

Titre: Caméra hyperspectrale d'imagerie en fluorescence pour guider
Title: l'exérèse de tumeurs du cerveau

Auteur: Yoann Gosselin
Author:

Date: 2014

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Gosselin, Y. (2014). Caméra hyperspectrale d'imagerie en fluorescence pour
guider l'exérèse de tumeurs du cerveau [Mémoire de maîtrise, École
Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1508/>
Citation:

Document en libre accès dans PolyPublie Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1508/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Frédéric Leblond, & Olivier Daigle
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CAMÉRA HYPERSPECTRALE D'IMAGERIE EN FLUORESCENCE POUR GUIDER
L'EXÉRÈSE DE TUMEURS DU CERVEAU

YOANN GOSSELIN

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

CAMÉRA HYPERSPECTRALE D'IMAGERIE EN FLUORESCENCE POUR GUIDER
L'EXÉRÈSE DE TUMEURS DU CERVEAU

présenté par : GOSSELIN Yoann

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

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

M. KADOURY Samuel, Ph.D, président

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

M. DAIGLE Olivier, Ph.D, membre et codirecteur de recherche

M. LESAGE Frédéric, Ph.D, membre

REMERCIEMENTS

Je veux tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Frederic Leblond, de m'avoir pris comme premier étudiant dans son laboratoire à Polytechnique Montréal. Merci de m'avoir fait confiance au cours de ma maîtrise et durant l'organisation du laboratoire. Merci pour avoir non seulement pris à cœur la progression de mon projet de maîtrise, mais aussi mon développement en tant qu'ingénieur dans le domaine de l'optique biomédicale. Je tiens également à remercier mes collègues au Laboratoire de Radiologie Optique, Andréanne Goyette, Jeanne Mercier et plus récemment Joannie Desroches, Michael Jermyn et Julien Pichette pour leur support académique et moral. Merci aussi à Amélie St-Georges, étudiante au doctorat sous la direction de Thomas Gervais, pour avoir répondu à mes nombreuses questions avec le sourire.

Je tiens aussi à remercier mon co-directeur, Olivier Daigle, ainsi que toute l'équipe chez Nüvü Cameras pour m'avoir donné la chance de travailler sur un projet si passionnant. Merci de m'avoir aidé à progresser au courant de ma maîtrise et de m'avoir accueilli lors de différentes activités, dîners et conférences.

Je tiens également à remercier les autres laboratoires du Département de génie physique. Merci à Gabriel Éthier-Majcher et Philippe St-Jean du laboratoire de Sébastien Francoeur pour les conversations de bureau et le *pool* de hockey. Merci à l'équipe de laboratoire de Caroline Boudoux pour leur support, le *journal club* et les innombrables emprunts de matériel optique. Merci à l'équipe du laboratoire de Nicolas Godbout pour leur aide au niveau de la programmation et à Elyes Khettal pour le support moral durant nos études. Merci au laboratoire de Frederic Lesage pour leur aide au niveau logiciel et optique.

Finalement, je tiens à remercier nos collaborateurs au Dartmouth College, principalement à Pablo Valdés et à Kolbein Kolste, pour leur aide durant diverses expériences optiques. Merci pour ces longues heures de compagnie durant la préparation de centaines de fantômes optiques et durant l'acquisition de milliers de spectres. Merci de votre soutien.

RÉSUMÉ

Les biomarqueurs ayant la capacité de s'accumuler spécifiquement dans une tumeur et d'être imaginés durant la chirurgie ouvrent plusieurs avenues de traitement pour différents types de cancer. Dans le cas du cancer du cerveau, la protoporphyrine IX (PpIX) a montré une accumulation spécifique dans les gliomes de haut grade (HGG) et ce en assez grande quantité pour être facilement détectée durant la chirurgie. L'utilisation de ce marqueur durant la chirurgie a augmenté l'efficacité de l'exérèse de ces tumeurs, ce qui augmente le pronostic et la qualité de vie des patients. Cependant, les méthodes de détection qualitatives (vFI) utilisées durant la chirurgie manquent de sensibilité pour détecter les marges des tumeurs et les gliomes de bas grades, même avec l'utilisation de marqueurs fluorescents. De façon à guider plus efficacement l'exérèse, une sonde spectroscopique a été développée par le Dr. Brian Wilson de manière à détecter de façon plus sensible et plus spécifique le signal fluorescent accumulé dans les tumeurs du cerveau durant la chirurgie. Cette sonde s'est montrée plus efficace que l'utilisation seule d'un microscope neurochirurgical pour la classification de tissus cancéreux lors de l'exérèse. Cependant, une telle sonde peut venir déranger le plan de travail du chirurgien et a un champ de vue très limité. Pour ces raisons, un système en champ large pour la quantification de la fluorescence (qFI) durant la chirurgie a été développé au Dartmouth College avec le prof. Frederic Leblond. Un tel système vient se connecter au microscope neurochirurgical utilisé en salle d'opération (OR) et permet la détection hyperspectrale de l'entièreté du champ de vue imaginé par le microscope. Ainsi, on peut obtenir en quelques secondes durant la chirurgie un spectre de fluorescence corrigé par rapport aux propriétés optiques du tissu pour chacun des pixels de l'image associée au champ de vue. Les spectres de fluorescence obtenus peuvent ensuite être associés à une concentration de biomarqueur dans le tissu imaginé. Bien qu'un tel système se montre plus sensible que la simple utilisation d'un microscope neurochirurgical et ce sans venir déranger le plan de travail du chirurgien, sa sensibilité est moindre que celle de la sonde décrite plus haut.

Ainsi, dans le cadre de cette maîtrise, un système hyperspectral pour la quantification de la fluorescence en neurochirurgie a été développé pour imager l'entièreté du champ de vue du chirurgien tout en ayant une sensibilité semblable à celle de la sonde spectroscopique présentée précédemment. Pour ce faire, le système a été conçu, développé et caractérisé à Polytechnique

Montréal dans le Laboratoire de Radiologie Optique en collaboration avec Nüvü Camēras, une compagnie ayant développé la caméra la plus sensible au monde en imagerie à faible flux lumineux. Le système, intégrant la caméra EMCCD hNü de Nüvü Caméra, est connecté au microscope neurochirurgical à l'aide de composantes d'optiques personnalisées et d'un guide d'imagerie de fibres optiques. Une interface logicielle personnalisée a été développée de manière à contrôler et synchroniser les différentes composantes du système.

Tout d'abord, de façon à évaluer le besoin en sensibilité en neurochirurgie, le détecteur EMCCD a été comparé au détecteur utilisé dans le système de détection de la fluorescence en champ large développé au Dartmouth College. Un indice $= RSB/t_{exp}$, où le RSB est le ratio signal sur bruit et t_{exp} est le temps d'exposition est utilisé pour comparer les deux détecteurs. À de faibles concentrations de chromophores, la caméra EMCCD a obtenu un indice I jusqu'à 470 fois plus élevé que le détecteur utilisé dans le système qFI de Dartmouth College. Ceci démontre que des détecteurs moins bruités augmentent la qualité des images et la vitesse d'acquisition dans un contexte neurochirurgical.

Ensuite, le système développé à Polytechnique Montréal intégrant la caméra EMCCD est comparé au système qFI développé à Dartmouth. Des fantômes fluorescents sont imaginés simultanément avec les deux systèmes à travers un microscope neurochirurgical. Pour les mêmes temps d'intégration, le système développé dans le cadre de cette maîtrise a détecté des concentrations de biomarqueur jusqu'à 25 fois plus faibles que celles détectées par le système le plus sensible de l'état de l'art. Un tel système pourrait donc aider de façon plus efficace à guider l'exérèse de tumeurs du cerveau, en quantifiant de façon plus sensible et plus spécifique les biomarqueurs utilisés en neurochirurgie.

ABSTRACT

Biomarkers that are specific to malignancies and can be imaged during intraoperative procedures hold significant promises to the treatment of disease. For brain cancer, protoporphyrin IX (PpIX) has shown a specific accumulation in high grade gliomas (HGG) in sufficient concentration to be easily detected during surgery. The use of this marker during surgery has shown to improve the completeness of tumor resection, which translates to statistically significant increase in progression-free survival on patients. However, the visual assessment of fluorescence intensity (vFI) under the surgical microscope lacks sensitivity in order to detect invasive tumor margins and low grade gliomas (LGG), even with the use of specific biomarkers. In order to help surgical guidance in tumor resection, a point detection spectroscopic probe was developed by Dr. Brian Wilson in order to detect the fluorescent signal with increased sensitivity and specificity. The use of the probe during surgical procedures has shown to be more efficient than the visual assessment of the tumor, detecting histologically confirmed fluorescent signal in LGG and tumor margins where none was detected with the neurosurgical microscope. However, a point detection probe can be disruptive to the surgeon's workflow and has a limited field-of-view. For these reasons, a wide-field fluorescence quantification system (qFI) was designed at Dartmouth College with prof. Frdéric Leblond. Such a system can be connected to a side optical port of a neurosurgical microscope in order to image the entire field-of-view of the microscope. The system can acquire in a couple of seconds during surgery a fluorescence spectrum that is corrected for the tissue's optical properties for each pixel in the image associated with the surgeon's field-of-view. The corrected fluorescence spectra can be associated to a precise concentration of biomarker in order to obtain a quantitative pixel map of the surgical cavity. The Dartmouth College's qFI wide-field system proved to be more effective than the visual assessment of the tumor through the neurosurgical microscope, but was still less sensitive than the point detection probe described earlier.

In this Master's project, a hyperspectral imaging system for fluorescence quantification during surgery has been designed in order to image the entire surgeon's field-of-view with a detection sensitivity similar to that of the point detection probe described earlier. To do so, the system has been designed, assembled and characterised at Polytechnique Montreal in the Laboratory of Radiology Optics in collaboration with Nüvü Caméras, a Canadian company that

designed world's most sensitive low light imaging camera. This system uses Nüvü Cameras' hNü EMCCD camera and can be connected to a free side optical port of a neurosurgical microscope with a fiberoptics imaging bundle and custom optics. A custom software user interface was designed to control and synchronize the different system's components.

In order to evaluate the need in terms of sensitivity in neurosurgical procedures, Nüvü's EMCCD detector was compared to the camera used in the Dartmouth College's qFI system. To do so, a performance index $I = SNR/t_{exp}$, where SNR is the signal to noise ratio and t_{ex} is exposure time of the camera, was used to compare both systems in terms of sensitivity and speed. At low biomarker concentrations, the EMCCD camera scored a index I up to 470 times higher than the detector used at Dartmouth College. This proves that less noisy detectors are needed in neurosurgery to obtain clearer and faster acquisitions.

The system designed at Polytechnique Montreal using Nüvü's EMCCD camera was then compared to Dartmouth College's qFI system. Liquid phantoms were imaged simultaneously with both systems through a neurosurgical microscope. For the same exposure times, the system developed during this Master was able to detect biomarker's concentration up to 25 times lower than those detected by the most sensitive state-of-the-art system. Therefore, such a system could help guide surgeons during the procedure in order to perform more complete tumor resection by quantifying with more sensitivity and specificity the biomarkers used in neurosurgery.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVI
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	5
1.1 Détection en conventionnelle en neurochirurgie	5
1.1.1 Propriétés des molécules fluorescentes	6
1.1.2 Origine biologique du contraste en fluorescence	7
1.1.3 Propriétés optiques des tissus	8
1.1.4 Protoporphyrine IX induite par acide aminolévulinique.....	11
1.2 Technologies d'imagerie de détection de fluorescence en neurochirurgie	13
1.2.1 Microscope neurochirurgical Zeiss	15
1.2.2 Propriétés des détecteurs d'imagerie	16
1.2.3 Principales technologies d'imagerie.....	17
CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE.....	22
2.1 Quantification de la fluorescence durant la chirurgie	22
2.2 État-de-l'art: Systèmes de quantification existants	23
2.2.1 Sonde neurochirurgicale permettant la quantification point-par-point	23
2.2.2 Premier prototype d'imagerie en champ large	29

2.3	Prototype d'imagerie ultra-sensible en champ large	37
2.3.1	Détecteur d'imagerie	39
2.3.2	Conception logicielle.....	42
2.3.3	Intégration au microscope neurochirurgical.....	45
2.3.4	Expériences préliminaires et de caractérisation	48
CHAPITRE 3 RÉSULTATS		52
3.1	Expérience 1 : Besoin de sensibilité.....	52
3.2	Expérience 2 : Comparaison de sensibilité	56
3.3	Expérience 3: Comparaison de sensibilité en salle d'opération.....	60
CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE		63
4.1	Synthèse des résultats.....	64
4.1.1	Expérience 1: Détermination du besoin en terme de sensibilité	64
4.1.2	Expériences 2 et 3: Comparaison de la sensibilité et de la vitesse d'acquisition avec l'état de l'art	65
4.2	Limitations du système et améliorations possibles	67
4.3	Comparaison des technologies d'imagerie.....	69
4.4	Possibilités futures.....	74
CONCLUSION		79
BIBLIOGRAPHIE		80
ANNEXE 1- ADAPTATEUR OPTIQUE		82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1: Spécifications de la caméra EMCCD hNü de Nüvü Caméras	41
Tableau 2-2: tableau résumant les propriétés d'absorbtion et de diffusion des fantômes liquides utilisés dans cette expérience. Les valeurs données dans le tableau sont mesurées à 405 nm.	50
Tableau 3-1: Propriétés de la caméra sCMOS PCO.EDGE et de la caméra EMCCD hNü de Nüvü Camēras	57

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1: Coefficients d'absorption en fonction de la longueur d'onde de certains chromophores dans les tissus biologiques incluant l'eau (H_2O), l'hémoglobine de-oxygénée (Hb) et l'hémoglobine oxygénée (HbO_2) [20].....	11
Figure 1-2: Spectres d'absorption (en noir) et spectre d'émission (en rouge) de la PpIX en fonction de la longueur d'onde [20].....	12
Figure 1-3: Exemples d'imagerie en fluorescence et de sonde de spectroscopie. L'imagerie en fluorescence est habituellement réalisée à travers un microscope neurochirurgical. L'imagerie en lumière blanche est montrée en (A) avec l'imagerie correspondante en lumière bleue en (B) où on peut voir la fluorescence en rose. La région interrogée avec la sonde, montrée en (B) a un spectre de réflectance montré en (C), qui est dépendant de la diffusion et de l'absorption du tissu et le spectre de fluorescence en lumière bleue de la PpIX est montré en (D), avec les pics caractéristiques du fluorophore à 635 nm et 710 nm [3]...	14
Figure 1-4: Transfert de charges dans un CCD 3 phases. Les électrodes sont identifiées par les chiffres [1], [2] et [3]. En (a), on voit que l'électrode [2] est positive, et retient les électrons, qui sont ici identifiés en bleu. En (b), on remarque que lorsque l'électrode (3) devient positive, les électrons se dispersent sous les deux électrodes positives. Finalement, en (c), on voit que les électrons s'accumulent sous l'électrode [3] lorsque l'électrode [2] devient négative. Ces étapes peuvent être répétées plusieurs fois.....	18
Figure 1-5: Schéma illustrant les différentes composantes d'un intensificateur d'images utilisé dans les caméras iCCD [35].....	21
Figure 2-1: Diagramme conceptuel de l'acquisition et du traitement des données de la sonde [9]. Acquisition de données (gauche) : La sonde intraopératoire fibrée au diamètre à sa pointe d'environ 1,1 mm est déposée à la surface du tissu. Une illumination séquentielle de lumière blanche et bleue permet la collection de spectres de réflectance diffuse et de fluorescence en utilisant un spectromètre portable comme détecteur. Traitement de données (droite) : Les données de réflectance en lumière blanche sont entrées dans un modèle optique contraint spectralement (modèle de diffusion utilisant les spectres d'absorption de l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée en entrée) pour calculer l'absorption et la diffusion du tissu à	

chaque longueur d'onde. Ces propriétés sont utilisées pour corriger l'influence des propriétés optiques (atténuation) sur le spectre de fluorescence. Ensuite, un spectre corrigé de fluorescence est généré duquel la concentration du fluorophore peut être calculée lorsque comparé avec les résultats d'une procédure de calibration comparant des mesures faites sur des concentrations connues. Les valeurs calculées de biomarqueurs, c'est-à-dire les concentrations de PpIX, photoproducts et hémoglobines (concentration totale et saturation), sont utilisées dans un algorithme de diagnostic pour classifier les régions interrogées en tant que tissu normal ou cancéreux..... 25

Figure 2-2: Mesures spectroscopiques in vivo de la PpIX induite par 5-ALA durant la chirurgie à crâne ouvert pour la résection de tumeur au cerveau [5]. **Gauche** : Image de la fluorescence lors de la chirurgie de la cavité chirurgicale visible par le chirurgien à travers le microscope neurochirurgical sous excitation par lumière bleue. **Milieu** : Spectre brut de la fluorescence (vert) et spectre corrigé quantitatif de la fluorescence (rouge) mesurés à chacun des sites interrogés. L'axe des y est en $\text{nm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et l'axe des x est en nm. **Droite** : Tranche histologique du tissu (H&E, magnification originale x40). Les rangés correspondent à : cotex normal (A-C), LGG (D-F), HGG (G-I), méningiome (J-L), and métastases (M-O)... 28

Figure 2-3: A) Schéma du système installé sur un port optique latéral libre d'un microscope neurochirurgical de la compagnie Carl Zeiss Meditech [10]. Les sources lumineuses sont celles incluses dans le microscope neurochirurgical Pentero. B) Image du système avec l'adaptateur optique, le filtre accordable et la caméra sCMOS. C) Image du système connecté à un port optique latéral libre du microscope neurochirurgical..... 30

