



HAL
open science

Caractérisation par autofluorescence de tissus cérébraux tumoraux : mesures sur fantômes et modèle animal

Barbara Leh

► **To cite this version:**

Barbara Leh. Caractérisation par autofluorescence de tissus cérébraux tumoraux : mesures sur fantômes et modèle animal. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112166 . tel-00647327

HAL Id: tel-00647327

<https://theses.hal.science/tel-00647327>

Submitted on 1 Dec 2011

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

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

UNIVERSITÉ PARIS SUD XI
ÉCOLE DOCTORALE 534 MIPEGE
SCIENCES PHYSIQUES APPLIQUÉES À L'IMAGERIE MÉDICALE

THÈSE

pour obtenir le titre de

Docteur ès Sciences

de l'Université Paris Sud XI

Mention : SCIENCES PHYSIQUES

Présentée et soutenue par

Barbara LEH

Caractérisation par autofluorescence de tissus cérébraux tumoraux :

Mesures sur fantômes et modèle animal

Thèse dirigée par Rainer SIEBERT

préparée à IMNC,

soutenue le 17 octobre 2011

Jury :

<i>Rapporteurs :</i>	Walter BLONDEL	- CRAN
	Geneviève BOURG-HECKLY	- AnBIOPhy
<i>Directeur :</i>	Rainer SIEBERT	- IMNC
<i>Présidente :</i>	Marie-Pierre FONTAINE-AUPART	- ISMO
<i>Examineurs :</i>	Bertrand DEVAUX	- Hôpital Ste Anne
	Raphaël SABLONG	- CREATIS

*Science may set limits to knowledge, but should not set
limits to imagination.*
Bertrand Russell (1872 - 1970)

Remerciements

When I get sad, I stop being sad and be awesome instead. True story.
Barney Stinson

La première chose que je souhaite dire : merci **Rainer**¹. Je suis heureuse d'avoir fait ta connaissance et apprécié le fait de travailler avec toi lors de ces trois dernières années. Je te remercie de m'avoir patiemment écoutée et soutenue lors de mes doutes et de m'avoir guidée dans mes travaux de thèse. Je ne peux pas en quelques lignes résumer tout ce que nous avons partagé en 3 ans, mais j'y pense souvent. Merci.

Je remercie également mes rapporteurs de thèse : **Madame Geneviève BOURG-HECKLY** et **Monsieur le professeur Walter BLONDEL**. Je vous suis reconnaissante de m'avoir donné l'opportunité d'améliorer mon manuscrit et de m'avoir accordé de votre temps. Merci pour vos remarques précises et précieuses.

J'adresse mes remerciements à **Madame Marie-Pierre FONTAINE-AUPART** qui a accepté de présider mon Jury de soutenance de thèse. Je vous remercie pour votre sens de l'orchestration et votre regard expert sur mon travail.

Je tiens également à remercier les autres membres de mon Jury de thèse, **Monsieur le professeur Bertrand DEVAUX** pour avoir apporté un point de vue clinique sur le travail que j'ai mené et **Monsieur Raphaël SABLON** pour avoir soulevé des questions intéressantes et des points à creuser pour la suite des travaux liés à ma thématique de thèse.

Comment ne pas remercier chaleureusement les personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de travailler lors de ces trois années de thèse :

1. **Rainer SIEBERT, mon directeur de thèse**

- **Darine ABI HAIDAR**, pour avoir eu la patience de me transmettre tes connaissances et pour ton soutien sans faille durant les moments difficiles.
- **Mauricette COLLADO-HILLY** qui nous a été d'une grande aide pour la culture des cellules et les manipulations sur les rats. Merci pour le temps que tu nous as consacré.
- **Thierry TORDJMAN** et **François MONNET**, je vous remercie de votre aide à la mise en place et l'amélioration de nos manipulations sur les rats
- **Pascale VARLET** et tout le service d'anatomopathologie de l'hôpital Ste Anne pour avoir effectué les premières colorations histologiques de nos tranches de cerveau de rat.
- tout le laboratoire ANBioPhy, pour m'avoir accueillie dans vos locaux et en particulier **Imène CHEBBI**, pour ta bonne humeur et ta patience, merci.

Et bien sûr, les précieux stagiaires qui ont croisé ma route : Stefan, je te serai éternellement reconnaissante d'avoir mis le nez dans notre fameux programme ! Michaël, merci d'avoir partagé notre douloureuse investigation sur les filtres fluorescents. Kamal, je te remercie pour les nombreuses publications que tu as bien voulu me transmettre ainsi que pour ta bonne humeur et ton courage. Merci aussi à JB, tu ne m'as pas vraiment croisée à la meilleure période, mais j'ai beaucoup apprécié nos encouragements mutuels.

Merci également à Aurélie : sans toi, les dernières images histologiques n'auraient pas vu le jour. Je te suis reconnaissante de tout le travail que tu as fourni pour me permettre d'avoir ces précieuses informations.

Je me dois également de tirer mon chapeau à **Yves CHARON**, directeur du laboratoire, merci de m'avoir fait intégrer le petit monde d'IMNC pour cette thèse mouvementée (une thèse comme une autre, en quelque sorte). Je salue ta décision judicieuse de nous réunir, Estelle et moi, dans un même bureau.

Ils sont nombreux, les membres d'IMNC qui ont contribué à mon bout de chemin de doctorat. Je suis reconnaissante à chacun d'entre eux, quelque soit le temps que nous ayons pu passer ensemble.

Un grand merci à mon parrain IMNC : Philippe. J'ai apprécié ton attention et nos discussions certes peu fréquentes, mais toujours enrichissantes.

Je remercie les membres du groupe IC, Laurent, Marie-Alix et Irène, avec lesquels les discussions furent mouvementées, en particulier lors des réunions du mercredi matin.

Le soutien mutuel entre doctorants et post-doctorants a été salutaire pendant ces trois ans. Dans le désordre le plus complet : merci à Chloé, Hatem, Rémi, Romain, Nicolas, Fred, Charlotte, Didier. Tous nos délires ont été des plus rafraichissants et m'ont permis de garder le cap. Bon courage à ceux qui continuent l'aventure. Jack, je ne t'oublie pas ! Tu as été d'une attention et d'une aide particulière, et pour tous ces moments d'écoute et de soutien : un grand merci =)

Je suis contente d'avoir fait la connaissance d'Estelle et de Mounir, mes compagnons de galère. Ensemble nous avons commencé, ensemble nous avons fini. Mounir

(ou devrais-je dire « dieu »), merci pour tout (ben ouais, dieu fait tout alors pourquoi s'embêter;)). Et que te dire Estelle, ma co-bureau de chic et de choc. Sans toi et sans la BO de Glee, je ne sais pas si je serai allée jusqu'au bout de ma thèse. Merci tout plein, je suis sûre que de nouvelles aventures nous attendent ... Vivent Bob et Dan Gareau;)

Je remercie également ma famille, mon père, ma mère, mon frère et ma sœur (air connu) qui ont, de près ou de loin (aaaah, l'Alsace) été attentifs et attentionnés. Mes pensées vont également à mes grands-parents, oncles, tantes, et surtout mes cousins-cousines qui ont été présents lors des réunions de famille et qui ont toujours fait preuve d'intérêt. Un merci tout particulier à PE, Deborah et Caroline.

Un grand merci pour tous ceux qui se sont déplacés pour ma soutenance de thèse. Je pense en particulier à la famille Grosjean-Strub.

Merci à Anne-Sophie, mon ex-colloc qui m'a fait énormément plaisir en se déplaçant pour ma soutenance ! Et merci également à Maeva, pour ses mails réguliers. J'y crois toujours aux mamies rebelles !

Ma thèse ne se serait pas passée sans mes amis parisiens (merci pour ton réseau, Estelle;)). Pour toutes nos soirées et repas dominicaux (ah, le bœuf Wellington), merci à Adrien, Hélène et Fabien. J'espère que nos habitudes ne s'arrêteront pas de si tôt.

Merci également à Marie, ma physicienne masquée préférée, nous avons fait notre chemin doctoral ensemble, malgré les kilomètres qui nous séparaient. Merci beaucoup pour ton réconfort, pour tes visites et surtout pour nos délires =)

Et parce que je n'ai pas été seule pendant ces trois ans, que j'ai été accompagnée, soutenue, encouragée, secourue, et j'en passe, par l'homme qui partage ma vie : Laurent, je te dois un énorme merci. Cette thèse est un peu la tienne.

Table des matières

1	Le tissu cérébral tumoral, caractéristiques et modes de détection	5
1.1	Approche biologique	6
1.1.1	Le tissu cérébral sain	6
1.1.1.1	Les types de cellules du cerveau	6
1.1.1.2	Organisation du cerveau	8
1.1.2	Le tissu (cérébral) tumoral	9
1.1.2.1	Mécanismes cancéreux	9
1.1.2.2	Les types de tumeurs cérébrales	11
1.1.2.3	Les tumeurs gliales : les gliomes	12
1.1.2.4	Le glioblastome	13
1.1.2.5	Morphologie/histologie	16
1.2	Approche diagnostique	17
1.2.1	Imageries « classiques »	18
1.2.1.1	Imagerie à résonance magnétique	18
1.2.1.2	Tomodensitométrie	19
1.2.1.3	Imagerie radio-isotopique	22
1.2.2	Imagerie optique	22
1.2.2.1	Imagerie (proche) infrarouge	23
1.2.2.2	Imagerie de fluorescence	25
1.2.3	Histologie	27
1.2.3.1	Histologie classique : coloration H&E (Hématoxyline et Éosine)	27
1.2.3.2	Vers une classification des glioblastomes	28
1.3	Prise en charge/traitement du glioblastome	29
1.3.1	Imageries pour l'exérèse	30
1.3.1.1	Aide à la détection per-opératoire : la neuronavigation	30
1.3.1.2	Méthodes per-opératoires non optiques	31
1.3.1.3	Méthodes per-opératoire optiques	33
1.3.2	Traitement adjuvant/complémentaire	35
1.3.2.1	La radiothérapie	36
1.3.2.2	La chimiothérapie	37
1.3.2.3	La thérapie photodynamique	37
1.4	Le projet TRIOP	38
1.4.1	Principe de la fluorescence	38
1.4.2	Les deux sondes TRIOP	44
1.4.2.1	Modalité radio-isotopique : TRIOP-R	45
1.4.2.2	Modalité autofluorescence : TRIOP-AF	46
1.4.3	Etat de l'art	47
1.4.3.1	Laura Marcu (UCDavis)	47

1.4.3.2	Anita Mahadevan-Jansen (VanderBilt University)	48
1.5	Conclusion	49
2	Dispositif de mesures :	
	description et caractérisation	53
2.1	Description du dispositif de mesures	53
2.1.1	Source lumineuse : le laser	54
2.1.2	Injection de la lumière laser	55
2.1.2.1	Type 1 : miroir et collimateur fibré	55
2.1.2.2	Type 2 : collimateur fibré dédié	55
2.1.3	La sonde fibrée	56
2.1.4	Filtres	57
2.1.5	Détection : le spectromètre	59
2.2	Propagation de la lumière - Fantômes optiques	60
2.2.1	Indice de réfraction - gel	61
2.2.2	Coefficients liés à la diffusion – billes	62
2.2.2.1	Coefficient d’anisotropie de diffusion – g	63
2.2.2.2	Coefficient de diffusion - μ_s	64
2.2.3	Coefficient d’absorption - μ_a	65
2.2.4	Vérification des paramètres optiques	68
2.2.4.1	Dispositif de mesure - sphère intégrante	69
2.2.4.2	Résultats	70
2.2.5	Construction des fantômes	73
2.3	Caractérisation de la détection de la sonde	75
2.3.1	Traitement des données, analyse générale	76
2.3.2	Profondeur effective	79
2.3.3	Fantômes bicouches : détectabilité	82
2.3.4	Fantômes à inclusions	86
2.4	Conclusion	90
3	Programme de simulation :	
	vers une systématisation de la caractérisation	93
3.1	Principe de fonctionnement de la simulation Monte-Carlo	94
3.1.1	Définition générale	94
3.1.2	Application à la propagation de la lumière dans les tissus	94
3.1.2.1	Initialisation du paquet de photons	95
3.1.2.2	Propagation des photons dans le tissu	97
3.1.2.3	Absorption du photon	98
3.1.2.4	Passage d’une interface	98
3.1.2.5	Mort du paquet de photons	99
3.1.3	Programme de simulations : modifications	99
3.1.3.1	Programme d’excitation	100
3.1.3.2	Programme de collection de fluorescence	103
3.2	Validation : comparaison à la littérature	106

3.3	Validation : comparaisons simulations-expériences	108
3.3.1	Fantômes monocouches	108
3.3.1.1	Distance sonde-tissu	108
3.3.2	Fantômes bicouches	110
3.3.2.1	Variation de μ_s	110
3.3.2.2	Variation de μ_a	111
3.3.3	Fantômes à inclusions	113
3.4	Variation des paramètres de la sonde	113
3.4.1	Angle de collection	116
3.4.2	Distance entre les deux fibres	116
3.5	Conclusion et perspectives	118
4	Mesures sur modèle animal	121
4.1	Protocoles expérimentaux	121
4.1.1	Protocoles d'induction des tumeurs et extraction du cerveau	121
4.1.1.1	Modèle animal	122
4.1.1.2	Lignées cellulaires tumorales	122
4.1.1.3	Protocole d'injection	122
4.1.1.4	Protocole d'extraction et de coupe du cerveau	123
4.1.2	Protocole de mesure d'autofluorescence	123
4.1.2.1	Maintien de la tranche	124
4.1.2.2	Recalage des mesures	125
4.1.3	Analyse histologique des tranches	126
4.1.4	Analyse des données	126
4.1.4.1	Description des acquisitions spectrales typiques	126
4.1.4.2	Traitement des données « brutes »	127
4.1.4.3	Traitement des données par ajustement	128
4.1.4.4	Traitement commun	129
4.1.5	Erreurs et limitations des mesures	133
4.1.5.1	Évolution du signal en fonction du temps	133
4.1.5.2	Répétabilité entre rats	138
4.2	Résultats ex vivo	139
4.2.1	Description histologique pour les cellules RG2 et C6	139
4.2.2	Validation de la méthode de traitement	142
4.2.3	Caractéristiques autofluorescentes des RG2	143
4.2.4	Caractéristiques autofluorescentes des C6	147
4.2.5	Définition d'un indicateur tumoral	149
4.3	Vers un protocole plus complet	154
4.3.1	Mesure du temps de vie de fluorescence	154
4.3.1.1	Principe de mesure du temps de vie de fluorescence	154
4.3.1.2	Traitement des données	155
4.3.1.3	Résultats ex vivo préliminaires	156
4.3.2	Instrumentation pour des mesures in vivo chez le rat	158
4.3.2.1	Instrumentation : dispositif et sonde	158

4.3.2.2	Caractérisation de la sonde	160
4.3.3	Conclusions	164
A	Protocole de fabrication des fantômes	171
B	Protocole de mesure des paramètres optiques	173
B.1	Échantillons	173
B.2	Dispositifs de mesures	173
B.2.1	Mesure de transmission et réflexion – dispositif de la sphère intégrante	174
B.2.2	Mesure de la transmission collimatée	174
B.3	Protocole de mesures	174
B.3.1	Mesure de transmission	175
B.3.2	Mesure de réflexion	176
B.3.3	Mesure de transmission collimatée	176
B.4	Description des mesures pour un fantôme	177
B.5	Analyse des mesures	177
C	Traitement de la détection par la fibre collectrice	179
C.1	Principe de détection par la sonde de collection	179
C.1.1	Premier test : sélection à la surface de l'échantillon ($z = 0$)	179
C.1.2	Deuxième test : sélection à la surface de la sonde ($z = H$)	179
C.1.3	Dernier test : sélection par le cône d'acceptance	180
C.2	Calcul des différentes données nécessaires	180
C.2.1	Schéma général	180
C.2.2	Ellipse formée par la fibre de détection à la surface de la sonde	181
C.2.3	Projection de l'ellipse formée par la fibre de collection en $z = H$	182
C.2.4	Cône d'acceptance correspondant à un photon « pré-déecté »	184
	Bibliographie	187

Introduction

Le cancer est souvent qualifié de « mal du siècle ». Son mécanisme est complexe et peut s'attaquer à n'importe quel organe. Il serait la cause de 13 % des décès dans le monde [WHO, 2008] et pourrait toucher jusqu'à 15 millions de personnes en 2020. Le chemin d'un patient commence au diagnostic, puis passe par un ou souvent plusieurs traitements comme l'ablation chirurgicale, la radiothérapie, la chimiothérapie. Il est difficile de donner une véritable définition correspondant à un patient « guéri » du cancer. Cela correspond à un intervalle de 5 à 10 ans sans récurrence, suivant les types de cancers. L'action de la recherche peut intervenir à différents stades : la prévention, le diagnostic ou le traitement.

Les cancers les plus fréquents en France sont les cancers de la prostate, du sein et des poumons, voir figure 1. Les tumeurs cérébrales ne sont pas les plus fréquentes et représentent 1,3 % des cancers diagnostiqués [WHO, 2008]. Il existe de nombreux types de ces tumeurs, dont les caractéristiques et pronostiques sont variés. Le glioblastome est l'une des tumeurs intracrâniennes les plus fréquentes, dont l'incidence est de 5 cas sur 100 000 habitants par an en France [Baldi et al., 2010]. Cette catégorie de tumeurs est très agressive, à cause de son caractère infiltrant, soit sa capacité à s'étendre dans le tissu sain. La durée de survie d'un patient atteint par cette pathologie est inférieure à 1 an [Fontaine and Paquis, 2010]. Le traitement du patient commence par l'ablation de la tumeur, suivie d'une radiothérapie simultanée à la prise d'un composé de chimiothérapie. De multiples efforts ont été entrepris afin d'améliorer chacune de ces étapes. Celle qui semble jouer le plus grand rôle lié à la survie du patient est l'exérèse chirurgicale, en particulier la qualité de son exécution.

Si le noyau tumoral est retiré relativement facilement à l'aide des images pré-opératoires diagnostiques et à l'expérience du praticien, il est plus difficile d'exciser le tissu infiltré bordant cette zone centrale. Le cœur de la problématique est lié à la résection de tissu tumoral infiltré bordant la tumeur, non visible à l'œil nu et dû à la propriété invasive de certaines tumeurs cérébrales. Une meilleure résection permet de retarder la quasi-inévitable récurrence et augmente considérablement la qualité ainsi que la durée de vie du patient [Stummer et al., 2006]. La capacité à discriminer correctement le tissu tumoral infiltré par rapport au tissu sain est alors cruciale. En effet, en apportant une information complémentaire sur la nature histologique des tissus au neurochirurgien, celui-ci a la possibilité de parfaire son intervention, d'où la nécessité de développer des méthodes permettant de renforcer la qualité du geste opératoire.

Plusieurs solutions ont déjà été portées au bloc opératoire afin de guider le neurochirurgien. Certaines techniques de détection utilisées pour le diagnostic, comme l'IRM, l'échographie ou des méthodes radioactives, parfois reliées à la neuronavigation, ont été transférées et employées au bloc opératoire [Nimsky et al., 2006; Lindner et al., 2005; Bhanot et al., 2007]. Souvent, ce type de méthodes présente un

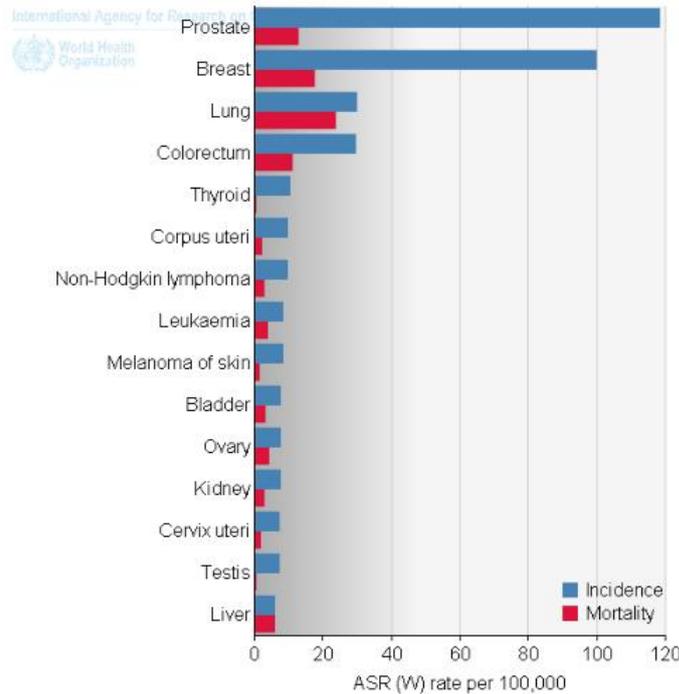


FIGURE 1 – Incidence et mortalité des cancers les plus fréquents en France (*source* : <http://globocan.iarc.fr/>)

ou plusieurs inconvénients majeurs comme par exemple son coût, sa portabilité ou une résolution insuffisante. De ce fait, un instrument portable, maniable, procurant une information en temps réel et limitant les effets secondaires subits par le patient pourrait être un véritable avantage pendant de telles interventions.

Le présent travail de thèse se situe précisément dans la réponse à cette problématique, avec l'ambition de développer un tel instrument. Il s'est déroulé au sein du laboratoire IMNC (Imagerie et Modélisation en Neurologie et Cancérologie), dans l'équipe « Imagerie per-opératoire » du groupe « Imagerie en Cancérologie ». Un des projets de l'équipe est la sonde bi-modale TRIOP², destinée à assister le neurochirurgien lors d'opérations de résection tumorale. Le projet TRIOP démontre son intérêt par deux originalités, par rapport à d'autres méthodes disponibles ou en développement. La première originalité consiste en une détection bimodale alliant la localisation d'un radiotracer injecté préalablement au patient au signal autofluorescent des tissus cérébraux. Deuxièmement, la sonde bimodale se destine à être couplée à l'outil d'exérèse utilisé actuellement par le chirurgien en bloc opératoire, soit l'aspirateur ultrasonore. Cette association permettra une plus grande précision dans l'acte d'excision. Les deux modalités de détection, radioactive et autofluorescente, sont développées en parallèle, ce travail de thèse étant destiné à la seule partie

de détection optique de la sonde.

Dans le cadre du développement de la modalité de mesure d'auto fluorescence de la sonde, une géométrie de sonde basée sur des fibres optiques a été choisie, facilitant ultérieurement la réunion des deux types de détection. Afin de rendre efficace la discrimination des tissus tumoraux infiltrés par auto fluorescence, il faut identifier des indicateurs reproductibles. Cette problématique est au centre du travail exposé dans ce manuscrit, ainsi qu'une connaissance approfondie des propriétés de détection de la sonde, en particulier en profondeur et en fonction des différents paramètres optiques des tissus.

Les cellules du corps humain contiennent des molécules qui ont la propriété d'absorber de la lumière et d'en réémettre, elles sont appelées des fluorophores endogènes. De nombreuses études sont consacrées à l'étude de l'auto fluorescence des tissus, méthode qui a pour avantage de ne nécessiter aucune injection de produits exogènes. En particulier, elle permet de différencier le tissu tumoral du tissu sain, à condition de coupler plusieurs méthodes de détection. Les fluorophores endogènes sont connus et les mécanismes cancéreux altérant le fonctionnement des cellules tumorales influent, entre autres, sur ces molécules et donc sur la lumière de fluorescence qui est émise. Plusieurs techniques de mesures sont possibles, comme la mesure des spectres d'intensité de fluorescence ou la mesure de durée de vie de fluorescence, apportant ainsi des informations complémentaires. La spécificité de la méthode peut être renforcée en se basant sur plusieurs fluorophores.

Ce mémoire s'organise en quatre chapitres qui illustrent le travail réalisé au cours de ces trois ans. De nombreux volets ont été abordés, allant de la simulation numérique à l'expérimentation sur des fantômes avant de passer aux mesures sur des fragments tissulaires ex vivo maintenus en vie. Le premier chapitre décrit la pathologie au centre de notre thématique : le glioblastome, ainsi que les mécanismes caractéristiques des tissus cancéreux. Les méthodes de détection d'une tumeur employées lors des différentes étapes cliniques, du diagnostic au traitement, sont ensuite présentées. Pour chacune d'elles, la particularité des cellules tumorales qu'elles exploitent est illustrée. Enfin, le projet TRIOP, dans lequel s'inscrit notre travail, ainsi que son état de l'art sont décrits.

Le deuxième chapitre est constitué de trois parties principales. Dans la première, nous présentons le dispositif expérimental mis en place pour les mesures de fluorescence. L'architecture la plus simple, la moins encombrante et la plus puissante pour répondre à nos attentes a été recherchée. Notre dispositif est composé d'un laser interchangeable, d'un jeu de lentilles et filtres, d'une sonde « maison » et d'un spectromètre. La deuxième partie aborde les phénomènes de propagation de lumière dans des milieux diffusifs et les paramètres optiques caractéristiques pour cette propagation. La réalisation de fantômes reflétant ces paramètres est également décrite. En troisième lieu, une caractérisation de la sonde est effectuée à l'aide des fantômes optiques dont les paramètres ont été vérifiés. Plusieurs géométries de

fantômes permettent de définir les propriétés de détection en profondeur de notre sonde. Ce processus de caractérisation est coûteux en temps et en énergie.

Le troisième chapitre présente un programme de simulation de propagation des photons dans le tissu qui a été adapté à notre dispositif expérimental, en particulier la géométrie de la sonde et des fantômes ainsi que les fluorophores utilisés. Les modifications et corrections du programme sont explicitées. Le programme de simulation est ensuite validé grâce à une comparaison avec les mesures présentées dans le chapitre précédent. En utilisant cet outil, la caractérisation de nouvelles sondes est effectuée plus facilement et rapidement.

Le quatrième et dernier chapitre décrit les résultats des expériences réalisées sur un modèle animal : le rat. Les mesures sont effectuées grâce à la sonde caractérisée précédemment. Dans un premier temps, les protocoles d'implantation de cellules tumorales dans le cerveau de rats, d'extraction des cerveaux, de mesures et de traitement des données sont détaillés. Ensuite, nous présentons les résultats *ex vivo* obtenus sur plusieurs rats. Ces résultats étudient le signal émis par différentes biomolécules fluorescentes (NADH³, Flavines, Lipopigments et Porphyrines) dédiées à la discrimination du tissu tumoral par différentiation spectrale. Ensuite, une comparaison entre deux lignées cellulaires injectées aux rats est établie, soulignant la diversité des réponses métaboliques et la complexité de la problématique. Des indicateurs potentiels de discrimination de signal tumoral sont identifiés, constituant un résultat marquant de ce travail. Une complémentarité est réalisée par des études préliminaires de mesures du temps de vie de la fluorescence, tout en utilisant la même sonde. Tout en situant notre travail par rapport à la littérature, les pistes d'évolution du projet sont enfin dégagées.

3. Nicotinamide adénine dinucléotide

Le tissu cérébral tumoral, caractéristiques et modes de détection

In the beginning there was nothing ... which exploded.
Terry Pratchett

Sommaire

1.1	Approche biologique	6
1.1.1	Le tissu cérébral sain	6
1.1.2	Le tissu (cérébral) tumoral	9
1.2	Approche diagnostique	17
1.2.1	Imageries « classiques »	18
1.2.2	Imagerie optique	22
1.2.3	Histologie	27
1.3	Prise en charge/traitement du glioblastome	29
1.3.1	Imageries pour l'exérèse	30
1.3.2	Traitement adjuvant/complémentaire	35
1.4	Le projet TRIOP	38
1.4.1	Principe de la fluorescence	38
1.4.2	Les deux sondes TRIOP	44
1.4.3	Etat de l'art	47
1.5	Conclusion	49

Le cancer est la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme, soit environ 27 % des décès en France [Touboul et al., 2009]. Cette pathologie est due à un dérèglement du fonctionnement des cellules. Le tissu tumoral qui résulte de cette anomalie diffère du tissu sain, de par sa composition, son métabolisme, sa durée de vie. Il est crucial de comprendre les caractéristiques de ce « nouvel organe » afin de le différencier de son homologue sain.

Les particularités d'une tumeur dépendent de l'organe dans lequel elle se forme. Elle est donc fortement liée à son environnement. Les différences observées du point de vue cellulaire se répercutent à l'échelle macroscopique. Ces mécanismes permettent de distinguer la tumeur du tissu sain lors des différentes étapes de prise en charge d'un patient cancéreux. Du diagnostic au traitement, de nombreuses méthodes discriminant la tumeur sont disponibles.

Les tumeurs cérébrales ne comptent que pour un peu plus d'un pourcent des cancers en France [WHO, 2008]. Si ce ne sont pas les plus fréquentes, certains types n'en sont pas moins agressifs et mortels. C'est plus particulièrement le cas du glioblastome qui représente environ 50 % des tumeurs cérébrales. La médiane de survie des patients atteints d'un glioblastome est inférieure à un an [Fontaine and Paquis, 2010]. Chaque étape de la prise en charge du patient est importante, en particulier, lors de l'opération destinée à retirer la tumeur, la résection ou exérèse tumorale. Plusieurs études ont montré l'intérêt d'une résection la plus complète possible [Stummer et al., 2006]. À ce stade, une aide permettant au chirurgien de mieux identifier les tissus envahis pourrait améliorer l'efficacité de son geste. Il existe de multiples solutions émergentes qui nécessitent toutes une discrimination précise entre le tissu sain et le tissu tumoral.

1.1 Approche biologique

D'une façon générale, les cellules tumorales dérivent de nos cellules saines, et ainsi chaque tissu tumoral est lié au tissu dont il provient. Ceci est également valable pour les cellules cérébrales. Dans un premier temps, seront abordées les caractéristiques du tissu cérébral sain, ainsi que son fonctionnement. Ensuite seront exposées différentes types de tumeurs cérébrales, avant de se focaliser plus précisément sur la pathologie d'intérêt : le glioblastome.

1.1.1 Le tissu cérébral sain

Le cerveau, siège de nos pensées, nos émotions, est un organe complexe. Il est constitué de cellules spécifiques qui ne se retrouvent pas dans le reste du corps (mise à part la moelle épinière). Ces cellules s'organisent de manière à transporter efficacement les informations, sous forme d'influx nerveux, dans les zones du cerveau où elles seront « comprises ». Les structures de celui-ci sont nombreuses et ne seront pas toutes évoquées dans la présente partie. Nous nous restreindrons à la présentation des types cellulaires suivie de la définition de quelques parties du cerveau ainsi que leur rôle.

1.1.1.1 Les types de cellules du cerveau

Notre cerveau est composé de deux familles de cellules. Il y a d'une part les cellules nerveuses, se chargeant de transporter les messages nerveux, d'autre part

les cellules gliales, ou non neuronales, qui ont pour rôle de protéger et alimenter les cellules nerveuses.

Les cellules nerveuses Ces cellules sont également appelées neurones. Leur structure caractéristique est présentée sur la figure 1.1. Leur corps cellulaire, partie la plus large, contenant le noyau et des organites, est entouré de prolongements, de courtes dendrites et un long axone.

L'influx nerveux, un déséquilibre ionique entre K^+ et Na^+ se propage le long de l'axone et est délivré à un nouveau neurone grâce à une transmission synaptique. Cette dernière correspond à un échange de molécules appelées neurotransmetteurs. Les neurones se chargent donc de générer et propager les messages nerveux dans le cerveau. Il existe plusieurs familles de neurones qui ne seront pas détaillées ici.

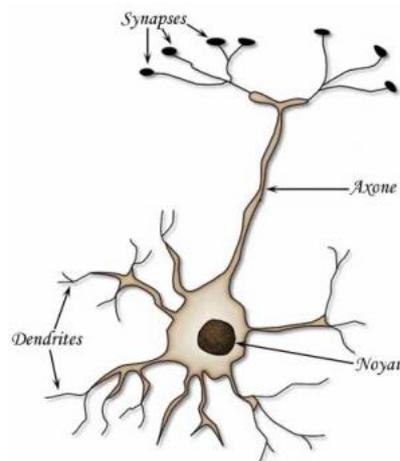


FIGURE 1.1 – Schéma d'un neurone (source : <http://www.dasko.org>)

Les cellules gliales Contrairement aux cellules neuronales, les cellules gliales ne transportent pas d'influx nerveux. Elles se divisent en plusieurs types, la macro- et microglie. La macroglie est composée de trois familles cellulaires : les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules épendymaires. Les deux premières seront détaillées par la suite. Le dernier type correspond aux cellules qui composent les parois des ventricules cérébraux. Les cellules qui appartiennent à la microglie assurent une réponse immunitaire dans le cerveau grâce à leur capacité de phagocytose.

Les bras des **astrocytes**, cellules en forme d'étoile, s'enroulent autour des capillaires sanguins d'une part et s'allient aux neurones d'autre part. Ceci est représenté sur la figure 1.2. De cette manière, les astrocytes protègent et alimentent les cellules nerveuses en sélectionnant les molécules contenues dans le sang qui leur arrivent. Elles contribuent ainsi à former la barrière hémato-encéphalique, caractéristique du système nerveux.

Comme illustré sur la figure 1.2, la membrane plasmique des oligodendrocytes forme des prolongements qui s'enroulent autour des axones pour former la gaine de myéline. Celle-ci a pour fonction de protéger les neurones et d'accélérer la transmission de l'influx nerveux.

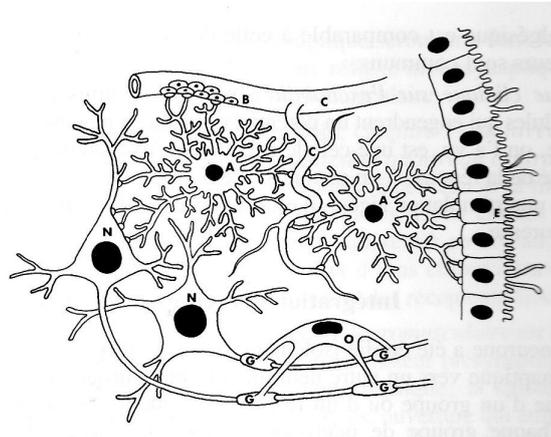


FIGURE 1.2 – Organisation des cellules nerveuses et gliales. Les oligodendrocytes (O) s'enroulent autour des axones des neurones (N). Les astrocytes (A) relient les neurones et les cellules épendymaires (E) aux capillaires sanguins (C) formant ainsi la barrière hématoencéphalique (B) [Amiel-Tison, 1997].

1.1.1.2 Organisation du cerveau

Il existe deux types de tissu cérébral, chacun relié à un type de cellule du cerveau, soit neuronal ou glial. Nous avons vu que ces tissus sont très liés l'un à l'autre. Il existe une appellation pour identifier chacun de ces tissus : les substances grises et blanches.

Les cellules neuronales sont groupées dans certaines régions de notre cerveau. Elles se trouvent en particulier dans le cortex, soit en périphérie des hémisphères, comme illustré sur la figure 1.3. Ces groupements sont appelés **matière grise**, à cause de la couleur des corps cellulaires des neurones qui la composent.

La matière blanche est composée des axones entourés de leur gaine de myéline. Cette dernière est de couleur blanchâtre et donne ainsi son nom à la substance blanche.

Le cerveau est divisé en deux régions, sous- et sus-tentorielles, séparées par la tente du cervelet. La région **sous-tentorielle** est composée du cervelet, qui joue un rôle coordinateur de la motricité.

La région **sus-tentorielle** comprend les deux hémisphères cérébraux, séparés par un sillon, appelé la faux du cerveau. Ces hémisphères comptent pour environ 80 % de la masse du cerveau [RYCAJAL@aol.com, 2010]. Leur surface est plissée et forme des circonvolutions de substance grise également appelées gyrus. Cette

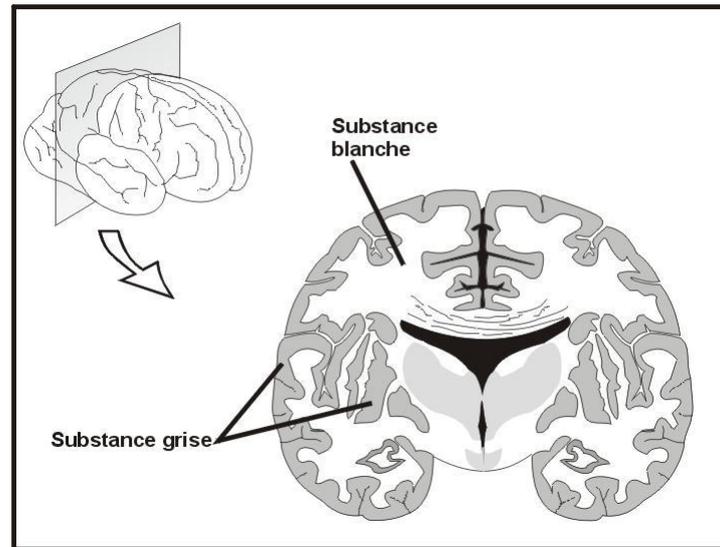


FIGURE 1.3 – Schéma d'une coupe cérébrale présentant les matières grises et blanches. Les parties noires correspondent à des cavités (ventricules ou contour des gyrus).

couche de neurones, le cortex, a une épaisseur d'environ 3 mm en moyenne [RYCA-JAL@aol.com, 2010].

Les hémisphères sont quasiment symétriques et composés chacun de cinq lobes, ayant chacun un rôle spécifique. Il existe un sixième lobe qui réunit les deux hémisphères. Toutes les zones du cortex ne sont pas fonctionnelles. Il existe trois types de rôles dans le cortex, soient les aires motrice, sensitive et associative qui contrôlent respectivement les mouvements, la conscience des sensations et la synchronisation entre les différentes aires. La localisation de ces régions actives est plus ou moins commune à tous les humains.

1.1.2 Le tissu (cérébral) tumoral

Une fois les bases de l'organisation du cerveau sain posées, nous allons nous intéresser au mécanisme cancéreux. Le phénomène de cancérogénèse est commun à tous les cancers, quelle que soit leur « organe d'origine ». Après une définition générale, une focalisation sur les tumeurs cérébrales permettra d'affiner les définitions vers la pathologie d'intérêt de la thèse : le **glioblastome**.

1.1.2.1 Mécanismes cancéreux

Le cancer peut s'attaquer à n'importe quel organe. Il résulte d'un processus en plusieurs étapes du dérèglement du fonctionnement normal des cellules. Une cellule tumorale se multiplie de manière incontrôlée. Elle se divise plus souvent que ses congénères saines et forme alors deux nouvelles cellules tumorales qui vont à leur

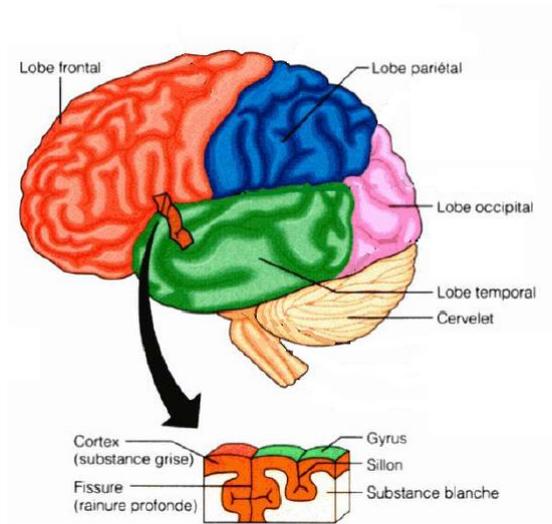


FIGURE 1.4 – Schéma des différentes régions du cerveau

tour se diviser. De plus, ces cellules ont une durée de vie supérieure à celle d'une cellule saine. Certaines cellules tumorales peuvent même être considérées comme immortelles.

De ce comportement anormal des cellules résulte un amas de cellules tumorales. Elles forment alors une tumeur. Cette dernière va influencer sur les tissus sains qui l'environnent. Ces interactions définissent la malignité de la tumeur. Le stade le plus grave du cancer est caractérisé par la formation de métastases. Ce sont de petits amas de cellules qui se détachent de la tumeur principale, migrent dans le corps par différentes voies (lymphatique, sanguine, ...) et s'installent dans un autre organe où elles peuvent alors se développer en une nouvelle tumeur. Le tissu tumoral provenant d'une métastase a les caractéristiques du tissu de l'organe dont la métastase provient. Ainsi, une métastase du foie qui migrerait dans les poumons provoquerait une tumeur « du foie » dans le poumon, et non un cancer du poumon.

Possibles origines du cancer L'origine du cancer est donc une cellule dont le comportement est modifié. Cette variation provient d'une mutation de certains gènes de la cellule. Les gènes, situés sur les chromosomes, se trouvent dans le noyau de la cellule et codent chacun pour une protéine qui assure une fonction spécifique dans le cycle de vie de la cellule ou son rôle dans l'organisme. Un gène est une partie de la chaîne d'ADN. Si cette chaîne est mutée, le fonctionnement de la cellule peut se retrouver perturbé.

La plupart du temps, la cellule a la capacité de réparer ces erreurs ou de provoquer la mort de la cellule défectueuse. Dans le cas du cancer, c'est une succession de mutations qui rend la cellule défectueuse. Par exemple, une première modification peut rendre la cellule immortelle. Cela ne fait pas d'elle une cellule tumorale.

Par contre, si une ou plusieurs mutations viennent s'ajouter et dérégler la multiplication de cette cellule, celle-ci devient dangereuse. Il faut en moyenne six mutations de gènes régulant la multiplication cellulaire pour aboutir à une tumeur maligne [GFME, 2010].

L'apparition d'un cancer peut être facilitée par plusieurs facteurs, dits carcinogènes. D'une part, il existe des facteurs environnementaux, classés en trois catégories :

- * des facteurs physiques, comme les rayons ionisants, les UV
- * des facteurs chimiques, comprenant par exemple l'amiante, l'arsenic, les fumées toxiques (dues au tabac, à la pollution, . . .)
- * des facteurs biologiques, soient des infections virales, bactériennes ou parasites

Les facteurs environnementaux les plus courants et contre lesquels une forte prévention est mise en place sont une mauvaise alimentation, le tabac et l'alcool. En France, chacune de ces causes est reliée respectivement à 35, 22 et 12 % des cancers [Touboul et al., 2009].

Il existe également des facteurs génétiques. Ceux-ci sont liés à des prédispositions familiales et transmission génétiques. 5 % des cancers sont liés à des gènes transmis [Touboul et al., 2009].

1.1.2.2 Les types de tumeurs cérébrales

Dans le cas du cerveau, le terme de cancer peut être en partie nuancé. En effet, la plupart des cancers ont la propriété de former des métastases qui vont se disséminer dans le corps et s'attaquer à d'autres organes. Les tumeurs cérébrales n'ont pas cette capacité, ou alors de manière très réduite. Il semble donc plus approprié de parler de « tumeurs cérébrales » plutôt que de « cancer du cerveau ».

Les tumeurs du cerveau et du système nerveux représentent environ 1,3 % des cancers en France [WHO, 2008]. Si ces tumeurs ne sont pas les plus fréquentes, elles sont malheureusement très souvent graves. Elles touchent indifféremment les hommes et les femmes sur toutes les tranches d'âge.

Ces tumeurs peuvent avoir des localisations, sus- ou sous-tentorielle, et des origines histologiques, soit leur « cellule d'origine », différentes. Grâce à ces deux caractéristiques, une classification est établie. Leur répartition permet d'orienter le diagnostic ainsi que le traitement.

Les 3 grandes familles histologiques de tumeurs cérébrales sont :

les tumeurs neuro-épithéliales Les gliomes, tumeurs dérivant des cellules gliales, font partie de cette famille. Ils sont composés de plusieurs types qui seront détaillés par la suite. Le médulloblastome fait également partie de cette catégorie. Il se caractérise par la région dans laquelle il se développe, soit la partie centrale du cervelet appelé vermis. C'est une tumeur fréquente chez l'enfant. Elle est particulièrement agressive et infiltrante. Les cellules à l'origine de la maladie ne sont pas clairement identifiées.

les tumeurs des nerfs crâniens et spinaux Ces tumeurs, qui se développent à partir du nerf crânien, sont appelés neurinomes. L'adénome est la tumeur qui provient des cellules d'une glande cérébrale. Ces types de tumeurs sont en général bénins.

les tumeurs des méninges Ces tumeurs se créent à partir des enveloppes du système nerveux. Ces tissus sont la dure-mère, qui sépare le cerveau de la paroi osseuse et la pie-mère, qui est un peu plus profonde et tapisse la surface externe du système nerveux central. L'arachnoïde se trouve entre ces deux membranes. C'est cette structure qui est à l'origine des méningiomes.

1.1.2.3 Les tumeurs gliales : les gliomes

Les tumeurs gliales représentent 50 % des tumeurs intracrâniennes [Touboul et al., 2009; de Tribolet, 2008]. Elles sont également appelées gliomes et ont pour origine des cellules gliales. Comme nous l'avons vu précédemment, il existe plusieurs types de cellules gliales saines. Le mécanisme cancéreux peut être initié par chacune d'entre-elles.

Ainsi, les cellules astrocytaires se dégradent en astrocytomes. Les oligodendrocytes, quant à eux, dégénèrent en oligodendrocytomes. Enfin, l'épendynome est une tumeur généralement bénigne qui se développe à partir des cellules épendymaires.

Classification des gliomes L'organisation mondiale de la santé (OMS) a élaboré une classification des tumeurs cérébrales en fonction de leur malignité. L'échelle est graduée de I à IV. Le tableau 1.1 récapitule les grades ainsi que les tumeurs associées. Le graphique de la figure 1.5 permet d'apprécier la distribution des tumeurs intracrâniennes.

Grade	Tumeurs gliales	Description
I	Astrocytome pilocytique	Bénin, stable
II	Astrocytome Oligodendrogliome } bas grade	Pré-malins, évolution vers la malignité
III	Astrocytome Oligodendrogliome } anaplasique	Malins
IV	Glioblastome	Très malin

TABLE 1.1 – Définition OMS des grades de tumeurs intracrâniennes

La caractérisation du grade se fait par l'intermédiaire de quatre critères histologiques :

- le **nombre de mitoses**, soit de divisions cellulaires
- le **polymorphisme nucléaire et cellulaire**, c'est-à-dire le fait qu'il y ait différents types de cellules

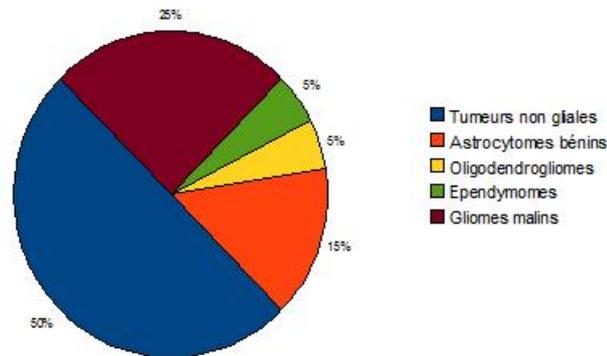


FIGURE 1.5 – Répartition des tumeurs intracrâniennes

- la **prolifération microvasculaire** ou la capacité des cellules à former des vaisseaux sanguins, caractéristique du grade III
- la **présence de nécroses**, donc de cellules mortes, celle-ci étant fortement reliée au grade IV

Les deux derniers critères cités sont d'une importance capitale pour le pronostic de survie du patient. En effet, il est reconnu que, plus le degré de malignité est élevé, plus la durée moyenne de survie du patient est courte [Louis et al., 2007].

Une caractérisation reflétant plus justement le pronostic clinique est parfois utilisée [Daumas-Duport et al., 1988]. Elle utilise les critères évoqués précédemment. Au lieu de relier le grade à un caractère précis, cette méthode articule sa gradation en fonction du nombre d'éléments présents dans le gliome à diagnostiquer. Dans le cas où aucun critère n'est identifié, la tumeur détectée se voit attribuer un grade I. En présence d'un élément, la tumeur est de grade II, deux caractères correspondent au grade III. Le grade IV vaut donc pour la présence de trois ou quatre critères identifiés.

1.1.2.4 Le glioblastome

Le glioblastome est la tumeur la plus agressive du système nerveux central. Elle correspond au grade IV de la classification OMS. L'incidence de ce type de tumeurs est de 5 cas pour 100 000 habitants par an en France [Baldi et al., 2010], ce qui correspond à 38 % des tumeurs du système nerveux, soit 65 % des gliomes. Le pronostic est en général très mauvais. La médiane de survie d'un patient atteint d'un glioblastome est d'environ 9 mois [Laws et al., 2003].

Ces tumeurs sont très complexes de par leur hétérogénéité. La plupart du temps, elles sont localisées dans la matière blanche. 30 % des glioblastomes se développent dans les lobes temporaux ou frontaux [Lonjon et al., 2010].

Glioblastome primaire vs glioblastome secondaire Deux voies d'apparition du glioblastome ont été identifiées. Les glioblastomes primaires ou « de novo » sont à distinguer des glioblastomes secondaires. Les premiers se développent rapidement et sont très malins. Les seconds dérivent de gliomes de plus bas grade, leur processus de développement est donc plus lent.

Les glioblastomes primaires sont les plus courants, soit plus de 90 % des glioblastomes [Figarella-Branger et al., 2010b]. Ils sont plus fréquents chez les personnes âgées et voient donc leur incidence augmenter fortement après 60 ans [Baldi et al., 2010].

Une théorie d'explication de la tumorigenèse postule que l'origine de ces tumeurs est une cellule souche cérébrale [Reya et al., 2001]. Les cellules souches, en temps normal, se multiplient indéfiniment et se différencient en fonction du tissu où elles se trouvent. Les cellules souche cérébrales qui se différencient vers des cellules gliales, soit astrocytome ou oligodendrocytome, pourraient être à l'origine de certains glioblastomes.

Les glioblastomes secondaires ont des caractéristiques semblables aux glioblastomes primaires. Il est néanmoins possible de les différencier par leur signature histologique. Ils dérivent de tumeurs de plus bas grade, comme les oligodendrocytomes et les astrocytomes. Des mutations successives affectant les cellules tumorales augmentent ainsi progressivement leur malignité. Ils comptent donc pour moins de 10 % des gliomes et sont plus fréquents chez des sujets plus jeunes, avec un âge moyen de 45 ans [Figarella-Branger et al., 2010b].

Origine « génétique » des glioblastomes Les mutations s'opérant dans les tumeurs en général affectent plus particulièrement les gènes jouant un rôle dans certains métabolismes. Le cycle cellulaire, soit tout ce qui a trait à la division cellulaire est souvent touché. Un autre mécanisme altéré correspond aux voies de transmission du signal entre cellules. Ces mécanismes sont modifiés par le biais de l'amplification ou de l'inhibition de certains récepteurs. Il en résulte donc des cellules au fonctionnement altéré et qui ne communiquent plus correctement entre elles.

Différentes mutations sont récurrentes dans les glioblastomes et autres gliomes malins. Pour chaque cas, il est important de déterminer celles qui sont présentes. En effet, elles permettent d'identifier clairement le type de tumeur. Les choix thérapeutiques ainsi que le pronostic du patient peuvent être adaptés grâce à cette connaissance.

Quelques unes de ces anomalies génétiques sont présentées dans cette partie. Le descriptif se limite à celles qui font partie des plus courantes et/ou potentiellement influentes sur le signal de fluorescence endogène de la pathologie considérée.

Mutation du gène TP53 D'une façon générale, lorsque l'ADN d'un chromosome est muté, la cellule enclenche une réponse qui a pour but de réparer cette lésion. La protéine P53 est impliquée dans ce mécanisme d'auto-réparation. Le gène TP53

code pour cette protéine. En cas de mutation dudit gène TP53, la protéine P53 n'est plus correctement synthétisée et la fonction correctrice est affectée. Aussi, en cas de nouvelle lésion de l'ADN, la cellule ne sera pas capable de réparer cette erreur. De nouveaux clones malins peuvent ainsi apparaître et se multiplier.

La mutation du gène TP53 a lieu dans un grand nombre de cellules cancéreuses. Elle est retrouvée dans 24 à 40 % des glioblastomes [Fontaine and Paquis, 2010], principalement dans les glioblastomes secondaires (soient 50 à 65 % [Fontaine and Paquis, 2010]).

L'activité de la protéine P53 peut également être altérée par d'autres voies. Son inactivation semble associée à une grande radiorésistance des cellules du glioblastomes.

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor Plusieurs mutations et/ou réarrangements chromosomiques résultent en une sur-expression du récepteur du facteur de croissance épidermique. Ceci a pour conséquence d'augmenter la cadence de la prolifération cellulaire, caractéristique des cellules tumorales.

Cette anomalie se retrouve dans plusieurs types de cancers. Dans le cas du cerveau, elle est caractéristique des gliomes de haut grade et est retrouvée dans 33 à 100 % des cas [Fontaine and Paquis, 2010] selon les études. L'influence de la présence de cette sur-expression sur le pronostic du patient ne fait pas l'unanimité. Il semblerait que la durée de survie du patient présentant ce dérèglement soit dépendante de son âge [Fontaine and Paquis, 2010]. Ainsi, la présence d'une dérégulation de l'EGFR serait un bon pronostic pour des patients d'âge supérieur à 60 ans.

Mutation des gènes IDH1 et/ou IDH2 (gène Isocitrate Dehydrogénase 1 ou 2) IDH1 et IDH2 sont des gènes codant pour des enzymes impliqués dans le cycle cellulaire, et plus particulièrement la réduction de NADP⁺ en NADPH. Une mutation de ce gène entraîne une inactivation de l'enzyme correspondant, ce qui provoque une diminution de la production de NADPH. Cette molécule joue un rôle dans la synthèse d'un composé protégeant les cellules d'un stress appelé stress « rédox ». De plus, la mutation IDH1 entraîne la diminution de la concentration d'une protéine : α -ketoglutarate. Cette dernière agit sur le cycle de production d'un facteur régulateur de l'expression des gènes : HIF (Hypoxia-inducible-factor). Cet élément régule le métabolisme du glucose ainsi que l'angiogénèse, deux facteurs critiques dans la croissance tumorale. Sa modification est favorable à l'apparition de gliomes.

Les mutations IDH1/2 se retrouvent dans d'autres cancers. Une altération de IDH1 est présente dans 12 % des glioblastomes [Yan et al., 2009b]. Elle est caractéristique des glioblastomes secondaires où elle est détectée dans plus de 80 % des tumeurs et se trouve déjà sur des gliomes de grade II et III [Yan et al., 2009a]. Il semblerait que cette mutation soit plus fréquente chez des patients plus jeunes et associée à un bon pronostic.

PTEN Le gène PTEN est impliqué dans plusieurs mécanismes liés au cycle cellulaire. Il est dit « suppresseur de tumeur » et joue un rôle dans l'inhibition d'une protéine : PI3-kinase. Cette substance supprime l'apoptose, soit la mort de la cellule. Dans le cas où PTEN est mutée, la cellule acquiert un avantage de croissance [Pardoll, 2004]. Ceci peut être provoqué par la perte de l'homozygotie du gène. Nos chromosomes existant par paires dans nos cellules, cela signifie que le gène est présent sur un chromosome, mais pas sur son homologue. Une mutation sur le gène restant semble jouer un rôle dans la conversion d'un gliome de bas grade en glioblastome. Elle se retrouve dans 60 % des glioblastomes [Hulleman and Helin, 2005].

Les mutations retrouvées dans les glioblastomes ainsi que leurs fréquences respectives sont récapitulées dans le tableau 1.2. Les mutations affectant le facteur de croissance (EGFR) ou les gènes PTEN et TP53 ont un effet sur leur concentration dans les cellules. En empêchant leur mort ou en augmentant leur capacité à se multiplier, ces mutations augmentent l'activité métabolique et la densité cellulaire du tissu tumoral. Ces caractéristiques entraînent une modification du signal de fluorescence endogène qui est principalement due à des fluorophores impliqués dans le cycle cellulaire, et à la structure du tissu, tous deux modifiés par cette prolifération cellulaire.

Mutation	Pourcentage			Fonction affectée
	primaire	secondaire	tous	
IDH1	< 10 %	50 – 85 %	12 %	Cycle cellulaire
EGRF	++	-	30 – 100 %	Multiplication cellulaire
PTEN	N.A.	N.A.	15 – 60 %	Suppression de l'apoptose
TP53	10 – 18 %	50 – 65 %	24 – 40 %	Réparation de l'ADN muté

TABLE 1.2 – Tableau récapitulatif des mutations retrouvées dans les glioblastomes ainsi que leur occurrence.

1.1.2.5 Morphologie/histologie

Les glioblastomes sont présents sous des formes très variées, d'où l'appellation : glioblastome multiforme. Les principales caractéristiques histologiques de ces tumeurs sont liées à leur composition divisée en deux structures : solide et infiltrante.

Composante solide D'un côté, il y a un cœur tumoral (solide) constitué de cellules tumorales en contact les unes avec les autres. Leurs fréquentes mitoses engendrent une densité cellulaire très élevée. Un critère caractéristique des glioblastomes est le polymorphisme cellulaire et nucléaire. Cela signifie que plusieurs formes de cellules et de noyaux sont retrouvées au sein de ces tumeurs.

La masse de cellules tumorales déclenche le phénomène de néoangiogénèse, la création de nouveaux vaisseaux, pour pourvoir à ses besoins en nutriments et continuer de proliférer.

Cette composante solide est souvent associée à un foyer nécrotique, composé de cellules mortes, qui compte pour environ 80 % du volume tumoral [Figarella-Branger et al., 2010a]. Au bord de ce cœur nécrosé se trouve une structure caractéristique des glioblastomes : la nécrose palissadique, voir figure 1.6.

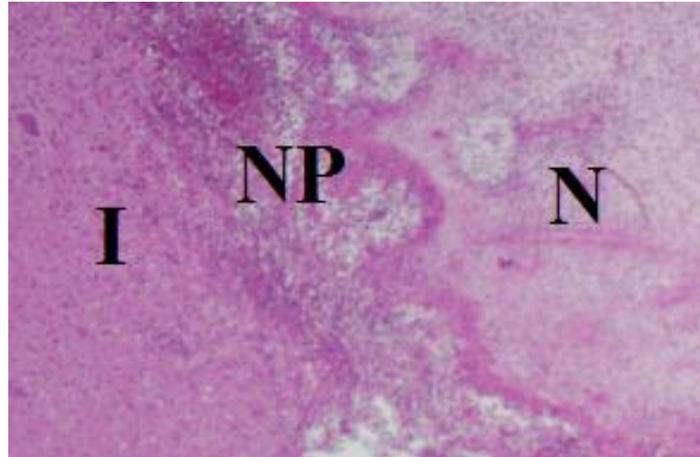


FIGURE 1.6 – Histologie : I = tissu infiltré ; NP = nécrose palissadique ; N = nécrose, coloration H&E, échantillon de glioblastome murin (lignée C6).

Composante infiltrante La malignité du glioblastome est due à sa capacité à infiltrer les tissus qui l'environnent. L'infiltration est caractérisée par des cellules isolées qui se détachent du corps solide et se déplacent dans le tissu cérébral intact. Ces cellules sont difficiles à localiser. Il est donc quasi-impossible de les extraire. En conséquence, elles causent souvent des récurrences rapides de la tumeur.

Dans la suite du chapitre et de la thèse, notre attention se focalisera sur les tumeurs intracrâniennes, en particulier les gliomes et surtout le glioblastome multiforme.

1.2 Approche diagnostique

Lorsqu'une tumeur cérébrale est suspectée, il faut choisir un moyen (de préférence non invasif) de déterminer la pathologie à laquelle le médecin est confronté, ainsi que sa localisation dans le cerveau. Il s'agit donc de différencier le tissu sain du tissu tumoral, mais également d'identifier le type de tumeur.

Une tumeur intracérébrale s'annonce en premier lieu par des symptômes cliniques. Ce sont eux, en général, qui amènent le patient à consulter. Dans le cas du glioblastome, ces symptômes peuvent être des troubles de la mémoire, de l'attention, du jugement ou du comportement [Lonjon et al., 2010]. Ils peuvent être accompagnés d'un déficit moteur, de troubles du langage et/ou de céphalées (maux

de tête) [Lonjon et al., 2010]. Une épilepsie peut également éveiller les soupçons. Le premier réflexe du médecin est d'utiliser un appareil d'imagerie « classique » comme l'imagerie par résonance magnétique, ou le tomodensitomètre, plus communément appelé scanner. Certaines techniques d'imagerie optique émergentes pourraient apporter des informations complémentaires au diagnostic mais ne sont pas actuellement utilisées en routine clinique.

1.2.1 Imageries « classiques »

L'imagerie « classique » comprend les techniques d'imagerie utilisées actuellement en routine dans les hôpitaux et les cliniques. En cas de tumeur cérébrale suspectée, l'examen le plus utilisé est l'imagerie par résonance magnétique (IRM), réalisée dans 91,7 % des cas en France [Lonjon et al., 2010]. Elle est suivie de près par le scanner ou tomodensitomètre (TDM), exécutée dans 73,5 % des cas. Les imageries radio-isotopiques comme la tomographie à émission de positons (TEP) ou la tomographie à émission monophotonique (TEMP) sont plus marginalement utilisées.

1.2.1.1 Imagerie à résonance magnétique

IRM - imagerie anatomique Certains atomes possèdent un moment magnétique de spin, c'est le cas de l'atome d'hydrogène qui se retrouve en grande quantité dans les molécules des tissus biologiques. En IRM, cet atome présente un intérêt supplémentaire car son moment magnétique est relativement fort, ce qui facilite sa détection.

Lors d'un examen IRM, le patient est introduit dans un anneau capable de générer des champs magnétiques. Dans un premier temps, un champ est généré, pour aligner tous les moments magnétiques des atomes d'hydrogène dans la même direction, l'axe z autour duquel ils tournent. Ensuite, plusieurs impulsions radiofréquence sont générées. Les moments des atomes d'hydrogène vont donc être déplacés par ces impulsions avant de revenir, tout en continuant de tourner, dans leur direction initiale, l'axe z. Ce phénomène est appelée « relaxation ». L'appareil d'IRM mesure le retour des moments magnétiques dans deux directions. La première suit l'axe longitudinal ou axe z, donnant une image appelée T1. La composante transversale, soit perpendiculaire à l'axe z est mesurée pour former l'image T2. Chaque tissu a une concentration et organisation en hydrogène caractéristique, les images IRM T1 et T2 permettent donc de différencier les tissus.

Dans le cas du cerveau, les images T1 et T2 permettent non seulement de localiser la tumeur, mais également de poser un diagnostic sur le type de tumeur. Par exemple, un glioblastome comporte des bords irréguliers, un centre nécrotique hypo-intense en imagerie T1 [Jacobs et al., 2005]. La figure 1.7 montre les images T1 de patients atteints de gliomes de bas- (gauche) et haut-grade (droite). Tous deux présentent un hyposignal en T1. L'imagerie pondérée T2 ou encore une imagerie de perfusion apporte des informations complémentaires et permet de différencier hauts et bas-

grades. Néanmoins, l'interprétation d'une image IRM mène à une sous-estimation de la malignité de la tumeur dans un tiers des cas [Menei and Metellus, 2010].

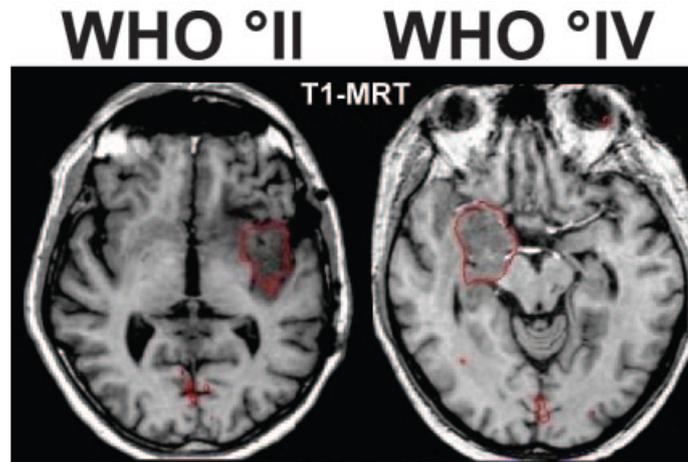


FIGURE 1.7 – IRM pondérée T1 d'un patient atteint d'un gliome de bas-grade (à gauche) et d'un patient atteint d'un gliome de haut-grade (à droite) [Jacobs et al., 2005].

IRM de perfusion - imagerie fonctionnelle Souvent, l'IRM de perfusion est réalisée en complément de l'IRM classique. Le principe est d'utiliser un produit de contraste paramagnétique qui fournit un signal spécifique. Les produits couramment utilisés sont des complexes à partir de Gadolinium. La substance est injectée en intra-veineux, pendant l'examen d'IRM, et se propage donc dans les vaisseaux sanguins. Dans le cerveau, la barrière hémato-encéphalique (BHE) empêche les molécules contenues dans le compartiment sanguin de diffuser dans le tissu cérébral. Dans le cas des tumeurs cérébrales, cette barrière peut être abimée. Il est donc possible de repérer ce dysfonctionnement par imagerie IRM de perfusion, voir figure 1.8.

La méthode dite « de premier passage » permet d'évaluer le volume sanguin cérébral (VSC) pour chaque voxel de l'image. Cette information est déduite d'une acquisition dynamique pendant et après l'injection d'un produit de contraste. Cet indicateur illustre en particulier le phénomène de néovascularisation. En effet, la tumeur provoquant la création de nombreux vaisseaux, le volume sanguin sera plus élevé dans une zone tumorale, comparée à une zone saine.

1.2.1.2 Tomodensitométrie

TDM - imagerie anatomique La tomodensitométrie utilise le même principe physique que la radiographie. C'est une technique médicale dite irradiante car elle utilise un faisceau de rayons X. Ce rayonnement est très énergétique. Lors du passage au travers du patient, ce rayonnement est plus ou moins absorbé par les tissus qu'il

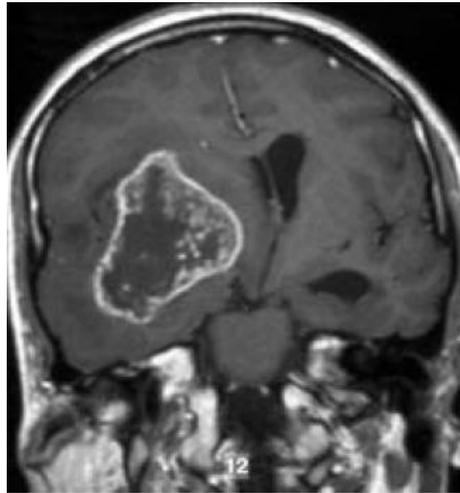


FIGURE 1.8 – IRM pondérée T1 d'un patient atteint d'un glioblastome, après injection de Gadolinium. Une prise de contraste est observée autour du glioblastome. Elle correspond à la vascularisation ainsi que la fuite du produit de contraste à cause de la rupture de la BHE [Grand et al., 2007].

traverse. Après leur passage à travers le patient, les rayons sont détectés et leur intensité reflète leur atténuation dans le milieu.

Dans le cas de la radiographie, la détection peut se faire directement sur un film photosensible qu'il suffit ensuite de développer. Les os étant très absorbants, très peu de rayons peuvent les traverser, ce qui laisse le film blanc. Cette technique permet donc de repérer les fractures des os, par exemple.

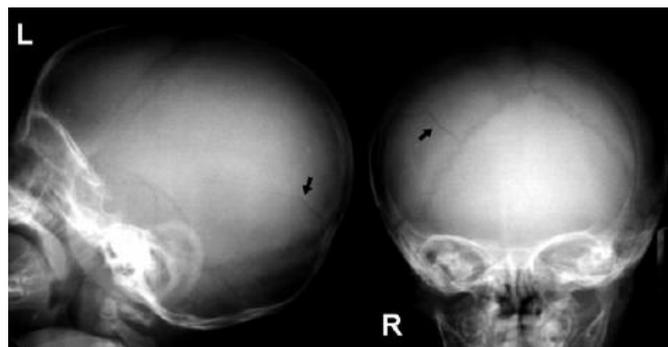


FIGURE 1.9 – Radiographies du crâne d'un enfant, la flèche indique une fracture. (University of Hawaii John A. Burns School of Medicine website)

Lors d'un examen de TDM, la source de rayons X tourne autour du patient et permet d'avoir des images d'atténuation sous plusieurs angles. Le détecteur est toujours en face de la source et tourne en même temps que celle-ci. Ce n'est plus

un simple film photosensible mais un compteur qui va enregistrer l'information au format numérique. Des logiciels se chargent ensuite d'interpréter ces données pour reconstruire une cartographie 3D de l'absorption dans le corps. Ceci permet de voir non seulement les os, mais également les organes à l'intérieur.

Par exemple, dans le cas du cerveau, une radiographie ne permet que de voir le crâne, car nous n'avons qu'une seule projection et l'os bloque toute l'information venant de l'intérieur du crâne. Au contraire une TDM de la tête permet d'observer le cerveau et ses structures car les multiples projections ont permis une reconstruction tomographique 3D. Ce qui fait de cet imageur un candidat potentiel à la détection de tumeurs. En effet, la densité de cellules étant modifiée dans la tumeur, l'absorption du rayonnement X le sera aussi.

TDM de perfusion - imagerie fonctionnelle Pour caractériser au mieux la tumeur (sa localisation, sa taille, son type, ...) un examen fréquemment utilisé est la TDM de perfusion. Le principe rejoint celui de l'IRM de perfusion, à savoir l'injection d'un produit de contraste, en intraveineux, couplée à une acquisition en fonction du temps. Le produit utilisé ne nécessite pas de propriété magnétique particulière, contrairement à l'IRM, par contre, il doit posséder un fort coefficient d'absorption des rayons X. De cette manière, il apparaîtra en blanc sur une image TDM. En règle générale, c'est un produit de contraste iodé qui est utilisé.

Une TDM avant injection est effectuée pour définir la zone à imager lors de l'injection. L'acquisition dynamique permet de déterminer le volume sanguin cérébral (VSC) par voxel. Pour rappel, une augmentation de ce volume correspond à la néoangiogénèse, donc à la tumeur. Un VSC maximal est défini dans la région tumorale et corrélé à la malignité de la tumeur.

Les courbes de prises de contraste en fonction du temps permettant de déterminer le VSC sont modifiées dans le cas où la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique est augmentée. Cette information permet d'appréhender le grade tumoral.

L'IRM et la TDM procurent toutes deux des images anatomiques et peuvent apporter une information fonctionnelle lorsqu'un produit de contraste est utilisé. Leurs résolutions spatiales, soit la capacité à différencier deux structures proches, sont équivalentes et de l'ordre de 1 mm. Le temps moyen d'acquisition d'une image IRM complète d'un organe ou segment du corps est de 30 minutes et celui d'un scanner varie entre 15 et 30 minutes.

L'IRM est une modalité non radiative, contrairement à la TDM. Elle permet un meilleur contraste entre les tissus mous. De plus, une IRM est plus sensible à la concentration d'agent de contraste. Elle est recommandée en cas de suspicion de tumeur cérébrale et de fait utilisée plus couramment que le scanner.

