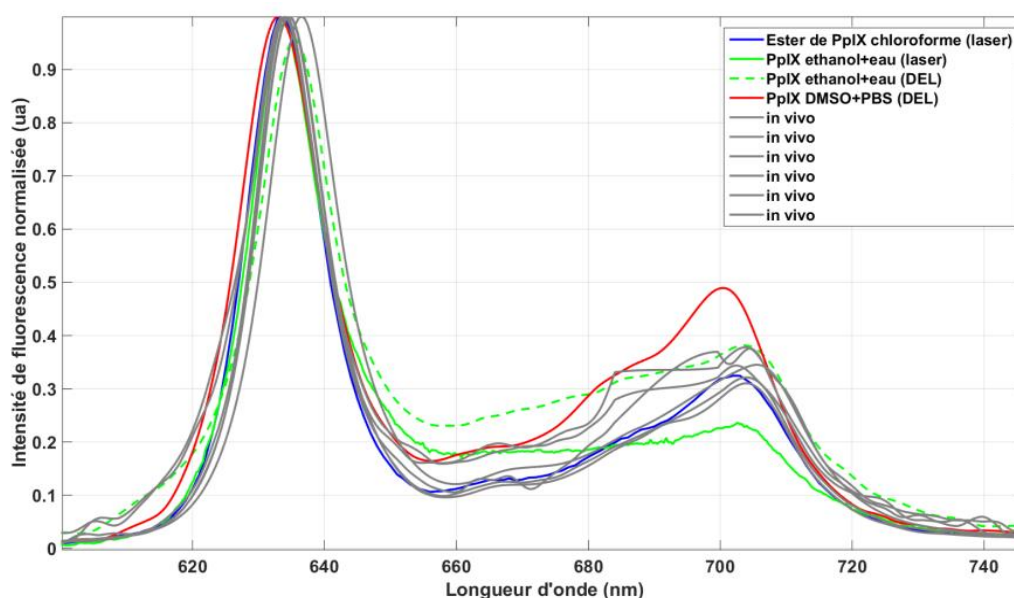


Figure 6-11 : Comparaison de mesures *in vivo* sous excitation avec une DEL (gris) et sur fantômes de PpIX. En bleu, ester de PpIX et excitation laser, en vert PpIX dissoute dans l'éthanol et diluée dans l'eau, excitation laser (trait plein) et DEL (pointillés). En rouge, PpIX dissoute dans DMSO et diluée dans PBS, excitation DEL.

Nous confirmons sur la Figure 6-11 la variabilité du spectre émis par la PpIX après 650 nm, la zone 685-700 nm étant toutefois la zone interpolée pour les mesures *in vivo*. Nous pouvons noter que la courbe acquise sur fantôme qui suit le mieux celle des cœurs tumoraux est celle de l'ester de PpIX dissout dans du chloroforme (courbe bleue). L'intérêt de l'ester de PpIX a été étudié pour la PDT (Manivasager et al., 2003, 2006) mais aussi pour la gastroentérologie (Rc et al., 2002). Cette piste pourrait être étudiée pour le cerveau, même s'il reste peu probable qu'une réaction d'estérification ait lieu dans le cerveau puisque cette dernière demande des conditions particulières de température et la présence d'alcool.

6.5 - Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu les axes de recherche qui ont été travaillés en parallèle de l'étude clinique, dans le but d'une part de répondre au deuxième défi du neurochirurgien en cherchant à identifier les zones de fonctionnalité cérébrale en temps réel au cours de l'opération et d'autre part de mieux caractériser les deux états de la PpIX. Si les modèles et techniques proposées pour identifier ces zones de fonctionnalité cérébrale sont encore à améliorer, nous avons déjà proposé un algorithme de recalage temps réel, permettant de compenser les mouvements du cerveau induits par la respiration et le pouls du patient. Par ailleurs, de nombreuses pistes de traitement des données sont encore en cours, inspirées de travaux qui ont donné des résultats concluants. D'autre part, nous avons identifié une réponse de chacun des états sous excitation deux photons et cherchons maintenant à utiliser ces propriétés sur biopsies. Par ailleurs, nous sommes parvenus à déterminer des temps de vie légèrement différents pour les deux états isolés. Enfin, nous avons soulevé la question de la ressemblance du spectre d'émission de l'ester de PpIX avec les données acquises *in vivo*.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans le contexte clinique de la résection de gliomes. Ces derniers étant des tumeurs infiltrantes du système nerveux central, la problématique clinique est d'ôter un maximum d'infiltrations tumorales tout en préservant la fonctionnalité cérébrale.

Le but de ces travaux de thèse était de proposer de nouveaux outils optiques interventionnels et biomarqueurs associés pour assister le neurochirurgien au moment de l'exérèse, afin de lui permettre de visualiser les infiltrations des gliomes aujourd'hui invisibles, ainsi que les zones de fonctionnalité cérébrale. Le contexte des travaux a été détaillé dans le premier chapitre, où nous avons montré l'intérêt de la fluorescence de la PpIX pour visualiser les infiltrations tumorales et la variabilité de son spectre d'émission en fonction de son microenvironnement. Cette variabilité du spectre d'émission de la PpIX avec son microenvironnement fut l'hypothèse fondatrice de ce travail de thèse puisque nous avons recherché la présence de deux états de la PpIX dans les tissus tumoraux, là où les techniques actuelles ne recherchent qu'un seul état. Les états proposés sont des configurations où la PpIX émet des spectres de fluorescence différents, présentant un maximum soit vers 622 nm (état 620), soit vers 634 nm (état 634). Ces deux états ont des propriétés d'absorption différentes, et nous avons donc conçu, développé et caractérisé un système interventionnel proposant une excitation multi-longueurs d'onde adaptée aux deux états recherchés. L'utilisation de ce système sur fantômes de PpIX mimant les propriétés des gliomes a permis de développer un modèle d'ajustement des spectres collectés qui suppose que la fluorescence émise par la PpIX est une combinaison linéaire des spectres émis par les deux états de référence, sur la bande spectrale 608-637 nm. Cette étude a aussi permis de proposer des fantômes de PpIX mimant les propriétés des gliomes complémentaires d'une banque de donnée de fantômes déjà proposée dans laquelle le spectre collecté est proportionnel à la concentration en PpIX. Avant d'utiliser le système au bloc opératoire, nous avons établi un protocole de recherche biomédicale présentant le protocole de mesure et justifiant par une analyse de risques que ces derniers sont fortement limités. Ceci nous a permis d'obtenir les autorisations de l'ANSM et d'un comité d'éthique, autorisations indispensables pour commencer l'étude clinique.

L'utilisation *in vivo* du système a tout d'abord permis de répondre aux objectifs de faisabilité technique et de sécurité d'utilisation du dispositif au bloc opératoire sur 10 patients. Ensuite, nous avons analysé les données spectroscopiques suivant deux modèles distincts qui ont rendu possible la proposition de différents biomarqueurs discriminant les tissus suivant leur densité en cellules tumorales.