Figure 2-4: Spectre commun d'une diode électroluminescente [56]..... 32

Figure 2-5: Spectre commun d'une lampe au Xenon [56]..... 33

Figure 2-6: Images au début (A-C), près de la fin (E-G) et à la fin (I-K) de la chirurgie. Les images montrent de gauche à droite des images en lumière blanche, en vFI et en qFI + lumière blanche [10]. De hauts niveaux de PpIX sont évidents en début de chirurgie (B), alors que vers la fin de la chirurgie, aucune trace de PpIX ne demeure en vFI (F), alors que de niveaux significatifs de PpIX sont détectés en qFI près du centre du champ de vue (G) avec une confirmation de en histologie de la nature cancéreuse du tissu (L). À la fin de la chirurgie, aucun niveau significatif de PpIX ne demeure en qFI (K). Les spectres obtenus au

début de la chirurgie (D) à 3 emplacements (1 = positif en vFI, marque rouge en A; 2 = positif en qFI/négatif en vFI. Marque bleue en A; 3 = cerveau normal, marque verte en A), et un spectre acquis vers la fin de la chirurgie (H) à un emplacement (1= positif en qFI/négatif en vFI, marque bleue en E) sont aussi illustrés.....	36
Figure 2-7: Gauche: Schéma du système ultrasensible en champ large connecté à un port optique latéral libre d'un microscope neurochirurgical Zeiss par l'intermédiaire d'une guide optique d'imagerie. Le système d'illumination ici montré est un système expérimental allant sur le microscope du laboratoire LRO, qui n'a pas de source lumineuse incluse. Le système peut aussi être utilisé avec la source d'un microscope Zeiss PENTERO. Droite: Image du système ultrasensible.....	38
Figure 2-8: Image conceptuelle de la détection spectralement résolue de la fluorescence en champ large. On voit une inclusion de fluorescence dans un fantôme liquide à gauche et le spectre de fluorescence associé à un pixel à droite.....	39
Figure 2-9: Caméra EMCCD hNü de Nüvü Caméras. Source : http://www.nuvucameras.com...	40
Figure 2-10: Interface utilisateur en LabVIEW pour contrôler et synchroniser le LCTF avec une caméra CCD. Les images acquises sont affichées et sauvegardées en temps réel.....	43
Figure 2-11: Interface utilisateur en LabVIEW pour contrôler et synchroniser le LCTF avec une caméra EMCCD. Les images acquises sont affichées et sauvegardées en temps réel.....	44
Figure 2-12: Interface utilisateur en LabVIEW pour contrôler et synchroniser le LCTF avec une caméra CCD et une caméra EMCCD. Les images acquises sont affichées et sauvegardées en temps réel.....	45
Figure 2-13: Système ultrasensible en champ large en salle d'opération sur un chariot chirurgical.....	46
Figure 2-14: Guide optique de 91cm de long avec une aire active de 400 x 400 fibres optiques 10µm.....	47
Figure 2-15: Graphique de transmission de la lumière du filtre LCTF visible utilisé. Source : spécifications VariSpec.....	48

Figure 2-16 : Fantômes liquides utilisés pour la comparaison de sensibilité. Gauche : dans l'éprouvette. Milieu : Prêt à être imagé. Droite : Image prise d'un fantôme avec la caméra EMCCD à 638nm.....	51
Figure 3-1: Simulation de l'influence de l'intensité du signal sur la contribution du détecteur au seuil de bruit du système. Les graphiques de gauches montrent le signal détecté par un détecteur parfait, c'est-à-dire un détecteur non bruité avec un QE de 100%. Les graphiques du milieu montrent le signal détecté par une caméra CCD. Les graphiques de droite montrent le signal détecté par la caméra EMCCD de Nüvü Cameras. La ligne noire représente le signal détecté par les caméras pour un pixel donné, c'est-à-dire un signal gaussien d'amplitude constante dans un bruit de fond variable. Les graphiques du haut montrent un bruit de fond de 6 électrons alors que les graphiques du bas montrent un bruit de fond de 40 électrons. La caméra EMCCD se compare seulement avantageusement à la caméra CCD dans la situation où le bruit est illustré en vert (comparé au bruit illustré en rouge pour les autres situations).....	53
Figure 3-2: Montage expérimental utilisé pour comparer les deux détecteurs sur le système hyperspectral utilisé au Dartmouth Hitchcock Medical Center.....	55
Figure 3-3: Detectabilité de l'alexa fluor 647 à différentes concentrations pour des caméras CCD et EMCCD Nüvü Cameras. 10ng/mL en red et 1ng/mL en bleu.....	56
Figure 3-4: Configuration expérimentale pour la comparaison de sensibilité.....	58
Figure 3-5: Intensité de fluorescence en unités arbitraires mesurée en fonction de la concentration réelle de PpIX contenue dans les fantômes.....	59
Figure 3-6: Déetectabilité de la fluorescence à 40ng/mL et à 200ng/mL pour les deux systèmes.	61
Figure 3-7: Fluorescence détectée en fonction de la concentration réelle de PpIX pour l'ancien système (sCMOS) et le nouveau système (EMCCD).....	62
Figure 4-1: Efficacité quantique d'un détecteur EMCCD en fonction de la longueur d'onde détectée.....	71
Figure 4-2: Images de 5 puits de points quantiques, à 5 concentrations différentes avec deux détecteurs, c'est-à-dire avec une caméra iCCD (gauche) et une caméra CCD (droite). Cette image est une reproduction de la figure 5 de l'article sevick-Muraca et al. [35].....	72

Figure 4-3: Approximation d'une inclusion fluorescente à partir de l'information surfacique acquise avec le système de détection de la fluorescence.....	75
Figure 4-4: 1) Caméra EMCCD hNü de Nüvvü Cameras; (2 et 2') Filtres accordables de type à cristaux liquide dans le NIR et visible. Le filtre en (2') peut être enlevé, dépendant de l'utilisation du système. (3) C'est ici qu'on installe le séparateur de faisceau 0,1/0,9 ou NIR/VIS, dépendant de l'utilisation du système (4) Caméra CCD Pixelfly.USB de PCO...	76
Figure 4-5: (gauche) Plan de référence du champ de vue du microscope imageant le cerveau dans un référentiel 3D. (haut) Cerveau dans le plan de référence du champ de vue du microscope. (milieu) Motif déformé de l'illumination modulée du cerveau (bas) Reconstruction du cerveau avec la profilométrie dans le plan de référence du champ de vue du microscope. (droite) Reconstruction du cerveau avec la profilométrie dans le référentiel 3D.....	77

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADC	Convertisseur analogue à digital (<i>Analog to digital converter</i>)
ALA	Acide aminolévulinique
c	Concentration d'une molécule
C	Injection de charges
CCD	Dispositif à couplage de charges (<i>Charge-coupled device</i>)
CIC	Injection de charges (<i>Clock-induced charges</i>)
CT	Tomodensitométrie (<i>Computed tomography</i>)
D	Bruit thermique (<i>Dark noise</i>)
$D(\Phi, r)$	Coefficient de diffusion collectif pour une densité Φ et une position r
DEL	Diode électroluminescente
DHMC	Dartmouth-Hitchcock Medical Center
EM	Multiplication d'électrons (<i>Electron multiplication</i>)
EMCCD	Dispositif à couplage de charges à multiplication d'électrons (<i>Electron multiplying CCD</i>)
EPR	Effet de perméabilité et rétention augmentée (<i>Enhanced permeability and retention</i>)
F	Facteur de bruit excédentaire
fps	Images par secondes (<i>Frames per seconds</i>)
g	Coefficient d'anisotropie
G	Gain de multiplication d'électrons
G_D	Gamme dynamique d'un détecteur
Hb	Hémoglobine désoxygénée
HbO_2	Hémoglobine oxygénée
HGG	Gliome de haut grade (<i>High grade glioma</i>)

H&E	Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine
I	Indice de performance composé
iCCD	Dispositif à couplage de charges intensifié (<i>Intensified charge-coupled device</i>)
	<i>charge-coupled device</i>)
ICG	Indocyanine green
LCTF	Filtre accordable à cristaux liquides (<i>Liquid crystal tunable filter</i>)
IRM	Imagerie à résonnance magnétique
LGG	Gliome de bas grade (<i>Low grade glioma</i>)
LRO	Laboratoire de radiologie optique
MNI	Institut de neurologie de Montréal (<i>Montreal Neurological Institute</i>)
NIR	Portion proche infra-rouge du spectre électromagnétique
PpIX	Protoporphyrine IX
QE	Efficacité quantique (<i>Quantum efficiency</i>)
qFI	Système d'imagerie quantitative de la fluorescence (<i>Quantitative fluorescence intensity</i>)
RSB	Rapport signal sur bruit
RTE	Équation de transfert radiatif (<i>Radiative transfer equation</i>)
S	Signal capté par un détecteur
sCMOS	Détecteur scientifique à base de semiconducteur d'oxyde métallique (<i>Scientific complementary metal oxide detector</i>)
T	Transmittance de la lumière en milieu absorbant
UHN	University Health Network
vFI	Système d'imagerie qualitative de la fluorescence (<i>Visual fluorescence intensity</i>)
VIS	Portion visible du spectre électromagnétique
ϵ	Coefficient d'extinction

$\Phi(r, t)$	Densité d'un matériau diffusant à la position r et au temps t
μ'_s	Coefficient de diffusion réduit
μ_s	Coefficient de diffusion
μ_a	Coefficient d'absorption
σ	Bruit de lecture

INTRODUCTION

La fluorescence est un phénomène de luminescence où une molécule absorbe un photon pour en émettre un autre dont la longueur d'onde est plus élevée. Ce phénomène est utilisé dans le domaine biomédical depuis plusieurs dizaines d'années. Son habileté à fournir de l'information en temps réel au niveau moléculaire de manière non-destructive en fait la famille de marqueurs la plus largement utilisée en microscopie. En effet, la biocompatibilité de plusieurs molécules fluorescentes exogènes, leur habileté de marquer de façon spécifique un pathogène d'intérêt et l'information fournie par la fluorescence intrinsèque des tissus est actuellement inégalée [1].

Dans le domaine de la neurochirurgie oncologique, le traitement standard d'un grand nombre de tumeurs est l'exérèse des tissus cancéreux, accompagnée de chimiothérapie et/ou de radiothérapie. Le pronostique du patient étant directement lié à la quantité de tissus cancéreux restant à la fin de la chirurgie [2], le chirurgien utilise habituellement un microscope neurochirurgical pour l'assister durant la chirurgie. À cet effet, les qualités de sensibilité et de spécificité au niveau moléculaire en temps réel d'un fluorophore pourraient augmenter significativement la qualité d'une telle résection [1]. C'est pourquoi l'acide aminolévulinique (ALA), un précurseur au fluorophore endogène protoporphyrine IX (PpIX), est utilisé depuis les années 1950 pour la détection de tumeurs durant la chirurgie [3]. En effet, dans le contexte de la neurochirurgie oncologique, l'ALA est un marqueur performant étant donné qu'il s'accumule spécifiquement dans certains types de tumeurs pour lesquelles le transport à travers la barrière hémato-encéphalique est possible. Cependant, même avec un microscope chirurgical modifié pour la détection qualitative de la fluorescence et le contraste apporté par l'ALA, une quantité significative de tissus cancéreux demeure à la fin de la chirurgie, ce qui peut entraîner une réapparition du cancer [2], [4]–[6]. Afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la détection en neurochirurgie, différents systèmes spectroscopiques pour quantifier la fluorescence ont été développés. Un premier système de sonde spectroscopique en neurochirurgie a été développé pour quantifier la fluorescence, avec des mesures point par point [5], [7]–[9]. Bien que ce système ait une haute sensibilité de détection des biomarqueurs de façon quantitative, son utilisation vient déranger le plan de travail du chirurgien en neurochirurgie et allonge significativement la procédure. Un deuxième outil pouvant être connecté au microscope neurochirurgical a été développé pouvant aussi détecter la fluorescence de manière quantitative,

mais sur l'entièreté du champ de vue du chirurgien [10], [11]. Avec cet outil, on vient obtenir durant la chirurgie une concentration de fluorescence pour chaque pixel imagé. Bien que cet outil ne vienne pas perturber le plan de travail du chirurgien, la sensibilité de ce système, quoique supérieure à la détection qualitative du microscope neurochirurgical, est inférieure à la sensibilité de la sonde précédemment développée.

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, un outil permettant de guider la neurochirurgie pour l'exérèse de tumeurs sera développé. Ce système sera conçu de manière à s'intégrer dans le plan de travail du chirurgien pour détecter la fluorescence en temps réel durant la chirurgie. Bien que les résultats d'un tel projet puissent être utilisés dans différentes applications médicales, l'ampleur de ce projet se limite à la détection de la fluorescence émise par la PpIX induite par ALA dans le cadre de la neurochirurgie oncologique.

Objectifs de recherche

L'objectif principal de ce projet est de développer un système spectroscopique permettant la détection quantitative de PpIX en champ large dans un contexte neurochirurgical. Le système doit pouvoir être connecté sur un port latéral libre d'un microscope neurochirurgical Carl Zeiss. Le système doit être plus sensible que les systèmes de détection de la fluorescence en neurochirurgie de l'état de l'art. Idéalement, le système de détection de la fluorescence en champ large développé dans le cadre de ce projet aurait une sensibilité comparable à celle de la sonde spectroscopique de quantification de la fluorescence en neurochirurgie de l'état de l'art. Le système doit pouvoir être installé rapidement sur le microscope neurochirurgical durant la chirurgie. Les différentes composantes du système doivent être contrôlées à partir d'une interface personnalisée sur un ordinateur. Cette interface doit permettre l'affichage et la sauvegarde des images acquises. Un logiciel personnalisé doit donc être programmé. Chacune des composantes du système, du microscope neurochirurgical aux composantes optiques, doivent être achetées. Une revue de la littérature et une veille technologique doivent donc être effectuées de manière à ce que les composantes optimales puissent être acquises de manière à développer un tel système. Finalement, chacun des sous-systèmes mécaniques et optiques doivent être conçus, assemblés et caractérisés avant l'utilisation du système dans un contexte neurochirurgical.

Organisation générale du mémoire

Le présent mémoire rapporte les travaux effectués dans le cadre d'une maîtrise (M.Sc.A.) en génie biomédical dans le Laboratoire de Radiologie Optique (LRO) à Polytechnique Montréal, sous la direction du Professeur Frederic Leblond, du département de génie physique de Polytechnique Montréal et du co-directeur Olivier Daigle de Nüvü Caméras.

Le chapitre 1 consiste en une revue de littérature dans laquelle on retrouve les principes théoriques nécessaires à la compréhension du mémoire. Il y est présenté les propriétés de base de la fluorescence, certains concepts liés à la détection de ce contraste optique *in vivo*, une introduction aux propriétés optiques des tissus biologiques ainsi qu'une présentation du fluorophore principal utilisé dans cette étude. Un survol des technologies actuellement utilisées en salle d'opération est ensuite présenté, suivi des principales propriétés des technologies de détection permettant l'imagerie en champ large.

La méthodologie est présentée au chapitre 2. On y retrouve une collection des techniques principales requises à l'imagerie hyperspectrale et aux modèles de transport de la lumière utilisés de manière à corriger et à quantifier les spectres de fluorescence détectés. Il y est ensuite présenté l'état de l'art de l'imagerie spectralement résolue en champ large ou avec une sonde pour la détection de fluorescence en neurochirurgie. Par la suite, on y décrit la conception mécanique, optique et logicielle du système réalisé dans le cadre du projet de maîtrise. Finalement, on y retrouve une description des expériences de caractérisation du système et de comparaison avec les systèmes de l'état de l'art.

Les résultats de ces expériences sont présentés au chapitre 3. On y trouve d'abord les résultats d'une expérience prouvant le besoin d'une sensibilité accrue au niveau du détecteur en neurochirurgie. On y retrouve ensuite les résultats de deux expériences, une effectuée à Polytechnique Montréal et une effectuée dans une salle d'opération à l'Institut de Neurologie de Montréal, comparant le système développé aux systèmes de l'état de l'art en neurochirurgie.

Finalement, on retrouve au chapitre 4 une discussion critique situant les résultats obtenus avec notre système avec les résultats existants dans la littérature en neurochirurgie. On y présente ensuite les limitations et améliorations possibles au système. Par la suite, une comparaison des performances de différentes technologies d'imagerie dans le contexte de la neurochirurgie est

présentée, en relation avec les résultats d'un article récent. Le chapitre termine par une présentation des possibilités et applications futures pour le système.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

Durant les deux dernières décennies, l'utilisation de la fluorescence lors d'applications chirurgicales a significativement augmenté à travers différentes avancées dans les marqueurs fluorescents, l'instrumentation et le traitement de données [1]. Dans cet ouvrage, la discussion sur la détection de la fluorescence se limitera à la détection durant la neurochirurgie, principalement pour la détection de protoporphyrine IX (PpIX). Nous sommes conscients de l'existence de méthodes de détection de la fluorescence dans d'autres domaines, mais elles ne seront pas abordées ici. Les méthodes présentées, bien qu'appliquées à la détection de PpIX, peuvent facilement s'appliquer à d'autres marqueurs fluorescents.

1.1 Détection en conventionnelle en neurochirurgie

Le traitement de beaucoup de cancers du cerveau est une chirurgie à crâne ouvert suivi de chimiothérapie et/ou de radiothérapie. Durant l'opération, un microscope neurochirurgical permet d'illuminer la surface chirurgicale de manière à fournir au chirurgien une image grossie détectée à travers une paire de binoculaires. L'évaluation visuelle des tissus est un facteur important dans l'identification des tumeurs. Cependant, une telle évaluation dépend grandement de l'expérience du chirurgien et de la situation du patient. En effet, l'imagerie en lumière blanche, que ce soit à l'œil nu (sans composantes optiques supplémentaires) ou à travers le microscope, ne permet pas de distinguer les tissus normaux des tissus cancéreux avec une précision suffisante [3]. En neurochirurgie, la classification des tumeurs a un impact important. Par exemple, les gliomes sont classifiés par la *World Health Organization* en 4 différents grades [12]. Les gliomes de haut grade (grades 3 et 4), sont plus faciles à détecter, mais plus invasifs que les gliomes de bas grade (grades 1 et 2) [2], [4], [5], [6], [13]–[19]. Pour plusieurs types de cancers, comme le cancer de la peau ou du sein, une large marge est enlevée autour de la tumeur de manière à minimiser les chances de cellules cancéreuses résiduelles. Cependant, dans le cas du cancer du cerveau, un tel retrait d'une marge de sécurité autour de la tumeur est impossible sans handicaper le patient. De ce fait, le développement de méthodes de détection plus sensibles et spécifiques est crucial afin d'effectuer de meilleures exérèses du cancer du cerveau.