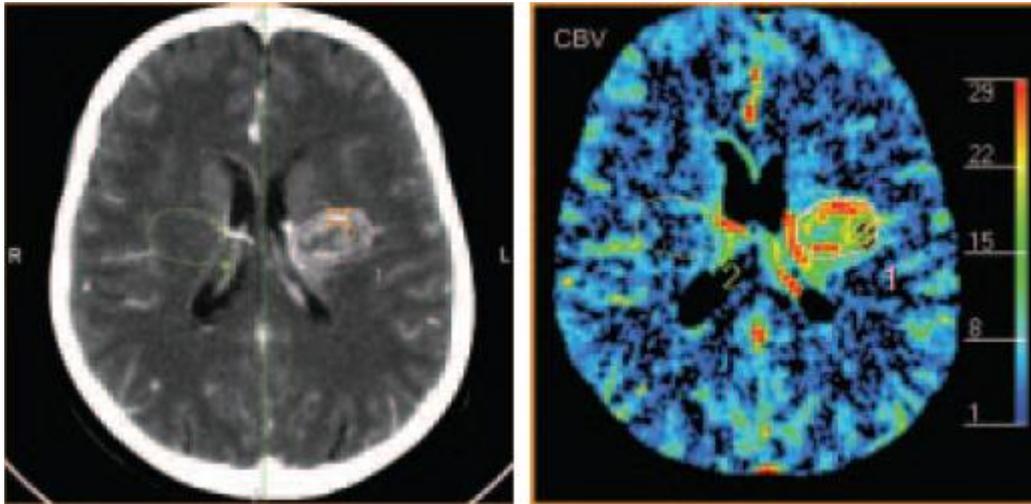


FIGURE 1.10 – À gauche, TDM de perfusion d'un patient atteint d'un glioblastome. À droite, l'image colorisée de VSC calculée grâce à la méthode de premier passage [Grand et al., 2007].

1.2.1.3 Imagerie radio-isotopique

Les techniques d'imagerie radioisotopiques procurent une image de la distribution d'un traceur radioactif dans le corps humain. Dans le cas d'une tumeur, le produit injecté est un dérivé du glucose, marqué avec du ^{18}F . Les cellules tumorales consommant plus de glucose, le produit, et donc la radioactivité, s'accumule dans la tumeur. Ce type d'imagerie présente des inconvénients, elle produit notamment des images peu précises et nécessite souvent un couplage avec un type d'imagerie IRM ou TDM.

Il existe deux types d'imageurs. La tomographie d'émission monophotonique (TEMP) détecte directement le photon γ émis par le radiotracer. L'autre méthode, la tomographie d'émission de positons (TEP), utilise un marqueur radioactif émettant une particule appelée positon (ou β^+) qui traverse en moyenne un millimètre dans le tissu avant de s'annihiler avec un électron pour créer deux rayons γ de même énergie, 511 keV émis dans des directions opposées. Ces rayons sont détectés « en coïncidence » puisqu'ils sont émis au même moment. Les deux types d'imagerie présentent l'intérêt de permettre une quantification spécifique de l'état métabolique du gliome [Jacobs et al., 2005].

1.2.2 Imagerie optique

Les techniques d'imagerie optique utilisent des rayonnements dans une gamme d'énergie beaucoup plus faible que les imageries X ou γ , comprise entre l'ultra-violet et l'infrarouge. Cette plage d'énergie comprend la lumière visible, voir la figure 1.11.

Les imageries basées sur cette méthodologie sont émergentes. Elles sont pour

la plupart en développement ou testées en préclinique, en tout cas dans le cas du cerveau. Plusieurs principes sont utilisés, dont la fluorescence et la mesure de l'atténuation d'un rayonnement infrarouge/proche infrarouge.

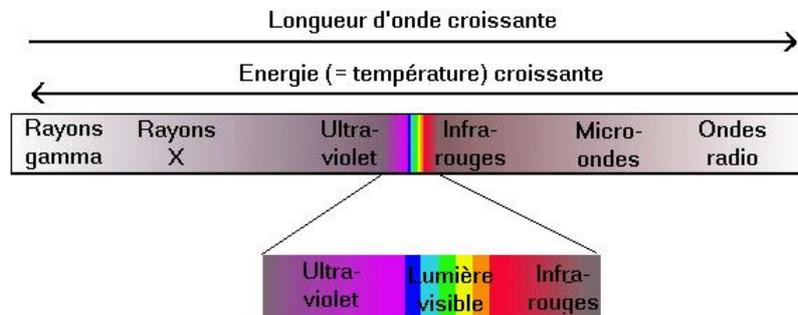


FIGURE 1.11 – Spectre des rayonnements classés en fonction de leur énergie.

1.2.2.1 Imagerie (proche) infrarouge

Dans les tissus vivants, le sang et l'eau absorbent la lumière dans des longueurs d'onde spécifiques. La figure 1.12 montre l'absorption relative de trois milieux différents (hémoglobine oxygénée ou non ainsi que l'eau) en fonction de la longueur d'onde. Il existe une plage de longueurs d'onde, se situant entre 700 et 900 nm environ, et correspondant au rayonnement infrarouge/proche infrarouge dans laquelle l'absorption est plus faible, appelée « fenêtre thérapeutique ». Ce domaine est donc intéressant pour récupérer des informations plus profondément dans les tissus. Le rayonnement IR pénètre de 3 à 15 mm dans les tissus organiques. Hors de cette fenêtre thérapeutique, la pénétration dans les tissus est limitée au mieux à quelques millimètres.

Le principe de la tomographie optique diffuse dans le domaine proche infrarouge permet de former des images à trois dimensions en utilisant la différence spectrale entre Hb et HbO_2 pour étudier les tissus [Horecher, 1943]. La tomographie optique diffuse résolue en temps est une technique employée pour sonder profondément des tissus épais en mesurant l'absorption et la diffusion dans le domaine du proche infrarouge. La source utilisée émet des impulsions ultra brèves et la répartition temporelle des photons diffusés est mesurée. La détection est généralement assurée par des caméras à balayage de fente ou des systèmes de comptage de photons [Ramstein, 2004; Montcel, 2005]. Cette technique, appartenant aux méthodes spectrophotométriques fibrées, est sensible à la dynamique de propagation de la lumière dans le milieu [Mottin, 2005]. Elle fournit une carte des propriétés optiques du tissu sondé résolue dans l'espace. Elle est capable d'évaluer quantitativement l'oxygénation tissulaire, paramètre d'intérêt dans l'étude du métabolisme sanguin ou de l'activation cérébrale. La tomographie optique diffuse résolue en temps a fait ses preuves en particulier pour une exploration fonctionnelle du cerveau [S. Mottin, 2011; Ramstein,

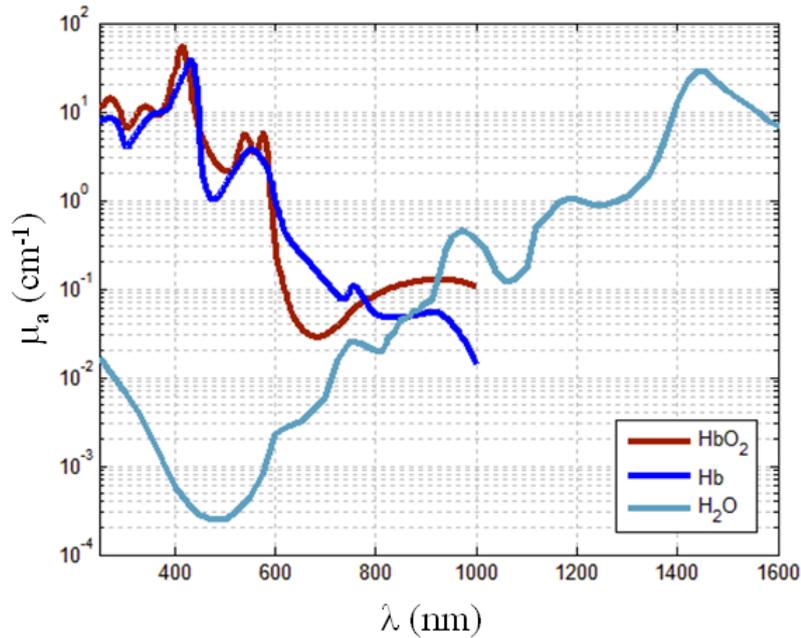


FIGURE 1.12 – Spectre d’absorption de l’eau et du sang, illustration de la fenêtre thérapeutique.

2004; Obrig and Vilringer, 2003] ainsi que la localisation de tumeurs hypervasculaires, par quantification de l’angiogenèse [M.G. Pakalniski, 2011]. Récemment, un groupe a prouvé la faisabilité de la détection « non invasive » d’un fluorophore exogène (ICG¹), injecté en intra-veineuse, par des méthodes analogues à la tomographie optique diffuse résolue en temps [Liebert et al., 2006, 2011]. Une des applications évoquées concerne la détection de tumeurs, mais aucune étude n’a été faite pour le moment.

Cette technique permet de traverser le crâne, mais la profondeur est alors limitée dans le cerveau à quelques centimètres. La détection de tumeurs cérébrales profondes n’est donc pas possible avec de telles méthodes. Les tomographies optiques diffuses résolue en temps ou non sont appliquées chez le nouveau-né [Schmidt, 1999; Austin, 2007] et permettent alors d’imager le cerveau en entier. Ces méthodes souffrent néanmoins d’une mauvaise résolution spatiale mais présentent l’avantage de ne pas être irradiantes, contrairement à la TEP ou la TEMP et ne nécessitent pas d’endormir l’enfant, comme c’est le cas pour l’IRM. A notre connaissance, aucune étude n’a été consacrée au diagnostic de tumeurs cérébrales chez l’enfant avec cette technique.

Une autre technique, appelée tomographie optique cohérente (OCT) utilise un rayonnement proche IR et exploite la réflexion de ce rayonnement sur les différentes interfaces du tissu. Cette méthode est analogue à l’échographie qui mesure la réflexion des ultrasons. La profondeur de réflexion dans le tissu se retrouve par

1. Indocyanine Green

mesure du délai entre le pulse lumineux envoyé et celui qui est réfléchi par un interféromètre. L'analyse des données permet de remonter à l'indice de réfraction du tissu et procure une information sur sa structure. Historiquement, cette technique a été utilisée en ophtalmologie, pour effectuer un fond de l'œil précis. Son utilisation diagnostique s'étend vers la détection précoce de cancers, tel que le cancer de la peau. Plusieurs études se sont intéressées à la différenciation du tissu épithélial sain et du tissu tumoral par OCT [Strasswimmer et al., 2004; Mogensen et al., 2010]. L'entreprise Michelson Diagnostics développe un scanner portable pour détecter les tumeurs de la peau. Les limitations des systèmes OCT sont liées à leur pénétration limitée dans les tissus, pour des tissus fortement diffusifs, cette profondeur est d'environ 2 – 3 mm jusqu'à 10 – 20 mm pour le tissu ophtalmique. En contrepartie, l'OCT présente l'avantage d'avoir une très bonne résolution, jusqu'à 15 μm . De nombreuses études sont faites sur des échantillons ex vivo, telles des biopsies de cerveau humain [Böhringer et al., 2009]. La technique OCT ne permet pas de traverser le crâne, mais des études in vivo ont été initiées sur le cerveau de rat [S.N. Roper, 1998].

1.2.2.2 Imagerie de fluorescence

La fluorescence est la propriété d'une molécule excitée, le fluorophore, d'émettre de la lumière. L'excitation se fait par un rayonnement lumineux, souvent fourni par un laser. L'énergie du rayonnement est absorbée par la molécule et celle-ci quitte son état fondamental pour se trouver dans un état excité. La molécule revient dans son état fondamental en émettant à son tour de la lumière. L'énergie de ce rayonnement est inférieure à celle du photon absorbé, car il y a des pertes d'énergie par phénomène non radiatif à l'intérieur de la molécule. Cette différence permet d'identifier le rayonnement fluorescent qui est spécifique à chaque molécule. Le processus de fluorescence sera expliqué plus en détail dans la partie 1.4.1.

Il existe plusieurs moyens d'utiliser la fluorescence afin de distinguer le tissu tumoral du tissu sain. Il est possible d'utiliser la fluorescence produite par les tissus eux-mêmes ou bien, de manière similaire aux méthodes radio-isotopiques, de fixer un fluorophore, le marqueur, sur une molécule spécifique, le vecteur, qui se fixe préférentiellement dans le tissu tumoral.

Auto-fluorescence Dans les tissus, certaines molécules émettent de la lumière de fluorescence, dans la gamme UV-visible. Parmi ces molécules, appelées fluorophores endogènes, se trouvent le collagène et l'élastine, des protéines structurales localisées dans la matrice extra-cellulaire, les NADH, un co-enzyme ayant un rôle dans le métabolisme cellulaire, ainsi que des flavo-protéines et des lipides, contenus dans les cellules [Wagnières et al., 1998]. Le nombre et la nature des fluorophores excités varient en fonction de la longueur d'onde utilisée. Le tissu tumoral ayant une architecture et un métabolisme différent du tissu sain, une variation peut se retrouver sur les spectres d'émission et/ou le temps de vie de fluorescence de ces molécules.

De nombreuses études sont menées afin d'établir un diagnostic tumoral grâce à

une méthode de mesure de l'autofluorescence des tissus, pour différents organes cibles comme, entre autres, le colon [McGinty et al., 2010], les poumons [Huttenberger et al., 2008], la vessie [Péry, 2007], la bouche [Skala et al., 2004; Pavlova, 2008], et le cerveau [Lin et al., 2001; Marcu et al., 2004; Toms et al., 2007; Pascu et al., 2009; Saraswathy et al., 2009; Sun et al., 2010]. Ce mode de détection a été choisi pour la sonde TRIOP², développée au laboratoire. Son principe est expliqué plus en détail dans la partie 1.4.

Marqueurs exogènes Les marqueurs exogènes sont des molécules émettant de la lumière de fluorescence dans le domaine visible ou infrarouge. Les fluorophores IR comportent un avantage : ils se situent dans une gamme de longueurs d'onde qui présente un rapport signal/bruit plus élevé car il n'y a pas ou peu d'autofluorescence des tissus. Un fluorophore dit exogène n'est pas présent dans le corps humain. Il est administré par voie intraveineuse, par exemple, et doit présenter une accumulation dans la tumeur afin que celle-ci se démarque du tissu environnant.

Il existe plusieurs types de marqueurs :

- les **marqueurs spécifiques**. Dans ce cas, la molécule fluorescente est couplée à un traceur qui se fixe préférentiellement dans les tissus visés.
- les **marqueurs non spécifiques**. La molécule fluorescente n'est pas couplée à un traceur ou vecteur. Elle se disperse donc dans tout l'organisme. Dans le cas de tumeurs cérébrales, une augmentation d'intensité de fluorescence sera tout de même observée à cause de la rupture hémato-encéphalique et de leur forte concentration de vaisseaux sanguins.
- les **marqueurs dits « activables »**. Le marqueur n'est pas directement fluorescent, mais il va induire la production de fluorophores endogènes dans la région où il s'accumule, donc au niveau de la tumeur.

De nombreuses techniques d'imagerie optique non invasives émergent dans le milieu clinique, mais peu sont appliquées à la détection de tumeurs cérébrales. Elles se consacrent à la mesure de flux cérébral, par exemple. En effet, le crâne qui protège le cerveau est une barrière importante pour les photons devant accéder aux tissus cérébraux, puis ressortir afin d'être détectés. Certaines techniques sont utilisées dans des études précliniques chez le rat ou la souris [Deliolani et al., 2008; Boffety, 2010]. Leur crâne est plus fin et donc permet l'utilisation de méthodes photoniques à travers celui-ci. Ces études portent surtout sur la définition de nouveaux marqueurs tumoraux fluorescents pour la microscopie.

Chez l'homme, les techniques optiques de détection tumorale sont surtout réservées à l'étude histologique des échantillons prélevés et/ou à des techniques peropératoires d'aide à la résection tumorale. Ces procédés sont détaillés dans les parties suivantes.

De manière générale, les images obtenues par les méthodes de détection tumorales présentées ci-dessus ne permettent pas toujours de diagnostiquer le type de

2. TRIOP = Tumor Resection IntraOperative Probe

tumeur de manière précise. Une analyse histologique additionnelle, réalisée à partir d'échantillons obtenus par biopsie ou récupérés lors d'une opération chirurgicale, est effectuée afin de confirmer et/ou affiner le diagnostic.

1.2.3 Histologie

L'analyse histologique est la méthode standard pour préciser ou confirmer le diagnostic, en particulier le type de tumeur. Elle est effectuée sur des échantillons de tissu tumoral prélevés chez le patient, soit lors de l'exérèse, soit lors d'une biopsie.

Il existe deux moyens de récupérer des morceaux de tissu cérébral tumoral. Ce prélèvement est évidemment possible lors de l'opération tumorale, soit le moment où la tumeur est enlevée par le chirurgien.

La seconde méthode nécessite l'utilisation d'une seringue très fine qui est introduite, à travers le crâne, dans le cerveau jusqu'à la tumeur, pour en récupérer une petite partie. Les prélèvements se font de préférence en plusieurs endroits pour caractériser l'hétérogénéité de la tumeur. Cette opération est appelée biopsie. La plupart du temps, elle a lieu lorsque l'opération de résection est impossible ou non souhaitée.

Une fois le morceau de tissu récupéré, celui-ci est confié au service d'anatomopathologie qui l'analyse afin de définir le type de tumeur. Classiquement, l'histologie est faite par une coloration appelée Hématoxyline et Éosine (H&E). De nouvelles études [Fontaine and Paquis, 2010] montrent l'intérêt de créer des sous-classes de glioblastomes afin de définir au mieux la manière de traiter le patient. Dans ce cas, les critères caractéristiques des cellules tumorales sont recherchés, en particulier les mutations génétiques et leurs effets sur la cellule.

1.2.3.1 Histologie classique : coloration H&E (Hématoxyline et Éosine)

Cette technique d'analyse histologique est utilisée dans de nombreuses études pour caractériser le type de cellules, de tissu et/ou de tumeur. Les tissus à analyser sont fixés dans une solution de formol. Celle-ci empêche les cellules de se dégrader et de se dissocier. L'échantillon est ensuite coupé en tranches très fines qui vont être colorées.

L'hématoxyline colore les noyaux des cellules en bleu. Cette substance aurait pour propriété de se fixer sur les histones, des protéines autour desquelles s'enroule l'ADN. Comme l'ADN ne se retrouve que dans le noyau, c'est le seul compartiment de la cellule coloré. L'autre molécule, l'éosine, se lie avec des protéines intra et extracellulaires, colorant des structures comme le cytoplasme ou les hémoglobines avec des nuances de rouge.

Cette technique permet donc de différencier les noyaux des cellules et d'identifier leur forme. Sur la figure 1.13, plusieurs types de cellules, colorées au H&E, trouvées dans les glioblastomes sont présentés. Ceux-ci témoignent du polymorphisme cellulaire observé dans ces tumeurs.

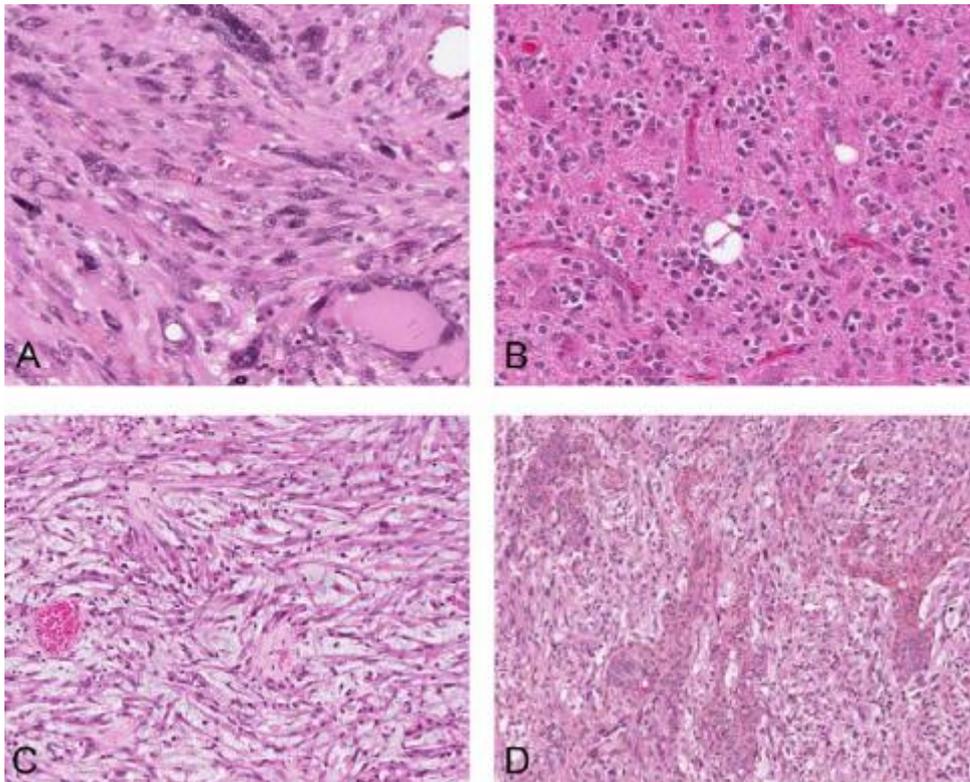


FIGURE 1.13 – Polymorphisme cellulaire du glioblastome. A. Cellules tumorales géantes. B. Cellules rondes pseudo-oligodendrogiales. C. Cellules fusiformes. D. Prolifération microvasculaire.

1.2.3.2 Vers une classification des glioblastomes

D'autres techniques, moins couramment utilisées, permettent également de différencier les types de gliomes. Ces méthodes apportent des informations complémentaires permettant de classer plus précisément les glioblastomes et donc d'adapter le traitement du patient.

Une technique couramment utilisée est appelée « immunohistochimie ». Cette méthode consiste à marquer un anticorps avec un colorant ou un fluorophore, par exemple. Cet anticorps est complémentaire d'un antigène spécifique contenu dans l'organisme.

Par exemple, la substance MIB-1 est un anticorps de l'antigène Ki-67, une protéine nucléaire marquant la multiplication cellulaire. Cette protéine est présente dans toutes les phases du cycle cellulaire, excepté la phase de repos. Lorsque l'anticorps MIB-1 se fixe sur son antigène correspondant, une coloration bleu/brune est observée. Les cellules du système nerveux se multiplient peu, voire pas du tout. Si la coloration apparaît dans des cellules agglomérées, cet amas correspond à une tumeur [Ohta et al., 1994]. Ce marquage est utilisé dans le cas du glioblastome et

permet de définir une fraction de prolifération de la tumeur [Figarella-Branger et al., 2010a].

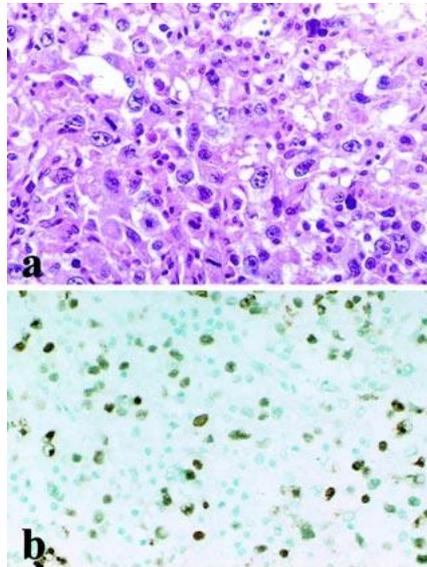


FIGURE 1.14 – Coloration H&E a), et MIB-1 b) d'un échantillon de gliome [Umeoka et al., 2001].

1.3 Prise en charge/traitement du glioblastome

Lorsque le diagnostic de la tumeur cérébrale est confirmé, le traitement du patient doit être déterminé. Dans un premier temps, une opération de résection tumorale est programmée. Elle ne peut avoir lieu que si le patient est en bonne condition pour la supporter. Elle dépend également de l'accessibilité de la tumeur dans le cerveau. Enfin, aucune zone fonctionnelle importante ne doit être mise en danger. Ce traitement chirurgical a pour avantage de soulager le patient de certains de ses symptômes, souvent liés à la compression des tissus cérébraux par la masse tumorale. En France, la majorité des glioblastomes sont opérés : 56 %, contre 44 % de glioblastomes uniquement biopsiés. Pourtant, la résection est préconisée dans tous les cas où elle est possible [Menei and Metellus, 2010]. Plusieurs études ont montré l'intérêt de l'exérèse [Stupp et al., 2005; Filippini et al., 2008], la durée moyenne de survie étant de 15,8, contre 9,4 mois en l'absence d'opération. Toutefois, cette constatation n'est observée que dans le cas où la résection est suivie d'une radiochimiothérapie. Se pose alors la question de la qualité de l'exérèse. Pour maximiser le temps précédant l'apparition de récurrences, il est crucial de retirer le plus de tissu tumoral possible, et de minimiser ainsi le nombre de cellules tumorales restantes. Pour ce faire, le chirurgien doit être capable de différencier parfaitement le tissu sain du tissu tumoral. Plusieurs techniques sont en cours de développement afin

d'apporter une aide per-opératoire au neurochirurgien.

Cette opération est suivie d'un traitement complémentaire destiné à éliminer les cellules tumorales résiduelles. Les techniques utilisées sont la radiothérapie et/ou la chimiothérapie. Cette prise en charge cible les cellules tumorales suivant différentes voies.

1.3.1 Imageries pour l'exérèse

Lors des opérations de résection « classique », le neurochirurgien utilise sa connaissance des tissus cérébraux ainsi que les images préopératoires pour accéder à la tumeur puis pour la retirer. Le caractère infiltrant des glioblastomes rend l'exérèse de la totalité des cellules tumorales impossible. Cependant, l'opération vise à les retirer de la manière la plus complète possible. L'intérêt d'assister le chirurgien se fait ressentir. De nombreuses méthodes sont en cours de développement pour répondre à ce besoin. La plupart en sont à une étape préclinique. Certaines d'entre elles sont passées en étude clinique de phase II ou III. Une première approche a été de miniaturiser ou d'adapter les techniques d'imagerie classique, comme l'IRM pour les utiliser en bloc opératoire. La nécessité de nouvelles méthodes d'imagerie, en temps réel et compactes, a été constatée. En réponse à cette problématique, de nombreuses techniques d'imagerie optique sont développées.

La qualité du geste chirurgical est évaluée grâce à une IRM postopératoire dite « précoce », car elle doit avoir lieu dans les 48 heures suivant l'opération de résection. La quantité de cellules tumorales restantes est appréhendée par la prise de contraste dans les bords de la tumeur. Lorsqu'aucun contraste n'est observé, la résection est alors qualifiée de « totale » [Menei and Metellus, 2010]. Pourtant, l'IRM ne permet pas de détecter les berges infiltrées de la tumeur. L'absence de contraste dans l'image IRM ne garantit donc pas d'une résection complète au sens histologique.

1.3.1.1 Aide à la détection per-opératoire : la neuronavigation

Plus qu'une méthode de détection de tumeurs, la neuronavigation est destinée à guider le geste du chirurgien grâce à une image IRM ou scanner prise avant l'opération. Elle nécessite des repères parqués sur le patient qui soient visible sur l'imagerie préopératoire. Ces repères permettront de recalibrer l'image diagnostique lors de l'opération chirurgicale. Ils sont repérés par une caméra infrarouge. Celle-ci détecte également les outils chirurgicaux. De cette manière, le système de neuronavigation peut indiquer au chirurgien où ses outils se trouvent dans l'image 3D du cerveau du patient. Le médecin obtient ainsi une information sur le positionnement de ses outils par rapport à la localisation de la tumeur. Si une IRM fonctionnelle a été faite, le chirurgien peut ainsi vérifier que le tissu tumoral qu'il retire ne risque pas, à priori, de créer de lésions majeures au patient.

La principale limite de la méthode de neuronavigation lors d'une opération de résection d'une tumeur cérébrale est liée à l'affaissement des tissus cérébraux qui sont très mous. Au cours de l'opération il devient alors probable que les images

prises avant l'opération ne soient plus valables. Pour contrer cette difficulté, il est donc possible de coupler cette technique avec une prise d'image pendant l'opération, une IRM per-opérateur [Nimsky et al., 2006], par exemple. Cela permet de mettre à jour l'image comparative et donc de corriger au possible l'erreur due au déplacement des tissus.

1.3.1.2 Méthodes per-opératoires non optiques

Plusieurs techniques diagnostiques pré-opératoires ont été miniaturisées afin de permettre leur utilisation en bloc opératoire et ainsi aider le chirurgien à parfaire sa résection des tumeurs cérébrales. Les méthodes optiques dédiées à cette problématique sont pour la plupart encore en développement et seront abordées dans le chapitre suivant.

IRM per-opérateur L'IRM ayant déjà été expliqué dans le paragraphe 1.2.1.1, son principe ne va pas être détaillé à nouveau. Dans ce cas, le terme d'IRM per-opérateur fait référence à deux méthodes particulières. La première consiste à interrompre l'opération, déplacer le patient dans la salle d'examen IRM puis le ramener au bloc afin de compléter la résection si nécessaire. La seconde possibilité est reliée à l'utilisation d'un imageur IRM adapté au bloc opératoire. Dans ce cas, il existe plusieurs dispositifs. L'IRM peut être « ouverte » et donc permettre au chirurgien d'opérer entre les deux aimants, ou bien être placée sous la table du bloc opératoire. Dans tous les cas, une IRM bas-champ, soit inférieur à 1 T, est nécessaire. Ce choix impose un inconvénient : la résolution d'une IRM bas-champ est inférieure à celle d'une IRM haut champ. De plus, il n'est pas possible de faire une imagerie de perfusion avec une IRM bas-champ. Ceci dit, l'IRM per-opérateur à haut-champ permet d'augmenter le taux de résection totale : 29 % contre 15 % sans IRM [Nimsky et al., 2006]. Dans le cas de l'IRM per-opérateur bas-champ, une étude a montré qu'elle permet de diminuer le volume tumoral résiduel. Sans imagerie, le chirurgien arrête l'opération, laissant 30 % de tissu tumoral. Grâce à l'IRM, ce taux diminue et passe à 15 % [Schneider et al., 2005].

Comme cela est mentionné dans le paragraphe ci-dessous, une IRM per-opérateur permet de corriger le décalage des tissus et ainsi de recalibrer les images pré-opératoire. Elle permet également de quantifier et de visualiser le tissu tumoral résiduel. La résection est donc améliorée par l'utilisation de cette méthode. Les limites de l'IRM sont dues à la difficulté d'interpréter un rehaussement de signal. Celui-ci peut-être dû à la présence de tissu tumoral ou bien à une inflammation. De plus, le tissu infiltré par le glioblastome n'est pas clairement identifiable.

Les propriétés alléchantes de cette technique d'imagerie : une bonne résolution spatiale, la méthode d'imagerie pré-opératoire de référence, etc. en font une méthode qui pourrait s'imposer comme standard dans le monde de l'imagerie per-opérateur. Néanmoins, de nombreux inconvénients viennent ternir ce futur prometteur. Le coût de ces dispositifs est assez élevé, en particulier pour les appareils haut-champ qui

demandent un investissement de 3 à 5 millions d’euros contre 1 million d’euros pour un système bas-champ. De plus, le bloc opératoire doit être considérablement modifié pour pouvoir accueillir ces dispositifs volumineux, parfois placés dans une chambre concomitante avec une table d’opération amovible. Dans le cas d’IRM « ouvertes », le chirurgien doit travailler avec des outils amagnétiques, ce qui suppose également un investissement supplémentaire. Ceci sans compter l’inconfort d’opérer entre deux aimants ou le risque de déplacer la table supportant le patient, retardant une intervention en cas d’hémorragie, par exemple. Tous ces désagréments limitent l’utilisation de l’IRM dans le bloc opératoire.

Échographie per-opératoire L’échographie est une technique d’imagerie principalement utilisée en obstétrique. Cette technique se base sur l’envoi et la détection d’ondes ultrasonores, dont les fréquences sont comprises entre 2 et 20 MHz .

Lors d’opérations de résection tumorales, l’utilisation des sondes échographiques a également fait son apparition. De manière similaire à l’IRM per-opératoire, ce type d’imagerie permet entre-autres de corriger le décalage des tissus cérébraux [Lindner et al., 2005]. Elle fournit également au chirurgien une information sur l’étendue de la résection. De ce fait, le taux de résections « totales » est augmenté [Lindner et al., 2005]. L’imagerie ultrasonore présente l’avantage d’être moins coûteuse que l’IRM [Namba et al., 2006]. Cependant, la capacité des imageurs échographiques à discriminer le tissu infiltré du tissu sain est limitée [Lindner et al., 2005; Selbekk et al., 2010].

Techniques de détections radioisotopiques per-opératoires Les méthodes d’imagerie radio-isotopique, comme nous l’avons déjà vu dans la partie 1.2.1.3, nécessitent l’utilisation d’un traceur radioactif émettant des particules, comme les photons γ ou les positons.

En ce qui concerne les techniques d’exérèse radioguidée, elles sont utilisées lors de divers traitements chirurgicaux de cancers, comme le cancer du sein, des poumons, de la peau, ... Dans le cas de tumeurs cérébrales, les exemples sont moins courants. La plupart des études publiées sur le sujet utilisent des sondes, dites compteurs gamma, qui ne donnent qu’une information sur le taux de comptage de photons γ détectés [Bhanot et al., 2007; Kojima et al., 2004]. Un paramètre primordial est la fixation spécifique du radiotracer dans les tissus, pour avoir un rapport signal-sur-bruit acceptable et pour éviter les faux positifs. De plus, l’utilisation de la radioactivité en bloc oblige à surveiller la dose de radioactivité reçue par le personnel soignant afin d’éviter toute complication.

Le projet TRIOP apporte une originalité dans ce champ d’action. En effet, la sonde développée détecte non pas les photons γ , mais directement les positons émis par le radio-traceur. De plus, elle ne se contente pas de compter les particules détectées en un seul point, mais apporte une information sur plusieurs points différents qui précise l’information sur la localisation de la tumeur. Cet aspect sera plus explicité dans la partie 1.4.

1.3.1.3 Méthodes per-opérateur optiques

Les principes de ces techniques sont explicités dans la partie « Approche diagnostique-Imagerie optique » de ce chapitre. Ces méthodes sont illustrées par des exemples dans cette partie.

Imagerie infrarouge La tomographie de cohérence optique, déjà décrite dans la partie 1.2.2.1, est une méthode qui mesure la réflexion d'un rayonnement IR par le tissu. Son utilisation est majoritairement diagnostique. Néanmoins, des études récentes tentent d'adapter ces techniques à la détection du glioblastome, en particulier le cortex infiltré [Boppert, 2003; Böhringer et al., 2009]. Le tissu infiltré présente un changement de microstructure ainsi qu'une diminution de l'intensité du signal, comme présenté sur la figure 1.3.1.3. Ces mesures se limitent pour l'instant à des études ex-vivo sur échantillons humains. Mais le dispositif d'interférométrie pourrait être intégré à un microscope per-opérateur. La résolution de ce type de système, de l'ordre de $15 \mu\text{m}$, est plus petite que la résolution de l'IRM.

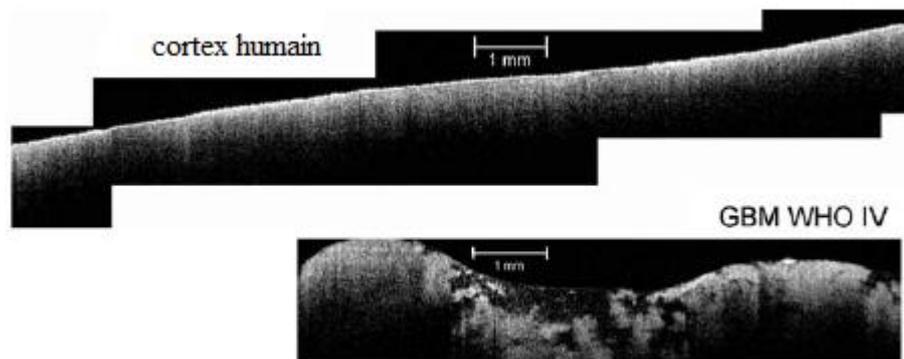


FIGURE 1.15 – Scans *ex vivo* OCT d'échantillons de cortex humain normal et de glioblastome grade IV [Böhringer et al., 2009]

Imagerie de fluorescence Les imageurs de fluorescence utilisés lors des opérations doivent respecter le critère de compacité. Ces systèmes de mesure sont souvent constitué de fibres optiques particulièrement adaptées pour former un endoscope et produire une image. À titre représentatif, nous pouvons citer les imageurs endoscopiques liés aux cancers de l'estomac [Filip et al., 2011] ou des ovaires [Zhong et al., 2009]. Pour les opérations de tumeurs cérébrales, des endoscopes peuvent également être utilisés, dans le cas d'utilisation d'un précurseur de fluorescence [Potapov A.A. ; Usachev D.J. ; Loshakov, 2008] ou pour la fluorescence endogène [Sun et al., 2010]. Dans certains cas, les fibres optiques utilisées dans les endoscopes sont très fines et permettent une très bonne résolution, proche de la microscopie [Sun et al., 2010].

Les imageurs fibrés consistent en une à plusieurs fibres optiques mesurant la fluorescence des tissus et parfois la réflectance diffuse. Les exemples présentés dans

ce paragraphe ont été utilisés sur des tissus cérébraux humain ou de modèle animal (rat). Un système classique se compose d'une fibre qui transporte la lumière d'une source laser vers le tissu et un ensemble de fibres qui collectent le signal lumineux ré-émis qui est analysé par un spectromètre ou un système de comptage de photons (photomultiplicateur ou photodiode). Le groupe de Laura Marcu a fait le choix d'une sonde comportant une fibre d'excitation centrale de $600\ \mu\text{m}$ de diamètre, entourée de 18 fibres de $200\ \mu\text{m}$ de diamètre [Marcu et al., 2004]. Nous trouvons un autre exemple chez [Chung et al., 1997] qui utilisent des fibres de $300\ \mu\text{m}$ de cœur avec une fibre centrale excitatrice et 6 fibres collectrices. Le groupe de Mahadevan-Jansen mesure la fluorescence et la réflectance diffuse, sur un total de 7 fibres de $300\ \mu\text{m}$ de diamètre de cœur, deux d'entre-elles, placées sur le contour, délivres de la lumière blanche ou une excitation laser pulsée à $337\ \text{nm}$ [Lin et al., 2000]. Dans ce cas, les fibres en périphérie sont polies en biseau. Diverses informations intéressantes sur le tissu étudié peuvent être fournies par l'intensité lumineuse, le temps de vie ou encore la forme du spectre de fluorescence.

Autofluorescence Cette méthode sera détaillée dans la partie suivante 1.4.1

Fluorophores exogènes Comme tout traceur, un marqueur optique doit présenter un fort contraste par rapport au signal ambiant. Deux caractéristiques sont essentielles afin de décrire la détectabilité d'un fluorophore exogène. D'une part, il faut considérer sa spécificité. Le traceur auquel est lié le fluorophore, doit se fixer préférentiellement dans la tumeur ou, plus généralement, dans la structure à identifier. D'autre part, le rendement de fluorescence du marqueur doit lui permettre de se distinguer du bruit de fond, principalement imputable à l'autofluorescence.

Les traceurs se fixent à la tumeur suivant un principe identique à l'immunohistochimie. Quelques exemples sont présentés sur le tableau 1.3. Les traceurs doivent par exemple être capables de relever la présence (ou l'absence) de certaines molécules caractéristiques des cellules ou du tissu tumoral. Une équipe a marqué du glucose avec un fluorophore infra-rouge commercial (IRDye800CW), cette technique a permis d'imager le métabolisme cellulaire, de manière analogue aux techniques radioactives [Zhou et al., 2009]. Les marqueurs fluorescents non spécifiques sont également utilisés. Ils peuvent être, par exemple, le vert d'indocyanine (ICG) ou le bleu de méthylène (MB) [Davis et al., 2008; Wang et al., 2010b]. Ils sont injectés en intraveineuse et permettent de détecter l'angiogenèse et/ou la rupture de la barrière hématoencéphalique.

L'intervalle proche-infrarouge présente une faible émission d'autofluorescence. Les marqueurs fluorescents émettant dans cette gamme de longueur d'onde sont plus facilement détectés. Le spectre de fluorescence mesuré est peu influencé par le signal fluorescent du milieu lui-même et est donc dominé par l'émission de fluorescence due au marqueur.

Marqueur	Molécule tracée	Référence
Cy5.5	Herceptine, facteur de croissance (HER2/neu)	[Montet et al., 2005]
	IGFPB, vaisseaux sanguin des GBM	[Iqbal et al., 2010]
ICG	EPR, vascularisation tumorale	[Davis et al., 2008]
FITC	Tenascin, présence spécifique dans les tumeurs	[Zenzinger et al., 2000]

TABLE 1.3 – Exemples d’associations traceur/marqueur exogène.

Précurseurs de fluorescence endogène Dans ce cas, l’acide aminolévulinique (5-ALA) est administré dans la tumeur afin d’induire temporairement l’accumulation d’un photosensibilisateur fluorescent endogène, la protoporphyrine IX (*PpIX*). Cette accumulation s’effectue préférentiellement dans les cellules tumorales. En conséquence, il existe un contraste marqué entre zone saine et tumorale, ce qui permet une bonne sensibilité de détection. Cette technique présente un intérêt car il est possible d’observer visuellement l’émission de fluorescence des *PpIX* lorsque le tissu est éclairé par une lumière émettant dans l’UV-visible, comme illustré sur l’image 1.3.1.3. Cette technique permet d’améliorer la résection tumorale dans le cas des glioblastomes. Une étude multicentrique a montré que le taux de résection tumorale totale défini grâce à l’IRM post-opératoire est de 65 % par rapport à 36 % lors d’une chirurgie conventionnelle [Stummer et al., 2006]. Cette conclusion a été validée par une autre étude monocentrique [Hefti et al., 2008].

Les limitations de cette méthode sont liées à l’appréciation du chirurgien de la lumière émise due à la non homogénéité de l’émission des *PpIX* ainsi que l’hétérogénéité du glioblastome. La protoporphyrine IX présente un fort pouvoir de photoblanchiment, ce qui gêne la résection totale, puisqu’il y a perte du signal fluorescent. Une étude a démontré qu’une excitation continue de 2,5 secondes, suivie d’un intervalle sans lumière permet de diminuer ce phénomène [N. Haj-Hosseini et al., 2009].

1.3.2 Traitement adjuvant/complémentaire

L’exérèse seule ne suffit pas à « guérir » le patient. Du tissu tumoral peut avoir échappé au chirurgien lors de l’opération, et le caractère infiltrant du glioblastome rend l’exérèse totale, soit de toutes les cellules tumorales, quasi-impossible. Les cellules infiltrantes, détachées de la composante solide, sont isolées et ne peuvent pas être détectées in-vivo à ce jour avec les techniques existantes. Il est donc nécessaire de traiter le patient pour éliminer au moins en partie ces cellules et retarder ainsi la récurrence tumorale. Les traitements appliqués en routine comprennent la radiothérapie et/ou la chimiothérapie. Certaines nouvelles méthodes font leur apparition, mettant à profit les caractéristiques lumineuses, comme la photothérapie dynamique. Ces traitements sont, en grande partie, encore à l’étude.

Toutes ces thérapies peuvent être appliquées soit « en local », c’est-à-dire à la fin de l’opération de résection tumorale, soit en postopératoire. De nombreuses études

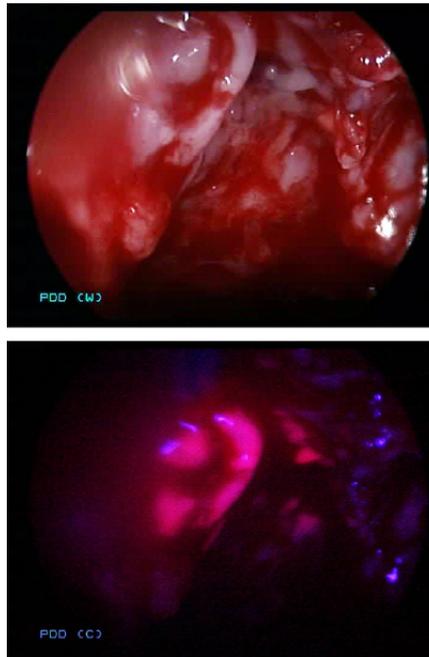


FIGURE 1.16 – Image endoscopique de tumeur cérébrale avec injection préalable d’Ala, sous lumière blanche (en haut) et excitation UV (en bas) [Potapov A.A. ; Usachev D.J. ; Loshakov, 2008]

s’attachent à déterminer le moment le plus opportun pour administrer les différents traitements.

1.3.2.1 La radiothérapie

La radiothérapie utilise un rayonnement de photons de haute énergie (entre 6 et 25 MeV). Ces rayons sont envoyés dans la tumeur pour casser l’ADN des cellules dans le but de causer la mort de celles-ci. Ce phénomène peut évidemment intervenir dans toute cellule, saine ou tumorale. Une dose maximale, soit le dépôt d’énergie maximum toléré dans les tissus, est définie à 60 Gy pour les tissus cérébraux. Le dépôt de cette dose est fractionné en plusieurs séances de radiothérapie. Le glioblastome est une des tumeurs les plus radio-résistantes. Cela nécessite donc un rapport de dose très favorable dans la tumeur par rapport aux tissus sains pour préserver ces derniers.

Il faut alors s’arranger pour limiter le passage des rayonnements dans les tissus sains. Au lieu d’utiliser une seule direction, plusieurs faisceaux de photons sont envoyés à des angles différents de telle manière à ce qu’ils se croisent à l’endroit de la tumeur.

Ce traitement peut également s’appliquer « en local », soit en envoyant un faisceau de photons énergiques, soit en insérant un matériel radioactif dans la cavité

tumorale, cela s'appelle la curiethérapie [Bondiau et al., 2010]. Ces méthodes permettent de protéger les tissus environnant, car la dose est réduite et appliquée directement sur le tissu tumoral. Des études se sont intéressées à un potentiel avantage de survie pour des patients traités par ces méthodes, comparativement à la radiothérapie « classique ». Aucun bénéfice n'a été démontré à ce jour [R.G. Selker, 2002].

1.3.2.2 La chimiothérapie

Lorsqu'un médicament destiné à éradiquer des cellules tumorales est administré à un patient, il s'agit d'une chimiothérapie. Il existe plusieurs classes de médicaments utilisées dans ce cas, les deux principaux étant :

- des **anti-angiogéniques**, empêchant les cellules tumorales de former de nouveaux vaisseaux sanguins
- des **agents alkylants**, entravant la multiplication des cellules

Dans le cas du glioblastome, c'est un médicament du second type qui est le plus couramment administré. Plus précisément, depuis 2005, le médicament employé contient une molécule appelée témozolomide, commercialisée sous le nom de Témodal®. Il a été démontré que, pris en même temps que les séances de radiothérapie, l'effet de ces deux traitements était amélioré [Bondiau et al., 2010]. Cette substance aurait la propriété de radio-sensibiliser les tumeurs. Le témozolomide utilisée simultanément avec la radiothérapie améliore la médiane de survie, passant de 12,1 mois pour un traitement uniquement radiothérapique à 14,6 mois [Chinot et al., 2010].

Aussi, la chimiothérapie peut être administrée « in situ ». Lors de l'opération, des systèmes de polymères biodégradables à libération prolongée sont placés dans la cavité tumorale.

1.3.2.3 La thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique (PDT) consiste à envoyer un faisceau lumineux sur la tumeur afin de provoquer un processus entraînant la mort des cellules cancéreuses, en utilisant un photosensibilisateur. Dans le cas de la PDT, l'énergie du rayonnement envoyé « in situ » est comprise dans le domaine visible ou proche infrarouge. Cette thérapie peut se faire directement après l'opération de résection tumorale, ou bien par l'insertion d'une fibre optique à travers le crâne, délivrant la lumière directement dans la tumeur.

La lumière seule ne suffit pas à éliminer les cellules tumorales. Il est nécessaire d'utiliser un composé chimique appelé photo-sensibilisateur, qui est excitée à une longueur d'onde spécifique. Il passe alors de son état singulet fondamental à un état singulet excité. À partir de cet état, le photo-sensibilisateur peut retourner dans son état fondamental en émettant de la lumière de fluorescence, par exemple, mais il peut également se retrouver dans un état triplet excité, par conversion intersystème. Depuis cet état triplet, si une molécule d'oxygène se trouve dans le champ proche du photo-sensibilisateur, il peut y avoir un transfert d'énergie vers l'oxygène. Ce

dernier se trouve donc dans son état excité, qui correspond à un état singulet, il est alors question d'un oxygène singulet. Ce composé est un puissant oxydant qui provoque une réaction chimique (oxydation) avec plusieurs molécules biologiques telles que le cholestérol des membranes cellulaires, des acides aminés et des acides nucléiques. La forte réactivité de l'oxygène singulet réduit son champ d'action (libre parcours moyen $\sim 0,02 \mu m$). L'oxygène singulet provoque donc sur son lieu de formation des dommages localisés dans la cellule, conduisant à sa mort via nécrose ou apoptose. Le produit s'accumule préférentiellement dans la tumeur, mais elle est également présente dans les cellules saines. La sélectivité de cette méthode est donc limitée [Reddi, 1997].

De manière similaire aux techniques d'imagerie de fluorescence, un photosensibilisateur ou un précurseur peuvent être administrés au patient. Une étude particulière utilisant le précurseur de proto-porphyrine IX (5-ALA) allié à un photosensibilisateur exogène (Photofrin) a montré l'augmentation de l'efficacité de la PDT, ainsi que la fluorescence de la proto-porphyrine. Les composés utilisés autorisent une double utilisation : une résection photo-guidée dans un premier temps, puis la photothérapie dynamique. Plusieurs PDT sont exécutées. Ce traitement prolonge la survie à 52,8 mois, par rapport à 24,6 mois sans PDT [Eljamel, 2008b,a, 2010].

1.4 Le projet TRIOP

Le projet TRIOP est développé au laboratoire IMNC depuis 2002 – 2003. Il se propose d'apporter une solution au chirurgien afin de l'assister lors des opérations de résection tumorale. Ce projet contient plusieurs originalités. D'une part il s'agit d'un instrument bimodal permettant une détection simultanée de la fluorescence des tissus, traité dans la présente thèse, et de positons. D'autre part, son couplage à l'outil de résection utilisé par le chirurgien en fait un instrument à visée pratique.

La présente partie consiste à replacer le sujet de cette thèse dans le contexte du projet TRIOP, plus ambitieux. Dans un premier temps des précisions sur la théorie liée à la méthode de mesure d'autofluorescence des tissus sera présenté. Ensuite, le projet en lui-même sera décrit plus en détails.

1.4.1 Principe de la fluorescence

Lorsqu'une onde électromagnétique interagit avec un atome, plusieurs phénomènes peuvent entrer en jeu. Le photon peut être dévié de sa trajectoire sans perte d'énergie, il est donc diffusé. Il peut également être absorbé avec ou sans ré-émission d'un photon d'énergie inférieure, par phénomène de fluorescence ou phosphorescence.

Un fluorophore se trouve naturellement dans un état énergétique d'équilibre appelé état fondamental. Lorsqu'un photon interagit avec cette molécule, il peut être absorbé par celle-ci. Cela se traduit par l'excitation du fluorophore qui se retrouve

alors dans un état énergétique dit excité. Ceci correspond plus précisément à un état électronique de la molécule. Comme illustré sur la figure 1.18, chaque état excité d'une molécule se divise en plusieurs niveaux vibrationnels excités, auxquels correspondent des énergies différentes. Cela explique que le fluorophore soit capable d'absorber plusieurs photons d'énergies, donc de longueurs d'onde, différentes. Dans un premier temps, après l'excitation, la molécule va retrouver le niveau vibrationnel le plus bas, relatif à l'état énergétique atteint. L'énergie diminue par le biais de phénomènes non radiatifs, comme la production de phonons. Puis, s'ensuit une émission de photons d'énergie inférieure à l'énergie d'excitation. Cela se traduit par une longueur d'onde d'émission supérieure à celle de l'absorption, ce décalage est appelé déplacement de Stokes, visible sur la figure 1.17.

Chaque fluorophore a des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres. La forme du spectre d'émission présente une symétrie-miroir par rapport à celle d'absorption [Lakowicz, 2006], illustré sur la figure 1.17. Ce phénomène nécessite une symétrie entre les niveaux vibrationnels sur les états excités et fondamentaux. Plusieurs exceptions à cette règle existent, par exemple pour des fluorophores dont l'état vibrationnel dépend du pH. La forme du spectre d'émission, quant à elle, reste inchangée quelle que soit la longueur d'onde d'absorption.

Le laps de temps écoulé entre l'absorption et l'émission d'un photon de fluorescence se définit par le temps de vie de fluorescence qui est de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-6} secondes. Il correspond au temps de vie moyen d'une molécule dans son état excité.

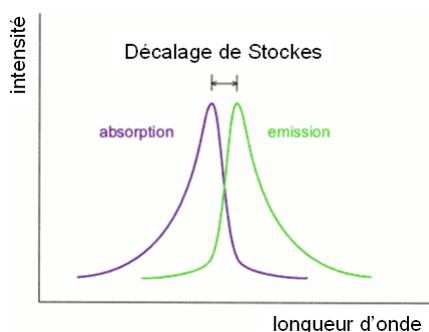


FIGURE 1.17 – Déplacement de Stokes entre les spectres d'émission et d'absorption.

Dans le cas de la fluorescence, les états énergétiques atteints sont qualifiés de « singulets » (S_0 pour le fondamental ; S_1, S_2, \dots pour les états excités). Ils correspondent à des transitions permises. Un phénomène radiatif similaire à la fluorescence est la phosphorescence. Seulement, dans ce cas, la molécule passe par un état excité dit « triplet », cette transition entre état singulet et triplet est dite interdite car il existe une faible probabilité qu'elle ait lieu. La molécule met alors beaucoup plus de temps à retrouver son état fondamental. Les temps de vie de phosphorescence sont typiquement compris entre 10^{-6} et 10^2 secondes.

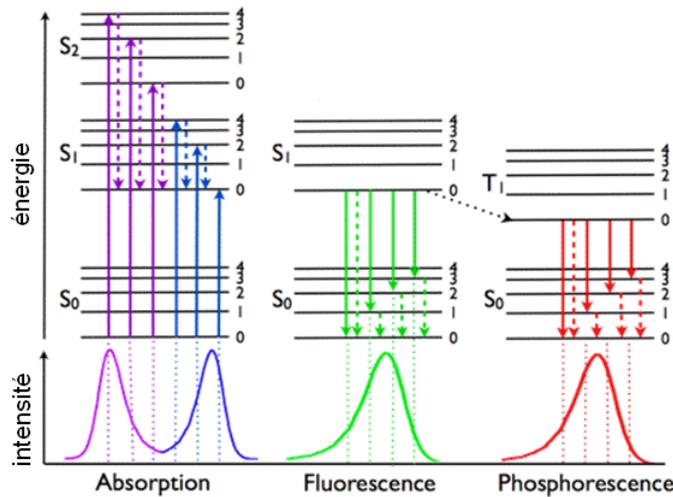


FIGURE 1.18 – Diagramme d'états énergétiques de Jablonski [Visser and Rolinski, 2010]

Fluorescence endogène Ce phénomène a déjà été introduit dans la partie 1.2.2.2. La plage des longueurs d'onde concernées par l'autofluorescence des tissus est comprise entre le proche UV et le visible, soit de 200 à 500 *nm* pour l'excitation et de 300 à 700 *nm* pour l'émission. Le nombre et le type de fluorophores endogènes sont connus, ceux-ci sont illustrés sur la figure 1.19. Les fluorophores endogènes peuvent être des protéines structurales, comme le collagène et l'élastine, des acides aminés, le tryptophane et la pyridoxine, des protéines ayant un rôle dans le cycle respiratoire, NADH et les flavines [Wagnières et al., 1998; Ramanujam, 2000]. Le tableau 1.4 récapitule brièvement les fluorophores retrouvés dans l'organisme, leurs longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission ainsi que leur fonction.

Suivant la longueur d'onde d'excitation choisie, les fluorophores excités ne seront pas les mêmes. En fonction de la pathologie et de l'organe ciblé, les longueurs d'onde d'intérêt peuvent différer. Dans le cas des tumeurs cérébrales, et plus particulièrement du glioblastome, plusieurs groupes d'étude ont fait des investigations afin de déterminer le ou les fluorophores permettant de fournir des informations potentiellement utiles dans la différenciation entre le tissu sain et le tissu tumoral, ceci étant évidemment conditionné par la longueur d'onde d'excitation utilisée. Dans ce cas, les longueurs d'onde d'excitations choisies varient entre 320 et 500 *nm* [Chung et al., 1997; Bottiroli et al., 1998; Croce et al., 2003; Pascu et al., 2009]. Les conclusions de ces groupes ne sont pas équivalentes. Certains orientent leur choix vers le maximum d'excitation des NADH [Croce et al., 2003; Marcu et al., 2004], soient des longueurs d'onde autour de 340 *nm*. D'autres préfèrent exciter majoritairement des fluorophores comme les flavines, avec des longueurs d'onde supérieures à 350 *nm* [Saraswathy et al., 2009; Pascu et al., 2009]. Une comparaison complète des études menées est complexe, car les paramètres, comme la nature des échantillons, les molécules

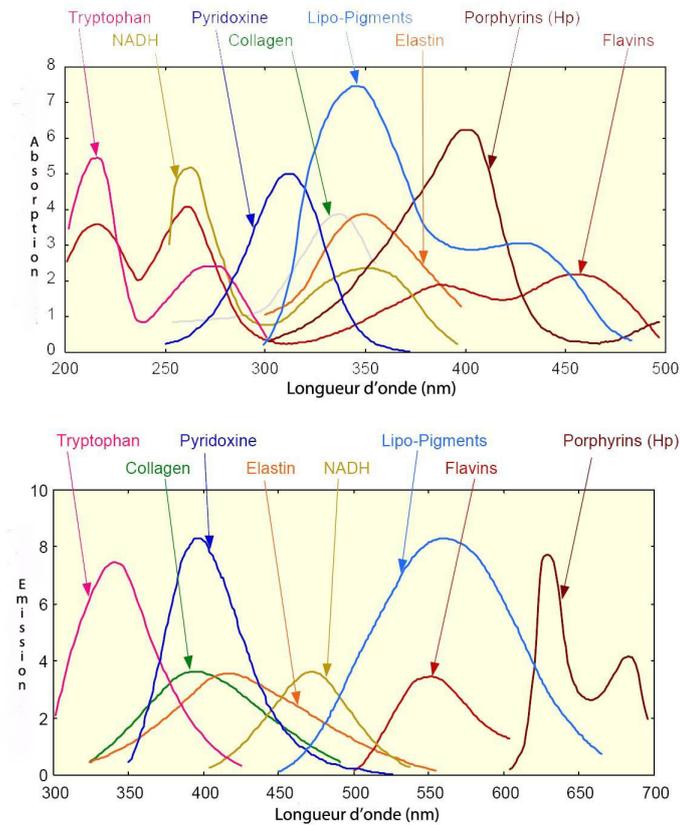


FIGURE 1.19 – Spectres d'absorption et émission des fluorophores endogènes.

étudiées, les paramètres d'intérêts (intensité maximale, intégrale, rapports d'intensités), le dispositif de mesures, sont très différents suivant les groupes. Un choix précis des méthodes ou molécules à privilégier reste difficile. Le tableau 1.5 récapitule les différentes études menées, les méthodes associées ainsi que les conclusions tirées.

Fluorophore	λ_{exc}	λ_{exc}	Type	Fonction
Tryptophane	275	350	Acide aminé	Précurseur de certaines protéines (sérotonine)
Collagène	335	390	Protéine fibreuse	Résistance mécanique des tissus
Élastine	360	410	Protéine fibreuse	Élasticité des tissus
NADH	260/340	450	Protéine	Rôle dans la production de l'énergie cellulaire (ATP)
Lipopigment	350	570	Groupe de dérivés de lipides	Déchet lipidique
Porphyrine	400	620	Molécule cyclique	Implication dans le transport de l'oxygène
Flavine	450	520	Famille de protéine	Rôle dans la production de l'énergie cellulaire (ATP)

TABLE 1.4 – Récapitulatif des fluorophores endogènes et leurs propriétés

Référence	λ_{exc} utilisée(s)	Échantillons	λ_{exc} optimale
[Chung et al., 1997]	de 360 à 630 nm	Rat in vivo (gliosarcome) Humains ex vivo, "frais"	3 $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ d'intérêt : 360/470, 440/520, 490/630
[Bottiroli et al., 1998]	366 et 405 nm	Humains ex vivo, congelés (GBM) Humains in vivo (GBM)	Propose $\lambda_{exc} = 405$ nm
[Croce et al., 2003]	366 et 405 nm	Humains ex vivo, congelés (GBM)	Propose $\lambda_{exc} = 366$ nm
[Saraswathy et al., 2009]	320, 370, 420 et 470 nm	Humains ex vivo, frais	λ_{exc} optimales : 410 et 470 nm
[Pascu et al., 2009]	337, 370 et 410 nm	Humains ex vivo, frais	Propose 337 nm , si analyse des intégrales Propose 410 nm, si analyse de rapports d'intensité
[Lin et al., 2000]	de 337 à 850 nm	Humains ex vivo, congelés	Fluorescence $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 337/460 nm et Réflectance à 460 et 625 nm

TABLE 1.5 – Tableau récapitulatif d'étude de la λ_{exc} optimale pour la mesure spectrale d'autofluorescence

L'émission de fluorescence se caractérise par plusieurs paramètres : son intensité, sa distribution spectrale, son temps de vie et son anisotropie. L'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde peut se mesurer avec un spectromètre. Cela permet de déduire le spectre d'émission des fluorophores. Pour la mesure de temps de vie de fluorescence, une excitation pulsée est nécessaire. Le premier photon atteignant le détecteur après un pulse est détecté et le temps entre les deux signaux, excitation et détection, est enregistré. Un histogramme des temps mesurés se présente sous forme d'exponentielle décroissante et permet de retrouver le temps de vie τ .

- Chaque fluorophore possède des propriétés qui vont influencer sur ces paramètres :
- le coefficient d'extinction molaire ε : il traduit la capacité d'un fluorophore à absorber la lumière excitatrice en fonction de sa longueur d'onde.
 - le rendement quantique ϕ : la molécule excitée peut rejoindre son état fondamental par des procédés non radiatifs. Le rapport entre le nombre de photon émis par rapport au nombre de photons absorbés, appelé rendement quantique de fluorescence, est donc inférieur ou égal à un.

L'autofluorescence mesurée varie en fonction de la nature, de la concentration relative, de la distribution spatiale et du micro- et macro-environnement du fluorophore. Dans les tissus, ceci est d'avantage compliqué par la présence de plusieurs fluorophores qui absorbent et émettent dans des plages de longueurs d'onde similaires. Nous l'avons déjà noté dans les parties précédentes, la concentration de NADH peut être altérée par des mutations génétiques, comme celle du gène IDH1 par exemple. La forme et la concentration des cellules changent dans une tumeur, influant sur le micro-environnement. Les paramètres d'absorption et de diffusion du tissu influent également sur la réponse de fluorescence. Par exemple, l'augmentation de la vascularisation entraîne une augmentation de l'absorption globale du tissu, puisque celui-ci contient plus d'hémoglobine, un des principaux absorbeurs. Autant de modifications pathologiques qui vont donc influencer sur le signal autofluorescent.

Devant la multiplicité des fluorophores, la spécificité de la réponse d'un seul paramètre de fluorescence en tant qu'indicateur d'un tissu pathologique est souvent limitée. Plusieurs groupes ont alors défini non pas un mais plusieurs indicateurs permettant de différencier la tumeur et sa partie infiltrée par rapport au tissu sain l'environnant. Certains groupes allient donc intensité et temps de vie de fluorescence [Marcu et al., 2004]. Une autre modalité développée utilise l'intensité de fluorescence alliée à la mesure de réflectance diffuse [Lin et al., 2001]. D'autres encore proposent d'utiliser plusieurs couples de longueurs d'onde $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ [Chung et al., 1997] se basant ainsi sur plusieurs fluorophores endogènes.

1.4.2 Les deux sondes TRIOP

Le projet TRIOP comporte deux modalités de détections. Jusqu'à présent, chacune de ces méthodes a évolué de manière indépendante. Le mode de détection de radio-isotopes : TRIOP-R a été initié en premier. Depuis 2003, deux thèses [Bonzom, 2006; Bogalhas, 2009] se sont enchaînées sur le développement de la sonde ainsi que

sa caractérisation. La partie optique, TRIOP-AF, a débuté en 2005 avec la thèse de Minh Hong Vu-Thi [Vu-Thi, 2008]. La présente thèse est donc la seconde dédiée à cette thématique. Les deux sous-projets sont à des stades d'avancement différents.

1.4.2.1 Modalité radio-isotopique : TRIOP-R

La sonde TRIOP-R est composée de fibres scintillantes de 1,5 mm de diamètre, organisées en cercle, comme cela peut se voir sur la figure 1.20. Il existe deux têtes de détections : une petite, dédiée à un test sur primate à gauche sur la figure 1.20, et une grande, envisagée pour les études per-opératoires chez l'homme, à droite sur la figure 1.20. Le trou central permet à la sonde d'accueillir l'aspirateur ultrasonore, en vert sur la figure 1.21, outil utilisé habituellement par le chirurgien pour l'exérèse de tissus. Ce couplage, à visée pratique, autorise une détection et une résection du tissu par un seul et même geste.

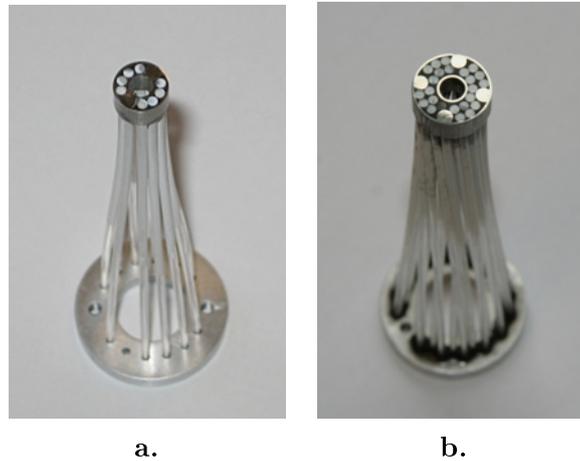


FIGURE 1.20 – Têtes de détection TRIOP-R dédiées au primate, **a.** et à l'homme, **b.**



FIGURE 1.21 – Sonde TRIOP-R fixée sur l'aspirateur ultrasonore (en vert).

Chaque fibre donne une information ponctuelle. Elle permet de localiser les particules β^+ émises par le radiotraceur en transformant leur énergie en énergie lumineuse, acheminée au détecteur par un guide de lumière. Les photons émis sont comptés par un PMMA (PhotoMultiplicateur Multi-Anodes). Nous avons déjà vu que les positons sont des particules qui traversent les tissus sur une distance moyenne de 1 mm avant de s'annihiler avec un électron et de créer deux photons γ de directions opposées et d'énergie identique (511 keV). Ces particules γ peuvent également être détectées par les fibres scintillantes utilisées. Il est donc nécessaire de déduire le bruit de fond, dû à la participation de ces particules au signal. Pour ce faire, certaines fibres sont couvertes d'aluminium, garantissant une détection unique des photons γ , elles sont visibles sur la figure 1.20 b.. Cette méthode permet une réjection du bruit de fond de 99,6 %.

Les caractéristiques de cette sonde ont été démontrées grâce à des tests sur fantômes-gels radioactifs. L'efficacité de détection de la grande tête de détection est de 72,8 % et sa sensibilité s'élève à 92 cps/ μ Ci/ml. Après évaluation sur fantôme-gel, la sonde semble permettre, pour une durée d'acquisition de 4 s, de détecter des inclusions tumorales de 5 mm de diamètre.

Une exérèse tumorale a été tentée sur un modèle primate. Si la validité de l'approche a pu être montrée, certaines limites ont été constatées. En effet, la tête de détection est plutôt encombrante et son guide de lumière trop peu maniable. À la lumière de ces constatations, une réorientation de la méthode de détection a été proposée. Profitant de l'évolution des Silicium PhotoMultiplier (SiPM), photodétecteurs de très petite taille, la suppression du guide de lumière peut être envisagée. Grâce à l'intégration de cette nouvelle technologie, la maniabilité de la sonde peut être considérablement augmentée. Ce type de détecteurs, d'un principe identique à celui des photodiodes par avalanches, permet une meilleure efficacité de détection et donc une surface de détection plus faible. De plus, les espaces morts présents dans la configuration utilisant des fibres pourront être diminués. Aussi, le trou central, destiné à accueillir l'aspirateur ultrasonore, complique la lecture des résultats. En effet, la source de radioactivité, soit la tumeur, doit se trouver à l'emplacement du trou pour pouvoir être retirée. Une solution envisagée pourrait être le couplage à un système de neuronavigation.

1.4.2.2 Modalité autofluorescence : TRIOP-AF

Pour prendre en compte dès le début une future fusion des deux modalités sur un même et unique instrument, le concept de la détection de fluorescence de notre sonde se base également sur des fibres optiques. La lumière d'excitation est alors transmise au tissu par une (ou plusieurs) fibre(s) et la lumière de fluorescence émise par le tissu est aussi collectée par une (ou plusieurs) fibre(s). Cette approche sera aussi compatible avec une future utilisation des SiPM tel qu'elle est envisagé pour TRIOP-R.

Du côté TRIOP-AF, une sonde fibrée basique, composée de deux fibres dédiées chacune à l'excitation ou la collection, a été développée. Une géométrie optimale a

été sélectionnée, correspondant à une distance entre fibres de $600 \mu m$ et un angle d'inclinaison de 11° de la fibre de collection. Un protocole de fabrication de fantôme imitant les propriétés optiques des tissus est disponible, permettant ainsi l'évaluation des performances de détection de cette sonde.

Les longueurs d'onde d'excitation sur lesquelles portent notre étude sont de 375 et 405 nm . Comme cela a été montré dans le paragraphe précédent, elles permettent d'observer les flavines, lipopigments, porphyrines et éventuellement les NADH. Un modèle animal, le rat, a été utilisé pour amorcer la caractérisation du signal fluorescent de tissus sains et tumoraux. Les matières blanches et grises sont identifiables grâce à leur signal fluorescent. Il a également été montré que les intensités absolues et relatives des signaux peuvent être considérées comme des indicateurs des zones tumorales. La fixation des tissus cérébraux extraits modifie l'intensité et la forme du signal fluorescent, provoquant une perte d'information sur des fluorophores d'intérêt, comme les lipopigments [Vu-Thi, 2008]. Il existe donc un intérêt certain à privilégier les mesures sur tissu frais.