Le premier modèle d'analyse utilisé fut le modèle d'ajustement développé sur fantômes, qui renvoie donc la contribution des deux états à la fluorescence totale (α_{620} et α_{634}). Le ratio de ces deux contributions a non seulement corroboré les résultats de l'étude préliminaire sur biopsies en proposant une discrimination des cœurs des GHG de leurs marges, mais a de plus

amélioré ces résultats en prouvant qu'il permettait une discrimination significative des marges des GHG du tissu sain. Par ailleurs, le tracé d'une contribution en fonction de l'autre montre que nous détectons de la fluorescence de l'état 620 dans les marges peu denses des GHG et dans les marges des GBG, là où la microscopie de fluorescence n'en détecte pas. Ce tracé 2D, tout comme le tracé du module en fonction de la phase d'un nombre complexe $z = \alpha_{620} + i\alpha_{634}$, permettent de proposer une ébauche de discrimination graphique des tissus en fonction de leur densité en cellules tumorales. Nous proposons ainsi une séparation graphique des échantillons sains, des marges peu denses des GHG, des marges des GHG et des cœurs des GHG. Nous proposons aussi une zone pour les marges des GBG. La présence de cet état 620 mise en évidence dans les marges des GBG et les marges peu denses des GHG est d'autant plus intéressante que son coefficient d'absorption et son rendement de fluorescence sont plus faibles que ceux de l'état 634, ce qui signifie qu'une fluorescence moins intense ne traduit pas forcément une concentration plus faible en PpIX. Ces résultats, novateurs, montrent d'une part que nous détectons de la fluorescence de la PpIX là où les techniques actuelles n'en détectent pas et d'autre part que cette fluorescence met en évidence des infiltrations tumorales. Au final, nous apportons des éléments de réponse à la problématique clinique introduite en début de mémoire en proposant une piste de séparation des marges du tissu sain. La suite de ces travaux serait la confirmation de l'efficacité clinique de ces biomarqueurs puis une étude incluant plus de patients. Dans cette nouvelle étude, une augmentation de la puissance en sortie des DELs pourrait aider à augmenter le RSB et ainsi améliorer les résultats obtenus, notamment pour les GBG.

Le deuxième modèle d'analyse propose une représentation 3D des données acquises aux trois sources d'excitations pour un même échantillon. Ceci permet d'étudier simultanément les données renvoyées par les trois sources d'excitation et de prouver l'intérêt d'une excitation multi-longueurs d'ondes. L'étude du volume du nuage de points d'une classe tout comme l'étude de l'anisotropie fractionnelle (AF) de chaque échantillon ont montré une diminution de ces biomarqueurs avec la quantité en cellules tumorales. La diminution de l'AF traduit une diminution de corrélation des données qui soutient l'intérêt de l'excitation multi-longueurs d'ondes mise en place.

Enfin, le dernier chapitre de ce manuscrit fut la présentation de différents travaux entrepris pendant la thèse et qui sont des perspectives de l'objectif principal. Nous avons d'abord proposé l'utilisation d'une caméra optique pour répondre au deuxième défi qui se présente au neurochirurgien, à savoir la localisation de la fonctionnalité cérébrale. Ces travaux proposent un algorithme de recalage des vidéos acquises, afin de s'affranchir du mouvement pseudopériodique induit par les mouvements physiologiques du patient (respiration, pouls) et des variations d'intensité induites par un potentiel mouvement de la caméra ou une ombre dans le champ opératoire. Cet algorithme, temps réel, a permis de compenser ce mouvement. Nous proposons ensuite de compenser la dessiccation des tissus et les variations colorimétriques qui ne sont pas dues à une activation cérébrale à l'aide de filtres, avant d'appliquer une matrice de conversion des données colorimétriques en variations

hémodynamiques. Les résultats obtenus à l'aide de matrices de la littérature corroborent la localisation de la zone fonctionnelle identifiée par stimulation électrique. Les perspectives de ces travaux sont le développement de matrices de conversions adaptées au système développé, l'utilisation d'une caméra hyperspectrale, ou des analyses temporelles et fréquentielles des données afin de proposer le meilleur marqueur de fonctionnalité cérébrale. En parallèle, nous avons aussi déterminé un temps de vie de fluorescence de chacun des états isolés, et des travaux sont maintenant nécessaires sur des fantômes présentant les deux états afin de montrer que l'étude de temps de vie des deux états pourrait aider à mieux discriminer les tissus. Enfin, nous avons étudié les propriétés non linéaires des deux états et montré que la fluorescence à deux photons sur fantôme présentant les deux états isolés permettait de retrouver les spectres de fluorescence obtenus sous excitation un photon. Un post doctorant a été recruté pour étudier le potentiel de ces propriétés non linéaires pour discriminer des biopsies de gliomes.

Les travaux présentés dans cette thèse cherchent à répondre à un enjeu de santé publique : *« les gliomes cérébraux infiltrants de l'adulte constituent un enjeu de santé publique, car ils affectent une population active et mettent systématiquement en jeu les pronostics fonctionnel et vital qui restent sombres »* (Pallud, 2012). Ainsi, s'ils sont confirmés par des études d'efficacité clinique sur plus de patients, les biomarqueurs proposés au cours de ces travaux de thèse permettraient de maximiser l'exérèse de gliomes, donc d'augmenter l'espérance de vie tout en minimisant la mise en jeu de la fonctionnalité cérébrale et améliorant ainsi la qualité de vie. Les outils développés sont peu onéreux, non ionisants et non invasifs, ce qui en ferait une méthode adaptée à cet enjeu de santé publique.

Publications et communications

Revue internationale avec comité de lecture

M. Sdika, L. Alston, L. Mahieu-Williams, D. Rousseau, J. Guyotat, B. Montcel « *Repetitive Motion Compensation for Real Time Intraoperative Video Processing* » International Journal of Computer Vision (soumis)

L. Alston, D. Rousseau, M. Hebert, L. Mahieu-Williams, B. Montcel “*Characterization of tissue-mimicking protoporphyrin IX optical phantoms in the presence of a non linear relation between concentration and fluorescence intensity*” Journal of Biomedical Optics (soumis)

C. Jonin, C. Ray, E. Salmon, L. Alston, B. Montcel, P-F. Brevet, *Nonlinear Optical Response of Protoporphyrin IX as a potent photosensitizer* (en cours de rédaction, Biomedical Letters - short communication)

Conférences internationales avec comité de lecture et publication des actes

L. Alston, L. Mahieu-Williams, X. Armoiry, D. Meyronet, M. Hebert, D. Rousseau, J. Guyotat, B. Montcel “*Spectroscopic fluorescence measurements as an intraoperative tool for glioma resection*” European Conference on Biomedical Optics (ECBO), Munich, Allemagne, 2015, **poster**

M. Sdika, L. Alston, D. Rousseau, B. Montcel “*Real time motion compensation for hemodynamics estimation during neurosurgery*” IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI), Prague, République Tchèque, 2016, **présentation orale**

L. Alston, J. Guyotat, L. Mahieu-Williams, M. Hebert, P. Kantapareddy, D. Meyronet, D. Rousseau, B. Montcel “*Intraoperative imaging in neurosurgery: relevance of using two fluorescence spectra of 5-ALA induced protoporphyrin IX*” European Conference on Biomedical Optics (ECBO), Munich, Allemagne, 2017, **présentation orale**

Conférences nationales avec comité de lecture

L. Alston, L. Mahieu-Williams, T. Picart, J. Guyotat, B. Montcel “*Spectroscopie de fluorescence de la protoporphyrine IX pour l'assistance peropératoire lors de l'exérèse de gliomes*” Congrès de Neuro-oncologie, Montpellier, France, 2016, **présentation orale**