1.1.1 Propriétés des molécules fluorescentes

La fluorescence est un procédé photonique radiatif linéaire où un photon est réémis par une molécule à une énergie moindre que celle du photon absorbé. Dans certains cas, une version non-linéaire (moins probable) de la fluorescence (pour la même molécule) permet à deux photons de même énergie (dont l'énergie totale est égale au photon générant le processus linéaire) d'être absorbés simultanément entraînant l'émission d'un photon de longueur d'onde plus courte qu'à l'excitation. Les molécules fluorescentes sont caractérisées par un spectre d'émission et un spectre d'excitation [19]. Le spectre d'excitation d'une molécule est une mesure de sa capacité à absorber un photon à des fins de fluorescence. Les valeurs du spectre d'excitation à une longueur d'onde donnée, aussi appelées coefficient d'extinction, ont les unités suivantes : $\text{longueur}^{-1}\text{M}^{-1}$, où la molarité M est le nombre de moles par litre de la solution fluorescente. Le spectre d'excitation d'une molécule simple a habituellement un seul pic d'excitation où l'absorption est la plus élevée. Par contre, il peut arriver qu'une molécule plus complexe ait plusieurs pics d'absorption, permettant l'excitation à différentes longueurs d'onde [19]. Par exemple, un fluorophore utilisé dans l'étude ici présentée, la PpIX, possède 5 pics d'excitation, dans la région visible (VIS) du spectre électromagnétique, i.e., à 500 nm, 540 nm, 575nm, 633 nm [20]. Contrairement au spectre d'excitation d'une molécule fluorescente, le spectre d'émission est indépendant de la longueur d'onde d'excitation λ^{ex} . L'amplitude du spectre d'émission mesuré (à une longueur d'onde donnée λ^{em}) peut être interprétée comme étant la probabilité qu'un fluorophore excité à λ^{ex} émette un photon à λ^{em} . Cependant, dans le cas linéaire, le photon émis est moins énergétique que le photon absorbé, donc λ^{ex} est toujours plus petit que λ^{em} . Ce phénomène est le déplacement de Stokes, c'est-à-dire, $\Delta\lambda = \lambda^{\text{ex}} - \lambda^{\text{em}}$ [19]. La fluorescence est donc un procédé photonique non-élastique, étant donné qu'une partie de l'énergie absorbée n'est pas réémise sous forme de photon, mais est dissipée dans des états transitoires vibrationnels dont la relaxation mène habituellement à la formation de chaleur dissipée dans les tissus biologiques. Pour les molécules simples, le spectre d'émission d'une molécule peut être une image miroir de son spectre d'absorption. Cependant, ce n'est pas le cas pour toutes les substances fluorescentes. Les spectres peuvent varier en fonction de la structure moléculaire de la substance et de ses interactions avec le milieu environnant [19].

Les procédés radiatifs comme la fluorescence ne sont pas les seuls processus suivant l'excitation d'une molécule fluorescente. En effet, molécules fluorescentes sont caractérisées par leur efficacité quantique, qui est une mesure de la fraction de photons (entre 0 et 1) absorbés qui mènent à de la fluorescence. On peut aussi décrire l'efficacité quantique d'une molécule comme étant la contribution relative entre les procédés radiatifs (fluorescence) et les procédés non radiatifs (dissipation en chaleur). Certaines molécules ont une efficacité quantique près de l'unité, comme les molécules manufacturées (i.e. Alexa Fluor) alors qu'une molécule organique comme la PpIX a une efficacité quantique de moins de 0,01 [19]. Une autre propriété importante des molécules fluorescentes est le photoblanchiment qui peut être considéré comme une mesure du nombre de fois qu'une molécule fluorescente peut être excitée de façon continue. Au niveau moléculaire, il s'agit d'une modification permanente de la structure moléculaire rendant la molécule non-fluorescente. Finalement, une substance fluorescente est caractérisée par sa durée de vie. La durée de vie d'un fluorophore est le temps moyen durant lequel la molécule restera dans un état excité avant de revenir à l'état de repos. Ce temps est habituellement de l'ordre de la nanoseconde [19].

1.1.2 Origine biologique du contraste en fluorescence

Un aspect important à considérer lors de l'utilisation de fluorescence en neurochirurgie est de bien comprendre l'origine de la sensibilité et la spécificité du signal détecté à un niveau biologique. En effet, ces deux mesures sont liées à la source du processus biologique étudié menant à la présence de fluorophores détectables au niveau des tissus devant être imaginés. Les fluorophores pouvant être utilisés en chirurgie peuvent se classer dans deux catégories, c'est-à-dire les fluorophores endogènes et les fluorophores exogènes. Les premiers sont des fluorophores qui sont présents naturellement dans les tissus, alors que les fluorophores exogènes s'accumulent à la suite de l'injection d'un agent de contraste. Par exemple, le fluorophore utilisé dans l'étude ici présentée, la PpIX, s'accumule spécifiquement dans les tumeurs du cerveau après l'injection de l'acide ALA, qui agit en tant que précurseur au fluorophore. La PpIX se retrouve aussi de façon endogène dans nos tissus, mais en quantités si faibles que sa détection est très difficile autrement que par des méthodes microscopiques [3],[21]–[23].

Un des facteurs principaux dictant l'utilité d'un fluorophore en milieu chirurgical est sa spécificité à la pathologie étudiée. En effet, une accumulation non-spécifique dans un tissu peut

mener à plusieurs problèmes. Par exemple, un tissu sain pourrait être faussement identifié comme étant cancéreux ou le contraste de fluorescence entre un tissu sain et un tissu cancéreux pourrait être trop faible pour être distingué [1],[22],[25]. Ce problème est commun lorsque le moyen d'accumulation du fluorophore est la perméabilité et rétention augmentée (EPR, de l'anglais *enhanced permeability and retention*), qui est un moyen d'accumulation passif [3]. Actuellement, peu de marqueurs fluorescents qui s'accumulent de façon active, comme dans les cas des molécules fonctionnalisées par anticorps, sont approuvés au niveau clinique. Un autre problème commun avec l'utilisation de molécules fluorescentes en chirurgie est un manque de sensibilité. En effet, une molécule peut s'accumuler de façon spécifique dans les tissus, mais en très faible quantité, limitant ainsi la capacité de discriminer entre les tissus normaux et cancéreux. De ce fait, un tissu malin peut être faussement identifié comme étant sain, ce qui peut mener à une réapparition du cancer suivant la neurochirurgie [1], [4], [21]–[23], [25].

1.1.3 Propriétés optiques des tissus

Un autre facteur crucial à considérer lors de l'imagerie de la fluorescence en neurochirurgie est l'influence des propriétés optiques intrinsèques des tissus biologiques reliées à la diffusion élastique et à l'absorption sélective. Selon la loi de Beer-Lambert, qui est donnée par

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-\varepsilon lc}, \quad (1)$$

la transmittance (T) de la lumière voyageant dans un tissu purement absorbant sera atténuée exponentiellement selon le produit de la longueur parcourue, l , et le coefficient d'extinction, ε , donnée $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ où M est la molarité et c est la concentration molaire du chromophore. Le produit du coefficient d'extinction par la concentration molaire correspond alors au coefficient d'absorption, μ_{a} , dont les unités sont en cm^{-1} . Cependant, les tissus biologiques ne sont pas seulement absorbants, mais sont aussi diffusants grâce à leur structure cellulaire et à l'organisation des protéines, membranes et organelles. Ainsi, pour approximer la propagation de la lumière dans les tissus biologiques, on doit utiliser des modèles de transport avec comme paramètres les propriétés optiques des tissus avec les coefficients effectifs reliés non seulement à l'absorption, mais aussi à la diffusion. Ces coefficients, donnés en unités inverses de distance, décrivent la probabilité d'un événement d'absorption ou de diffusion par unité de distance dans un tissu. Un autre paramètre important à considérer pour modéliser la diffusion est la fonction de

phase, qui dépend de l'angle de diffusion et réfère à la probabilité qu'un photon soit diffusé dans une direction donnée [26].

De ce fait, afin d'isoler l'information quantitative liée uniquement aux molécules fluorescentes durant la chirurgie, il est important d'utiliser des modèles mathématiques afin de déterminer la contribution au signal associée à l'atténuation intrinsèque des tissus. Le transport de la lumière dans un milieu hautement diffusant peut être modélisé à l'aide de l'équation de transfert radiatif (RTE de l'anglais *Radiative Transfer Equation*) [26] ou de la méthode Monte Carlo (une simulation qui consiste à simuler une multitude d'évènements aléatoires de manière à obtenir une solution numérique à un problème complexe) [28],[29]. Ces deux méthodes permettent la simulation d'évènements photoniques et sont efficaces, mais nécessitent des calculs complexe et de l'information *a priori* (*propriétés optiques liées à la diffusion et l'absorption*) *difficiles à obtenir pratiquement durant la chirurgie*. Considérant qu'un photon voyageant dans un tissu biologique (dans lesquels l'influence de l'absorption est typiquement moins marquée que celle associée à la diffusion) subira plusieurs évènempriontiers de diffusion avant d'être absorbé, on peut assumer que le transport lumineux peut être considéré comme un processus diffusif. Mathématiquement, ce phénomène est associé au fait que le coefficient modélisant la probabilité d'évènements de diffusion est beaucoup plus grand que celui associé à l'absorption. Aussi, l'atteinte du régime diffusif requiert que la distance entre la source et le détecteur soit plus grande que quelques millimètres. Ceci vient simplifier le RTE, qui se réduit à l'équation de diffusion, qui est donné par,

$$\frac{\partial \Phi(r,t)}{\partial t} = \nabla \cdot [D(\Phi, r) \nabla \Phi(r, t)], \quad (2)$$

où $\Phi(r, t)$ est la densité du matériau diffusant à la position r et au temps t et $D(\Phi, r)$ est le coefficient de diffusion collectif pour une densité Φ et une position r . La résolution de l'équation de la diffusion nécessite beaucoup moins de calculs que la RTE, ce qui est donc plus compatible avec le déroulement habituel des chirurgies du cerveau. De plus, l'équation de diffusion nécessite moins d'information *a priori*, c'est-à-dire qu'elle ne nécessite que le coefficient d'absorption ($\mu_a(\lambda) = c_{Hb}[S_t O_2 \mu_a(\lambda)^{oxyHb} + (1 - S_t O_2) \mu_a(\lambda)^{deoxyHb}]$) et le coefficient de diffusion réduit ($\mu'_s = \mu_s(1 - g)$) [26]. De plus, on applique à l'équation diffusion les conditions limite d'un milieu semi-infini, homogène et optiquement turbide, c'est-à-dire qu'on suppose que tissus

biologiques comme étant homogènes. Ainsi, on peut utiliser un algorithme de Levenberg-Marquardt pour extraire plusieurs paramètres d'intérêts.

$$R(\lambda) = \frac{a'}{4\pi} \left[z_0 \left(\mu_{eff} + \frac{1}{\rho_1} \right) \frac{\exp(-\mu_{eff}\rho_1)}{\rho_1^2} + (z_0 + 2z_b) \left(\mu_{eff} + \frac{1}{\rho_2} \right) \frac{\exp(-\mu_{eff}\rho_2)}{\rho_2^2} \right],$$

où $z_0 = 1/\mu'_s$, $\mu_{eff}(\lambda) = [3\mu_a(\lambda)\mu'_s(\lambda)]^{1/2}$, $\mu_a(\lambda)$ et $\mu'_s(\lambda)$ sont données par les équations données plus haut, $\rho_1^2 = z_0^2 + r^2$, $\rho_2^2 = (z_0 + 2z_b)^2 + r^2$. Les paramètres z_0 , ρ_1 , ρ_2 , z_b , et μ_{eff} sont dépendants de la longueur d'onde. La distance frontière extrapolée est donnée par $z_b = 2\kappa D$, où D est la constante de diffusion donnée par $D = (3\mu'_s)^{-1}$. Les paramètres d'intérêts sont ici la concentration en hémoglobine, la saturation en oxygène et les paramètres de diffusion. Plus de détails sont donnés dans Kim & al, (2010)[7].

L'absorption et la diffusion sont spécifiques au tissu étudié et dépendent fortement de ses propriétés biochimiques, physiologiques et structurelles [22],[23]. Les protéines, particulièrement l'hémoglobine et la mélanine, ont un coefficient d'extinction important dans les longueurs d'onde visibles. Par contre, la mélanine, principalement présente dans la peau, n'est habituellement pas un problème lors des chirurgies du cerveau, considérant que le champ de vue est une cavité chirurgicale ouverte. L'eau est aussi un contributeur important, bien que son coefficient chute rapidement dans les proches infrarouges, avant de remonter vers 900nm. Les lipides peuvent aussi contribuer fortement à l'absorption. Dans beaucoup d'applications, dont l'imagerie du cerveau, la molécule dominante en termes d'absorption est l'hémoglobine, dans sa forme oxygénée et désoxygénée (figue 1-1). La forte absorption de ces molécules dans la plage visible du spectre électromagnétique limite l'excitation des molécules fluorescentes à moins d'un millimètre dans les tissus. Cependant, leur coefficient d'absorption diminue de plusieurs ordres de grandeur dans le proche infra-rouge (NIR de l'anglais *near-infrared*), ce qui permet d'imager en profondeur soit quelques millimètres à quelques centimètres dépendant des concentrations des différents chromophores [7], [23]. On retrouve des coefficients d'absorption typiques en cm^{-1} pour les principaux contributeurs dans les tissus à la figure 1-1.

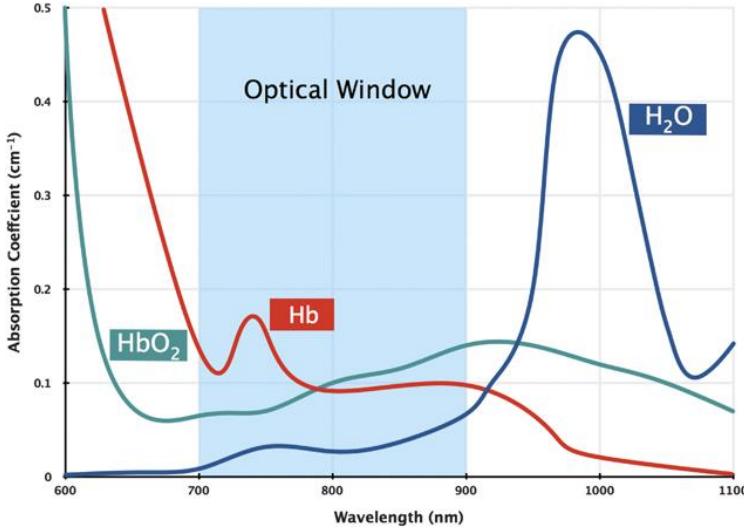


Figure 1-1: Coefficients d'absorption en fonction de la longueur d'onde de certains chromophores dans les tissus biologiques incluant l'eau (H_2O), l'hémoglobine de-oxygénée (Hb) et l'hémoglobine oxygénée (HbO_2). [20]

Étant donné que les spectres d'absorption des chromophores varient en fonction de la longueur d'onde, les propriétés optiques des tissus peuvent venir déformer le spectre d'émission d'un fluorophore détecté. Ces déformations peuvent être corrigées à l'aide des modèles mathématiques décrits plus haut. De ce fait, l'utilisation de modèles appropriés peut venir augmenter la spécificité et la sensibilité de fluorescence détectées dans un tissu biologique, en corrigeant des variations dans le spectre causées par les propriétés optiques. Une telle correction est nécessaire à la quantification d'un fluorophore dans un tissu [5], [7], [29].

1.1.4 Protoporphyrine IX induite par acide aminolévulinique

L'acide aminolévulinique (ALA) est utilisé depuis plus de 50 ans en photodiagnostic et en photothérapie. L'administration d'ALA génère une surproduction et accumulation de protoporphyrine IX (PpIX) dans certains tissus cancéreux. La PpIX est une molécule fluorescente endogène présente au cours du cycle de biosynthèse de l'hème, une molécule à la base de l'hémoglobine. Cependant, bien que la PpIX induite par ALA soit utilisée depuis des décennies, son mécanisme exact n'est pas encore parfaitement compris. C'est un fluorophore présentement utilisé cliniquement lors de la chirurgie du cerveau au Japon et en Allemagne et qui est approuvé

pour certaines études scientifiques cliniques au Canada et aux États-Unis. La PpIX a un pic d'excitation principal à $\lambda^{ex} = 405 \text{ nm}$, mais possède aussi différents pics d'excitation secondaires, dont un pic dans le rouge à $\lambda^{ex} = 633 \text{ nm}$. Son spectre d'émission a un pic principal à $\lambda^{em} = 635 \text{ nm}$, mais a aussi un pic caractéristique secondaire à $\lambda^{em} = 710 \text{ nm}$ [3]. Ces spectres sont illustrés à la figure 1-2. Une surproduction et une accumulation sélective de ce biomarqueur dans les tumeurs lui permettent d'être utilisé pour guider certaines chirurgies. Ce fluorophore est principalement utilisé pour guider l'exérèse de certaines tumeurs du cerveau (gliomes de haut grade), étant donné son excellente spécificité (il ne semble pas y avoir accumulation dans les tissus normaux [9]). Une partie des succès de l'ALA pour les gliomes de haut grade tient du fait que pour ce type de tumeurs très avancées la barrière hémato-encéphalique est compromise, ce qui facilite le transport vers les tissus cancéreux [30], [31]. Son accumulation spécifique dans les tumeurs est mal comprise, mais une partie de la cause peut être liée à l'environnement chimique de la tumeur, c'est-à-dire à un pH plus acide, un manque d'oxygène et un contenu différent en enzymes.

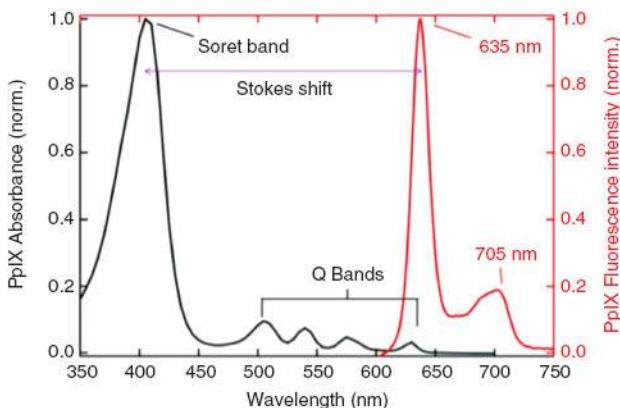


Figure 1-2: Spectres d'absorption (en noir) et spectre d'émission (en rouge) de la PpIX en fonction de la longueur d'onde [20].

Dans le cas de la neurochirurgie, l'ALA est administré oralement au patient 24 heures avant la chirurgie ou injecté par intraveineuse quelques heures avant la chirurgie, avec la moitié de la dose orale [32]. Une partie de l'ALA est utilisé pour produire la PpIX et l'excédent est éliminé à travers les excréptions dans l'urine et par le foie [2], [17], [18].