1.4.3 Etat de l'art

Comme nous l'avons déjà mentionné, de nombreuses réponses sont proposées à la problématique de définition des zones tumorales cérébrales infiltrées dans le cas de résection de glioblastomes. Nous avons choisi de développer une solution utilisant la fluorescence endogène des tissus. Notre groupe n'est pas le seul à avoir orienté ses recherches dans cette voie. En effet, en particulier deux groupes américains ont commencé à travailler sur la même problématique de l'autofluorescence des tissus cérébraux dès le début des années 2000. Il s'agit des équipes encadrées par Laura Marcu (UCDavis, Davis, États-Unis) et Anita Mahadevan-Jansen (Vanderbilt University, Nashville, États-Unis). D'autres groupes, comme celui d'Anne Croce (Università de Pavia, Pavie, Italie) ou de Yo Gun Chung (Korea University, Seoul, Corée du Sud) ont également amorcé des études dans ce sens, mais dans leurs cas, aucune suite n'a été donnée depuis plusieurs années, selon notre connaissance. De nouvelles publications semblent indiquer un regain d'attention pour ce type de mesures, produites par des groupes en Inde [Saraswathy et al., 2009] et en Roumanie [Pascu et al., 2009]. Dans cette partie, les travaux des groupes de Laura Marcu et Anita Mahadevan-Jansen seront brièvement présentés, permettant ainsi de situer notre projet, TRIOP-AF par rapport à l'avancement de la recherche actuelle sur le sujet. Les travaux de Pascu et Saraswathy ne seront pas détaillés car les articles publiés concernent des travaux préliminaires n'illustrant pas de choix précis quant à la méthode finale utilisée.

1.4.3.1 Laura Marcu (UCDavis)

Les premières publications de ce groupe datent de 2002 [Marcu et al., 2002]. Dès le départ, leur choix s'est porté sur la mesure de temps de vie de fluorescence des tissus cérébraux. Ils ont porté leur intérêt sur les NADH en choisissant un

laser émettant à 337 nm , soit une longueur d'onde excitant les NADH de manière optimale.

Leur sonde est composée d'une large fibre excitatrice de $600\ \mu\text{m}$ de diamètre entourée d'un anneau de fibres collectrices de $200\ \mu\text{m}$ inclinées suivant un angle de 10° . Ils étudient le temps de vie sur un large intervalle de longueur d'onde, de 350 à 550 nm environ. Ces études sont effectuées uniquement sur des échantillons de cerveaux humains ex vivo, provenant de différents types de gliomes. L'analyse se fait après un temps élevé, soit d'une à 6 heures suivant l'excision. Deux pics sont identifiés à 390 et 460 nm , attribués respectivement à la pyrimidine et aux NADH. Les rapports entre les intensités de ces pics et temps de vie sont considérés comme des potentiels indicateurs tumoraux. Suite à une étude ex vivo sur des échantillons de glioblastomes humains, un espoir est fondé sur le temps de vie des régions tumorales, significativement supérieur à celui du tissu sain pour les deux fluorophores considérés, mais particulièrement pour la pyrimidine à 390 nm [Marcu et al., 2004].

Après un certain temps, de nouvelles publications ont vu le jour, fruit d'études cliniques in vivo chez l'homme. Le même système de mesure a été testé sur une vingtaine de patients atteint de gliomes de grades variables, lors de leur opération de résection. Les tumeurs ont été reclassées en deux catégories : les gliomes de bas grades (LGG), pour des grades I et II de la classification WHO et des gliomes de haut grades (HGG) pour les grades III et IV. Un nouvel indicateur potentiel est introduit, provenant du traitement statistique, soit les coefficients d'expansion de Laguerre (LEC). Une longueur d'onde d'intérêt est ajoutée : 440 nm . En conclusion de cette étude, les gliomes de bas grade sont identifiables par le dispositif utilisé, contrairement aux gliomes de haut grade dont la grande variabilité empêche une distinction catégorique [Butte et al., 2010].

Cette méthode prometteuse semble néanmoins limitée dans la discrimination des zones infiltrées du glioblastome. Une association de la technique à un nouvel outil, un endoscope de $600\ \mu\text{m}$ de diamètre comprenant 10 000 fibres, permet de faire une image en temps de vie et démontre un potentiel de discrimination supérieur. L'excitation est toujours de 337 nm et un filtre passe-bande de $460 \pm 25\text{ nm}$ a été utilisé. Le temps de vie mesuré, probablement des NADH, pour des tissus cancéreux in vivo est supérieur à celui des tissus sains, $1,65\text{ ns}$ pour le glioblastome contre $1,2$ à $1,5\text{ ns}$ [Sun et al., 2010]. La différence reste néanmoins faible et un plus grand nombre d'échantillons doit être étudié afin de valider la méthode.

1.4.3.2 Anita Mahadevan-Jansen (VanderBilt University)

Son travail sur l'identification des berges tumorales du glioblastome grâce à l'autofluorescence des tissus a débuté dans les années 2000. Dans un premier temps, une lampe et un laser sont utilisés pour couvrir un large spectre en excitation entre 337 et 850 nm . Deux types de mesures sont effectués en simultané : une étude spectroscopique ainsi qu'une étude en réflexion diffuse. Les fluorophores identifiés comme les plus représentatifs de la différence spectrale entre le tissu sain et le tissu tumoral sont les NADH avec une paire de longueur d'onde excitation/collection de $330/460\text{ nm}$.

La longueur d'onde présentant le plus d'intérêt pour la réflexion diffuse est identifiée à 625 nm. La combinaison de ces informations permet une discrimination entre tissu sain et tissu tumoral effective pour des échantillons humains extraits [Lin et al., 2000]. Une étude in vivo est menée ensuite et mène à des conclusions identiques [Lin et al., 2001].

Quelques années plus tard, le dispositif est testé en bloc opératoire sur 24 patients atteints de glioblastomes. Une attention particulière est accordée à mesurer le signal en plusieurs endroits de chaque tumeur et en particulier de définir des zones tumorales centrales, infiltrées et saines, grâce à une coloration histologique correspondante à chaque mesure. La méthode permet une discrimination de la partie centrale autant que des bords infiltrés [Toms et al., 2007].

1.5 Conclusion

Du diagnostic au traitement, l'identification du tissu tumoral est un point critique. Les méthodes de discrimination, qu'elles soient in vivo ou ex vivo, invasives ou non, sont la plupart du temps basées sur les connaissances biologiques des tumeurs. Elles ciblent les mécanismes caractéristiques de l'activité anormale des cellules tumorales. La néovascularisation, le potentiel de prolifération cellulaire et le métabolisme du glucose sont des propriétés souvent exploitées par les techniques d'imagerie. Le tableau 1.6 récapitule les méthodes d'imagerie utilisées ainsi que les mécanismes tumoraux illustrés par celles-ci. En ce qui concerne leur utilisation en bloc opératoire, certaines des méthodes existantes présentent des désavantages majeurs, notamment en termes de maniabilité, d'encombrement et de coûts. Malgré la grande variété de ces méthodes, des besoins comme la détection des zones tumorales en temps réel ou la détection de zones faiblement infiltrées restent sans réponse. Ceci laisse donc une place à des techniques adaptées à l'environnement du chirurgien et permettant une amélioration de la qualité de l'exérèse.

C'est dans ce cadre et plus particulièrement dans le cas du glioblastome que se place le développement de la sonde TRIOP-AF. Parmi les solutions possibles pouvant aider le chirurgien lors de l'exérèse, l'autofluorescence présente plusieurs intérêts. D'abord, un tel instrument est concevable de façon à ce qu'il soit peu encombrant, facile à manier et qu'il évite le contact entre ses composants sous tension et le patient. Il est donc particulièrement bien adapté à une utilisation en bloc opératoire, notamment en comparaison avec l'IRM per-opératoire. De plus, elle ne nécessite l'injection d'aucun composé destiné à marquer les cellules tumorales, ce qui peut être source de complications chez le patient. Enfin, un tel système est *a priori* assez facilement compatible avec d'autres modalités de détection, ce qui en fait un candidat intéressant pour un instrument multimodal comportant de bonnes performances de spécificité de détection.

Les mécanismes responsables de la variation de la fluorescence endogène d'un tissu sont complexes. Le signal fluorescent est conditionné par de nombreux paramètres : la longueur d'onde et la géométrie du système d'excitation, la concentration

Méthode d'imagerie	Spécification		Mécanisme tumoral imagé
IRM	sans produit de contraste		Composition en hydrogène
	avec produit de contraste		- Rupture de la BHE - Augmentation de la microvascularisation
TDM	sans produit de contraste		Atténuation des tissus
	avec produit de contraste		- Rupture de la BHE - Augmentation de la microvascularisation
TEMP	$^{99m}Tc - MIBI$		- Concentration de cellules - Rupture de la BHE
	$^{201}Tl - TlCl$		Vascularisation de la tumeur
TEP	$^{18}F - FDG$		Métabolisme du glucose
	$^{18}F - FET$		Synthèse protéique
	$^{11}C - MET$		Prolifération cellulaire
Fluorescence	endogène		- Microstructure des tissus - Modification du métabolisme cellulaire
	exogène	5ALA (PpIX)	Métabolisme de l'hème
		ICG	- Rupture de la BHE
		Fluorescéine	- Augmentation de la microvascularisation

TABLE 1.6 – Récapitulatif des méthodes d'imagerie utilisées ou étudiées en clinique

des espèces fluorescentes et leur localisation dans le tissu, la diffusion et l'absorption de la lumière (excitatrice et de fluorescence) par les tissus, le sang, etc. C'est pourquoi, l'utilisation de cette méthode nécessite une étude approfondie afin de définir le signal qui permet de distinguer le tissu sain du tissu tumoral.

Cette étude approfondie est composée de différentes étapes afin de converger vers un indicateur tumoral fiable. Le travail de thèse est focalisé sur cette question. La géométrie de la sonde conditionne les paramètres de détection comme la résolution spatiale et la profondeur de détection. Il est donc nécessaire de caractériser la sonde afin de définir ses capacités à détecter du tissu tumoral (taille, profondeur). Cette étude est facilitée par l'utilisation de fantômes optiques calibrés, imitant les propriétés des tissus cérébraux. Cette campagne de mesures est décrite dans le 2^e chapitre, ainsi que la fabrication et l'évaluation de fantômes optiques dédiés à ces mesures. Elles complètent la caractérisation de la sonde, initiée dans la précédente thèse. Dans le chapitre 3, un programme de simulation est présenté avec des modifications qui ont été apportées afin de représenter au plus près les paramètres de mesure de notre expérimentation et de permettre d'automatiser et systématiser les caractérisations de sondes à géométries variables, sans passer à chaque fois

par l'étape expérimentale. Une étape fondamentale à valider est la détermination d'un indicateur permettant la discrimination des tissus cérébraux tumoraux. Celui-ci peut mettre à profit des mesures spectrales, comme des rapports d'intensités, des intégrales, et/ou des mesures en temps de vie. Le fait de multiplier les indices tumoraux permet d'augmenter la robustesse de la détection. Cette définition peut être approchée par des mesures ex vivo sur un modèle animal, et sera discutée dans le 4e chapitre. Tous ces travaux se sont faits dans la suite logique de ce qui a été initié lors de la thèse précédente [Vu-Thi, 2008].

Dispositif de mesures : description et caractérisation

Science... never solves a problem without creating ten more.

George Bernard

Sommaire

2.1	Description du dispositif de mesures	53
2.1.1	Source lumineuse : le laser	54
2.1.2	Injection de la lumière laser	55
2.1.3	La sonde fibrée	56
2.1.4	Filtres	57
2.1.5	Détection : le spectromètre	59
2.2	Propagation de la lumière - Fantômes optiques	60
2.2.1	Indice de réfraction - gel	61
2.2.2	Coefficients liés à la diffusion – billes	62
2.2.3	Coefficient d'absorption - μ_a	65
2.2.4	Vérification des paramètres optiques	68
2.2.5	Construction des fantômes	73
2.3	Caractérisation de la détection de la sonde	75
2.3.1	Traitement des données, analyse générale	76
2.3.2	Profondeur effective	79
2.3.3	Fantômes bicouches : détectabilité	82
2.3.4	Fantômes à inclusions	86
2.4	Conclusion	90

2.1 Description du dispositif de mesures

Le dispositif de mesures mis en place dans le laboratoire et utilisé pour la globalité des mesures expérimentales de cette thèse est décrit dans ce chapitre. L'objectif

recherché a été la simplicité d'un montage bien conçu, capable de mesurer la fluorescence générée par les échantillons. Le montage se divise en deux fonctions, la première excitatrice, qui transmet la lumière source à l'échantillon, et l'autre collectrice, qui récupère la fluorescence émise par l'échantillon et la transmet au détecteur afin qu'elle soit analysée.

2.1.1 Source lumineuse : le laser

Le laser utilisé est une diode laser refroidie et pulsée, émettant à 405 nm (LDH-P-C-405B, Picoquant). La fréquence de répétition peut varier soit à l'aide d'un déclencheur interne au contrôleur laser (PDL 808 « Sepia », Picoquant), dans la gamme comprise entre $2,5$ à 40 MHz , soit par un déclencheur externe.

En sortie du laser, le faisceau est de forme elliptique ($3,5 \times 1,5\text{ mm}$), ce qui influe sur la qualité de la transmission de celui-ci en fonction de l'optique utilisée. Le contrôleur permet de modifier la puissance de ce faisceau. Le tableau 2.1 compare la puissance moyenne en sortie de la diode mesurée avec un puissance-mètre (PH100-Si, Gentec Electro Optics Inc., Québec, Canada) avec celle indiquée dans la notice du laser. Les valeurs mesurées sont proches de celles attendues (écart relatif moyen inférieure à $0,5\%$). Le pic laser est étroit, sa largeur totale à mi-hauteur (LTMH) en intensité est de l'ordre de 2 nm (voir figure 2.1). D'après la notice de la diode laser, sa LTMH temporelle varie inversement avec la puissance. Pour la puissance moyenne maximale, soit environ $1,36\text{ mW}$, la largeur temporelle du pic est de 59 ps .

Fréquence (MHz)	P_{max} notice (mW)	P_{max} mesurée (mW)
40	1,3	1,22
20	0,80	0,78
10	0,43	0,42
5	0,21	0,21
2,5	0,1	0,11

TABLE 2.1 – Comparaison de la puissance laser maximale de la notice et celle mesurée.

L'utilisation d'un laser pulsé est nécessaire pour mesurer la durée de vie de fluorescence, cet aspect sera présenté dans la partie 4.3.1. Une source pulsée offre également la possibilité de sélectionner temporellement la fluorescence émise et ainsi s'affranchir en très grande partie de la lumière ambiante. Une autre diode laser émettant à 375 nm (LDH-P-C-375B, Picoquant) est utilisée en complément de la source à 405 nm lors des mesures sur les échantillons ex vivo de rat. La taille, forme et largeur temporelle du faisceau laser à 375 nm est identique à celles du laser à 405 nm . Cependant, la puissance en sortie du laser est 25% plus faible. La durée d'utilisation de ce laser est inférieure à 100 heures, sa puissance moyenne n'a donc pas été vérifiée.

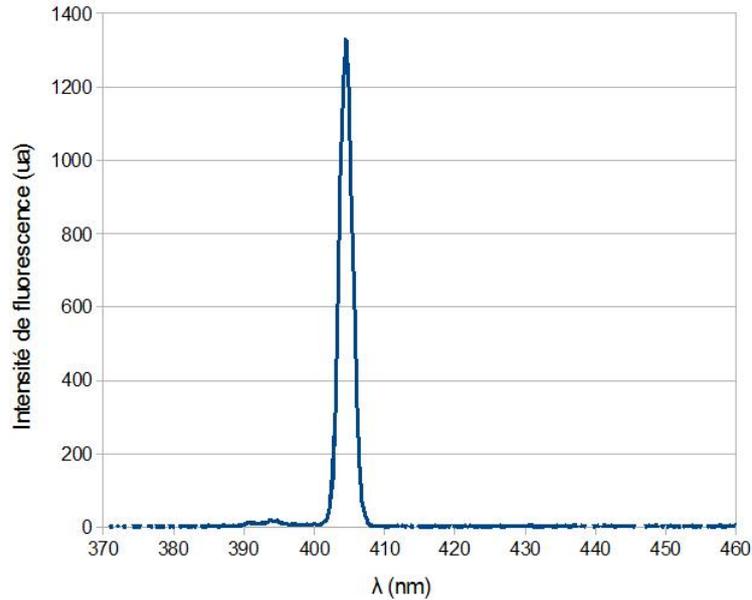


FIGURE 2.1 – Spectre du pic d'émission laser

2.1.2 Injection de la lumière laser

Deux montages différents ont été employés pour injecter le faisceau laser dans la fibre excitatrice de la sonde lors des mesures effectuées dans ce travail de thèse.

2.1.2.1 Type 1 : miroir et collimateur fibré

Dans ce cas, le matériel utilisé pour injecter la lumière du laser dans la fibre émettrice de la sonde est composé d'un miroir, d'un diaphragme et d'une lentille collimatrice fibrée UV-visible (F810FC-543, Thorlabs), comme illustré sur le schéma de la figure 2.2. Chaque élément optique utilisé provoque la perte d'une partie du faisceau laser. Les pertes les plus importantes sont imputées au diaphragme de diamètre 1 mm qui coupe environ 50 % du faisceau incident, ce qui est dû à la taille et la forme elliptique de ce dernier. Les réflexions et/ou transmissions du miroir, du collimateur et de la fibre de la sonde entraînent respectivement des pertes de 5, 15 et 1 % qui ont été mesurées. La perte totale en sortie de sonde est donc de 60 % du faisceau en sortie de laser. Ce montage a été utilisé uniquement pour l'excitation à 405 nm.

2.1.2.2 Type 2 : collimateur fibré dédié

Pour simplifier le couplage entre le laser et la fibre émettrice et pour éviter les pertes engendrées par la présence de nombreux éléments d'optique, il est possible d'utiliser un collimateur (PAF-SMA-11-C, Thorlabs, Maison Laffitte, France) qui se place directement en sortie du laser. D'après les spécifications du constructeur, plus

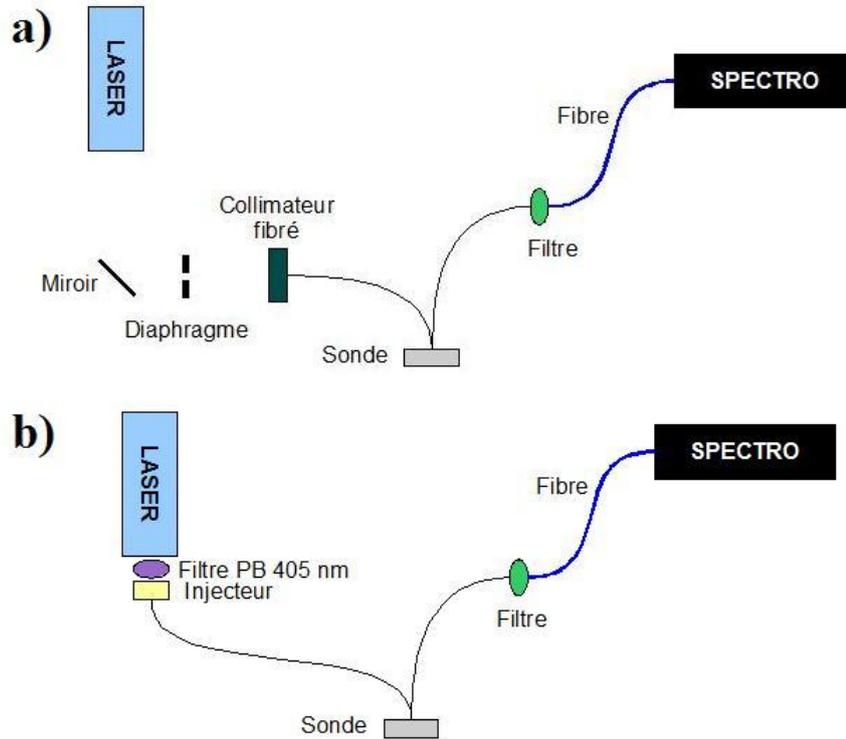


FIGURE 2.2 – Schéma du dispositif de mesures avec a) l'injection de type 1 et b) l'injection de type 2.

de 80 % de l'intensité laser est transmise par ce dispositif. Ce collimateur fibré, ou injecteur, est placé après un filtre passe-bande à $405 \pm 10 \text{ nm}$ (FB405-10, Thorlabs), transmettant 40 % du signal. Ce filtre est utilisé pour filtrer la source et éliminer les signaux parasites observés pendant la caractérisation du dispositif expérimental. Selon le fournisseur de la diode (PicoQuant, Berlin, Allemagne), ces contributions parasites sont normales pour les diodes émettant dans l'UV et les expliquent par le « Quantum confined Stark effect ». Comme dans le premier montage, nous avons mesuré des pertes de 60 %. La LTMH de la lumière laser mesurée en sortie de la sonde est toujours de 2 nm .

Un dispositif similaire a été mis en place pour le laser émettant à 375 nm . Un filtre passe-bande à $375 \pm 10 \text{ nm}$ (FB375-10, Thorlabs) a été utilisé. Le collimateur fibré dédié est traité pour supporter le rayonnement UV.

2.1.3 La sonde fibrée

La sonde est composée de deux fibres. La première fibre, de diamètre de cœur de $200 \mu\text{m}$, est reliée au laser et transmet la lumière d'excitation à l'échantillon. Cette fibre est toujours normale par rapport au tissu, comme présenté sur la figure 2.3.

La seconde fibre, de diamètre de cœur $365 \mu\text{m}$, présente un angle, θ , par rapport

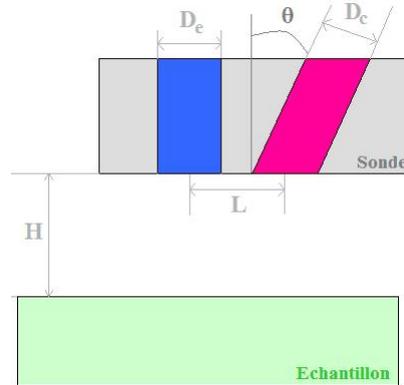


FIGURE 2.3 – Schéma de la sonde bi-fibres

à la première et collecte la lumière de fluorescence émise ainsi que la lumière laser réfléchiée par le tissu. Les deux fibres sont séparées d'une distance L . La dénomination des sondes est : $S\theta-L$ (avec θ en degrés et L en micromètres).

Les fibres utilisées (HCG M0200T et HCG M0365T, Sedi Fibres optiques) sont multimodes à saut d'indice. Le cœur de la fibre est en silice pure et son revêtement en silicium dopé. Leur ouverture numérique est de 0,22. Cette configuration est adaptée à la transmission de lumière dans l'UV-visible. L'atténuation de la lumière dans ces fibres est de 28 dB/km à 405 nm et 100 dB/km à 375 nm . Pour une distance inférieure à 1 m , la puissance transmise à 405 nm est supérieure à 99 %, à 375 nm , elle est supérieure à 98 %. L'atténuation est donc négligeable pour les sondes utilisées.

Plusieurs configurations de sondes ont été testées auparavant [Vu-Thi, 2008]. La variation des paramètres d'angle et de distance centre-à-centre a été effectuée. Grâce à la figure 2.4, la sonde S11-600 a été identifiée comme collectant l'intensité lumineuse la plus élevée. Pour le présent travail, cette sonde a été choisie. La distance optimale entre le tissu et la sonde, permettant de détecter l'intensité maximale, est donc de 1,5 mm et la résolution spatiale de cette sonde est d'environ 500 μm [Vu-Thi, 2008].

2.1.4 Filtres

Il faut éviter le fait que la lumière laser réfléchiée par le tissu pénètre dans le système de mesures. En effet, à cause de réflexions sur l'échantillon, l'intensité laser est supérieure de plusieurs ordres de grandeur à celle de l'autofluorescence. Ce phénomène empêche la détection de la fluorescence. Il est donc nécessaire d'utiliser un filtre passe-haut, positionné entre la fibre collectrice et le spectromètre, dont la longueur de coupure est supérieure à la longueur d'onde d'excitation tout en minimisant la coupure dans les spectres d'émission des fluorophores d'intérêt. Plus précisément, pour permettre la détection de la fluorescence des NADH, fluorophores

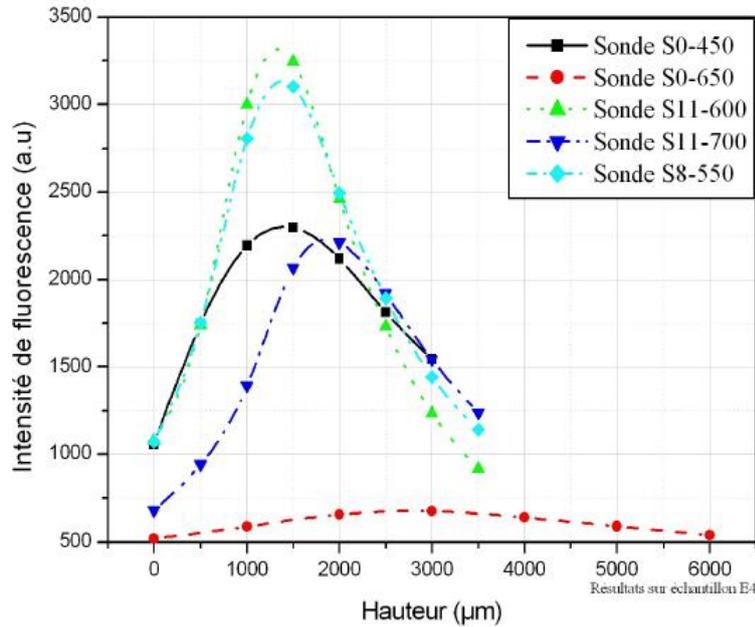


FIGURE 2.4 – Test de différentes géométries de sondes [Vu-Thi, 2008]

aux longueurs d'onde d'émission les plus faibles dans notre configuration, tout en coupant le faisceau à 405nm , la longueur d'onde de coupure du filtre doit se trouver entre 410 et 450 nm ¹. Plusieurs filtres ont été utilisés lors des mesures. Le filtre est soutenu par un porte-filtre (CLH-VAR-UV/VIS, Avantes, Eerbeek, Pays-Bas) constitué de deux lentilles permettant de relier des connecteurs SMA 905.

Le tableau 2.2 contient les caractéristiques de deux filtres utilisés. Les figures 2.5 a. et b. présentent la transmission des filtres OG450 et SR420, respectivement.

Filtre	λ de coupure	Technique de filtrage	Constructeur	λ laser
OG450	450 nm	Verre coloré	Edmund Optics	405 nm
SR410	410 nm	Filtre réseau	Semrock	375 nm et 405 nm

TABLE 2.2 – Filtres passe-haut utilisés

La caractérisation expérimentale de ces filtres a révélé une fluorescence du filtre OG450, lorsqu'il est éclairé par une lumière excitatrice de 405 nm , voir figure 2.6. Il a été vérifié que ce phénomène n'est pas gênant lors de nos mesures de fluorescence, le taux de laser réfléchi étant trop faible. Dans les mêmes conditions, le filtre SR410 ne présente pas de fluorescence et fournit une plus large bande de détection. La densité

1. Pour un filtre coupant les longueurs d'onde inférieures à 450 nm , le spectre d'émission du NADH est fortement tronqué (environ 50 %) et il est difficile de déduire une information sur sa détection.

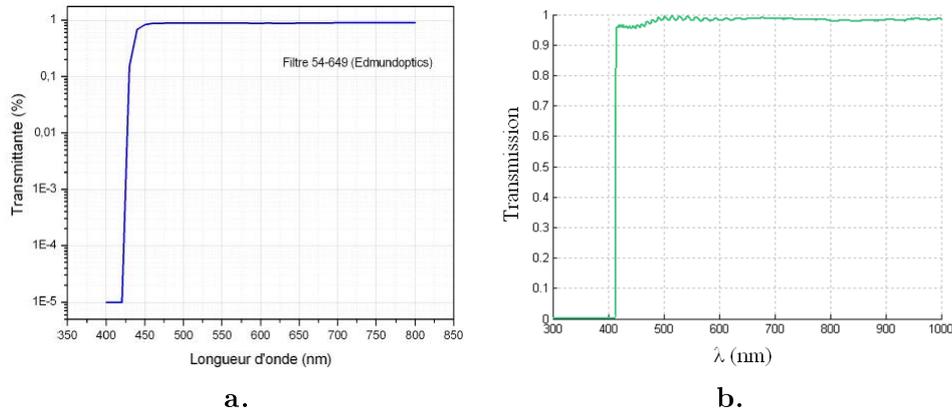


FIGURE 2.5 – Spectres de transmission des filtres OG450 (a.) et SR410 (b.).

optique du filtre SR410 varie entre 6 et 7 pour des longueurs d'onde comprises entre 396 et 410 nm .

Il est à noter que l'intensité de fluorescence du filtre OG450 était négligeable devant celle émise par les fluorophores contenus dans les fantômes. L'intensité des mesures effectuées sur les tranches de cerveau de rat étant plus faible, nous avons voulu éviter tout risque de contamination du signal par le filtre et avons donc utilisé préférentiellement le filtre SR410.

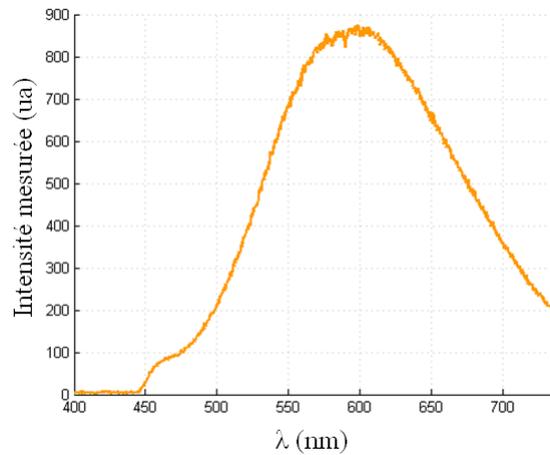


FIGURE 2.6 – Spectre d'émission de fluorescence du filtre OG450 excité à 405 nm

2.1.5 Détection : le spectromètre

Après recollimation, la fluorescence est transmise du porte-filtre vers le détecteur grâce à une fibre optique de 600 μm de diamètre de cœur (QP600-1-UV-VIS, Ocean Optics, Dunedin, Etats-Unis). La transmission de cette fibre est d'environ 90 %

sur la plage de longueurs d'onde de 400 à 900 nm . Le détecteur utilisé est un spectromètre fibré (QE65000, Ocean Optics, Dunedin, Etats-Unis), compatible avec les connecteurs SMA. Sa matrice CCD bidimensionnelle (S7031-1006, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japon) permet l'intégration du signal collecté sur plusieurs lignes de capteurs, augmentant ainsi la sensibilité du système par rapport à une ligne simple de CCD. Le réseau de diffraction est choisi de telle sorte à couvrir une plage de détection comprise entre 365 et 750 nm , et conférant au spectromètre une résolution spectrale de 1,5 nm .

2.2 Propagation de la lumière - Fantômes optiques

Lorsqu'un faisceau lumineux est envoyé sur un tissu, les photons interagissent avec les particules composant le milieu et peuvent être absorbés ou déviés. Pour chaque phénomène comme la réflexion, l'absorption ou la diffusion, impliqué dans le trajet d'un photon dans le tissu, il existe une grandeur, un coefficient qui le caractérise.

La connaissance de ces grandeurs définissant les propriétés optiques d'un tissu permettent de modéliser celui-ci. Un fantôme optique aux propriétés calibrées peut être défini de manière à simuler un tissu biologique. Il existe plusieurs intérêts à imiter un tissu à l'aide de fantômes. Cette modélisation peut permettre la caractérisation d'un dispositif de mesure, en terme de profondeur détectée par exemple [Mazoli et al., 2010; Choi et al., 2011]. Le calibrage de certains dispositifs de mesure - des paramètres optiques, de la concentration de fluorophore [Drakaki et al., 2005] - nécessite l'utilisation de fantômes et certains groupes de recherche développent des méthodes de correction grâce à ces outils [Liu et al., 2011]. Une étude approfondie sur fantômes peut également mener à l'optimisation des paramètres de la sonde développée, comme le diamètre de la fibre ou la distance entre les fibres émettrice et collectrice [Pfefer et al., 2003; Vishwanath and Mycek, 2005].

La première étape dans la conception d'un fantôme est d'identifier clairement l'utilisation qui va en être faite. Cela permet de choisir les composants les plus adaptés. Par exemple, s'il est souhaité de fabriquer des fantômes stables dans le temps, il est préférable de construire des fantômes solides, en utilisant des polymères comme le polyuréthane [Moffitt et al., 2006; Keränen et al., 2010] ou la paraffine [Rao et al., 2006]. D'autres textures, moins durables, peuvent être fabriquées : des fantômes-gel, en agarose par exemple, ou des fantômes liquides. La géométrie souhaitée peut conditionner le choix de la consistance. L'utilisation de fantômes en gel facilite la conception de fantômes à plusieurs couches [Pfefer et al., 2003; Nieman et al., 2009], bien qu'il soit également possible de fabriquer une couche solide surmontée d'une couche liquide, par exemple [Qian et al., 2003].

Les paramètres optiques des tissus sont imités grâce à différents composants ajoutés aux fantômes. Les diffuseurs les plus couramment utilisés sont des intralipides [Pfefer et al., 2003; Qian et al., 2003; Drakaki et al., 2005; Ansari et al., 2009] et des microsphères en latex ou en polystyrène. La théorie de Mie permet de

déterminer la concentration de diffuseurs nécessaire pour obtenir le coefficient de diffusion souhaité. L'absorbant communément utilisé est l'encre de Chine [Madsen et al., 1992; Ansari et al., 2009; Keränen et al., 2010]. Il faut néanmoins faire attention à la concentration utilisée car l'encre, généralement considérée comme un pur absorbant, possède une composante diffusante pour des solutions concentrées, ce qui peut être source d'erreur dans la fabrication de fantômes [Madsen et al., 1992]. Certaines études nécessitent des fantômes aux propriétés d'émission de fluorescence. Un ou plusieurs fluorophores peuvent alors être ajoutés. Ceux-ci sont souvent choisis pour leur utilisation commune en biologie ou médecine, comme le bleu de méthylène [Drakaki et al., 2005] ou la protoporphyrine IX [Beck et al., 1998]. Dans le cas de fantômes bi- ou multi-couches, des chromophores émettant à des plages de longueurs d'onde différentes sont attribués à chaque couche, ceci permettant de connaître la provenance du signal détecté [Pfefer et al., 2003; Vishwanath and Mycek, 2005].

Dans notre cas, nous avons fait le choix d'un fantôme-gel, permettant ainsi des géométries variées. Le gel est choisi en fonction de ses propriétés de réfraction, en préférant une faible fluorescence. La diffusion est apportée par des billes diffusives, permettant, en variant leur diamètre et leur composition, de couvrir les valeurs de diffusion des tissus. L'absorbant utilisé est l'encre de Chine, dans des concentrations faibles, permettant ainsi d'éviter un effet de diffusion supplémentaire. Les fluorophores sont déterminés pour leurs spectres d'émission semblables à certains fluorophores endogènes. Tous ces choix sont détaillés dans la suite de cette partie.

2.2.1 Indice de réfraction - gel

La vitesse de propagation de la lumière, v , varie suivant le milieu. Elle peut s'exprimer en fonction de la vitesse de la lumière dans le vide, c , et l'indice de réfraction du milieu, n :

$$n = \frac{c}{v} \quad (2.1)$$

L'indice de réfraction varie avec la longueur d'onde, la concentration volumique des molécules ainsi que la polarisation de la lumière. Lorsqu'il y a changement de milieu, donc d'indice de réfraction, une partie de la lumière est réfléchi et l'autre partie est réfractée. Ceci est illustré sur la figure 2.7 et se retrouve pour différentes interfaces, entre le tissu et l'air ou entre deux tissus. Les angles d'incidence, θ_i , et transmis, θ_t sont reliés par l'équation de Snell-Descartes :

$$n_i \cdot \sin(\theta_i) = n_t \cdot \sin(\theta_t) \quad (2.2)$$

Dans les tissus, l'indice de réfraction est relié à la concentration en eau [Biswas and Luu, 2011]. Il varie donc entre 1,33, indice de l'eau pure, et 1,5, indice du tissu déshydraté. Le corps humain contient 65 % d'eau en moyenne. Cette concentration varie avec l'âge, le genre et l'organe considéré. Le cerveau humain est composé de 75 à 80 % d'eau, ce qui correspond à un indice de réfraction de 1,4 environ [Biswas and Luu, 2011]. La fraction de lumière réfléchi, R , peut être calculée grâce à la loi

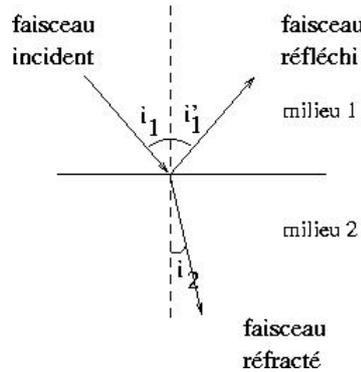


FIGURE 2.7 – Réflexion et réfraction de la lumière entre deux milieux.

de Fresnel. Pour une incidence normale sur un tissu cérébral, elle est d'environ 4 %, donc faible. Le milieu de provenance considéré est l'air ($n = 1,33$).

$$R = \frac{1}{2} \left(\frac{\sin^2(\theta_i - \theta_t)}{\sin^2(\theta_i + \theta_t)} + \frac{\tan^2(\theta_i - \theta_t)}{\tan^2(\theta_i + \theta_t)} \right) \quad (2.3)$$

Le milieu d'un fantôme doit permettre d'imiter l'indice de réfraction des tissus. La gélatine de porc (Type-A G1890, Sigma Aldrich) a été choisie pour sa faible fluorescence lorsqu'elle est excitée à 405 nm. De plus, la gélatine permet de fabriquer des fantômes de différentes géométries. Une étude approfondie de mesure d'indice de réfraction en fonction de la concentration de gélatine diluée dans de l'eau distillée a été menée lors du précédent travail de thèse [Vu-Thi, 2008]. Il a été démontré qu'un ajout de 10 % en masse de poudre de gélatine dans un volume d'eau distillée² permet d'obtenir un indice de réfraction de 1,4.

2.2.2 Coefficients liés à la diffusion – billes

Lors d'une interaction entre un photon, d'une certaine fréquence ou longueur d'onde λ , et une particule, un changement de direction peut être engendré. Ce phénomène est appelé diffusion et se divise en deux types :

- la diffusion élastique, soit quand la longueur d'onde du photon diffusé est identique à celle du photon incident
- la diffusion inélastique, soit quand les deux longueurs d'onde diffèrent, comprenant les phénomènes tels que la diffusion Raman ou de Brillouin.

La diffusion élastique est caractérisée par deux grandeurs, liées à la distance parcourue entre deux diffusions, μ_s , et à la distribution des directions de propagation, g . Ces paramètres sont liés à la taille des diffuseurs ainsi qu'à la longueur d'onde λ du photon. Il existe deux théories de diffusion. La **diffusion de Rayleigh**, utilisée lorsque le diamètre de la particule est très inférieur à la longueur d'onde. Dans ce cas, la concentration de particules est faible et celles-ci sont considérées comme très

2. Pour exemple : 2,5 g de poudre de gélatine dans 25 ml d'eau distillée.

espacées. Il est alors question de diffusion unique. La **théorie de Mie** s'applique à des particules de diamètre égal ou supérieur à la longueur d'onde du faisceau incident. *La concentration de particules définit des diffusions multiples.*

2.2.2.1 Coefficient d'anisotropie de diffusion – g

La direction initiale du photon, \vec{s} , est déviée par une interaction avec la particule. Le photon se propage alors suivant une nouvelle direction : \vec{s}' . La direction de diffusion est caractérisée par les angles de déflexion θ et azimutal ϕ . La section efficace différentielle de diffraction, σ_d , permet de connaître la distribution des directions après diffusion. Elle s'exprime comme indiqué dans l'équation 2.4, où $d\Omega$, l'angle solide élémentaire, est égal à $\sin\theta d\theta d\phi$. La section efficace différentielle dépend de r , la distance entre l'observateur et la particule diffusée, I_s , l'intensité, en nombre de photons par unité de surface et de temps, diffusée dans la direction \vec{s}' et I_i , l'intensité du faisceau incident.

$$\sigma_d = \frac{d\sigma_s(\vec{s}, \vec{s}')}{d\Omega} = r^2 \frac{I_s(\vec{s}')}{I_i(\vec{s})} = |p(\vec{s}, \vec{s}')|^2 \quad (2.4)$$

La section efficace de diffusion totale σ_s correspond à l'intégration de la section efficace de diffusion différentielle suivant tous les angles (voir équation 2.5). Elle permet d'introduire la fonction de phase de diffusion p qui représente la répartition angulaire des directions de propagation. Cette fonction respecte la condition de normalisation (équation 2.6).

$$\sigma_s = \int_{4\pi} \left(\frac{d\sigma_s(\vec{s}, \vec{s}')}{d\Omega} \right) d\vec{s}' = \int_{4\pi} \sigma_s p(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega \quad (2.5)$$

$$\int_{4\pi} p(\vec{s}, \vec{s}') d\Omega = 1 \quad (2.6)$$

Par exemple, si $p(\vec{s}, \vec{s}') = \frac{1}{4\pi}$, la diffusion est isotrope. Dans le cas d'un milieu contenant des diffuseurs répartis aléatoirement, la diffusion peut être considérée comme symétrique autour de la direction incidente. La fonction de phase ne dépend alors que de l'angle θ . Le coefficient d'anisotropie de diffusion, soit le cosinus moyen de l'angle de diffusion, peut être alors défini suivant l'équation 2.7. Si la diffusion est isotrope, g est égal à 0. Une diffusion uniquement vers l'avant correspond à une anisotropie de diffusion de 1, alors que si la lumière est entièrement rétrodiffusée, g est égal à -1 .

$$g = \int_{4\pi} p(\cos\theta) \cos\theta d\cos\theta = \langle \cos\theta \rangle \quad (2.7)$$

Il existe plusieurs expressions analytiques de la fonction de phase, qui dépendent du type de diffusion considéré. Henyey et Greenstein ont développé une fonction de phase décrivant la diffusion de la lumière par les poussières interstellaires [Henyey

and Greenstein, 1941]. Cette fonction de phase, décrite par l'équation 2.8, ne dépend que d'un seul paramètre libre, g et elle décrit convenablement la dépendance angulaire de la diffusion dans les tissus biologiques [Jacques et al., 1987].

$$p(\cos \theta) = \frac{1}{2} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (2.8)$$

L'anisotropie de diffusion dans les tissus cérébraux est comprise entre 0,75 et 0,95 [Yaroslavsky et al., 2002; Gebhart et al., 2006]. Les composants cellulaires principalement responsable de la diffusion sont le noyau (pour un faible angle incident) et les mitochondries (pour un grand angle incident) [Hollis, 2002]. D'après les équations ci-dessus, il est défini que la section efficace de diffusion et donc le coefficient d'anisotropie sont reliés à la taille des particules. Il est possible de calculer le coefficient g , suivant la théorie de Mie (programme FdMie [Lentz, 1976; Gelebart, 1998]), pour des billes diffusives, connaissant leur diamètre ainsi que leur indice de réfraction. Sur le tableau 2.3, l'anisotropie de diffusion a été calculée pour différents types de billes.

2.2.2.2 Coefficient de diffusion - μ_s

Dans un milieu homogène, le coefficient de diffusion moyen est μ_s , dont l'unité est le cm^{-1} . C'est ce paramètre qui, en plus de l'anisotropie de diffusion g , permettra de caractériser la diffusion dans un tissu. Il permet de définir la probabilité $p(l)$ pour un photon de subir une diffusion entre les distances parcourues l et $l + dl$.

$$p(l) = \mu_s e^{-\mu_s l} dl \quad (2.9)$$

Cette probabilité permet de déduire la distance moyenne entre deux événements de diffusion, le libre parcours moyen l_{moy} , qui correspond à l'inverse du coefficient de diffusion.

$$l_{moy} = \int_0^{\infty} l \mu_s e^{-\mu_s l} dl = \frac{1}{\mu_s} \quad (2.10)$$

Le coefficient de diffusion est également lié à la section efficace de diffusion, σ_s et à la densité volumique de particules diffusantes dans le milieu considéré ρ . Un coefficient de diffusion réduite est défini, permettant de faire le lien entre μ_s et g et donc représentatif de la diffusion en terme de distance moyenne et de distribution de la direction de propagation.

$$\mu_s = \rho \sigma_s \quad (2.11)$$

$$\mu'_s = \mu_s (1 - g) \quad (2.12)$$

Dans le tissu cérébral humain, μ_s varie entre 100 et 400 cm^{-1} [Yaroslavsky et al., 2002; Gebhart et al., 2006]. Dans les fantômes, l'équation 2.11 permet de déterminer la concentration de billes diffusives à utiliser pour obtenir un coefficient de diffusion voulu [Gelebart, 1998; Vu-Thi, 2008]. Plusieurs types de billes diffusives, de compositions et diamètres différents, sont disponibles pour l'intervalle d'anisotropie de diffusion des tissus, voir le tableau 2.3. Or, parmi ces billes, un seul modèle de

billes permet d'obtenir les coefficients de diffusion compris dans l'intervalle des tissus cérébraux : les billes de mélamine formaldéhyde (MF), de 410 nm de diamètre (microparticules GmbH). Celles-ci seront les seules utilisées pour nos fantômes.

Billes, diamètre	Concentration (mg/ml)	Densité ($g \cdot cm^{-3}$)	σ_s (cm^2)	g
MF, 410 nm	100	1,51	$1,91 \cdot 10^{-9}$	0,87
Si, 304 nm	50	2	$2,73 \cdot 10^{-12}$	0,82
Si, 585 nm	50	2	$4,21 \cdot 10^{-11}$	0,94

TABLE 2.3 – Tableau des billes diffusives à anisotropie de diffusion permettant d'obtenir une anisotropie g compatible avec celle mesurée sur des tissus cérébraux

2.2.3 Coefficient d'absorption - μ_a

Un photon du faisceau lumineux incident interagit avec la molécule absorbante. Celle-ci passe alors dans un état énergétique excité, en absorbant l'énergie d'un photon. Le retour de la molécule dans son état fondamental peut se faire suivant différents mécanismes :

- **radiatif**, avec émission d'un photon d'énergie plus faible que le photon incident, ceci correspond aux phénomènes de fluorescence, phosphorescence et diffusion Raman qui seront explicités dans une partie ultérieure.
- **non radiatif**, sans émission de photon. L'énergie incidente est alors convertie en énergie thermique.

L'absorption d'un milieu transparent, non diffusif et homogène est définie comme la diminution de l'intensité lumineuse incidente I_0 au travers de ce milieu. Elle se décrit par la loi de Beer-Lambert, faisant apparaître un paramètre caractéristique de l'absorption : le coefficient d'absorption μ_a , exprimé en cm^{-1} .

$$I = I_0 e^{-\mu_a l} \quad (2.13)$$

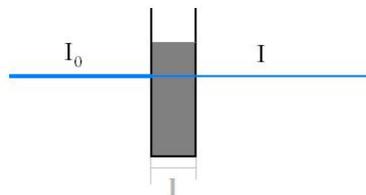


FIGURE 2.8 – Transmission de la lumière à travers un milieu homogène et absorbant.

Une molécule responsable de l'absorption est appelée chromophore. Dans les tissus, les principaux composants absorbants sont le sang, l'eau et la mélanine. La mélanine est le pigment responsable de la coloration de notre peau. Elle est peu

présente dans le cerveau humain, elle se concentre dans la substance noire à laquelle elle donne sa couleur.

L'eau est présente de 75 à 80 % dans le cerveau humain. Plusieurs formes sont trouvées, caractérisées par la liaison des molécules d'eau à son environnement. Chaque forme possède un spectre d'absorption propre. Une variation des concentrations des espèces de liaison de l'eau à son milieu peut faire varier légèrement le spectre d'absorption. Sur la figure 2.9, le spectre de l'eau pure est représenté. L'eau absorbe peu dans notre région d'intérêt, l'UV-visible.

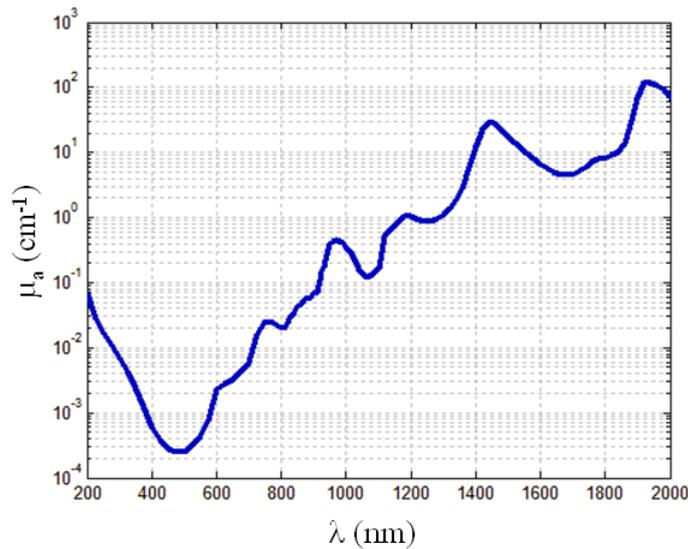


FIGURE 2.9 – Spectre d'absorption de l'eau, d'après [Hale and Querry, 1973].

Certaines cellules sanguines, les érythrocytes, contiennent une protéine absorbante appelée hémoglobine. Elle a pour rôle de transporter l'oxygène depuis les poumons aux organes. L'hémoglobine est composée d'une molécule, la globine, rassemblant en son centre quatre molécules appelées « hèmes ». Chaque hème comporte un ion de fer (Fe^{2+}), permettant de fixer une molécule d'oxygène. Il peut donc y avoir 4 molécules de dioxygène au total sur une molécule d'hémoglobine. Lorsqu'au moins une molécule d'oxygène est attachée au globule rouge, il est question d'oxyhémoglobine (HbO_2). Dans le cas contraire, où aucune molécule de dioxygène n'est fixée sur l'hème, la molécule sanguine est référencée comme dé-oxyhémoglobine (Hb). Chaque état chargé ou non de l'hémoglobine a son propre spectre d'absorption, comme indiqué sur la figure 2.10. Les deux espèces présentent une forte absorption dans la région UV-visible. Il faut garder à l'esprit cette spécificité lors de mesures in-vivo.

Dans les tissus, le coefficient d'absorption ex vivo à 405 nm est compris entre 3 et 18 cm^{-1} [Yaroslavsky et al., 2002; Gebhart et al., 2006]. Dans les fantômes optiques, un composé souvent utilisé pour modéliser l'absorption est l'encre de Chine. La loi de Beer-Lambert permet d'établir une relation de proportionnalité entre le coeffi-

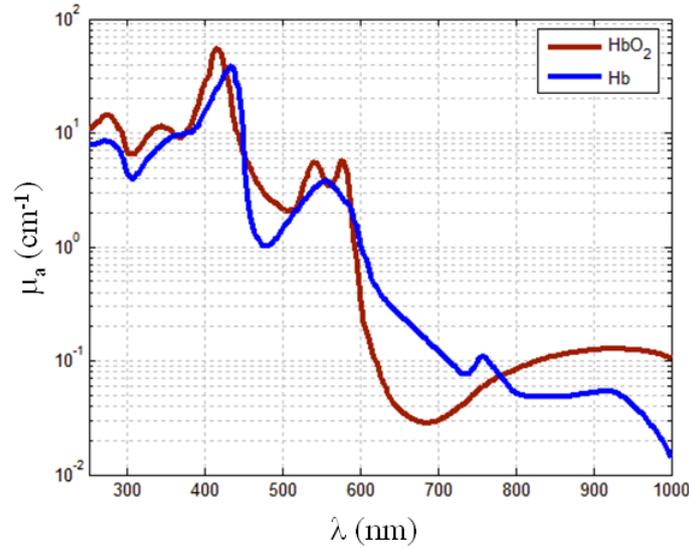


FIGURE 2.10 – Spectres des coefficients d'absorption de l'oxyhémoglobine et la déoxyhémoglobine, d'après S. Prahl (omlc).

cient d'absorption et la concentration en particules absorbantes. Si la concentration d'encre reste faible, sa diffusion est négligeable et la relation entre concentration, c , et μ_a est linéaire. Le coefficient d'absorption spécifique est noté α .

$$I = I_0 e^{-\alpha c l} \quad (2.14)$$

$$\mu_a = \alpha c \quad (2.15)$$

Un calibrage de l'absorption de l'encre dans de l'eau a été effectuée grâce à un spectrophotomètre (UVICON 923, Bio-Tek, Kontron Instrument, Milan, Italie), permettant de définir la relation entre μ_a et concentration volumique d'encre de Chine ($n^\circ 17$, Pelikan, Hannovre, Allemagne). La droite reliant les deux paramètres est exprimée par l'équation 2.16, trouvée grâce à l'ajustement linéaire des données mesurées, voir figure 2.11 ($r^2 = 0,9977$). Il est à noter que la solution mesurée correspond à de l'encre diluée dans de l'eau distillée. La concentration $c = 1$ est équivalente à une dilution à 0,4 % (soit 100 μl d'encre pure dans un total de 25 ml). Les barres d'erreur proviennent du calcul de l'écart moyen entre 4 mesures effectuées pour chaque dilution.

$$\mu_a = 34,43 \cdot c = 34,43 \cdot \frac{100}{0,4} \cdot \frac{V_{\text{encre pur}}}{V_{\text{total}}} = \quad (2.16)$$

Le tableau 2.4 permet de comparer la dilution d'encre utilisée pour obtenir un coefficient d'absorption de 15 cm^{-1} . Les ordres de grandeur sont comparables, soit environ quelques pour mille. Il existe des variations en fonction des marques et

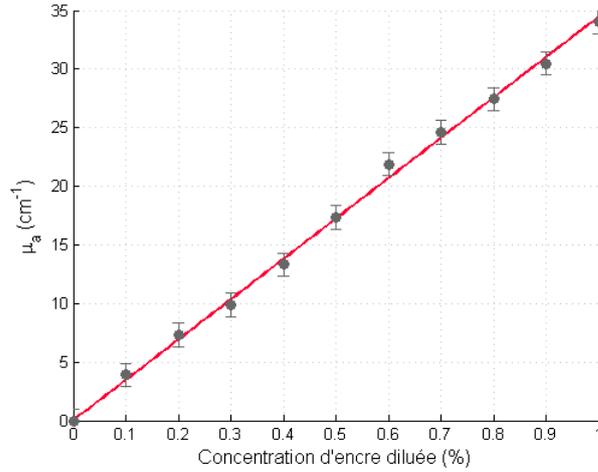


FIGURE 2.11 – Spectres de calibration de l’absorption de l’encre de Chine. La concentration est nulle pour de l’eau distillée pure et est de 1 pour la solution diluée à 0,4 %.

longueurs d’onde d’excitation utilisées. Le calibrage effectué est en accord avec celles qui sont trouvées dans la littérature.

La courbe 2.11 a été utilisée pour calibrer le coefficient d’absorption de nos fantôme et montre la linéarité du μ_a avec la concentration d’encre.

Marque d’encre	λ d’excitation	$\frac{V_{encre\ pur}}{V_{total}}$	Référence
Pelikan	405nm	$2 \cdot 10^{-3}$	La présente thèse
Higgins		$\sim 10^{-3}$	[Keränen et al., 2010]
Pelikan	632,8 nm	$3 \cdot 10^{-3}$	[Ninni et al., 2010]
Higgins		$4 \cdot 10^{-3}$	
Pelikan	833 nm	$4 \cdot 10^{-3}$	

TABLE 2.4 – Tableau comparatif de la quantité d’encre diluée nécessaire à obtenir $\mu_a = 15\ cm^{-1}$.

2.2.4 Vérification des paramètres optiques

Nos fantômes sont des milieux homogènes absorbants et diffusifs, caractérisés par un coefficient d’atténuation. Dans le cas d’un faisceau collimaté, traversant un milieu fin, le coefficient d’atténuation total, μ_t , est défini comme la somme des coefficients de diffusion et absorption (équation 2.17). Ce coefficient est représentatif du comportement des photons balistiques.

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \tag{2.17}$$

Pour vérifier les calibrages des paramètres énoncées dans les paragraphes précédents, un dispositif de mesures de paramètres optiques a été utilisé, une sphère intégrante. Elle permet, grâce à plusieurs mesures, suivies d'une analyse en problème inverse, de retrouver les paramètres de diffusion et absorption d'un milieu, comme un fantôme optique. Son principe sera expliqué ci-après ainsi qu'en détail dans l'annexe dédiée B.

2.2.4.1 Dispositif de mesure - sphère intégrante

Une unique sphère intégrante (IS200, Thorlabs) a été utilisée. Sa surface interne est couverte de téflon, réfléchissant 99 % de la lumière incidente. La sphère comporte plusieurs ports, permettant de placer l'échantillon à plusieurs endroits afin d'effectuer les différentes mesures de réflexion et transmission nécessaires. Pour une utilisation optimale, l'aire des ports d'une sphère ne doit pas dépasser 5 % de l'aire interne de la sphère, ce qui est le cas de la sphère utilisée pour nos mesures.

L'illumination de l'échantillon se fait par le laser à 405 nm. Le spectromètre est branché directement en sortie de la sphère par son port fibrée. Les fibres utilisées pour la transmission et la collection de la lumière sont des fibres optiques résistantes à la solarisation de 600 μm de diamètre (QP600-1-UV-VIS, Ocean Optics).

Les échantillons sont des gels contenant de l'encre et des billes, d'un millimètre d'épaisseur. Ils sont placés dans des cuvettes en quartz (Starna, Pfungstadt, Allemagne) ayant des fenêtres d'une épaisseur d'un millimètre. La taille des échantillons était de $8 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$, soit inférieure à la taille du port de la sphère. Un cache en téflon a donc été utilisé pour diminuer la taille du port à 7 mm de diamètre.

La mesure de trois grandeurs par échantillon est nécessaire pour déduire les coefficients g , μ_s et μ_a . Ces paramètres sont la réflectance, la transmittance ainsi que la transmittance collimatée. Les schémas de la figure 2.12 représentent les expériences effectuées pour obtenir les données nécessaires. Un protocole plus précis est disponible en annexe B.

Afin de retrouver les paramètres de diffusion, un programme fonctionnant la méthode d'Inverse Adding-Doubling (IAD [Prah, 2010]) est utilisé. Il prend en compte les paramètres géométriques de l'échantillon et la sonde pour faire des simulations successives afin de retrouver les grandeurs mesurées. Il procure ensuite les coefficients μ_a , μ_s et g ayant permis une correspondance réussie entre mesure et simulation. Plus de détails sont donnés dans l'annexe B.

L'erreur sur la détermination de ces paramètres a été estimée en reproduisant la mesure sur un même fantôme ainsi que sur des fantômes différents, plus de détails sont donnés dans la partie ci-dessous ainsi que dans l'annexe B. Le protocole de fabrication a également été évalué par la préparation de plusieurs fantômes-gels aux propriétés identiques. Un fantôme-gel correspond à un volume fabriqué ($\sim 3 \text{ ml}$) possédant les propriétés optiques souhaitées, avec un seul fantôme-gel, plusieurs ($n = 1$ à 4) échantillons peuvent être fabriqués. Chaque échantillon est mesuré en 5 endroits. La variation des coefficients d'absorption et de diffusion a été effectuée dans les intervalles correspondant aux tissus cérébraux. Une attention particulière

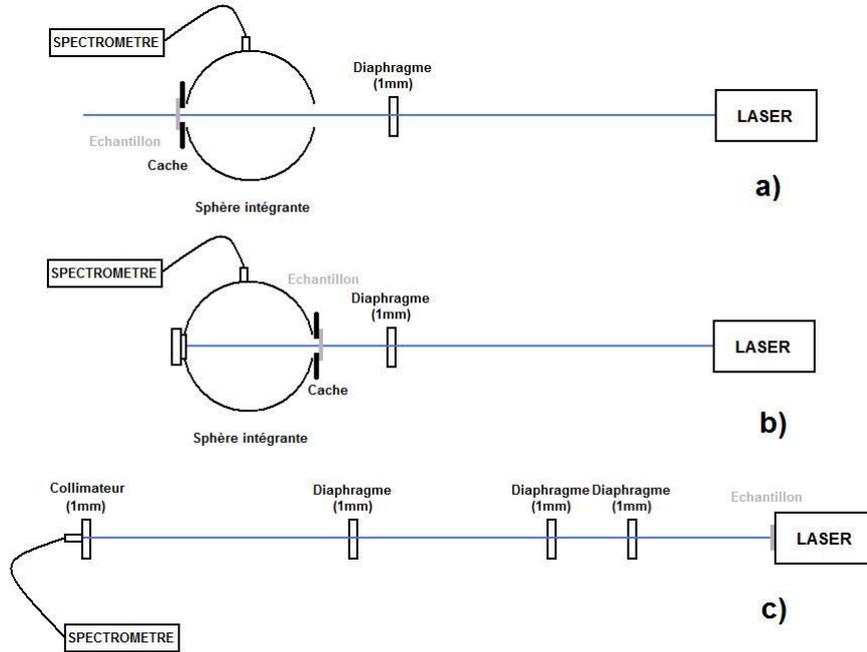


FIGURE 2.12 – Schémas des mesures de a) réflexion, b) transmission et c) transmission collimatée.

a été portée à panacher les différents coefficients, par exemple, pour un même μ_s , plusieurs fantômes de μ_a différents ont été fabriqués et mesurés.

2.2.4.2 Résultats

Plusieurs couples de coefficients (μ_a, μ_s) des échantillons ont été mesurés. Pour un μ_a fixé, des fantômes-gels contenant des μ_s variés ont été fabriqués et mesurés afin de vérifier que la mesure du coefficient d'absorption ne dépend pas du coefficient de diffusion. Le même genre de mesures a été effectué en fixant le μ_s et en variant le μ_a . Les résultats ont montré que la variation du μ_a mesuré pour plusieurs μ_s sont de l'ordre de 5 %, soit comparable à la variation de mesure du coefficient entre plusieurs fantômes-gels fabriqués (voir tableau 2.7). Une constatation équivalente est fait pour un μ_s constant : le coefficient de diffusion varie de moins de 10 % pour différents μ_a . Le milieu (billes et gel) semble apporter une contribution à l'absorption du fantôme. Le tableau 2.5 présente les différentes associations (μ_s, μ_a) fabriquées ainsi que le nombre de fantômes-gels et d'échantillons mesurés dans chaque cas. Des mesures sont effectuées de telle sorte à déduire 5 ensembles de coefficients (μ_s, μ_a) ou (g, μ_s, μ_a) pour chaque échantillon. La transmission collimatée permettant de déterminer le facteur d'anisotropie g a été mesurée pour le tiers des échantillons mentionnés. La comparaison des différents paramètres calibré ou théoriques avec les mesures effectuées à l'aide de la sphère intégrante est présentée dans cette partie.

(μ_s, μ_a) (en cm^{-1})	N échantillons
100, 3*	6
100, 9	4
200, 3*	6
200, 9	4
200, 13	1
300, 3*	4
300, 13*	4
300, 18	1
400, 3	1
400, 18	4

* : échantillons provenant de deux fantômes-gels différents.

TABLE 2.5 – Tableau des échantillons de couples (μ_s, μ_a) mesurés.

Anisotropie de diffusion – g Ce coefficient est obtenu grâce aux mesures de transmission collimatée. Le tableau 2.2.4.2 permet de confronter la valeur attendue pour des billes MF de diamètre 410 nm au paramètre déduit des mesures. Le coefficient d'anisotropie mesuré correspond à la moyenne de mesures sur 12 échantillons et son erreur est estimée par la déviation standard entre ces mesures. L'écart relatif moyen entre les mesures et le g attendu est de 3 % et l'écart relatif maximal de 6 %. L'anisotropie de diffusion expérimentale est donc comparable à celle attendue d'après la théorie de Mie (voir tableau 2.3).

g théorique	0,87
g mesuré	$0,85 \pm 0,01$

TABLE 2.6 – Tableau comparatif de l'anisotropie de diffusion théorique et mesurée.

Coefficient de diffusion – μ_s La figure 2.13 a. expose les valeurs de μ_s mesurées en fonction des valeurs attendues, c'est-à-dire calculées avec la théorie de Mie décrite dans la partie 2.2.2.2. Ces valeurs théoriques sont matérialisées par la ligne rouge. L'erreur figurée sur le graphique est estimée par l'écart-type entre les mesures faites pour chaque coefficient de diffusion.

Une surestimation du coefficient de diffusion mesuré est observé par rapport à celui attendu, avec une erreur relative moyenne de 15 % et une erreur relative maximale de 23 %. Sur la figure 2.13 b. est représenté l'écart relatif pour chaque mesure.

Coefficient d'absorption – μ_a Lors des mesures, il a été constaté que le mélange gel+billes contribue à une partie de l'absorption. L'absorption totale du fantôme se

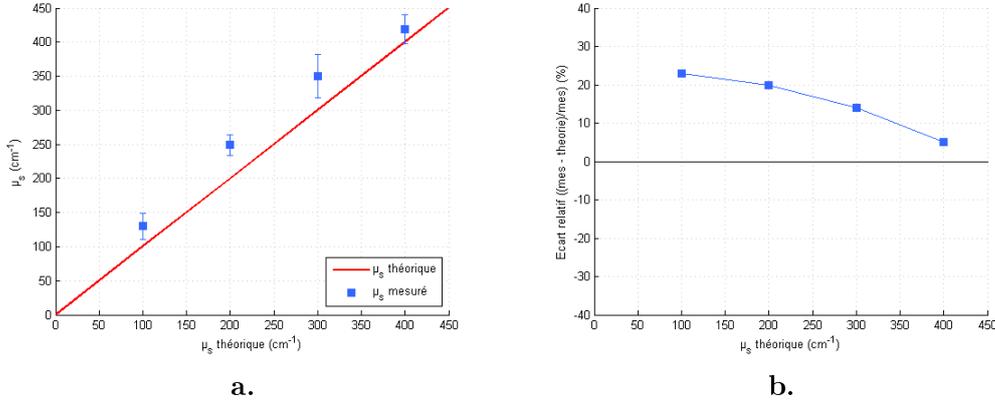


FIGURE 2.13 – Graphique représentant les coefficients de diffusion mesurés comparés à la théorie de Mie (a.) et représentation graphique de l’erreur relative entre μ_s mesuré et attendu (b.).

décrit donc comme la somme de la contribution gel+billes d’une part et de l’encre de l’autre part.

$$\mu_{a\ tot} = \mu_{a\ encre} + \mu_{a\ gel+billes} \quad (2.18)$$

La contribution imputée au milieu, soit $\mu_{a\ gel+billes}$ a été mesurée. Elle est constante et vaut toujours $2\ cm^{-1}$. Ce décalage est donc à prendre en compte dans le calcul de la concentration d’encre nécessaire à l’obtention du coefficient d’absorption total voulu. Les paramètres d’absorption obtenus à l’aide de la sphère intégrante présentent bien un décalage d’environ $2\ à\ 3\ cm^{-1}$. En soustrayant la contribution $\mu_{a\ gel+billes}$ des valeurs mesurées, l’erreur relative moyenne entre mesures et valeurs attendues est de $9\ \%$ avec une erreur relative maximale de $19\ \%$.

En règle générale les paramètres optiques attendus ont été retrouvés. Le tableau 2.7 présente les écarts-types relatifs suivant les mesures considérées. Les erreurs effectuées sur un même échantillons ou plusieurs échantillons issus d’un même gel sont faibles (inférieures à $5\ \%$). La variation des paramètres mesurés entre plusieurs gels est plus élevée et pourrait s’expliquer par des différences dû à la fabrication même des gels. Les écarts relatif moyens entre mesures et valeurs attendues sont de $3, 9$ et $15\ \%$ pour les coefficients g, μ_a et μ_s , respectivement. Des erreurs statistiques ont été évaluées et ce par la répétition des mesures sur différents échantillons. Des erreurs systématiques peuvent également être source des différences observées. D’un côté, des erreurs systématiques lors des manipulations ont pu avoir lieu, comme :

- un mauvais positionnement de l’échantillon (présence d’un angle entre le faisceau laser et la surface de l’échantillon)
- des erreurs dans la fabrication des gels (incertitude sur la quantité de billes, d’encre)

- dans le cas de l'estimation de g , un alignement optique parfait est nécessaire. Des mesures ont permis d'évaluer le fait qu'un mauvais alignement peut entraîner des sous-estimations de g jusqu'à 30 % de la valeur attendue.

Mesures effectuées :	Ecart-type relatif
sur un même échantillon	$\leq 2 \%$
entre plusieurs échantillons	$\sim 4 \%$
entre plusieurs fantômes-gels	pour μ_s 15 - 20 %
	pour μ_a : $\leq 5 \%$

TABLE 2.7 – Tableau des écarts-types relatifs entre mesures (les échantillons comparés possèdent les mêmes paramètres optiques).

D'un autre côté, le programme d'analyse IAD pourrait être à l'origine de certaines erreurs, de par la mauvaise appréciation de certains paramètres d'entrée. Quelques paramètres ont été modifiés afin d'évaluer leur impact sur le calcul des coefficients optiques. Ces tests sont récapitulés dans le tableau 2.8. Des paramètres comme la taille du faisceau et l'indice de réfraction du quartz ne semblent pas jouer un grand rôle. Par contre, une diminution du coefficient de réflexion de la sphère, due à un dépôt de poussière ou l'usure par exemple, ou encore une sous estimation du diamètre du port/cache pourrait corriger la surestimation du coefficient de diffusion. Cela ne semble pas être la seule cause car, dans ce cas, le coefficient d'absorption s'éloignerait des valeurs attendues.

Paramètre varié	Modification de la valeur utilisée	Effet sur les paramètres optiques
Coefficient de réflexion de la sphère	- 0,02	$\mu_a \sim + 10 \%$ $\mu_s \sim - 15 \%$
Diamètre du port	facteur 2	$\mu_a \sim + 10 \%$ $\mu_s \sim - 25 \%$
Diamètre du faisceau incident	facteur 2	$< 1 \%$
Indice de réfraction du quartz	+ 0,02	$< 1 \%$

TABLE 2.8 – Tableau des tests de l'influence de certains paramètres du programme IAD sur la détermination des paramètres optiques μ_a et μ_s .

En conclusion, ces mesures ont permis de valider et optimiser le protocole de fabrication des fantômes. La correction de l'absorption du milieu a été effectuée pour la construction des fantômes ayant suivi la campagne de vérification.

2.2.5 Construction des fantômes

Le protocole de fabrication des fantômes est décrit en annexe [Vu-Thi, 2008]. En plus des billes et de l'encre, un fluorophore est ajouté dans les fantômes afin

que ceux-ci présentent une émission de fluorescence. Les fluorophores utilisés sont la Rhodamine B (RhB, Sigma Aldrich Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France) et la Fluorescéine (FITC, acide libre, Sigma Aldrich Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France). La concentration molaire ajoutée dans les fantômes est de $10^{-5} M$, en règle générale. Les spectres d'absorption de ces molécules ont été mesurés grâce à un spectromètre d'absorption (UVICON 932, Bio-Tek, Kontron Instrument, Milan, Italie). Le tableau 2.9 contient les valeurs des coefficients d'absorption des fluorophores à 405 nm , pour une concentration de $10^{-5} M$. Ceux-ci sont très faibles comparés aux coefficients d'absorption des tissus cérébraux. Il n'est donc pas nécessaire d'apporter de correction supplémentaire à la définition de la concentration d'encre des fantômes.