L. Alston, L. Mahieu-Williams, M. Hébert, J. Guyotat, D. Rousseau, B. Montcel, “*Spectroscopie de fluorescence de la protoporphyrine IX induite par 5-ALA pour l'assistance peropératoire en neurochirurgie*” Optique Diagnostic (OptDiag), Paris, France, 2016, **présentation orale**

L. Alston, L. Mahieu-Williams, M. Hébert, J. Guyotat, D. Rousseau, B. Montcel, “*Interventional imaging in neurosurgery of gliomas with 5-ALA induced PpIX fluorescence spectroscopy*” Physics and Biology, Saclay, France, 2016, **présentation orale –Conférencier invité**

L. Alston, L. Mahieu-Williams, M. Hébert, J. Guyotat, D. Rousseau, B. Montcel, “*Interventional imaging in neurosurgery of gliomas: use of several fluorescence emission spectra of 5-ALA induced protoporphyrin IX to guide neurosurgeons*”, santé@LabEx, Lyon, France, 2016, **poster-Premier prix**

L. Alston, L. Mahieu-Williams, M. Hébert, J. Guyotat, D. Rousseau, B. Montcel, “*Interventional imaging in neurosurgery of gliomas: use of several fluorescence emission spectra of 5-ALA induced protoporphyrin IX to guide neurosurgeons*”, Cancéropole CLARA, Lyon, France, 2017, **poster-Premier prix**

L.Alston, J. Guyotat, L. Mahieu-Williame, M. Hebert, P.Kantapareddy, D. Meyronet, D. Rousseau, B.Montcel
“*Imagerie interventionnelle en neurochirurgie par spectroscopie de fluorescence de la protoporphyrine IX*”
Recherche en imagerie et technologies pour la santé, Lyon, France, 2017, **présentation orale**

Bibliographie

- Acerbi, F., Broggi, M., Eoli, M., Anghileri, E., Cuppini, L., Pollo, B., Schiariti, M., Visintini, S., Orsi, C., Franzini, A., et al. (2013). Fluorescein-guided surgery for grade IV gliomas with a dedicated filter on the surgical microscope: preliminary results in 12 cases. *Acta Neurochir. (Wien)* 155, 1277–1286.
- Acerbi, F., Broggi, M., Eoli, M., Anghileri, E., Cavallo, C., Boffano, C., Cordella, R., Cuppini, L., Pollo, B., Schiariti, M., et al. (2014). Is fluorescein-guided technique able to help in resection of high-grade gliomas? *Neurosurg. Focus* 36, E5.
- American Brain Tumor Association Glioblastoma (GBM) | American Brain Tumor Association.
- Anastasopoulou, M., Koch, M., Gorpas, D., Karlas, A., Klemm, U., Garcia-Allende, P.B., and Ntziachristos, V. (2016). Comprehensive phantom for interventional fluorescence molecular imaging. *J. Biomed. Opt.* 21, 091309.
- Ando, T., Kobayashi, E., Liao, H., Maruyama, T., Muragaki, Y., Iseki, H., Kubo, O., and Sakuma, I. (2011). Precise comparison of protoporphyrin IX fluorescence spectra with pathological results for brain tumor tissue identification. *Brain Tumor Pathol.* 28, 43–51.
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541.
- Bagdonas, S., Ma, L.-W., Iani, V., Rotomskis, R., Juzenas, P., and Moan, J. (2000). Phototransformations of 5-Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin IX in vitro: A Spectroscopic Study. *Photochem. Photobiol.* 72, 186–192.
- Bahreini, M. (2015). Role of Optical Spectroscopic Methods in Neuro-Oncological Sciences. *J. Lasers Med. Sci.* 6, 51–61.
- Barron, G.A., Valentine, R., Moseley, H., Brancalion, L., Hill, C., and Woods, J.A. (2013). Porphyrin profile in four human cell lines after supplementation with 5-aminolaevulinic acid and its methyl ester. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 10, 654–663.
- Beck, T.J., Kreth, F.W., Beyer, W., Mehrkens, J.H., Obermeier, A., Stepp, H., Stummer, W., and Baumgartner, R. (2007). Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg. Med.* 39, 386–393.
- Behbahaninia, M., Martirosyan, N.L., Georges, J., Udovich, J.A., Kalani, M.Y.S., Feuerstein, B.G., Nakaji, P., Spetzler, R.F., and Preul, M.C. (2013). Intraoperative fluorescent imaging of intracranial tumors: A review. *Clin Neurol Neurosurg* 115, 517–528.
- Belloch, J.P., Rovira, V., Llácer, J.L., Riesgo, P.A., and Cremades, A. (2014). Fluorescence-guided surgery in high grade gliomas using an exoscope system. *Acta Neurochir. (Wien)* 156, 653–660.
- Belykh, E., Martirosyan, N.L., Yagmurlu, K., Miller, E.J., Eschbacher, J.M., Izadyazdanabadi, M., Bardanova, L.A., Byvaltsev, V.A., Nakaji, P., and Preul, M.C. (2016). Intraoperative Fluorescence Imaging for Personalized Brain Tumor Resection: Current State and Future Directions. *Front. Surg.* 3.
- Bongetta, D., Zoia, C., Pugliese, R., Adinolfi, D., Silvani, V., and Gaetani, P. (2016). Low-Cost Fluorescein Detection System for High-Grade Glioma Surgery. *World Neurosurg.* 88, 54–58.
- Brancalion, L., Magennis, S.W., Samuel, I.D.W., Namdas, E., Lesar, A., and Moseley, H. (2004). Characterization of the photoproducts of protoporphyrin IX bound to human serum albumin and immunoglobulin G. *Biophys. Chem.* 109, 351–360.
- Bravo, J.J., Olson, J.D., Davis, S.C., Roberts, D.W., Paulsen, K.D., and Kanick, S.C. (2017). Hyperspectral data processing improves PpIX contrast during fluorescence guided surgery of human brain tumors. *Sci. Rep.* 7.