1.2 Technologies d'imagerie de détection de fluorescence en neurochirurgie

Les technologies actuelles pour la détection de fluorescence en neurochirurgie peuvent être divisées en deux catégories majeures : l'imagerie en champ large et la détection poignent par point en utilisant une sonde manuelle. Chacune de ses technologies a ses avantages et inconvénients et influencent différemment le plan de travail du chirurgien [1], [2], [4], [22], [17], [23], [33]. Connaître en détail la technologie d'imagerie utilisée est crucial de manière à connaître les limitations de son système. Par exemple, l'imagerie en champ large permet un grand champ de vue (de l'ordre de quelques centimètres) sans déranger le plan de travail du chirurgien, mais a habituellement une sensibilité assez faible en plus de fournir de l'information non-résolue spectralement, c'est-à-dire pas nécessairement spécifique à la molécule d'intérêt. D'autre part, la sonde de spectroscopie développée à Dartmouth offre habituellement un champ de vue limité tout en dérangeant le plan de travail du chirurgien, mais fournit une sensibilité élevée en plus de donner un signal résolu spectralement [5], [7]–[9]. C'est dans l'optique d'avoir le meilleur des deux technologies qu'on présente dans cet ouvrage la conception et la caractérisation d'un système d'imagerie en champ large ayant une sensibilité semblable à celle d'une sonde de spectroscopie. Une image des deux technologies est montrée en figure 1-3.

Fluorescence Imaging

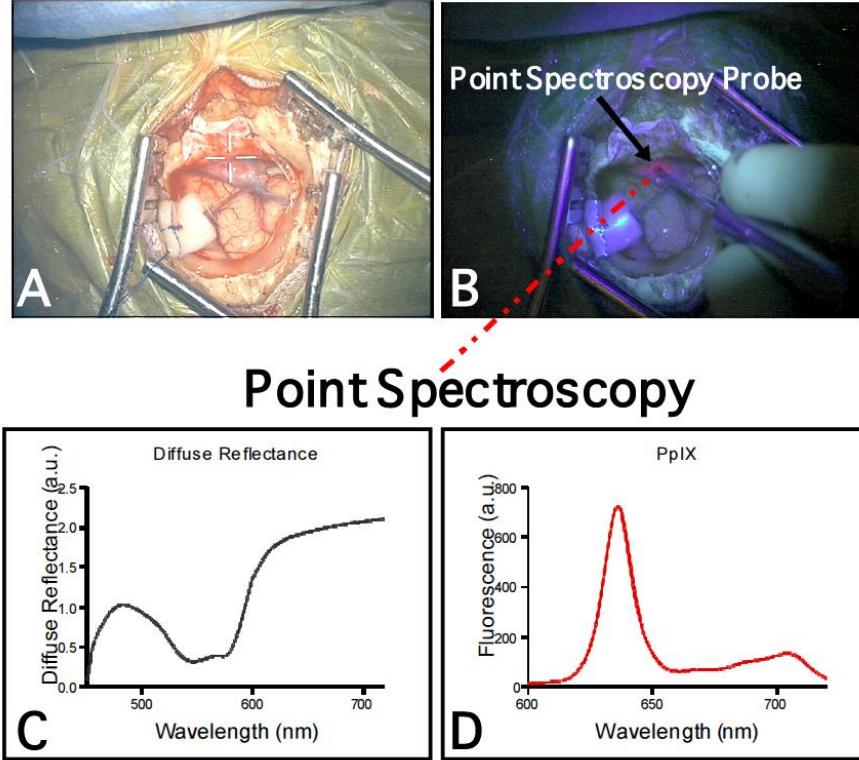


Figure 1-3: Exemples d'imagerie en fluorescence et de sonde de spectroscopie. L'imagerie en fluorescence est habituellement réalisée à travers un microscope neurochirurgical. L'imagerie en lumière blanche est montrée en (A) avec l'imagerie correspondante en lumière bleue en (B) où on peut voir la fluorescence en rose. La région interrogée avec la sonde, montrée en (B) a un spectre de réflectance montré en (C), qui est dépendant de la diffusion et de l'absorption du tissu et le spectre de fluorescence en lumière bleue de la PpIX est montré en (D), avec les pics caractéristiques du fluorophore à 635 nm et 710 nm [3].

L'imagerie optique est hautement avantageuse comparée à d'autres méthodes intraopératoires comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomodensitométrie (CT) à cause de son faible coût relatif, de la nature non-ionisante de la lumière utilisée et de son habileté à fournir de l'information fonctionnelle et moléculaire potentiellement en temps réel durant la chirurgie [23]. L'imagerie de la fluorescence durant la chirurgie est complémentaire à l'IRM et au CT préopératoire.

1.2.1 Microscope neurochirurgical Zeiss

Le développement d'un outil pour guider la chirurgie en fluorescence implique nécessairement une source de lumière pour l'excitation, un élément de sélection spectrale et un détecteur. Dans le cas du microscope neurochirurgical Pentero (Carl Zeiss, Allemagne) comme exemple, la source d'excitation est une lampe au xénon. Cette lampe inclut une roulette de filtres permettant le filtrage de la large bande spectrale d'une lampe au xénon pour illuminer spécifiquement un fluorophore. En effet, une source lumineuse au spectre trop large viendrait illuminer de façon non-spécifique tous les fluorophores intrinsèques aux tissus, ce qui compliquerait la détection du biomarqueur d'intérêt. Une telle illumination vient aussi accélérer le photoblanchiment des fluorophores. Au niveau de la composante de sélection spectrale, ce type de microscope utilise habituellement un filtre passe-haut permettant de couper la composante d'illumination du laser tout en collectant la fluorescence, à une longueur d'onde plus élevée, émise par le biomarqueur. Le filtrage permet aussi à une très faible quantité de lumière d'excitation d'être conservée, de manière à ce que la réflectance permette au chirurgien de localiser la fluorescence dans le cerveau. Un séparateur de faisceau (*beam splitter*) vient partager la lumière détectée entre les différentes binoculaires et un détecteur à des fins d'enregistrement. Un mécanisme de sélection permet au chirurgien de passer rapidement entre le mode de détection de la fluorescence et le mode de réflectance en lumière blanche [17].

Bien que ce microscope vienne assister le chirurgien dans son évaluation de la tumeur et permette une meilleure sensibilité et spécificité qu'une évaluation à l'œil nu en lumière blanche, plusieurs études ont démontré que cette méthode manquait de sensibilité, surtout en comparaison avec les sondes de spectroscopie [3], [5]–[7], [9], [14]. De ce fait, plusieurs améliorations sont possibles à chacun des niveaux du microscope, c'est-à-dire dans la composante d'illumination, de sélection spectrale et de détection. Ces améliorations seront discutées en détail à travers cet ouvrage. Considérant la complexité des différentes technologies d'imagerie, les différents facteurs à considérer et une brève description de leurs mécanismes de fonctionnement seront ici présentés avant d'en discuter plus en détail en section 2, 3 et 4.

1.2.2 Propriétés des détecteurs d'imagerie

Les principales propriétés recherchées lors de l'implémentation d'un détecteur dans un système d'imagerie biomédical sont le ratio signal sur bruit (RSB, qui peut être décrit comme le signal divisé par le niveau de bruit dans une image) qu'il permet d'atteindre, la rapidité d'acquisition, la résolution spatiale et la plage dynamique du détecteur. Le rapport signal sur bruit qu'un détecteur permet d'atteindre est directement dépendant de sa sensibilité. La sensibilité d'un détecteur est définie comme étant le flux lumineux le plus faible pouvant être détecté par une caméra. La sensibilité est donc dépendante du seuil de bruit du photo-senseur. Le seuil de bruit d'un détecteur est fonction des différentes sources de bruit intrinsèque à son utilisation. Les sources majeures de bruits affectant différentes caméras seront décrites à la section suivante. Ainsi, une caméra avec une meilleure sensibilité peut permettre à un système d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit si les conditions photoniques le permettent. Un deuxième paramètre important est la vitesse d'acquisition. En effet, certaines applications nécessitent de hautes vitesses d'acquisitions. La vitesse de lecture d'une caméra, habituellement mesurée en images par secondes, varie en fonction du type de technologie utilisée et de la résolution spatiale du senseur. En effet, un détecteur peut lire un certain nombre de pixels par secondes. De ce fait, la fréquence de lecture d'image est inversement proportionnelle à la résolution spectrale du détecteur [34].

En plus, un détecteur ayant une haute résolution spatiale a habituellement de plus petits pixels. De ce fait, chacun de ces pixels captera moins de photons qu'un pixel de taille supérieure. Il est aussi possible qu'une caméra sacrifie sa sensibilité pour plus de vitesse de lecture. Cependant, dans un contexte d'imagerie en faible flux photonique, il est fréquent que la limitation principale se situe au niveau de la détection des faibles signaux lumineux. En effet, plus on image rapidement, plus le temps d'intégration du détecteur est faible, et donc moins de photons sont détectés par image. Ainsi, pour une application donnée, un compromis idéal doit être atteint entre la sensibilité et la vitesse d'acquisition, et du même coup, la résolution spatiale. Finalement, la gamme dynamique d'une caméra est définie par le nombre de valeurs qu'un pixel peut adopter. La plage spectrale est habituellement définie en nombre de bits effectifs ou en décibels. Un détecteur ayant une plage dynamique élevée pour détecter de faibles signaux dans une même image que des signaux élevés sans saturer. De plus, plus la plage dynamique d'un détecteur est élevée, plus il devient facile de distinguer la différence entre le bruit et le signal.

présents dans l'acquisition. C'est pourquoi une plage dynamique élevée est importante en imagerie de faible flux, particulièrement lorsqu'un veut imager dans une même image des objets d'intensité lumineuse largement différents.

1.2.3 Principales technologies d'imagerie

La technologie d'imagerie la plus répandue est celle des dispositifs à couplage de charges (CCD). Le fonctionnement de ce type de caméras sera ici expliqué en détail, étant donné qu'il est semblable au fonctionnement des autres technologies qui seront décrites. Tout d'abord, le but de chacune de ces technologies d'imagerie est de convertir les photons collectés par différentes composantes optiques en électrons, qui peuvent ensuite être lus électroniquement de manière à un extraire de l'information spatiale et temporelle. Pour ce faire, différents mécanismes physiques et électroniques entreront en action, ce qui générera différentes sources de bruit. Les technologies diffèrent entre elles de manière à minimiser ces différentes sources de bruits, tout en variant différents paramètres, comme la vitesse de lecture et la résolution spatiale. Dans tous les cas ici présentés, c'est l'effet photoélectrique qui nous permet de visualiser les photons avec ces dispositifs. L'effet photoélectrique est le phénomène selon lequel un électron est émis d'un matériau soumis à une radiation électromagnétique d'énergie suffisante. L'énergie photonique suffisante à émettre un électron dépend du matériau. Par exemple, pour les détecteurs de silicium, cette valeur correspond à l'énergie d'un photon d'environ $1,1 \mu\text{m}$ de longueur d'onde. De ce fait, un détecteur de silicium est complètement transparent à une radiation électromagnétique d'énergie inférieure à cette longueur d'onde.

Une fois que l'électron correspondant à un photon, aussi appelé photo-électron, est émis, il est emmagasiné dans un pixel. Un pixel agit comme un petit condensateur qui accumule les charges qui y sont déposées. Un pixel est composé de deux types de matériaux principaux, c'est-à-dire le matériau N et le matériau P. Ce sont des matériaux composés majoritairement d'atomes de silicium, avec une faible quantité d'impuretés. C'est ce qu'on appelle le dopage. C'est dans le matériau P que les électrons sont accumulés à l'état libre dans le pixel. Par la suite, pour qu'un pixel soit lu, les charges de ce pixel doivent être déplacées jusqu'à l'amplificateur de sortie, qui sera décrit plus loin. Pour déplacer les charges de pixel en pixel, des électrodes placées au-dessus de chacun des pixels sont utilisées. En effet, en variant la tension de ces électrodes adéquatement, comme démontré à la figure 1-4, il est possible de déplacer les électrons de pixel en pixel jusqu'à

l'amplificateur de sortie qui lira leur valeur. De cette manière, une puce CCD récente peut déplacer les charges dans ses pixels avec une efficacité allant jusqu'à 99,9999% par transfert.

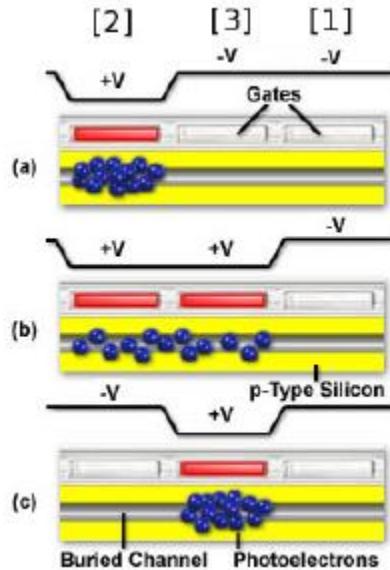


Figure 1-4: Transfert de charges dans un CCD 3 phases. Les électrodes sont identifiées par les chiffres [1], [2] et [3]. En (a), on voit que l'électrode [2] est positive, et retient les électrons, qui sont ici identifiés en bleu. En (b), on remarque que lorsque l'électrode (3) devient positive, les électrons se dispersent sous les deux électrodes positives. Finalement, en (c), on voit que les électrons s'accumulent sous l'électrode [3] lorsque l'électrode [2] devient négative. Ces étapes peuvent être répétées plusieurs fois.

Source : <http://www.microscopyu.com/articles/digitalimaging/ccdintro.html>

Un tel déplacement permet aux photoélectrons d'atteindre l'amplificateur de sortie, où leur valeur pourra être mesurée. Pour ce faire, les charges sont transférées dans un petit condensateur connecté à un transistor. Dans ce condensateur, on peut donc transférer une valeur en nombre d'électrons en valeur de tension, qui peut facilement être lue par différentes composantes électroniques. C'est ici qu'apparaît une des contributions majeures limitant la sensibilité des CCD. En effet, diverses fluctuations aléatoires dans le courant traversant le transitoire amènent un bruit gaussien à la conversion du nombre d'électron en tension. C'est en grande partie cette incertitude sur la tension de sortie du détecteur qu'on appelle le bruit de lecture d'une caméra. Dans le cas des caméras CCD, c'est le bruit de lecture qui détermine

le plancher de sensibilité. Finalement, une fois le nombre d'électrons converti en tension, il est possible de convertir cette tension en valeur numérique. La tension de sortie est comparée à un niveau de référence et un niveau de réinitialisation. Elle peut ensuite être numérisée par un convertisseur analogique à numérique (ADC). Les caméras CCD scientifiques utilisent habituellement une numérisation à 14 ou 16 bits, ce qui donne 16 384 ou 65 536 valeurs possibles. La gamme dynamique d'une caméra est dictée par la résolution de son ADC et par son bruit total, selon l'équation suivante :

$$G_D = 20 \log \frac{x}{\sigma}, \quad (3)$$

où G_D est la gamme dynamique, σ est le bruit total, et x est la résolution de la caméra. Dans le cas où la puce CCD sature après l'ADC, x est 2^N où N est le nombre de bits de l'ADC. Dans le cas où la CCD sature avant l'ADC, x est le niveau de saturation de la CCD. Une autre source de bruit qui afflige les détecteurs au silicium est le bruit thermique. Le bruit thermique est causé par la distribution de Maxwell-Boltzmann de l'état des atomes de silicium au-dessus du zéro absolu. De ce fait, il peut y avoir une génération de charge dans le détecteur sans effet photoélectrique. Le bruit thermique a une dépendance temporelle. Ainsi, plus le temps d'intégration est élevé, plus le bruit thermique sera élevé. Ceci peut être problématique en imagerie à faible flux considérant que le courant sombre peut croître plus rapidement que le signal qu'on veut imager. Ceci explique la nécessité de refroidir les détecteurs d'imagerie en faible flux [34].

Le fonctionnement des caméras EMCCD est semblable à celui des caméras CCD, mais implique un registre de multiplication des électrons avant l'amplificateur de sortie, où le bruit de lecture est généré. Ainsi, en multipliant les photoélectrons d'un facteur pouvant aller jusqu'à 5000, on vient atteindre un bruit de lecture effectif de moins de 0,01 e⁻/pixel/image, considérant que le bruit de lecture des CCD est de l'ordre de la dizaine d'électrons. Ainsi en diminuant le bruit de lecture, qui est le bruit limitant des caméras CCD, on vient de diminuer le plancher de sensibilité atteignable. Cependant, le gain électronique obtenu est obtenu de façon stochastique. De ce fait, on peut facilement calculer le gain moyen du registre de multiplication, mais on ne peut pas déterminer le gain exact par lequel a été multiplié chacun des pixels. Cette incertitude entraîne une nouvelle source de bruit, appelée le facteur de bruit excédentaire F . Ce facteur F est fonction du gain, mais plafonne rapidement à $\sqrt{2}$ et, à cette valeur, impacte le RSB de la même manière que si l'efficacité quantique (i.e. l'efficacité du détecteur à convertir les photons en

électrons) du détecteur était diminuée de moitié. Finalement, une fois le bruit effectif de lecture minimisé grâce au gain de multiplication électronique et le bruit thermique minimisé par un refroidissement du détecteur, la source de bruit dominante dans les caméras EMCCD est le bruit d'injection de charges. En effet, l'injection de charges (CIC), est une source de bruit créé par la fréquence élevée des horloges qui pilotent le capteur CCD ou EMCCD. Dans le cas des caméras CCD, le CIC est négligeable, étant souvent plus de 10 fois plus faible que le bruit de lecture. Cependant, en imagerie à faible flux, c'est-à-dire lorsque le bruit photonique est minime (voir Chapitre 2 pour une description du bruit photonique), c'est le bruit d'injection de charges qui vient dominer les caméras EMCCD [34]. Une brève description de la technologie EMCCD de Nüvü caméra, qui permet de minimiser le CIC, est décrite au Chapitre 2.

Finalement, une autre technologie utilise un différent mécanisme d'amplification afin de minimiser le bruit de lecture des capteurs CCD et donc d'en augmenter la sensibilité. Les caméras iCCD utilisent un intensificateur d'images permettant d'amplifier les photons jusqu'à 10^6 fois avant qu'ils soient détectés par le capteur CCD. Un schéma d'un amplificateur d'images est illustré en figure 1-5. De ce fait, considérant que les signaux détectés par le senseur seront très élevés, le bruit de lecture est négligeable. De plus, l'intensificateur d'images étant modulé par une tension appliquée aux bornes de la photocathode, une caméra iCCD peut atteindre des temps d'intégration de l'ordre de la nano seconde, en alimentant très brièvement la photocathode. Cependant, les caméras iCCD sont affectées, comme les caméras EMCCD, par facteur de bruit excédentaire F (ou ENF, de l'anglais *excess noise factor*). Pour ces détecteurs, le facteur F vaut 2 ou plus, dépendant de l'architecture de la photocathode (alors qu'il est de $\sqrt{2}$ dans le cas des caméras EMCCD), ce qui a le même impact sur le RSB de la caméra que si l'efficacité quantique (i.e. l'efficacité du détecteur à convertir les photons en électrons) du détecteur était réduite de 75%.