Fluorophore	$\mu_a(\text{cm}^{-1})$
FITC	0,13
RhB	0,15

TABLE 2.9 – Coefficients d'absorption mesurés des fluorophores (à 405 nm) utilisés dans la fabrication des fantômes

Les fluorophores utilisés ont été choisis pour leurs spectres d'émission de fluorescence s'approchant de ceux de certaines espèces fluorescentes contenues dans les tissus. Les spectres d'émission de la rhodamine B et de la fluorescéine sont présentés sur la figure 2.14, ils sont issus de mesures de solutions des fluorophores dilués à $10^{-5} M$ dans de l'eau distillée effectuées grâce à un spectrofluorimètre (AMINCO Bowman Series 2, Bioritech, Guyancourt, France) sous excitation à 405 nm . Chaque spectre a été normalisé par rapport à son intensité maximale d'émission de fluorescence. Le tableau 2.10 récapitule les paramètres d'intérêt des fluorophores sélectionnés.

Fluorophore	λ_{max} émission	Fluorophore endogène correspondant
FITC	515 nm	Flavine
RhB	580 nm	Lipopigment

TABLE 2.10 – Fluorophores endogènes approchés par les fluorophores choisis pour les fantômes

Géométrie des fantômes Deux géométries ont été utilisées afin d'établir des modèles réalistes de tissu (multi-couches) tumoral (inclusion spécifique) pour pouvoir caractériser certaines propriétés de détection de notre sonde. Il s'agit des géométries bicouche et à inclusions. Nos fantômes bicouche ont pour particularité de présenter des couches non parallèles, les épaisseurs des couches supérieure et inférieure varient inversement et leur somme reste constante. Chaque géométrie est détaillée ci-dessous.

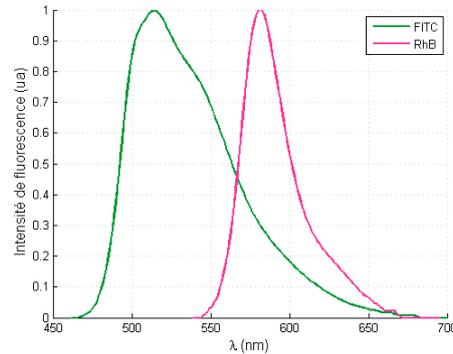


FIGURE 2.14 – Spectres d’émission de fluorescence de la rhodamine B (en rose) et de la fluorescéine (en vert), normalisés par le maximum d’intensité émise.

- * **Fantôme bicouche** : Ces fantômes sont constitués de deux couches à section verticale triangulaire superposées l’une sur l’autre, voir le schéma de la figure 2.15 a.. Les dimensions de ce fantôme sont de $L \times l \times h = 8 \times 1 \times 0,7 \text{ cm}^3$. Chaque couche contient un fluorophore différent. De cette façon, il est possible de déterminer la profondeur à laquelle le signal de la couche inférieure disparaît, par exemple. Un film plastique, dont l’effet est pris en compte, est placé entre les deux couches, de manière à prévenir la migration des fluorophores d’une couche à l’autre.
- * **Fantôme à inclusions cylindriques** : Un moule spécifique a été créé pour la fabrication de ce type de fantômes, voir la photo de la figure 2.16. Chaque fantôme contient deux groupes de trois inclusions possédant chacun une profondeur propre P pour le premier groupe et $P + 0,5 \text{ mm}$ pour le second (voir figure 2.15 b.). Les diamètres des inclusions sont de 2, 3 et 4 mm. Plusieurs profondeurs peuvent être choisies, allant de 0 à 3,5 mm, par pas de 0,5 mm. Dans ce cas, les inclusions contiennent un fluorophore différent du gel qui les entoure. Les mesures faites avec ces deux dispositifs ainsi que l’interprétation des résultats obtenus sont présentés dans la partie qui suit : « Caractérisation de la détection de la sonde ».

2.3 Caractérisation de la détection de la sonde

Comme cela a été mentionné précédemment, l’utilisation de deux fluorophores différents permet d’identifier - dans une certaine mesure - l’origine de chaque photon détecté et en particulier de savoir s’il vient des inclusions ou quelle couche l’a émis, étant donné que le signal émis par ces portions de fantôme leur est particulier. Les capacités de la sonde à détecter des objets situés en surface ou en profondeur peuvent donc être définies et déterminées en fonction des paramètres optiques des différentes couches. Les données mesurées sur fantômes ont permis de définir deux paramètres

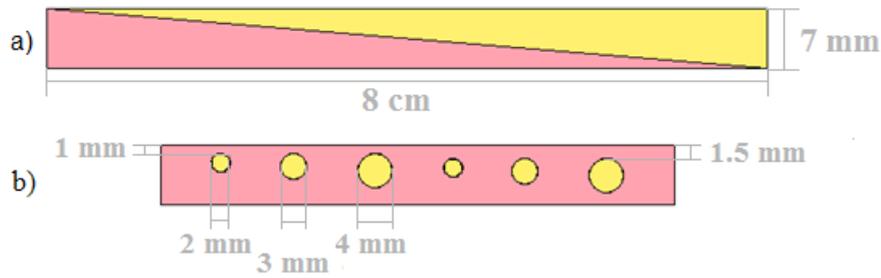


FIGURE 2.15 – Schéma des différentes géométries de fantômes.

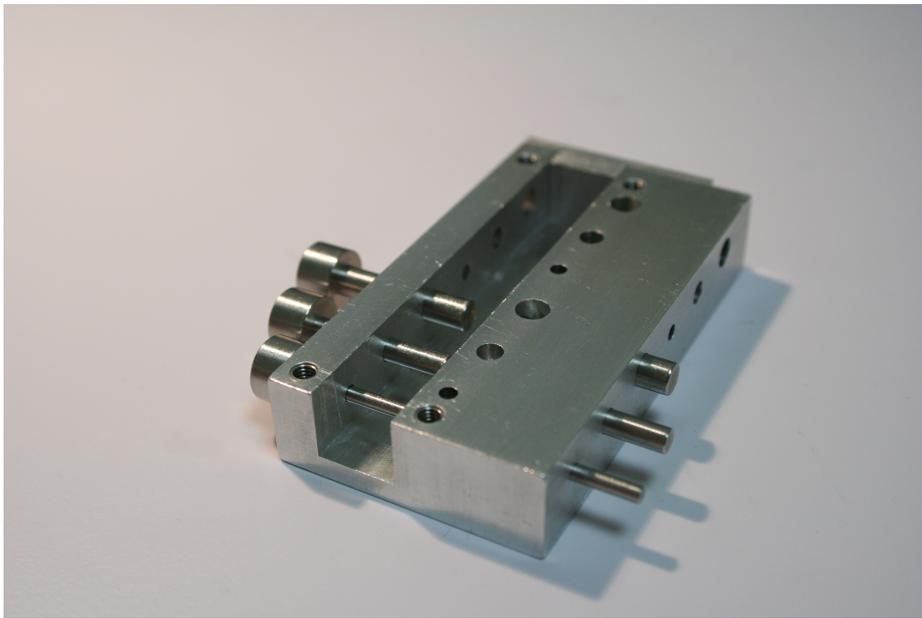


FIGURE 2.16 – Photo du moule permettant de fabriquer des fantômes à inclusion.

de détection : la détectabilité d'une couche spécifique ainsi que la profondeur effective exploitée dans le fantôme. Ces variables ainsi que les résultats leur correspondant sont explicités dans la partie présente.

2.3.1 Traitement des données, analyse générale

Un spectre caractéristique mesuré sur un fantôme bicouche, S_{tot} correspond à la somme pondérée de deux composantes : le spectre d'émission de la Rhodamine B, S_{RhB} , et celui de la Fluorescéine, S_{FITC} , voir l'équation 2.19. Avant de procéder à l'analyse, deux corrections doivent être effectuées. Dans un premier temps, il faut soustraire le bruit thermique dû au spectromètre et correspondant à une ligne de base constante. Dans un second temps, une contribution attribuée à la source laser, ainsi qu'à une faible fluorescence des billes utilisées est également soustraite. La

figure 2.17 présente à gauche un spectre auquel la ligne de base a été soustraite, la contribution du système de mesure est observable pour des longueurs d'onde proches de la longueur d'onde de coupure du filtre, soit 450 nm (filtre utilisé : OG450). À droite de la même figure se trouve le spectre après corrections. Les deux contributions, à savoir RhB et FITC, sont représentées ainsi que leur somme. Le programme de traitement, rédigé sous Matlab considère une somme pondérée des deux spectres, voir équation 2.19, qui est ajustée aux mesures par méthode des moindres carrés non linéaire. Le point de départ de l'ajustement d'un nouveau spectre est défini par les coefficients déterminés lors de l'ajustement précédent. Le coefficient de détermination ajusté, procuré par Matlab, est toujours supérieur à 0,99.

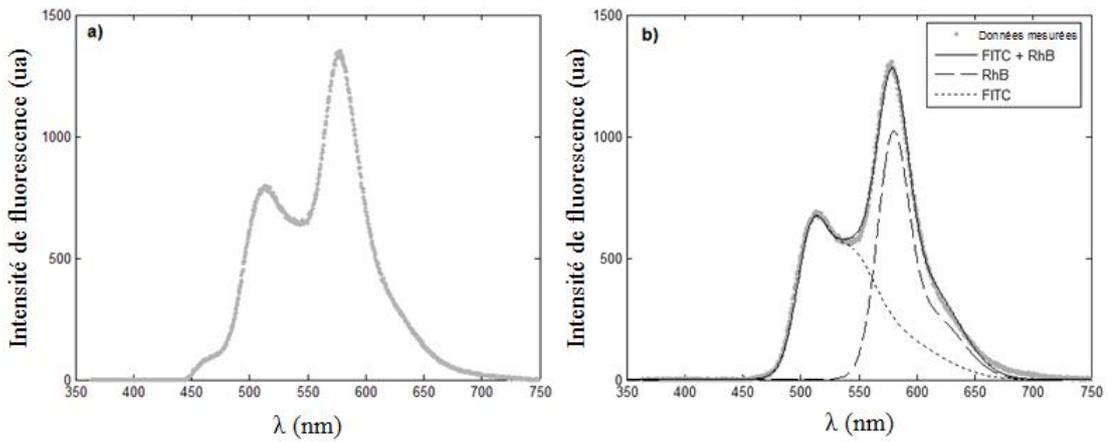


FIGURE 2.17 – a) Spectre brut mesuré sur un fantôme bicouche. b) Spectre après soustraction des contributions de bruit, présentant le traitement par ajustement des spectres

$$S_{tot}(\lambda) = f_{inf} \cdot S_{RhB}(\lambda) + f_{sup} \cdot S_{FITC}(\lambda) \quad (2.19)$$

Pour obtenir les spectres de référence : S_{RhB} et S_{FITC} , plusieurs spectres de RhB et FITC ($n = 4$ pour chaque fluorophore) ont été mesurés sur des fantômes mono-couche épais aux propriétés optiques standard, dans les mêmes conditions expérimentales. Ces courbes sont moyennées puis modélisées par des sommes pondérées de gaussiennes, deux pour la Rhodamine B et trois pour la Fluorescéine, le nombre de gaussienne étant choisi pour obtenir la meilleure correspondance mesure/somme de gaussienne (coefficient de détermination ajusté $> 0,99$). Chaque spectre de fluorophore est normalisé par rapport à l'aire sous la courbe de la Rhodamine B. De cette manière, le rendement de fluorescence est corrigé. En effet, nous avons vérifié que les coefficients f_{inf} et f_{sup} correspondent respectivement à l'aire sous la courbe du spectre de Rhodamine B et l'aire sous la courbe de FITC corrigée

du rendement de fluorescence. Pour simplifier, ces facteurs seront assimilés à une intensité de fluorescence dans la suite du chapitre.

Pour un fantôme bicouche, des spectres sont acquis le long d'une ligne de scan sur le fantôme, parcourant ainsi différentes épaisseurs du fantôme supérieur, pour lesquelles un spectre est mesuré. Les acquisitions sont faites pour un temps d'intégration de 100 *ms*. La sonde se déplace sur une ligne grâce à un moteur, à vitesse constante. Les propriétés géométriques du fantôme, la vitesse du moteur et la durée d'acquisition permettent de déterminer l'épaisseur de fantôme supérieur correspondant à l'acquisition. Un spectre caractéristique du traitement d'une ligne de scan est présenté sur la figure 2.18. Les deux contributions, intensités de la couche supérieure et inférieure, sont représentées en fonction de l'épaisseur de la couche supérieure. Sur le graphique de gauche, des imperfections dues à l'étirement du fantôme-gel sont observées. Le graphique de droite présente les mêmes données analysées lissées. Le lissage est effectué par un polynôme d'ordre 6 à 8, déterminé de manière à ce que le coefficient de corrélation entre les mesures et l'ajustement soit supérieur à 0,99. Le repérage des différents indicateurs présentés dans la suite de la partie se fait sur des données lissées.

Toujours sur la figure 2.18, nous pouvons constater que l'intensité provenant de la couche supérieure, en noir, augmente et que celle de la couche inférieure, en gris, diminue. À partir d'une épaisseur de 2 *mm* environ, les deux courbes se stabilisent : l'intensité de la courbe supérieure est maximale et celle de la couche inférieure est minimale, tendant vers zéro. Ce phénomène de plateau s'explique par la profondeur limitée de pénétration de la lumière dans les tissus. En effet, la couche inférieure n'est plus détectée, car trop profonde, et l'intensité provenant de la couche supérieure, qui peut être considérée comme un fantôme monocouche uniforme, est stable.

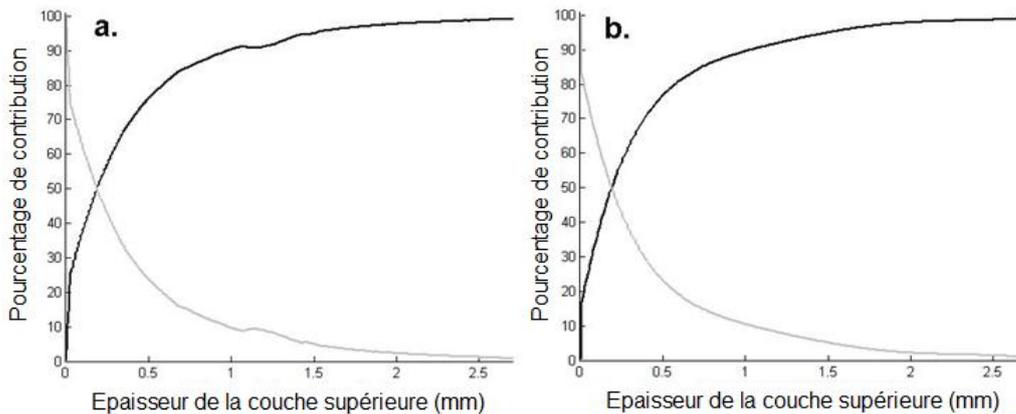


FIGURE 2.18 – a) Courbes des facteurs des couches supérieures et inférieures, f_{sup} en noir et f_{inf} en gris, en fonction de l'épaisseur e du fantôme supérieur, sur un fantôme bicouche. b) Courbes après lissage des imperfections dues à l'étirement des fantômes-gel

Effet du film L'impact sur les mesures du placement d'un film plastique entre les deux couches de fantômes a été évalué. Pour cela, un fantôme bicouche dont les paramètres optiques des deux couches sont identiques a été mesuré dans les mêmes conditions avec et sans film séparant les deux couches. Comme il est possible de l'observer sur la figure 2.19, l'intensité collectée est supérieure dans le cas où il y a un film entre les deux fantômes. Il s'agit d'une erreur systématique dans nos mesures que nous avons négligée, car la différence entre les fantômes avec et sans film est toujours inférieure à 5 %.

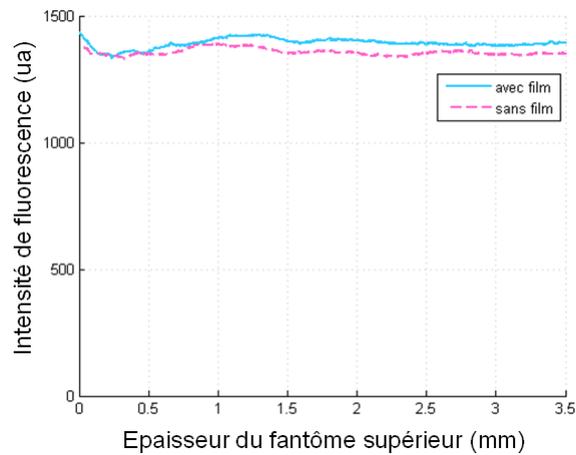


FIGURE 2.19 – Intensité mesurée dans le cas de fantômes avec et sans film séparant les deux couches

Paramètres optiques par défaut Dans la suite du chapitre, plusieurs mesures sur fantômes seront présentées. Des paramètres optiques standards sont définis : $\mu_a = 3 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0,87$ et $[Fluorophore] = 10^{-5} \text{ M}$. Si aucune précision n'est apportée, ces paramètres sont utilisés par défaut.

2.3.2 Profondeur effective

Dans un premier temps, un indicateur a été défini, de manière à présenter une information sur les capacités de détection de la sonde en profondeur. La grandeur $e_{80\%}$ est l'épaisseur de la couche qui fournit 80 % du signal détecté pour la couche supérieure. Cette grandeur est désormais appelée « profondeur effective ». Celle-ci est déterminée grâce à la normalisation de la courbe d'intensité en fonction de l'épaisseur e , par rapport à l'intensité maximale collectée sur le fantôme monocouche ou sur la couche supérieure d'un fantôme bicouche (voir équation 2.20), soit l'intensité lorsque l'épaisseur e tend vers l'infini.

$$P_{couche\ sup}(e) = \frac{f_{sup}(e)}{f_{sup\ max}} \quad (2.20)$$

Fantôme monocouche Un fantôme monocouche correspond à la couche supérieure d'un fantôme bicouche, la couche inférieure étant remplacée par un matériau très absorbant. Plusieurs fantômes ($n = 4$) ont été fabriqués, le coefficient de diffusion est compris entre 100 à 400 cm^{-1} . Les quatre courbes d'intensité obtenues en fonction de l'épaisseur du fantôme sont représentées sur la figure 2.20. Lorsque les courbes sont normalisées par rapport à l'intensité maximale, soit celle du plateau observé pour des épaisseurs supérieures à $1,5 \text{ mm}$, elles se superposent, avec un écart relatif moyen inférieur à 2 % et un écart relatif maximal de 20 %. La variation d'intensité entre les coefficients de diffusion est constante. Pour une augmentation du μ_s de 100 cm^{-1} , l'intensité est augmentée d'un facteur $1,2 \pm 0,1$, soit la moyenne et l'écart-type déterminé grâce aux courbes présentés sur la figure 2.20. Le tableau 2.11 présente les profondeurs effectives du signal pour les différents coefficients de diffusion. Ce paramètre ne semble pas varier significativement en fonction de μ_s et est d'environ $0,56 \pm 0,05 \text{ mm}$, correspondant à la moyenne et l'écart-type des valeurs présentées dans le tableau 2.11. Une erreur statistique a été déterminée en calculant l'écart-type entre les $e_{80\%}$ déterminés sur plusieurs fantômes aux propriétés optiques identiques ($n = 8$) et est estimée à $0,06 \text{ mm}$. Cette erreur est du même ordre que l'écart-type des valeurs du tableau 2.11, ce qui renforce la conclusion de non dépendance de la profondeur effective de diffusion en fonction du paramètre de diffusion.

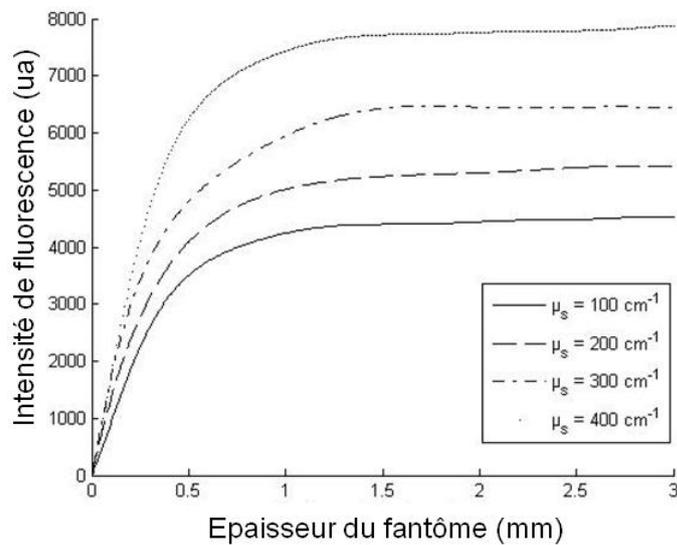


FIGURE 2.20 – Courbes d'intensité de fluorescence totale mesurées sur des fantômes monocouche triangulaires, pour différents coefficients de diffusion

Fantômes bicouches Dans ce cas, les paramètres optiques des deux couches sont identiques, exception faite du fluorophore. Nous allons observer deux cas, la variation du coefficient de diffusion et celle du coefficient d'absorption. Dans le cas de

μ_s (cm^{-1})	$e_{80\%}$ (mm)
100	0,53
200	0,57
300	0,62
400	0,50

TABLE 2.11 – Tableau présentant les profondeurs effectives pour des fantômes monocouches de paramètres optiques fixes $\mu_a = 3\text{ cm}^{-1}$, $g = 0,87$, $[RhB] = 10^{-4}\text{ M}$ pour différents μ_s .

variation du μ_s , le μ_a est fixé à 3 cm^{-1} et pour des μ_a différents, $\mu_s = 100\text{ cm}^{-1}$. Chaque point d'une courbe représente la moyenne entre deux valeurs de $e_{80\%}$, déterminée sur deux lignes de mesures acquises sur un même fantôme, l'écart moyen entre ces mesures pour les différents fantômes est inférieur à 2 %. La barre d'erreur de $\pm 0,06\text{ mm}$ provient d'un écart-type entre 8 valeurs de profondeur effective, calculées sur 8 fantômes aux propriétés optiques identiques. La figure 2.21 a. présente la variation de $e_{80\%}$ en fonction du coefficient de diffusion et la figure 2.21 b. en fonction du coefficient d'absorption.

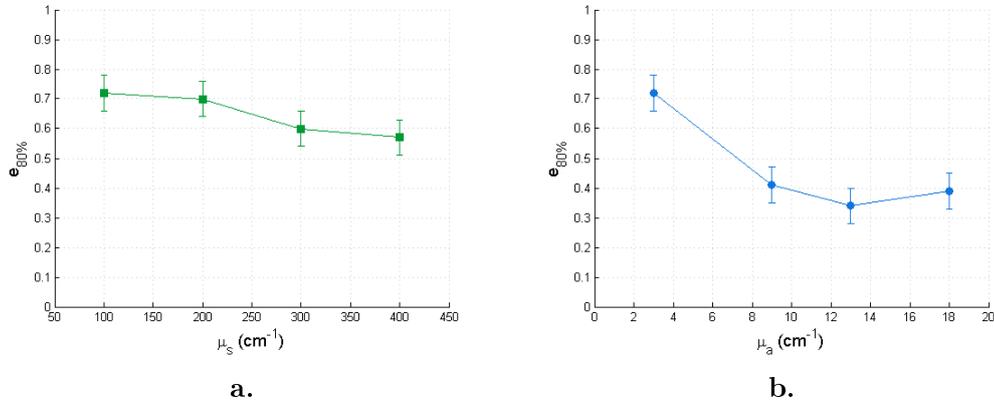


FIGURE 2.21 – Variation de l'épaisseur de détection de 80 % du signal de la couche supérieure en fonction de μ_s (a.) et de μ_a (b.).

Afin de déterminer si la profondeur effective de détection varie avec un paramètre ou pas, nous avons comparé l'écart-type des points de la courbe, $S_{80\%}$, avec le double de l'erreur statistique, $\sigma_{80\%} = 0,06\text{ mm}$, correspondant à 95 % de l'intervalle de confiance (la normalité des résultats a été vérifiée par un test de Shapiro). Si le critère présenté dans l'équation 2.21 est validé, alors $e_{80\%}$ est dépendant du coefficient varié dans la courbe considérée.

$$S_{80\%} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(e_{80\%}^{(i)} - e_{80\%}^- \right)^2} \geq 2 \cdot \sigma_{80\%} \quad (2.21)$$

En appliquant cette méthode, nous trouvons que, sur la courbe 2.21 a., $S_{80\%} = 0,08 \text{ mm}$ est inférieur à $2 \cdot \sigma_{80\%} = 0,12 \text{ mm}$, nous ne pouvons donc pas considérer que la profondeur de détection varie avec le coefficient de diffusion. Cette conclusion rejoint celle faite sur le fantôme monocouche. Concernant la figure 2.21 b., le point correspondant à $\mu_a = 3 \text{ cm}^{-1}$ est statistiquement différent des trois autres, qui eux, ne peuvent être différenciés.

Nous pouvons conclure que la profondeur effective de détection ne varie pas en fonction du coefficient de diffusion, mais dépend du μ_a . Pour un coefficient d'absorption de 3 cm^{-1} , $e_{80\%}$ est d'environ $0,65 \pm 0,08 \text{ mm}$, et diminue à une valeur de $0,38 \text{ mm}$ pour des μ_a plus élevés.

2.3.3 Fantômes bicouches : détectabilité

Dans cette partie, les coefficients optiques des couches supérieure et inférieure ne sont pas toujours identiques. Ces nouvelles analyses ont pour but d'apporter une information sur la capacité de la sonde à détecter l'une ou l'autre couche des deux couches différentes superposées. Les résultats procureront une estimation nécessaire au futur acte chirurgical. Ces résultats seront approchés par la détection ou non d'une couche tumorale surfacique ou en profondeur. Pour ce faire, deux nouveaux indicateurs sont définis :

- e_{min} , soit l'épaisseur minimale du fantôme supérieur nécessaire à sa propre détection
- e_{max} , l'épaisseur maximale du fantôme supérieur permettant la détection de la couche inférieure

Ces grandeurs sont définies sur les courbes de ligne de mesures normalisées par la somme des intensités de chaque couche. Les calculs de ces contributions sont explicités sur les équations 2.22. La figure 2.22 présente une définition graphique des deux nouveaux paramètres, repérés sur les courbes de contribution des différentes couches. La grandeur e_{min} correspond à une contribution de 10 % de la couche supérieure au signal total enregistré. Elle illustre la capacité à détecter une couche tumorale en surface. Si une couche a une épaisseur supérieure à e_{min} , elle sera considérée détectable. Le coefficient e_{max} est égal à une épaisseur de la couche supérieure correspondant à une contribution de 10 % de la couche inférieure au signal total. Dans ce cas, la couche tumorale est considérée comme étant couverte par une couche de tissu sain. Si la couche de tissu sain est d'épaisseur inférieure à e_{max} , la couche tumorale est détectable. La valeur de 10 % ne fait pas référence à une référence bibliographique particulière. Elle a été définie car elle donne un ordre de grandeur raisonnable pour la détectabilité. Evidemment, cette détectabilité dépendra aussi de l'écart des longueurs d'onde à distinguer.

$$C_{sup}(e) = \frac{f_{sup}(e)}{f_{sup}(e) + f_{inf}(e)} \quad C_{inf}(e) = \frac{f_{inf}(e)}{f_{sup}(e) + f_{inf}(e)} \quad (2.22)$$

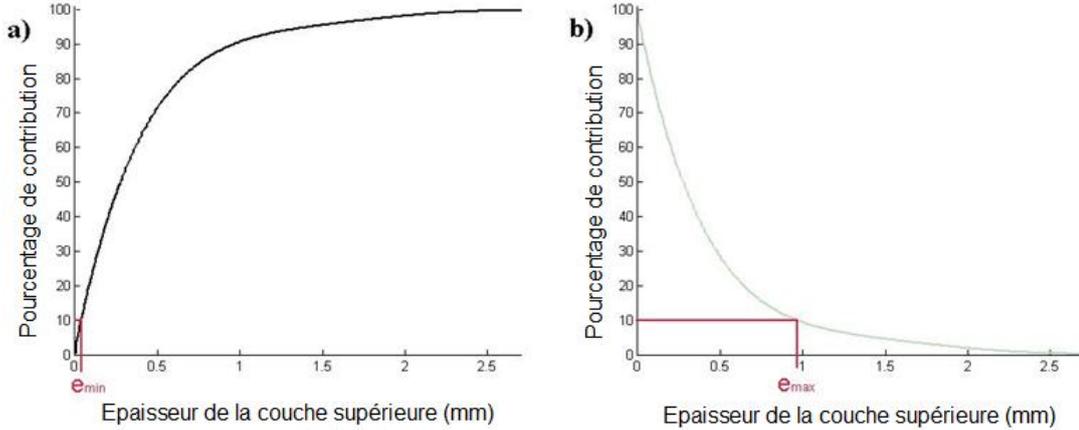


FIGURE 2.22 – a) Courbe de contribution de la couche supérieure (C_{sup}), définition de e_{min} . b) Courbe de contribution de la couche inférieure (C_{inf}), définition de e_{max} .

Chaque point des courbes suivantes correspond à la moyenne entre deux détermination de e_{max} sur deux lignes de mesures effectuées sur un même fantôme. Une erreur statistique de $\pm 0,13 \text{ mm}$ est définie par l'écart-type entre des valeurs de e_{max} calculées sur différents fantômes ($n = 8$).

Variation de μ_s Dans cette partie, une variation du coefficient de diffusion des fantômes est étudiée, le coefficient d'absorption étant fixé à 3 cm^{-1} . La figure 2.23 présente l'épaisseur maximale de la couche supérieure en fonction du μ_s de la couche supérieure. Chaque courbe correspond à un μ_s de la couche inférieure fixé.

Un critère identique à celui présenté dans l'équation 2.21 a été utilisé pour définir si la variation observée était significative ou non. Dans ce cas, la valeur critique est de $2 \cdot \sigma_{max} = 0,26 \text{ mm}$ et l'écart-type S_{max} est calculé pour des valeurs e_{max} en fonction d'un μ_s fixé, soit pour la couche inférieure, soit pour la couche supérieure. Les tableaux 2.12 présentent les valeurs de S_{max} calculées dans tous les cas possibles. Le tableau 2.12 a. contient les valeurs de S_{max} calculé pour un coefficient de diffusion de la couche supérieure fixé et un μ_s de la couche inférieure modifié. Dans le cas du tableau 2.12 b., c'est le μ_s supérieur qui est changé et le μ_s de la couche inférieure est fixe.

En comparant les valeurs des tableaux 2.12 à la valeur critique σ_{max} , nous pouvons déduire que l'épaisseur maximale de détection ne dépend pas du coefficient de diffusion de la couche inférieure, mais il est influencé par le μ_s de la couche supérieure. Plus la couche supérieure est diffusante, plus l'épaisseur e_{max} est fine,

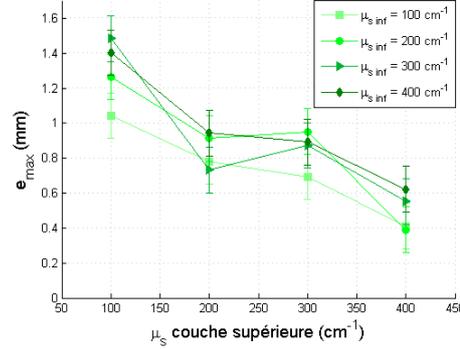


FIGURE 2.23 – Variation de l'épaisseur maximale de fantôme supérieur permettant la détection de la couche inférieure en fonction de différents coefficient de diffusion des deux couches.

$\mu_{s_{sup}}$ fixé (cm^{-1})	S_{max} (mm)
100	0,19
200	0,10
300	0,11
400	0,11

a.

$\mu_{s_{inf}}$ fixé (cm^{-1})	S_{max} (mm)
100	0,29
200	0,36
300	0,40
400	0,32

b.

TABLE 2.12 – Tableau des écart-types S_{max} pour chaque courbe et chaque paramètre de diffusion de la couche inférieure ou supérieure.

avec des valeurs moyennes comprises entre 1,3 et 0,49 mm. Une diffusion élevée correspond à un libre parcours moyen faible dans les tissus. Si nous considérons un nombre moyen de pas de diffusion constant quel que soit μ_s , un photon pénétrera moins profondément dans un tissu à coefficient de diffusion plus élevé. Ceci peut expliquer qualitativement la diminution de e_{max} pour des μ_s plus élevés.

La grandeur e_{min} liée à la détection de la couche supérieure est faible. Dans tous les cas de variation de la diffusion des deux couches, l'épaisseur minimale de détectabilité de la couche supérieure ne dépasse pas les 50 μm , avec une valeur moyenne autour de 20 μm .

Variation de μ_a Une étude similaire à celle de variation du μ_s est menée en faisant varier le coefficient d'absorption. Les figures 2.24 présentent les résultats de détermination de e_{max} en fonction du μ_a de la couche supérieure, chaque courbe correspondant à un μ_a inférieur fixé. L'écart-type S_{max} est également calculé dans ces cas et les résultats sont récapitulés dans les tableaux 2.13.

Les tableaux 2.13 a. et b. ne permettent pas de conclure en faveur d'une dépendance quelconque de l'épaisseur e_{max} en fonction du coefficient d'absorption dans la

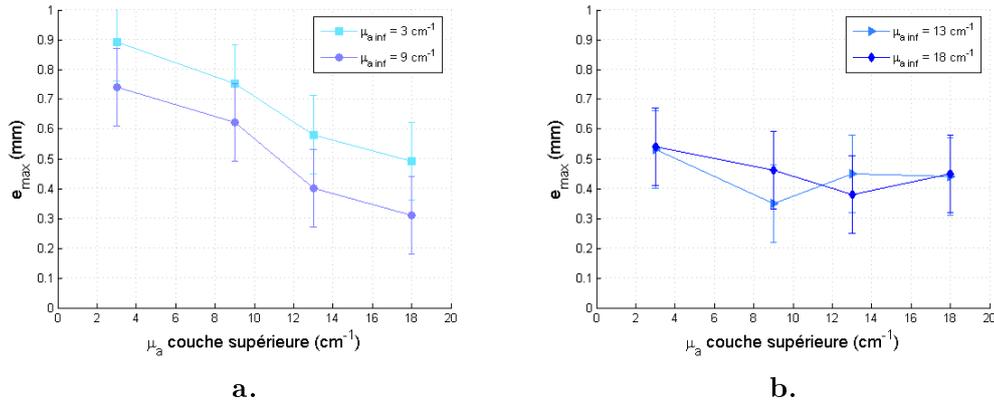


FIGURE 2.24 – Variation de l'épaisseur maximale de fantôme supérieur permettant la détection de la couche inférieure en fonction de différents coefficient de d'absorption des deux couches.

$\mu_{a\ sup}$ fixé (cm^{-1})	S_{max} (mm)
3	0,17
9	0,17
13	0,09
18	0,07

a.

$\mu_{a\ inf}$ fixé (cm^{-1})	S_{max} (mm)
3	0,16
9	0,20
13	0,07
18	0,07

b.

TABLE 2.13 – Tableau des écart-types S_{max} pour chaque courbe et chaque paramètre d'absorption de la couche inférieure ou supérieure.

gamme comprise entre 3 et 18 cm^{-1} . Qualitativement, nous pouvons observer une diminution de e_{max} en fonction du μ_a de la couche supérieure, et cela pour des μ_a de la couche inférieure faible (voir figure 2.24 a.).

Lors des variations du coefficient d'absorption, les valeurs déduites de e_{min} sont toujours inférieure à 70 μm , pour un valeur moyenne de 30 μm .

Le tableau 2.14 récapitule les dépendances des indices étudiés, $e_{80\%}$ et e_{max} , en fonction des paramètres optiques d'absorption et de diffusion pour des fantômes bicouches.

Dépendance	$e_{80\%}$	e_{max}
μ_s	Non	pour $\mu_s\ inf$: Non pour $\mu_s\ sup$: Oui
μ_a	Oui	Non

TABLE 2.14 – Tableau récapitulatif des dépendances de $e_{80\%}$ et e_{max} en fonction des paramètres optiques.

2.3.4 Fantômes à inclusions

La photo 2.25 présente un fantôme en Rhodamine B contenant des inclusions de Fluorescéine à des profondeurs de 1 et 1,5 mm. Il n'y a pas de film entre les inclusions et le gel environnant. Les mesures sont donc effectuées au plus vite afin de minimiser l'effet dû à la migration des fluorophores des inclusions vers le gel environnant et inversement.

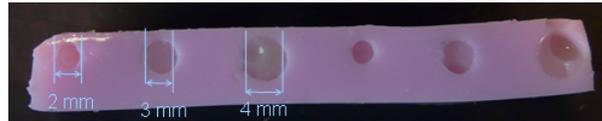


FIGURE 2.25 – Photo d'un fantôme à inclusions. Paramètre optiques par défaut du gel environnant en RhB, inclusions en FITC, $\mu_s = 150 \text{ cm}^{-1}$

Les figures 2.26 a. et b. présentent l'intensité de fluorescence du gel environnant et des inclusions, respectivement. Les inclusions peuvent donc être repérées par des pics d'augmentation du signal provenant de l'inclusion et/ou de la baisse d'intensité de la fluorescence émise par le gel environnant. Il s'agit dans un premier temps d'évaluer la qualité de la fabrication des fantômes, ce qui sera présenté dans le paragraphe suivant. Cette étude est motivée par l'envie de déterminer si la baisse d'intensité de fluorescence de la RhB, observable sur un fantômes à inclusions de FITC, voir figure 2.26 a., est représentative de la présence d'une inclusion ou est due à la méthode de construction des fantômes : bulles aléatoires remplies d'eau entre inclusions et gel environnant, par exemple.

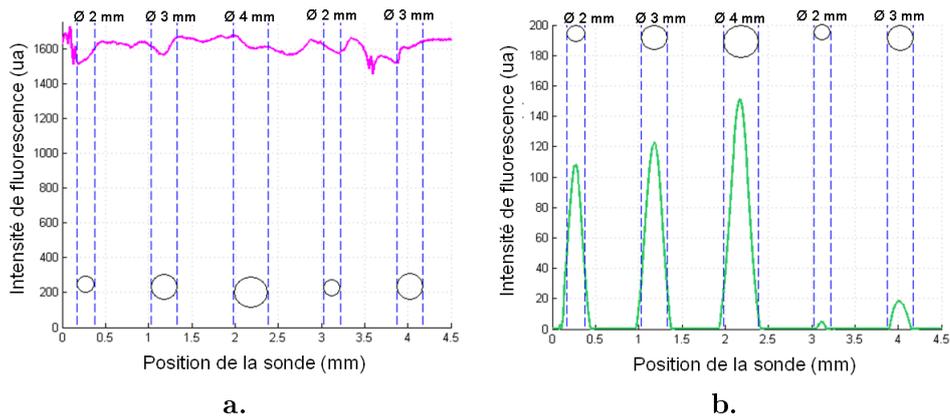


FIGURE 2.26 – Intensité de fluorescence du gel environnant (a.) et des inclusions (b.). Paramètre optiques par défaut du gel environnant en RhB, inclusions en FITC, $\mu_s = 150 \text{ cm}^{-1}$.

Qualité des fantômes à inclusions Afin d'évaluer la qualité des fantômes à inclusion fabriqués, plusieurs fantômes contenant des inclusions aux propriétés optiques strictement identiques à celles du gel environnant ont été fabriqués. Plusieurs de ces fantômes « uniformes » ont été testés pour évaluer l'écart moyen des valeurs d'intensité mesurées par rapport à un fantôme monocouche ($n = 6$). L'écart-type σ de l'ensemble de ces mesures a été estimé à environ 1,6 % de l'intensité de fluorescence. Le signal mesuré varie toujours entre $\pm 5\%$ ($\simeq 3\sigma$) autour de l'intensité d'un fantôme monocouche ayant les mêmes paramètres optiques et concentration de fluorophores.

Détection en fonction de la profondeur Pour un ensemble de paramètres optiques du gel environnant et des inclusions invariants, des fantômes ont été fabriqués, afin de permettre l'évaluation de la détectabilité des inclusions pour des profondeurs de 0 à 3,5 mm, et toujours pour des diamètres d'inclusion de 2, 3 et 4 mm. La figure 2.27 présente l'intensité de fluorescence provenant des inclusions mesurée pour un scan sur le fantôme. Les contributions provenant des inclusions sont calculées selon la même méthode de détectabilité, déjà utilisée pour les fantômes bicouches, analogues des équations 2.22. Chaque inclusion est ajustée par une gaussienne, en rouge sur la figure 2.27. Les paramètres d'intérêts sont le maximum et la largeur totale à mi-hauteur (LTMH). L'erreur sur l'intensité maximale mesurée sur une inclusion a été calculée à l'aide de 6 fantômes comportant chacun 6 inclusions, la moitié à une profondeur de 1 mm et les autres à 1,5 mm de profondeur. La variation moyenne de l'intensité maximale a été estimée grâce à un écart-type relatif et est de l'ordre de 1 %, avec un écart-type maximal de 3 %.

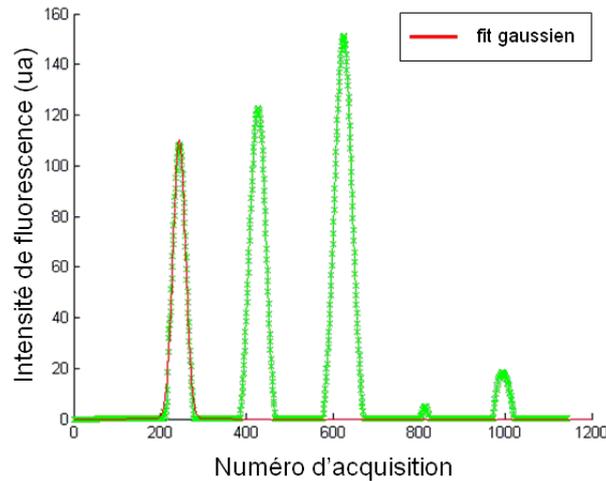


FIGURE 2.27 – Exemple d'ajustement d'une gaussienne sur un pic de fluorescence mesurée provenant d'une inclusion de diamètre 2 mm et de profondeur 1 mm.

La figure 2.28 récapitule les maxima de contribution des inclusions pour les différentes profondeurs et diamètres. Les contributions à une profondeur de 0 mm

sont inférieures à 100 %. Ceci s'explique par la résolution spatiale de la sonde qui est de $500 \mu\text{m}$ et mesure donc une surface supérieure à l'affleurement de l'inclusion. Le trait rouge représente la limite de détectabilité de 10 % définie dans le paragraphe plus haut. La détection est quasi-indépendante du diamètre des inclusions, lorsqu'il est compris entre 2 et 4 mm. La profondeur maximale de l'inclusion permettant sa détection est d'environ 0,9 mm.

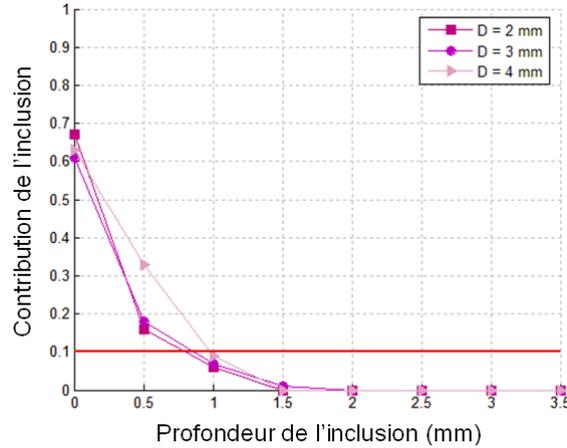


FIGURE 2.28 – Contribution maximale des inclusions en pourcentage de la totalité du signal collecté pour différentes profondeurs et diamètres.

Les largeurs à mi-hauteur des gaussiennes ajustées ne varient pas avec la profondeur de l'inclusion. Le tableau 2.15 contient les valeurs moyennes de largeur à mi hauteur pour les différents diamètres. Le rapport entre la LTMH et le diamètre est constant et d'environ 0,6.

Diamètre (mm)	LTMH (mm)
2	$1,3 \pm 0,5$ ($n = 4$)
3	$1,8 \pm 0,2$ ($n = 4$)
4	$2,4 \pm 0,2$ ($n = 4$)

TABLE 2.15 – Tableau des largeurs totales à mi hauteur moyennes mesurées pour les inclusions de différents diamètres.

En conclusion de cette partie, nous avons déterminé la limite de détection, définie comme une contribution minimale de 10 % du signal total mesuré, à une profondeur légèrement inférieure à 1 mm. Néanmoins, le signal provenant des inclusions est très bien défini grâce à la méthode d'ajustement des spectres d'émission, et ce même pour des profondeurs supérieures. La valeur seuil de détection définie arbitrairement à 10 % du signal total semble trop radicale. En effet, il est possible, grâce à la méthode de traitement des spectres, de détecter des inclusions plus profondément que le seuil défini.

Variation μ_s Dans cette partie, nous allons étudier la contribution maximale des pics dus aux inclusions en fonction de différents coefficients de diffusion des inclusions. Pour des inclusions profondes d'un millimètre, la figure 2.29 montre la variation de la contribution des pics pour différents diamètres des inclusions. Les valeurs sont très proches, mais nous pouvons tout de même constater que les inclusions de diffusion inférieure à 100 cm^{-1} sont moins bien détectées que celles qui possède un μ_s plus élevé. La contribution maximale de signal détecté pour l'inclusion semble constant, indépendamment du diamètre ou du coefficient de diffusion, tant que celui-ci est compris entre 150 et 350 cm^{-1} . Les largeurs à mi-hauteur sont équivalentes à celles présentées dans le tableau 2.15.

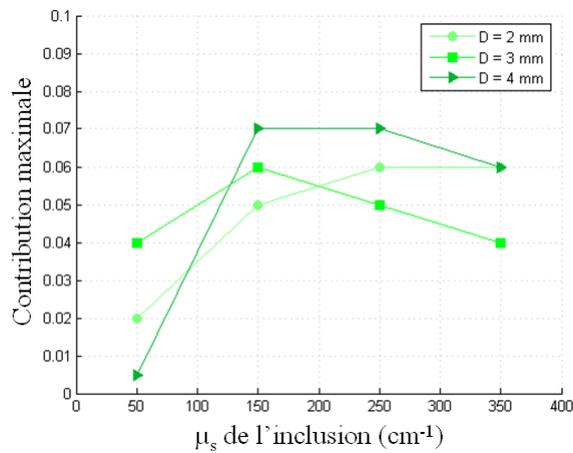


FIGURE 2.29 – Contribution maximale des inclusions pour différentes profondeurs et diamètres.

Distance optimale de détection Nous avons déjà vu que la distance entre la sonde et le tissu influe sur l'intensité détectée par la sonde. Dans ce paragraphe, la distance entre la sonde et le tissu est variée afin de voir l'influence sur la détection d'une inclusion et en fonction de sa profondeur. Les paramètres fixes de l'inclusion sont ses paramètres optiques et son diamètre. Les différentes profondeurs de l'inclusion sont comprises entre 1 et 2 mm . Sur la figure 2.30 a., nous nous sommes placés au dessus d'une inclusion et avons fait varier la distance sonde-tissu H et pour plusieurs profondeurs de l'inclusion. L'intensité de fluorescence collectée du gel environnant ne change pas avec la profondeur.

La figure 2.30 b. illustre l'intensité provenant de l'inclusion en fonction de la distance sonde-tissu pour différentes profondeurs. Elles varient en fonction de la distance sonde-tissu. Ces courbes ont été normalisées, par rapport au maximum d'intensité détectée par inclusion pour définir la distance optimale, H_{opt} , pour chaque profondeur. Le tableau 2.16 présente les valeurs de H_{opt} déterminées. Nous pouvons observer que la distance optimale de détection est augmentée pour des inclusions plus profondes.

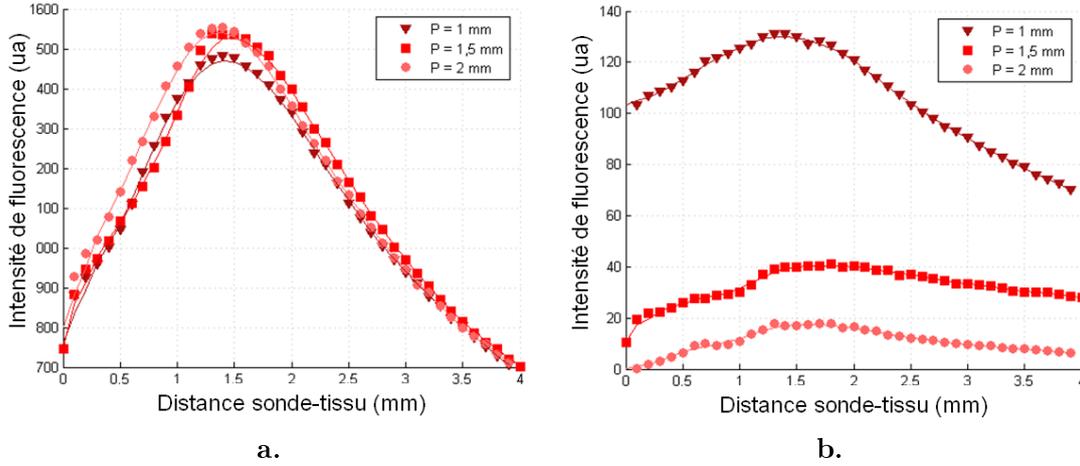


FIGURE 2.30 – Intensité de fluorescence du gel environnant (a.) et des inclusions (b.) en fonction de la distance sonde-tissu. Paramètres optiques par défaut du gel environnant en RhB, inclusions en FITC, $\mu_s = 150 \text{ cm}^{-1}$.

Profondeur (mm)	H_{opt} (mm)
1	1,4
1,5	1,7
2	1,7

TABLE 2.16 – Tableau des distances optimales de détection d’une inclusion de 3 mm en fonction de la profondeur de celle-ci.

2.4 Conclusion

Le système de mesure utilisé permet d’effectuer des mesures spectrales à deux longueurs d’onde, 375 et 405 nm. Le système d’injection permet une transmission d’un signal monochromatique et à 40 % de l’intensité en sortie de laser, cela étant dû au filtre passe-bande. L’aspect pulsé des lasers permet une éventuelle mesure des propriétés de temps de vie de fluorescence. La sonde disponible, S11 – 600, est composée de deux fibres, une transmettant la lumière d’excitation et l’autre collectant la fluorescence mesurée. Sa distance optimale de détection est de 1,5 mm et sa résolution spatiale de 500 μm .

Les paramètres optiques possibles de nos fantômes sont compris dans la gamme de coefficients mesurés dans le tissu cérébral humain (sain ou tumoral) : le coefficient de diffusion varie entre 100 et 400 cm^{-1} , le coefficient d’absorption entre 3 et 20 cm^{-1} . Plusieurs géométries de fantômes peuvent être fabriquées : des fantômes bicouches non parallèles dont l’épaisseur supérieure varie de 0 à 7 mm et des fantômes à inclusions de profondeurs et diamètres variés.

Les incertitudes des mesures sont essentiellement reliées à la reproductibilité des fantômes. Sont à noter en particulier le possible étirement des gels, la précision limitée dans l'estimation de l'épaisseur d'une couche, l'effet du film séparant deux couches et, bien sûr, la régularité atteignable dans la reproduction des paramètres optiques et des sondes. Nous estimons que ces limites expérimentales expliquent les barres d'erreur des mesures qui ont été discutés en détail dans les parties précédentes.

Les différents paramètres possibles ont permis de quantifier de manière précise la profondeur effective d'un tissu qui est analysée avec notre système de mesures spectrales d'autofluorescence. Selon les paramètres optiques, cette profondeur effective varie entre 0,2 et 1 *mm*. Au-delà de cette analyse, nous avons également pu évaluer la détectabilité de tissu tumoral en fonction de son épaisseur, lorsqu'il se trouve à la surface, ou en fonction de sa profondeur, soit s'il est couvert par une couche de tissu sain. En surface, les épaisseurs minimales détectables sont d'environ $0,07 \pm 0,02$ *mm*. En profondeur, une couche tumorale peut être détectée sous une couche saine dont l'épaisseur est inférieure à 1,3 *mm*. Lorsqu'il s'agit d'inclusions, la profondeur de détection correspond à 0,9 *mm*. Nous avons pu constater que la taille des inclusions a peu d'impact sur cette détectabilité.

En résumé, notre système expérimental et nos outils de fantôme nous ont permis de faire une estimation de l'ordre de grandeur des capacités de notre système. Dans le chapitre suivant, nous verrons un deuxième outil, celui d'un programme de simulation Monte-Carlo, qui lui permet, entre autre, une validation des résultats présentés dans ce chapitre.

Programme de simulation : vers une systématisation de la caractérisation

*The important thing in science is not so much to obtain
new facts as to discover new ways of thinking about
them.*

William Bragg

Sommaire

3.1	Principe de fonctionnement de la simulation Monte-Carlo	94
3.1.1	Définition générale	94
3.1.2	Application à la propagation de la lumière dans les tissus	94
3.1.3	Programme de simulations : modifications	99
3.2	Validation : comparaison à la littérature	106
3.3	Validation : comparaisons simulations-expériences	108
3.3.1	Fantômes monocouches	108
3.3.2	Fantômes bicouches	110
3.3.3	Fantômes à inclusions	113
3.4	Variation des paramètres de la sonde	113
3.4.1	Angle de collection	116
3.4.2	Distance entre les deux fibres	116
3.5	Conclusion et perspectives	118

Lors du chapitre précédent, nous avons présenté une méthode de caractérisation de notre sonde à l'aide de fantômes optiques calibrés. Cette démarche peut être couteuse, mais elle est surtout chronophage, car de nombreux fantômes et sondes doivent être construits et testés. Une méthode alternative plus efficace et systématique pour caractériser des systèmes adaptés est d'avoir recours à un programme de simulations adapté à notre dispositif de mesure. Au-delà du développement d'un tel

programme, une étape de sa validation est nécessaire. Celle-ci consiste en la comparaison de données simulées et mesurées. Suite à la validation, la caractérisation d'un grand nombre de sondes à géométries variable peut être effectuée.

3.1 Principe de fonctionnement de la simulation Monte-Carlo

Une méthode est dite de Monte-Carlo lorsqu'elle utilise des procédés aléatoires afin de calculer des valeurs numériques illustrant le phénomène d'intérêt. Cette dénomination fait référence aux jeux de hasard organisés à Monte-Carlo. Elle date de 1947, introduite par Nicholas Metropolis et Stanislas Ulam [Nicholas Metropolis, 1949]. La résolution de problème grâce à ces méthodes couvre de nombreux domaines comme les mathématiques, les sciences physiques, la biologie, mais également l'économie, la finance et la sociologie.

3.1.1 Définition générale

Les simulations Monte-Carlo sont utilisées pour résoudre des problèmes complexes, décrits à travers des modèles déterministes. Ceux-ci nécessitent la génération de paramètres aléatoires afin de calculer des solutions. Cette étape est répétée un grand nombre de fois afin d'appréhender la solution du problème. La figure 3.1 présente les 5 étapes simplifiées de la simulation Monte-Carlo. La nécessité d'itérer la génération de solutions un grand nombre de fois en fait un procédé très long, nécessairement traité par ordinateur.

3.1.2 Application à la propagation de la lumière dans les tissus

Au fil du temps et des recherches en physique, plusieurs théories définissant les phénomènes lumineux ont été développées. Dès l'Antiquité, l'optique géométrique considère la lumière comme des rayons rectilignes et permet d'expliquer la réflexion et la réfraction. Vient ensuite l'optique ondulatoire qui explique d'autres manifestations optiques comme la diffraction et la polarisation. Maxwell intègre l'optique ondulatoire à sa théorie, faisant des rayons lumineux des ondes électromagnétique. Puis, au début du XX^e siècle, Einstein introduit l'optique corpusculaire décrivant la lumière comme un ensemble de grains de lumière, appelés photons. Cette nouvelle théorie permet de décrire des effets, comme l'effet Compton, observés mais non expliqués auparavant. Louis de Broglie unifie les théories corpusculaires et électromagnétiques par sa théorie de l'optique quantique.

Pour un programme de simulation Monte-Carlo, la première étape indiquée sur le schéma de la figure 3.1 indique la nécessité de définir un modèle. Celui-ci doit donc se trouver dans l'une des théories décrites dans le paragraphe précédent. Pour le passage de photons dans un tissu, certains phénomènes décrits y sont marginaux. Par exemple, le modèle ne nécessite pas de traiter la polarisation, les interférences ou encore l'effet Compton. La théorie du transfert, modèle simplifié réutilisant les

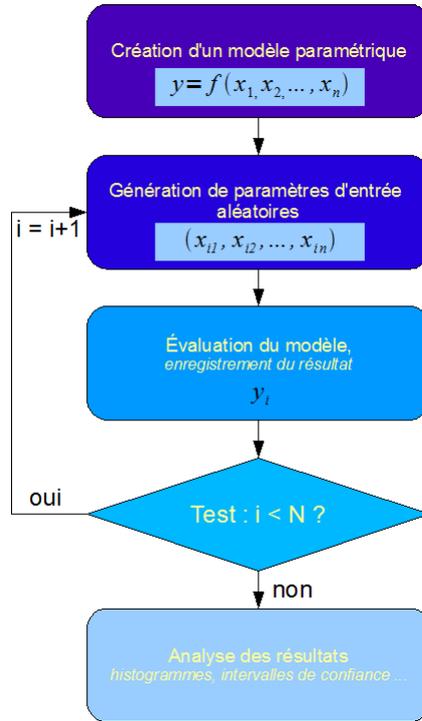


FIGURE 3.1 – Étapes simplifiées d’une simulation Monte-Carlo. N correspond au nombre total de photons lancés dans le tissu

différentes théories optiques, est caractérisée par l’équation du transfert radiatif (ETR) qui décrit le transport des photons dans les milieux troubles, comme les tissus biologiques. Cette équation considère les photons associés à un quantum d’énergie et sans interactions ni collisions les uns avec les autres.

La théorie du transfert est donc utilisée pour traduire le modèle dans une simulation Monte-Carlo. De nombreux groupes ont développé des programmes de transport de la lumière dans les tissus [S. A. Prahl, 1989; Wang et al., 1995]. Nous avons choisi de nous baser sur un programme existant et disponible librement : MCML, pour Monte-Carlo Multi-Layer [Wang et al., 1995]. Il semblait facilement adaptable à nos fantômes comportant plusieurs couches ainsi qu’à nos sondes. Chaque couche étant caractérisée par une épaisseur d et un ensemble de propriétés optiques, à savoir l’indice de réfraction n , le coefficient d’absorption μ_a , le coefficient de diffusion μ_s et l’anisotropie de diffusion g . Dans la suite de cette partie, nous allons nous concentrer sur l’explication du fonctionnement de ce programme, schématisé sur la figure 3.2, avant d’écrire ensuite les modifications que nous avons entreprises.

3.1.2.1 Initialisation du paquet de photons

Dans sa version initiale, le programme n’envoie pas de photon unique dans le tissu mais considère un paquet de photons, auquel un poids initial, $w_0 = 1$, est

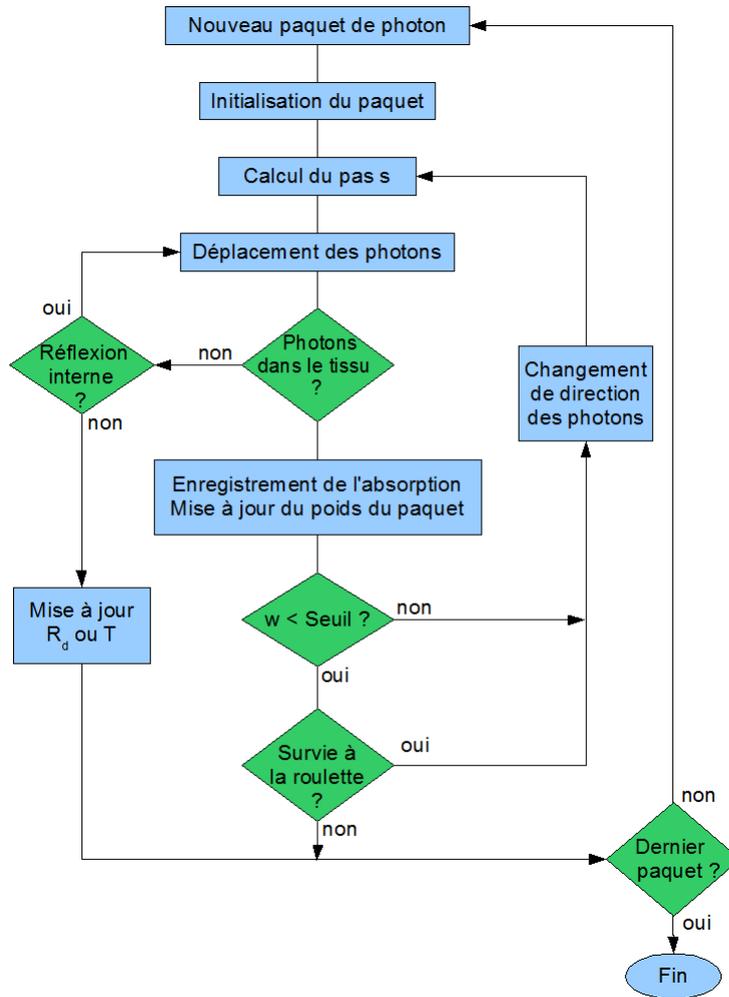


FIGURE 3.2 – Schéma de fonctionnement du programme de simulation MCML, d’après [S. A. Prahl, 1989; Wang et al., 1995].

attribué. C’est ce paquet de photons qui est envoyé dans le tissu et dont la trajectoire est calculée. Cette technique permet d’améliorer l’efficacité du programme de simulation. Le faisceau de photons est considéré comme infiniment petit, envoyé avec une incidence perpendiculaire à la surface du tissu.

La direction du paquet de photons est définie à partir de sa position (x, y, z) et sa direction \vec{r} . La trajectoire est calculée grâce aux directions cosinusales : u_x , u_y et u_z , calculées suivant les formules de l’équation 3.1.

$$\begin{cases} u_x = \vec{r} \cdot \vec{x} \\ u_y = \vec{r} \cdot \vec{y} \\ u_z = \vec{r} \cdot \vec{z} \end{cases} \quad (3.1)$$

Dans un premier temps, les photons vont rencontrer l’interface d’entrée de la

première couche du tissu. Une partie du paquet de photons est alors réfléchi et ne sera donc pas propagée plus loin. Cette quantité, la réflexion spéculaire R_{sp} , est calculée grâce à l'équation 3.2 et déduite au poids initial. Le paquet de photon possède alors un poids de $w = 1 - R_{sp}$.

$$R_{sp} = \frac{(n_1 - n_2)^2}{(n_1 + n_2)^2} \quad (3.2)$$

Le tissu est subdivisé en une matrice 3D de voxels. Le paquet de photons est propagé dans cet environnement. Le fractionnement du tissu en une matrice permet de stocker différentes grandeurs comme par exemple l'absorption par le tissu.

3.1.2.2 Propagation des photons dans le tissu

Le paquet est propagé dans le tissu tant que son poids est supérieur à une valeur seuil. Le trajet est construit pas par pas, pour chacun desquels il faut définir une direction et une longueur correspondant aux propriétés de diffusion du tissu. A la fin de chaque pas, le paquet subit une « absorption » par le tissu, son poids est donc diminué.

Taille du pas des photons À chaque pas, le photon se propage en ligne droite sur une distance variable, la longueur s . Il dépend de paramètres optiques du tissu, soit μ_t , le coefficient d'atténuation totale qui est égal à la somme des coefficients d'absorption et de diffusion : $\mu_t = \mu_a + \mu_s$. La fonction de densité de probabilité $p(s)$ définie par l'équation 3.3 permet de calculer le pas s . Celui-ci nécessite la génération d'une variable aléatoire ξ , uniformément répartie entre 0 et 1.

La probabilité $p(s)$ qu'un photon soit propagé sur une distance s est la suivante :

$$p(s) = \mu_t \cdot e^{-\mu_t \cdot s} \text{ avec } \mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (3.3)$$

La fonction de distribution cumulative est la suivante :

$$\xi(x) = \int_0^x p(x') dx' \quad (3.4)$$

Pour la génération d'un nombre aléatoire ξ uniformément distribué entre 0 et 1, telle que :

$$\xi = \int_0^s (\mu_t \cdot e^{-\mu_t \cdot x}) dx = 1 - e^{-\mu_t \cdot s} \quad (3.5)$$

nous obtenons alors la distance entre deux événements différents suivante :

$$s = -\frac{\ln(1 - \xi)}{\mu_t} \quad (3.6)$$

Il suffit d'opérer un changement de variable : $\xi' = 1 - \xi$, également uniformément répartie entre 0 et 1. Le calcul du pas s se fait donc suivant l'équation 3.7.

$$s = -\frac{\ln(\xi')}{\mu_t} \quad (3.7)$$

Nouvelle direction des photons La direction du photon est définie par deux angles : l'angle de déflexion θ , compris entre 0 et π , et l'angle azimutal ψ , compris entre 0 et 2π . L'angle θ est calculé à partir de la probabilité de distribution de son cosinus, soit la fonction de diffusion de Henyey-Greenstein, présentée dans le chapitre précédent. Les équations 3.8 permettent de définir le cosinus $\cos \theta$ en fonction d'une variable aléatoire ξ répartie uniformément entre 0 et 1. L'angle azimutal ψ est uniformément réparti entre 0 et 2π et ainsi calculée grâce à l'équation 3.9.

$$\cos \theta = \begin{cases} \frac{1}{2g} \left(1 + g^2 - \left[\frac{1-g^2}{1-g+2g\xi} \right] \right) & g \neq 0 \\ 2\xi - 1 & g = 0 \end{cases} \quad (3.8)$$

$$\psi = 2\pi\xi \quad (3.9)$$

Une fois ces paramètres définis, la position du paquet de photons est mise à jour. Les nouvelles coordonnées (x', y', z') sont calculées grâce à l'équation 3.10.

$$\begin{cases} x' = x + u_x \\ y' = y + u_y \\ z' = z + u_z \end{cases} \quad (3.10)$$

3.1.2.3 Absorption du photon

Après chaque pas, le paquet de photons est atténué. Une partie de son énergie est laissée dans le tissu. Elle est considérée comme absorbée et dépend donc du coefficient μ_a . Le nouveau poids w' , décrit par l'équation 3.11, est diminué d'un albédo d_{wa} . Cet albédo est enregistré dans la matrice représentant l'absorption par le tissu.

$$w' = w - d_{wa} = w - w \cdot \frac{\mu_a}{\mu_t} \quad (3.11)$$

3.1.2.4 Passage d'une interface

Lors de son trajet, le paquet de photons peut rencontrer une interface, soit entre deux couches de tissu, soit entre le tissu et l'extérieur, en général de l'air. Les photons peuvent être réfléchis ou transmis. Ils peuvent échapper du tissu par la surface d'entrée, dans ce cas, c'est une réflexion diffuse, R_d , ou bien par la surface opposée, ce qui reflète la transmission, T . Ces deux grandeurs sont enregistrées dans des matrices 2D correspondant chacune à la surface supérieure ou inférieure du tissu simulé.

Quand le pas d'un paquet de photons coupe une limite entre deux couches, le pas raccourci s_1 est calculé. Il correspond à la distance entre le début du pas et le point d'intersection avec l'interface. Le pas restant s'_1 est donc égal à $s - s_1$.

Il faut alors déterminer quel événement est attribué au photon : réflexion ou transmission. Pour ce faire, la réflexion interne R est calculée grâce à l'angle d'incidence et l'angle de transmission qui est défini par la loi de Snell-Descartes. Un

nombre ξ est tiré aléatoirement et uniformément entre 0 et 1 et est comparé à la valeur de la réflexion interne.

- si $\xi \leq R$, les photons sont réfléchis et continuent leur chemin dans la même couche. Cela se traduit par une nouvelle trajectoire, d’une distance correspondant au pas restant s'_1 et de directions cosinusales $(u_x, u_y, -u_z)$.
- si $\xi > R$, les photons passent dans la nouvelle couche. Si celle-ci fait encore parti du tissu, une nouvelle trajectoire est définie. Un nouveau pas est calculé et la direction est modifiée suivant la loi de Snell-Descartes.

3.1.2.5 Mort du paquet de photons

Un paquet de photons est considéré comme « mort » lorsqu’il n’est plus propagé dans le tissu. Le chemin du paquet de photons peut être terminé de différentes façons, lorsqu’il quitte le tissu par réflexion diffuse ou transmission ou quand son énergie est devenue trop faible. Une valeur seuil est définie : $w_{seuil} = 0,0001$, si le paquet de photons se déplaçait alors avec un poids inférieur à ce seuil, il y aurait violation de la conservation d’énergie. Quand le poids w est inférieur à ce seuil, un phénomène aléatoire appelé « Roulette » est utilisé. Il donne une chance : $Chance = \frac{1}{m}$ aux photons de survivre avec un poids de $m \cdot w$, m étant fixé à une valeur de 10 photons. Un nombre ξ est tiré de manière aléatoire entre 0 et 1 et comparé à la valeur Chance.

- si $\xi \leq \frac{1}{m}$, le nouveau poids attribué au paquet de photons est $m \cdot w$. Il se voit alors attribuer une nouvelle direction de propagation.
- si $\xi > \frac{1}{m}$, le paquet est considéré comme « mort ». Un nouveau paquet de photon est alors envoyé dans le tissu.

3.1.3 Programme de simulations : modifications

Le programme MCML [Wang et al., 1995] utilise le principe Monte Carlo pour propager des paquets de photons dans un tissu à couches multiples. Il enregistre une matrice 3D d’absorption des photons par le tissu, ainsi que des matrices 2D pour les positions des photons transmis ou réfléchis de manière diffuse aux plans inférieur et supérieur du tissu. Le phénomène de fluorescence n’est pas simulé. De plus, le faisceau de photons envoyés est considéré comme ponctuel et perpendiculaire au tissu. Ces caractéristiques doivent être modifiées afin de représenter la géométrie de la sonde fibrée utilisée lors des expériences présentées dans le Chapitre 2.