- Butte, P.V., Mamelak, A.N., Nuno, M., Bannykh, S.I., Black, K.L., and Marcu, L. (2011). Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors. *NeuroImage* 54, S125–S135.
- Buxton, R.B. (2013). The physics of functional magnetic resonance imaging (fMRI). *Rep. Prog. Phys.* 76, 096601.
- Cannestra, A.F., Bookheimer, S.Y., Pouratian, N., O’Farrell, A., Sicotte, N., Martin, N.A., Becker, D., Rubino, G., and Toga, A.W. (2000). Temporal and Topographical Characterization of Language Cortices Using Intraoperative Optical Intrinsic Signals. *NeuroImage* 12, 41–54.
- CCLIN Sud-Est (2010). STERILISATION AU PEROXYDE D’HYDROGENE ET PHASE PLASMA.
- CEE (1993). Directive 93/42/CEE du Conseil, du 14 juin 1993, relative aux dispositifs médicaux.
- Chaichana, K.L., Garzon-Muvdi, T., Parker, S., Weingart, J.D., Olivi, A., Bennett, R., Brem, H., and Quiñones-Hinojosa, A. (2011). Supratentorial Glioblastoma Multiforme: The Role of Surgical Resection Versus Biopsy Among Older Patients. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 239–245.
- Coburger, J., Engelke, J., Scheuerle, A., Thal, D.R., Hlavac, M., Wirtz, C.R., and König, R. (2014). Tumor detection with 5-aminolevulinic acid fluorescence and Gd-DTPA-enhanced intraoperative MRI at the border of contrast-enhancing lesions: a prospective study based on histopathological assessment. *Neurosurg. Focus* 36, E3.
- Coburger, J., Hagel, V., Wirtz, C.R., and König, R. (2015). Surgery for Glioblastoma: Impact of the Combined Use of 5-Aminolevulinic Acid and Intraoperative MRI on Extent of Resection and Survival. *PloS One* 10, e0131872.
- Collaud, S., Juzeniene, A., Moan, J., and Lange, N. (2004). On the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 4, 301–316.
- Corwin, A., Chivvis, A., Poor, R., Whitten, D., and Baker, E. (1968). The interpretation of porphyrin and metalloporphyrin spectra.pdf. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6577–6583.
- Croce, A., Fiorani, S., Locatelli, D., Nano, R., Ceroni, M., Tancioni, F., Giombelli, E., Benericetti, E., and Bottiroli, G. (2003). Diagnostic Potential of Autofluorescence for an Assisted Intraoperative Delineation of Glioblastoma Resection Margins. *Photochem. Photobiol.* 77, 309–318.
- Dailey, H.A., and Smith, A. (1984). Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem. J.* 223, 441–445.
- Desroches, J., Jermyn, M., Mok, K., Lemieux-Leduc, C., Mercier, J., St-Arnaud, K., Urmev, K., Guiot, M.-C., Marple, E., Petrecca, K., et al. (2015). Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification. *Biomed. Opt. Express* 6, 2380.
- Diaz, R.J., Dios, R.R., Hattab, E.M., Burrell, K., Rakopoulos, P., Sabha, N., Hawkins, C., Zadeh, G., Rutka, J.T., and Cohen-Gadol, A.A. (2015). Study of the biodistribution of fluorescein in glioma-infiltrated mouse brain and histopathological correlation of intraoperative findings in high-grade gliomas resected under fluorescein fluorescence guidance. *J. Neurosurg.* 122, 1360–1369.
- Dietel, W., Fritsch, C., Pottier, R.H., and Wendenburg, R. (1997). 5-Aminolaevulinic-acid-induced formation of different porphyrins and their photomodifications. *Lasers Med. Sci.* 12, 226–236.
- Dietel, W., Pottier, R., Pfister, W., Schleier, P., and Zinner, K. (2007). 5-Aminolaevulinic acid (ALA) induced formation of different fluorescent porphyrins: A study of the biosynthesis of porphyrins by bacteria of the human digestive tract. *J. Photochem. Photobiol. B* 86, 77–86.
- Duffau, H. (2017). The error of Broca: From the traditional localizationist concept to a connectomal anatomy of human brain. *J. Chem. Neuroanat.*
- Ewelt, C., Nemes, A., Senner, V., Wölfer, J., Brokinkel, B., Stummer, W., and Holling, M. (2015). Fluorescence in neurosurgery: Its diagnostic and therapeutic use. Review of the literature. *J. Photochem. Photobiol. B* 148, 302–309.

- Ferrolì, P., Acerbi, F., Albanese, E., Tringali, G., Broggi, M., Franzini, A., and Broggi, G. (2011). Application of intraoperative indocyanine green angiography for CNS tumors: results on the first 100 cases. *Acta Neurochir. Suppl.* *109*, 251–257.
- Fouke, S.J., Benzinger, T., Gibson, D., Ryken, T.C., Kalkanis, S.N., and Olson, J.J. (2015). The role of imaging in the management of adults with diffuse low grade glioma: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J. Neurooncol.* *125*, 457–479.
- Fuchs, C., Riesenberger, R., Siegert, J., and Baumgartner, R. (1997). pH-Dependent formation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX in fibrosarcoma cells. *J. Photochem. Photobiol. B* *40*, 49–54.
- Gardner, C.M., Jacques, S.L., and Welch, A.J. (1996). Fluorescence spectroscopy of tissue: recovery of intrinsic fluorescence from measured fluorescence. *Appl. Opt.* *35*, 1780–1792.
- Gasser, T., Sandalcioglu, E., Schoch, B., Gizewski, E., Forsting, M., Stolke, D., and Wiedemayer, H. (2005a). Functional Magnetic Resonance Imaging in Anesthetized Patients: A Relevant Step toward Real-time Intraoperative Functional Neuroimaging: *Oper. Neurosurg.* *57*, 94–99.
- Gasser, T., Ganslandt, O., Sandalcioglu, E., Stolke, D., Fahlbusch, R., and Nimsky, C. (2005b). Intraoperative functional MRI: Implementation and preliminary experience. *NeuroImage* *26*, 685–693.
- Gering, D.T., and Weber, D.M. (1998). Intraoperative, real-time, functional MRI. *J. Magn. Reson. Imaging* *8*, 254–257.
- GFME (2001). Association GBM.
- Gilbert, M.R., and Lang, F.F. (2007). Management of Patients with Low-Grade Gliomas. *Neurol. Clin.* *25*, 1073–1088.
- Hadjipanayis, C.G., Widhalm, G., and Stummer, W. (2015). What is the Surgical Benefit of Utilizing 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Surgery of Malignant Gliomas?: *Neurosurgery* *77*, 663–673.
- Haidar, D.A., Leh, B., Zanello, M., and Siebert, R. (2015). Spectral and lifetime domain measurements of rat brain tumors. *Biomed. Opt. Express* *6*, 1219–1233.
- Haj-Hosseini, N., Richter, J., Andersson-Engels, S., and Wårdell, K. (2010). Optical touch pointer for fluorescence guided glioblastoma resection using 5-aminolevulinic acid. *Lasers Surg. Med.* *42*, 9–14.
- Hamamcıođlu, M.K., Akçakaya, M.O., Göker, B., Kasımcıan, M.Ö., and Kırış, T. (2016). The use of the YELLOW 560nm surgical microscope filter for sodium fluorescein-guided resection of brain tumors: Our preliminary results in a series of 28 patients. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *143*, 39–45.
- Harris, C., and Stephens, M. (1988). A combined corner and edge detector. In *Alvey Vision Conference*, (Manchester, UK), pp. 10–5244.
- HAS (2010). Autorisation de Mise sur le Marché Gliolan.
- Hefti, M. (2013). Fluorescence-guided surgery for brain tumors. *CNS Oncol.* *2*, 67–74.
- Hope, C.K., and Higham, S.M. (2016). Evaluating the effect of local pH on fluorescence emissions from oral bacteria of the genus *Prevotella*. *J Biomed Opt* *21*, 084003–084003.
- Jakovels, D., and Spigulis, J. (2012). RGB imaging device for mapping and monitoring of hemoglobin distribution in skin. *Lith. J. Phys.* *52*.
- Jermyn, M., Mok, K., Mercier, J., Desroches, J., Pichette, J., Saint-Arnaud, K., Bernstein, L., Guiot, M.-C., Petrecca, K., and Leblond, F. (2015). Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. *Sci. Transl. Med.* *7*, 274ra19–274ra19.