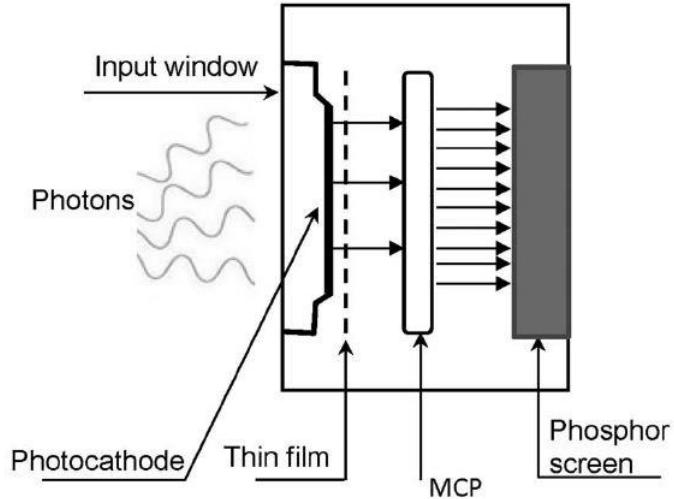


Figure 1-5: Schéma illustrant les différentes composantes d'un intensificateur d'images utilisé dans les caméras iCCD [35].

Une discussion critique de ces technologies d'imagerie dans le contexte de la détection de la fluorescence en chirurgie est présentée au Chapitre 4.

CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE

2.1 Quantification de la fluorescence durant la chirurgie

Comme discuté au chapitre 1, l'avènement des marqueurs biologiques fluorescents et leur utilisation pour guider les opérations chirurgicales requièrent le développement de méthodes quantitatives à des fins de sensibilité et de spécificité. Ces méthodes permettent de fournir aux cliniciens (médecins et chirurgiens) des images standardisées desquelles a été retirée toute contribution autre que celles étant directement reliées à la concentration du marqueur fluorescent (i.e. le marqueur biologique d'intérêt clinique). Il est à noter qu'au fil des années, il n'y a eu que peu de travail fait dans le but de développer des approches cliniques quantitatives de détection de la fluorescence en chirurgie. La plupart des instruments ayant été développés pour la chirurgie sont plutôt associés à des méthodes qualitatives en champs large (e.g. imagerie de la Protoporphyrin IX [2], [5], [6], [11], [16]–[18], [31], [36]–[39] et de l'ICG [1], [4], [25], [33], [40]–[42]) ou encore des méthodes semi-quantitatives utilisant des systèmes de détection point par point basés sur des sondes ou des endoscopes [3], [7]–[10], [37], [39], [43]. Au cours des 6 dernières années, le Dr. Leblond a développé de nouvelles approches de quantification de fluorophores durant la chirurgie, tout d'abord à l'aide de sondes (méthodes de détection pointes par point) [5], [9], [36], [38], [39] et ensuite à l'aide d'un système d'imagerie en champ large [10], [11].

Dans le présent travail seront démontrées les premières étapes du développement d'un système d'imagerie qui est couplé avec une nouvelle approche mathématique, développée au Laboratoire de Radiologie Optique (LRO), permettant la quantification de marqueurs fluorescents ayant des spectres d'excitation et d'émission aussi bien dans le visible que dans le proche infrarouge. Comme démontré par les travaux de notre collaborateur le Dr. Wilson du Toronto University Health Network (UHN), la quantification de marqueurs fluorescents dans les tissus biologiques requiert la détection de signaux de fluorescence de façon spectroscopique (i.e. imagerie résolue spectralement) ainsi que la détection de spectres de réflectance en lumière blanche afin de normaliser et calibrer les signaux de fluorescence [38], [44]. Le système biomédical présenté dans ce mémoire permet la détection des signaux nécessaires à la quantification et ceci de

manière totalement intégrée dans un microscope neurochirurgical commercial de la compagnie Carl Zeiss Meditech. Ce dernier aspect, c'est-à-dire l'intégration dans un microscope, est crucial afin que l'outil puisse être intégré dans le plan de travail des neurochirurgiens sans causer de dérangement.

Dans tout système de détection de la fluorescence, les signaux comportent plusieurs contributions qui, si non-corrigées ou mal comprises, empêcheront la quantification. Ces facteurs importants incluent : (1) la réponse du système de détection, i.e., l'impact des composantes du systèmes sur les signaux par exemple l'efficacité de détection variable du spectromètre à travers la plage de détection spectrale, (2) le bruit de détection du système, (3) la présence dans le signal d'autres sources de fluorescence, par exemple la fluorescence intrinsèque des tissus biologiques, (4) la courbure de la surface interrogée, (5) les propriétés optiques du tissu et son hétérogénéité, (6) la profondeur de pénétration variable de la lumière à différentes longueurs d'onde, (7) la distribution spatiale des sources de fluorescence considérant qu'une source sur la surface peut mener au même signal qu'une source de taille plus petite sous la surface. Dans le présent ouvrage, le développement d'un système de photo-détection spectroscopique est présenté permettant l'acquisition des signaux à partir desquels des algorithmes mathématiques sont développés au LRO afin de prendre en compte les éléments (3-7). Ici, nous présentons une caractérisation détaillée des éléments (1) et (2) soit la réponse du système de détection et une analyse et une explication des sources de bruit de l'instrument.

2.2 État de l'art: Systèmes de quantification existants

Afin de bien mettre en contexte les travaux de ce mémoire, il sera ici présenté les différents systèmes de quantification de la fluorescence déjà développés par les collaborateurs du LRO.

2.2.1 Sonde neurochirurgicale permettant la quantification point par point

Au cours des dernières décennies un très grand nombre de techniques ont été développées pour la détection localisée (*in situ*) de signaux de fluorescence durant les interventions

chirurgicales [2], [3], [6]–[11], [14]–[16], [18], [20], [21], [36]–[40], [44]–[53]. Un de ces systèmes a été développé par le Dr. Wilson (UNH) et a été utilisé au Dartmouth-Hitchcock Medical Center afin de guider la résection de tumeurs du cerveau en utilisant le contraste optique associé à la Protoporphyrin IX (voir introduction pour les détails) [7], [8]. Ce système a été utilisé sur plus de 50 patients par le Dr Leblond et son équipe qui ont développé des algorithmes quantification et de classification des tissus afin d'évaluer le pouvoir diagnostique de ce marqueur métabolique [5]. Nous décrivons ici cette sonde et les algorithmes puisque la technique présentée dans ce mémoire en est une généralisation dans un contexte d'imagerie impliquant un très grand nombre de pixels plutôt qu'un seul point.

2.2.1.1 Instrumentation

Comme illustré à la figure 2-1, cette sonde est composée de 4 fibres optiques multi-modes disposées linéairement et espacées de 260 μ m (distance centre à centre). Deux fibres agissent en tant que source de lumière blanche. Une troisième fibre située à 260 μ m et 520 μ m des fibres de détection sert à la détection et est connectée à un spectromètre portable (OceanOptics, États-Unis) ayant une résolution spectrale de 0,35nm [5], [7]–[9]. La résolution spectrale d'un spectromètre est définie comme étant la plus petite différence en longueurs d'onde pouvant être distinguée. La quatrième fibre agit en tant que source de lumière bleue pour l'excitation du fluorophore et est située à 260 μ m du détecteur. Chacune des fibres a un cœur de 200 μ m de silice avec une ouverture numérique de 0,22. L'ouverture numérique d'un système optique est un nombre adimensionnel qui représente la plage angulaire dans laquelle le système peut accepter ou émettre la lumière. Les fibres sont encastrées dans une tige d'acier inoxydable de calibre 18 et la sonde est connectée par un fil de 3m au système de contrôle. La sonde est aussi stérilisable, ce qui est essentiel à l'utilisation d'un outil entrant en contact avec les tissus en chirurgie [9].

La sonde permet l'acquisition des données suivantes nécessaires à la quantification *in situ* de marqueurs fluorescents : (i) 2 spectres de réflectance (entre 450nm et 720nm) suivant l'excitation du tissu avec la lumière blanche, (ii) 1 spectre de fluorescence (entre 600nm et 720nm) suivant l'excitation à 405nm (lumière bleue). Les spectres de réflectance, correspondant à des distances source-détecteur différentes, sont utilisés pour déterminer les propriétés d'absorption, qui est dépendante de la concentration et saturation en hémoglobine, et de

diffusion, qui est dépendante des paramètres structuraux liés à la nature microscopique du tissu à l'aide d'un modèle de transport de la lumière [9].

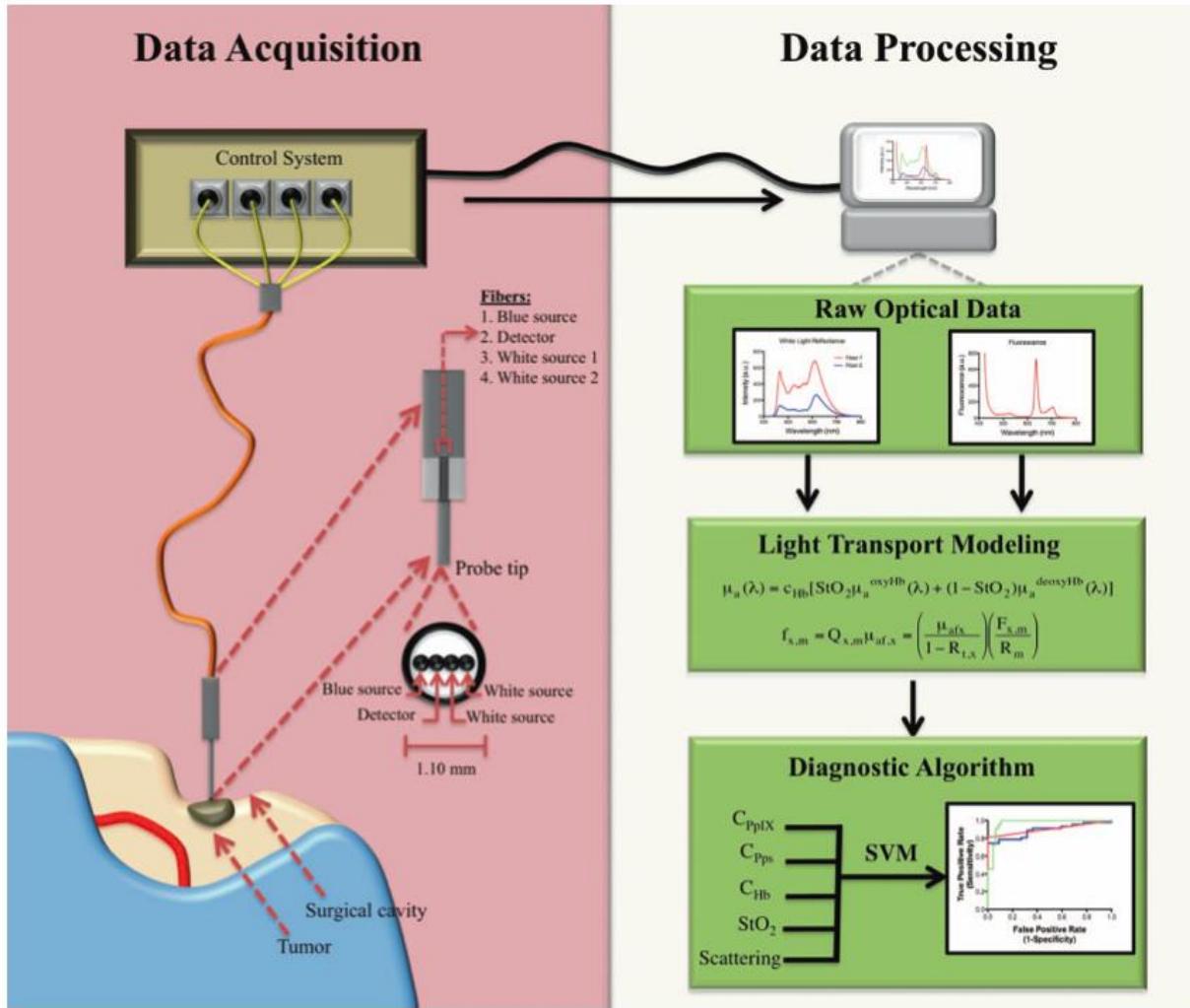


Figure 2-1: Diagramme conceptuel de l'acquisition et du traitement des données de la sonde [9]. Acquisition de données (gauche) : La sonde intraopératoire fibrée au diamètre à sa pointe d'environ 1,1 mm est déposée à la surface du tissu. Une illumination séquentielle de lumière blanche et bleue permet la collection de spectres de réflectance diffuse et de fluorescence en utilisant un spectromètre portable comme détecteur. Traitement de données (droite) : Les données de réflectance en lumière blanche sont entrées dans un modèle optique contraint spectralement (modèle de diffusion utilisant les spectres d'absorption de l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée en entrée) pour calculer l'absorption et la diffusion du tissu à chaque longueur d'onde. Ces propriétés sont utilisées pour corriger l'influence des propriétés optiques (atténuation) sur le spectre de fluorescence. Ensuite, un spectre corrigé de fluorescence est généré

duquel la concentration du fluorophore peut être calculée lorsque comparé avec les résultats d'une procédure de calibration comparant des mesures faites sur des concentrations connues. Les valeurs calculées de biomarqueurs, c'est-à-dire les concentrations de PpIX, photoproducts et hémoglobines (concentration totale et saturation), sont utilisées dans un algorithme de diagnostic pour classifier les régions interrogées en tant que tissu normal ou cancéreux.

2.2.1.2 Traitement de données menant à la quantification

Un modèle de transport de la lumière est utilisé pour estimer les propriétés optiques d'absorption et de diffusion élastique à partir des spectres de réflectance diffuse. Les algorithmes de traitement de données sont basés sur l'hypothèse que le transport de la lumière peut être décrit dans les tissus par l'équation de diffusion résolue avec les conditions limites d'un milieu semi-infini, homogène et optiquement turbide [7]. Un milieu turbide est un milieu opaque à cause de la présence d'un grand nombre de particules généralement invisibles à l'œil nu. Le tissu peut alors être caractérisé par son coefficient d'absorption μ_a et son coefficient de diffusion réduit μ_s' , exprimés en cm^{-1} . Ces propriétés sont calculées pour chacune des longueurs d'onde et ensuite appliquées à corriger les effets de distorsions dans le spectre de fluorescence [9],[54], [55]. Le spectre de fluorescence ainsi corrigé et quantitatif est décomposé (un utilisant un algorithme mathématique de dé-convolution spectrale) en 3 composantes, c'est-à-dire 1. PpIX 2. Différents photoproducts générés par l'exposition de la PpIX à la lumière durant la chirurgie 3. La fluorescence intrinsèque générée par différentes molécules dans les tissus. La concentration de PpIX est alors mesurée à partir du spectre corrigé en utilisant le spectre connu de la fluorescence à chaque concentration. Les spectres d'absorption et de diffusion sont ensuite utilisés de manière à obtenir les propriétés optiques intrinsèques au biomarqueur. Le spectre d'absorption peut être représenté par :

$$\mu_a(\lambda) = c_{Hb}[S_t O_2 \mu_a(\lambda)^{oxyHb} + (1 - S_t O_2) \mu_a(\lambda)^{deoxyHb}], \quad (4)$$

où $\mu_a(\lambda)^{oxyHb}$ et $\mu_a(\lambda)^{deoxyHb}$ sont les coefficients d'absorption de l'oxy- et deoxy-hémoglobine en fonction de la longueur d'onde à une concentration de 1g/mL, c_{Hb} représente la concentration totale d'hémoglobine et $S_t O_2$ représente la fraction de saturation en oxygène de l'hémoglobine [9].

Le coefficient réduit de diffusion des tissus est représenté par une fonction exponentielle en fonction de la longueur d'onde (loi de Mie),

$$\mu'_s(\lambda) = S_A \lambda^{-S_p}, \quad (5)$$

où S_A est l'amplitude de la diffusion et S_p est la puissance de la diffusion. Un modèle de réflectance diffuse et l'information *à priori* sur l'absorption et la diffusion sont combinés et un algorithme non-linéaire d'ajustement des courbes Levenberg-Marquardt, montrée en section 1.1.3 est utilisé pour extraire les paramètres libres, c'est-à-dire la concentration totale d'hémoglobine, la saturation en oxygène, l'amplitude de la diffusion et la puissance de la diffusion. La fluorescence quantitative peut quant à elle être déterminée à l'aide de l'équation suivante :

$f_{x,m} = Q_{x,m} \mu_{af,x} = \left(\frac{\mu_{a,x}}{1 - R_{t,x}} \right) \left(\frac{F_{x,m}}{R_m} \right)$, où $F_{x,m}$ est la fluorescence mesurée, R_m est la réflectance diffuse à la longueur d'onde d'émission, $Q_{x,m}$ est l'efficacité quantique du fluorophore, $R_{t,x}$ est la réflectance diffuse totale Plus de détails sur l'algorithme utilisé sont disponibles dans les articles Kim et al. [7]–[9].

2.2.1.3 Résultats cliniques

La sonde est testée dans une étude clinique sur plus de 25 patients à DHMC avec différents types de tumeurs du cerveau: gliomes de bas grade (LGG), gliomes de haut grade (HGG), méningiome, carcinome et métastase au poumon [5]. Des spectres correspondant à une biopsie sont enregistrés à différents moments lors des chirurgies. Les biopsies correspondant à un spectre sont analysées par un pathologiste en utilisant des méthodes d'histologie standard soit par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). Certains résultats sont montrés en figure 2-2. Une différence statistiquement significative est trouvée entre les spectres des tissus normaux et les spectres des tissus cancéreux ($p < 0,05$).