Pour répondre à ces problématiques, nous avons choisi de simuler la fluorescence en deux étapes, chacune d’elles étant effectuée par un programme dédié. Un premier programme, appelé programme d’excitation, envoie les photons dans le tissu et enregistre, comme dans les versions précédentes, une matrice d’absorption par le tissu ainsi qu’une nouvelle matrice présentant l’absorption par le (ou les) fluorophores présents. Le second programme, dit de collection de fluorescence, simule le trajet des photons de fluorescence, émis avec une distribution isotrope depuis leur lieu d’absorption. Si les photons quittent le tissu par la surface d’entrée, leur détection

par la sonde est vérifiée ; des détails sont donnés dans l'annexe C. La simulation de fluorescence en plusieurs parties est une méthode classique, choisie pour sa précision [Swartling et al., 2003; Welch et al., 1997; Pfefer, 2004; Pavlova, 2008]. Il existe également des méthodes de convolution par simulations Monte-Carlo, comme le principe d'émission inversée [Swartling et al., 2003; Palmer, 2008; Zhu et al., 2008]. Dans ce cas, des matrices de probabilités d'absorption et d'émission du photon sont obtenues par des simulations Monte-Carlo et permettent de déterminer, par convolution, la probabilité de détection des photons en fonction des paramètres du tissu et de la sonde. Ces méthodes permettent un gain de temps considérable, au détriment de la résolution spatiale et/ou temporelle [Swartling et al., 2003].

Géométries du milieu Dans un premier temps, nous allons présenter les géométries possibles du milieu considéré, celles-ci sont identiques pour les programmes de simulation d'excitation et de collection de fluorescence. Le photon se propageant dans un tissu, sa trajectoire est calculée dans un repère cartésien. Le faisceau de photons envoyé depuis la fibre d'excitation est centré en $(x, y, z) = (0, 0, H)$, où H correspond à la distance entre la sonde et le tissu. Les voxels correspondent chacun à une des multiples couches du tissu ou à une sphère. Chaque couche (ou sphère) étant définie par une épaisseur (ou un rayon et une coordonnée centrale pour les sphères), ainsi que de multiples paramètres optiques. Le tableau 3.1 montre un exemple de fichier d'entrée pour un fantôme comportant une couche et une sphère.

L'enregistrement des données comme l'absorption se fait dans une matrice de voxels dont la taille et le nombre doivent être spécifiés. Le volume possède généralement $200 \times 200 \times 50$ voxels, avec une dimension de voxel en $0,05 \times 0,05 \times 0,05 \text{ mm}^3$, correspondant à un volume total de $10 \times 10 \times 2,5 \text{ mm}^3$. Ce volume correspond à la collection de données et non à la géométrie du fantôme.

La partie suivante du document est consacrée à la description des modifications intégrées au programme initial. Des modifications ont déjà été effectuées lors de la thèse précédente [Vu-Thi, 2008]. Un travail de validation du programme a conduit à diverses corrections, suivi de l'intégration de plusieurs améliorations qui ont été menés lors de cette thèse. Nous tâcherons de différencier les avancements propres au travail le plus récent.

3.1.3.1 Programme d'excitation

Le schéma de la figure 3.3 présente les modifications apportées au programme original. Les modules changés sont signalés en rouge. Ce programme permet non seulement de simuler plusieurs couches, mais il a été remanié afin de permettre de placer une ou plusieurs sphères (ou inclusions), chacune ayant des propriétés optiques spécifiées. Ceci a son importance pour la simulation de détection de tumeurs, ainsi que pour la comparaison avec les données sur fantômes.

```

# # # # SPECIFY DATA FOR RUN 1
Exc-Layer-Sphere           # output file name, ASCII

1000000                    # No. of launched photons
0.005 0.005 0.005         # dz, dx, dy [cm] dimensions d'un voxel
50 200 200                 # No. of nz, nx, ny nombre de voxels

0.02 0.22 0.15 G          # D, NA, H, type (Gaussian G or Uniform U)
                           # diamètre, ON de la fibre d'excitation, distance sonde-tissu

1                           # Number of layers
# n mua muaf mus g d       # One line for each layer
1                           # n for medium above
1.4 3 0.13 100 0.87 1     # layer 1 paramètres optiques de la couche
1                           # n for medium below

1                           # Number of spheres
# Two lines for each sphere
# Cx Cy Cz R               # sphere 1 coordonnées du centre et rayon
0.1 0 0.2 0.1             # [cm]
# n mua muaf mus g        # sphere 1 paramètres optiques
1.4 3 0.02 50 0.87        # [cm] or [cm-1]

```

TABLE 3.1 – Exemple de fichier d'entrée pour une simulation.

Envoi du paquet de photons Le faisceau lumineux éclairant l'ensemble multicouche représentant le tissu ou fantôme est envoyé depuis la fibre émettrice, toujours perpendiculaire au tissu. La direction du paquet de photons dépend donc de plusieurs paramètres : l'angle d'ouverture de la fibre, α , et son diamètre D . Bien entendu, la distance H entre la sonde et le fantôme est elle aussi déterminante. Le type du faisceau peut être gaussien ou uniforme.

La direction initiale du paquet de photons est donc déterminée par un tirage aléatoire des deux angles : θ , compris entre 0 et 2π et ψ , compris entre 0 et α . La position initiale est déterminée par un tirage aléatoire de deux variables x et y , comprises dans un cercle de diamètre correspondant au diamètre de la fibre d'excitation. Le photon est prolongé depuis la surface de la sonde vers le tissu grâce à ces caractéristiques. Les interfaces fibre-air et air-tissu sont prises en compte dans le calcul de propagation du photon.

Absorption par le fluorophore Dans les couches définies dans le programme, une interaction supplémentaire a été prise en compte : l'absorption des photons par les fluorophores, traduite par un nouveau coefficient d'absorption, μ_{af} . Celle-ci

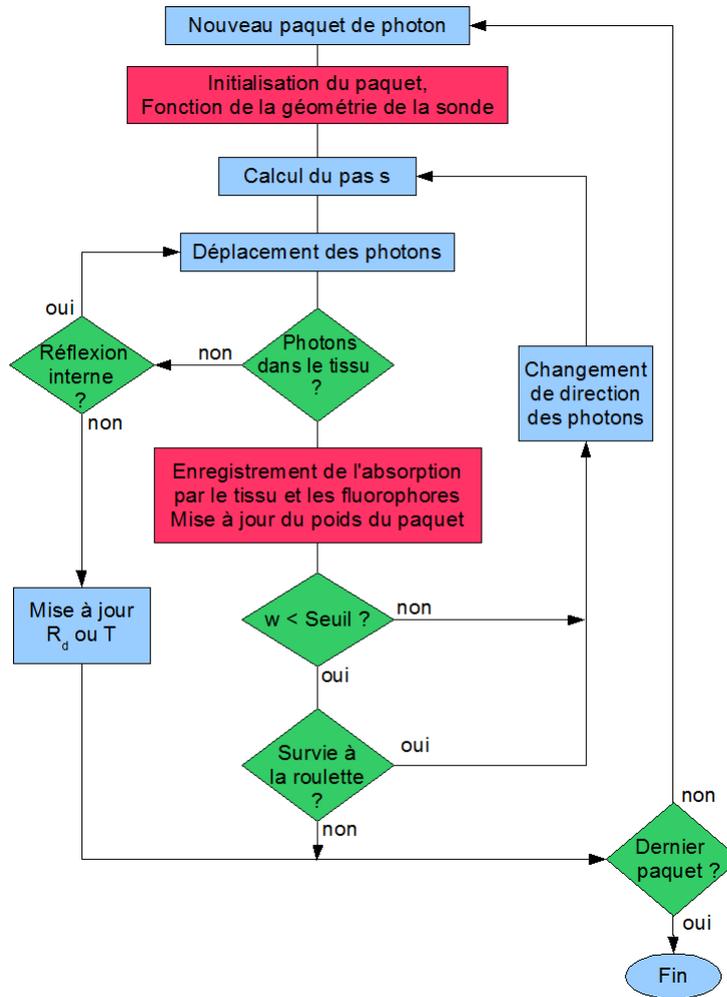


FIGURE 3.3 – Schéma de fonctionnement du programme d’excitation, modifications apportées indiquées en rouge.

modifie le coefficient d’atténuation totale : $\mu_t = \mu_s + \mu_a + \mu_{af}$. Ce changement est aussi pris en compte lors du calcul du pas s .

Dans le programme original, les photons sont déplacés et, à chaque pas, une partie de leur énergie est absorbée par le seul tissu. Désormais, une partie est toujours absorbée par le tissu sans les fluorophores, soit sans création de lumière, et une autre partie est absorbée par le fluorophore, qui aura vocation à être réémise sous forme de lumière de fluorescence. Il existe plusieurs méthodes de traitement de l’absorption. Notre choix se calque sur la manière utilisée dans le programme MCML et diffère de la solution du programme précédent. Les probabilités d’absorption, sans création de lumière P_a et par le fluorophore P_{af} sont introduites et calculées à l’aide du pas s , comme indiqué dans l’équation 3.12. Elles sont utilisées pour déterminer les parts d’énergie absorbées par le tissu non fluorescent d_{wa} et par le fluorophore d_{waf} . Ces

deux grandeurs sont enregistrées séparément dans deux matrices 3D. Le nouveau programme fournit donc une matrice d'absorption par les fluorophores.

$$P_a = s \cdot \mu_a \text{ et } P_{af} = s \cdot \mu_{af} \quad (3.12)$$

$$d_{wa} = w \cdot P_a = w \cdot s \cdot \mu_a \text{ et } d_{waf} = w \cdot P_{af} = w \cdot s \cdot \mu_{af} \quad (3.13)$$

Le tissu peut contenir différents fluorophores, soit un type de chromophore par couche. Chaque fluorophore se voit attribuer son propre coefficient d'absorption : μ_{af} . Les propriétés des tissus renseignées pour le programme sont, pour chaque couche : l'indice de réfraction n , le coefficient d'absorption du tissu μ_a , du fluorophores μ_{af} , le coefficient de diffusion μ_s et l'anisotropie de diffusion g . Ces paramètres dépendent de la longueur d'onde d'excitation, soit 405 nm dans notre cas.

3.1.3.2 Programme de collection de fluorescence

La figure 3.4 présente le schéma de fonctionnement du programme simulant la collection de la fluorescence. Les modifications sont indiquées par un fond rouge ou orange.

Lancement des photons Les paquets de photons sont envoyés à partir de la matrice 3D d'absorption par les fluorophores obtenue avec le programme d'excitation. Le nombre de photons de fluorescence N_{voxel} à envoyer depuis chaque voxel dépend du poids accumulé de photons absorbé dans ce voxel, w_{voxel} . Ce poids a été stocké dans la matrice d'absorption, voir figures 3.5. L'équation 3.14 présente le calcul de N_{voxel} , $N_{photons}$ étant le nombre total de paquets de photons prévus d'être envoyés dans le tissu.

$$N_{voxel} = \frac{w_{voxel}}{\sum w_{voxel}} \cdot N_{photons} \quad (3.14)$$

Pour une série de simulations successives, lancées par un seul appel du programme, une normalisation du nombre de photons lancés par voxel est calculées, en fonction de l'absorption totale contenue dans chaque matrice. Cette étape permet d'homogénéiser la détection calculée et donc les « intensités » de fluorescence détectées.

Une longueur d'onde est attribuée à chaque paquet de photons. Elle est tirée aléatoirement dans une gaussienne centrée autour du maximum d'émission du fluorophore. Une largeur à mi-hauteur est également donnée au programme pour s'approcher de la forme du spectre d'émission du fluorophore. Cette longueur d'onde d'émission conditionne les paramètres optiques du fantôme comme n , μ_a , μ_{af} , μ_s et g qui en dépendent.

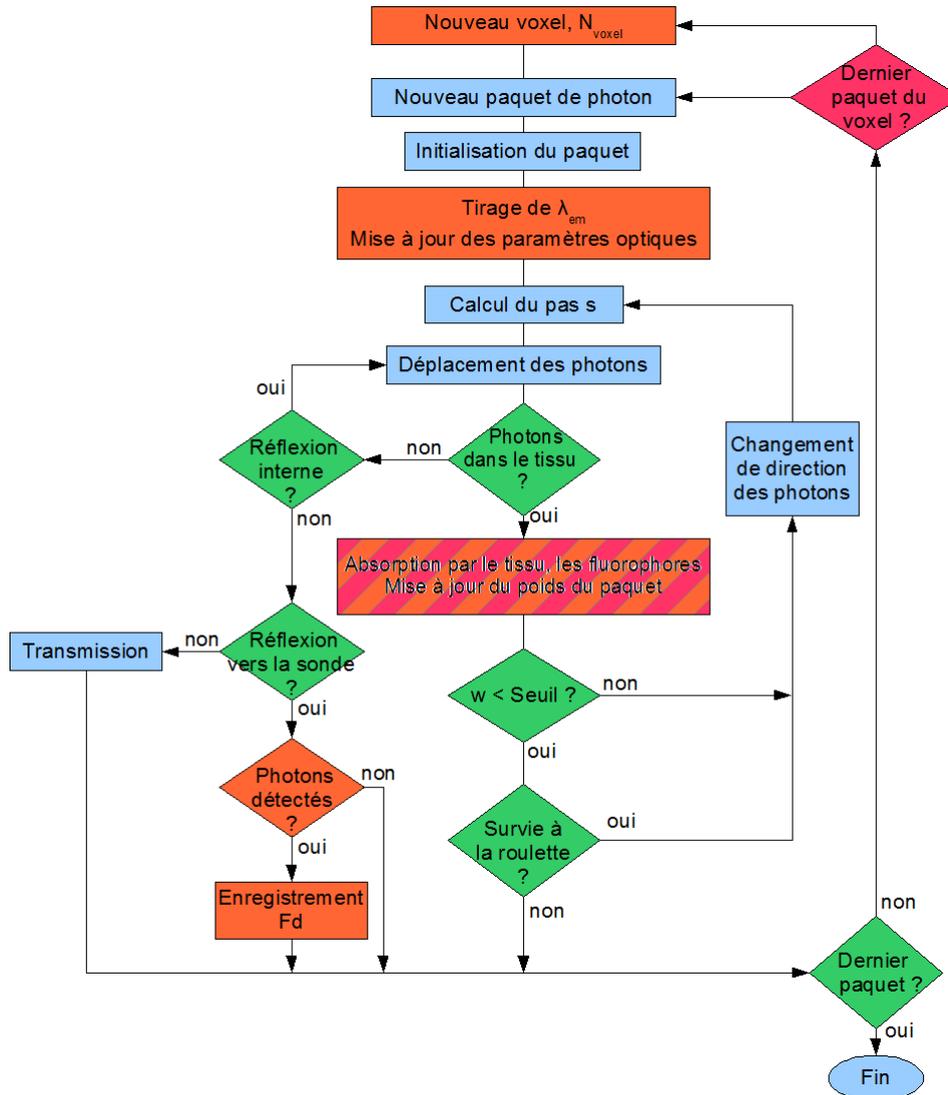


FIGURE 3.4 – Schéma de fonctionnement du programme de fluorescence, modifications apportées indiquées en rouge et orange pour les modifications les plus récentes.

La propagation des photons et leur possible réémission La propagation des photons de fluorescence est traitée comme expliqué précédemment dans le programme d'excitation, prenant en compte les coefficients de diffusion et d'absorption. À nouveau, les matrices d'absorption par le tissu et les fluorophores sont être à nouveau créées. Dans un premier temps, nous n'avons pas utilisé ces matrices pour une ré-émission de photons de fluorescence, mais nous avons vérifié le taux de réabsorption par le tissu. Les résultats seront présentés et discutés dans la partie suivante.

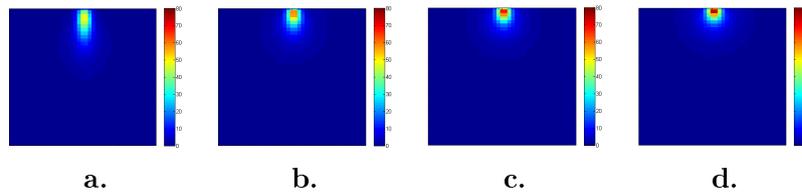


FIGURE 3.5 – Matrices d’absorption par le fluorophore pour des fantômes mono-couches de différents coefficients de diffusion, soit $\mu_s = 100$ (a.), 200 (b.), 300 (c.) et 400 cm^{-1} (d.).

Détection des photons par la sonde La méthode de détection a subi une correction dans la version actuelle du programme. Elle est décrite brièvement dans la partie présente, plus de détails pourront être trouvés dans l’annexe C.

Plusieurs études ont porté leur intérêt sur la définition d’une géométrie adaptée optimisée en fonction de l’utilisation. [Pfefer, 2004] étudie les effets du diamètre d’une sonde monofibre et de la distance entre fibre excitatrice et fibres collectrices sur la profondeur détectée. Le groupe de [Skala et al., 2004] a évalué la couche la mieux détectée en fonction de fibres protégées ou non par du quartz ainsi que des paramètres de leur sonde comme l’inclinaison et la distance de la fibre collectrice par rapport à la fibre excitatrice. La méthode de collection des photons en fonction de la géométrie de la sonde peut varier. Les méthodes de convolution permettent de définir une probabilité de détection des photons en fonction des paramètres de la sonde [Palmer, 2008]. Dans notre cas, nous avons choisi de continuer la propagation de chaque paquet de photon sorti du tissu, et ce en fonction de leurs coordonnées et direction. Cette méthode est expliquée brièvement dans le paragraphe suivant, des détails peuvent être trouvée dans l’annexe C.

Lorsqu’un paquet de photons ressort du tissu par la surface vue par la sonde, sa position de sortie est enregistrée. L’aire d’acceptance de la fibre de collection est projetée à la surface du tissu. Si la position de sortie d’un paquet de photons est située dans l’aire d’acceptance, la trajectoire du paquet, après modification de l’angle de sortie en accord avec l’équation de Snell-Descartes pour prendre en compte l’interface tissu-air, est prolongée jusqu’au plan de la face d’entrée de la sonde. Un deuxième test est alors effectué : il faut que le trajet prolongé des photons touche l’entrée de la fibre de collection. Enfin, il doit être vérifié que le paquet de photons est propagé dans la fibre, avant qu’il ne soit considéré comme détecté. Son poids est alors incrémenté en fonction de sa couche de provenance.

Performances En variant le nombre de photons lancés par simulations, certaines performances du programme comme sa rapidité et l’erreur sur le nombre de photons détectés sont estimées. Les performances du programme présentées sur le tableau 3.2 sont calculées pour un ordinateur de bureau adapté (Pentium III, 2, 3 GHz, 64 bits). Le temps de calcul vaut pour une simulation complète, incluant excitation et collection. Par soucis de rapidité, le nombre de photons par simulation lancée est de

1 000 000 de photons. L'erreur sur le nombre de photons détectés est donc de 4 %. Il est possible d'améliorer la rapidité des simulations en utilisant des puissances de calcul plus élevées comme des stations plus puissantes ou grâce à des centres de calcul.

Le taux de photons collectés à partir de la matrice d'absorption par le fluorophore fournie par le programme d'excitation est comparé à celui de la matrice d'absorption par le fluorophore fournie par le programme de fluorescence, appelée matrice de ré-absorption. Le poids total de photons absorbés par le fluorophore après l'excitation est d'environ 6 % (estimé grâce à 20 simulations). Lorsque le programme de collection est lancé, un pourcentage de photons est ré-absorbé par le tissu. Celui-ci correspond à 0,5 % des photons lancés au départ du premier programme. Ce pourcentage est considéré négligeable. Nous avons donc choisi de ne pas lancer plusieurs simulations successives.

Nombre de photons lancés	10^5	10^6	10^7
Erreur (%)	9	4	1
Temps de calcul (min)	1	8,5	82

TABLE 3.2 – Performances du programme en fonction du nombre de photons lancés. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne calculée sur 50 itérations du programme.

3.2 Validation : comparaison à la littérature

Dans un premier temps, nous allons comparer quelques résultats obtenus avec notre programme par rapport à ceux trouvés dans la littérature. Le manuel du code MCML [Wang, 1998] compare les résultats de réflectance diffuse et de transmittance totale en fonction de la littérature [van de Hulst, 1980] et de ses résultats. Le tableau 3.3 présente la moyenne et l'erreur sur les résultats de 10 simulations Monte-Carlo (programme d'excitation) de 50 000 paquets de photons chacune. Le fantôme simulé comporte une couche de 0,02 cm avec les coefficients optiques suivants : $n = 1$, $\mu_a = 10 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 90 \text{ cm}^{-1}$ et $g = 0,8$. Le coefficient d'absorption par le fluorophore a été fixé à 0 cm^{-1} , deux autres combinaisons de μ_a ont été testées : $\mu_a = 5 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu_{af} = 5 \text{ cm}^{-1}$ ainsi que $\mu_a = 0 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu_{af} = 10 \text{ cm}^{-1}$. Dans chaque cas, l'erreur relative par rapport aux valeurs présentées dans le tableau 3.3 est inférieure à 1 %.

Nous pouvons constater que les valeurs procurées par notre programme diffèrent de celles présentes dans la littérature : la réflectance et transmittance sont surestimées respectivement de 16 et 7 %. Pour vérifier si la géométrie de la fibre excitatrice est en cause, tous les paramètres la concernant ont été changés (diamètre, ON, distance sonde-tissu, type de faisceau). Dans chaque cas, la différence par rapport à

Source	R_d moyenne	Erreur R_d	T_t moyenne	Erreur T_t
[van de Hulst, 1980]	0,09739		0,66096	
[Wang, 1998]	0,09734	0,00035	0,66096	0,00020
[S. A. Prahl, 1989]	0,09711	0,00033	0,66159	0,00049
Notre programme	0,11538	0,00035	0,70789	0,00051

TABLE 3.3 – Comparaison de la réflectance diffuse et de la transmittance totale avec des données de la littérature, pour un fantôme d'épaisseur définie.

notre valeur initiale est inférieure à 1 %, ce qui exclut a priori la modification du mode d'injection comme cause des différences observées.

Le tableau 3.4 rapporte les résultats pour une simulation monocouche d'un milieu semi-infini (simulé dans notre cas par un fantôme très épais, soit d'une épaisseur de 10 cm). La valeur de réflectance diffuse rapportée dans le tableau correspond à la moyenne sur 10 simulations de 5 000 photons chacune, les coefficients optiques du milieu considéré sont les suivants : $n = 1,5$, $\mu_a = 10 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 90 \text{ cm}^{-1}$ et $g = 0$. Dans ce cas, l'écart entre notre valeur et la référence est de l'ordre de 4 %.

Source	R_d moyenne	Erreur R_d
[Giovannelli, 1955]	0,2600	
[Wang, 1998]	0,25907	0,00170
[S. A. Prahl, 1989]	0,26079	0,00079
Notre programme	0,25123	0,00144

TABLE 3.4 – Comparaison de la réflectance diffuse avec des données de la littérature, pour un fantôme semi-infini.

Les résultats obtenus pour un fantôme multicouche ont également été comparés, voir le tableau 3.5. Les propriétés des trois couches considérées sont récapitulées dans le tableau 3.6, une seule simulation de 10 000 photons a été lancée. À nouveau, la réflectance diffuse et la transmittance sont surestimées par notre simulation. Dans ce cas, la différence est de 8 et 15 % pour R_d et T_t .

Source	R_d	T_t
[Gardner and Welch, 1992]	0,2381	0,0974
[Wang, 1998]	0,2375	0,0965
Notre programme	0,2596	0,1149

TABLE 3.5 – Comparaison de la réflectance diffuse et de la transmittance totale avec des données de la littérature, pour un fantôme à trois couches.

Les résultats de nos simulations présentent des différences systématiques de l'ordre de 10 % par rapport au programme d'origine. Une étude approfondie de

Couche	n	μ_a (cm^{-1})	μ_s (cm^{-1})	g	Epaisseur (cm)
1	1,37	1	100	0,9	0,1
2	1,37	1	10	0	0,1
3	1,37	2	10	0,7	0,2

TABLE 3.6 – Propriétés optiques des couches du fantôme simulé.

la taille et du nombre de voxels, en particulier dans la direction z , pourrait apporter des éléments de réponse sur l'origine des différences. L'introduction d'une absorption supplémentaire par la fluorescence n'a pas eu d'impact sur les résultats du programme.

3.3 Validation : comparaisons simulations-expériences

Au vu des modifications apportées au programme, il est nécessaire de valider son fonctionnement en utilisant les mesures effectuées sur les fantômes. De ce fait, des diverses géométries pour la sonde ainsi que pour la géométrie des fantômes et ses propriétés optiques ont été simulées avec le nouveau programme pour les comparer systématiquement aux résultats obtenus lors des expérimentations. La correspondance entre mesures et expérimentations pour de variables géométries de la sonde a déjà été étudiée dans la thèse précédente [Vu-Thi, 2008], avec les erreurs de programme associés. Nous avons donc mené une étude systématique de l'effet des paramètres de la sonde sur ses performances de détection. Ces résultats seront présentés dans la partie suivante.

Les paramètres du fantôme sont répartis entre sa géométrie, monocouche, bicouche ou à inclusions, et ses paramètres optiques. Ces derniers sont variés pour chaque géométrie. Les méthodes d'analyse utilisées pour les simulations sont les mêmes que celles présentées dans le chapitre précédent. Dans notre cas, les fantômes bicouches seront modélisés par des tissus possédant deux couches aux propriétés différentes et les fantômes à inclusion cylindriques seront modélisés par les simulations de sphères.

3.3.1 Fantômes monocouches

Dans un premier temps, nous allons comparer la variation de collection de fluorescence en fonction de la distance entre la sonde et le tissu. Puis, nous allons comparer les valeurs de profondeur effective, soit l'indice $e_{80\%}$, pour des monocouches de différents coefficients de diffusion dans le cas mesuré et simulé.

3.3.1.1 Distance sonde-tissu

La distance entre la sonde $S11 - 600$ et un fantôme monocouche aux propriétés optiques standard, voir le chapitre 2, et d'environ 1 cm d'épaisseur a été variée

entre 0 et 4 *mm*. Des simulations pour des hauteurs espacées de 0,1 *mm* pour des distances allant de 0 à 2,6 *mm*, puis par intervalles de 0,2 *mm* ont été lancées. La figure 3.6 a. présente les données mesurées (en vert) et les données simulées (en rouge), chacune étant normalisées par rapport à son propre maximum. Les distances permettant un maximum de collection sont similaires dans les cas mesuré et simulé, et se situent aux alentours de 1,5 *mm*. Une normalisation en fonction de l'aire sous la courbe a également été effectuée. Un écart relatif entre mesure et simulation a été calculé pour chaque point de la courbe dans les deux cas de normalisation, ils sont présentés sur la figure 3.6 b..

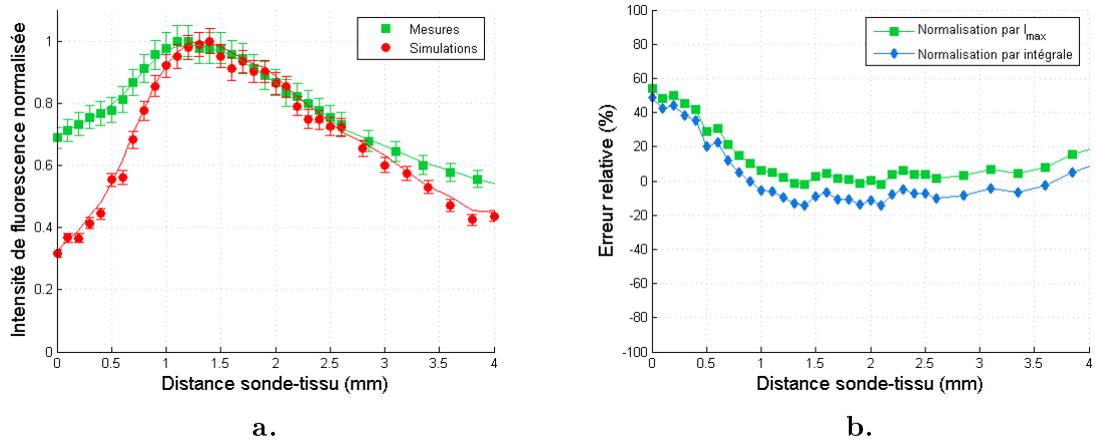


FIGURE 3.6 – Variation de l'intensité collectée mesurée (en vert) et simulée (en rouge) en fonction de la distance entre la sonde et le tissu. L'erreur est de 5 % pour la mesure de l'intensité maximale ($n = 10$) et de 4 % pour les simulations (voir partie 3.1.3.2)

Sur la plage de détection comprise entre 0,75 et 4 *mm*, l'écart relatif est inférieur à 20 %, quelle que soit la méthode de normalisation. Par contre, pour des distances sonde-tissu inférieure à 0,75 *mm*, les mesures et la simulation divergent. La qualité de la surface d'entrée des deux fibres pourrait être à l'origine de cette différence. En effet, la plupart du temps pour de faibles distances entre sonde et fantôme, la direction des photons de fluorescence ne leur permet pas d'être captés par la fibre. Si des imperfections se trouvent à la surface de celle-ci, la détection devient possible. Cet effet est toujours valable sur des distances plus grandes, mais il est minimisé car le nombre de photons dont la direction ne devrait pas permettre de détection diminue lorsque la distance sonde-fibre qui augmente. Dans la suite du chapitre, les simulations ont été effectuées pour une distance sonde-tissu de 1,5 *mm*, sauf si précisé différemment.

3.3.2 Fantômes bicouches

Dans le chapitre précédent, nous avons varié les paramètres optiques de diffusion et d'absorption des deux couches de nos fantômes bicouches pour effectuer des mesures. Pour obtenir des résultats comparables à ces mesures, nous avons réalisé plusieurs simulations de fantômes à deux couches en changeant leurs épaisseurs respectives.

Pour chaque fantôme bicouche 46 simulations ont été lancées, soit 23 simulations en excitation et 23 en collection. Chaque simulation utilise les mêmes paramètres optiques pour les couches inférieure et supérieure, respectivement. Le paramètre variant d'une simulation à l'autre est l'épaisseur des deux couches, sachant que l'épaisseur totale ne varie pas et est égale à 7 mm. Plus en détail, les épaisseurs de la couche supérieure ont été variées de 0 à 1,3 mm par intervalles de 0,1 mm puis de 1,5 à 3,3 mm par intervalles de 0,2 mm. L'erreur sur la détermination d'une épaisseur caractéristique, e_{80} , e_{min} ou e_{max} , a été déterminée par la simulation de 10 fantômes bicouches identiques et est de $\pm 0,05$ mm (écart-type entre les valeurs déterminées grâce aux simulations). Le programme fournit un taux de photons détecté en fonction de la couche d'où il provient, relatif au nombre total de photons de fluorescence collectés. La figure 3.7 présente les pourcentages d'intensité lumineuse provenant de chaque couche. Les lignes noires présentent les mesures tandis que les résultats simulés sont affichés par des points colorés. Les barres d'erreur de 4 % correspondent aux performances du programme pour un lancement de 10^6 photons (voir Table 3.2). Les lignes grises en pointillé représente l'erreur sur la mesure estimée par un écart-type sur plusieurs mesures identiques ($n = 6$). Les traitements appliqués pour déterminer les indicateurs définis sont identiques à ceux utilisés pour les mesures des fantômes bicouches (voir le chapitre 2). Un lissage a été effectué en utilisant un polynôme, ce dernier étant choisi pour présenter un coefficient de corrélation supérieur à 0,99.

Nous pouvons constater un bon accord entre mesures et simulations. Le χ^2 par degré de liberté $n - 1$ (calculé avec 23 points) est de 1,7 pour la courbe de la figure 3.7 a. et de 1,0 pour la figure 3.7 b..

3.3.2.1 Variation de μ_s

Le premier indice présenté est l'épaisseur de fantôme correspondant à 80 % de détection de la couche supérieure, $e_{80\%}$. Sur chaque graphique présenté dans la figure 3.8, le coefficient de diffusion du fantôme inférieur est fixé. Les valeurs obtenues pour $e_{80\%}$ en fonction du μ_s de la couche supérieure sont comparées aux valeurs déduites des mesures et celles relevées sur les simulations.

Le comportement des simulations diffère de celui des mesures, aucun accord n'a été trouvé pour ce paramètre. Cela semble surprenant, compte-tenu du bon accord que montre la figure 3.7. Des mesures complémentaires paraissent nécessaires pour éclaircir l'origine de ce constat.

En ce qui concerne la détectabilité, les valeurs e_{min} et e_{max} ont également été

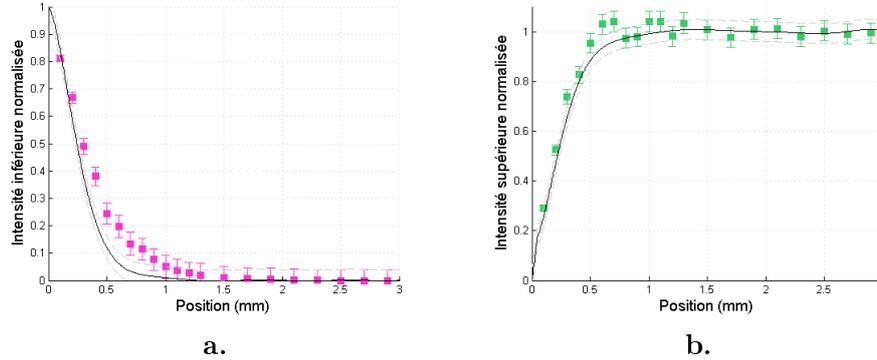


FIGURE 3.7 – Comparaison des pourcentages d’intensité de fluorescence mesurés (noir) et simulés (coloré) pour les couches inférieure (a.) et supérieure (b.) d’un fantôme bicouche. Les intensités ont été normalisées chacune par rapport à leur maximum. Les paramètres optiques des couches sont les paramètres standards pour la couche inférieure et de $\mu_a = 9 \text{ cm}^{-1}$ pour la couche supérieure. Le fluorophore de la couche supérieure est la fluorescéine et celui de la couche inférieure la Rhodamine.

extraites des résultats des simulations. Pour e_{min} , les simulations indiquent une valeur de $0,1 \pm 0,05 \text{ mm}$ quels que soient les paramètres optiques des fantômes. Cette valeur est cohérente avec l’épaisseur minimale déduite des mesures, soit $0,05 \pm 0,02 \text{ mm}$.

La comparaison simulations/mesures de la détermination de l’indicateur e_{max} est présentée sur les graphiques de la figure 3.9. Dans ce cas, le comportement des mesures et des simulations est semblable, en particulier pour des coefficients de diffusion faible de la couche inférieure. Un calcul du χ^2 (par degré de liberté $n - 1$) a été effectué pour comparer mesures et simulations. Sa valeur est systématiquement petite (χ^2 inférieur à 6), ce qui confirme l’accord entre les courbes.

3.3.2.2 Variation de μ_a

De manière similaire aux résultats de variation du coefficient de diffusion, les simulations et mesures pour différents coefficients d’absorption sont comparées dans cette partie. Dans un premier temps, la profondeur effective de détection, mesurée et simulée, est présentée sur la figure 3.10. À nouveau, nous pouvons observer une bonne correspondance entre les valeurs mesurées et simulées, en particulier, le phénomène de stabilisation de l’indicateur pour des $\mu_{a \text{ sup}}$ élevés ($\chi^2 < 4$, sauf pour $\mu_{a \text{ sup}} = 3 \text{ cm}^{-1}$).

Dans un second temps, nous avons comparé les résultats des deux indicateurs de détectabilité. L’épaisseur minimale de détection est toujours inférieure à $0,1 \pm 0,05 \text{ mm}$ dans le cas des simulations. Ce résultat est consistant avec celui déduit des mesures, soit $0,05 \pm 0,02 \text{ mm}$. L’épaisseur maximale de détection mesurée et simulée est comparée sur les graphiques de la figure 3.11. Si les allures

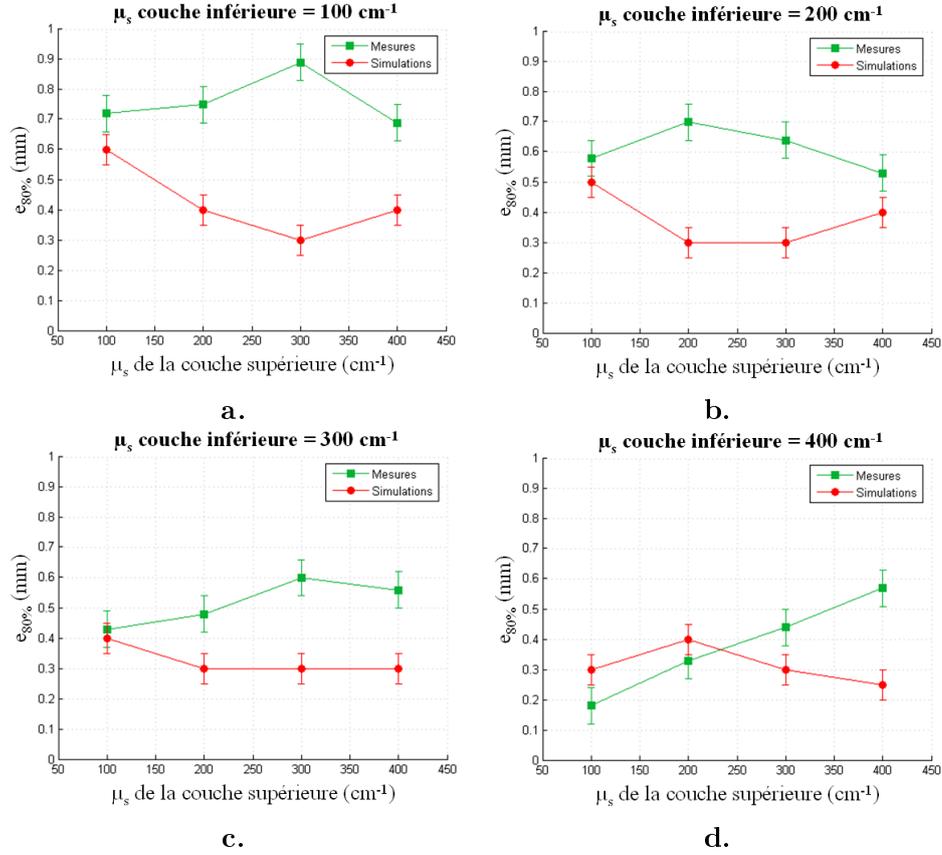


FIGURE 3.8 – Comparaison des valeurs de la profondeur effective déterminées par la mesure (vert) et les simulations (rouge) pour différents coefficients optiques de diffusion.

des courbes simulées et mesurées sont identiques pour toutes les $\mu_{a\ inf}$, un écart constant d'environ 200 μm est observé entre les indices e_{max} déduits des mesures et des simulations. Cette différence pourrait être due à une erreur dans la détermination du coefficient d'absorption des fantômes, mais si une différence existe, elle ne pourrait pas expliquer la totalité du décalage. Une autre explication incriminerait le programme de simulations, en particulier le traitement de l'absorption par la partie simulant la fluorescence. Dans ce cas, le paramètre d'absorption reste inchangé en fonction de la longueur d'onde, il est toujours donné comme étant égal à celui mesuré à 405 nm. Or, nos mesures de l'absorption de l'encre en fonction de la longueur d'onde par un spectrophotomètre montrent une diminution du coefficient d'absorption pour des longueurs d'onde plus élevées (de l'ordre de 25 % à 520 nm, par exemple). Le coefficient des simulations est surestimé par rapport à celui des fantômes. En cas de correction, les valeurs de e_{max} simulées devraient se rapprocher de la valeur mesurée.

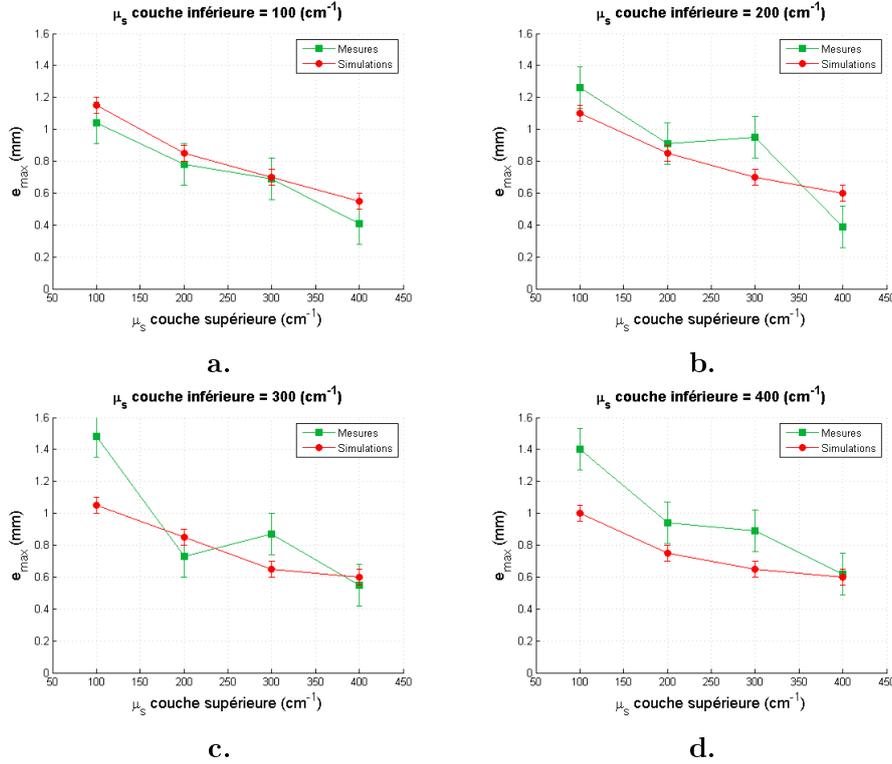


FIGURE 3.9 – Comparaison des valeurs de l'indicateur e_{max} déterminées par la mesure (vert) et les simulations (rouge) pour différents coefficients optiques de diffusion.

3.3.3 Fantômes à inclusions

La simulation d'inclusions sphériques est également possible grâce à notre programme. Il est à noter que les sphères de notre programme sont différentes des cylindres utilisés dans nos mesures, ce qui peut être conduit potentiellement à des imprécisions. La localisation et la taille de ces sphères peuvent être variées dans le tissu simulé, permettant ainsi d'imiter le passage de la sonde sur les inclusions. La configuration des cinq sphères positionnées tel que décrit dans la partie 2.2.5 a ainsi été simulée. La figure 3.12 présente la comparaison entre la mesure sur un fantôme à inclusions cylindriques et les simulations correspondantes. Les intensités normalisées mesurées et simulées sont cohérentes l'une avec l'autre : la réponse mesurée avec la sonde (voir chapitre 2) a pu être simulée presque parfaitement ($\chi^2 = 2$). En conclusion, nous pouvons constater que l'identification de structures cancéreuses peut être modélisée avec notre programme Monte-Carlo.

3.4 Variation des paramètres de la sonde

Une sonde est caractérisée par les paramètres liés aux fibres, soient leur diamètre et leur ouverture numérique, l'espacement et l'angle de collection entre les deux

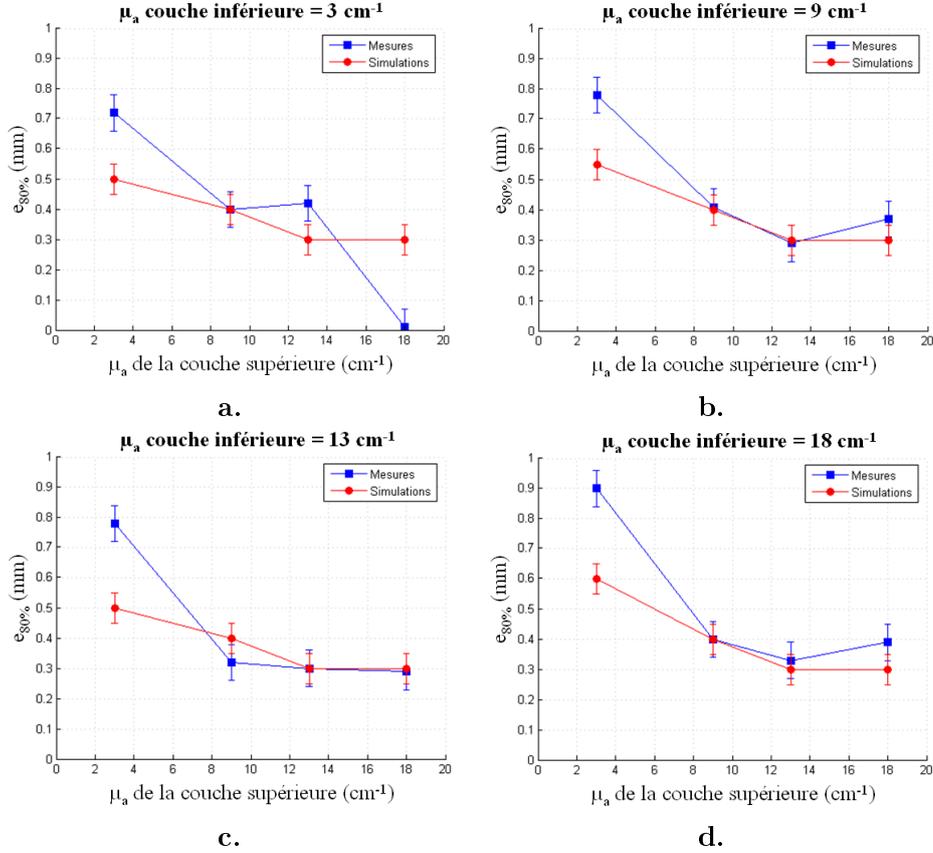


FIGURE 3.10 – Comparaison des valeurs de la profondeur effective déterminées par les mesures (bleu) et les simulations (rouge) pour différents coefficients optiques d’absorption.

fibres. Des études de simulations comparatives sont faites en variant certains de ces paramètres. Elles sont présentées dans cette partie.

Dans un premier temps, les distances optimales de collection entre sonde et échantillon sont comparées pour différentes valeurs du paramètre étudié, puis la variation de la profondeur de détection est estimée à l’aide de fantômes bicouches. Par soucis de temps, un seul fantôme bicouche est simulé par paramètre varié, afin de déterminer l’indicateur e_{max} moyen. Sur les mesures présentées précédemment, la valeur de e_{max} simulée varie entre 1,15 et 0,55 mm, ce qui donne une valeur d’épaisseur maximale de détection moyenne de 0,85 mm. Le fantôme bicouche de $\mu_{s\ inf}$ de 100 cm⁻¹ et $\mu_{s\ sup}$ de 200 cm⁻¹ présente une bonne correspondance simulations/mesures et son e_{max} simulé correspond à l’épaisseur maximale moyenne. Ce sont donc ces paramètres qui ont été simulés et qui sont présentés dans la suite de ce chapitre.

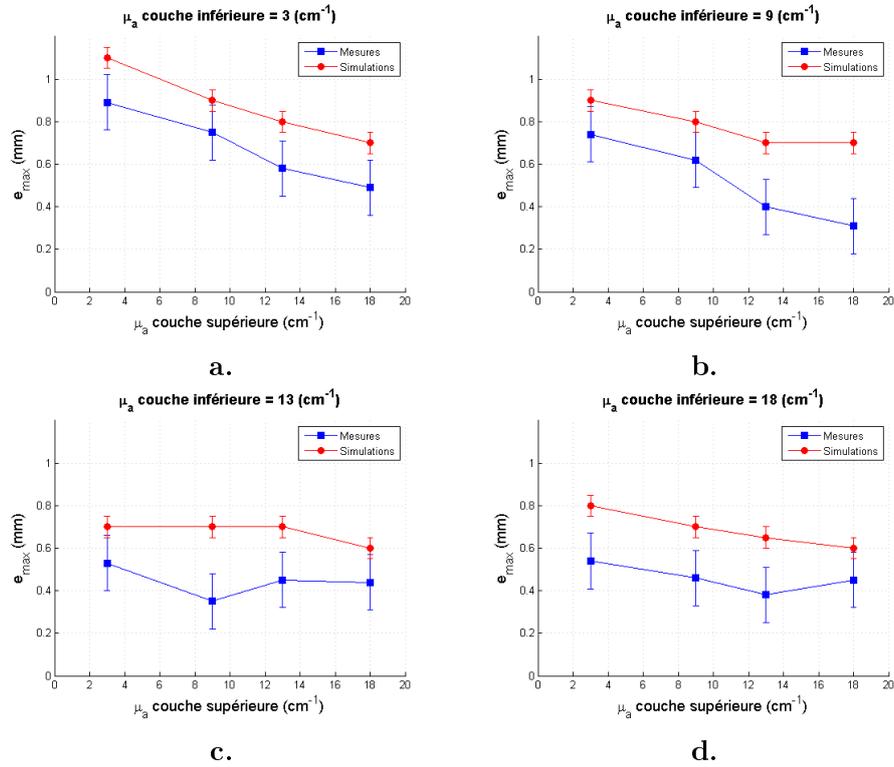


FIGURE 3.11 – Comparaison des valeurs de l'indicateur e_{max} déterminées par les mesures (bleu) et les simulations (rouge) pour différents coefficients optiques d'absorption.

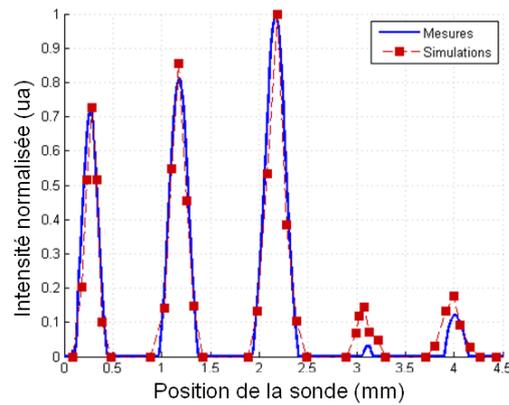


FIGURE 3.12 – Comparaison des signaux mesuré et simulé, normalisés chacun par le maximum, pour un fantôme à inclusions.

3.4.1 Angle de collection

La fibre de collection possède un angle par rapport à la fibre d'excitation. Celui-ci est varié entre 5 et 35°. Dans ce cas, la distance entre les deux fibres est fixée à 600 μm . La figure 3.13 a. présente la variation d'intensité collectée simulée en fonction de la distance entre la sonde et le tissu.

À l'aide de la figure 3.13 a., nous pouvons constater que l'intensité maximale détectée varie peu pour des angles de collection entre 5 et 20°. À l'inverse, la distance sonde-tissu pour laquelle la valeur d'intensité maximale est atteinte se déplace beaucoup avec l'angle. Elle augmente considérablement pour les petits angles. Ceci se comprend qualitativement par le fait qu'un bon recouvrement des cônes d'acceptance des deux fibres n'est réalisé pour de petits angles qu'à relativement grande distance [T. Papaioannou, 2004; Wang et al., 2010a]. Le tableau 3.7 présente ces distances optimales H_{opt} déterminées pour les différents angles.

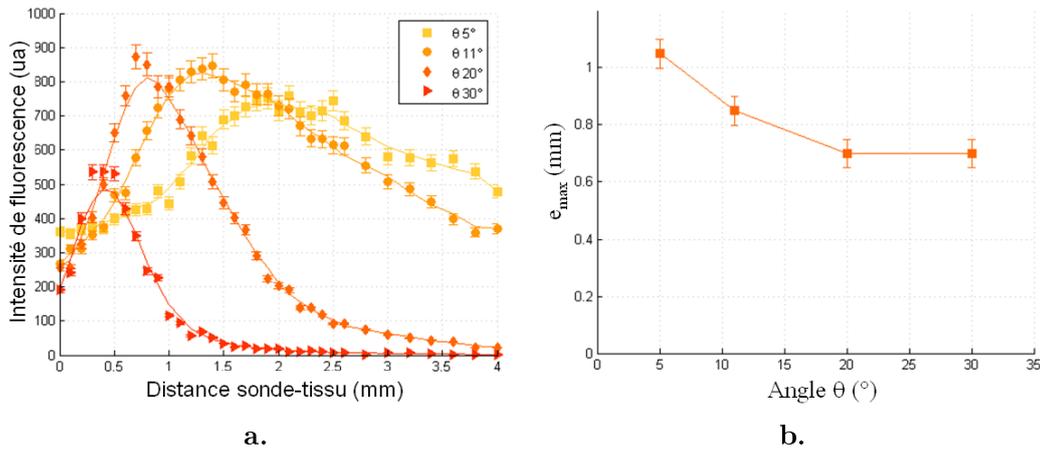


FIGURE 3.13 – Variation de l'intensité collectée en fonction de la distance entre la sonde et le tissu (a.) et variation de l'épaisseur e_{max} (b.) pour différents angles de collection .

Les simulations de détermination de l'épaisseur de détection maximale e_{max} est effectuée pour chaque angle à la valeur de sa distance optimale. La figure 3.13 b. présente l'épaisseur maximale de la couche supérieure permettant la détection de la couche inférieure qui diminue en fonction de l'angle d'inclinaison de la fibre de collection. Plus la fibre est inclinée, plus la détection sélectionne des photons provenant de la surface, ce qui est en accord avec les conclusions de Skala [Skala et al., 2004].

3.4.2 Distance entre les deux fibres

La distance L centre-à-centre entre les deux fibres, d'excitation et de collection, est de 600 μm dans le cas de la sonde utilisée pour les mesures sur fantômes. Cette

Angle $\theta(^{\circ})$	$H_{opt}(mm)$
5	1,9
11	1,5
20	0,8
30	0,4

TABLE 3.7 – Valeurs de distance optimale de détection pour les différentes inclinaisons de la fibre de collection.

distance est variée entre 0,4 et 1 mm à intervalles réguliers de 0,2 mm lors des simulations suivantes. Dans ce cas, l'angle de collection est fixé à 11° . La variation du taux de collection en fonction de la distance entre la sonde et le tissu pour les différents L est présentée sur la figure 3.14 a.. L'intensité détectée diminue lorsque la distance L augmente. La variation de L a également pour effet de déplacer la distance optimale de détection H_{opt} . Comme illustré sur le tableau 3.8, la distance entre les fibres varie avec la distance optimale de détection. Comme pour la dépendance avec l'angle de collection, cette observation s'explique qualitativement par le recouvrement des cônes d'acceptance des fibres qui est optimal à plus grande distance. Ces distances H_{opt} sont utilisées pour lancer les simulations de fantômes bicouches destinées à déterminer e_{max} . Sur la figure 3.14 b., nous pouvons observer que l'épaisseur maximale de détection de la couche inférieure augmente légèrement avec la distance entre les deux sondes. Cette constatation est également en accord avec des travaux évoqués précédemment [Pfefer et al., 2003; Skala et al., 2004]. De plus, une explication qualitative de ce phénomène se rapporte à la propagation des photons dans le milieu, des photons détectés à une grande distance de la sonde possèdent une grande probabilité de provenir de couches plus profondes.

Distance $L(\mu m)$	$H_{opt}(mm)$
400	0,9
600	1,5
800	1,8
1000	2,5

TABLE 3.8 – Valeurs de distance optimale de détection pour les différents angles de collection.

Grâce aux simulations, les paramètres de notre nouvelle sonde peuvent donc être définis en fonction de ses propriétés requises. Pour maximiser le taux de collection et permettre une analyse « surfacique » d'un tissu, la distance entre les fibres devrait être petite, par exemple de 400 μm , avec un angle de collection d'environ 10° . Ce deuxième paramètre paraît, au vu de nos résultats de simulation, peu critique quant à la quantité de lumière collectée. Toutefois, pour nos mesures ex vivo, nous avons

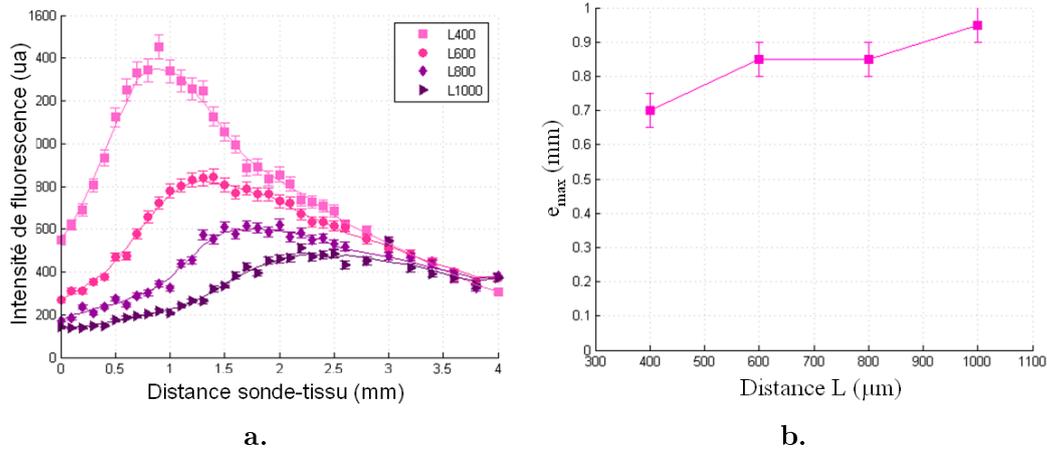


FIGURE 3.14 – Variation de l’intensité collectée en fonction de la distance entre la sonde et le tissu (a.) et variation de l’épaisseur e_{max} (b.) pour différentes distances entre les fibres.

gardé la distance entre les fibres de $600 \mu\text{m}$, étant donné que les tissus à analyser se trouvent systématiquement sous une lame de quartz d’une épaisseur de 1 mm , ce qui nous empêche de nous rapprocher suffisamment des échantillons, pour le cas de $L = 400 \mu\text{m}$, par exemple.

3.5 Conclusion et perspectives

Dans le but de permettre une caractérisation systématique de notre instrument et de disposer d’un outil permettant son perfectionnement, nous avons développé un programme de simulation Monte-Carlo. Il est défini à partir du code MCML [Wang et al., 1995], considéré comme un standard dans la propagation de photons dans des milieux diffusifs à laquelle l’émission et collection de fluorescence ont été ajoutées [Vu-Thi, 2008].

Dans le cadre de ce travail, la version existante du programme a été révisée, certaines parties réécrites et plusieurs fonctionnalités ont été jointes. Celles-ci concernent en particulier la méthode d’absorption, la dépendance des paramètres optiques avec à la longueur d’onde d’émission ainsi que la détection des photons par la sonde de collection. La version complète a ensuite été validée en comparant avec des résultats présentés dans la littérature. Les erreurs sont inférieures à 15 %. Nous avons considéré que cette différence nous permettait tout de même d’utiliser le programme, mais pourrait être la base de réflexion pour un futur perfectionnement des simulations.

Une comparaison à des expériences sur fantômes optiques calibrés a également été effectuée. D’une manière générale, cette comparaison a donné des résultats satisfaisants. Cela concerne de multiples paramètres : le positionnement de la sonde par

rapport à l'échantillon, l'intensité de fluorescence collectée en fonction de l'épaisseur de l'échantillon, les valeurs mesurées de la détectabilité et celles de la profondeur effective ($e_{80\%}$) et enfin la détection des inclusions. Un véritable écart entre mesures et simulations a été trouvé uniquement pour la profondeur effective en fonction du μ_s . À noter également un décalage entre mesures et simulations d'environ $200 \mu m$ pour e_{max} en fonction du coefficient d'absorption. Ces différences ne sont pas complètement comprises et leur origine doit faire partie des prochaines analyses à faire.

Concernant les limites actuelles du programme de simulation, nous pouvons signaler en particulier que la réabsorption des photons de fluorescence est prise en compte, mais pas leur réémission. De plus, la surface de « l'échantillon » ainsi que celle des fibres est considérée comme parfaitement plane dans la simulation, ce qui peut également créer des imprécisions.

En résumé, nous pouvons considérer notre programme comme validé pour notre situation de mesure. En l'état, il peut être utilisé pour évaluer de possibles améliorations des performances de notre sonde, s'affranchissant ainsi en partie du long processus de production de nouvelles sondes et de mesures sur fantômes. Une première étude sur l'influence des paramètres géométrique de la sonde a pu être présentée.

Dans un futur proche, plusieurs améliorations pourraient être apportées à la version actuelle du programme présenté dans cette thèse. En effet, il est déjà possible de prendre en compte l'absorption par plusieurs fluorophores par couche. Une émission nécessite par contre de modifier la sortie du programme d'excitation qui doit créer plusieurs matrices d'absorption, soit une pour chaque fluorophore présent dans le fantôme. Aussi, le programme de collection attribue une longueur d'onde au photon propagé en tirant un nombre aléatoire dans une gaussienne centrée sur le maximum du pic d'émission du fluorophore. L'intégration d'un tirage aléatoire suivant le spectre d'émission de chaque fluorophore est en cours.

À plus long terme, le programme de simulations pourrait s'approcher des mesures sur tissus en utilisant les spectres d'absorption et d'émission des fluorophores endogènes. Les concentrations de ceux-ci ne sont pas encore déterminées pour le cerveau, mais les simulations pourraient aider à estimer ces valeurs. De plus, le temps de vie de fluorescence pourrait être ajouté au photon, comme cela est fait dans d'autres programmes [Péry, 2007; Kervella, 2008].

Mesures sur modèle animal

Croyez ceux qui cherchent la vérité, doutez de ceux qui la trouvent.

André Gide

Sommaire

4.1	Protocoles expérimentaux	121
4.1.1	Protocoles d'induction des tumeurs et extraction du cerveau	121
4.1.2	Protocole de mesure d'autofluorescence	123
4.1.3	Analyse histologique des tranches	126
4.1.4	Analyse des données	126
4.1.5	Erreurs et limitations des mesures	133
4.2	Résultats ex vivo	139
4.2.1	Description histologique pour les cellules RG2 et C6	139
4.2.2	Validation de la méthode de traitement	142
4.2.3	Caractéristiques autofluorescentes des RG2	143
4.2.4	Caractéristiques autofluorescentes des C6	147
4.2.5	Définition d'un indicateur tumoral	149
4.3	Vers un protocole plus complet	154
4.3.1	Mesure du temps de vie de fluorescence	154
4.3.2	Instrumentation pour des mesures in vivo chez le rat	158
4.3.3	Conclusions	164

4.1 Protocoles expérimentaux

4.1.1 Protocoles d'induction des tumeurs et extraction du cerveau

Pour induire des tumeurs cérébrales chez le rat, nous avons injecté des cellules tumorales directement dans le cerveau de celui-ci. Alternativement, deux lignées cellulaires différentes ont été utilisées : les cellules C6 ou RG2. Toutes deux ont un comportement s'approchant de celui du glioblastome chez l'homme.

4.1.1.1 Modèle animal

Le modèle animal choisi est le rat. Ce modèle est couramment utilisé dans la recherche pré-clinique et présente plusieurs avantages : la taille de son cerveau permet une injection stéréotaxique précise et ses structures cérébrales sont compatibles avec la résolution de notre sonde. Le délai d'incubation est facile à gérer, cela étant dû au fait que la tumeur peut atteindre une grande taille avant de provoquer la mort de l'animal.

Les rats utilisés sont des « Sprague Dawley », une race albinos utilisée communément pour les études médicales. Ils sont plutôt calmes et faciles à manipuler, comparés aux rats Wistar, à partir desquels ils ont été développés. Les manipulations ont été effectuées sur des rats mâles. Leur âge varie de 42 à 45 jours et leur poids de 160 à 180 g lorsqu'ils arrivent au laboratoire. De manière générale, l'injection des cellules tumorales se fait une semaine après l'arrivée des rats au laboratoire, respectant ainsi un délai d'acclimatation à leur nouvel environnement.

4.1.1.2 Lignées cellulaires tumorales

Deux lignées cellulaires différentes dérivant de cellules gliales ont été utilisées. Toutes deux ont été induites chez le rat par des méthodes chimiques.

Dans un premier temps, nous avons injecté des cellules C6 (ATCC, Molsheim, France). Les mutations et surexpressions génétiques observées dans ces cellules se rapprochent de celles des tumeurs humaines [Sibenaller et al., 2005]. Un inconvénient de ces tumeurs concerne la réponse immunitaire qu'elles engendrent [Barth and Kaur, 2009]. Certains rats peuvent donc « guérir » ou ne développeront pas de tumeur. Les tumeurs C6 se caractérisent par un foyer nécrosé entouré de nécroses palissadiques [Barth and Kaur, 2009], ce qui leur donnent également des caractéristiques proches de celles du glioblastome humain.

Dans un second temps, des cellules RG2 (ATCC, Molsheim, France) ont été injectées chez le rat. Ce type de cellule est aussi considéré comme un bon modèle pour s'approcher du glioblastome humain [Ceberg et al., 1995]. Elles déclenchent une faible réponse immunitaire [Barth and Kaur, 2009] et nécessitent une faible inoculation.

Lors des expérimentations, nous avons constaté un taux d'induction tumorale supérieur pour les RG2 que pour les C6, 100 % comparé à 40 % environ. Ceci peut s'expliquer par le peu de réponses immunitaire de la lignée RG2 ainsi que le fait que les C6 requièrent plus de temps pour bien se développer. De plus, plusieurs protocoles expérimentaux différents, variant la concentration et le milieu d'injection des cellules, ont été testés. Le protocole le plus efficace pour la lignée C6 n'a pas encore été déterminé. Les résultats seront présentés pour les deux lignées.

4.1.1.3 Protocole d'injection

Préalablement à l'injection, les cellules sont mises en culture. Puis elles sont comptées et mises en suspension dans un milieu d'injection (PBS). La concentration

de la solution injectée est de $3 \cdot 10^3 \text{ cellules} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pour les RG2 et de 2 à 30 fois plus concentré pour les cellules C6. Les valeurs de concentrations injectées seront introduites dans le tableau récapitulatif des rats étudiés (voir le tableau 4.4). Un volume de $5 \mu\text{l}$ de cette solution est injecté pour les rats 5 à 11, pour les rats 1 à 4, le volume est de $1,5 \mu\text{l}$.

La première étape consiste à anesthésier le rat par inhalation de l'isoflurane à 3,5 % (Abott). Une fois l'animal endormi, sa tête est fixée dans un cadre stéréotaxique. Un masque apportant de l'isoflurane permet de maintenir le rat endormi pendant l'opération. La voûte crânienne du rat est dégagée et un trou d'environ 1 mm de diamètre est percé aux coordonnées 2 mm en antérieur et 2 mm en latéral par rapport au Bregma. Une aiguille Hamilton de $10 \mu\text{l}$ est insérée dans le cerveau à une profondeur de 4 mm. Le point d'injection correspond au striatum. La solution, pour $V = 5 \mu\text{l}$, est injectée à une vitesse de $1 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$, en intercalant une pause d'une minute entre chaque microlitre. L'injection de $1,5 \mu\text{l}$ s'est faite en continu pendant 20 minutes. La seringue est ensuite retirée très lentement afin d'éviter la remontée des cellules tumorales le long de l'axe d'injection. Le rat est suturé et maintenu sous surveillance une dizaine de minutes avant d'être rapporté à l'animalerie.

Un délai de 15 jours minimum d'incubation est respecté avant de passer à l'étape d'extraction des cerveaux et de mesure de fluorescence endogène.

4.1.1.4 Protocole d'extraction et de coupe du cerveau

Le rat est d'abord anesthésié par injection d'éthyle de carbamate à 10 % dans une solution d'héparine à 0,2 %. Le rat est ensuite décapité et le cerveau est extrait avant d'être découpé en tranches d'épaisseur variable, de 1 à 3 mm, placées dans une solution de PBS-1X, qui est soit enrichie en glucose à 1 %, soit bullée au carbogène (95 % d' O_2 et 5 % de CO_2), pour garantir une bonne conservation des échantillons. Les tubes contenant les tranches de cerveau sont placées dans de la glace et maintenue ainsi au frais jusqu'à ce qu'elles soient mesurées. Toutes les mesures sont effectuées sur du tissu frais, entre 10 et 40 minutes après le sacrifice de l'animal.

Pour permettre des analyses complémentaires, certaines tranches sont fixées, après mesure, dans une solution de paraformaldéhyde à 4 %, afin de subir une analyse histologique par la suite. Les histologies, coloration H & E et/ou MIBI ont été faites au service d'anatomopathologie de l'hôpital Ste-Anne (Paris 13^e) ou au laboratoire même.

4.1.2 Protocole de mesure d'autofluorescence

Pour une étude systématique du signal d'émission d'autofluorescence des tranches de rats, il est nécessaire de faire des mesures ainsi qu'un positionnement de la sonde par rapport à la tranche de manière reproductible. Pour répondre à cette exigence, un système de maintien des tranches spécifique a été développé. De plus,

il a fallu développer une méthode de mesure permettant de recalibrer les données de fluorescence mesurée à l'histologie de la tranche, soit identifier si le signal provenait d'une région saine ou tumorale, par exemple.

4.1.2.1 Maintien de la tranche

Le système de maintien, visible sur la Figure 4.1, est composé d'une partie inférieure, fixée à un support et d'une partie supérieure mobile. La tranche de cerveau repose sur une lame de quartz intégrée à la partie inférieure étanche. La tranche peut donc être immergée dans un liquide, du PBS, afin de maintenir les tissus frais le plus longtemps possible et d'éviter leur dessiccation. La partie supérieure vient se placer sur la tranche. Elle est également composée d'une lame de quartz d'épaisseur 1 ou 1,25 mm . Elle comporte un cadre noir utilisé pour effectuer le recalage des mesures, dont il sera question dans un paragraphe suivant. La distance entre les deux parties peut être variée, en vissant la partie inférieure, permettant ainsi un ajustement en fonction de l'épaisseur de la tranche. Une fois la tranche maintenue dans le système, celui-ci s'encastre dans un support fixé sur les moteurs. La hauteur de la partie supérieure ne varie pas, fournissant ainsi un placement reproductible par rapport à la sonde de mesure.

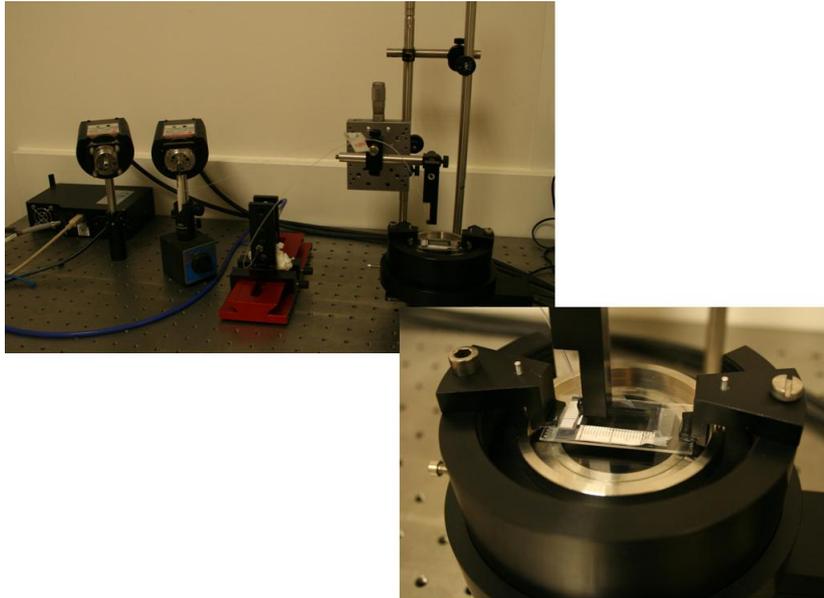


FIGURE 4.1 – Photo du dispositif de mesures, et gros plan du système de maintien des tranches fixé sur les moteurs.