- Jermyn, M., Desroches, J., Aubertin, K., St-Arnaud, K., Madore, W.-J., De Montigny, E., Guiot, M.-C., Trudel, D., Wilson, B.C., Petrecca, K., et al. (2016). A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology. *Phys. Med. Biol.* *61*, R370–R400.
- Johansson, A., Palte, G., Schnell, O., Tonn, J.-C., Herms, J., and Stepp, H. (2010). 5-Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin IX Levels in Tissue of Human Malignant Brain Tumors: Photochemistry and Photobiology. *Photochem. Photobiol.* *86*, 1373–1378.
- Khalfaoui-Bendriiss, G. (2010). THESE_2010_KHALFAOUI-BENDRISS_GHIZLANE.pdf. mediterranee-aix-marseille.
- Kim, S.-G., and Ogawa, S. (2012). Biophysical and physiological origins of blood oxygenation level-dependent fMRI signals. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *32*, 1188–1206.
- Kim, A., Roy, M., Dadani, F., and Wilson, B.C. (2010a). A fiberoptic reflectance probe with multiple source-collector separations to increase the dynamic range of derived tissue optical absorption and scattering coefficients. *Opt. Express* *18*, 5580–5594.
- Kim, A., Moriyama, Y., Wilson, B.C., and Khurana, M. (2010b). Quantification of in vivo fluorescence decoupled from the effects of tissue optical properties using fiber-optic spectroscopy measurements. *J. Biomed. Opt.* *15*, 067006–067006.
- Koc, K., Anik, I., Cabuk, B., and Ceylan, S. (2008). Fluorescein sodium-guided surgery in glioblastoma multiforme: a prospective evaluation. *Br. J. Neurosurg.* *22*, 99–103.
- Kohl-Bareis, M., Ebert, B., Dreier, J.P., Leithner, C., Lindauer, U., and Royl, G. (2010). Apparatus for Measuring Blood Parameters (Google Patents).
- Krammer, B., and Plaetzer, K. (2008). ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem. Photobiol. Sci.* *7*, 283–289.
- Kreth, F.W., Berlis, A., Spiropoulou, V., Faist, M., Scheremet, R., Rossner, R., Volk, B., and Ostertag, C.B. (1999). The role of tumor resection in the treatment of glioblastoma multiforme in adults. *Cancer* *86*, 2117–2123.
- Krivosheya, D., Prabhu, S.S., Weinberg, J.S., and Sawaya, R. (2016). Technical principles in glioma surgery and preoperative considerations. *J. Neurooncol.* *130*, 243–252.
- Kubben, P.L., ter Meulen, K.J., Schijns, O.E., ter Laak-Poort, M.P., van Overbeeke, J.J., and van Santbrink, H. (2011). Intraoperative MRI-guided resection of glioblastoma multiforme: a systematic review. *Lancet Oncol.* *12*, 1062–1070.
- Kuroiwa, T., Kajimoto, Y., and Ohta, T. (1998). Development of a Fluorescein Operative Microscope for use During Malignant Glioma Surgery: A Technical Note and Preliminary Report. *Surg. Neurol.* *50*, 41–49.
- Lacroix, M., and Toms, S.A. (2014). Maximum Safe Resection of Glioblastoma Multiforme. *J. Clin. Oncol.* *32*, 727–728.
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fournay, D.R., Gokaslan, Z.L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F.F., McCutcheon, I.E., Hassenbusch, S.J., Holland, E., et al. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J. Neurosurg.* *95*, 190–198.
- Lang, A., Stepp, H., Homann, C., Hennig, G., Brittenham, G.M., and Vogeser, M. (2015). Rapid screening test for porphyria diagnosis using fluorescence spectroscopy. (International Society for Optics and Photonics), p. 953706.
- Lange, F. (2016). Développement d'un système de Topographie Optique Diffuse résolu en temps et hyperspectral pour la détection de l'activité cérébrale humaine. INSA de Lyon.
- Lawrence, J.E., Patel, A., Rovin, R.A., Belton Jr, R.J., Bammert, C.E., Steele, C.J., Winn, R.J., and Winn, R. Quantification of protoporphyrin IX accumulation in glioblastoma cells–.

- Le Bihan, D. (2003). Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 469–480.
- Leh, B. (2011). Caractérisation par autofluorescence de tissus cérébraux tumoraux: mesures sur fantômes et modèle animal. Université Paris Sud-Paris XI.
- Leroy, H.-A., Vermandel, M., Lejeune, J.-P., Mordon, S., and Reyns, N. (2015). Fluorescence guided resection and glioblastoma in 2015: A review: FLUORESCENCE GUIDED RESECTION AND GLIOBLASTOMA. *Lasers Surg. Med.* *47*, 441–451.
- Li, Y., Rey-Dios, R., Roberts, D.W., Valdés, P.A., and Cohen-Gadol, A.A. (2014). Intraoperative Fluorescence-Guided Resection of High-Grade Gliomas: A Comparison of the Present Techniques and Evolution of Future Strategies. *World Neurosurg.* *82*, 175–185.
- Li, Y.M., Suki, D., Hess, K., and Sawaya, R. (2016). The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-total resection? *J. Neurosurg.* *124*, 977–988.
- Lin, W.-C., Toms, S., Johnson, M.D., Jansen, E.D., and Mahadevan-Jansen, A. (2001). In Vivo Brain Tumor Demarcation Using Optical Spectroscopy. *J. Neurosurg.* *95*, 101–107.
- Liu, J.T.C., Meza, D., and Sanai, N. (2014). Trends in Fluorescence Image-Guided Surgery for Gliomas: *Neurosurgery* *75*, 61–71.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *114*, 97–109.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *131*, 803–820.
- Lozovaya, G.I., Masinovsky, Z., and Sivash, A.A. (1990). Protoporphyrin IX as a possible ancient photosensitizer: spectral and photochemical studies. *Orig. Life Evol. Biosph.* *20*, 321–330.
- Lu, S., Chen, J.-Y., Zhang, Y., Ma, J., Wang, P.-N., and Peng, Q. (2008). Fluorescence detection of protoporphyrin IX in living cells: a comparative study on single- and two-photon excitation. *J. Biomed. Opt.* *13*, 024014.
- Lucas, B., and Kanade, T. (1981). An iterative Image Registration Technique with an Application to stereo Vision. In *IJCAI*, pp. 674–679.
- Mahboob, S., McPhillips, R., Qiu, Z., Jiang, Y., Meggs, C., Schiavone, G., Button, T., Desmulliez, M., Demore, C., Cochran, S., et al. (2016). Intraoperative Ultrasound-Guided Resection of Gliomas: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *World Neurosurg.* *92*, 255–263.
- Mandonnet, E., Winkler, P.A., and Duffau, H. (2010). Direct electrical stimulation as an input gate into brain functional networks: principles, advantages and limitations. *Acta Neurochir. (Wien)* *152*, 185–193.
- Manivasager, V., Heng, P.W.S., Hao, J., Zheng, W., Soo, K.C., and Olivo, M. (2003). A study of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester used in in vitro and in vivo systems of human bladder cancer. *Int. J. Oncol.* *22*, 313–318.
- Manivasager, V., Yee, K.K.L., Heng, P.W.S., Soo, K.C., and Olivo, M. (2006). A study comparing endogenous protoporphyrin IX induced by 5-ALA and ALA-methyl ester with exogenous PpIX and PpIX dimethyl ester in photodynamic diagnosis of human nasopharyngeal carcinoma xenografts. *Int. J. Oncol.* *29*, 997–1002.
- Markwardt, N.A., Haj-Hosseini, N., Hollnburger, B., Stepp, H., Zelenkov, P., and Rühm, A. (2016). 405 nm versus 633 nm for protoporphyrin IX excitation in fluorescence-guided stereotactic biopsy of brain tumors. *J. Biophotonics* *9*, 901–912.