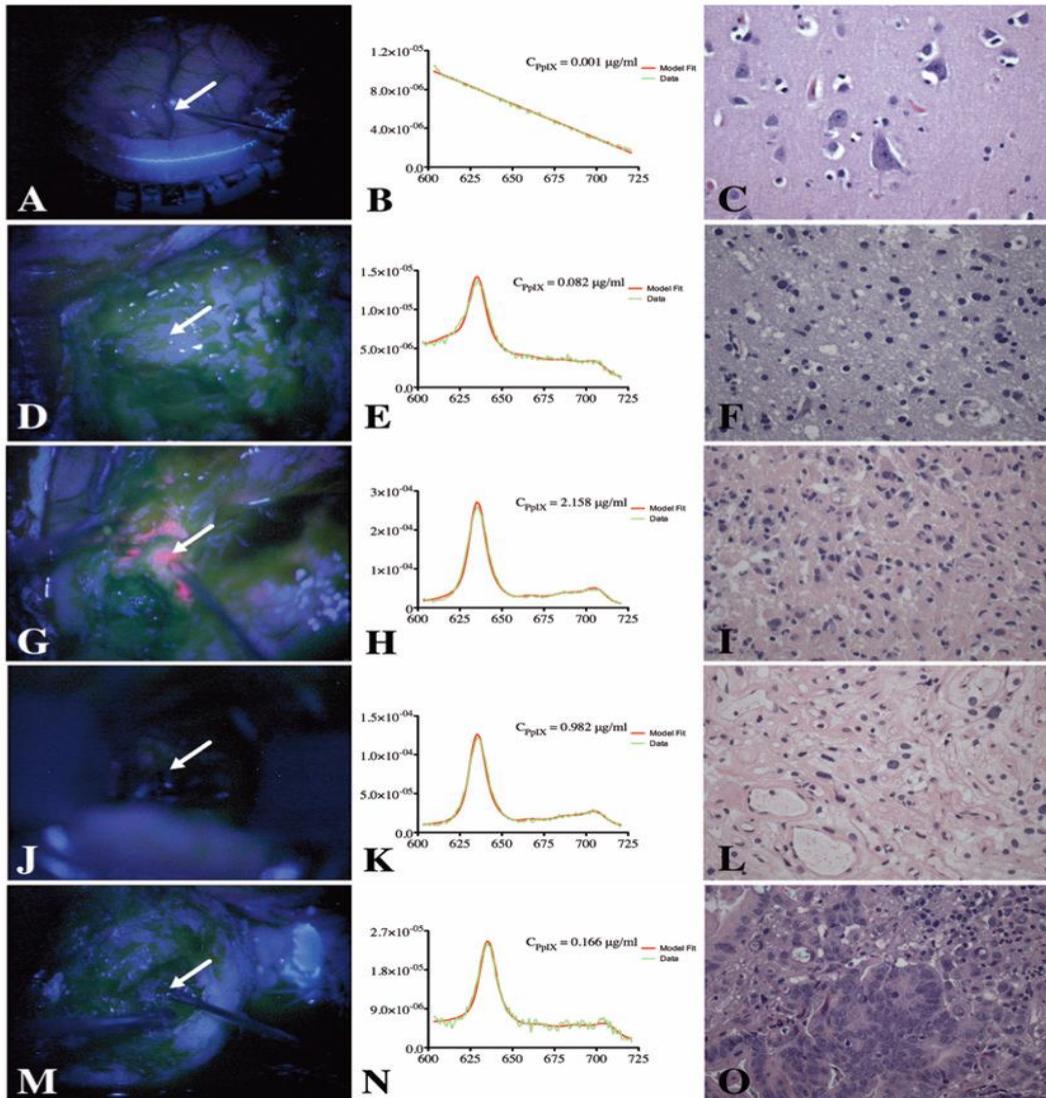


Figure 2-2: Mesures spectroscopiques in vivo de la PpIX induite par 5-ALA durant la chirurgie à crâne ouvert pour la résection de tumeur au cerveau [5]. **Gauche** : Image de la fluorescence lors de la chirurgie de la cavité chirurgicale visible par le chirurgien à travers le microscope neurochirurgical sous excitation par lumière bleue. **Milieu** : Spectre brut de la fluorescence (vert) et spectre corrigé quantitatif de la fluorescence (rouge) mesurés à chacun des sites interrogés. L'axe des y est en $\text{nm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et l'axe des x est en nm. **Droite** : Tranche histologique du tissu (H&E, magnification originale x40). Les rangés correspondent à : cotex normal (A-C), LGG (D-F), HGG (G-I), méningiome (J-L), and métastases (M-O).

Après analyse de la figure suivante, on remarque que non seulement la sonde peut-elle détecter de la fluorescence où la détection qualitative de microscope neurochirurgical peut en

déetecter, dans les gliomes de haut grade (G, H, I), mais elle peut aussi en détecter dans les gliomes de bas grades et autres types de tumeurs (D, J, M). Par contre, malgré ses résultats d'une sensibilité supérieure, une sonde ne permettant que des mesures ponctuelles n'est pas idéale durant une chirurgie. En effet, un tel outil, peut perturber le développement de l'opération du chirurgien. De plus, avec des mesures ponctuelles, il est possible que le chirurgien ne sonde pas une partie maligne du tissu [3], [7], [21]. Ainsi, un système d'imagerie en champ large imageant l'entièreté du champ opératoire serait préférable afin d'éviter ces problèmes. Un tel système en champ large, mais spectralement résolu, permettrait d'appliquer des algorithmes semblables à ceux utilisés avec la sonde, mais en chacun des pixels. On pourrait donc, de façon à semblable aux résultats présentés en figure 2-2, détecter de la fluorescence où le microscope neurochirurgical n'en voit pas.

2.2.2 Premier prototype d'imagerie en champ large

Au cours des dernières années, le Dr Leblond a développé, en collaboration avec le neurochirurgien Dr. David Roberts et Dr. Keith Paulsen, un système d'imagerie hyperspectral permettant la quantification de la fluorescence ainsi que la mesure de spectres de réflectance en lumière blanche afin de permettre la normalisation des signaux (i.e. évaluation d'un facteur de correction prenant en compte l'atténuation des tissus pour chaque pixel) [10]. Comme démontré à la figure 2-3, le système d'imagerie se connecte directement sur un microscope neurochirurgical par l'intermédiaire d'un adaptateur optique connecté à l'un des ports optiques de l'instrument. En effet, les microscopes neurochirurgicaux commerciaux sont habituellement équipés de quatre ports optiques. Deux ports sont utilisés par le neurochirurgien et un assistant, souvent un résident en médecine, qui peuvent visualiser la cavité chirurgicale à l'aide de paires de binoculaire avec un grossissement allant jusqu'à 10X, alors que deux autres ports sont disponibles pour de l'équipement optique supplémentaire.

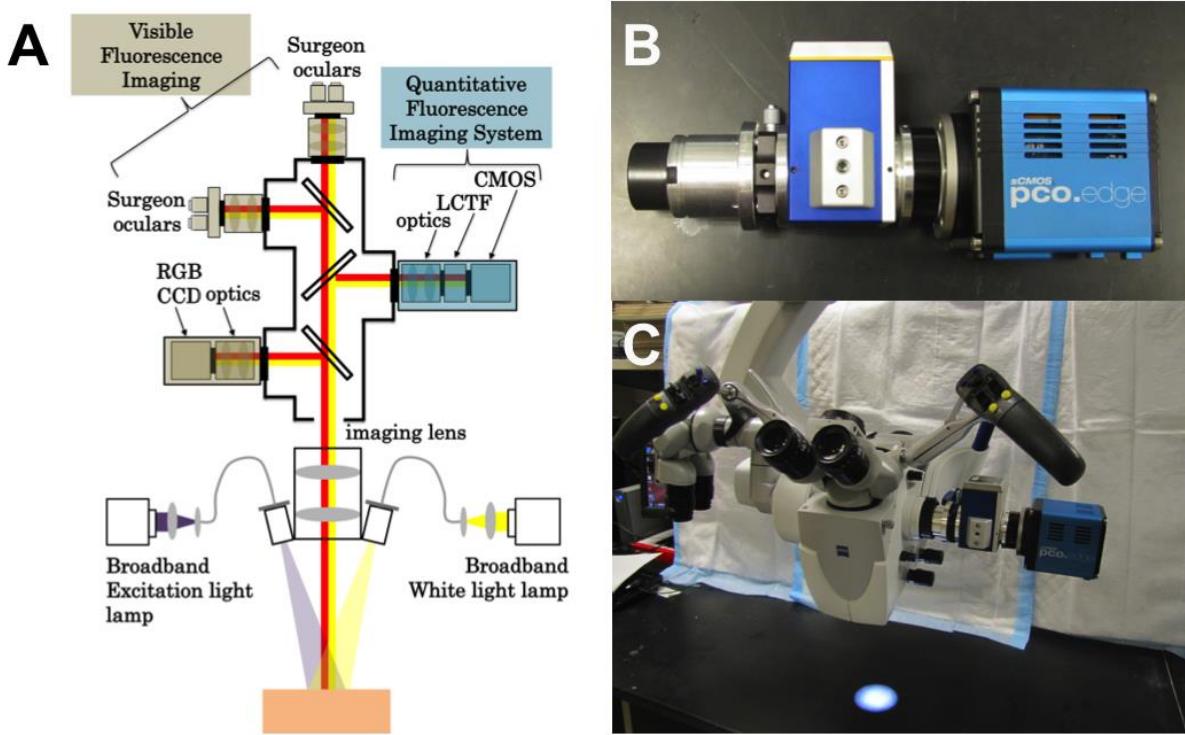


Figure 2-3: A) Schéma du système installé sur un port optique latéral libre d'un microscope neurochirurgical de la compagnie Carl Zeiss Meditech [10]. Les sources lumineuses sont celles incluses dans le microscope neurochirurgical Pentero. B) Image du système avec l'adaptateur optique, le filtre accordable et la caméra sCMOS. C) Image du système connecté à un port optique latéral libre du microscope neurochirurgical.

2.2.2.1 Instrumentation

Le système de quantification de la fluorescence en champ large est composé de 3 principaux éléments, c'est-à-dire un adaptateur pour la connexion au port optique latéral du microscope neurochirurgical, un filtre accordable à cristaux liquides (LCTF) pour la détection hyperspectrale de la fluorescence (suivant l'excitation) ainsi que de la réflectance diffuse (suivant l'éclairage avec une source blanche) et une caméra. Le système original, étant discuté dans les sections 2.3.4.1 et 3.1 utilisait une caméra CCD (PCO, Allemagne) [10]. Cependant, la caméra a été rapidement remplacée par une caméra sCMOS (PCO, Allemagne) à des fins de sensibilité du système [11]. C'est la version du système utilisant la caméra sCMOS qui est discutée dans les sections 2.3.4.2 et 3.2. L'ensemble du système est connecté à un ordinateur et est contrôlé par un

logiciel LabVIEW. L'adaptateur optique fait sur mesure vient connecter le microscope chirurgical au filtre accordable alors que des pièces optiques commerciales (Edmund Optics) viennent connecter le filtre à la caméra.

Le filtre accordable permet de balayer la plage optique entre 400nm et 720nm en filtrant de manière passe-bande avec une largeur à mi-hauteur de 7nm. La résolution spectrale de ces filtres est beaucoup moins précise que celle du spectromètre utilisé avec la sonde. Cependant, une résolution spectrale élevée n'est pas nécessaire, considérant les larges bandes d'émissions des fluorophores. Ainsi, il devient possible d'utiliser les mêmes algorithmes qu'avec la sonde point par point, mais cette fois-ci pour un très grand nombre de pixels [7], [10], [38]. L'avantage de ce filtre est sa versatilité lui permettant d'acquérir les images sur une large bande spectrale. Son désavantage se situe au niveau de sa transmission limitée dans la région spectrale d'intérêt. En effet, cette dernière varie en fonction de la longueur d'onde, mais est égale à ~48% à 635nm. De plus l'atténuation optique hors-bande (i.e. à l'extérieur de la bande d'intérêt) du filtre est limitée. Par conséquent, l'adaptateur optique a été fabriqué de manière à optimiser le signal recueilli en permettant au filtre accordable d'être opéré dans des conditions optimales. Pour ce faire, puisque la transmission et l'atténuation hors-bande sont maximales pour des rayons parallèles, les rayons optiques associés au plan image du microscope issus du port optique sont collimés lorsqu'ils parviennent au filtre. De plus, la spécificité des signaux est souvent limitée par la nature polychromatique des sources de lumière utilisées pour exciter les molécules fluorescentes. En effet, les sources de lumière utilisées pour exciter la fluorescence, souvent des diodes électroluminescentes (DEL), ne sont jamais parfaitement monochromatiques et adoptent une forme gaussienne telle que représentée à la figure 2-4. Aussi, le signal de réflectance de la lumière d'excitation est toujours plusieurs ordres de grandeur supérieurs à celui associé à la fluorescence [19]. C'est pourquoi l'atténuation hors-bande limitée des filtres LCTF peut être problématique puisqu'une fraction importante du signal non-fluorescent associé aux réflexions des sources d'excitation pourrait parvenir au photo-détecteur. Ainsi, pour éviter une situation où la source lumineuse viendrait contaminer le signal fluorescent détecté, un filtre interférentiel passe-haut doit être ajouté à la sortie du microscope. La même situation peut survenir avec la source d'illumination du microscope chirurgical Pentero, qui utilise une source au Xenon, dont le spectre habituel est montré en figure 2-5 avec un filtre passe-bande autour de 405nm. En effet, la forme spectrale d'une telle source est similaire à la forme spectrale d'une DEL [56].

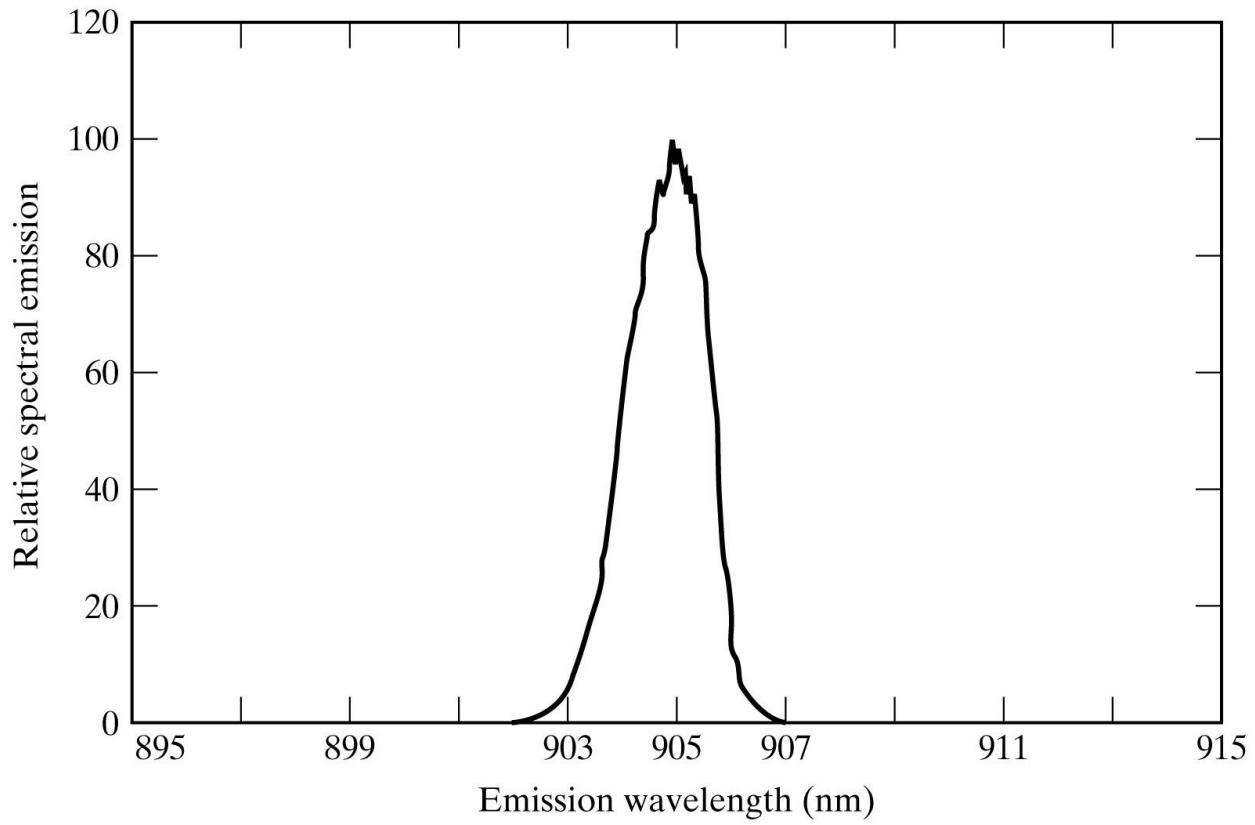


Figure 2-4: Spectre commun d'une diode électroluminescente [56].

© 2007 Pearson Prentice Hall, Inc.

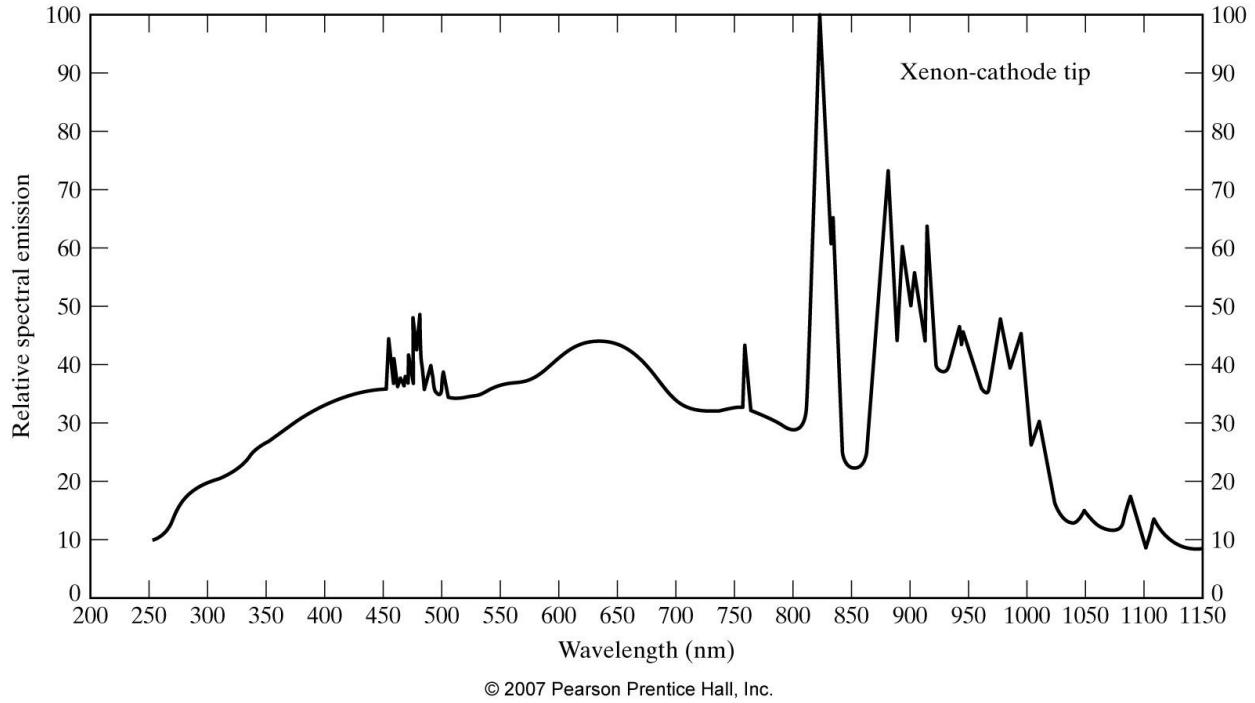


Figure 2-5: Spectre commun d'une lampe au Xenon [56].