La sonde utilisée, *S11 – 600*, est placée à une distance de 0,25 ou 0,5 mm de la plaque de quartz, en fonction de l'épaisseur de celle-ci, afin de se trouver à la distance correspondant au maximum de collection, distance simulée et validée dans le chapitre précédent. Les deux lasers, à 405 et 375 nm peuvent facilement

être utilisés de manière séquentielle, grâce à leurs collimateurs dédiés fibrés. Dans les deux cas, le même filtre passe-haut (FF02-409/LP-25, Semrock) a été utilisé en sortie de la sonde, à savoir pour une longueur d'onde de coupure de 410 nm . Pour rappel, la densité optique de ce filtre est de 6 et 7 pour des longueurs d'onde de 375 et 405 nm , respectivement.

4.1.2.2 Recalage des mesures

Les mesures sont faites par lignes d'acquisitions successives. Un moteur à précision micrométrique (Thorlabs) se déplace à une vitesse de $0,25 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ pour une durée d'acquisition d'une seconde. Le délai entre deux acquisitions est négligeable, il s'agit alors d'une acquisition continue. La distance parcourue pendant l'acquisition d'un spectre est de $250 \mu\text{m}$, ce qui reste bien inférieur à la résolution de la sonde ($500 \mu\text{m}$). La dégradation de cette dernière est considérée comme insignifiante. Un second moteur est placé de manière à déplacer le support perpendiculairement par rapport aux lignes de mesures. Ceci nous permet d'effectuer un balayage en x et y sur la totalité de la tranche.

Un cadre noir est disposé sur la plaque de verre supérieure. La tranche de cerveau est disposée de telle manière à ce qu'elle soit à l'intérieur de ce cadre. Les dimensions optimales du cadre sont de $20 \times 12 \text{ mm}$. La sonde parcourt la totalité du cadre et passe également sur la bande de téflon, comme illustré par la flèche sur le schéma de la figure 4.2. L'intensité des signaux de fluorescence collectée est modifiée par la réflexion sur le téflon ou par l'absorption du cadre noir, ce qui permet de recalibrer les positions de la mesure le long de l'axe x . La photo prise de la tranche dans son cadre permet de faire correspondre les acquisitions de fluorescence avec la morphologie de la tranche de cerveau. Des informations supplémentaires sont apportées en repositionnant les données histologiques sur les photos des tranches. L'erreur sur la position (axe x) est reliée à la précision de la définition de l'origine ($x = 0$) correspondant au début de la tranche et qui varie entre deux lignes d'acquisitions. Chaque acquisition correspondant à $0,25 \text{ mm}$, l'erreur en x est inférieure à $0,25 \text{ mm}$. Suivant l'axe y , l'erreur est estimée par la résolution spatiale de la sonde qui est de $0,5 \text{ mm}$, nous considérons donc cette erreur de $\pm 0,25 \text{ mm}$.

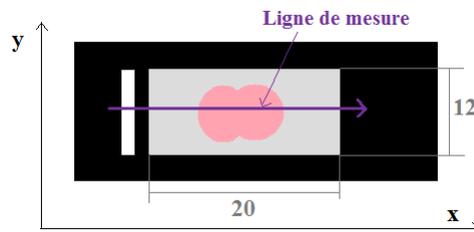


FIGURE 4.2 – Schéma du cadre permettant le recalage des mesures.

4.1.3 Analyse histologique des tranches

Suite à nos mesures spectroscopiques, toutes les tranches tissulaires ont été fixées par immersion dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % avant de suivre un processus particulier de coloration. La coloration que nous avons employée pour étudier la composition du tissu est l'hématoxyline et l'éosine (H& E, voir la partie 1.2.3.1). Pour rappel, l'hématoxyline colore les noyaux des cellules en bleu et l'éosine colore des compartiments comme le cytoplasme avec des nuances de rouge. Dans un premier temps, les colorations des coupes tissulaires ont été effectuées à l'hôpital Sainte-Anne, puis elles ont été réalisées au laboratoire.

Protocole de coloration Le protocole que nous avons utilisé est constitué des étapes suivantes : après des bains successifs de sucrose pour cryoprotection, les échantillons fixés sont congelés dans le milieu d'enrobage à -80°C . Ensuite, grâce à un cryostat, des coupes coronales flottantes de $20\ \mu\text{m}$ d'épaisseur sont réalisées et conservées dans une solution de PBS ($0,1\ \text{M}$) contenant de chlorure de sodium à 0,4 % pour être coloré à l'hématoxyline-éosine. Après déshydratation à l'éthanol et des bains de xylène, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage Eukitt. Nos coupes ont été observées via un microscope plein champ Nikon Eclipse 80i à grossissement variable (entre $\times 2$ et $\times 20$).

4.1.4 Analyse des données

Deux méthodes d'analyse des données ont été effectuées et seront comparées dans la suite du chapitre. Il s'agit d'une méthode utilisant les spectres « bruts », soit l'intensité mesurée sans traitement autre que la soustraction du bruit de fond et la correction de la fonction de réponse du spectromètre. L'autre méthode considère le spectre total comme la somme pondérée de spectres d'émission des fluorophores excités.

4.1.4.1 Description des acquisitions spectrales typiques

Les fluorophores excités dépendent de la longueur d'onde du laser, soit 375 ou $405\ \text{nm}$. À chaque longueur d'onde d'excitation correspond donc un traitement qui lui est spécifique. Pour $375\ \text{nm}$, voir figure 4.3 a., un pic unique est observé, son maximum est visible autour de $460\ \text{nm}$. Dans ce cas, nous considérons que les fluorophores contribuant majoritairement au spectre sont les NADH¹. Les autres possibles contributions sont négligées. Il existe des longueurs d'onde permettant d'exciter les NADH de manière plus adaptée comme $337\ \text{nm}$, par exemple.

La figure 4.3 b. est une acquisition caractéristique des mesures sur tissus extraits, sous une excitation de $405\ \text{nm}$. Cette longueur d'onde d'excitation présente l'avantage d'exciter plusieurs fluorophores, permettant ainsi de multiplier les sources d'indicateurs potentiels. Un léger pic est observé autour de $410\ \text{nm}$ et correspond à

1. Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

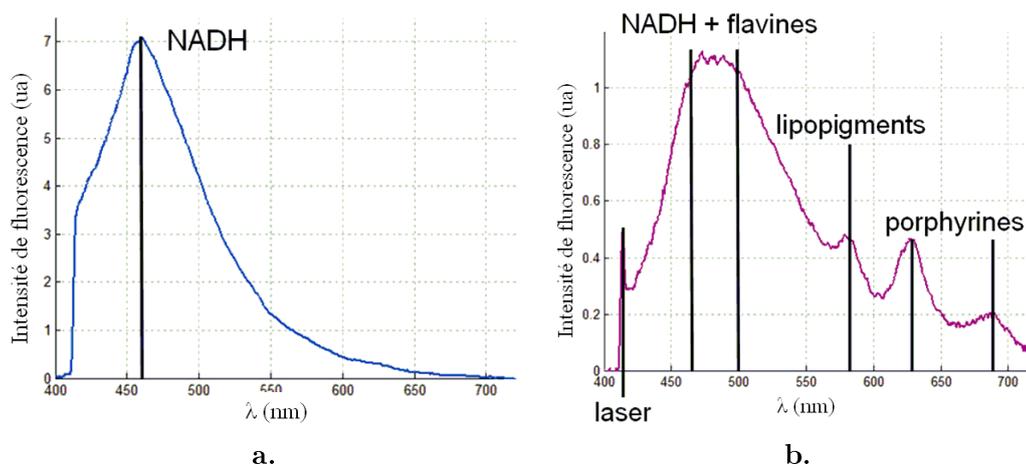


FIGURE 4.3 – Schéma du cadre permettant le recalage des mesures.

une partie de la lumière laser réfléchiée par le tissu. Le large pic dont le maximum s'étale entre 470 et 500 nm est une contribution de l'émission des NADH et des flavines. Vers 580 nm , nous pouvons observer un pic que nous attribuons à la fluorescence des lipopigments. Les deux derniers pics, dont les maxima se trouvent à 620 et 680 nm sont dus aux porphyrines ou à leurs dérivées (chlorines).

4.1.4.2 Traitement des données « brutes »

Une première méthode est utilisée dans le cas des acquisitions enregistrées sous une excitation de 375 nm . Les données collectées pour chaque spectre sont le maximum d'émission, la longueur d'onde correspondant à ce maximum ainsi que l'intégrale sous la courbe, pour des λ d'émission comprises entre 425 et 720 nm .

Une méthode de traitement des données « brutes » a été effectuée sur les données à 405 nm . Dans ce cas, plusieurs maxima sont repérés dans des plages de longueur d'onde prédéfinies, rapportées dans le tableau 4.1, et qui correspondent chacune à l'émission d'un fluorophore endogène. Il est à noter que le recouvrement spectral des NADH et des flavines complique l'extraction de la contribution de chaque molécule.

Fluorophore	Intervalle de longueurs d'onde
NADH + Flavines	de 470 à 520 nm
Lipopigments	de 570 à 590 nm
Porphyrines à 620 nm	de 610 à 630 nm
Porphyrines à 680 nm	de 670 à 690 nm

TABLE 4.1 – Tableau des intervalles en longueur d'onde sur lesquelles le maximum d'intensité est cherché, pour les données brutes.

4.1.4.3 Traitement des données par ajustement

Un spectre de fluorescence mesuré peut être considéré comme une somme pondérée des spectres d'émission des fluorophores endogènes excités pour une longueur d'onde donnée. Les différentes contributions, soient les spectres de chaque fluorophore excité sont ajustées pour correspondre à l'acquisition initiale. Ceci est traduit par l'équation 4.1, où $S_{total}(\lambda)$ est le spectre mesuré, i le fluorophore, S_i le spectre d'émission du fluorophore i et f_i le facteur multiplicatif de ce spectre. Les 5 fluorophores considérés sont les NADH, les flavines, les lipopigments et deux spectres de porphyrines centrés environ à 620 et 680 nm . Pour $\lambda_{exc} = 405 nm$, le spectre des flavines ($S_{Flav}(\lambda)$) est ajusté par un spectre d'émission, tiré de la littérature [Barrio et al., 1973]. Pour les NADH ($S_{NADH}(\lambda)$), nous avons utilisé le spectre obtenu lors de nos mesures à une longueur d'onde d'excitation à 375 nm , spectre qui est clairement dominé par les NADH. Une méthode similaire a été utilisée par [Wu and Qu, 2006]. Les autres spectres d'émission sont approchés par des gaussiennes, soit pour le pic de lipopigments ($S_{Lipo}(\lambda)$), dont le pic est situé vers 580 nm , ainsi que pour les pics de porphyrines, avec un premier vers 620 nm ($S_{P620}(\lambda)$) et un second autour de 680 nm ($S_{P680}(\lambda)$).

$$S_{total}(\lambda) = \sum_{i=1}^5 f_i \cdot S_i(\lambda) \quad (4.1)$$

Cette approche permet en particulier de décorréler les intensités maximales d'émission des NADH, flavines et lipopigments, puisque les spectres de ces fluorophores se recouvrent de manière non négligeable. Les degrés de libertés laissés aux paramètres des spectres d'émission des fluorophores sont limités. Ceux-ci sont récapitulés dans le tableau 4.2. Les paramètres de sortie du programme sont l'intensité maximale des pics ajustés et la longueur d'onde correspondante, ainsi que l'intégrale sous la courbe. Ce traitement est illustré sur la figure 4.4. L'optimisation de l'ajustement se fait par la méthode des moindres carrés non linéaire. Celui-ci possède toujours un coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté) supérieur à 0,95. L'erreur relative, soit la différence entre la somme pondérée et l'acquisition, est inférieure à 10 %, quelle que soit la longueur d'onde.

Degré de liberté	λ_{em} maximale	LTMH (nm)
NADH	460 \pm 10 nm	Fixe
Flavines	530 \pm 10 nm	Fixe
Lipopigments	de 575 à 585 nm	de 0 à 25 nm
Porphyrines à 620 nm	de 615 à 630 nm	de 0 à 50 nm
Porphyrines à 680 nm	de 675 à 690 nm	de 0 à 50 nm

TABLE 4.2 – Tableau des limitations des paramètres de l'ajustement.

Pour une excitation de 375 nm , un traitement par ajustements a été testé, prenant en compte deux contributions théoriques tirées de la littérature pour les NADH

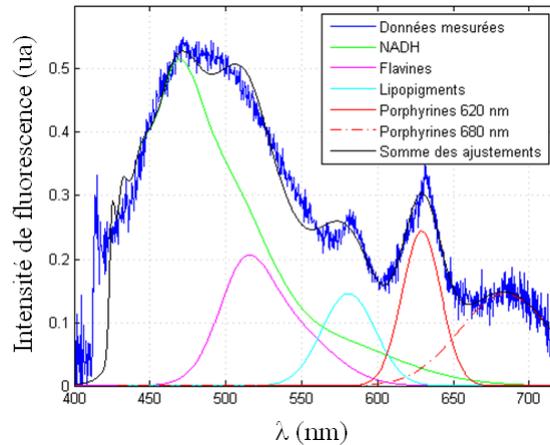


FIGURE 4.4 – Acquisition à la longueur d'onde d'excitation 405 nm et les spectres ajustés par notre programme de traitement.

et les flavines. La contribution des flavines ajustée était très faible comparée à celle des NADH, restant toujours inférieur à 5 %. De ce fait, notre hypothèse semble validée : seules les NADH émettent de la fluorescence (à $\lambda_{exc} = 375 \text{ nm}$). Aucun traitement par ajustement ne sera donc utilisé dans ce cas.

4.1.4.4 Traitement commun

Quelle que soit la méthode de traitement des données utilisée, le procédé d'analyse suivant est identique. Chaque ligne d'acquisition, voir figure 4.2, est traitée séparément, puis une statistique sur plusieurs lignes acquises sur une même tranche de cerveau de rat est effectuée. Celle-ci sera détaillée plus tard. En premier lieu, plusieurs régions d'intérêt (ROI) sont définies sur une ligne de mesure. Une ROI correspond à une moyenne sur trois spectres acquis de façon consécutive. Pour trois acquisitions, la taille de la ROI est d'environ $1 \times 0,5 \text{ mm}^2$. La taille de celle-ci est limitée de manière à ce que le contenu des ROIs soit homogène. Les ROIs sont définies en fonction de l'histologie des tissus, soit du tissu tumoral, du tissu infiltré ou du tissu sain. Le tableau 4.3 présente les dénominations ainsi qu'une brève description des zones. Les trois premières zones sont qualifiées de tumorales ou infiltrées et les trois suivantes sont des zones saines définies « en miroir » des zones tumorales dans l'hémisphère sain. Les zones sont définies visuellement sur une photo de la tranche de cerveau. Celles-ci sont illustrées sur la figure 4.5. La première ROI correspond à la partie centrale de la tumeur, souvent nécrosée dans le cas des tumeurs C6. L'infiltration étant difficile à repérer à l'œil nu, une validation des données est nécessaire grâce à l'histologie dans le cas où les régions ont été définies a priori.

La figure 4.6 a. illustre les spectres moyens normalisés des ROIs pour un rat. Sur la figure 4.6 b., nous pouvons observer l'erreur entre la moyenne et les spectres compris dans les ROIs définies. Ceci permet de vérifier que la variation entre les spectres

ROI	Dénomination	Définition
1	C ou N	Zone tumorale centrale ou nécrosée
2	I_{ext}	Zone « infiltrée » dans les berges de la tumeur vers l'extérieur du cerveau
3	I_{int}	Zone « infiltrée » dans les berges de la tumeur vers l'intérieur du cerveau
4	S_c ou S_n	Zone saine dans la partie de l'hémisphère sain en miroir de la zone 1
5	S_{ext}	Zone saine dans la partie extérieure de l'hémisphère sain
6	S_{int}	Zone saine dans la partie intérieure de l'hémisphère sain

TABLE 4.3 – Tableau de définition des zones repérées sur chaque ligne de mesure analysée.

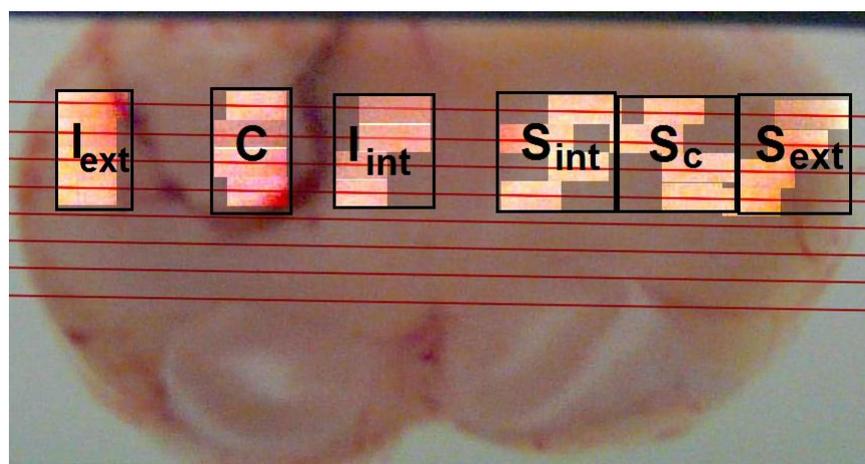
ne dépasse pas 15 %, ainsi la ROI soit validée. Si tel n'est pas le cas, la ROI est légèrement déplacée ou réduite à deux acquisitions. Les intensités, longueurs d'onde et intégrales moyennes sont déterminées dans ces régions pour chaque fluorophore, assurant ainsi une multitude d'indicateurs potentiels.

Les cerveaux de deux rats témoins ont été extraits et analysés. Ces rats ont subi une intervention semblable aux autres, excepté le fait qu'aucune cellule tumorale ne leur a été inoculée. Seul le milieu (PBS) a été injecté, en respectant le protocole habituel. Dans le tableau 4.4 ci-dessous est présentée une liste de rats dont les résultats seront présentés par la suite. Au cours de la thèse, les protocoles de mesures et en particulier le dispositif, ont changé légèrement. En particulier, pour les trois premiers rats de la liste, le filtre utilisé était un filtre passe-haut à 450 nm, ne permettant pas d'identifier la contribution des NADH. De plus, les mesures n'ont été effectuées qu'à une longueur d'onde d'excitation de 405 nm.

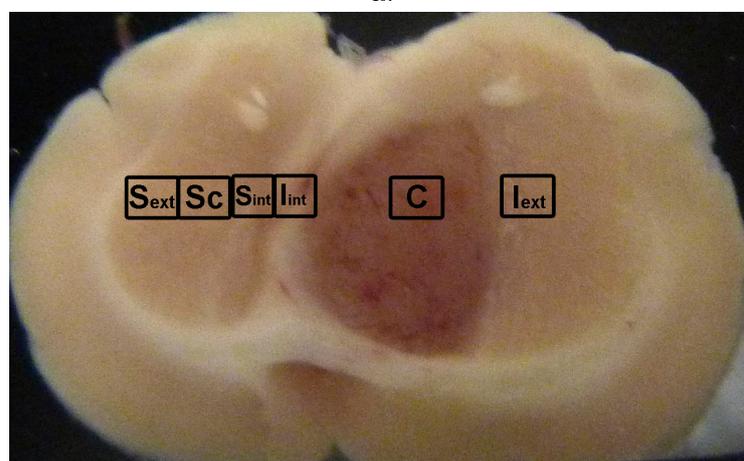
Traitement statistique Différents tests statistiques ont été effectués, variant en fonction du nombre de données traitées. L'hypothèse de base est toujours l'hypothèse d'égalité de la moyenne des deux populations considérées.

Dans le cas d'une comparaison intra-rat, soit sur un seul rat, les données acquises sur les différentes lignes sont regroupées. Le nombre d'acquisitions pour une zone (tumorale centrale (C) ou infiltrée extérieure (I_{ext}) par exemple) varie entre 6 et 11. Il dépend de la taille de la ROI concernée. Nous avons alors effectué des tests non paramétriques pour des données appariées, le test approprié étant le test de rangs de Wilcoxon (calculé à l'aide de Matlab).

Les tests effectués dans ce cas comparent les zones entre elles une à une, par exemple, la zone centrale tumorale (C) est comparée successivement aux 5 autres zones. Les tests effectués couvrent ainsi la totalité des combinaisons de comparaisons possibles entre les zones définies, soit un total de 15 tests par rat.



a.



b.

FIGURE 4.5 – Photos illustrant les différentes ROIs repérées sur une tranche de cerveau de rat, exemple sur le rat 4 (a., C6) et le rat 8(b., RG2).

Pour des comparaisons inter-rat, soit entre plusieurs rats, le nombre d'acquisitions par zone est le même, mais, dans ce cas, les données sont considérées comme non appariées. Nous avons donc effectué le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Le tableau 4.5 présente les rats analysés, le nombre de lignes acquises par rat en fonction de la longueur d'onde d'excitation ainsi que le nombre d'acquisition par zone (toutes lignes confondues). Le nombre d'acquisitions par zone est équivalent, quelle que soit la longueur d'onde d'excitation. Ces données seront celles qui seront utilisées par la suite pour effectuer les tests statistiques.

Bref comparatif données brutes/données ajustées À titre d'exemple, sur la figure 4.7 a., est illustré la représentation en « boîtes à moustache » (grâce au logiciel R [R Development Core Team, 2010]) de l'intensité maximale de flavines

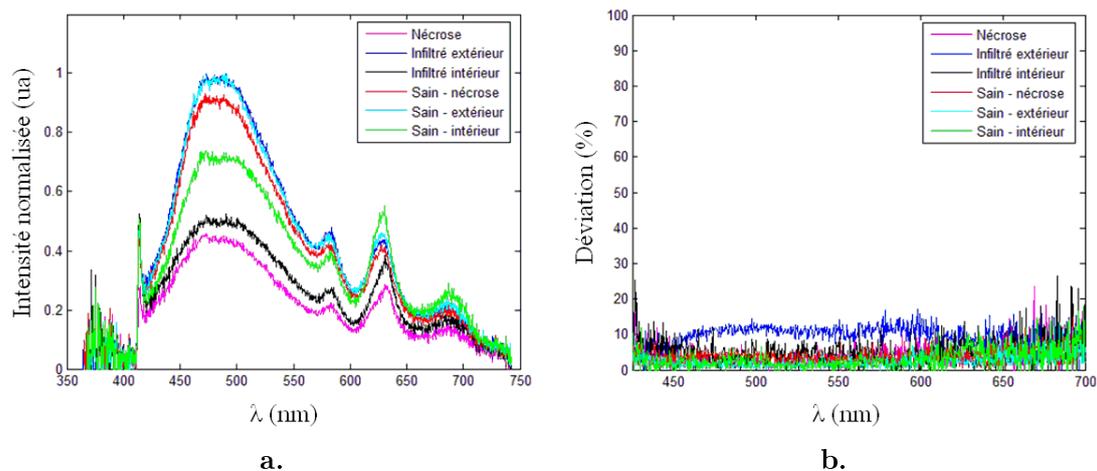


FIGURE 4.6 – Moyennes normalisées en fonction du maximum de la courbe la plus intense (a.) et erreur (b.) des ROIs pour un rat injecté RG2, excitation à 405 nm.

Numéro de rat	Lignée implantée	λ_{exc} (nm)	N cellules	Volume injecté (μl)
1	témoin	405	0	1,5
2	C6	405	10^5	1,5
3	C6	405	10^5	1,5
4	C6	405	10^5	1,5
5	RG2	405	$3 \cdot 10^3$	5
6	RG2	375/405	$3 \cdot 10^3$	5
7	RG2	375/405	$3 \cdot 10^3$	5
8	RG2	375/405	$3 \cdot 10^3$	5
9	C6	375/405	$2 \cdot 10^4$	5
10	C6	375/405	$2 \cdot 10^4$	5
11	témoin	375/405	0	5

TABLE 4.4 – Tableau récapitulatif des rats étudiés dans le cadre de ce chapitre.

détectées chez le rat 2. Les résultats issus du traitement des données « brutes » ou par ajustement sont présentées pour chaque zone définie. Qualitativement, le comportement est semblable dans les deux cas. Pour la figure 4.7 a., les résultats du test de rangs de Wilcoxon pour comparer les différentes zones sont équivalents à 85 %. La zone infiltrée extérieure (I_{ext}) est significativement différente ($p < 0,005$) des zones saines centrale (S_c) et extérieure (S_{ext}) pour les données ajustées, alors qu'elle ne l'est pas pour les données brutes.

Sur la figure 4.7 b., nous pouvons constater que le traitement des données « brutes » présente un résultat différent des données ajustées. La zone tumorale

Numéro de rat	N lignes de mesures 375 nm/405 nm	N acquisitions par ROI
1	0/3	7
2	0/4	11
3	0/4	10
4	0/4	X*
5	0/3	8
6	3/3	8
7	4/4	10
8	3/3	9
9	3/3	6
10	3/3	6
11	2/2	5

* : les ROIs n'ont pu être définies sur le rat 4, car la tumeur occupait la quasi-totalité du cerveau, et l'histologie a montré une infiltration de la totalité de la coupe. Il est donc impossible de trouver du tissu sain sur cette tranche.

TABLE 4.5 – Tableau récapitulatif du nombre de lignes et d'acquisitions par zone pour les rats étudiés dans ce chapitre.

centrale (C) est significativement différente de toutes les autres zones ($p < 0,005$), ce qui n'est pas le cas pour les données ajustées, où elle ne peut être différenciée des zones infiltrées I_{ext} et I_{int} ($p > 0,2$), ni de la zone saine intérieure S_{int} ($p > 0,05$). Nous attribuons cette différence au fait que le traitement « brut » des lipopigments ne tient pas compte de l'augmentation des flavines, observée sur la figure 4.7 a.. En effet, les spectres des flavines et des lipopigments se superposent. Dans le traitement des données brutes, l'intensité maximale repérée pour les lipopigments est en réalité une somme du maximum d'émission des lipopigments et de l'intensité de flavines émises à la même longueur d'onde. Le traitement par ajustements permet de s'affranchir de cet inconvénient puisque tous les spectres sont décorrélés les uns des autres. Dans ce cas, l'intensité maximale des lipopigments n'est pas entachée de l'intensité de fluorescence émise par un autre fluorophore, dans la mesure de la justesse de l'ajustement, bien entendu.

Dans la suite du document, nous avons privilégié l'interprétation des données de la méthode par ajustement. Sauf mention contraire, les données présentées proviennent donc d'un traitement par ajustement.

4.1.5 Erreurs et limitations des mesures

4.1.5.1 Évolution du signal en fonction du temps

Une étude a été menée quant à la dégradation du signal autofluorescent en fonction du temps écoulé depuis le sacrifice. Les tissus extraits examinés sont frais

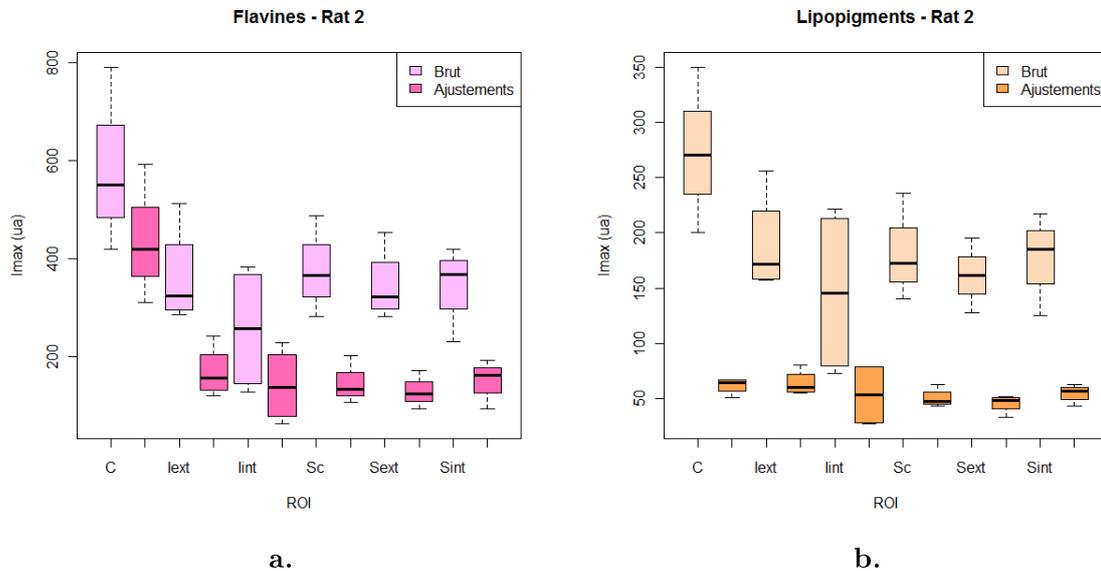


FIGURE 4.7 – Comparaison des deux traitements pour le rat 2 injecté C6, excitation à 405 nm .

et conservés dans une solution de PBS. Les fluorophores peuvent donc s'échapper des cellules abîmées et donc se retrouver dans la solution ou se dégrader avec le temps, ce qui aura un impact sur le signal autofluorescent. Pour rappel, nos mesures commencent entre 10 et 15 minutes après le sacrifice du rat, effectué à t_0 . Ce temps est incompressible et correspond au temps nécessaire pour extraire le cerveau du rat, le couper en tranches et le placer dans le dispositif de mesures. Dans cette partie, nous nous intéressons donc à la variation de l'intégrale sous la courbe d'émission des fluorophores en fonction du temps. Tous les autres paramètres de mesure sont invariants.

La même ligne de mesure a été prise à deux reprises, pour 10 et 30 minutes après le sacrifice du rat, soit l'intervalle de temps pendant lequel les mesures sont prises sur les tranches de rat actuellement. Grâce à un second rat, nous avons étudié la variation pour un intervalle de temps compris entre 30 minutes et 2 h 30. Dans ces cas, trois zones sont également définies, une zone tumorale (1), une zone saine dans la matière grise (2) et une zone saine dans la matière blanche (3). Ces études ont été menées sur des rats injectés C6. Des tests ont été effectués pour garantir que la variation de signal observée n'est pas due au photoblanchiment du tissu. Dans la gamme d'intensité et de durée d'illumination utilisée pour notre étude, aucun effet dû au photoblanchiment n'a été constaté.

Variation pendant les mesures Dans un premier temps, nous avons constaté une baisse générale de la lumière de fluorescence collectée entre 10 et 30 minutes. La figure 4.8 présente un spectre acquis pour une même position aux deux temps

différents. L'intensité de fluorescence émise semble diminuée d'un facteur 2.

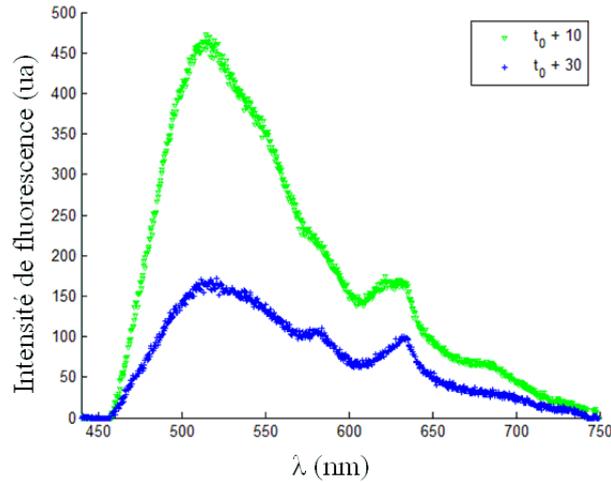


FIGURE 4.8 – Baisse générale de l'intensité de fluorescence collectée entre 10 et 30 minutes après le sacrifice du rat. Acquisition pour une position dans la zone tumorale.

Le traitement par ajustement permet de décorrélérer les différentes contributions des fluorophores et ainsi observer si elles varient de manière similaire ou non pendant l'intervalle de temps considéré et suivant les zones, saines ou tumorales. Pour ce faire, un facteur de décroissance est calculé grâce aux intégrales sous les courbes, notées Int , en fonction de la position x , suivant l'équation 4.2.

$$Facteur(x) = \frac{Int_{t_0+30'}(x) - Int_{t_0+10'}(x)}{Int_{t_0+10'}(x)} \quad (4.2)$$

La figure 4.9 **a.** présente la variation de l'intégrale sous la courbe des flavines (méthode par ajustement) en fonction de la position sur une ligne de mesures pour des acquisitions à $t_0 + 10'$ et $t_0 + 30'$. Les zones étudiées sont marquées en vert. La figure 4.9 **b.** montre la variation du facteur de décroissance en fonction de la position pour la même ligne de mesure. Le facteur est moyenné dans chaque zone représentée graphiquement. Le même traitement est effectué pour chaque fluorophore présent. Les résultats de pourcentage de diminution entre 10 et 30 minutes sont rassemblés dans le tableau 4.6.

Les flavines et porphyrines à 620 nm semblent diminuer de manière identique, quelle que soit la zone considérée, la diminution est d'environ 55 et 40 % respectivement. Considérant les porphyrines à 680 nm et les lipopigments, la baisse d'émission de fluorescence est variable suivant la composition de la zone. Ces composés semblent se dégrader différemment suivant leur environnement.

Au vu de ces résultats, il est crucial de faire les mesures au plus vite après le sacrifice de l'animal. Nous avons donc pris soin d'effectuer les mesures rapidement ainsi que de se trouver toujours dans le même intervalle de temps après le sacrifice,

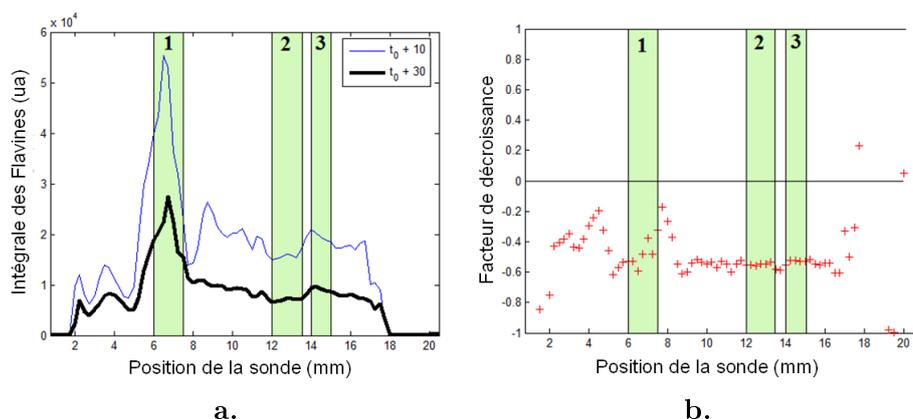


FIGURE 4.9 – Intégrale des flavines (a.) et facteur de décroissance (b.) en fonction de la position sur une ligne de mesures.

Fluorophore	Zone tumorale (1)	Zone saine MG (2)	Zone saine MB (3)
Flavines	50	55	55
Lipopigments	30	45	40
Porphyrines à 620 nm	40	40	40
Porphyrines à 680 nm	55	50	40

TABLE 4.6 – Pourcentage de décroissance en fonction du fluorophore et de la zone considérés.

pour pouvoir comparer au mieux les mesures effectuées. Les mesures sur une seule tranche de cerveau de rat se font assez rapidement. En effet, une ligne de mesure est acquise en 2 minutes environ. Nous avons constaté, pour des mesures de 3 à 4 lignes par échantillon, en moyenne 7,5 minutes sont nécessaires et ce pour une seule longueur d'onde donnée. Nous considérerons que les corrections sur une ligne même ainsi que d'une ligne à l'autre ne sont pas nécessaires. Par contre, pour faire une statistique sur une plus grande partie de la tranche de cerveau et plus encore entre différents rats, une correction semble nécessaire.

Cependant, en ce qui concerne les mesures à notre disposition, une telle correction des données en fonction de leur moment d'acquisition ne paraît pas possible. Nous n'avons pas d'information assez précise sur la manière dont le signal varie entre 10 et 30 minutes après le sacrifice. De plus, l'étude de variation en fonction du temps présentée a été effectuée sur des rats injectés C6, les observations se sont donc pas nécessairement transférables aux rats injectés avec des cellules RG2, en tout cas pour la zone tumorale. Ceci est particulièrement vrai pour toute comparaison ou correction au niveau des NADH qui n'ont pas été étudiés lors des premières expériences C6 pour lesquelles un filtre de coupure inadapté à l'exploitation du spectre d'émission des NADH a été utilisé.

Dans de futures manipulations, une étude plus précise et dans des conditions optimales devrait être menée. Celle-ci permettrait alors de mettre en place une correction de l'intensité de fluorescence en fonction du temps d'acquisition après le sacrifice.

Variation de 30 minutes à 2 h 30 après le sacrifice La figure 4.10 **a.** présente plusieurs acquisitions faites à une même position pour des intervalles de temps après le sacrifice compris entre 30 minutes et 2 h 30. Pour des pics comme ceux des flavines (vers 520 nm) et des lipopigments (épaule vers 580 nm), la variation d'intensité semble se stabiliser. Ce n'est pas le cas pour les pics de porphyrines (620 et 680 nm) qui diminuent de manière beaucoup plus forte. Sur la figure 4.10 **b.**, les intégrales normalisées sont tracées pour les différents fluorophores contribuant au signal. Nous pouvons constater que la diminution est de forme exponentielle. Une simple exponentielle a pu être ajustée pour chaque fluorophore ($R^2 > 0,97$), excepté pour les lipopigments où une somme pondérée de deux exponentielles est la plus adaptée ($R^2 = 0,9$).

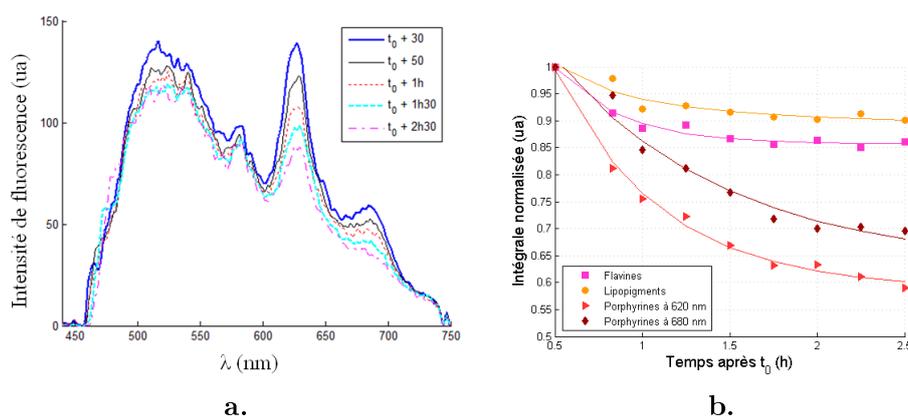


FIGURE 4.10 – Acquisitions (**a.**) et intégrales sous les courbes de différents fluorophores (**b.**) à une même position dans la zone saine, pour plusieurs intervalles de temps après le sacrifice du rat (t_0).

Ces résultats renforcent l'argument de la nécessité d'effectuer les mesures le plus rapidement possible après le sacrifice du rat. La variation du signal n'étant pas homogène en fonction des fluorophores et des zones considérées, toute correction devient délicate. Des mesures effectuées dans les 20 minutes suivant l'extraction de l'échantillon et une reproductibilité des temps d'acquisition entre les rats sont deux facteurs essentiels pour permettre des études comparatives, au plus proche des résultats *in vivo*. Nous avons, dans la mesure du possible, respecté ces conditions lors de nos expérimentations.

4.1.5.2 Répétabilité entre rats

L'injection des cellules tumorales à l'aide d'un appareil stéréotaxique se fait toujours au niveau du striatum. La position de celui-ci est repérée grâce à un atlas du cerveau du rat, celle-ci dépend également de la taille du cerveau et donc de l'âge du rat. Les incertitudes sur la définition du point d'injection sont de l'ordre de $\pm 0,25mm$ en x et y , en moyenne. L'erreur en z , quant à elle est plus élevée, soit de $\pm 0,5 mm$. Toutefois, nous avons observé des tumeurs se développant dans des endroits un peu éloignés du striatum, ce qui peut être dû à la mobilité des cellules tumorales dans le cerveau. Dans ce cas, la comparaison d'un rat à l'autre est compliquée. Ceci peut s'apprécier en comparant les figures 4.11 a. et b., correspondant à deux rats injectés RG2, le rat 5, figure 4.11 a., dont la tumeur se localisait dans le striatum, soit au centre de l'hémisphère, et le rat 6, figure 4.11 b., possédant une tumeur localisée en périphérie du cerveau, soit dans le cortex.

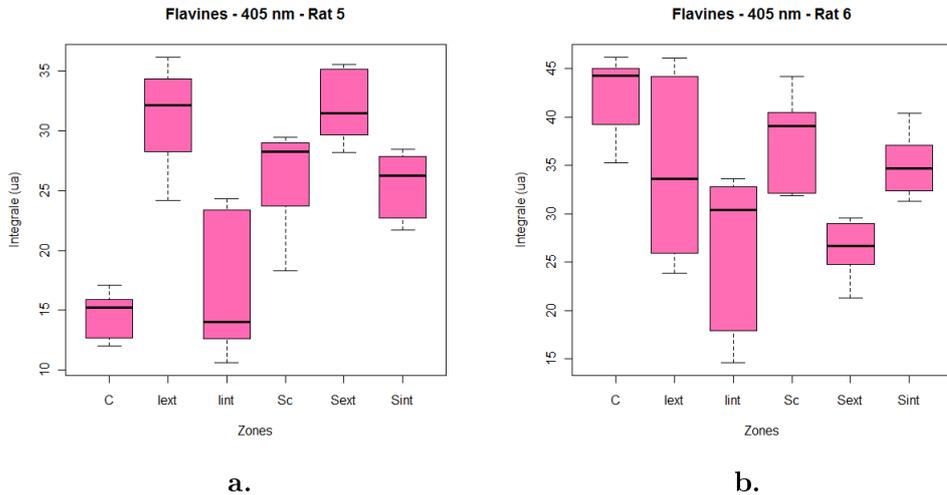


FIGURE 4.11 – Intégrales de flavine collectée dans les ROIs définies pour deux rats différents injectés RG2. La localisation de la tumeur est centrale dans le cas du rat 5 et périphérique pour le rat 6.

Pour montrer la dépendance des résultats obtenus en fonction de la localisation tumorale dans le cerveau, un test statistique non paramétrique a été effectué entre le rat 6, dont la tumeur a évolué dans le cortex, et les rats 5, 7 et 8 dont la tumeur est située dans le striatum. Les rapports d'intégrales de 5 fluorophores ont été analysés entre les zones tumorale centrale (C) et saine centrale (S_c). Le tableau 4.7 présente les résultats des tests statistiques comparant le rapport C/S_c entre les différents rats injectés RG2, pour chaque fluorophore. Le rapport C/S_c pour le rat 6 est statistiquement différent des autres rats dans 80 % des cas. Les tests comparant les rats 5, 7 et 8 présentent moins de 50 % de différences statistiques. La signature de la tumeur semble donc dépendre de sa localisation dans le cerveau.

Suite à cette constatation, nous avons choisi de comparer des tumeurs s'étant

Rats comparés	Fluorophores				
	NADH	Flavines	Lipopigments	P620 <i>nm</i>	P680 <i>nm</i>
Rat 6 vs Rat 5	0,42	$8 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$
Rat 6 vs Rat 7	0,13	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	0,03	0,13
Rat 6 vs Rat 8	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$

TABLE 4.7 – Tableau des résultats (*p-value*) des tests de Mann-Whitney comparant le rapport d'intégrales des fluorophores entre les zones C et S_c . La valeur seuil de p est définie à 0,005. les cases vertes indiquent les tests pour lesquels l'hypothèse d'égalité des moyennes ne peut être rejetée.

développées dans les mêmes régions, afin d'éviter des variations non significatives. Bien entendu, cette hypothèse reste à valider lorsqu'un nombre plus élevé de tumeurs périphériques sera disponible à l'étude.

Les trois rats pouvant être mis en comparaison pour la lignée RG2 sont donc les rats 5, 7 et 8. Les protocoles d'injection et méthodes de traitement étant différentes pour la lignée C6 (voir tableau 4.4), nous ne pouvons corrélérer ces résultats entre-eux. Nous comparerons donc les deux rats 2 et 3 d'une part et les rats 9 et 10 séparément d'autre part.

Les constatations évoquées dans cette partie illustrent la difficulté de trouver un indicateur robuste dans le cas du glioblastome, ce devant la multitude de localisations et de comportements différents.

4.2 Résultats ex vivo

4.2.1 Description histologique pour les cellules RG2 et C6

Via des colorations (voir la partie 4.1.3) nous pouvons mieux identifier les structures cellulaires des tissus et relier les ROIs choisies a priori aux différents types tissulaires. Cette étape est indispensable et doit être effectuée systématiquement afin de retrouver l'identité histologique de la signature spectrale.

À titre représentatif, les figures 4.12 présentent respectivement une image histologique complète et des spectres de fluorescence d'une tranche de cerveau du rat 4 (figure 4.12 a.) et du rat 8 (figure 4.12 b.). Le rat 4 a subi une injection de cellules de la lignée cellulaire C6 et ses tranches de cerveau ont été colorées à l'hôpital Saint-Anne à l'H&E tandis que le rat 8 a subi une injection de lignée cellulaire RG2 et ses tranches de cerveau ont été colorées dans notre laboratoire. Chaque image histologique est superposée à la photo de la figure 4.5 de la même tranche, ce qui permet de recalibrer les ROIs définies préalablement.

Pour la figure 4.12 a., les spectres de fluorescence ont été acquis sous une excitation de 405 *nm* avec un filtre passe-haut de 450 *nm*. Ces spectres correspondant chacun à la moyenne d'une ROI (en général 2 à 3 acquisitions) sont représentés à droite de chaque image. Les incertitudes sont relatives à l'écart-type des acquisitions

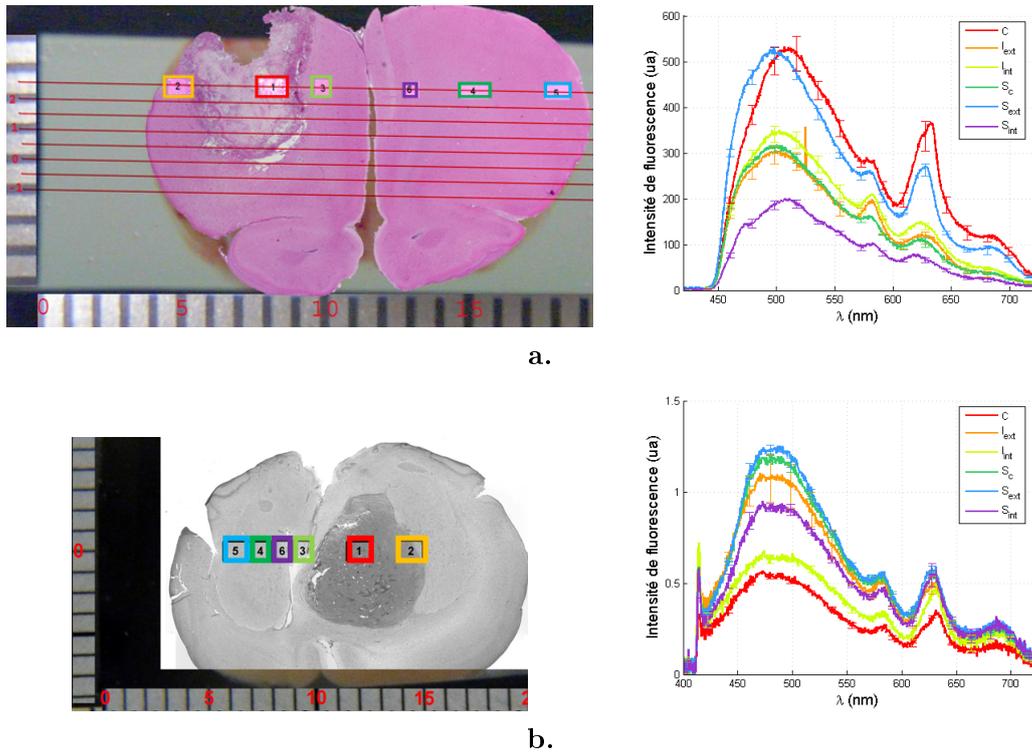


FIGURE 4.12 – **a.** : coupe histologique, coloration H& E d'une tranche du cerveau du rat 4, injecté de C6 et les spectres de fluorescences associés à chaque ROI ; **b.** coupe histologique, coloration H& E, d'une tranche de cerveau du rat 8, injecté de RG2 et les spectres de fluorescences associés à chaque ROI.

de chaque ROI. Cette mise en rapport des données spectrale et histologique nous permet de corréler les informations structurale et morphologique, étape importante du diagnostic spectral.

La figure 4.12 **a.** est caractérisée par une zone centrale nécrotique bien établie (typique pour les tumeurs C6). Cette masse tumorale est bordée par une structure aux contours diffus qui est qualifiée de zone infiltrée. Les limites de la zone nécrosée apparaissent clairement sur les coupes colorées H& E, car la tumeur est bordée de nécrose palissadique, caractéristique des glioblastomes. Une prolifération microvasculaire est également très bien définie.

Ces spectres montrent la dépendance spectrale du choix de ROIs. Bien qu'un léger décalage spectral d'environ 10 nm vers le rouge soit détecté dans la zone cancéreuse pour cet exemple, les mêmes molécules répondent dans les différentes régions. Ces molécules sont les flavines (FAD) vers 520 nm, les lipopigments vers 560 nm et les porphyrines à 620 et 680 nm. L'intensité de fluorescence est plus prononcée dans la zone cancéreuse spécialement au niveau de la FAD et de la porphyrine à 620 nm. Pour les flavines, ceci pourrait être attribué à l'altération du métabolisme cellulaire

qui perturbe l'équilibre entre le FAD (fluorescent) et FADH (non fluorescent). La fluorescence au-delà des 600 *nm* est probablement attribuée à la porphyrine [Yang et al., 1987; Veld et al., 2005], produite par des microorganismes vivant en surfaces des nécroses [Veld et al., 2005]. Comme illustré dans cette courbe, l'altération tissulaire est reflétée par la forme spectrale et l'intensité. Sur les rats injectés de cellules C6, des proliférations cellulaires de noyaux atypiques légèrement agrandis s'infiltrant dans d'autres endroits du tissu ont été retrouvés. Ces observations histologiques sont en accord avec la littérature [Amharref, 2007; Butte et al., 2011].

Afin de comparer histologiquement le développement de deux lignées cellulaires qualifiés de glioblastome de grade 4, la figure 4.12 **b.** représente une tranche du cerveau du rat 8 injecté de cellules RG2. Cette image a été prise avec une caméra monochromatique, ne permettant de visualiser qu'une seule des deux couleurs présentes sur les coupes. Dans le cas présenté, seule la coloration à l'hématoxyline est visible. L'observation est suffisamment résolue pour visualiser la masse cellulaire développée dans le centre de la tumeur située dans le striatum. Aucune nécrose n'est observée. Les berges sont mieux délimitées sur cette tranche, ce qui est typique des tumeurs RG2 observées lors de nos expérimentations. Aucune masse tumorale n'est observée dans l'hémisphère controlatéral. Nous avons constaté, d'après l'observation des différentes tranches, que les tumeurs adoptent une évolution de forme ovoïde.

Dans le cas d'une tumeur RG2, la réponse spectrale des différentes régions d'intérêt est représentée à droite de la figure 4.12 **b.**. Ces spectres ont été enregistrés sous excitation à 405 *nm* avec un filtre passe haut à 410 *nm* afin de collecter la faible contribution du nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme réduite (NADH). La NADH est une coenzyme impliquée dans le métabolisme énergétique cellulaire et présente une fluorescence sous sa forme réduite inversement à la FAD qui, elle, fluoresce sous sa forme oxydée. À la différence des spectres présentés au-dessus (dans la figure 4.12), ceux-ci ont subi une correction supplémentaire², ce qui explique les différences d'intensité entre les deux rats. Les courbes présentent toujours la fluorescence moyenne sur chaque ROI ainsi que l'incertitude correspondante. Les mêmes molécules répondent dans toutes les régions avec des différences en termes d'intensité spécifiques à chaque zone. Contrairement au C6, les FAD sont moins intenses dans la zone tumorale.

Il est à rappeler que le choix des ROI a été effectué sur la base des seules photos, les images histologiques étant obtenues seulement à la fin de la thèse. Ceci explique en particulier le choix de la zone 2 du rat 8, estimé sur la photo se trouvant dans une zone infiltrée, mais où l'image histologique révèle que cette ROI se trouve pour une partie non-négligeable dans une zone cancéreuse. Si cette réponse ne correspond néanmoins pas à la réponse du tissu cancéreux (ROI 1, zone C), nous pouvons émettre l'hypothèse que ceci soit lié au fait que la réponse métabolique au centre de la tumeur n'est pas comparable à celle de son bord. L'activité mitotique est

2. Correction de l'efficacité du réseau et de la sensibilité spectrale du spectromètre, grâce à une lampe calibrée.

probablement très importante à l'approche des berges, mais pas au centre (voir réponse des tumeurs C6).

Une perspective de ces observations est l'étude chronologique, soit à différents stades de développement tumoral, des modifications induites par la progression de la tumeur sur l'architecture tissulaire et, si possible, sur la réponse spectrale.

4.2.2 Validation de la méthode de traitement

Des rats témoins sains, avec injection de milieu (PBS) sans cellules tumorales, ont subi le même traitement statistique que les rats tumoraux. Des ROIs dans les deux hémisphères sont définies en miroir, et ce afin de vérifier que nos méthodes d'analyse ne créent pas de différences entre les zones définies qui ne soient pas représentatives de leur nature métabolique. Évidemment, les zones *C* ne représentent pas une tumeur, car il s'agit de rats sains. Elles illustrent seulement l'endroit où se développe habituellement la tumeur. Par exemple, nous souhaitons vérifier qu'un changement d'intensité d'un hémisphère par rapport à l'autre est bien représentative d'un cas tumoral. Les figures 4.13 a. et b. présentent la variation de l'intégrale sous la courbe des flavines dans les zones définies pour les deux rats témoins. Le comportement observé sur ces figures est retrouvé sur les différents paramètres de sortie du programme de traitement, à savoir intensité maximale et intégrale sous la courbe pour les différents fluorophores considérés. Les tests statistiques effectués sur ces données sont des tests de rangs de Wilcoxon.

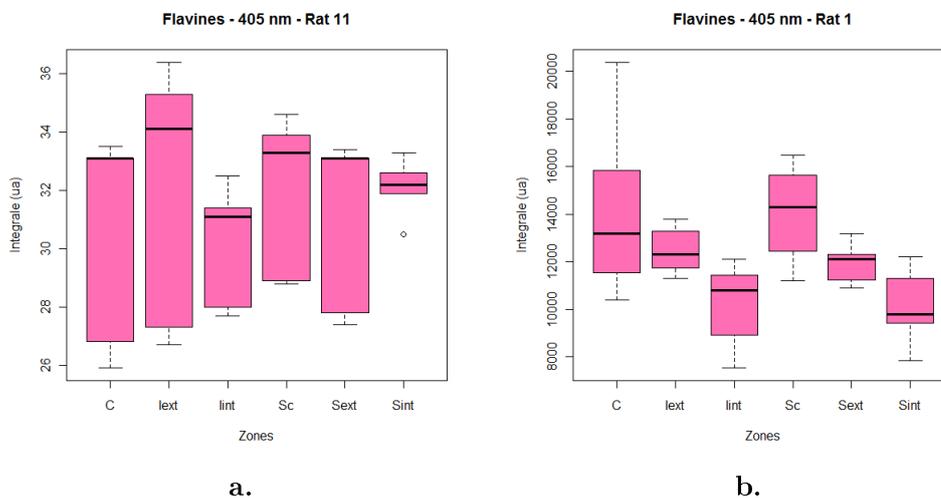


FIGURE 4.13 – Intégrale de flavine collectée dans les ROIs définies pour les deux rats témoins.

Pour le rat 1, les intégrales varient en fonction de la zone et des différences significatives ($p < 0,05$) sont trouvées en comparant les zones entre elles (environ 55 % des tests effectués). Par contre, lorsque les zones sont comparées en fonction de leurs localisations, soient centrales, extérieures ou intérieures, les intégrales sont

comparables ($p > 0,05$). Cette constatation est valable pour tous les fluorophores. Concernant le rat 11, aucune différence significative n'a été trouvée en comparant les différentes zones, et ce pour tous les fluorophores considérés ($p > 0,05$ dans tous les cas).

Ces résultats semblent indiquer que notre traitement permet de trouver une analogie entre zones saines, en particulier si elles sont situées dans des zones symétriques dans les deux hémisphères. Il est également à noter qu'il peut exister des différences significatives entre zones saines, si elles ne se trouvent pas dans une zone à l'histologie comparable. La non significativité trouvée dans le cas du rat 11 peut être imputée au petit nombre d'acquisitions dans chaque ROI ($n = 5$).

4.2.3 Caractéristiques autofluorescentes des RG2

Pour rappel, les résultats présentés dans cette partie sont focalisés sur les rats 5, 7 et 8, voir le paragraphe 4.1.5.2. Les données analysées concernent uniquement les valeurs obtenues grâce au traitement par ajustement.

$\lambda_{exc} = 375 \text{ nm}$: Pour une telle excitation, une forte diminution de l'intensité de fluorescence émise par les NADH tout le long du site tumoral est illustrée sur la figure 4.14, représentant l'intégrale sous la courbe de NADH. La tumeur est située entre les deux barres verticales. La ligne de mesure est représentée par une ligne horizontale. Cette observation est consistante avec des études d'autofluorescence des gliomes menées par d'autres équipes sur des échantillons ex vivo humain [Bottiroli et al., 1998; Croce et al., 2003; Saraswathy et al., 2009]. La figure 4.15 a. est une représentation graphique des résultats mesurés pour le rat 8. Seuls les NADH sont présentés puisque ceux-ci sont seuls détectés pour 375 nm en excitation. Nous pouvons confirmer le fait que l'intensité des NADH est significativement plus faible dans la région tumorale centrale par rapport aux trois zones saines ($p < 0,05$). Les figures 4.15 a. et b. présentent les variations des intégrales sous la courbe d'émission des NADH avec des longueurs d'onde de 375 et 405 nm, respectivement. Ces résultats sont en accord l'un avec l'autre. En effet, les tests statistiques comparant les zones entre elles sont similaires à 80 % pour les longueurs d'onde d'excitation 375 et 405 nm (valeur seuil de p de 0,05, test de rangs de Wilcoxon). Il est à noter que la fluorescence émise sous une excitation à 375 nm est plus élevée qu'à 405 nm, ce qui est consistant avec le fait que les NADH absorbent plus dans les longueurs d'onde inférieures à 400 nm, avec un maximum autour de 340 nm. Cette constatation reste valable, même si la puissance d'excitation à 375 nm est inférieure par rapport à celle à 405 nm.

$\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$: Pour une longueur d'onde d'excitation de 405 nm, l'intégrale sous la courbe des fluorophores dans la partie tumorale centrale est toujours significativement inférieure ($p < 0,05$) à celle des trois zones du côté sain et ce pour tous les fluorophores. Une illustration pour les NADH, flavines et lipopigments est visible sur les figures 4.15 b., c. et d.. Cette constatation est également valable pour les

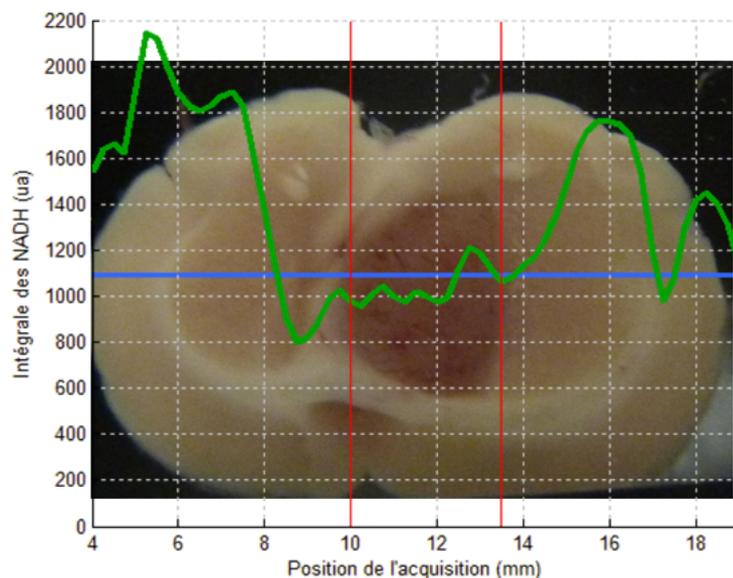


FIGURE 4.14 – Variation de l'intégrale des NADH sur une ligne de mesures, pour le rat 8, injecté RG2, sous une λ_{exc} de 375 nm

rats 5 et 7 pour les trois fluorophores précédemment cités. En ce qui concerne les porphyrines, quelques différences non significatives ont été trouvées, en particulier en comparant les zones tumorales centrales avec les zones saines interne.

Les graphiques 4.15 permettent d'appréhender la difficulté liée à la définition des bords de la tumeur. Pour rappel, les zones ont été définies grâce aux photos, dans un premier temps. Par la suite et au fur et à mesure de la disponibilité des résultats histologiques, la définition des ROI a été validée. Les zones 2 et 3 définies (voir figure 4.15), qualifiées d'infiltrée, peuvent contenir en partie des cellules tumorales et donc coller à leur définition d'infiltré. De même, la zone 6, saine intérieure, pourrait encore être infiltrée et donc comporter des cellules tumorales. D'après l'analyse comparative des intégrales sous les courbes de tous les fluorophores considérée, la zone 3 est significativement différente des trois zones saines considérée ($p < 0,05$). La zone 2, quant à elle, ne peut se différencier des zones saines pour 85 % des tests effectués. L'histologie semble indiquer que cette zone se trouve pourtant en périphérie de la tumeur, dans une zone dont l'activité de division cellulaire est élevée. Pour quelques coupes, il existe une incertitude sur la profondeur d'où elles proviennent. Si l'histologie correspond à une coupe profonde de l'échantillon (plus de 1 mm), il est possible que le tissu tumoral présenté sur l'histologie ne soit pas détecté par notre sonde et que le signal soit représentatif du tissu sain en surface.

Lorsque l'histologie ne permet pas de trancher sur la nature du tissu en tant que sain ou tumoral, la zone en question est écartée des statistiques présentées par la suite. Les zones infiltrées étant particulièrement délicates à recalcr entre la coupe histologique et la photo prise de la tranche, ces zones ne seront pas considérées dans

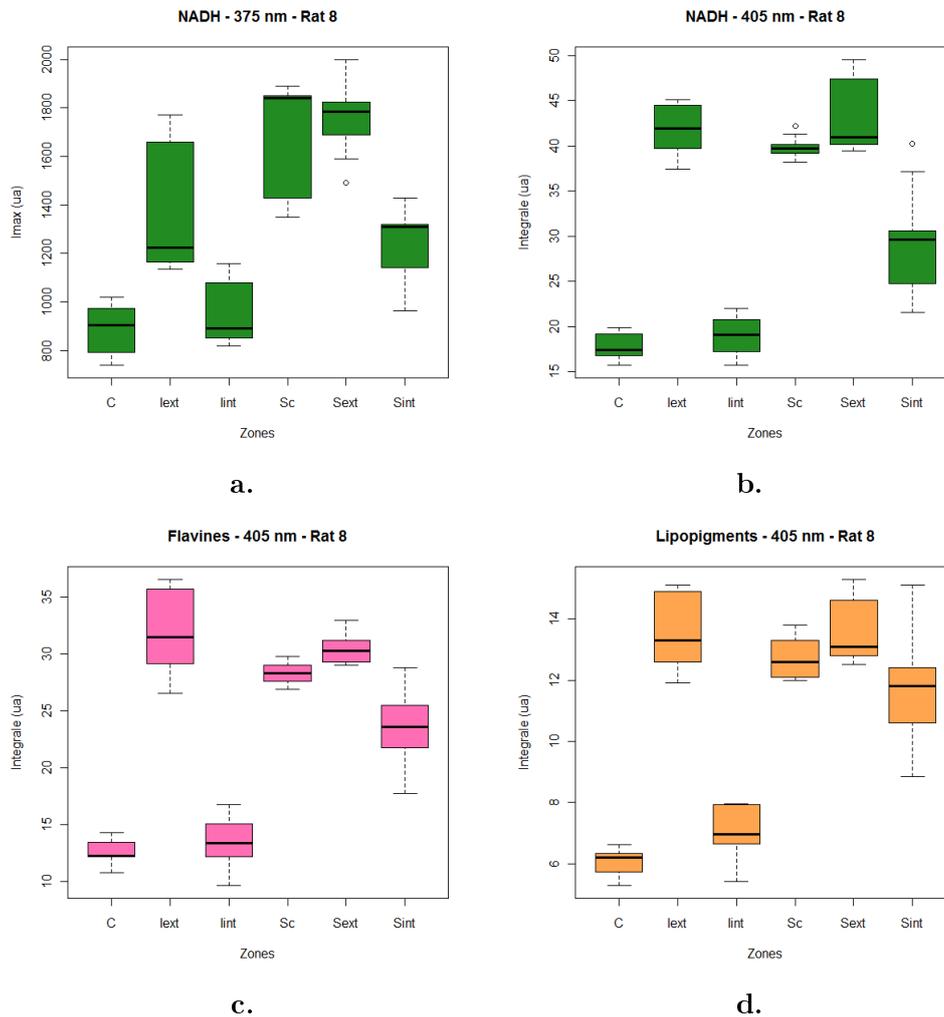


FIGURE 4.15 – Résultats sur le rat 8 pour les intensités maximales des NADH à 375 (a.) et leur intégrale à 405 nm (b.), ainsi que les intégrales des flavines (c.) et lipopigments d..

la suite. Nous nous attacherons à comparer la zone tumorale centrale, dont l'activité de division cellulaire ainsi que la vascularisation est forte aux zones acquises dans l'hémisphère sain, dans la mesure où celles-ci ne sont pas qualifiées d'infiltrées par l'analyse histologique.

Information métabolique Les flavines et les NADH sont deux coenzymes d'oxydoréduction impliquées dans le cycle de Krebs, soit le cycle de production d'ATP, source d'énergie des cellules. Ces deux fluorophores répondent de manière antagoniste à une variation métabolique. Cette caractéristique les rends potentiellement intéressantes pour notre étude. Il est admis que le cycle de Krebs est affecté dans les

cellules tumorales. Une modification du rapport de concentration entre flavines et NADH est représentative d'un problème métabolique et donc un possible indicateur de tumeur [Malthiéry and Savagner, 2006]. Il est à noter que des études [Croce et al., 2003; Wu and Qu, 2006; Liu et al., 2011] ont montré que l'excitation à 405 nm est particulièrement sensible pour l'étude du métabolisme cellulaire.

La figure 4.16 présente le rapport d'intensité entre les NADH et les flavines pour une ligne de mesure sur le rat 5. Une augmentation de ce rapport est observée dans la zone correspondant à la tumeur. Cette observation est valable pour les trois rats étudiés. L'augmentation du rapport des intégrales NADH/FAD a également été retrouvée pour les mesures effectuées sur des échantillons humains ex vivo [Chung et al., 1997], mais ils ne jugent pas cette différence comme suffisamment représentative. Pourtant, le comportement inverse, soit une diminution de ce quotient, est rapportée par la même équipe, pour des mesures in vivo chez le rat (modèle de tumeur CL9) [Chung et al., 1997]. Le groupe de Chung n'apporte pas de précisions quant à la différence observée et conclut que ce rapport ne pourrait pas aider à différencier les tissus sains et tumoraux en raison de leur trop grande variabilité.

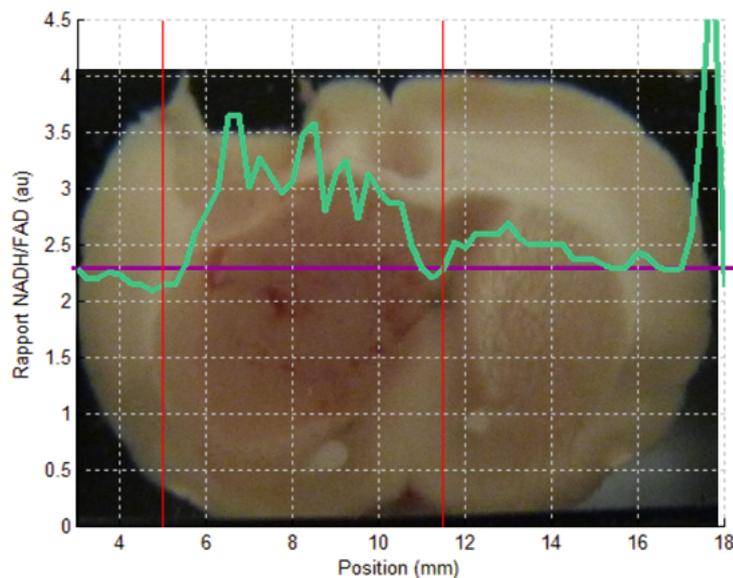


FIGURE 4.16 – Variation du rapport des NADH sur les flavines, pour une ligne de mesures du rat 5, à une λ_{exc} de 405 nm

Décalage en longueur d'onde Plusieurs articles mentionnent l'observation d'un décalage du pic d'émission de fluorescence dans la tumeur [Bottiroli et al., 1998; Croce et al., 2003]. Les longueurs d'onde du maximum des pics de NADH, pour 375 nm et 405 nm , et de flavines ne présentent pas de différence significative sur nos données. Un léger décalage vers le rouge, de 2 nm , est observé dans le cas des lipopigments.

En résumé, nous pouvons constater que les fluorophores d'intérêt repérés pour différencier une tumeur RG2 du tissu sain sont les NADH, flavines et lipopigments. Tous présentent une diminution significative ($p < 0,05$) de leur intensité dans la partie tumorale. Une hypothèse expliquant cette diminution générale correspond à la présence de néo-vaisseaux. En effet, le sang est un fort absorbant dans les longueurs d'onde étudiées et les tumeurs présentent une forte vascularisation. Cela n'exclue pas des variations de concentration des fluorophores suivant les zones considérées. De plus, le rapport NADH/FAD semble indiquer un changement métabolique dans la région tumorale. Ces constatations, faites sur les variations d'intégrale restent valables pour les variations d'intensité maximale.

4.2.4 Caractéristiques autofluorescentes des C6

Lors des premières manipulations sur les rats implantés avec des tumeurs C6, une forte augmentation de l'intensité de flavines a été observée dans la partie nécrosée, et ce sur les trois rats présentant une tumeur [Siebert et al., 2010]. Les figures 4.17 a. et b. montrent cette augmentation du signal pour deux rats, à travers l'augmentation de l'intégrale sous la courbe des flavines. Une différence significative ($p < 0,05$) est à noter entre la zone 1 et les zones saines (4 à 6) pour les rats 2 et 3 présentés ci-dessous. Pour rappel, l'extension de la tumeur du rat 4 ne permet pas de définir de zone saine (voir la photo de la figure 4.18), le traitement statistique ne peut donc être présenté pour ce cas.