- Marois, M., Bravo, J., Davis, S.C., and Kanick, S.C. (2016). Characterization and standardization of tissue-simulating protoporphyrin IX optical phantoms. *J Biomed Opt* 21, 035003.
- Marreiros, F.M., Rossitti, S., Karlsson, P.M., Wang, C., Gustafsson, T., Carleberg, P., and Smedby, Ö. (2016). Superficial vessel reconstruction with a multiview camera system. *J. Med. Imaging* 3, 015001–015001.
- Marumoto, T., and Saya, H. (2012). Molecular biology of glioma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 746, 2–11.
- Melø, T.B., and Reisaeter, G. (1986). The physicochemical state of protoporphyrin IX in aqueous solution investigated by fluorescence and light scattering. *Biophys. Chem.* 25, 99–104.
- Meyronet, D. (2009). Thèse David Meyronet Finale 20091029 optim pdfx.pdf.
- Mischel, P., and Cloughesy, T. (2003). Moleculaire.pdf. *Brain Pathol.* 13, 52–61.
- Moan, J., Berg, K., Gadmar, Ø.B., Iani, V., Ma, L., and Juzenas, P. (1999). The temperature dependence of protoporphyrin IX production in cells and tissues. *Photochem. Photobiol.* 70, 669–673.
- Montcel, B. (2005). Tomographie optique diffuse résolue en temps: Applications fonctionnelles en neurosciences. Université Louis Pasteur-Strasbourg I.
- Montcel, B., Mahieu-William, L., Armoiry, X., Meyronet, D., and Guyotat, J. (2013). Two-peaked 5-ALA-induced PpIX fluorescence emission spectrum distinguishes glioblastomas from low grade gliomas and infiltrative component of glioblastomas. *Biomed. Opt. Express* 4, 548–558.
- Moore, G.E., Peyton, W.T., French, L.A., and Walker, W.W. (1948). The clinical use of fluorescein in neurosurgery: the localization of brain tumors. *J. Neurosurg.* 5, 392–398.
- Morone, K.A., Neimat, J.S., Roe, A.W., and Friedman, R.M. (2017). Review of functional and clinical relevance of intrinsic signal optical imaging in human brain mapping. *Neurophotonics* 4, 031220.
- Motekallemi, A., Jeltema, H.-R., Metzemaekers, J.D.M., Dam, G.M. van, Crane, L.M.A., and Groen, R.J.M. (2015). The current status of 5-ALA fluorescence-guided resection of intracranial meningiomas—a critical review. *Neurosurg. Rev.* 38, 619–628.
- Murray, K. (1982). Improved Surgical Resection of Human Brain Tumors _ Part 1. A preliminary Study.pdf. (Honolulu), p.
- Mursch, K., Scholz, M., Brück, W., and Behnke-Mursch, J. (2016). The value of intraoperative ultrasonography during the resection of relapsed irradiated malignant gliomas in the brain. *Ultrason. Ultrason.* 36, 60–65.
- Nabavi, A., Black, P.M., Gering, D.T., Westin, C.-F., Mehta, V., Pergolizzi Jr, R.S., Ferrant, M., Warfield, S.K., Hata, N., Schwartz, R.B., et al. (2001). Serial intraoperative magnetic resonance imaging of brain shift. *Neurosurgery* 48, 787–798.
- Nabavi, A., Thurm, H., Zountsas, B., Pietsch, T., Lanfermann, H., Pichlmeier, U., and Mehdorn, M. (2009). FIVE-AMINOLEVULINIC ACID FOR FLUORESCENCE-GUIDED RESECTION OF RECURRENT MALIGNANT GLIOMAS: A PHASE II STUDY. *Neurosurgery* 65, 1070–1077.
- Neuman, R.E., and Logan, M.A. (1950). The determination of collagen and elastin in tissues. *J. Biol. Chem.* 186, 549–556.
- Nishidate, I., Sasaoka, K., Yuasa, T., Niizeki, K., Maeda, T., and Aizu, Y. (2008). Visualizing of skin chromophore concentrations by use of RGB images. *Opt. Lett.* 33, 2263–2265.
- Nitta, T., and Sato, K. (1995). Prognostic implications of the extent of surgical resection in patients with intracranial malignant gliomas. *Cancer* 75, 2727–2731.
- Novotny, A., and Stummer, W. (2003). 5-Aminolevulinic acid and the blood-brain barrier—a review. *Med. Laser Appl.* 18, 36–40.

- Oelschlägel, M., Meyer, T., Wahl, H., Sobottka, S.B., Kirsch, M., Schackert, G., and Morgenstern, U. (2013). Evaluation of intraoperative optical imaging analysis methods by phantom and patient measurements. *Biomed. Tech. Eng.* 58, 257–267.
- Oelschlägel, M., Meyer, T., Sobottka, S.B., Kirsch, M., Schackert, G., and Morgenstern, U. (2015). Intraoperative identification of somato-sensory brain areas using optical imaging and standard RGB camera equipment – a feasibility study. *Curr. Dir. Biomed. Eng.* 1.
- Ogg, R.J., Laningham, F.H., Clarke, D., Einhaus, S., Zou, P., Tobias, M.E., and Boop, F.A. (2009). Passive range of motion functional magnetic resonance imaging localizing sensorimotor cortex in sedated children. *J. Neurosurg. Pediatr.* 4, 317–322.
- Oppenheim, C., Rodrigo, S., Poupon, C., de la Roque, A.D., Naggara, O., Meder, J.F., and Frédy, D. (2004). Imagerie en tenseur de diffusion et système nerveux central: Pour quelles applications cliniques? *J. Radiol.* 85, 287–296.
- Pallud, J. (2012). Les gliomes : diagnostic, classification, pronostic et traitement | *Neurol. Prat.*
- Pascu, A., Romanitan, M.O., Delgado, J.-M., Danaila, L., and Pascu, M. (2009). Laser-Induced Autofluorescence Measurements on Brain Tissues. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* 292, 2013–2022.
- Paul, P., Morandi, X., and Jannin, P. (2009). A surface registration method for quantification of intraoperative brain deformations in image-guided neurosurgery. *IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed.* 13, 976–983.
- Perrenoud-Rinuy, J., Brevet, P.-F., and Girault, H.H. (2002). Second harmonic generation study of myoglobin and hemoglobin and their protoporphyrin IX chromophore at the water/1,2-dichloroethane interface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4, 4774–4781.
- Petrecca, K., Guiot, M.-C., Panet-Raymond, V., and Souhami, L. (2013). Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma. *J. Neurooncol.* 111, 19–23.
- Pichette, J., Laurence, A., Angulo, L., Lesage, F., Bouthillier, A., Nguyen, D.K., and Leblond, F. (2016). Intraoperative video-rate hemodynamic response assessment in human cortex using snapshot hyperspectral optical imaging. *Neurophotonics* 3, 045003–045003.
- Piquer, J., Llácer, J.L., Rovira, V., Riesgo, P., Rodriguez, R., and Cremades, A. (2014). Fluorescence-Guided Surgery and Biopsy in Gliomas with an Exoscope System. *BioMed Res. Int.* 2014, 1–6.
- Pogue, B.W., and Patterson, M.S. (2006). Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *J. Biomed. Opt.* 11, 041102-041102-16.
- POTAPOV, A., GORYAYNOV, S., LOSCHENOV, V., SAVELEVA, T., Gavrilov, A.G., OHLOPKOV, V., ZHUKOV, V., Zelenkov, P.V., GOLBIN, D., SHURHAY, V., et al. (2013). Intraoperative combined spectroscopy (optical biopsy) of cerebral gliomas. *Methods* 8, 21.
- Pouratian, N., and Schiff, D. (2010). Management of Low-Grade Glioma. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 10, 224–231.
- Prabhu, V.C., Khaldi, A., Barton, K.P., Melian, E., Schneck, M.J., Primeau, M.J., and Lee, J.M. (2010). Management of Diffuse Low-Grade Cerebral Gliomas. *Neurol. Clin.* 28, 1037–1059.
- Quigley, M.R., and Maroon, J.C. (1991). The relationship between survival and the extent of the resection in patients with supratentorial malignant gliomas. *Neurosurgery* 29, 385-388; discussion 388-389.
- Rc, K., D, U., T, M., E, E., F, H., H, M., and R, K. (2002). Improving the use of 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced protoporphyrin IX (PPIX) for the gastrointestinal tract by esterification--an in vitro study. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 48, 917–923.
- Richards-Kortum, R., and Sevick-Muraca, E. (1996). Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 47, 555–606.