La caméra CCD (premier prototype de l'équipe de Dartmouth), ayant une résolution 1396 x 1024 pixels et un bruit de lecture moyen de 7,3 électrons, est opérée avec un binning 2 x 2, c'est-à-dire que 4 pixels, formant un carré 2 x 2, sont additionnés pour créer un mégapixel, de manière à détecter plus sensiblement la lumière pour ensuite envoyer les données digitalisées à l'ordinateur. La caméra sCMOS (2^{ième} prototype de l'équipe de Dartmouth), ayant une résolution de 2560 x 2160 pixels et un bruit de lecture moyen de 1,3 électron, est opérée avec un binning 4 x 4, encore à des fins de sensibilités. En effet, en additionnant des pixels, on obtient plus de signaux. Il est à noter que, bien que le binning diminue la résolution spatiale, ceci n'est pas un problème en neurochirurgie, où une détection macroscopique est nécessaire. Le tout est contrôlé, au niveau de l'acquisition, du traitement de données et de l'affichage, par un logiciel conçu à l'aide du logiciel LabVIEW (National Instrument, États-Unis). Le champ de vue du chirurgien à travers le microscope est imité par le système avec les mêmes dimensions. Ainsi, à des distances standards de travail, les champs de vue imités varient entre 50 mm x 40 mm et 10 mm x 7,5 mm. Une acquisition hyperspectrale avec le système peut prendre entre 2 s et 8 s, dépendant des niveaux de fluorescence détectés [10], [11].

2.2.2.2 Traitement de données menant la quantification

Pour chaque acquisition hyperspectrale, un cube d'images est enregistré avec une résolution spectrale de 5 nm entre 450 nm et 720 nm sous illumination par lumière blanche suivie d'un cube d'images avec une résolution de 3nm entre 600 nm et 720 nm sous illumination à 405 nm pour la détection de PpIX. On définit par cube hyperspectral un cube où deux dimensions sont les composantes x et y de l'image et où la troisième dimension est la longueur d'onde à laquelle l'image a été acquise. Par la suite, un spectre est reconstruit pour chacun des pixels associés aux cubes. On obtient donc 2 spectres par pixel : un en réflectance et un en fluorescence. Le spectre de réflectance en lumière blanche peut alors être utilisé pour corriger le spectre de fluorescence détecté afin d'éliminer les contributions dues aux propriétés optiques d'absorption et de diffusion des tissus [29]. Une normalisation à deux bandes contrainte spectralement [38] est utilisée pour estimer la fluorescence indépendamment des propriétés optiques du tissu à l'aide de l'expression suivante :

$$\Phi_{Corrected}^{Fluo}(\lambda) = \Omega \frac{\Phi_{Raw}^{Fluo}(\lambda)}{\Phi_x^{Ref} \times (\Phi_m^{Ref})^\alpha}, \quad (6)$$

où $\Phi_{Raw}^{Fluo}(\lambda)$ est l'intensité de la fluorescence brute en fonction de la longueur d'onde; Φ_x^{Ref} et Φ_m^{Ref} sont le signal de réflectance intégré respectivement sur les plages $\lambda = 465 - 485$ nm et $\lambda = 625 - 645$ nm; Ω est un facteur de calibration dépendant de la puissance de la source lumineuse. La plage pour laquelle Φ_x^{Ref} est acquis est choisie de manière à être près de la longueur d'onde centrale d'excitation à 405nm pour approximer l'atténuation de la lumière due à l'excitation, alors que la plage Φ_m^{Ref} est choisie en fonction du pic d'émission de la PpIX aux alentours de $\lambda = 635$ nm. L'algorithme de correction assume que la majorité de l'atténuation lumineuse est due à l'absorption à la longueur d'onde d'excitation, mais la diffusion dans la bande d'émission peut aussi être corrigée par la fonction exponentielle empirique α de Φ_m^{Ref} , avec $\alpha = -0,7$. Ce facteur est obtenu empiriquement en imageant différents fantômes optiques avec la sonde d'imagerie présentée plus haut [10].

Pour chacun des pixels (x_i, y_i), le spectre de réflectance est intégré de manière à obtenir $\Phi_x^{Ref}(i)$ et $\Phi_m^{Ref}(i)$ et de manière à obtenir $\Phi_{Corrected}^{Fluo}(i)$ en normalisant $\Phi_{Raw}^{Fluo}(i)$ par ces quantités. La méthode des moindres carrés est appliquée aux spectres corrigés de fluorescence de

manière à décomposer spectralement les contributions individuelles des fluorophores principaux, soient la PpIX et l'autofluorescence des tissus à travers l'expression suivante

$$C^{rel} = (B^T B)^{-1} B^T \Phi_{Corrected}^{Fluo} \quad (7)$$

où $B = [b_1 b_2 \dots b_N]$ est une matrice des spectres de base pour N composantes de fluorophores, par exemple, PpIX, autofluorescence, fluorescéine, etc., et C^{rel} est un vecteur de concentration relative des fluorophores. Un facteur de calibration spécifique au système S_{cal} , dérivé des de la méthode des moindres carrés d'expériences sur des fantômes liquides de concentrations en PpIX connues décompose les concentrations relatives des fluorophores en concentration absolue pour chacun des pixels [10],

$$C^{abs} = S_{cal} C^{rel}. \quad (8)$$

2.2.2.3 Résultats cliniques

À l'automne 2012, 12 patients atteints de tumeur au cerveau avaient été imagés avec le système de quantification CCD, après avoir reçu 20 mg/kg de 5-ALA approximativement 3 heures avant la procédure chirurgicale, lors d'une étude clinique [10]. Ces résultats sont montrés en figure 2-6, où l'on voit une comparaison entre l'imagerie qualitative de la fluorescence incluse dans le microscope neurochirurgical Pentero (vFI) et l'imagerie quantitative du système hyperspectral CCD (qFI). Comme le révèle une analyse de cette figure, au début de la chirurgie, vFI montre une distribution hétérogène de la fluorescence alors que qFI démontre une image similaire, mais avec la présence significative de biomarqueurs précédemment non détectés. Les tissus normaux ne montrent pas de signe de tumeur maligne, ce qui est confirmé par la sonde décrite précédemment à la section 1.2.1. Une série similaire d'images vers la fin de la chirurgie ne montrent plus de signe de présence cancéreuse avec le vFI, alors que le qFI détecte des signes de tumeur résiduelle, ce qui est confirmé par l'histologie [10].

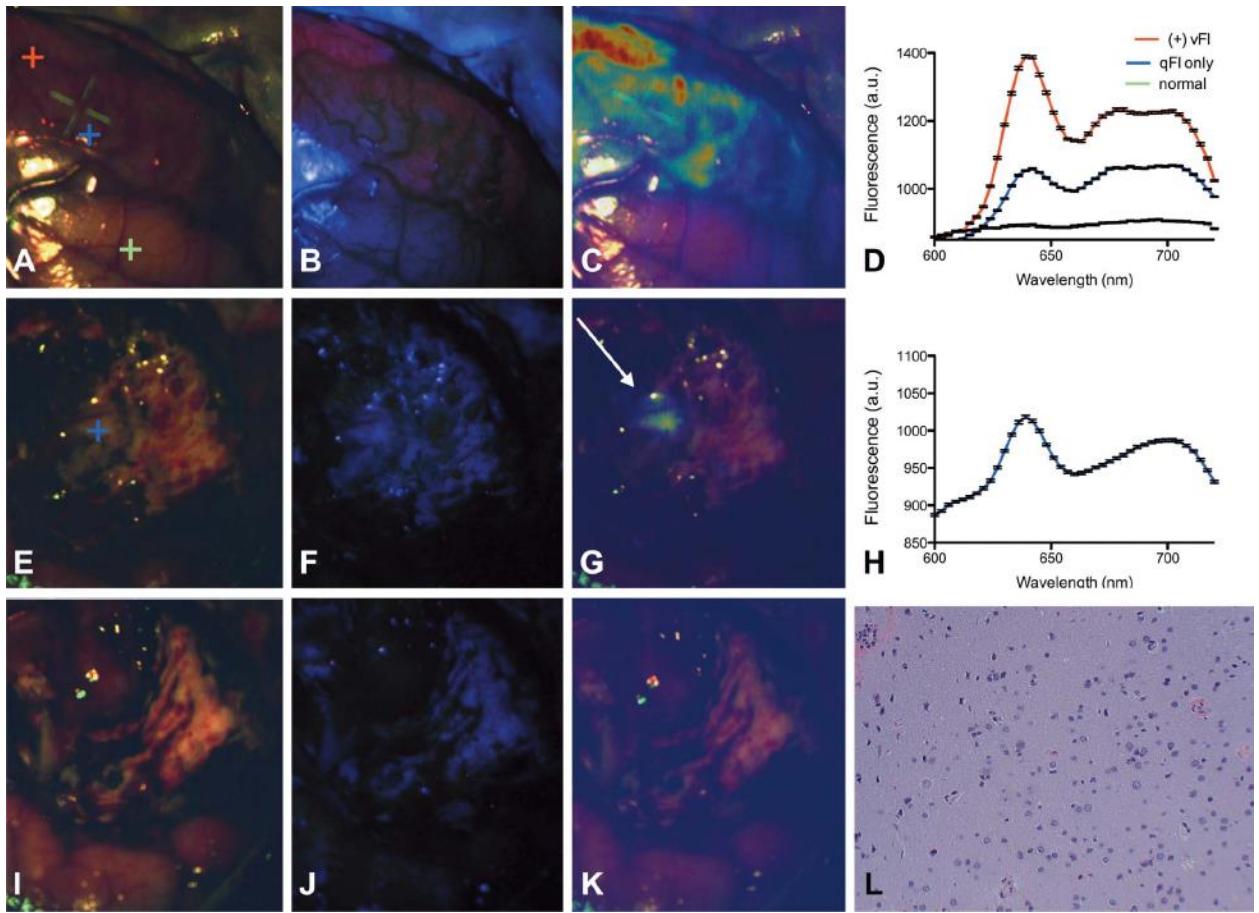


Figure 2-6: Images au début (A-C), près de la fin (E-G) et à la fin (I-K) de la chirurgie. Les images montrent de gauche à droite des images en lumière blanche, en vFI et en qFI + lumière blanche [10]. De hauts niveaux de PpIX sont évidents en début de chirurgie (B), alors que vers la fin de la chirurgie, aucune trace de PpIX ne demeure en vFI (F), alors que de niveaux significatifs de PpIX sont détectés en qFI près du centre du champ de vue (G) avec une confirmation en histologie de la nature cancéreuse du tissu (L). À la fin de la chirurgie, aucun niveau significatif de PpIX ne demeure en qFI (K). Les spectres obtenus au début de la chirurgie (D) à 3 emplacements (1 = positif en vFI, marque rouge en A; 2 = positif en qFI/négatif en vFI. Marque bleue en A; 3 = cerveau normal, marque verte en A), et un spectre acquis vers la fin de la chirurgie (H) à un emplacement (1= positif en qFI/négatif en vFI, marque bleue en E) sont aussi illustrés.

Cependant, même avec le nouveau détecteur sCMOS, le système en champ large, bien qu'il ne vienne pas perturber le plan de travail du chirurgien comme la sonde, est toujours significativement moins sensible que le système de détection ponctuelle fibrée [11]. En effet, le

système ici présenté a une sensibilité dans les dizaines de ng/mL de PpIX en tissus biologiques alors que la sonde a une sensibilité dans les unités de ng/mL [5], [11], [39]. Ainsi, il est pertinent de déterminer si une augmentation de sensibilité en champ large est possible sans compromettre la facilité d'installation du système sur le microscope neurochirurgical lors de la chirurgie [4].

2.3 Prototype d'imagerie ultra-sensible en champ large

Ainsi, l'objectif de cette maîtrise était de développer un système de quantification de la fluorescence en champ large permettant d'obtenir une sensibilité et une spécificité se rapprochant de celles de la sonde présentée en section 2.1. Nous avons donc développé un nouveau système d'imagerie en champ large pouvant être connecté au microscope neurochirurgical, mais possédant une sensibilité accrue par rapport aux systèmes grand champ existants. Pour ce faire, la première composante pouvant être changée est le détecteur. En effet, des expériences préliminaires, décrites en section 2.3.4 et en section 3.1, ont prouvé qu'il y avait effectivement un besoin de sensibilité accrue en quantification hyperspectrale en champ large de la fluorescence durant la chirurgie. Ceci est dû au fait que ce type d'acquisitions est en faible flux photonique, ce qui fait que le seuil de bruit est limité par le détecteur et non la pollution lumineuse ou le bruit photonique. De ce fait, nous nous sommes tournés vers un détecteur de très grande sensibilité, la caméra EMCCD. Par contre, étant donné que ces caméras sont généralement significativement plus lourdes et volumineuses que les caméras CCD et sCMOS non refroidies, qui sont habituellement utilisées dans ce genre de système, la caméra EMCCD ne peut être connectée directement au microscope. En effet, la tête du microscope a une limite de poids supportable que la caméra ferait dépasser et, de plus, la taille de la caméra viendrait encombrer le chirurgien lors de la chirurgie. De ce fait, la caméra doit être connectée au microscope par un intermédiaire optique qui viendrait éloigner la caméra du microscope. Cependant, un tel intermédiaire risque de significativement réduire le budget photonique disponible à la caméra. De ce fait, une fois le système conçu et assemblé, une caractérisation et comparaison détaillée avec le système précédent et de mise pour vérifier que la sensibilité accrue du détecteur n'est pas contrebalancée par la perte en intensité lumineuse amenée par l'intermédiaire connectant la caméra au système. La conception initiale du nouveau système de quantification est illustrée en figure 2-7.

Ce chapitre traite de l'importance du choix d'un détecteur adapté à notre application, de la conception personnalisée du logiciel contrôlant le système développé, de l'intégration optique et

mécanique du système au microscope neurochirurgical et, finalement, une description des expériences préliminaires et de caractérisation est donnée.

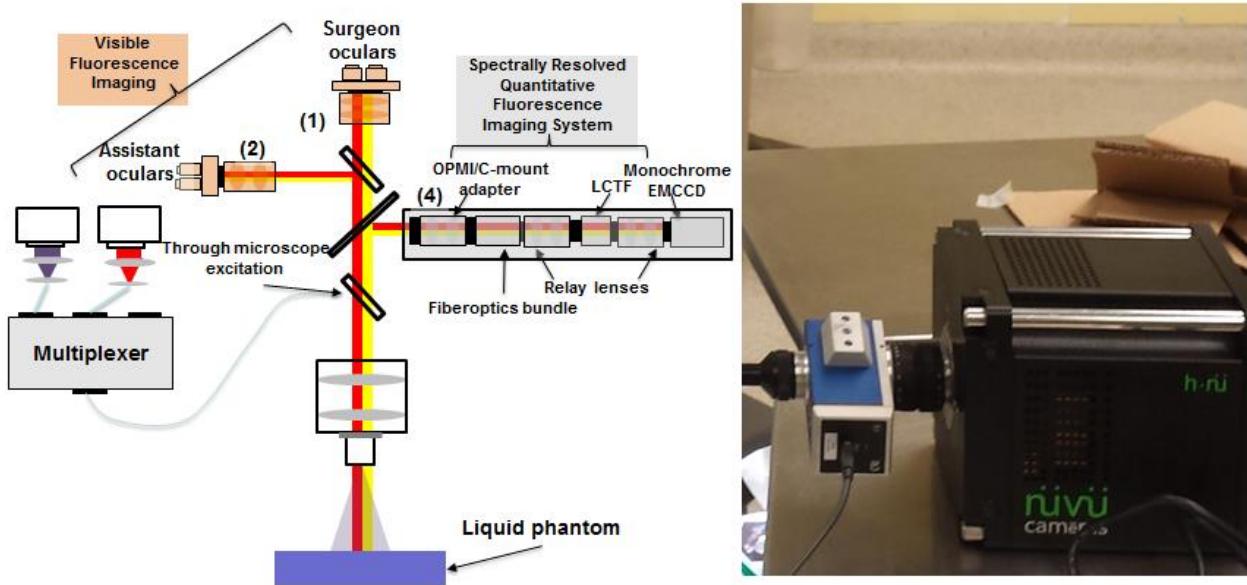


Figure 2-7: Gauche: Schéma du système ultrasensible en champ large connecté à un port optique latéral libre d'un microscope neurochirurgical Zeiss par l'intermédiaire d'une guide optique d'imagerie. Le système d'illumination ici montré est un système expérimental allant sur le microscope du laboratoire LRO, qui n'a pas de source lumineuse incluse. Le système peut aussi être utilisé avec la source d'un microscope Zeiss PENTERO. Droite: Image du système ultrasensible.

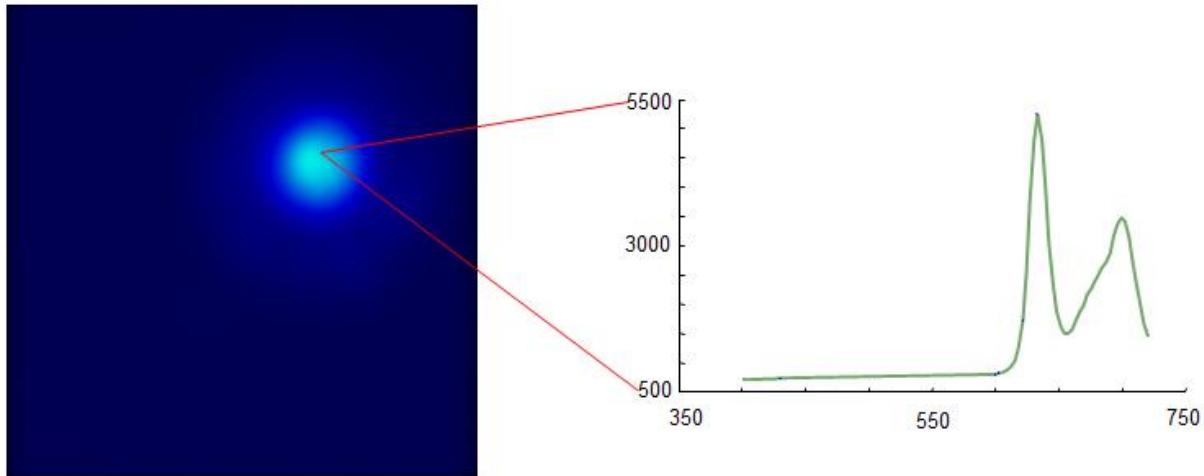


Figure 2-8: Image conceptuelle de la détection spectralement résolue de la fluorescence en champ large. On voit une inclusion de fluorescence dans un fantôme liquide à gauche et le spectre de fluorescence associé à un pixel à droite.