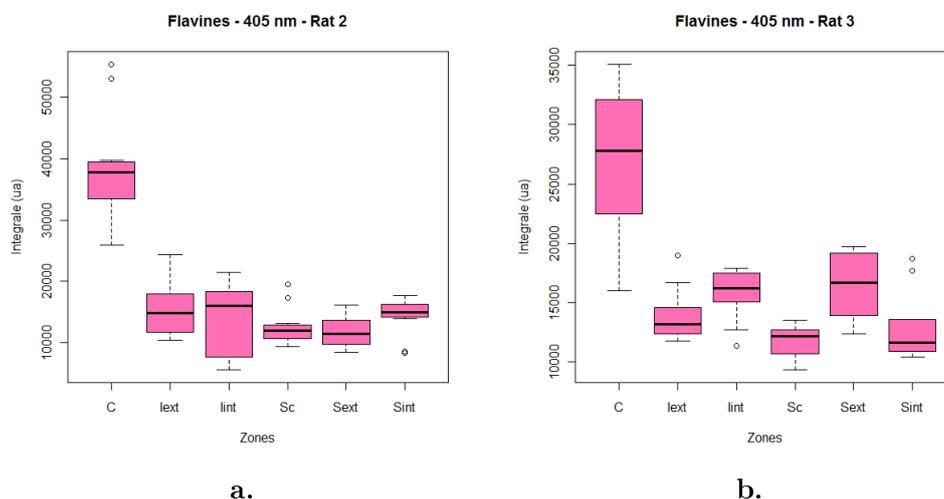


FIGURE 4.17 – Intégrale sous la courbe de flavine dans les ROIs définies pour les rats 2 et 3 implantés C6.

La figure 4.18 représente la variation de l'intégrale des flavines le long d'une ligne de mesures. Nous observons bien une augmentation de la fluorescence dans la zone nécrosée. Nous pouvons également noter une diminution du signal sur les bords de la

tumeur. Ces bords sont qualifiés de zone « active », car les cellules tumorales ont une activité de multiplication cellulaire élevée. La baisse observée est probablement une signature spécifique à cette partie en division cellulaire de la tumeur et peut-être, en moindre mesure, du tissu infiltrée. Ce constat s'approche des résultats obtenus sur les RG2, où une baisse de l'intégrale des fluorophores est également observée dans la partie centrale de la tumeur, zone fortement « active » pour les tumeurs RG2.

Cette augmentation n'est pas retrouvée sur les rats 9 et 10. Notre hypothèse à ce sujet concerne la nature histologique des tissus. En effet, les tumeurs des rats 9 et 10 sont plus petites et semblent d'aspect différent, ce qui a été confirmé par l'histologie qui ne montre pas de nécrose au centre. Ceci renforce la proposition d'explication quant à l'augmentation d'intensité de flavines qui serait due essentiellement à la présence de nécrose.

Le tableau 4.8 résume les résultats des tests statistiques effectués pour les fluorophores considérés (FAD, lipopigments et porphyrines 620 et 680 *nm*) en comparant différentes zones. Le nombre de tests correspond aux comparaisons effectuées pour chaque fluorophore. Par exemple, la zone 1 est comparée aux deux zones infiltrées et ce pour les 4 fluorophores, ce qui donne un total de $2 \cdot 4 = 8$ tests. Les cases dans lesquelles se trouve un point d'interrogation correspondent à des cas où la moitié des tests ont indiqués une différence significative et l'autre moitié l'inverse, dans ce cas, aucune conclusion n'est possible.

Zones comparées	N tests	Rat 2	Rat 3
Tumorale/infiltrée (1/2,3)	8	Significativement \neq à 75 %	Significativement \neq à 100 %
Tumorale/saines (1/4,5,6)	12	Significativement \neq à 90 %	Significativement \neq à 100 %
Infiltrées (2/3)	4	= à 100 %	?
Saines (4,5,6)	12	Significativement \neq à 85 %	Significativement \neq à 70 %
I_{ext} /saines (2/4,5,6)	12	?	?
I_{int} /saines (3/4,5,6)	12	= à 70 %	Significativement \neq à 70 %

TABLE 4.8 – Résultats statistiques de tests comparatifs des intégrales suivant zones définies et différents fluorophores; la différence significative est établie pour une valeur de p inférieure à 0,05.

Considérant la comparaison zone tumorale/zones infiltrées ou saines, nous pouvons préciser que les non significativités proviennent exclusivement des intégrales de porphyrines. Si nous considérons uniquement les flavines et lipopigments, ceux-ci permettent de différencier la zone tumorale centrale des zones infiltrées et saines, et

ce dans tous les cas. Ces résultats s'approchent de ceux trouvés sur les rats RG2. En effet, les flavines et lipopigments semblent être des fluorophores importants dans la différenciation spectrale des zones en fonction de leur histologie. Pour rappel, les mesures utilisées pour établir le tableau 4.8 ont été effectuées avec un filtre passe-haut à 450 nm ne permettant pas de conclure quant au comportement des NADH dans ce type de tumeurs.

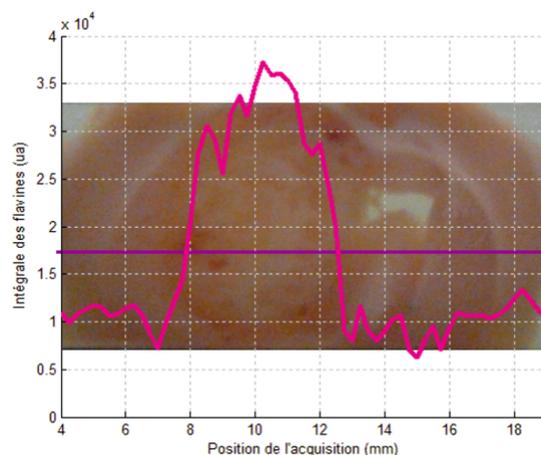


FIGURE 4.18 – Intégrale des flavines détectée pour une ligne de mesure sur le rat 4.

4.2.5 Définition d'un indicateur tumoral

Les résultats mis en évidence dans les parties ci-dessus dirigent vers une définition d'un indicateur en utilisant uniquement les mesures effectuées sur les rats RG2, car si les tumeurs C6 présentent une information permettant d'identifier la partie nécrosée, cela a peu d'intérêt dans le contexte clinique puisque la partie centrale du glioblastome humain, soit la partie nécrosée, est facilement reconnaissable à l'œil. Les histologies des tumeurs issues de cellules de lignées C6 ou RG2 sont différentes et ont été discutées dans la partie 4.2.1. Nous posons l'hypothèse que le comportement de la partie centrale de la tumeur RG2 s'approche de celui de la partie en division cellulaire, ou « active », du glioblastome.

Dans cette partie, nous allons donc concentrer notre attention à définir la signature particulière de la zone tumorale centrale des RG2 par rapport au tissu sain. De cette manière, nous cherchons à définir une signature spécifique au tissu tumoral qui se trouve en phase de mitose. Les trois zones saines sont traitées de manière commune et comparées à la partie centrale de la tumeur. Le traitement est effectué pour les intégrales des courbes ajustées pour chaque fluorophore excité à 405 nm . Les résultats sont présentés sur les figures 4.19. Dans un premier temps, les zones saines sont réparties en zones de matière blanche et de matière grise, en supprimant celles qui présentent un mélange des deux types de tissu. Les statistiques ainsi obtenues ne montrent pas de différence significative ($p > 0,05$, test de Mann-Whitney)

pour les intégrales des fluorophores suivant que la zone soit dans la matière blanche ou grise, excepté pour les lipopigments où $p = 0,008$. Les données de tissu sains, matière blanche ou grise, sont donc traitées ensemble.

Les rats mis en commun dans l'analyse qui suit sont les trois rats injectés RG2 : 5, 7 et 8. Le rat 6 qui a développé une tumeur dans le cortex a été écarté.

Intégrales des fluorophores Dans un premier temps, nous allons observer la différence de l'intégrale sous la courbe entre les zones saines et tumorales, et ce pour chaque fluorophore. Ces résultats sont illustrés sur les figures 4.19 a. à e., le nombre d'acquisitions est de 27 dans la zone tumorale et 62 pour la zone saine. Les fluorophores relevés précédemment comme potentiellement intéressants pour la différenciation tissu tumoral infiltré/tissu sain sont confirmés ($p < 0,001$, test de Mann-Whitney), soient les NADH, flavines et lipopigments. Dans ce cas, les porphyrines présentent également une différence significative entre tissu sain et tissu tumoral au centre de la tumeur ($p < 0,001$).

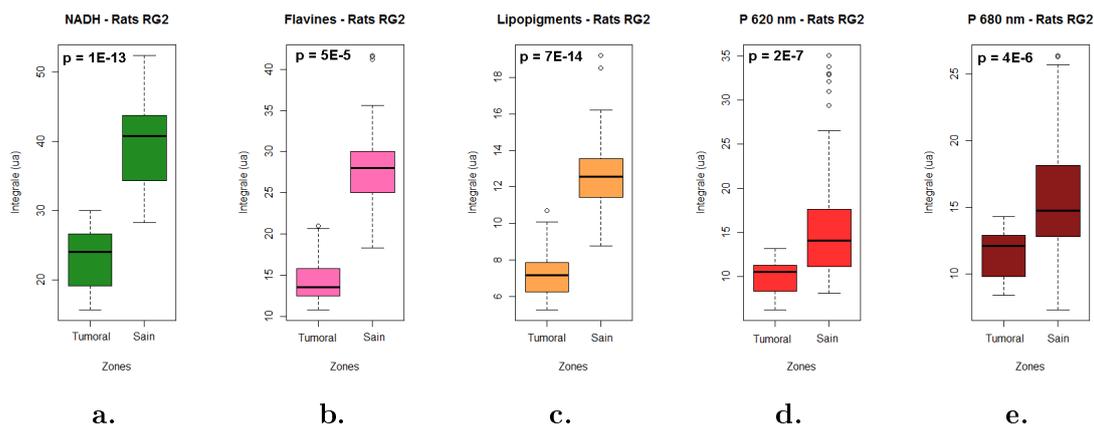


FIGURE 4.19 – Différence statistique entre les zones tumorales et saines pour intégrales des différents fluorophores ajustés à 405 nm.

Rapports des intégrales des différents fluorophores entre zones saines et tumorales

Une autre méthode d'analyse des données consiste à mettre en concurrence, pour chaque rat, la ou les ROIs prises dans la partie centrale de la tumeur et son « miroir » dans le tissu qualifié de sain. Nous pouvons trouver la répartition des rapports pour chaque fluorophore (voir figure 4.20 a., $n = 27$ pour chaque fluorophore). Dans un cas où le tissu tumoral ne présente pas de différence significative, les rapports calculés devraient être proches de 1. Ceci a été observé pour le rat témoin (rat 11), où les mêmes rapports ont été calculés entre zones en miroir (1/4, 2/5 et 3/6) ($n = 15$ pour chaque fluorophore). Le tableau 4.9 présente la moyenne et l'écart-type des 15 rapports entre zones miroir pour chaque

fluorophore. Pour les rats comportant une greffe tumoral, les rapports des intégrales tumoral/sain sont toujours strictement inférieur à 1, entre 0,5 et 0,6 en moyenne pour les NADH, flavines et lipopigments. Pour les deux pics de porphyrines, ce rapport est un peu plus élevé, variant autour de 0,7. Ces rapports ont été comparés par un test de Mann-Whitney aux rapports obtenus pour un rat sain (rat 11). Pour tous les fluorophores, le rapport sain/tumoral est significativement différent de celui obtenu pour un rat sain ($p < 0,001$ pour NADH, FAD et lipopigments et $p < 0,005$ pour les deux pics de porphyrines). Il semble donc possible de détecter la tumeur en utilisant des rapports entre tissus sain et tumoraux sur un même rat.

Fluorophore	Moyenne des rapports	Ecart-type
NADH	0,95	0,08
FAD	0,97	0,07
Lipopigments	0,92	0,09
Porphyrines 620 nm	0,88	0,16
Porphyrines 680 nm	0,86	0,15

TABLE 4.9 – Tableau des moyennes et écart-types calculés entre zones en miroir pour chaque fluorophore ($n = 15$) pour le rat témoin 11.

L'intensité mesurée dépend de manière non négligeable de l'échantillon considéré. Pour différencier tissu sain et tissu tumoral, la possible nécessité de comparer le signal avec une acquisition prise dans un endroit sain a déjà été évoquée [Pascu et al., 2009]. À l'évidence, dans le cas clinique, l'hémisphère sain n'est pas accessible, cependant il serait éventuellement possible de prendre une référence sur un tissu sain, comme le cortex par exemple. En effet, le cortex se situe en périphérie du cerveau et devrait en général être accessible lors de l'opération. Dans ce cas, une acquisition sur cette zone pourrait servir de référence saine, même si ce n'est pas le même type de tissu. La figure 4.20 b. montre le rapport entre la zone tumorale centrale et une zone corticale, soit définie en périphérie du cerveau, pour chaque fluorophore, le total de rapports d'intégrale est de 27. Ces valeurs ont été comparées par un test de Mann-Whitney aux rapports obtenus dans le cas d'un sujet sain (rat 11, témoin, $n = 10$). Les rapports pour les NADH, FAD et lipopigments sont statistiquement différents du cas sain ($p < 0,001$) et pourraient potentiellement permettre une discrimination tissu sain/tissu tumoral. Cette constatation n'est pas validée pour les deux pics de porphyrines ($p > 0,05$).

Le rapport entre zones tumorale centrale et zone saine a également été effectué pour le rat 6, dont la tumeur est située en périphérie du cerveau. Les résultats sont représentés graphiquement sur la figure 4.21 a. ($n = 8$ pour chaque fluorophore). Le rapport entre zones tumorales et zone corticale a également été établi, voir figure 4.21 b., dans ce cas, la zone du cortex utilisée a été la zone saine extérieure. Des différences significatives sont trouvées pour les trois fluorophores suivant : NADH, FAD et lipopigments ($p < 0,001$), dans le cas des porphyrines, le niveau de signi-

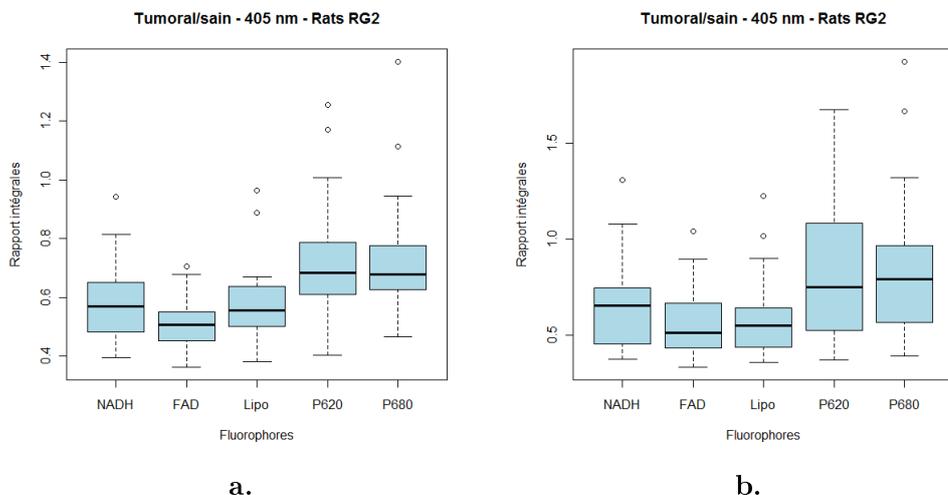


FIGURE 4.20 – Variation du rapport des intégrales des différents fluorophores, à une λ_{exc} de 405 nm pour une zone saine en « miroir » de la zone tumorale (a.) et pour une zone saine corticale (b.). Les rats analysés sont toujours les 5, 7 et 8.

ficativité est plus faible ($p < 0,05$). Ces résultats se rapprochent de ceux présentés pour les rats 5, 7 et 8 dans le sens où tous les fluorophores indiquent une variation significative. Cependant, si les moyennes des NADH sont comparables ($p = 0,5$), les rapports pour les autres fluorophores sont significativement différents entre les rats 5, 7 et 8 et le rat 6 ($p < 0,001$). En effet, ces rapports sont supérieurs à 1 pour le rat 6 et inférieurs à 1 pour les autres rats.

Les rapports entre tissu tumoral et cortex (figure 4.21 b.) sont significativement différents du rat témoin pour les fluorophores NADH ($p < 0,001$), FAD et lipopigments ($p < 0,05$). Les porphyrines ne présentent pas cette différence ($p > 0,05$). Encore une fois, ces résultats sont en accord avec ceux des rats 5, 7 et 8, à l'exception du fait que les rapports pour les fluorophores du rat 6 sont significativement différents entre ces groupes de rats ($p < 0,001$), sauf pour le NADH ($p = 0,9$). Ces résultats confirment la difficulté mentionnée précédemment. Le signal tumoral est fortement lié à la localisation de la tumeur. Il pourrait être envisagé de définir un indicateur en fonction de la localisation de la tumeur. Ces résultats restent tout de même à confirmer avec un nombre plus élevé de tumeurs développées dans la zone corticale du cerveau.

Information métabolique Le rapport entre les NADH et les flavines nous a semblé un indicateur prometteur dans les premières observations des rats RG2, car celui-ci est représentatif d'une modification métabolique du tissu. La figure 4.22 montre ce rapport pour des tissus sains ($n = 27$) et tumoraux ($n = 62$). Celui-ci est proche pour les deux types de tissu, mais reste supérieur dans le cas de la tumeur. Il existe une différence significative entre le rapport obtenu pour le tissu sain et celui

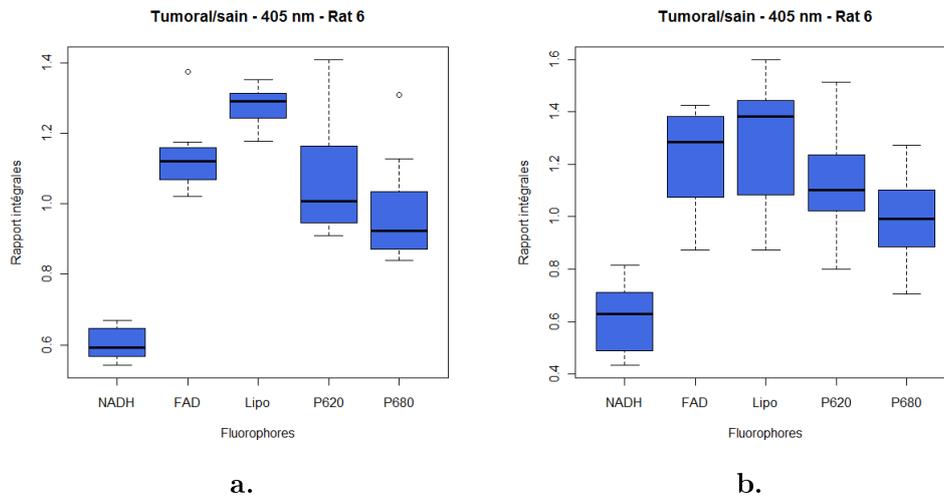


FIGURE 4.21 – Variation du rapport des intégrales des différents fluorophores, à une λ_{exc} de 405 nm pour une zone saine en « miroir » de la zone tumorale (a.) et pour une zone saine corticale (b.). Cette analyse concerne uniquement le rat 6.

obtenu pour le tissu tumoral ($p < 0,001$), ce qui valide l'intérêt de cet indicateur. En effet, malgré la baisse significative d'intensité dans la partie tumorale, une inversion du rapport entre les deux fluorophores reste observable.

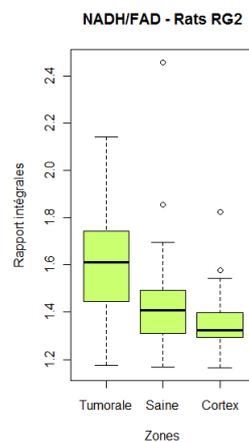


FIGURE 4.22 – Variation du rapport des intégrales NADH/flavines pour des zones tumorale, saine et pour le cortex sain, à une λ_{exc} de 405 nm

Dans l'hypothèse où nous considérons une zone corticale, les rapports entre zone tumorale et cortex sain sont également significativement différents ($p < 0,001$). Les deux zones saines (en miroir de la tumeur et dans le cortex) ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$). Cette étude confirme l'intérêt de s'intéresser à une

zone saine en périphérie de la tumeur afin de valider l'aspect tumoral du tissu.

4.3 Vers un protocole plus complet

4.3.1 Mesure du temps de vie de fluorescence

Nous avons déjà vu que la fluorescence n'est pas un phénomène instantané, la molécule fluorescente ayant absorbée un photon reste dans un état excité pendant un court instant avant de retourner dans son état fondamental en émettant de la lumière de fluorescence. La durée caractéristique de la fluorescence est appelée : temps de vie de fluorescence, noté τ . Pour l'estimer, nous considérons une population de n_0 fluorophores se trouvant dans un état énergétique excité. L'émission d'un photon de fluorescence étant un phénomène aléatoire, et chaque molécule de la population a la même probabilité de retourner dans son état fondamental. Ce phénomène se décrit par une décroissance exponentielle du nombre de fluorophores excités, $n(t)$, en fonction du temps :

$$n(t) = n_0 \cdot e^{\left(\frac{-t}{\tau}\right)} \quad (4.3)$$

Le temps de vie de fluorescence varie en fonction de divers paramètres comme par exemple le pH, la température, la viscosité, les possibles interactions avec d'autres espèces moléculaires. Sa valeur est donc fortement influencée par le microenvironnement du fluorophore, et peut ainsi apporter des informations complémentaires à celles qui sont obtenues pour les mesures d'intensité de fluorescence. De plus, contrairement à l'étude spectrale de fluorescence, le temps de vie est indépendant de la concentration du fluorophore, des propriétés en absorption et diffusion du tissu et des conditions expérimentales comme la puissance d'excitation. Pour effectuer des mesures de temps de vie, la source excitatrice doit être pulsée.

4.3.1.1 Principe de mesure du temps de vie de fluorescence

Il existe deux méthodes de mesure du temps de vie. La première, dans le domaine fréquentiel, utilise le principe de modulation de phase, la fluorescence émise possède un décalage de phase et d'amplitude par rapport à la fréquence de la lumière d'excitation. Cette technique est appelée fluorimétrie de phase. La seconde méthode, qui a été utilisée dans notre étude préliminaire, se place dans le domaine temporel et compte le temps entre l'émission de la lumière et la collection des photons de fluorescence des photons, utilisant le principe de mesure appelé TCSPC³. Une source de lumière pulsée est nécessaire, dont la largeur temporelle du pic doit être inférieure au temps de vie qui est à mesurer. Le système est réglé de manière à détecter au plus un seul photon par pulse d'excitation. Le temps entre le pulse d'excitation et la détection de ce photon est stocké dans un histogramme. En accumulant les temps détectés sur une durée de mesure de l'ordre de quelques secondes, la distribution des photons suivant la décroissance exponentielle est retrouvée, voir la figure 4.23.

3. Time Correlated Single Photon Counting

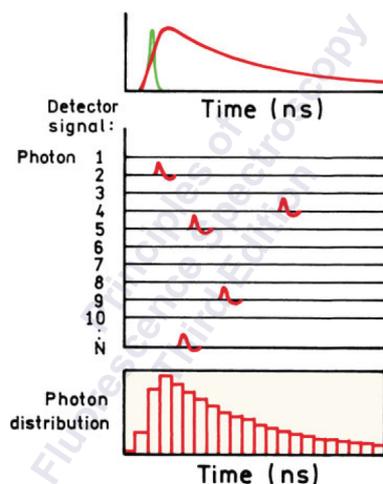


FIGURE 4.23 – Principe de mesure du temps de vie de fluorescence.

Dans notre cas, nous avons utilisé les deux lasers décrits dans le chapitre 2, émettant à 375 et 405 nm , avec une largeur temporelle à mi hauteur de 45 et 60 ps , respectivement. La détection du photon de fluorescence émis se fait grâce à un photomultiplicateur (PMA-182, Hamamatsu) dont la résolution temporelle est de 220 ps . Une carte d'acquisition (TimeHarp 200, PicoQuant) permet de compter la durée entre excitation et collection, qui possède également une résolution temporelle.

4.3.1.2 Traitement des données

Pour traiter une acquisition en temps de vie, il faut d'abord définir si la décroissance est mono- ou multi-exponentielle. Cette décision se prend compte tenu des connaissances a priori du nombre de fluorophores présents dans l'échantillon considéré et de leurs états variables possibles. Dans notre cas, nous avons choisi de limiter les acquisitions en sélectionnant plusieurs filtres passe-bande situés autour de chaque maximum des pics d'émission des fluorophores endogènes d'intérêt. Par exemple, pour les porphyrines, un filtre passe-bande de $620 \pm 10 \text{ nm}$ a été utilisé. De plus, les tissus considérés contiennent majoritairement des cellules saines ou des cellules tumorales. De cette manière, nous pouvons espérer nous approcher d'une décroissance mono-exponentielle. Cela est plus difficile pour des fluorophores comme les flavines ou les lipopigments, dont les spectres sont fortement liés. Pour décorréler les NADH des flavines, la solution la plus simple est d'exciter à 375 nm .

Selon les cas, les données acquises sont donc ajustées par une exponentielle simple et une exponentielle double, et ce grâce à un logiciel dédié à la carte d'acquisition (FluoFit, PicoQuant). Il permet de vérifier la pertinence des ajustements grâce à deux données statistiques : le χ^2 , dont la valeur doit se trouver autour de l'unité pour garantir d'un bon ajustement, et la fluctuation résiduelle, dont la valeur doit varier entre 4 et -4 .

4.3.1.3 Résultats ex vivo préliminaires

Avant les mesures sur tranches de rat, le dispositif a été validé grâce à des mesures sur des fluorophores en solution ou dans des fantômes, comme la rhodamine B et la coumarine 153. Les temps de vie de ces fluorophores sont connus, pour différents pH et différents solvants. De nombreuses mesures test ont été effectuées et les valeurs de temps de vie déduite ont été comparées à celles trouvées dans la littérature. Le tableau 4.10 présente quelques résultats mesurés, ainsi que les valeurs de la littérature correspondantes. Nous pouvons constater que nos valeurs sont proches de celles attendues. Cette étude préliminaire nous a permis de passer sur les tranches de cerveau de rat.

Fluorophore	Solvant	τ mesuré (<i>ns</i>)	τ littérature (<i>ns</i>)	Référence
Rhodamine B	eau	$1,7 \pm 0,1$	$1,74 \pm 0,02$	[Boens et al., 2007]
	méthanol	$2,8 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	
Coumarine 153	méthanol	$4,0 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,3$	
	acétone	$5,63 \pm 0,02$	5,57	Fluofit

TABLE 4.10 – Tableaux des mesures de temps de vie de solutions et comparaison par rapport à la littérature ($n = 15$ pour chaque solution).

Des mesures de temps de vie de fluorescence ont été effectuées sur des tranches de cerveaux de rat. Les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus à partir de tranches fixées dans une solution de paraformaldéhyde. Le dispositif de maintien des tranches est le même que celui qui a été décrit précédemment. De même, la sonde utilisée, S11-600, est la même que celle employée pour les mesures spectroscopiques.

Excitation à 405 nm Le tableau 4.11 récapitule les filtres utilisés pour les mesures de temps de vie des différents fluorophores étudiés, soient les flavines, les lipopigments et les porphyrines. L'analyse des spectres a été faite avec des exponentielles simples et doubles. Dans les deux cas, l'ajustement est correct, soit un χ^2 proche de 1 (χ^2 maximum de 1,3) et une fluctuation résiduelle faible (comprise entre -4 et $+4$). Nous ne présenterons ici que les résultats issus des ajustements mono-exponentiels.

Fluorophore	Filtre passe-bande utilisé
Flavines	$520 \pm 10 \text{ nm}$
Lipopigments	$580 \pm 10 \text{ nm}$
Porphyrines	$620 \pm 10 \text{ nm}$

TABLE 4.11 – Tableaux des filtres passe-bande utilisés pour mesurer le temps de vie des fluorophores, sous une excitation de 405 nm.

Le tableau 4.12 contient les valeurs moyennes de temps de vie des fluorophores mesurés, associées à l'écart-type entre les mesures. Cette erreur n'est pas représen-

tative de la résolution temporelle du système. Les moyennes sont faites sur trois rats injectés RG2, les valeurs saines comprennent également les durées de vie mesurées sur le rat témoin. Aucune différence significative n'est observée entre les zones saines et tumorales pour les flavines et les lipopigments ($p > 0,05$, test de Mann-Whitney). Au contraire, les porphyrines présentent une diminution reproductible de leur temps de vie dans les zones cancéreuses ($p = 0,013$). Les figures 4.24 **a.** et **b.** illustrent les acquisitions de temps de vie de la fluorescence pour deux rats différents, l'acquisition bleue correspond à la zone tumorale centrale et la rouge à la zone saine.

Fluorophore	τ zone saine (ns)	τ zone tumorale (ns)
Flavines	$4,1 \pm 0,4$ ($n = 8$)	$4,1 \pm 0,6$ ($n = 6$)
Lipopigments	$3,8 \pm 0,3$ ($n = 9$)	$3,9 \pm 0,4$ ($n = 6$)
Porphyrines	$6,5 \pm 1,3$ ($n = 6$)	$4,1 \pm 0,4$ ($n = 6$)

TABLE 4.12 – Tableau comparatif des temps de vie moyens entre zone saine et tumorale pour différents fluorophores. Les moyennes ont été effectuées pour les rats 6, 7 et 8, injectés RG2. Les zones saines contiennent également des valeurs mesurées sur le rat témoin 11.

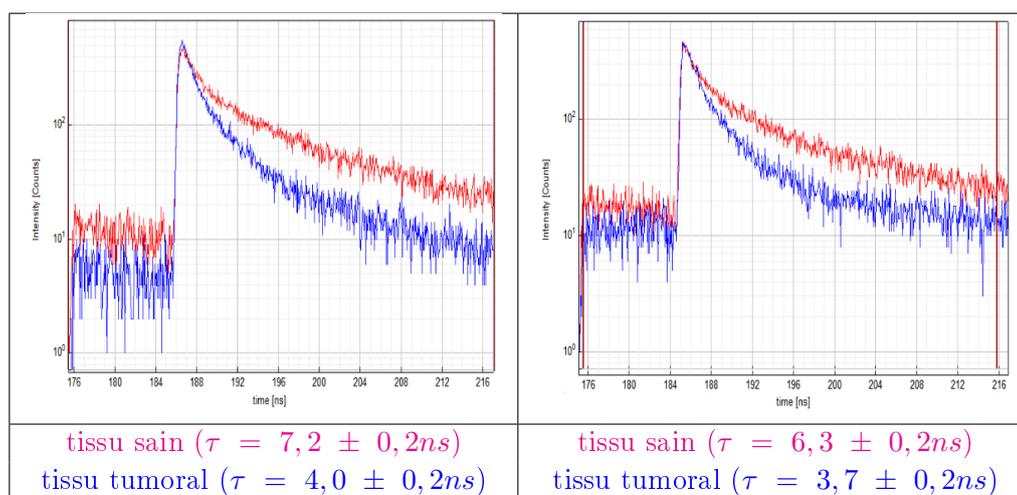


FIGURE 4.24 – Temps de vie des porphyrines mesuré à 620 nm pour des tissus sains (rouge) et tumoraux (bleu), sur le rat 7 (**a.**) et le rat 9 (**b.**).

La différence de temps de vie des porphyrines entre zone saine et tumorale est également observée dans le cas des tumeurs C6, le faible nombre d'acquisition ne permettant pas d'effectuer un test statistique. Leur baisse de temps de vie indique clairement l'intérêt potentiel des porphyrines dans la détection du tissu tumoral cérébral. Par la suite, de plus nombreuses mesures doivent être acquises, afin de confirmer cette tendance. De plus, une validation de cet indicateur sur tissu frais reste

à effectuer, suivie d'une étude *in vivo* chez le rat, avant de passer aux échantillons humains. Concernant les autres fluorophores, le traitement pourrait être amélioré en diminuant la bande passante des filtres. Néanmoins, les résultats présentés sont encourageants et démontrent l'intérêt de coupler la mesure de temps de vie au dispositif spectral. La fluorescence collectée pourrait être orientée simultanément sur deux chaînes de mesures, l'une spectrale et l'autre temporelle.

4.3.2 Instrumentation pour des mesures *in vivo* chez le rat

L'étape suivante de notre démarche vers la validation d'un indicateur tumoral et de ce fait vers le bloc opératoire est une expérimentation de mesure d'autofluorescence *in vivo* chez le rat, permettant de comparer les données *in vivo* et *ex vivo*. Pour ce faire, il faut introduire la sonde directement dans le cerveau du rat. Cette mesure invasive ne peut être effectuée avec la sonde bi-fibres utilisée actuellement pour les mesures *ex vivo* car celle-ci est beaucoup trop volumineuse comparée à la taille du cerveau du rat. Une sonde plus compacte est alors indispensable. La solution envisagée a été de développer une sonde à une fibre, ou monofibre, permettant à elle seule de transmettre la lumière d'excitation aux tissus et de collecter la fluorescence émise. Le dispositif de mesure doit être modifié afin d'autoriser cette double capacité. Plusieurs monofibres ont été construites et testées sur fantômes.

4.3.2.1 Instrumentation : dispositif et sonde

La sonde monofibre Une sonde monofibre dédiée à des mesures *in vivo* dans le cerveau de rat doit respecter les contraintes liées au contexte de l'expérience. D'un côté, il est indispensable que la sonde introduite doit minimiser les lésions dans le cerveau du rat, limiter les saignements, ce qui est également dans l'intérêt des mesures, et ne pas mettre en danger la vie de l'animal tout au long de la mesure. D'un autre côté, la sonde doit être capable de collecter un signal fluorescent d'amplitude assez prononcée pour permettre de différencier les fluorophores, et ce en un temps raisonnable.

Le paramètre conditionnant majoritairement les deux aspects mentionnés ci-dessus est le diamètre de la sonde. Plus celui-ci est petit, plus les lésions chez l'animal sont minimes, et, au contraire, plus le temps d'acquisition à l'obtention d'une mesure correcte est long. Il faut donc trouver le bon compromis entre les dommages acceptables dans le cerveau et la durée totale de l'expérience.

Plusieurs études de mesures de spectroscopie et temps de vie de fluorescence ont été effectuées *in vivo* chez le rat, les diamètres des sondes monofibres utilisées sont de 200 μm (cœur de la fibre) [Mottin et al., 2003] ou 300 μm [Kudo et al., 1992]. Nous avons choisi deux diamètres des cœurs des sonde, à savoir 200 et 365 μm (SEDI Fibres Optiques, voir spécifications décrites dans le chapitre 2). La sonde fabriquée au laboratoire est illustrée sur le schéma de la figure 4.25. Composée d'une seule fibre protégée par une gaine, une de ses extrémités est dénudée, ce afin de permettre son insertion dans une aiguille pour seringue, destinée à faciliter la pénétration de

la sonde dans le cerveau de rat.

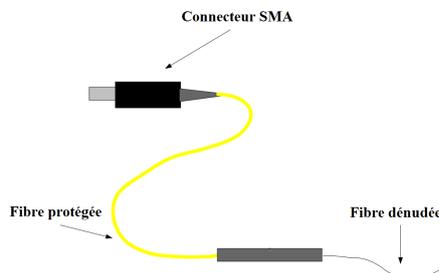


FIGURE 4.25 – Schéma de la sonde monofibre.

Le dispositif de mesures Le dispositif de mesures doit apporter la lumière laser dans la fibre et récolter le signal sortant de celle-ci. Le signal collecté comporte la composante fluorescente et la lumière laser qui est soustraite de l'intensité transmise au spectromètre grâce à un filtre passe-haut. Les filtres utilisés sont les mêmes que ceux présentés dans le chapitre 2. L'injection et la collection se font par l'intermédiaire d'une fibre à bifurcation. Comme présenté sur la Figure 4.26, la fibre à bifurcation est composée de deux fibres optiques de diamètre $400\ \mu\text{m}$ chacune. À une extrémité, ces deux fibres sont solidarisées dans un même connecteur SMA et à l'autre bout, chacune d'elles possède son propre connecteur SMA. Cette configuration semble adaptée à l'utilisation d'une sonde monofibre, voir Figure 4.27.

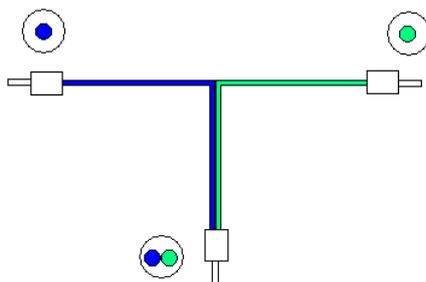


FIGURE 4.26 – Schéma de la fibre à bifurcation.

La géométrie particulière de cette fibre engendre néanmoins des pertes importantes de lumière transmise, dans les deux sens, notamment au niveau de la connexion de la sonde monofibre et de la fibre à bifurcation qui sont alignés grâce à un connecteur SMA/SMA. Le tableau 4.13 présente la mesure de puissance en sortie de laser (après le système d'injection), comparée à celle récoltée en sortie du dispositif bi-fibres, puis en sortie de la sonde monofibre, pour les deux diamètres étudiés. La sonde MF365 transmet une intensité plus élevée au tissu, par rapport à la sonde MF200.

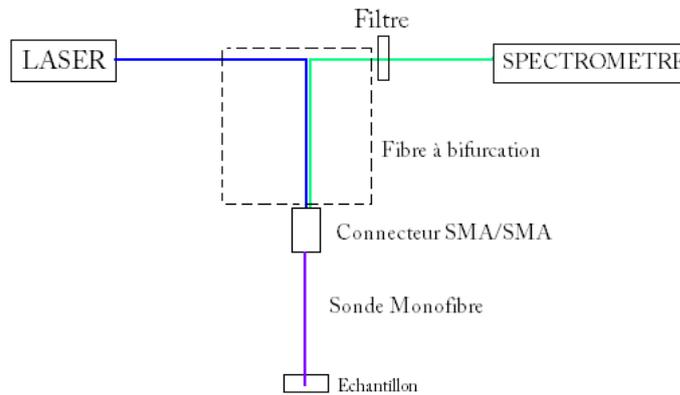


FIGURE 4.27 – Schéma du montage utilisant la fibre à bifurcation.

Les pertes drastiques observées sont imputées au connecteur SMA/SMA, qui ne contient pas d'optique permettant de focaliser le signal de sortie de la fibre à bifurcation dans la monofibre, et inversement pour le signal collecté. Une amélioration de la transmission de lumière est nécessaire. Pour ce faire, un nouveau dispositif sera mis en place, dès l'arrivée de tous les composants nécessaires. Un miroir dichroïque, transmettant la lumière laser dans la monofibre à l'aide d'un collimateur optique et renvoyant la lumière collectée pour des longueurs d'onde supérieures à 420 nm vers le dispositif de détection, sera utilisé prochainement.

Sonde utilisée	P laser (μW)	P bifibre (μW)	P monofibre (μW)
MF200	480	400	30
MF365			110

TABLE 4.13 – Puissances mesurées en sortie de différents composants du système de mesures.

L'insertion de la sonde dans l'échantillon est guidée par une aiguille biseautée (Sterican). La fibre est fixée sur une platine motorisée, ce qui autorise une descente pas à pas contrôlée dans le cerveau de rat.

4.3.2.2 Caractérisation de la sonde

Ayant conscience de la puissance transmise limitée dans le cas de ce dispositif, nous avons tout de même amorcé une caractérisation des sondes mono-fibres. Cette étude nous permet de mettre en œuvre le procédé de caractérisation, bien que les résultats obtenus, en particuliers ceux sur l'intensité collectée, ne reflètent pas des propriétés suffisantes pour les mesures envisagées.

Intensité collectée L'intensité de fluorescence collectée par une sonde est conditionnée par sa géométrie ainsi que les paramètres des fibres utilisées. Pour les sondes

monofibres, l'intensité collectée sera inférieure à celle des bi-fibres et diminuera avec le diamètre de la fibre. Nous avons vu qu'un critère pour les mesures in vivo concerne la durée de l'expérimentation. Il est préférable que celle-ci soit la moins longue possible, afin de faciliter le maintien en vie du rat et d'éviter des complications.

Lors des expériences ex vivo, nous avons choisi une durée d'acquisition d'une seconde, permettant d'obtenir une intensité du signal autofluorescent suffisamment élevée. Nous allons déterminer la durée d'acquisition nécessaire pour obtenir un signal équivalent aux bi-fibres avec le dispositif monofibre. Pour ce faire, un test a été effectué sur un même fantôme standard de rhodamine B pour les sondes monofibres MF200 et MF365 et la sonde bi-fibre S11-600. Le temps d'acquisition est varié et le maximum d'intensité du spectre de RhB est reporté dans chaque cas.

Les résultats sont illustrés sur la figure 4.28. Les intensités collectées sont faibles, ceci étant dû au dispositif d'injection qui est à améliorer. Ce genre de graphique permet néanmoins de donner une idée du temps d'acquisition à privilégier pour s'approcher du résultat obtenu par la sonde bi-fibres.

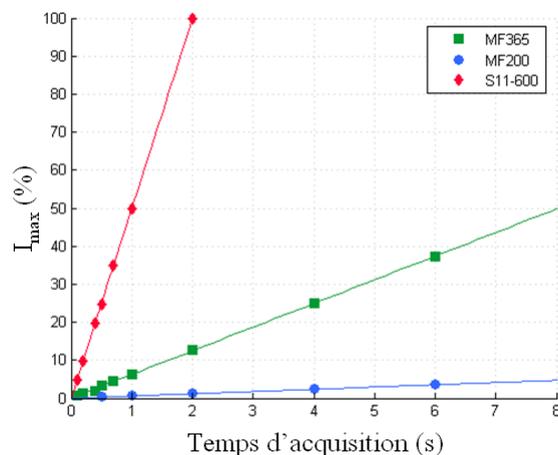


FIGURE 4.28 – Comparaison du maximum d'intensité collectée en fonction du temps d'acquisition pour deux sondes monofibres et une sonde bi-fibres.

D'après nos mesures, l'intensité mesurée par la sonde MF365 équivaut à environ sept fois celle qui est collectée par la sonde MF200. Pour des simulations, ce rapport est de 3. La différence avec les mesures peut s'expliquer par le fait que, dans les simulations, le nombre de paquets de photons incidents lancés est équivalent. Elles ne tiennent donc pas compte de la différence d'intensité apportée au tissu. D'après les mesures, la puissance en sortie de la sonde est trois fois plus élevée dans le cas de la sonde de $365 \mu\text{m}$ de diamètre. Les simulations peuvent donc être corrigées de ce facteur, ce qui donne les résultats présentés dans le tableau 4.14. Dans ce cas, les intensités détectées par les sondes MF200 et MF365 sont plus proches. Cette comparaison reste toujours conditionnée par les faibles puissances envoyées sur le tissu. L'étude sera donc à reproduire avec le nouveau système d'injection.

La quantité d'intensité de fluorescence collectée est moins cruciale lors de la

Sonde utilisée	Intensité mesurée	Intensité simulée
MF200	I_{mes}	I_{simu}
MF365	$7 \cdot I_{mes}$	$9 \cdot I_{simu}$

TABLE 4.14 – Intensité de fluorescence mesurée et simulée pour les deux configurations de monofibres.

mesure du temps de vie. La monofibre pourrait donc être utilisée dans le cadre de mesures temporelles, même avec des diamètres plus faibles que ceux nécessaires pour les mesures spectrales.

Profondeur de détection La valeur de la profondeur de détection de la monsonde est estimée à l'aide d'expérimentations sur fantômes, comparées aux simulations associées. Cette grandeur ne devrait pas être conditionnée par la mauvaise transmission de puissance observée dans notre cas.

Fantômes Un fantôme à deux couches a été utilisé. Les deux couches possèdent les mêmes paramètres optiques, cependant, la couche supérieure ne contient pas de fluorophore et la couche inférieure contient $10^{-5} M$ de Rhodamine B. Un film alimentaire est placé entre les deux couches. La sonde est descendue pas à pas dans le fantôme, jusqu'à pénétrer dans la couche inférieure fluorescente. Le maximum d'intensité de fluorescence collectée est présenté sur la figure 4.29, en fonction de la position de la sonde par rapport à l'interface entre les deux fantômes, soit le « zéro ». Les deux courbes présentent deux manipulations effectuées dans les mêmes conditions, les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type sur l'intensité collectée.

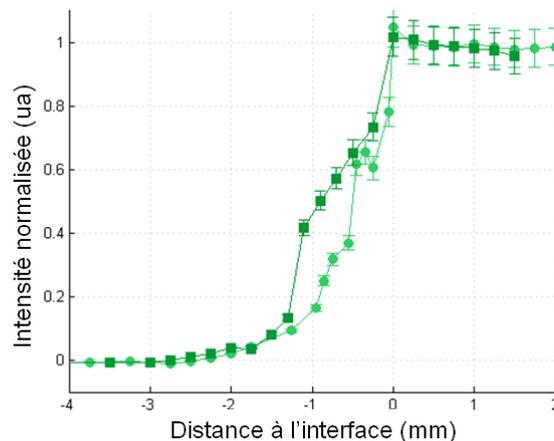


FIGURE 4.29 – Mesures de la profondeur maximale de détection sur un fantôme bicouche avec la sonde MF365.

Le seuil de détection de 10 % du signal est utilisé pour définir la profondeur

maximale de détection, P_{max} . Le tableau 4.15 présente les valeurs de P_{max} pour deux sondes, de $200 \mu m$ et $365 \mu m$ de diamètre. Les variations de P_{max} pour une sonde sont acceptables, de l'ordre de 25 %. La différence entre les mesures est due à des difficultés expérimentales comme la définition de l'interface entre les deux fantômes et le film alimentaire qui peut être difficile à traverser.

Sonde utilisée	P_{max} moyen (mm)	P_{max} erreur (%)
MF200	1.3	25
MF365	1.1	25

TABLE 4.15 – Profondeur maximale mesurée pour deux sonde monofibres de diamètres différents.

Simulations Nous avons imité les mesures faites dans la partie ci-dessus grâce au programme de simulations (voir le chapitre 3). Notre programme ne permet pas actuellement la simulation d'une sonde insérée dans un échantillon, mais il peut simuler des fantômes bicouches d'épaisseur variable. La sonde est placée en contact avec le tissu défini et les fibres d'émission et de collection sont définies comme identique, soit pas d'angle ni de distance entre les deux et le diamètre reste le même. Le « tissu » est composé de deux couches, la couche supérieure ne contient pas d'absorption par le fluorophore et son épaisseur est variée entre 0 et 3 mm . La couche inférieure contient de la rhodamine B et sera donc la seule à émettre des photons de fluorescence dans la seconde partie du programme. Les résultats normalisés pour les deux diamètres sont présentés sur la figure 4.30. En utilisant la définition de la profondeur maximale de détection, soit 10 % du signal total, nous trouvons une valeur équivalente d'environ 1,5 mm , quelque soit le diamètre utilisé. Bien entendu, ces mesures et simulations sont faites dans un cas « idéal » où la couche supérieure n'est pas fluorescente. Cette profondeur est donc une valeur maximale, qui est probablement surestimée pour des mesures dans le tissu.

Les résultats simulés sont en accord avec les mesures (χ^2 par degré de liberté de 1,3). En effet, avec cette méthode de définition, la profondeur de détection est constante, quelque soit le diamètre de fibre utilisé, et se situe aux environ de 1,5 mm . Ceci semble contredire les mesures effectuées sur fantômes bicouches, selon lesquelles une augmentation du diamètre amplifie la contribution de couches plus profondes [Pfefer et al., 2003]. Dans leur étude, un fantôme bicouche est considéré, les fluorophores sont différents dans les deux couches, de manière équivalente à notre protocole (voir chapitre 2). Leu sonde ne pénètre pas le fantôme, mais est placé au contact de celui-ci. Pfefer a constaté une augmentation de l'intensité provenant de la couche la plus basse, et ce pour des épaisseurs de fantôme supérieur de 300 et 600 μm . Sur la figure 4.30, si nous nous plaçons à une épaisseur de 600 μm , une différence est notable entre les deux sondes. Cette différence diminue pour des épaisseurs supérieures, soit celle pour laquelle nous définissons notre épaisseur maximale de détection. Les résultats présentés par l'étude citée [Pfefer et al., 2003] s'avèrent

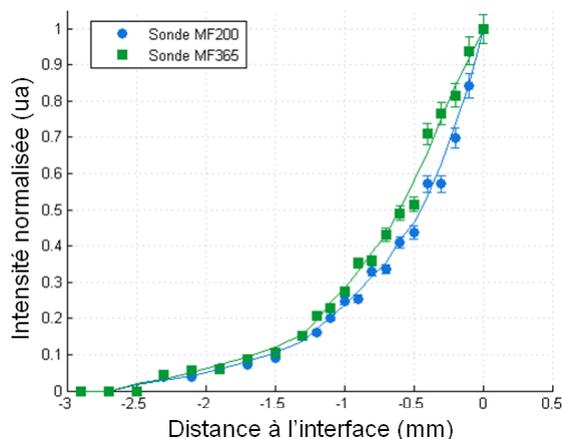


FIGURE 4.30 – Simulations pour déterminer la profondeur maximale de détection sur un fantôme bicouche avec les deux sondes MF200 et MF365.

donc être pas en désaccord avec nos mesures.

4.3.3 Conclusions

Les études présentées dans ce chapitre démontrent le potentiel de l'utilisation de la fluorescence endogène pour identifier les berges tumorales des glioblastomes. Cette méthode de détection ne nécessite pas d'injection de marqueur exogène, évitant ainsi de potentielles complications chez le patient (allergies, photo-sensibilité, ...).

Notre travail a permis une étude détaillée de l'autofluorescence endogène. Ceci est possible grâce à l'utilisation de deux longueurs d'onde d'excitation différentes (375 et 405 nm). Cette caractéristique apporte une originalité à notre travail par rapport à l'existant dans la littérature. Une étude de plusieurs fluorophores endogènes a donc été possible.

Nous avons mené à bien l'identification de différents indicateurs susceptibles de discriminer les bords infiltrés d'une tumeur cérébrale. La multiplicité de ces indicateurs semble être un facteur de réussite dans la discrimination des bords infiltrés. Plus en détail, les intégrales sous les courbes des NADH, FAD et lipopigments ont souligné une différence significative entre les zones saines et tumorales. Le rapport des intégrales des molécules métaboliques (NADH/FAD) semble également prometteur pour ce genre de discrimination. Une augmentation de ce rapport, validée statistiquement, a été révélée pour les zones tumorales. Le rapport NADH/FAD a également été comparé à une zone cérébrale superficielle saine, qui pourra être considérée comme référence lors de l'intervention (ou référence per-opératoire). De surcroît, les mesures préliminaires de durée de vie de la porphyrine ont montré une dépendance en fonction de la nature du tissu examiné. Cette voie ouvre une perspective de complémentarité aux mesures spectroscopiques.

De plus, une étude préliminaire en temps de vie de fluorescence des porphy-

rines semble indiquer une différenciation possible supplémentaire. Reste à définir un algorithme efficace de discrimination utilisant ces différentes données.

Nos études ne sont que préliminaires. L'efficacité des indicateurs précédemment cités a été validée jusqu'à présent uniquement sur des tranches de cerveau de rats. Bien que ces tranches aient été maintenues proche d'une situation *in vivo*, une validation de ces observations sur l'animal vivant reste à effectuer. La difficulté essentielle persiste dans une bonne définition des berges. En particulier, dans notre étude la zone tumorale active des RG2 a été considérée comme représentative pour les zones en multiplication cellulaire dans les berges de la tumeur. Le groupe de Laura Marcu semble confronté à la même difficulté, puisque le système développé ne leur permet pas de d'identifier les gliomes de haut grade. Par contre, les travaux d'Anita Mahadevan-Jansen ont pu passer outre cette difficulté, démontrant la possibilité de discriminer les bords tumoraux infiltrés.

La force des autres études menées correspond à leurs mesures sur des échantillons humains *ex* ou même *in vivo*. La prochaine étape de notre étude devrait suivre cette direction. Pour les futures mesures *in-vivo*, un dispositif est désormais disponible et utilisable, après une amélioration de la transmission de puissance grâce à une modification du dispositif. Parallèlement des études *ex vivo* sur des échantillons de patients seraient souhaitables, permettant ainsi d'avancer encore plus vers la définition d'une méthode de discrimination fiable.

À court terme, notre dispositif peut être amélioré en couplant la spectroscopie à la mesure de la durée de vie de fluorescence, ajoutant ainsi une originalité au projet TRIOP. D'autres options de discrimination seront discutées dans les conclusions et perspectives ci-dessous.

Conclusions et perspectives

Les enjeux liés à une amélioration de la durée et qualité de vie des patients atteints d'un glioblastome dépendent fortement du niveau de précision de la résection tumorale. Une aide doit être apportée au chirurgien, en particulier dans la définition des bordures tumorales infiltrées. Notre travail s'est consacré à définir une méthode optique permettant d'apporter une solution à cette problématique. Notre choix, soit l'autofluorescence des tissus, démontre un puissant potentiel de discrimination entre tissu sain et tissu tumoral en neuro-oncologie. La finalité de notre travail de recherche, liée à l'identification d'indicateurs potentiels propres au tissu tumoral actif sur un modèle animal, a été atteinte.

Au cours de ce travail de thèse, le projet TRIOP-AF a été porté plus loin vers sa future utilisation clinique. Il s'agit d'un travail pluridisciplinaire qui a été mené sur trois niveaux différents : instrumentation, simulations et validation expérimentale, et enfin campagne de mesures sur modèle animal. Plus précisément, au cours de la thèse un premier instrument prototype basé sur deux fibres, excitatrice et collectrice de la fluorescence, a été mis en place caractérisé. Pour y parvenir, plusieurs outils ont été développés, notamment des fantômes optiques calibrés et un programme de simulations validé pour l'étude qualitative de la géométrie de la sonde. Tous deux sont désormais opérationnels et ont été utilisés. Les fantômes ont permis non seulement la définition des propriétés de détection de notre sonde, notamment la profondeur de détection, mais aussi une validation partielle du programme de simulations. En conséquence, grâce à ces mêmes outils, l'effet de la géométrie des sondes sur la détection de signal a pu être étudié et pourra davantage être optimisée en fonction des caractéristiques souhaitées.

Pour définir des indicateurs autofluorescents du tissu tumoral, un modèle animal a été choisi, s'imposant comme premier pas vers le vivant. Deux lignées de cellules tumorales différentes ont été testées, permettant d'appréhender les différentes caractéristiques du tissu des glioblastomes, soient la nécrose, le tissu tumoral en division ou actif et le tissu infiltré. L'étude spectroscopique, riche en information, a permis l'identification de plusieurs indicateurs potentiels du signal autofluorescent des tissus tumoraux en division. En particulier, les trois paramètres d'intérêt suivants sont à nommer :

- Les intensités des NADH, flavines et lipopigments, estimées par les intégrales des courbes ajustées, présentent une diminution significative de l'ordre de 45 % dans la zone tumorale par rapport au tissu sain.
- Le rapport entre les intégrales de NADH et flavines est supérieur dans la tumeur, et ce malgré la baisse générale d'intensité. Cette constatation est cohérente avec la baisse d'activité métabolique de production d'ATP par le cycle respiratoire observée dans les tissus cancéreux [Malthiéry and Savagner, 2006; Ostrander et al., 2010]. Cette variation du rapport NADH/flavines a été

trouvé reproductible et présente ainsi un deuxième et puissant indicateur du tissu tumoral.

- Le rapport des intensités des NADH entre les zones saine (du cortex, par exemple) et tumorale d'un même échantillon est de l'ordre de 0,6. Pour les flavines, nous avons pu observer un comportement similaire.

Les mesures préliminaires de durée de vie de fluorescence mettent en lumière le potentiel intérêt des porphyrines, dont le temps de vie est significativement inférieur dans la zone tumorale.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc identifié de nombreux indicateurs potentiels de la zone tumorale active. Mais il faut garder à l'esprit que la zone considérée est une zone tumorale centrale, composée en quasi totalité de cellules tumorales en division. Pour une future utilisation lors d'une intervention chirurgicale, il s'agira d'identifier la partie tumorale infiltrée qui possède sans doute une concentration plus faible de cellules tumorales. Les différences observées seront en conséquence moins marquées. Il sera donc important d'étudier l'effet de la concentration de cellules tumorales sur le signal. Cette étude pourra être effectuée en comparant les signaux et les rapports entre divers zones dont la concentration en cellules cancéreuses sera connue et déterminée grâce aux données histologiques.

Lors des mesures, nous avons pu constater une diminution significative de l'intensité du signal de fluorescence dans la zone tumorale. Celle-ci est probablement liée à la forte vascularisation des tissus tumoraux et donc à la présence de sang. Dans des conditions de mesures *in vivo*, il est possible que la contribution de l'hémoglobine soit plus importante. Le premier indicateur identifié sera donc potentiellement plus marqué dans la tumeur. Il est également possible que la quantité variable de sang présent dans la plaie ou les tissus complique l'évaluation de cet indicateur.

Si la validité des potentiels indicateurs reste à confirmer sur une étude comprenant un plus grand nombre de rats injectés, il sera surtout nécessaire d'étendre ces expériences *in vivo*, où les paramètres hémodynamiques seront plus proches de ceux rencontrés au bloc opératoire. Pour ce faire, une sonde monofibre a déjà été développée et est prête à être utilisée. Bien évidemment une étude parallèle devra être effectuée sur des tissus humains, fixés en premier lieu, afin de préparer notre système à son transfert au bloc opératoire. Ceci permettra également de vérifier si les conclusions effectuées sur le rat peuvent être transférées aux glioblastomes humains.

La problématique du sang est souvent mentionnée par les praticiens ou dans des études similaires de la notre. Dans le cas où le signal serait trop diminué, il pourrait être judicieux de s'affranchir de cette absorption supplémentaire en utilisant différents moyens. Ceci soit en calibrant la concentration totale en hémoglobine via nos fantômes optiques, en se référant aux travaux de Liu [Liu et al., 2011], soit en utilisant des sources non linéaires pour exciter le tissu avec des longueurs d'ondes comprises dans la fenêtre thérapeutique (700 à 1000 *nm*). Ceci réduit le bruit provenant de la lumière diffusée par l'échantillon. Le rapport signal sur bruit de la

fluorescence s'en retrouve augmenté, ce qui a l'avantage d'améliorer la profondeur d'exploration des tissus biologiques. Un dispositif d'excitation non linéaire ou biphotonique aurait aussi le bénéfice d'éviter le chevauchement spectral entre excitation et collection des chromophores endogènes. L'instrumentation liée à ces mesures, plus compliquée et couteuse, serait à revoir complètement.

À plus long terme, la modalité optique devrait rejoindre la modalité radioisotopique dans une même et unique sonde. Leur complémentarité et donc l'intérêt de la bimodalité sera alors à démontrer. Nous pouvons néanmoins émettre l'hypothèse que les deux méthodes d'imagerie ne reflètent pas exactement les mêmes mécanismes. Nous avons d'un côté, TRIOP-R, qui peut utiliser le ^{18}FDG , un traceur informant sur le métabolisme du glucose, augmenté dans le cas d'une tumeur. De l'autre côté, la sonde autofluorescente a été jugée capable de repérer, entre autre, l'augmentation du rapport NADH/flavines, lié au dysfonctionnement du cycle de Krebs. Même si les deux phénomènes sont liés, ils apportent des informations complémentaires sur l'état métabolique des cellules. D'autre part, la spectroscopie optique peut apporter d'autres informations comme l'étendue de la néovascularisation. Cet effet est démultiplié si nous avons recours en plus à la mesure de temps de vie de fluorescence, dont les variations sont sensibles à des paramètres qui diffèrent de ceux influant sur l'intensité émise. Le potentiel de la sonde TRIOP est donc très important, ce qui confirme son intérêt face aux autres systèmes en développement, répondant à la même problématique de détection des tissus tumoraux cérébraux.

Protocole de fabrication des fantômes

Étapes de fabrication (d'après [Vu-Thi, 2008]) :

1. Préparer le gel :
 - Dans une boîte plastique refermable : Mettre 2,5 g (pour gel de 10 %, alors volume total de 25 ml) de gélatine (G1890 - Sigma Aldrich) + la quantité eau + encre de chine selon le tableau ci-dessus ou selon un calcul (pour un μ_a désiré).
 - Chauffer environ 300 ml d'eau dans un bécher de 400 ml pendant 2 minutes au microonde à puissance maximale.
 - Plonger le récipient en plastique (bouchon fermé) contenant le mélange eau+encre+gel pendant environ 3 minutes. Sortir de l'eau et retourner le récipient toutes les minutes pour mélanger les composants.
 - Attendre (bouchon fermé) que les bulles formées remontent à la surface (formation d'une mousse blanche), soit environ une minute avant d'ajouter les billes et la solution de fluorophore.
 - Remuer un peu (retourner le récipient fermé), puis replonger la boîte dans le bécher de 400 ml (pour que le gel ne se re-solidifie pas le temps de « chauffer » le bain à ultrasons).
2. Mélanger le gel et les billes :
 - Chauffer le bain à ultrasons en y versant trois fois un bécher de 600 ml presque plein chauffé au four à microondes pendant 3 minutes à puissance max.
 - Mettre le récipient fermé contenant le gel dans le bain à ultrasons et allumer celui-ci pendant environ 4 minutes.
 - Laisser le récipient fermé dans le bain pendant le montage du fantôme.
3. Montage du fantôme
 - Si le moule est froid (pièce non chauffée), laisser tremper les parties du fantôme dans le bain à ultrasons (éteint) pendant une minute.
 - Sécher les différentes parties puis les monter ensemble.
4. Remplissage du fantôme
 - Sortir le récipient contenant le gel du bain et laisser refroidir pendant quelques minutes.

- Remplir le fantôme à l'aide d'une pipette (choisir le volume en fonction du fantôme). (Fantôme en escaliers : Appuyer sur les bords du fantôme pour éviter les fuites. Une fois le fantôme rempli, maintenir la pression pendant 2 minutes.)
- Mettre le moule dans un sac plastique et fermer hermétiquement. Laisser refroidir le moule dans le frigo pendant 1 h - 1 h 30 avant de démouler et de commencer les expériences.

Les mesures sur chaque fantôme sont faites sur un **fond noir opaque**, et ne dépassent pas 1 h, ensuite les fantômes sont jetés. Si les fantômes contiennent des fluorophores, il est préférable de maintenir la température stable (à l'aide d'une climatisation par exemple).

Protocole de mesure des paramètres optiques

Cette annexe décrit en détails le protocole de mesure utilisé pour vérifier les paramètres optiques des fantômes fabriqués, μ_a , μ_s et g , respectant le manuel [Prahl, 2010]. Celui-ci est applicable dans le cas d'utilisation d'une unique sphère intégrante et permet le calcul des coefficients optiques par le programme d'inverse adding-doubling (IAD). Les spécifications liées aux échantillons (taille, nombre de mesures, etc.) seront également mentionnées.

B.1 Échantillons

Les échantillons sont des gels rectangulaires fabriqués suivant le protocole décrit dans l'annexe A. À la différence du protocole décrit, ces fantômes-gel ne contiennent pas de fluorophore.

Les fantômes sont de dimensions $8 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$. Ils sont placés entre deux cuvettes de quartz (Starna) comprenant chacune un empreinte creusée de 8 mm de largeur et $0,5 \text{ mm}$ de profondeur. L'indice de réfraction de ces cuvettes est de 1,55. De l'eau distillée a été utilisée pour améliorer l'adhésion des fantômes à la plaque de quartz et éviter les bulles d'air. L'épaisseur des plaques de quartz protégeant le fantôme est de $1,2 \text{ mm}$.

Les propriétés optiques variées sont le coefficient de diffusion et le coefficient d'absorption. Des combinaisons différentes ont été testées afin de vérifier la dépendance ou non des couples (μ_s, μ_a) . L'indice de réfraction et le coefficient d'anisotropie restent constant lors des mesures.

B.2 Dispositifs de mesures

Deux dispositifs sont nécessaires à la mesure des coefficients optiques d'absorption et de diffusion. Un premier dispositif, composé d'une sphère intégrante unique, permet de mesurer la transmission et la réflexion de l'échantillon, ce afin de déterminer μ_a et μ_s . Le second dispositif, sans sphère, détaillé par la suite, autorise la mesure de la transmission collimatée pour en déduire g .

B.2.1 Mesure de transmission et réflexion – dispositif de la sphère intégrante

Ce dispositif comprend la diode laser émettant à 405 nm . Une fibre optique transmet la lumière en sortie du laser à un diaphragme d'un millimètre de diamètre. Celui-ci est situé en face d'un port d'entrée de la sphère. Une autre fibre optique récupère la lumière collectée par la sphère et la transmet au spectromètre. La figure B.1 présente un schéma simplifié de ce dispositif.

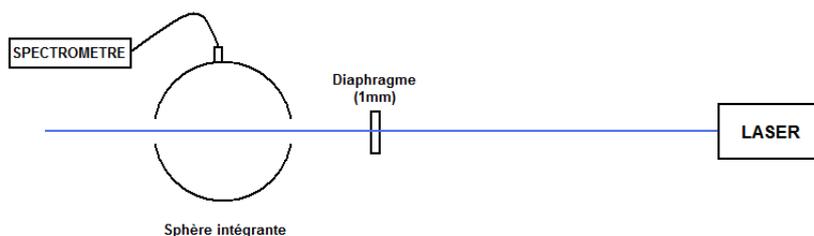


FIGURE B.1 – Schéma simplifié du dispositif comprenant la sphère intégrante.

B.2.2 Mesure de la transmission collimatée

Le laser utilisé est le même que pour le dispositif décrit ci-dessus. Une fibre optique transmet la lumière laser à un collimateur. Plusieurs diaphragmes permettent ensuite l'alignement du faisceau jusqu'au dernier diaphragme relié par fibre au spectromètre. Une représentation simplifiée de ce dispositif est illustrée sur la figure B.2.

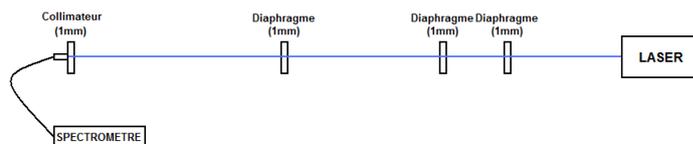


FIGURE B.2 – Schéma simplifié du dispositif de mesure de la transmission collimatée.

B.3 Protocole de mesures

Le diamètre d'un port de la sphère est de $1,27\text{ cm}$, ce qui est supérieur à la taille de l'échantillon. Le diamètre du port est donc diminué grâce à l'utilisation d'un cache recouvert de téflon, comportant une ouverture de 7 mm de diamètre.

Les mesures effectuées avec la sphère nécessitent l'utilisation d'une référence dont le coefficient de réflexion, r , est connu. Une référence en téflon, $r = 0,99$ est utilisée.

Les mesures ont toutes été effectuées dans l'obscurité (lumière ambiante éteinte, salle d'expérimentation sans fenêtre).

B.3.1 Mesure de transmission

Afin de calculer la transmittance totale mesurée, M_T , trois mesures différentes sont nécessaires. La transmission est la quantité de lumière traversant un milieu. La transmittance correspond à un rapport entre transmission, permettant une normalisation par rapport à la source utilisée. Une première mesure de la lumière transmise sans échantillon T_0 , source lumineuse allumée, est effectuée (voir B.3 a)). Une mesure de transmission sans lumière excitatrice T_{bruit} est illustrée sur le schéma B.3 b)). La mesure de la transmission de l'échantillon T_{ech} est également nécessaire, voir figure B.3 c)). Pour chaque fantôme, cinq mesures T_{ech} sont effectuées en différents points de l'échantillons.

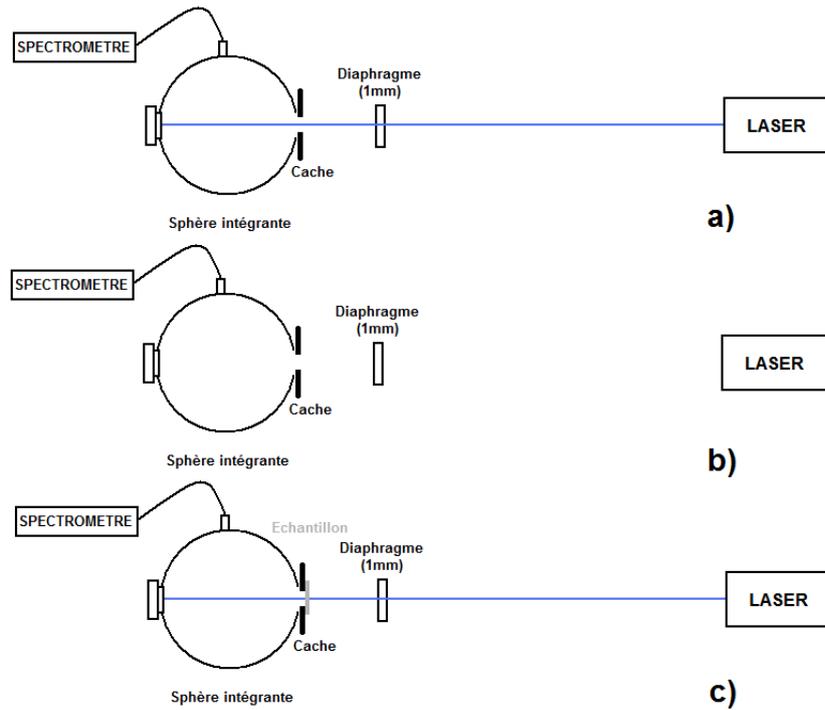


FIGURE B.3 – Schémas des différentes mesures de transmission à effectuer.

La transmittance totale mesurée M_T est déduite des mesures grâce à l'équation B.1.

$$M_T = \frac{T_{ech} - T_{bruit}}{T_0 - T_{bruit}} \quad (\text{B.1})$$

B.3.2 Mesure de réflexion

Trois mesures sont également nécessaires à la détermination de la réflectance totale mesurée. La réflexion est une grandeur mesurée correspondant à la quantité de lumière réfléchiée par l'échantillon et la réflectance est la normalisation de cette réflexion par la lumière incidente. Dans un premier temps, la réflexion R_0 est mesurée, sans échantillon, suivant le schéma B.4 a). Un échantillon de référence, dont le coefficient de réflexion r est connu, est placé à l'arrière de la sphère afin de mesurer $R_{standard}$ (figure B.4 b)). Enfin, la réflexion de l'échantillon R_{ech} est enregistrée en cinq endroits différents pour un même fantôme, voir le schéma B.4 c).