- Richter, M.L., and Rienits, K.G. (1980). The synthesis of magnesium and zinc protoporphyrin IX and their monomethyl esters in etioplast preparations studied by high pressure liquid chromatography. *FEBS Lett.* *116*, 211–216.
- Richter, J.C.O., Haj-Hosseini, N., Andersson-Engel, S., and Wårdell, K. (2011). Fluorescence spectroscopy measurements in ultrasonic navigated resection of malignant brain tumors. *Lasers Surg. Med.* *43*, 8–14.
- Russell, J.A., Diamond, K.R., Collins, T.J., Tiedje, H.F., Hayward, J.E., Farrell, T.J., Patterson, M.S., and Fang, Q. (2008). Characterization of Fluorescence Lifetime of Photofrin and Delta-Aminolevulinic Acid Induced Protoporphyrin IX in Living Cells Using Single- and Two-Photon Excitation. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* *14*, 158–166.
- Saban, R. (2002). Conception de la physiologie cérébrale de François-Joseph Gall à Paul Broca: Les localisations des fonctions cérébrales. *Biométrie Hum. Anthropol.* *20*, 195–203.
- Sanai, N., Chang, S., and Berger, M.S. (2011a). Low-grade gliomas in adults: a review. *J. Neurosurg.* *115*, 948–965.
- Sanai, N., Polley, M.-Y., McDermott, M.W., Parsa, A.T., and Berger, M.S. (2011b). An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J. Neurosurg.* *115*, 3–8.
- Sartorius, C.J., and Berger, M.S. (1998). Rapid termination of intraoperative stimulation-evoked seizures with application of cold Ringer's lactate to the cortex. *J. Neurosurg.* *88*, 349–351.
- Schebesch, K.-M., Proescholdt, M., Höhne, J., Hohenberger, C., Hansen, E., Riemenschneider, M.J., Ullrich, W., Doenitz, C., Schlaier, J., Lange, M., et al. (2013). Sodium fluorescein-guided resection under the YELLOW 560 nm surgical microscope filter in malignant brain tumor surgery—a feasibility study. *Acta Neurochir. (Wien)* *155*, 693–699.
- Scholkmann, F., Kleiser, S., Metz, A.J., Zimmermann, R., Mata Pavia, J., Wolf, U., and Wolf, M. (2014). A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology. *NeuroImage* *85*, 6–27.
- Sdika, M., Alston, L., Mahieu-Williams, L., Guyotat, J., Rousseau, D., and Montcel, B. (2016). Robust real time motion compensation for intraoperative video processing during neurosurgery. In *Biomedical Imaging (ISBI), 2016 IEEE 13th International Symposium on*, (IEEE), pp. 1046–1049.
- Senders, J.T., Muskens, I.S., Schnoor, R., Karhade, A.V., Cote, D.J., Smith, T.R., and Broekman, M.L.D. (2017). Agents for fluorescence-guided glioma surgery: a systematic review of preclinical and clinical results. *Acta Neurochir. (Wien)* *159*, 151–167.
- Senft, C., Bink, A., Franz, K., Vatter, H., Gasser, T., and Seifert, V. (2011). Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol.* *12*, 997–1003.
- Seo, I., Tseng, S.H., Cula, G.O., Bargo, P.R., and Kollias, N. (2009). Fluorescence spectroscopy for endogenous porphyrins in human facial skin. pp. 716103-716103–716106.
- Sobottka, S.B., Meyer, T., Kirsch, M., Koch, E., Steinmeier, R., Morgenstern, U., and Schackert, G. (2013). Intraoperative optical imaging of intrinsic signals: a reliable method for visualizing stimulated functional brain areas during surgery: clinical article. *J. Neurosurg.* *119*, 853–863.
- Sotiras, A., Davatzikos, C., and Paragios, N. (2013). Deformable Medical Image Registration: A Survey. *IEEE Trans. Med. Imaging* *32*, 1153–1190.
- Stefanovic, B., Hutchinson, E., Yakovleva, V., Schram, V., Russell, J.T., Belluscio, L., Koretsky, A.P., and Silva, A.C. (2008). Functional reactivity of cerebral capillaries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *28*, 961–972.
- Steimers, A., Gramer, M., Ebert, B., Füchtmeier, M., Royl, G., Leithner, C., Dreier, J.P., Lindauer, U., and Kohl-Bareis, M. (2009). Imaging of cortical haemoglobin concentration with RGB reflectometry. In *European Conference on Biomedical Optics*, (Optical Society of America), p. 7368_13.

- Steimers, A., Gramer, M., Takagaki, M., Graf, R., and Kohl-Bareis, M. (2011). Simultaneous imaging of haemoglobin oxygenation and blood flow with RGB reflectometry and LASCA during stroke in rats. A.H. Hielscher, and P. Taroni, eds. pp. 808808-808808–808811.
- Stummer, W., Stepp, H., Möller, G., Ehrhardt, A., Leonhard, M., and Reulen, H.J. (1998). Technical Principles for Protoporphyrin-IX-Fluorescence Guided Microsurgical Resection of Malignant Glioma Tissue. *Acta Neurochir. (Wien)* *140*, 995–1000.
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., and Reulen, H.-J. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* *7*, 392–401.
- Stummer, W., van den Bent, M.J., and Westphal, M. (2011). Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta Neurochir. (Wien)* *153*, 1211–1218.
- Stummer, W., Tonn, J.-C., Goetz, C., Ullrich, W., Stepp, H., Bink, A., Pietsch, T., and Pichlmeier, U. (2014). 5-Aminolevulinic Acid-derived Tumor Fluorescence: The Diagnostic Accuracy of Visible Fluorescence Qualities as Corroborated by Spectrometry and Histology and Postoperative Imaging. *Neurosurgery* *74*, 310–320.
- Stupp, R., Mason, W.P., Van Den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 987–996.
- Su, X., Huang, Q.-F., Chen, H.-L., and Chen, J. (2014). Fluorescence-guided resection of high-grade gliomas: A systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* *11*, 451–458.
- Tian, F., Johson, K., Lesar, A., Moseley, H., Ferguson, J., Samuel, I., Mazzini, A., and Brancaleon, L. (2006). The pH-dependent conformational transition of β -lactoglobulin modulates the binding of protoporphyrin IX.pdf. *Biochim. Biophys. Acta* *1760* 38–46.
- Toga, A.W., and Mazziotta, J.C. (2002). *Brain Mapping: The Methods* (Academic Press).
- Toms, S.A., Lin, W.-C., Weil, R.J., Johnson, M.D., Jansen, E.D., and Mahadevan-Jansen, A. (2005). Intraoperative Optical Spectroscopy Identifies Infiltrating Glioma Margins with High Sensitivity: *Oper. Neurosurg.* *57*, 382–391.
- Toms, S.A., Konrad, P.E., Lin, W.-C., and Weil, R.J. (2006). Neuro-oncological applications of optical spectroscopy. *Technol. Cancer Res. Treat.* *5*, 231–238.
- Unsgaard, G., Ommedal, S., Muller, T., Gronningsaeter, A., Hernes, N., and A, T. (2002). Neuronavigation by Intraoperative Three-dimensional Ultrasound: Initial Experience during Brain Tumor Resection. *Neurosurgery* *50*, 804–812.
- Utsuki, S., Oka, H., Sato, S., Suzuki, S., Shimizu, S., Tanaka, S., and Fujii, K. (2006). Possibility of using laser spectroscopy for the intraoperative detection of nonfluorescing brain tumors and the boundaries of brain tumor infiltrates: Technical note. *J. Neurosurg.* *104*, 618–620.
- Utsuki, S., Miyoshi, N., Oka, H., Miyajima, Y., Shimizu, S., Suzuki, S., and Fujii, K. (2007). Fluorescence-guided resection of metastatic brain tumors using a 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX: pathological study. *Brain Tumor Pathol.* *24*, 53–55.
- Utsuki, S., Oka, H., Miyajima, Y., Shimizu, S., Suzuki, S., and Fujii, K. (2008). Auditory alert system for fluorescence-guided resection of gliomas. *Neurol Med Chir Tokyo* 95–98.
- Valdés, P.A., Kim, A., Leblond, F., Conde, O.M., Harris, B.T., Paulsen, K.D., Wilson, B.C., and Roberts, D.W. (2011a). Combined fluorescence and reflectance spectroscopy for in vivo quantification of cancer biomarkers in low-and high-grade glioma surgery. *J. Biomed. Opt.* *16*, 116007–11600714.

- Valdés, P.A., Leblond, F., Kim, A., Harris, B.T., Wilson, B.C., Fan, X., Tosteson, T.D., Hartov, A., Ji, S., Erkmen, K., et al. (2011b). Quantitative fluorescence in intracranial tumor: implications for ALA-induced PpIX as an intraoperative biomarker: Clinical article. *J. Neurosurg.* *115*, 11–17.
- Valdés, P.A., Kim, A., Brantsch, M., Niu, C., Moses, Z.B., Tosteson, T.D., Wilson, B.C., Paulsen, K.D., Roberts, D.W., and Harris, B.T. (2011c). delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX concentration correlates with histopathologic markers of malignancy in human gliomas: the need for quantitative fluorescence-guided resection to identify regions of increasing malignancy. *Neuro-Oncol.* *13*, 846–856.
- Valdés, P.A., Leblond, F., Kim, A., Wilson, B.C., Paulsen, K.D., and Roberts, D.W. (2012a). A spectrally constrained dual-band normalization technique for protoporphyrin IX quantification in fluorescence-guided surgery. *Opt. Lett.* *37*, 1817–1819.
- Valdés, P.A., Leblond, F., Jacobs, V.L., Wilson, B.C., Paulsen, K.D., and Roberts, D.W. (2012b). Quantitative, spectrally-resolved intraoperative fluorescence imaging. *Sci. Rep.* *2*.
- Valdés, P.A., Bekelis, K., Harris, B.T., Wilson, B.C., Leblond, F., Kim, A., Simmons, N.E., Erkmen, K., Paulsen, K.D., and Roberts, D.W. (2014a). 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence in Meningioma: Qualitative and Quantitative Measurements In Vivo. *Oper. Neurosurg.* *10*, 74–83.
- Valdés, P.A., Jacobs, V.L., Leblond, F., Wilson, B.C., Paulsen, K.D., and Roberts, D.W. (2014b). Quantitative spectrally resolved intraoperative fluorescence imaging for neurosurgical guidance in brain tumor surgery: pre-clinical and clinical results. pp. 892809-892809–9.
- Valdés, P.A., Jacobs, V., Harris, B.T., Wilson, B.C., Leblond, F., Paulsen, K.D., and Roberts, D.W. (2015). Quantitative fluorescence using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX biomarker as a surgical adjunct in low-grade glioma surgery. *J. Neurosurg.* *123*, 771–780.
- Valdés, P.A., Roberts, D.W., Lu, F.-K., PhD, and Golby, A. (2016). Optical technologies for intraoperative neurosurgical guidance. *Neurosurg. Focus* *40*, E8.
- Vasefi, F., MacKinnon, N., Farkas, D.L., and Kateb, B. (2016). Review of the potential of optical technologies for cancer diagnosis in neurosurgery: a step toward intraoperative neurophotonics. *Neurophotonics* *4*, 011010.
- van Velthoven, V., and Auer, L.M. (1990). Practical application of intraoperative ultrasound imaging. *Acta Neurochir. (Wien)* *105*, 5–13.
- Villringer, A., and Chance, B. (1997). Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function.pdf. *Trends Neurosci.* *20*, 435–442.
- Viviand, X. (1998). Propofol (Diprivan).
- WebMD Brain Cancer and Gliomas.
- WHO (2008). Fact Sheets by Population.
- wikimédia Diagramme_de_Jablonski.png.
- Wisniewski, H.M., Wen, G.Y., Opitz, J.M., Reynolds, J.F., and Pullarkat, R.K. (1988). Lipopigment in the aging brain. *Am. J. Med. Genet. A.* *31*, 183–191.
- Wu, G.N., Ford, J.M., and Alger, J.R. (2006). MRI measurement of the uptake and retention of motexafin gadolinium in glioblastoma multiforme and uninvolved normal human brain. *J. Neurooncol.* *77*, 95–103.
- Yong, W., H. (2006). Distinction of brain tissue, low grade and high grade glioma with time-resolved fluorescence spectroscopy. *Front. Biosci.* *11*, 1255.

- Yuvaraj, M., Udayakumar, K., Jayanth, V., Prakasa Rao, A., Bharanidharan, G., Koteeswaran, D., Munusamy, B.D., Murali krishna, C., and Ganesan, S. (2014). Fluorescence spectroscopic characterization of salivary metabolites of oral cancer patients. *J. Photochem. Photobiol. B* 130, 153–160.
- Zanello, M., Poulon, F., Pallud, J., Varlet, P., Hamzeh, H., Abi Lahoud, G., Andreiuolo, F., Ibrahim, A., Pages, M., Chretien, F., et al. (2017). Multimodal optical analysis discriminates freshly extracted human sample of gliomas, metastases and meningiomas from their appropriate controls. *Sci. Rep.* 7, 41724.