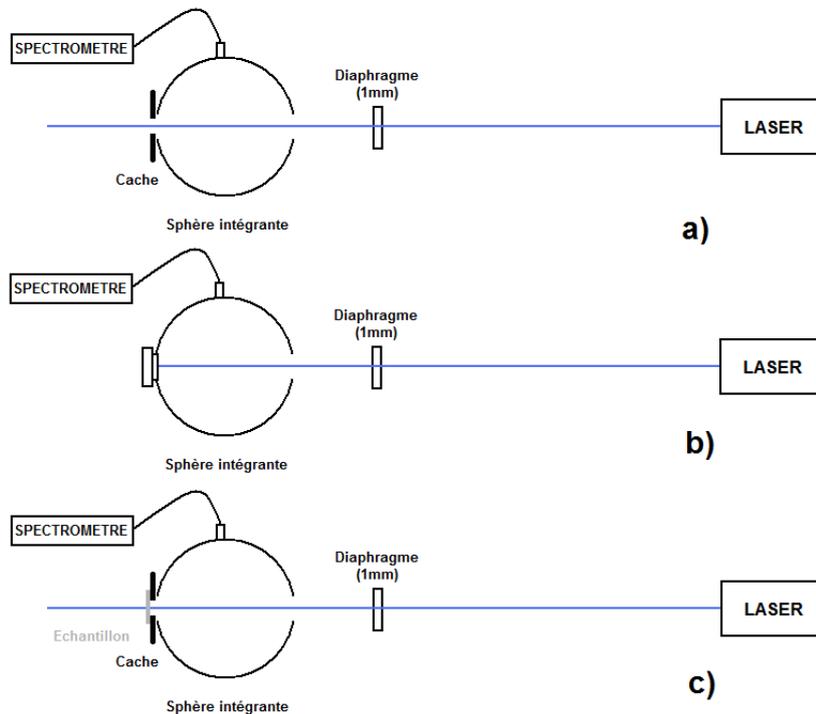


FIGURE B.4 – Schémas des différentes mesures de réflexion à effectuer.

Le calcul permettant de déduire M_R est donné par l'équation B.2. Pour rappel, dans notre cas, $r = 0,99$.

$$M_R = r \frac{R_{ech} - R_0}{R_{standard} - R_0} \quad (\text{B.2})$$

B.3.3 Mesure de transmission collimatée

Dans un premier temps, il faut aligner les diaphragmes afin que le faisceau soit orienté de manière optimale vers le détecteur. Pour faire ce type de mesures, un filtre absorbant est nécessaire afin de diminuer l'intensité du laser et donc permettre sa mesure. À nouveau, trois mesures sont nécessaires :

- T_{c_0} : mesure du bruit lumineux ambiant, laser éteint, voir B.5 a)
- $T_{c_{100}}$: mesure de la lumière laser incidente, utilisation d'un filtre absorbant, possédant une certaine densité optique ($OD = 2,0$), voir B.5 b)
- $T_{c_{ech}}$: mesure de l'échantillon, répétée en cinq endroits différents

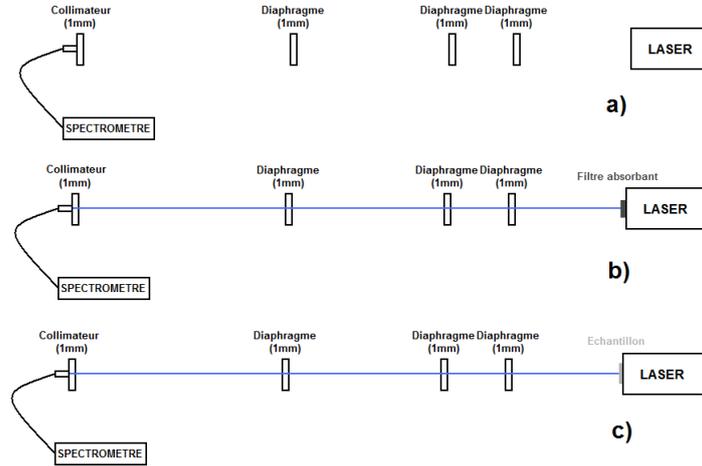


FIGURE B.5 – Schémas des différentes mesures de transmission collimatée à effectuer.

Le calcul de la transmittance collimatée totale M_U est le suivant :

$$M_U = \frac{T_{c_{ech}} - T_{c_0}}{T_{c_{100}} \cdot 10^{-OD} - T_{c_0}} \quad (\text{B.3})$$

B.4 Description des mesures pour un fantôme

Les mesures correspondent à des spectres acquis sur le spectromètre. Une mesure correspond à une moyenne de 100 acquisitions de 100 *ms*. Un point de mesure est donc effectué en 10 *s*.

Un fantôme correspond à un gel fabriqué présentant les propriétés optiques souhaitées. La quantité de gel fabriquée pour un ensemble de propriétés donné est d'environ 5 *ml*. Pour un même gel, plusieurs échantillons sont mesurés. Comme cela a déjà été mentionné précédemment, chaque échantillon est mesuré à plusieurs endroits. Plusieurs gels aux paramètres identiques sont fabriqués et diverses combinaisons μ_s et μ_a , sont utilisées. Par exemple, un fort μ_s va être mesuré avec un faible et un fort μ_a . La variabilité pour un même échantillon, un même gel et entre plusieurs gels peut ainsi être vérifiée.

B.5 Analyse des mesures

L'analyse des mesures s'effectue grâce à un programme développé par Scott Prahl, accessible sur le site : <http://omlc.ogi.edu/software/iad/> : IAD (Inverse

Adding Doubling). Ce programme fonctionne en simulant la propagation des photons suivant la situation expérimentale et compare les grandeurs simulées de réflectance et transmittances à celle qui ont été mesurées. Le programme retourne les coefficients d'absorption et diffusion ayant permis d'avoir le meilleur accord simulation/mesure.

Dans un premier temps, il convient de remplir le fichier d'entrée du programme qui comprend la description des paramètres de l'échantillon et de la sphère. Pour indication, les paramètres utilisés dans notre cas sont présentés en italique ci-dessous.

<i>1.40</i>	#	<i>Index of refraction of the sample</i>
<i>1.55</i>	#	<i>Index of refraction of the top and bottom slides</i>
<i>1.0</i>	#	<i>[mm] Thickness of sample</i>
<i>1.2</i>	#	<i>[mm] Thickness of slides</i>
<i>1</i>	#	<i>[mm] Diameter of illumination beam</i>
<i>0.99</i>	#	<i>Reflectivity of the reflectance calibration standard</i>
<i>1</i>	#	<i>Number of spheres used during each measurement</i>
	#	<i>Properties of sphere</i>
<i>50.8</i>	#	<i>[mm] Sphere Diameter (8 in * 25.4 mm/in)</i>
<i>7</i>	#	<i>[mm] Sample Port Diameter</i>
<i>12.7</i>	#	<i>[mm] Entrance Port Diameter</i>
<i>3.00</i>	#	<i>[mm] Detector Port Diameter</i>
<i>0.99</i>	#	<i>Reflectivity of the sphere wall</i>

En complément de cette description, les valeurs déterminées expérimentalement : M_R , M_T et M_U sont fournies par l'utilisateur.

Dans le cas où les trois valeurs M_R , M_T et M_U sont données au programme, ce dernier procure les valeurs de coefficient d'absorption de diffusion et d'anisotropie de diffusion. Il est également possible de ne fournir que les valeurs de M_R et M_T , auquel cas seuls les paramètres μ_a et μ_s seront retournés. Cette utilisation nécessite de renseigner le programme la valeur de g , soit 0,87 dans le cas présent.

Traitement de la détection par la fibre collectrice

La première partie (C.1) explique les différents tests que subit le photon (ou paquet de photon) afin de déterminer s'il est détecté ou non par la sonde. La seconde partie (C.2) indique comment sont calculées les différentes variables nécessaires pour effectuer les tests.

C.1 Principe de détection par la sonde de collection

Lorsqu'un photon (paquet de photon) lancé par le programme de fluorescence se retrouve à franchir la surface supérieure de l'échantillon (côté sonde), celui-ci va subir plusieurs tests afin de vérifier s'il est détecté par la fibre de collection ou pas.

Au départ, ses coordonnées sont notées : (x, y)

C.1.1 Premier test : sélection à la surface de l'échantillon ($z = 0$)

Le programme teste si le photon se trouve à l'intérieur de l'ellipse formée par la projection de la fibre collection à la surface de l'échantillon.

Coordonnées du centre de l'ellipse projetée : (x_e, y_e)

Les rayons de cette ellipse sont notés : (R_{ex}, R_{ey})

Le test effectué est donc le suivant :

$$\frac{(x - x_e)^2}{R_{ex}^2} + \frac{y^2}{R_{ey}^2} \leq 1 \quad (\text{C.1})$$

Si cette condition est vérifiée, alors le photon subit le test suivant. Si ce n'est pas le cas, le photon n'est pas détecté.

C.1.2 Deuxième test : sélection à la surface de la sonde ($z = H$)

Le programme prolonge le photon jusqu'à la surface de la sonde (avec l'angle qu'il avait en sortie de l'échantillon). Ses nouvelles coordonnées sont : (x_H, y_H) . Le test sert à vérifier si le photon se trouve dans l'ellipse formée par la sonde de détection.

Coordonnées du centre de l'ellipse de la sonde : (x_c, y_c)

Les rayons de cette ellipse sont notés : (R_{cx}, R_{cy})

Le test effectué est :

$$\frac{(x_H - x_c)^2}{R_{cx}^2} + \frac{y_H^2}{R_{cy}^2} \leq 1 \quad (\text{C.2})$$

Si cette condition est vérifiée, le photon passe au test suivant. Sinon, le photon n'est pas détecté.

C.1.3 Dernier test : sélection par le cône d'acceptance

Le principe est de vérifier si le point de départ du photon (à la surface de l'échantillon) est contenu dans le cône d'acceptance de la fibre, tracé depuis la position du photon à la surface de la fibre.

La première étape est donc de tracer le cône d'acceptance depuis les coordonnées de photon (x_H, y_H) jusqu'à la surface de la sonde. Ce cône a pour angle caractéristique les angles d'acceptance de la fibre, notés α_1 et α_2 , voir les calculs de l'annexe A dans [Vu-Thi, 2008]. Ce cône va former une ellipse à la surface de l'échantillon. Si le point de départ du photon, soit ses coordonnées (x, y) , se trouve dans cette ellipse, alors le photon est détecté.

Coordonnées du centre de l'ellipse d'acceptance à la surface de l'échantillon : (x_{ph}, y_{ph})

Les rayons de cette ellipse sont notés : (R_{phx}, R_{phy})

Le test effectué est donc le suivant :

$$\frac{(x - x_{ph})^2}{R_{phx}^2} + \frac{(y - y_{ph})^2}{R_{phy}^2} \leq 1 \quad (\text{C.3})$$

Si cette condition est vérifiée, le photon est donc détecté et son poids est enregistré dans un compteur de fluorescence totale ainsi qu'en fonction de la couche ou sphère d'où il provient. Sinon, le photon n'est pas détecté.

C.2 Calcul des différentes données nécessaires

C.2.1 Schéma général

Les différents paramètres sont :

H , la distance entre l'échantillon et la sonde.

L , la distance centre-à-centre entre la fibre émettrice (bleue) et la fibre collectrice (rose).

θ , l'angle d'inclinaison de la fibre collectrice.

D_e , le diamètre de la fibre émettrice.

D_c , le diamètre de la fibre collectrice.

En général, les paramètres sont les suivants :

Sonde $S11 - 600$ d'où $\theta = 11^{circ}$ et $L = 600 \mu m$, $D_e = 200 \mu m$ et $D_c = 365 \mu m$.

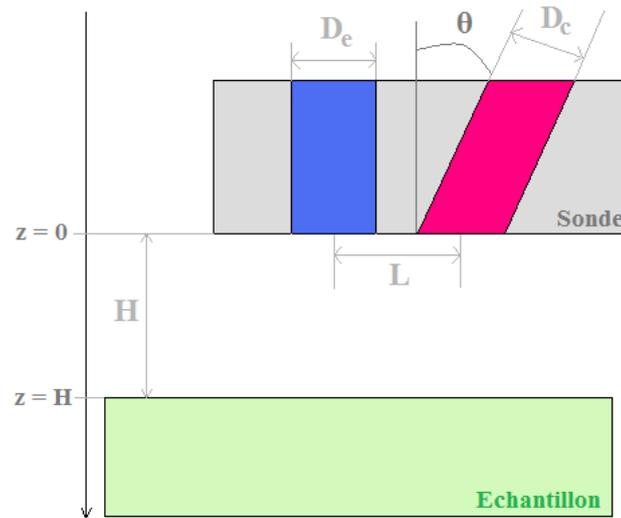
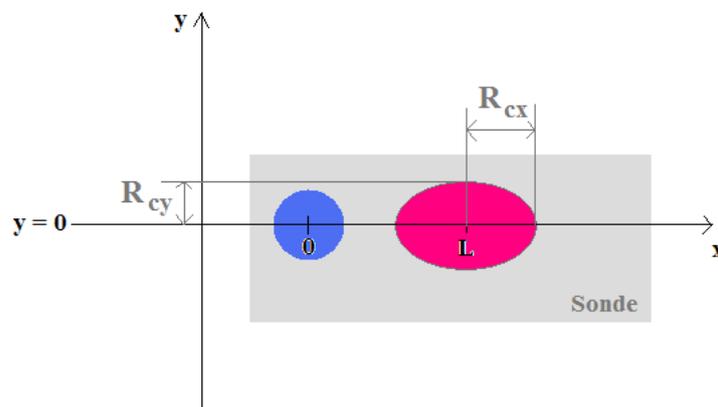


FIGURE C.1 – Schéma général de la géométrie de la sonde et de l'échantillon

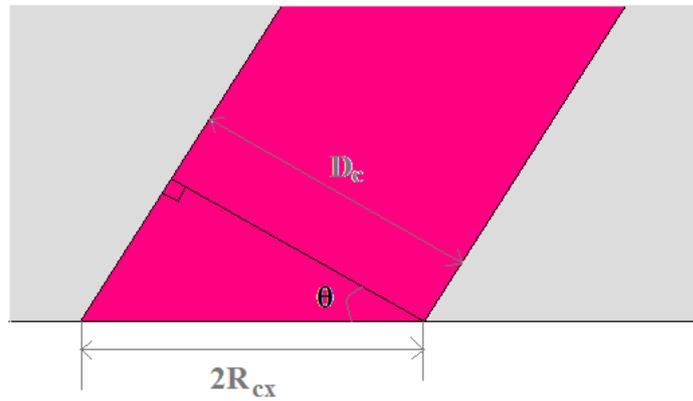
C.2.2 Ellipse formée par la fibre de détection à la surface de la sonde

FIGURE C.2 – Schéma de la sonde en $z = 0$, plan xy

Pour déterminer R_{cx} , le schéma suivant est utile :

Nous pouvons donc retrouver :

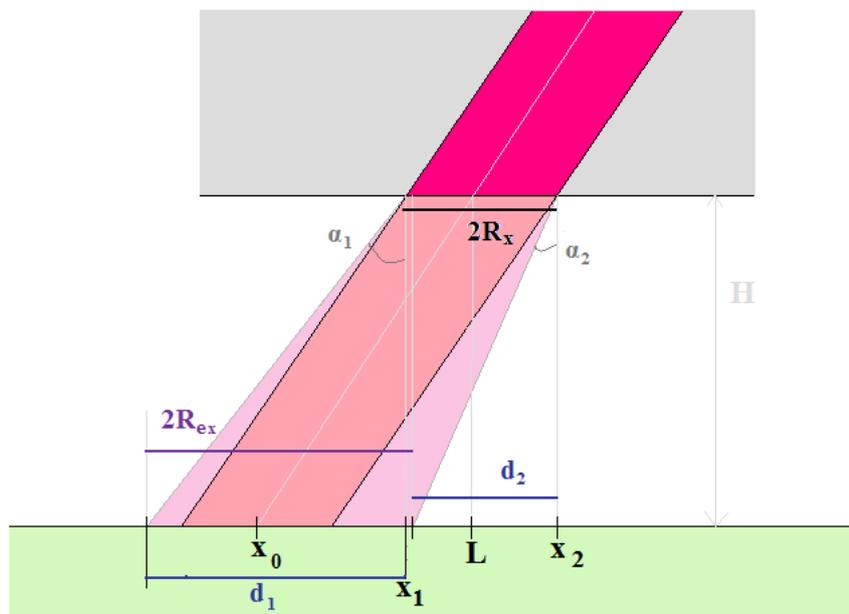
$$R_{cx} = \frac{D_c}{2 \cos \theta} \quad R_{cy} = \frac{D_c}{2} \quad (\text{C.4})$$

FIGURE C.3 – Schéma de la sonde, plan xz

C.2.3 Projection de l'ellipse formée par la fibre de collection en $z = H$

Pour rappel, le centre de l'ellipse projetée est noté : (x_e, y_e) .

Dans un premier temps, nous allons déterminer x_e et le rayon projeté en x : R_{ex} .

FIGURE C.4 – Schéma de la projection de l'ellipse depuis la sonde de collection, plan xz

D'après la figure C.4, nous pouvons constater que :

$$2R_{ex} = d_1 + 2R_x - d_2 \quad (\text{C.5})$$

Les trois grandeurs nécessaires au calcul se calculent grâce à des triangles rectangles. De cette manière, nous pouvons retrouver :

$$R_x = \frac{1}{2} \frac{D_c}{\cos \theta} \quad (\text{C.6})$$

$$d_1 = H \tan \alpha_1 \quad (\text{C.7})$$

$$d_2 = H \tan \alpha_2 \quad (\text{C.8})$$

Nous sommes alors en mesure de déduire R_{ex} :

$$2R_{ex} = \frac{D_c}{\cos \theta} + H (\tan \alpha_1 - \tan \alpha_2) \quad (\text{C.9})$$

Nous allons ensuite passer au calcul du centre de l'ellipse, x_e . D'après le schéma ci-dessous, nous pouvons établir l'équation suivante :

$$x_e = L - R_x - d_1 + R_{ex} \quad (\text{C.10})$$

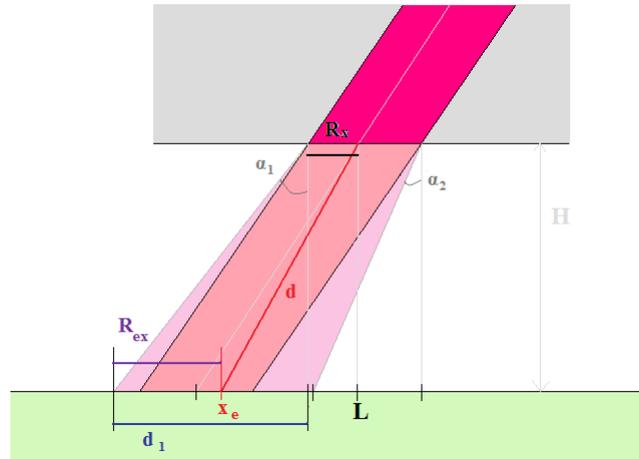


FIGURE C.5 – Schéma du centre de l'ellipse projetée depuis la sonde de collection, plan xz

En remplaçant les expressions par les formules précédemment définies, nous trouvons alors :

$$x_e = L - \frac{H}{2} (\tan \alpha_1 + \tan \alpha_2) \quad (\text{C.11})$$

Dans un second temps, nous allons calculer le rayon de l'ellipse projetée suivant l'axe y , soit R_{ey} . Pour ce faire, il faut commencer par calculer la distance d , illustrée sur la figure C.5.

$$d = \sqrt{H^2 + (L - x_e)^2} \quad (\text{C.12})$$

Ensuite, d'après la figure C.6 ci-dessous, nous établissons les équations suivantes :

$$2R_{ey} = D_c + 2d_{acc} \quad (\text{C.13})$$

$$d_{acc} = d \tan \alpha \quad (\text{C.14})$$

avec α , l'angle de collection de la fibre. Nous retrouvons donc : $2R_{ey} = D_c + 2d \tan \alpha$.

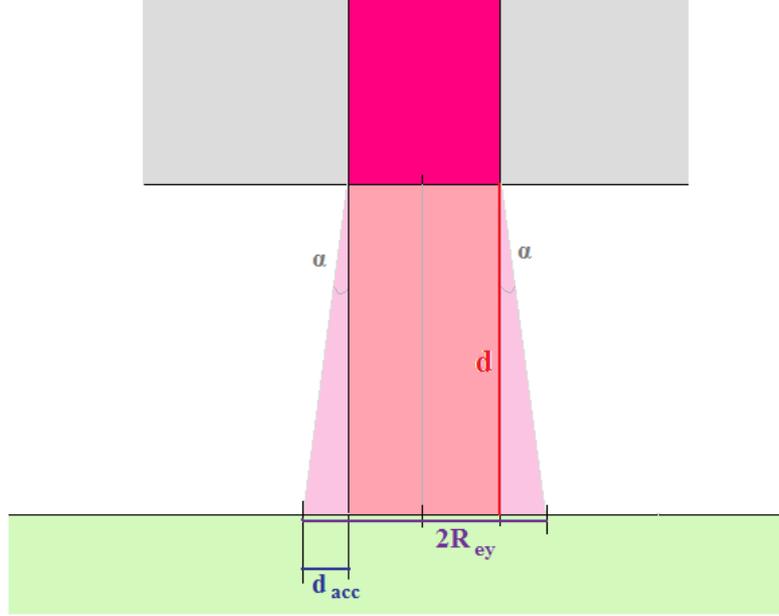


FIGURE C.6 – Schéma de l'ellipse projetée depuis la sonde de collection, plan yz

Le centre de l'ellipse projetée selon l'axe y est égal à y_c , donc $y_e = 0$.

En conclusion, nous pouvons rappeler les coordonnées trouvées :

$$(x_e, y_e) = \left(\left[L - \frac{H}{2} (\tan \alpha_1 + \tan \alpha_2) \right], 0 \right) \quad (\text{C.15})$$

$$(R_{ex}, R_{ey}) = \left(\left[\frac{D_c}{2 \cos \theta} + \frac{H}{2} (\tan \alpha_1 - \tan \alpha_2) \right], \left[\frac{D_c}{2} + d \tan \alpha \right] \right) \quad (\text{C.16})$$

C.2.4 Cône d'acceptance correspondant à un photon « pré-déecté »

Le centre de l'ellipse formée à la surface de l'échantillon par le cône d'acceptance du photon est : (x_{ph}, y_{ph}) . Les rayons de cette ellipse sont notés : (R_{phx}, R_{phy}) .

Dans le plan xz , nous pouvons nous repérer sur le schéma suivant :

Le rayon de de l'ellipse correspondant au cône d'acceptance du photon est calculé de la façon suivante :

$$2R_{phx} = H (\tan \alpha_1 - \tan \alpha_2) \quad (\text{C.17})$$

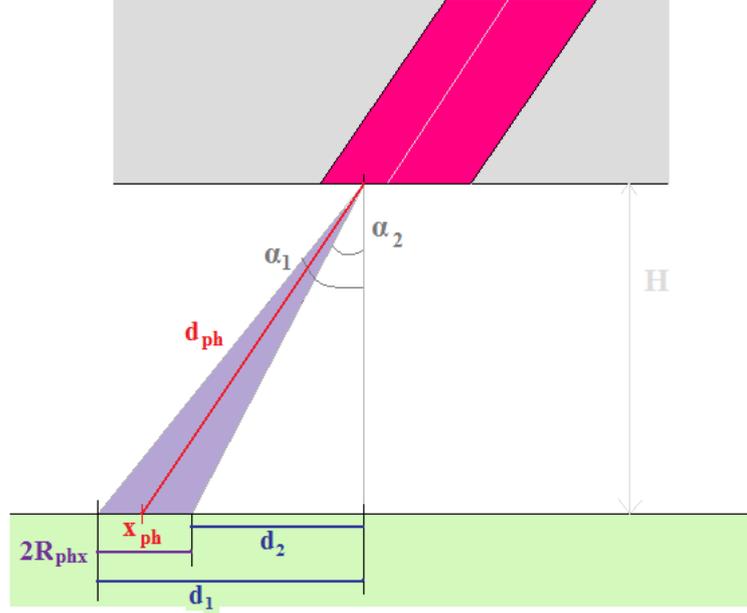


FIGURE C.7 – Schéma du cône d'acceptance projetée depuis l'impact du photon avec la sonde de collection, plan xz

Grâce à la figure C.7, nous pouvons également déterminer la coordonnée du centre du cône d'acceptance, à savoir x_{ph} :

$$x_{ph} = x - d_2 - R_{phx} \quad (C.18)$$

$$x_{ph} = x - \frac{H}{2} (\tan \alpha_1 - \tan \alpha_2) \quad (C.19)$$

Nous procédons également pour déterminer les grandueurs nécessaires dans le plan yz . La figure C.7 permet de calculer la distance d_{ph} .

$$d_{ph} = \sqrt{H^2 + (x - x_{ph}^2)} \quad (C.20)$$

Dans le plan yz , la représentation du cône d'acceptance est visible sur la figure C.8. Cela nous permet de calculer le rayon de l'ellipse R_{phy} .

$$2R_{phy} = 2d_{ph} \tan \alpha \quad (C.21)$$

Le centre du cône d'acceptance dans le plan yz a la même coordonnée que le point d'impact du photon avec la sonde, soit $y_{ph} = y$.

Nous rappellerons les grandeurs nécessaires au calcul du cône d'acceptance pour un photon ayant touché la surface de la fibre en (x, y) :

$$(x_{ph}, y_{ph}) = \left(\left[x - \frac{H}{2} (\tan \alpha_1 - \tan \alpha_2) \right], y \right) \quad (C.22)$$

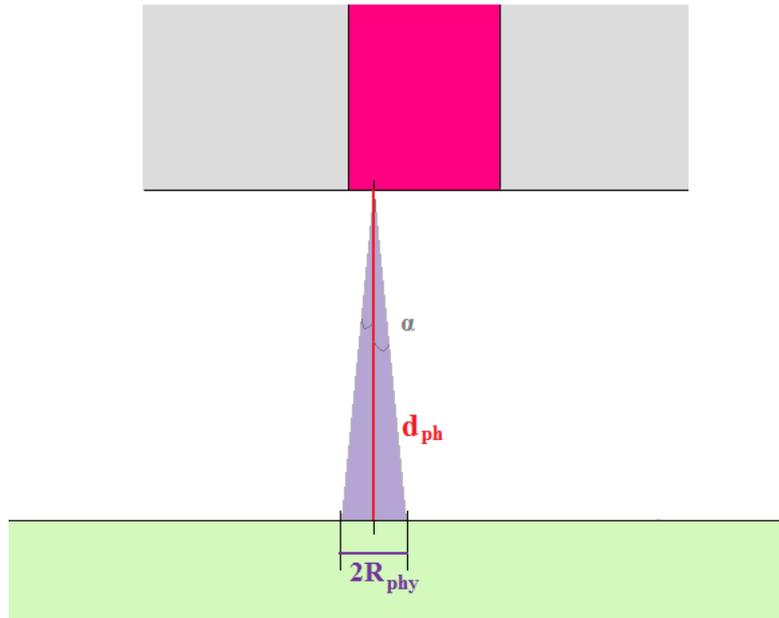


FIGURE C.8 – Schéma de du cône d'acceptance, projeté depuis la sonde de collection, plan yz

$$(R_{phx}, R_{phy}) = \left(\left[\frac{H}{2} (\tan \alpha_1 - \tan \alpha_2) \right], d_{ph} \tan \alpha \right) \quad (\text{C.23})$$

Bibliographie

- Nadia Amharref. *Caractérisation tissulaire d'un modèle de gliome par microspectroscopies vibrationnelles et influence de l'architecture tissulaire sur la distribution d'un agent anticancéreux*. PhD thesis, Université de Reims Champagne-Ardenne, 2007. 141
- Claudine Amiel-Tison. *L'infirmité motrice d'origine cérébrale*. Elsevier Masson, 1997. 8
- Mohammad Ali Ansari, Reza Massudi, and Marjaneh Hejazi. Experimental and numerical study on simultaneous effects of scattering and absorption on fluorescence spectroscopy of a breast phantom. *Optics & Laser Technology*, 41(6) :746 – 750, 2009. ISSN 0030-3992. doi : DOI:10.1016/j.optlastec.2008.12.019. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0030399209000024>. 60, 61
- Topun Austin. Optical imaging of the neonatal brain. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal*, 4 :238–241, 2007. 24
- I. Baldi, A. Huchet, L. Bauchet, and H. Loiseau. [epidemiology of glioblastoma]. *Neurochirurgie*, 56(6) :433–440, Dec 2010. doi : 10.1016/j.neuchi.2010.07.011. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.011>. 1, 13, 14
- Jorge R. Barrio, Glen L. Tolman, Nelson J. Leonard, Richard D. Spencer, and Gregorio Weber. Flavin 1, n6-ethenoadenine dinucleotide : Dynamis and static quenching of fluorescence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70 :941–943, 1973. 128
- Rolf F Barth and Balveen Kaur. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology : the c6, 9l, t9, rg2, f98, bt4c, rt-2 and cns-1 gliomas. *J Neurooncol*, 94 (3) :299–312, Sep 2009. doi : 10.1007/s11060-009-9875-7. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-009-9875-7>. 122
- G.C. Beck, N. Akgün, A. Rück, and R. Steiner. Design and characterisation of a tissue phantom system for optical diagnostics. *Lasers in Medical Science*, 13 :160–171, 1998. ISSN 0268-8921. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s101030050070>. 10.1007/s101030050070. 61
- Y. Bhanot, S. Rao, and R. V. Parmeshwaran. Radio-guided neurosurgery (rgns) : early experience with its use in brain tumour surgery. *Br J Neurosurg*, 21(4) : 382–388, Aug 2007. doi : 10.1080/02688690701491204. URL <http://dx.doi.org/10.1080/02688690701491204>. 1, 32
- H. J. Böhringer, E. Lankeau, F. Stellmacher, E. Reusche, G. Hüttmann, and A. Giese. Imaging of human brain tumor tissue by near-infrared laser coherence tomography. *Acta Neurochir (Wien)*, 151(5) :507–17 ; discussion 517, May 2009. doi : 10.1007/s00701-009-0248-y. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00701-009-0248-y>. 25, 33

- Tapan K Biswas and Tuan Minh Luu. In vivo mr measurement of refractive index, relative water content and t2 relaxation time of various brain lesions with clinical application to discriminate brain lesions. *The Internet Journal of Radiology*, 13, 2011. 61
- Noel Boens, Wenwu Qin, Nikola Basaric, Johan Hofkens, Marcel Ameloot, Jacques Pouget, Jean-Pierre Lefèvre, Bernard Valeur, Enrico Gratton, Martin vanden Ven, Norberto D Silva, Yves Engelborghs, Katrien Willaert, Alain Sillen, Garry Rumbles, David Phillips, Antonie J W G Visser, Arie van Hoek, Joseph R Lakowicz, Henryk Malak, Ignacy Gryczynski, Arthur G Szabo, Don T Krajcarski, Naoto Tamai, and Atsushi Miura. Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Anal Chem*, 79(5) :2137–2149, Mar 2007. doi : 10.1021/ac062160k. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ac062160k>. 156
- Matthieu Boffety. *Étude quantitative de la tomographie optique diffuse de luminescence. Application à la localisation de sources en imagerie moléculaire*. PhD thesis, École Centrale Paris, 2010. 26
- Frédéric Bogalhas. *Développement d'une sonde positon per-opératoire pour la localisation et l'excision des tumeurs cérébrales*. PhD thesis, Université Paris-Sud XI, 2009. 44
- P.-Y. Bondiau, F. Fauchon, E. Jadaud, and P. Paquis. [radiotherapy in adult glioblastomas]. *Neurochirurgie*, 56(6) :486–490, Dec 2010. doi : 10.1016/j.neuchi.2010.07.005. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.005>. 37
- S. Bonzom. *Développement et caractérisation d'une sonde radiosensible dédiée à l'assistance au traitement chirurgical des tumeurs cérébrales*. PhD thesis, Université Paris 7 Diderot, 2006. 44
- Stephen A Boppart. Optical coherence tomography : technology and applications for neuroimaging. *Psychophysiology*, 40(4) :529–541, Jul 2003. 33
- G. Bottiroli, A. C. Croce, D. Locatelli, R. Nano, E. Giombelli, A. Messina, and E. Benericetti. Brain tissue autofluorescence : an aid for intraoperative delineation of tumor resection margins. *Cancer Detect Prev*, 22(4) :330–339, 1998. 40, 43, 143, 146
- Pramod V Butte, Qiyin Fang, Javier A Jo, William H Yong, Brian K Pikul, Keith L Black, and Laura Marcu. Intraoperative delineation of primary brain tumors using time-resolved fluorescence spectroscopy. *J Biomed Opt*, 15(2) :027008, 2010. doi : 10.1117/1.3374049. URL <http://dx.doi.org/10.1117/1.3374049>. 48
- Pramod V Butte, Adam N Mamelak, Miriam Nuno, Serguei I Bannykh, Keith L Black, and Laura Marcu. Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors. *Neuroimage*, 54 Suppl 1 :S125–S135, Jan 2011. doi : 10.1016/

- j.neuroimage.2010.11.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.11.001>. 141
- C P Ceberg, A Brun, S B Kahl, M S Koo, B R Persson, and L G Salford. A comparative study on the pharmacokinetics and biodistribution of boronated porphyrin (bopp) and sulfhydryl boron hydride (bsh) in the rg2 rat glioma model. *Journal Of Neurosurgery*, 83(1) :86–92, 1995. 122
- O. Chinot, P. Soulier, and M. Frenay. Chemotherapy and targeted treatments in glioblastomas. *Neurochirurgie*, 56 :491–498, 2010. 37
- H.Y. Choi, S.Y. Ryu, J.Y. Kim, S.J. Park, B.H. Lee, and K.S. Chang. Microlensed dual-fiber probe for depth-resolved fluorescence measurements. *Opt Express*, 19 : 14172–14181, 2011. 60
- Y. G. Chung, J. A. Schwartz, C. M. Gardner, R. E. Sawaya, and S. L. Jacques. Diagnostic potential of laser-induced autofluorescence emission in brain tissue. *J Korean Med Sci*, 12(2) :135–142, Apr 1997. 34, 40, 43, 44, 146
- Anna C Croce, Sabrina Fiorani, Donata Locatelli, Rosanna Nano, Mauro Ceroni, Flavio Tancioni, Ermanno Giombelli, Eugenio Benericetti, and Giovanni Bottiroli. Diagnostic potential of autofluorescence for an assisted intraoperative delineation of glioblastoma resection margins. *Photochem Photobiol*, 77(3) :309–318, Mar 2003. 40, 43, 143, 146
- C. Daumas-Duport, B. Scheithauer, J. O’Fallon, and P. Kelly. Grading of astrocytomas. a simple and reproducible method. *Cancer*, 62(10) :2152–2165, Nov 1988. 13
- Scott C Davis, Brian W Pogue, Roger Springett, Christoph Leussler, Peter Mazurkewitz, Stephen B Tuttle, Summer L Gibbs-Strauss, Shudong S Jiang, Hamid Dehghani, and Keith D Paulsen. Magnetic resonance-coupled fluorescence tomography scanner for molecular imaging of tissue. *Rev Sci Instrum*, 79(6) :064302, Jun 2008. doi : 10.1063/1.2919131. URL <http://dx.doi.org/10.1063/1.2919131>. 34, 35
- N. de Tribolet. *Livre de Neurochirurgie - Les tumeurs gliales de l’adulte*. 2008. URL <http://campus.neurochirurgie.fr>. 12
- Nikolaos C Deliolanis, Randa Kasmieh, Thomas Wurdinger, Bakhos A Tannous, Khalid Shah, and Vasilis Ntziachristos. Performance of the red-shifted fluorescent proteins in deep-tissue molecular imaging applications. *J Biomed Opt*, 13(4) : 044008, 2008. doi : 10.1117/1.2967184. URL <http://dx.doi.org/10.1117/1.2967184>. 26
- E. Drakaki, S. Psycharakis, M. Makropoulou, and A.A. Serafetinides. Optical properties and chromophore concentration measurements in tissue-like phantoms. *Optics Communications*, 254(1-3) :40 – 51, 2005. ISSN 0030-4018. doi : DOI:

- 10.1016/j.optcom.2005.05.013. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0030401805005018>. 60, 61
- M. Sam Eljamel. Fluorescence image-guided surgery of brain tumors : explained step-by-step. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 5(4) :260–263, Dec 2008a. doi : 10.1016/j.pdpdt.2008.11.003. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2008.11.003>. 38
- M. Sam Eljamel. Brain photodiagnosis (pd), fluorescence guided resection (fgr) and photodynamic therapy (pdt) : past, present and future. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 5(1) :29–35, Mar 2008b. doi : 10.1016/j.pdpdt.2008.01.006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2008.01.006>. 38
- Sam Eljamel. Photodynamic applications in brain tumors : a comprehensive review of the literature. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 7(2) :76–85, Jun 2010. doi : 10.1016/j.pdpdt.2010.02.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.002>. 38
- D. Figarella-Branger, C. Bouvier, J. Moroch, S. Michalak, and F Burel-Vandenbos. [morphological classification of glioblastomas]. *Neurochirurgie*, 56(6) :459–463, Dec 2010a. doi : 10.1016/j.neuchi.2010.07.014. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.014>. 17, 29
- D. Figarella-Branger, C. Colin, A. Tchoghandjian, N. Baeza, and C. Bouvier. [glioblastomas : gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment]. *Neurochirurgie*, 56(6) :441–448, Dec 2010b. doi : 10.1016/j.neuchi.2010.07.010. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.010>. 14
- N. Filip, S. Iordache, A. Safoiu, and T. Ciurea. Autofluorescence imaging and magnification endoscopy. *World Journal of Gastroenterology*, 17 :9–14, 2011. 33
- Graziella Filippini, Chiara Falcone, Amerigo Boiardi, Giovanni Broggi, Maria G. Bruzzone, Dario Caldirolia, Rita Farina, Mariangela Farinotti, Laura Fariselli, Gaetano Finocchiaro, Sergio Giombini, Bianca Pollo, Mario Savoiardo, Carlo L. Solero, and Maria G. Valsecchi. Prognostic factors for survival in 676 consecutive patients with newly diagnosed primary glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 1 :79–87, 2008. 29
- D. Fontaine and P. Paquis. [glioblastoma : clinical, radiological and biological prognostic factors]. *Neurochirurgie*, 56(6) :467–476, Dec 2010. doi : 10.1016/j.neuchi.2010.07.008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.008>. 1, 6, 15, 27
- C. M. Gardner and A.J. Welch. private communication. *Biomeical Eng Program*, 1992. 107

- S C Gebhart, W C Lin, and A Mahadevan-Jansen. In vitro determination of normal and neoplastic human brain tissue optical properties using inverse adding-doubling. *Physics in Medicine and Biology*, 51(8), 2006. URL <http://stacks.iop.org/0031-9155/51/i=8/a=004>. 64, 66
- Bernard Gelebart. *Réflectance résolue dans le temps et dans l'espace appliquée à l'étude de milieux stratifiés : Résultats préliminaires sur fantômes optiques de tissus biologiques*. PhD thesis, Université Paris Nord, 1998. 64
- GFME. Gfme glioblastome association michèle esnault - <http://gfme.free.fr/>, 2010. URL gfme.free.fr/. 11
- R.G. Giovanelli. Reflection by semi-infinite diffusers. *Optics Acta*, 2 :153–162, 1955. 107
- S. Grand, V. Lefournier, A. Krainik, P. Bessou, I. Tropres, S. Chabardes, D. Hoffmann, and J-F. Le Bas. [mr and ct perfusion imaging of the brain : principles and clinical applications]. *J Radiol*, 88(3 Pt 2) :444–471, Mar 2007. 20, 22
- G. M. Hale and M. R. Querry. Optical constants of water in the 200-nm to 200-microm wavelength region. *Appl Opt*, 12(3) :555–563, Mar 1973. 66
- M. Hefti, G. von Campe, M. Moschopulos, A. Siegner, H. Looser, and H. Landolt. 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin ix fluorescence in high-grade glioma surgery. *SWISS MED WKLY*, 138 :180–185, 2008. 35
- L. Henyey and J. Greenstein. Diffuse radiation in the galaxy. *Astrophysical Journal*, 93 :70 – 93, 1941. 63
- Veronica Hollis. *Non-invasive monitoring of brain tissue temperature by near-infrared spectroscopy*. PhD thesis, University College London, 2002. 64
- B.L. Horecher. The absorption spectra of hemoglobin and its derivatives in the visible and near-infrared regions. *J.Biol. Chem.*, 148 :173–183, 1943. 23
- Esther Hulleman and Kristian Helin. Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res*, 94 :1–27, 2005. doi : 10.1016/S0065-230X(05)94001-3. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-230X\(05\)94001-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-230X(05)94001-3). 16
- D. Huttenberger, T. Gabrecht, G. Wagnières, B. Weber, A. Linder, H.-J. Foth, and L.Freitag. Autofluorescence detection of tumors in the human lung - spectroscopical measurements in situ, in an in vivo model and in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 5 :139–147, 2008. 26
- U. Iqbal, H. Albaghdadi, Y. Luo, M. Arbabi, C. Desvaux, T. Veres, D. Stanimirovic, and A. Abulrob. Molecular imaging of glioblastoma multiforme using anti-insulin-like growth factor-binding protein-7 single-domain antibodies. *Br J Cancer*, 103 (10) :1606–1616, Nov 2010. doi : 10.1038/sj.bjc.6605937. URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605937>. 35

- Andreas H Jacobs, Lutz W Kracht, Axel Gossmann, Maria A Rüger, Anne V Thomas, Alexander Thiel, and Karl Herholz. Imaging in neurooncology. *NeuroRx*, 2(2) :333–347, Apr 2005. doi : 10.1602/neurorx.2.2.333. URL <http://dx.doi.org/10.1602/neurorx.2.2.333>. 18, 19, 22
- S.L. Jacques, C.A. Altera, and S.A. Prahl. Angular dependence of he-ne laser light scattering by human dermis. *Laser in the Life Science*, 1 :309–333, 1987. 64
- Ville T. Keränen, Amanda I. Dayton, and Scott A. Prahl. Polyurethane phantoms with homogeneous and nearly homogeneous optical properties. In R. J. Nordstrom, editor, *SPIE Proceedings on Design and Performance Validation of Phantoms used in Conjunction with Optical Measurement of Tissue*, volume 7567, 2010. 60, 61, 68
- Marine Kervella. *Contribution à la modélisation et à la simulation numérique de la spectroscopie optique des tissus biologiques : application à l'imagerie moléculaire de fluorescence résolue en temps*. PhD thesis, Université d'Angers, 2008. 119
- Toyoyuki Kojima, Shin-Ichiro Kumita, Fumio Yamaguchi, Sunao Mizumura, Takayuki Kitamura, Tatsuo Kumazaki, and Akira Teramoto. Radio-guided brain tumorectomy using a gamma detecting probe and a mobile solid-state gamma camera. *Surg Neurol*, 61(3) :229–38 ; discussion 238, Mar 2004. doi : 10.1016/j.surneu.2003.07.015. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.surneu.2003.07.015>. 32
- Y. Kudo, K. Akita, T. Nakamura, A. Ogura, T. Makino, A. Tamagawa, K. Ozaki, and A. Miyakawa. A single optical fiber fluorometric device for measurement of intracellular ca^{2+} concentration : its application to hippocampal neurons in vitro and in vivo. *Neuroscience*, 50(3) :619–625, Oct 1992. 158
- Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition*. Springer Berlin / Heidelberg, 2006. 39
- Edward R Laws, Ian F Parney, Wei Huang, Fred Anderson, Angel M Morris, Anthony Asher, Kevin O Lillehei, Mark Bernstein, Henry Brem, Andrew Sloan, Mitchel S Berger, Susan Chang, and Glioma Outcomes Investigators. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma : data from the glioma outcomes project. *J Neurosurg*, 99(3) :467–473, Sep 2003. 13
- W.J. Lentz. Generating bessel functions in mie scattering calculations using continued fraction. *Appl Opt*, 15 :668–671, 1976. 64
- A. Liebert, H. Wabnitz, R. Erdmann, M. Moller, R. Macdonald, H. Rinneberg, A. Villringer, and J. Steinbrink. Non-invasive detection of fluorescence from exogenous chromophores in the adult human brain. *NeuroImage*, 31 :600–608, 2006. 24

- A. Liebert, P. Sawosz, M. Kacprzak, W. Wiegl, M. Botwicz, J. Maczewska, K. Fronczeska, E. Mavner-Zawadzka, L. Krolicki, and R. Maniewski. Assessment of inflow and washout of indocyanine green in the adult human brain by monitoring of diffuse reflectance at large source-detector separation. *J Biomed Opt*, 16, 2011. 24
- W. C. Lin, S. A. Toms, M. Motamedi, E. D. Jansen, and A. Mahadevan-Jansen. Brain tumor demarcation using optical spectroscopy ; an in vitro study. *J Biomed Opt*, 5(2) :214–220, Apr 2000. doi : 10.1117/1.429989. URL <http://dx.doi.org/10.1117/1.429989>. 34, 43, 49
- W. C. Lin, S. A. Toms, M. Johnson, E. D. Jansen, and A. Mahadevan-Jansen. In vivo brain tumor demarcation using optical spectroscopy. *Photochem Photobiol*, 73(4) :396–402, Apr 2001. 44, 49
- D. Lindner, C. Trantakis, S. Arnold, A. Schmitgen, J. Schneider, and J. Meixensberger. Neuronavigation based on intraoperative 3d-ultrasound during tumor resection. *International Congress Series*, 1281 :815–820, 2005. 1, 32
- Quan Liu, Gerald Grant, Jianjun Li, Yan Zhang, Fangyao Hu, Shuqin Li, Christy Wilson, Kui Chen, Darell Bigner, and Tuan Vo-Dinh. Compact point-detection fluorescence spectroscopy system for quantifying intrinsic fluorescence redox ratio in brain cancer diagnostics. *Journal Of Biomedical Optics*, 16(3) :037004, 2011. ISSN 1560-2281. URL <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=21456877&lang=fr&site=ehost-live>. 60, 146, 168
- M. Lonjon, L. Mondot, N. Lonjon, and S. Chanalet. [clinical factors in glioblastoma and neuroradiology]. *Neurochirurgie*, 56(6) :449–454, Dec 2010. doi : 10.1016/j.neuchi.2010.07.016. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.016>. 13, 17, 18
- David N Louis, Hiroko Ohgaki, Otmar D Wiestler, Webster K Cavenee, Peter C Burger, Anne Jouvet, Bernd W Scheithauer, and Paul Kleihues. The 2007 who classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2) : 97–109, Aug 2007. doi : 10.1007/s00401-007-0243-4. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>. 13
- S. J. Madsen, M. S. Patterson, and B. C. Wilson. The use of india ink as an optical absorber in tissue-simulating phantoms. *Phys Med Biol*, 37(4) :985–993, Apr 1992. 61
- Y. Malthiéry and F. Savagner. Métabolisme  nerg tique de la cellule cancéreuse : exemple des tumeurs endocrines riches en mitochondries. *Annales d'endocrinologie*, 67 :205–213, 2006. 146, 167
- Laura Marcu, Reid C. Thompson, Smita Garde, Mark Sedrak, Keith L. Black, and William H. Yong. Time-resolved fluorescence spectroscopy of human brain tumors. *Proc. SPIE 4613*, 2002. 47

- Laura Marcu, Javier A Jo, Pramod V Butte, William H Yong, Brian K Pikul, Keith L Black, and Reid C Thompson. Fluorescence lifetime spectroscopy of glioblastoma multiforme. *Photochem Photobiol*, 80 :98–103, 2004. doi : 10.1562/2003-12-09-RA-023.1. URL <http://dx.doi.org/10.1562/2003-12-09-RA-023.1>. 26, 34, 40, 44, 48
- Alida Mazzoli, Roberto Munaretto, and Lorenzo Scalise. Preliminary results on the use of a noninvasive instrument for the evaluation of the depth of pigmented skin lesions : numerical simulations and experimental measurements. *Lasers in Medical Science*, 25 :403–410, 2010. 60
- J. McGinty, N.P. Gallethy, C. Dunsby, I. Munro, D.S. Elson, J. Requejo-Isidoro, P. Cohen, R. Ahmad, A. Forsyth, A.V. Thillainayagam, M.A.A. Neil, P.M.W. French, and G.W. Stamp. Wide-field fluorescence lifetime imaging of cancer. *Biomedical Optics Express*, 1 :627–640, 2010. 26
- P. Menei and P. Metellus. [surgical treatment of glioblastomas]. *Neurochirurgie*, 56(6) :477–482, Dec 2010. doi : 10.1016/j.neuchi.2010.07.015. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.015>. 19, 29, 30
- M.C. Schwab H.M. Froelich S. Jiang-Z. Li T.D. Tosteson S.P. Poplack P.A. Kaufman B.W. Pogue K.D. Paulsen M.G. Pakalniski, W.A. Wells. Tumor angiogenesis change estimated by diffuse optical spectroscopy tomography : Demonstrated correlation in women undergoing neoadjuvant chemotherapy for invasive breast cancer. *Radiology*, 259 :365–374, 2011. 24
- Theodore Moffitt, Yin-Chu Chen, and Scott A. Prahl. Preparation and characterization of polyurethane optical phantoms. *Journal of Biomedical Optics*, 2006. 60
- Mette Mogensen, Thomas Martini Jørgensen, Lars Thrane, Birgit Meinecke Nürnberg, and Gregor Borut Ernst Jemec. Improved quality of optical coherence tomography imaging of basal cell carcinomas using speckle reduction. *Exp Dermatol*, 19(8) :e293–e295, Aug 2010. doi : 10.1111/j.1600-0625.2009.00979.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00979.x>. 25
- B. Montcel. *Tomographie optique diffuse résolue en temps : Applications fonctionnelles en neurosciences*. PhD thesis, Université Louis Pasteur, 2005. 23
- Xavier Montet, Vasilis Ntziachristos, Jan Grimm, and Ralph Weissleder. Tomographic fluorescence mapping of tumor targets. *Cancer Res*, 65(14) :6330–6336, Jul 2005. doi : 10.1158/0008-5472.CAN-05-0382. URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0382>. 35
- S. Mottin, editor. *Lasers et technologies femtosecondes*. Publications de l'Université Saint-Etienne, 2005. 23

- Stéphane Mottin, Pierre Laporte, and Raymond Cespuglio. Inhibition of nadh oxidation by chloramphenicol in the freely moving rat measured by picosecond time-resolved emission spectroscopy. *J Neurochem*, 84(4) :633–642, Feb 2003. 158
- J. Richter N. Haj-Hosseini, S. Andersson-Engels, and K. Wardell. Photobleaching behavior of protoporphyrin ix during 5-aminolaevulinic acid marked glioblastoma detection. *Proc. SPIE*, 7161, 2009. 35
- Hiroki Namba, Tsutomu Tokuyama, Naoki Yokota, Naoto Sakai, Tokutaro Tanaka, Seiji Yamamoto, Susumu Terakawa, Baigalmaa Tsagaan, and Keiichi Abe. Image-guided surgery for gliomas. In Tetsuo Kanno and Yoko Kato, editors, *Minimally Invasive Neurosurgery and Multidisciplinary Neurotraumatology*, pages 22–28. Springer Japan, 2006. ISBN 978-4-431-28576-2. URL http://dx.doi.org/10.1007/4-431-28576-8_4. 10.1007/4-431-28576-8_4. 32
- Stanislas Ulam Nicholas Metropolis. The monte carlo method. *Journal of the American Statistical Association*, 44 :335–341, 1949. 94
- Linda T Nieman, Marko Jakovljevic, and Konstantin Sokolov. Compact beveled fiber optic probe design for enhanced depth discrimination in epithelial tissues. *Opt Express*, 17(4) :2780–2796, Feb 2009. 60
- Christopher Nimsy, Oliver Ganslandt, Michael Buchfelder, and Rudolf Fahlbusch. Intraoperative visualization for resection of gliomas : the role of functional neuronavigation and intraoperative 1.5 t mri. *Neurol Res*, 28(5) :482–487, Jul 2006. doi : 10.1179/016164106X115125. URL <http://dx.doi.org/10.1179/016164106X115125>. 1, 31
- Paola Di Ninni, Fabrizio Martelli, and Giovanni Zaccanti. The use of india ink in tissue-simulating phantoms. *Opt Express*, 18(26) :26854–26865, Dec 2010. 68
- H. Obrig and Vilringer. Beyond the visible - imaging the human brain with light. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 23 :1–18, 2003. 24
- M. Ohta, T. Iwaki, T. Kitamoto, I. Takeshita, J. Tateishi, and M. Fukui. Mib1 staining index and scoring of histologic features in meningioma. indicators for the prediction of biologic potential and postoperative management. *Cancer*, 74(12) :3176–3189, Dec 1994. 28
- Julie Hanson Ostrander, Christine M McMahon, Siya Lem, Stacy R Millon, J Quincy Brown, Victoria L Seewaldt, and Nimmi Ramanujam. Optical redox ratio differentiates breast cancer cell lines based on estrogen receptor status. *Cancer Research*, 70(11) :4759–4766, 2010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460512>. 167
- N. Palmer, G.M. ; Ramanujam. Monte-carlo-based model for the extraction of intrinsic fluorescence from turbid media. *J Biomed Opt*, 13, 2008. 100, 105

- Pier Paolo Pandolfi. Breast cancer — loss of pten predicts resistance to treatment. *New England Journal of Medicine*, 351(22) :2337–2338, 2004. doi : 10.1056/NEJMcibr043143. URL <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMcibr043143>. 16
- Alexandru Pascu, Mihaela Oana Romanitan, Josè-Maria Delgado, Leon Danaila, and Mihail-Lucian Pascu. Laser-induced autofluorescence measurements on brain tissues. *Anat Rec (Hoboken)*, 292(12) :2013–2022, Dec 2009. doi : 10.1002/ar.21034. URL <http://dx.doi.org/10.1002/ar.21034>. 26, 40, 43, 47, 151
- C.R. ; Schwartz R. A. ; Williams M. ; El-Naggar E. ; Gillenwater A. ; Richards-Kortum R. Pavlova, I. ; Weber. Monte carlo model to describe depth selective fluorescence spectra of epithelial tissue. *J. Biomed Opt.*, 13, 2008. 26, 100
- L. S. ; Drezek R. Pfefer, T. J. ; Matchette. Influence of illumination-collection geometry on fluorescence spectroscopy in multi-layer tissu. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 42 :669–673, 2004. 100, 105
- T. Joshua Pfefer, L. Stephanie Matchette, Amanda M Ross, and Marwood N Ediger. Selective detection of fluorophore layers in turbid media : the role of fiber-optic probe design. *Opt Lett*, 28(2) :120–122, Jan 2003. 60, 61, 117, 163
- V.A. ; Kornienko V.N. ; Pronin I.N. ; Kobiakov G.L. ; Kalinin P.L. ; Gavrilov A.G. ; Stummer W. ; Golbin D.A. ; Zelenkov P. V. Potapov A.A. ; Usachev D.J. ; Loshakov, V.A. ; Cherekaev. First experience in 5-ala fluorescence-guided and endoscopically assisted microsurgery of brain tumors. *Medical Laser Application*, 23 :202–208, 2008. 33, 36
- Scott Prahl. *Everything I think you should know about Inverse Adding-Doubling*, February 2010. 69, 173
- Émilie Péry. *Spectroscopie bimodale en diffusion élastique et autofluorescence résolue spatialement : instrumentation, modélisation des interactions lumière-tissus et application à la caractérisation de tissus biologiques ex vivo et in vivo pour la détection de cancers*. PhD thesis, Université de Nancy, 2007. 26, 119
- Zhiyu Qian, Sundar Victor, Yueqing Gu, Cole Giller, and Hanli Liu. Look-ahead distance of a fiber probe used to assist neurosurgery : Phantom and monte carlo study. *Opt. Express*, 11(16) :1844–1855, Aug 2003. doi : 10.1364/OE.11.001844. URL <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-11-16-1844>. 60
- R Development Core Team. *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2010. URL <http://www.R-project.org/>. ISBN 3-900051-07-0. 131
- N. Ramanujam. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*, 2(1-2) :89–117, 2000. 40

- S. Ramstein. *Spectroscopie résolue en temps par laser blanc femtoseconde pour l'exploration fonctionnelle in vivo du métabolisme énergétique cérébral*. PhD thesis, Université de St-Etienne, 2004. 23
- K. Prahlad Rao, S. Radhakrishnan, and M. Ramasubba Reddy. Brain tissue phantoms for optical near infrared imaging. *Exp Brain Res*, 170(4) :433–437, Apr 2006. doi : 10.1007/s00221-005-0242-4. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00221-005-0242-4>. 60
- E. Reddi. Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. *Photochem Photobiol*, 37 :189–195, 1997. 38
- T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859) :105–111, Nov 2001. doi : 10.1038/35102167. URL <http://dx.doi.org/10.1038/35102167>. 14
- P. Burger M.S. Blackwood V.C. Arena J.C. Gilder R.G. Selker, W.R. Shapiro. The brain tumor cooperative group nih trial 87-01 :a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine vs surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine. *Neurosurgery*, 51 :343–355, 2002. 37
- RYCAJAL@aol.com. *Neuroscience et comportement - Partie 1 : Neuroanatomie fonctionnelle - Chapitre 7 L'étage sus-tentorial*. 2010. URL <http://www.neur-one.fr/>. 8, 9
- S. L. Jacques A. J. Welch S. A. Prahl, M. Keijzer. A monte carlo model of light propagation in tissue. *SPIE Institute Series*, 5 :102–111, 1989. 95, 96, 107
- H.G. de Chatellus S. Ramstein S. Mottin, B. Montcel. Functional white-laser imaging to study brain oxygen uncoupling/recoupling in songbirds. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 31 :393–400, 2011. 23
- Ariya Saraswathy, R. S. Jayasree, K. V. Baiju, Arun Kumar Gupta, and V. P Mahadevan Pillai. Optimum wavelength for the differentiation of brain tumor tissue using autofluorescence spectroscopy. *Photomed Laser Surg*, 27(3) :425–433, Jun 2009. doi : 10.1089/pho.2008.2316. URL <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2008.2316>. 26, 40, 43, 47, 143
- F.E.W. Schmidt. *Development of a time-resolved optical tomography system for neonatal brain imaging*. PhD thesis, University of London, 1999. 24
- Jens P Schneider, Christos Trantakis, Matthias Rubach, Thomas Schulz, Juergen Dietrich, Dirk Winkler, Christof Renner, Ralf Schober, Kathrin Geiger, Oana Brosteanu, Claus Zimmer, and Thomas Kahn. Intraoperative mri to guide the resection of primary supratentorial glioblastoma multiforme—a quantitative radiological analysis. *Neuroradiology*, 47(7) :489–500, Jul 2005. doi : 10.1007/s00234-005-1397-1. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00234-005-1397-1>. 31

- Tormod Selbekk, Reidar Brekken, Ole Solheim, Stian Lydersen, Toril A N Hernes, and Geirmund Unsgaard. Tissue motion and strain in the human brain assessed by intraoperative ultrasound in glioma patients. *Ultrasound Med Biol*, 36(1) :2–10, Jan 2010. doi : 10.1016/j.ultrasmedbio.2009.05.007. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2009.05.007>. 32
- Zita A Sibenaller, Arnold B Etame, Mushtaq M Ali, Manali Barua, Terry A Braun, Thomas L Casavant, and Timothy C Ryken. Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system. *Neurosurg Focus*, 19(4) :E1, Oct 2005. 122
- R. Siebert, Y. Charon B. Leh, M. Collado-Hilly, M.-A. Duval, L. Menard, F.P. Monnet, and P. Varlet. Development of an autofluorescence probe designed to help brain tumor removal : study on an animal model. In RJ Nordstrom, editor, *PHOTONIC THERAPEUTICS AND DIAGNOSIS VI*, volume 7548 of *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*, 1000 20TH ST, PO BOX 10, BELLINGHAM, WA 98227-0010 USA, 2010. SPIE, SPIE-INT SOC OPTICAL ENGINEERING. 147
- M.C. Skala, G.M. Palmer, C. Zhu, Q. Liu, K.M. Vrostsos, C.L. Marshek-Stone, A. Gendron-Fitzpatrick, and N. Ramanujam. An investigation of fiber-optic probe designs for optical spectroscopic diagnosis of epithelial pre-cancer. *Laser Surg Med*, 34 :25–38, 2004. 26, 105, 116, 117
- G.V. Gelikonov F.I. Feldchtein N.M. Beach M.A. King V.M. Gelikonov A.M. Sergeev D.H. Reitze S.N. Roper, M.D. Moores. In vivo detection of experimentally induced cortical dysgenesis in the adult rat neocortex using optical coherence tomography. *Journal of Neuroscience Methods*, 80 :91–98, 1998. 25
- John Strasswimmer, Mark C Pierce, B. Hyle Park, Victor Neel, and Johannes F de Boer. Polarization-sensitive optical coherence tomography of invasive basal cell carcinoma. *J Biomed Opt*, 9(2) :292–298, 2004. doi : 10.1117/1.1644118. URL <http://dx.doi.org/10.1117/1.1644118>. 25
- Walter Stummer, Uwe Pichlmeier, Thomas Meinel, Otmar Dieter Wiestler, Friedhelm Zanella, Hans-Jürgen Reulen, and A. L. A-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma : a randomised controlled multicentre phase iii trial. *Lancet Oncol*, 7(5) :392–401, May 2006. 1, 6, 35
- Roger Stupp, Warren P Mason, Martin J van den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin J B Taphoorn, Karl Belanger, Alba A Brandes, Christine Marosi, Ulrich Bogdahn, Jürgen Curschmann, Robert C Janzer, Samuel K Ludwin, Thierry Gorlia, Anouk Allgeier, Denis Lacombe, J. Gregory Cairncross, Elizabeth Eisenhauer, René O Mirimanoff, European Organisation for Research, Treatment of Cancer Brain Tumor, Radiotherapy Groups, and National Cancer Institute of Canada

- Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10) :987–996, Mar 2005. 29
- Yinghua Sun, Nisa Hatami, Matthew Yee, Jennifer Phipps, Daniel S Elson, Fredric Gorin, Rudolph J Schrot, and Laura Marcu. Fluorescence lifetime imaging microscopy for brain tumor image-guided surgery. *J Biomed Opt*, 15(5) :056022, 2010. doi : 10.1117/1.3486612. URL <http://dx.doi.org/10.1117/1.3486612>. 26, 33, 48
- J. Swartling, A. Pifferi, A.M.K. Enejder, and S. Andersson-Engels. Accelerated monte carlo models to simulate fluorescence spectra from layered tissues. *J. Opt.Soc. A*, 20 :714–727, 2003. 100
- Q. Fang A. Brightwell M. Carnohan G. Cottone R. Ross L.R. Jones L. Marcu T. Papaioannou, N.W. Preyer. Effects of fiber-optic probe design and probe-to-target distance on diffuse reflectance of turbid media : an experimental and computational study at 337 nm. *Appl Opt*, 43 :2846–2860, 2004. 116
- Steven A Toms, Wei-Chiang Lin, Robert J Weil, Mahlon D Johnson, E. Duco Jansen, and Anita Mahadevan-Jansen. Intraoperative optical spectroscopy identifies infiltrating glioma margins with high sensitivity. *Neurosurgery*, 61(1 Suppl) :327–35; discussion 335–6, Jul 2007. doi : 10.1227/01.neu.0000279226.68751.21. URL <http://dx.doi.org/10.1227/01.neu.0000279226.68751.21>. 26, 49
- Cyril Touboul, Jean-David Zeitoun, and Jérémie Lefevre. *Cancérologie 2e édition*. VG, 2009. 5, 11, 12
- K. Umeoka, N. Sanno, K. Oyama, S. Tahara, R. Kurotani, S. Ikuyama, M. Nakashima, T. Watanabe, R. Y. Osamura, and A. Teramoto. Immunohistochemical analysis of rcas1 in human pituitary adenomas. *Mod Pathol*, 14(12) :1232–1236, Dec 2001. doi : 10.1038/modpathol.3880467. URL <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3880467>. 29
- H.C. van de Hulst. *Multiple light scattering*. Academic Press, 1980. 106, 107
- D. C G De Veld, M. J H Witjes, H. J C M Sterenborg, and J. L N Roodenburg. The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. *Oral Oncol*, 41(2) :117–131, Feb 2005. doi : 10.1016/j.oraloncology.2004.07.007. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2004.07.007>. 141
- Karthik Vishwanath and Mary-Ann Mycek. Time-resolved photon migration in bilayered tissue models. *Opt Express*, 13(19) :7466–7482, Sep 2005. 60, 61
- A.J.W.G. Visser and O.J. Rolinski. *Basic Photonics*. 2010. 40
- Minh Hong Vu-Thi. *Développement d'une sonde per-opératoire basée sur la détection d'autofluorescence pour l'assistance au traitement chirurgical des tumeurs cérébrales*. PhD thesis, Université Paris-Sud XI, 2008. 45, 47, 51, 57, 58, 62, 64, 73, 100, 108, 118, 171, 180

- G. A. Wagnières, W. M. Star, and B. C. Wilson. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem Photobiol*, 68(5) :603–632, Nov 1998. 25, 40
- B.W. Wang, Y. Tang, X.L. Zhang, and S.Z. Fan. Optimization of fiber optic probe distance for biomedical spectroscopy. *Proc. SPIE*, 4845, 2010a. 116
- Lihong Wang. *Monte Carlo Modeling of light transport in multi-layer tissues in standard C*, 1998. 106, 107
- Lihong Wang, Steven L. Jacques, and Liqiong Zheng. Mcml - monte carlo modeling of light transport in multi-layer tissues. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 47 :131–146, 1995. 95, 96, 99, 118
- Xinghua Wang, Srabani Bhaumik, Qing Li, V. Paul Staudinger, and Siavash Yazdanfar. Compact instrument for fluorescence image-guided surgery. *J Biomed Opt*, 15 (2) :020509, 2010b. doi : 10.1117/1.3378128. URL <http://dx.doi.org/10.1117/1.3378128>. 34
- A.J. Welch, C. M. Gardner, R. Richards-Kortum, E. Chan, G. Criswell, J. Pfefer, and S. Warren. Propagation of fluorescent light. *Laser Surg Med*, 21 :166–178, 1997. 100
- World Health Organisation WHO. <http://globocan.iarc.fr/>, 2008. URL <http://globocan.iarc.fr/>. 1, 6, 11
- Y. Wu and J.Y. Qu. Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissues. *Journal Of Biomedical Optics*, 11, 2006. 128, 146
- Hai Yan, Darell D Bigner, Victor Velculescu, and D. Williams Parsons. Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. *Cancer Res*, 69(24) :9157–9159, Dec 2009a. doi : 10.1158/0008-5472.CAN-09-2650. URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2650>. 15
- Hai Yan, D. Williams Parsons, Genglin Jin, Roger McLendon, B. Ahmed Rasheed, Weishi Yuan, Ivan Kos, Ines Batinic-Haberle, Siân Jones, Gregory J Riggins, Henry Friedman, Allan Friedman, David Reardon, James Herndon, Kenneth W Kinzler, Victor E Velculescu, Bert Vogelstein, and Darell D Bigner. Idh1 and idh2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 360(8) :765–773, Feb 2009b. doi : 10.1056/NEJMoa0808710. URL <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>. 15
- Y. L. Yang, Y. M. Ye, F. M. Li, Y. F. Li, and P. Z. Ma. Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin. *Lasers Surg Med*, 7(6) :528–532, 1987. 141
- A N Yaroslavsky, P C Schulze, I V Yaroslavsky, R Schober, F Ulrich, and H-J Schwarzmair. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. *Physics in Medicine and Biology*, 47(12), 2002. URL <http://stacks.iop.org/0031-9155/47/i=12/a=305>. 64, 66

- M. Zenzinger, M.H. Götz, S. Fischer, and J. Bille. Confocal fluorescence microscopy for minimal-invasive tumor diagnosis. *Applied Physics B : Lasers and Optics*, 70 :281–286, 2000. ISSN 0946-2171. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s003400050046>. 10.1007/s003400050046. 35
- W. Zhong, J.P. Celli, I. Rizvia, Z. Mai, B.Q. Spring, S.H. Yun, and T. Hasan. In vivo high-resolution fluorescence microendoscopy for ovarian cancer detection and treatment monitoring. *British Journal of Cancer*, 101 :2015–2022, 2009. 33
- Heling Zhou, Kate Luby-Phelps, Bruce E Mickey, Aryn A Habib, Ralph P Mason, and Dawen Zhao. Dynamic near-infrared optical imaging of 2-deoxyglucose uptake by intracranial glioma of athymic mice. *PLoS One*, 4(11) :e8051, 2009. doi : 10.1371/journal.pone.0008051. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008051>. 34
- C. Zhu, T.M. Breslin, J. Harter, and N. Ramanujam. Model based and empirical spectral analysis for the diagnosis of breast cancer. *Opt Express*, 16 :14961–14978, 2008. 100

Résumé :

L'objectif de ce travail de thèse est de développer une sonde optique dédiée à aider le neurochirurgien à parfaire la résection des glioblastomes. Ce type de tumeurs est le plus fréquent et le plus agressif. Améliorer son exérèse permettrait d'augmenter la durée de survie moyenne du patient.

Une exposé des tumeurs cérébrales et de leur prise en charge médicale introduit cette thèse. Le développement comporte trois volets. En premier lieu, le dispositif expérimental et la sonde utilisée fibrée sont caractérisés. Pour ce faire, des fantômes optiques calibrés aux géométries variées ont été conçus. Après validation, ils ont permis de définir la profondeur détectée en fonction de la variation de coefficients optiques.

Deuxièmement, un programme de simulation Monte-Carlo a été développé et adapté au dispositif de mesures. Grâce aux mesures sur fantômes, ce programme a été validé. Cet outil permet un gain de temps considérable dans le processus de définition des propriétés de détection d'une sonde en fonction de sa géométrie.

Enfin, dans le but d'identifier des indicateurs potentiels du tissu cérébral tumoral, une campagne de mesures sur modèle animal a été menée. Une étude spectroscopique approfondie a été effectuée sur des échantillons frais ex vivo. Plusieurs indices caractéristiques des tissus tumoraux ont été mis en évidence grâce à ce travail.

Mots clés : fluorescence endogène, tumeur cérébrale, glioblastome, fantômes optiques, simulation de propagation des photons, profondeur de détection

Abstract :

This work is dedicated to the development of an optical probe, which aimed at helping the neurosurgeon while he is operating on glioblastoma. These brain tumours are the most frequent and aggressive. If the resection of tumourous tissue is improved, the patient will live longer.

As an introduction, the different types of brain tumours and the way they are taking care of are explained. The development is divided in three parts. First, the experimental setup and the home-made fibre-probe are characterized, thanks to optical calibrated phantoms. The depth of detection has been determined for several optical coefficients and phantom geometries.

A dedicated simulation program has been developed. Using the phantom measurements, this program has been validated. The time-consuming process of depth-detection definition with phantoms can be replaced by the use of the program.

At last, a study on an animal model has been initiated, to identify indicators of tumourous brain tissue. A spectroscopic study has been planed on fresh ex-vivo rat brain slices. Several tumourous indicators have been highlighted within this study.

Keywords : endogenous fluorescence, brain tumour, glioblastoma, optical phantoms, simulation program, depth detection