2.3.1 DéTECTEUR D’IMAGERIE

Le détecteur que nous avons choisi est l'hNü de Nüvü Caméras, illustré à la figure 2-9. Le concept électronique de cette caméra a été conçu par Olivier Daigle, Ph.D., co-fondateur de Nüvü Caméras et co-directeur de cette maîtrise. Il s'agit d'un détecteur de type EMCCD, comme présenté à la section 1.3.4. Les spécifications techniques et mécaniques de la caméra sont présentées dans la table 2-1 et se comparent très avantageusement à celles des caméras CCD et sCMOS entre autres en ce qui concerne le bruit de lecture effectif, le bruit thermique et l'efficacité quantique.



Figure 2-9: Caméra EMCCD hNü de Nüvü Caméras. Source : <http://www.nuvucameras.com>

La sensibilité supérieure de cette caméra est due à plusieurs facteurs. Premièrement, la caméra est refroidie à l'aide d'un module Peltier à une température de -85°C de manière à minimiser le bruit thermique. De plus, le gain EM de cette caméra peut être poussé jusqu'à 5000, de manière à minimiser le bruit de lecture. Finalement, Nüvü Caméras a développé une technologie qui différencie leur caméra des autres caméras EMCCD. En effet, à très faible flux lumineux, les caméras EMCCD commencent à être dominées par l'injection de charge, une source de bruit causée la transition de signaux électriques utilisés pour lire la caméra. Afin de minimiser cet effet qui vient polluer les images, la technologie brevetée de Nüvü Caméras vient contrôler de manière plus efficace et plus versatile les signaux électriques.

Cette amélioration du seuil de bruit de cette caméra permet entre autres d'opérer en mode comptage de photon, un mode de traitement des images beaucoup plus sensible que le mode traditionnel, ou linéaire de la caméra. Effectivement, en mode linéaire, après la lecture de chacun des pixels amplifiés, on vient diviser le nombre d'électrons dans chacun des pixels par le gain moyen utilisé durant l'acquisition. Cependant, étant donné que, comme mentionné dans la section 1.3.4, le processus de multiplication des électrons en avalanche est stochastique, les électrons dans chaque pixel ne sont pas nécessairement divisés par la valeur exacte par laquelle ils ont été multipliés. Ainsi, le nombre d'électrons déterminé dans chacun des pixels ne correspond pas toujours au nombre de photons ayant frappé le détecteur. Ceci induit une source de bruit supplémentaire, appelé le facteur de bruit excédentaire, comme mentionné précédemment.

Tableau 2-1: Spécifications de la caméra EMCCD hNü de Nüvü Caméras

Spécifications		hNü de Nüvü Caméras
Gain EM maximal		5000
Bruit de lecture:		
Mode EM avec gain		< 0.1 ē @ 20MHz
Mode conventionnel		3 ē @ 100kHz
Vitesse horloge verticale	EM	0.3 - 5 µs
	Conv	0.3 - 5 µs
Bruit thermique		0.0002 ē/pixel/s
	Maximum	0.001 ē/pixel/s
Injection de charge		< 0.001 ē/pixel/frame
Efficacité de transfert de charges		> 0.999993
Probabilité de détection photonique (EM gain = 5000)		> 91 %
Aire active		512 × 512 pixels 16 µm × 16 µm pixel area 8.19 mm × 8.19 mm Aire effective
Taille (mm)		155 × 155 × 178

Ce facteur réduit le RSB d'un facteur de $\sqrt{2}$, ce qui est l'équivalent de voir l'efficacité quantique du détecteur réduite de moitié [34]. Pour contourner ce problème, une caméra peut opérer en mode comptage de photons. En effet, le comptage de photons est un mode binaire : un pixel ayant un nombre d'électrons après amplification supérieur à un certain seuil est considéré comme ayant détecté un seul photon. Un pixel ayant une valeur inférieure à ce seuil est considéré comme

n'ayant détecté aucun photon. Ainsi, la valeur moyenne du processus stochastique de multiplication n'entre pas en compte dans la détermination du nombre de photons détectés. Il n'y a donc aucun effet d'ENF, ce qui augmente significativement le RSB. Par contre, ce mode de traitement d'image a deux limitations majeures. En effet, étant donné que ce mode ne peut détecter qu'un ou aucun photon par pixel, tout pixel ayant détecté plus d'un photon aura une valeur finale faussée par le mode comptage de photon. De ce fait, ce mode ne peut être utilisé qu'avec de flux lumineux extrêmement faibles. De plus, la quantité de photons détectés par ce mode est directement dépendante du seuil déterminé. Étant donné que ce seuil est dépendant du niveau de bruit de la caméra, seulement une caméra capable de générer un très grand gain peut opérer dans ce mode efficacement. C'est pourquoi la technologie de Nüvü Caméras rend cette caméra idéale pour cette application [34].

2.3.2 Conception logicielle

Au niveau de l'implémentation logicielle, c'est-à-dire le contrôle et la synchronisation des différentes composantes du système à l'aide d'une interface utilisateur, une simple modification du logiciel développé pour le système d'imagerie hyperspectrale précédent était possible. En effet, la fonction requise du logiciel pour le nouveau système est la même et les composantes sont les mêmes, à l'exception du détecteur, que celui développé au Dartmouth College. Il s'agit d'un code LabVIEW (National Instrument, États-Unis), ce qui rend la modification d'un tel code accessible à tous. De ce fait, une modification au niveau de la programmation de la caméra devrait être suffisante. Cependant, après avoir travaillé quelque temps avec ce logiciel, il devient évident qu'il serait préférable de concevoir un nouveau logiciel adapté à notre système. En effet, considérant la complexité et la structure du code, des modifications cohérentes et successives du logiciel deviennent un problème, particulièrement considérant que cette tâche doit pouvoir être faite rapidement par n'importe quel étudiant du laboratoire contribuant au projet. Ainsi, un nouveau code, programmé avec commentaire et simplicité d'utilisation en tête, devient essentiel.

Ainsi, un programme développé avec LabVIEW doit être programmé, permettant de contrôler tous les paramètres d'une caméra et d'un filtre accordable à travers une interface utilisateur et de permettre une acquisition où la caméra acquiert une image par longueur d'onde

sur une bande spectrale déterminée et variable tout en affichant et enregistrant chacune des images en temps réel. Un premier logiciel est développé pour un système d'imagerie préliminaire utilisant une caméra CCD Pixelfly USB (PCO, Germany). Ce programme est un premier prototype idéal étant donné que la compagnie de la caméra a fourni un code exemple pour acquérir des images sans les sauvegarder. L'interface de ce programme est montrée en figure 2-10.

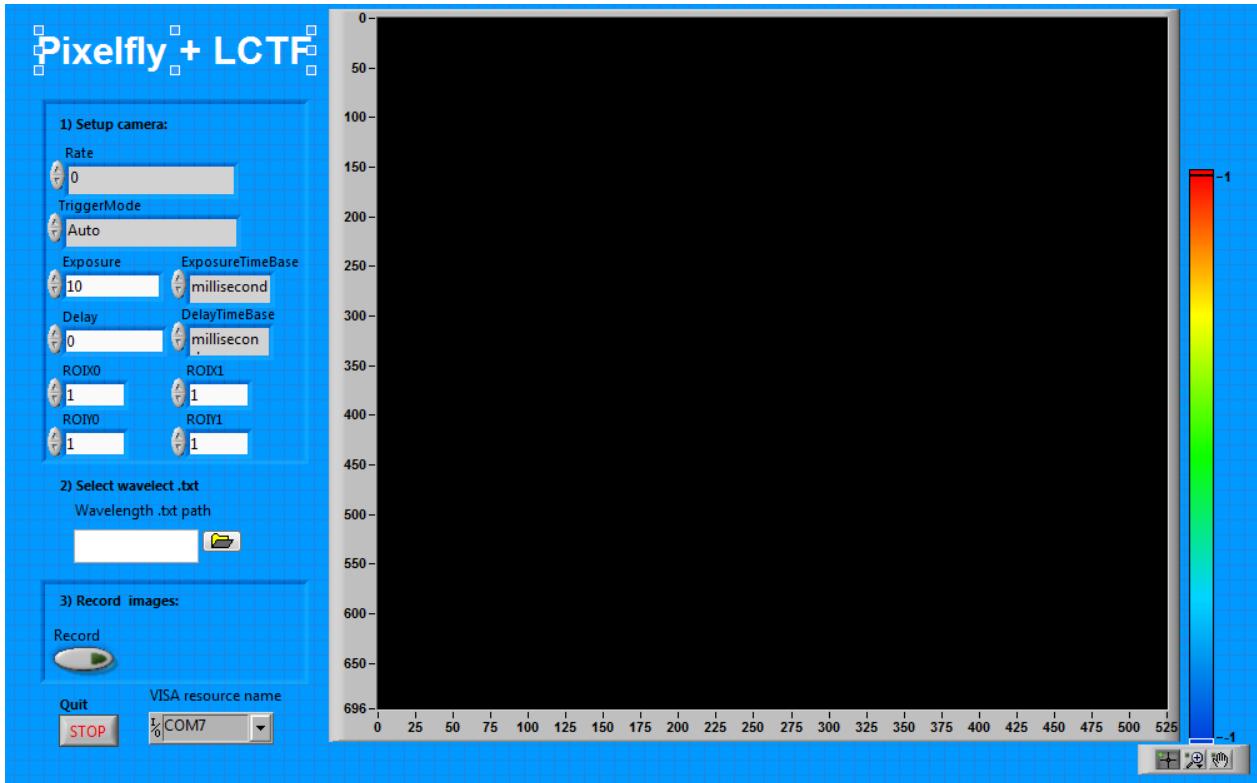


Figure 2-10: Interface utilisateur en LabVIEW pour contrôler et synchroniser le LCTF avec une caméra CCD. Les images acquises sont affichées et sauvegardées en temps réel.

Par la suite, un logiciel doit être développé pour contrôler la caméra hNü de Nüvü Caméras. Par contre, cette caméra n'est contrôlable que par un fichier .dll en C++. De ce fait, la stratégie utilisée pour contrôler ce détecteur doit être différente. Le premier logiciel développé à cet effet utilise une librairie .dll que nous avons programmé sur mesure pour notre programme en y appelant les fonctions de la .dll originale de Nüvü. De cette façon, en appelant une fonction de ce .dll dans LabVIEW, on peut effectuer des actions complexes, ce qui simplifie grandement le logiciel. Cependant, un logiciel ainsi programmé est spécifique à une application. Il faut donc modifier le .dll en C++ à chaque fois que l'on veut faire une modification attrayante à la caméra.

Ce logiciel est programmé avec l'aide du laboratoire de Nicolas Godbout. Cette interface est montrée en figure 2-11.

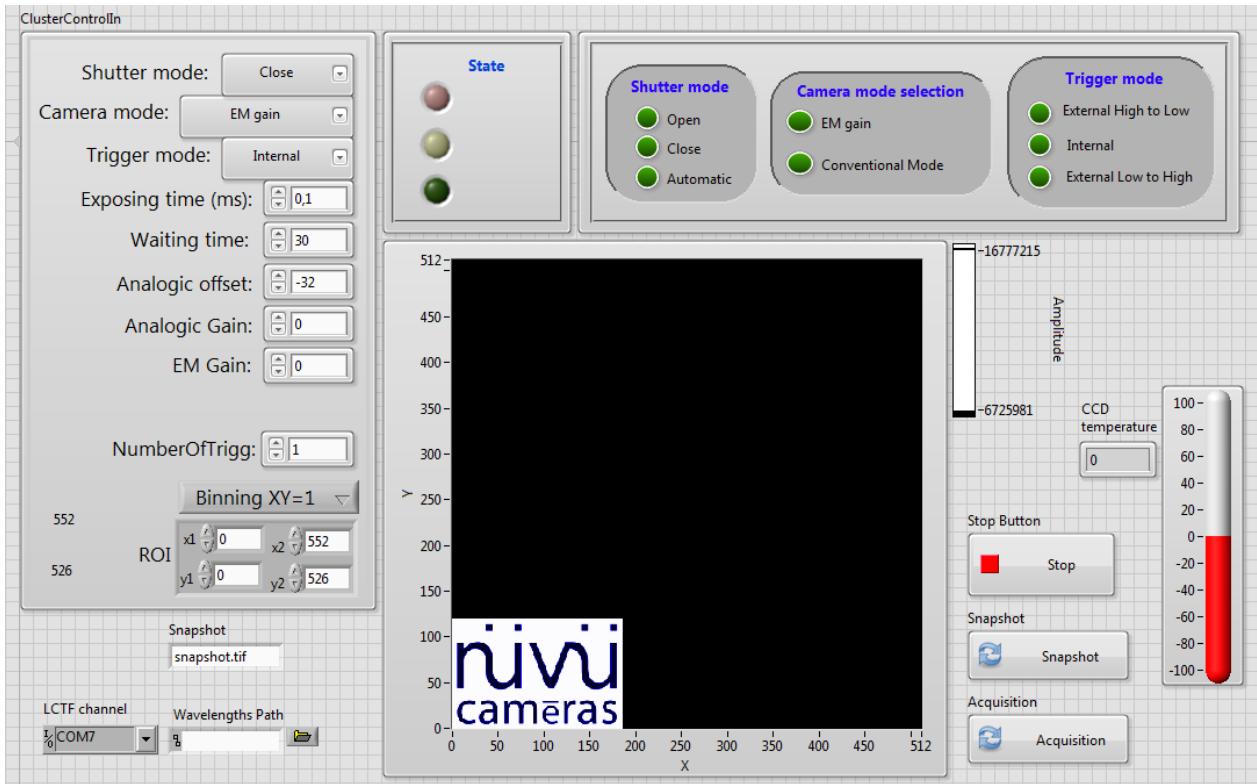


Figure 2-11: Interface utilisateur en LabVIEW pour contrôler et synchroniser le LCTF avec une caméra EMCCD. Les images acquises sont affichées et sauvegardées en temps réel.

Finalement, afin d'avoir un code plus versatile, une version finale est développée où l'on vient contrôler la caméra EMCCD en appelant directement dans LabVIEW la .dll fournie par Nūvū Caméras. De cette manière, on a un contrôle complet sur la caméra directement avec LabVIEW. Par contre, le programme en est complexifié et faire ainsi appel à la .dll demande une connaissance plus avancée du fonctionnement de la caméra. Par contre, un structurant et en commentant adéquatement le logiciel, ceci n'est pas un problème. Une fois ce code développé, il a été adapté, avec l'aide d'étudiants dans le cadre d'un projet de fin d'étude en génie biomédical, pour contrôler deux caméras. Cette interface est développée avec l'aide du laboratoire de Frédéric Leblond. Le logiciel final est montré en figure 2-12.

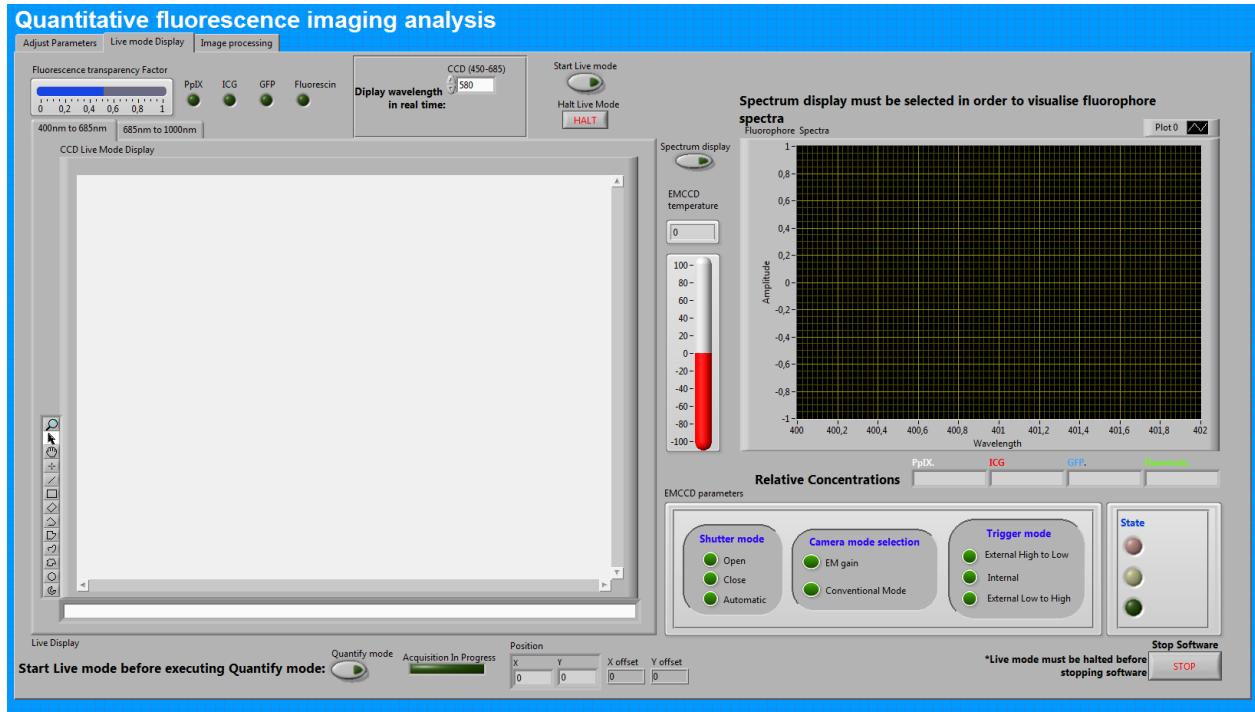


Figure 2-12: Interface utilisateur en LabVIEW pour contrôler et synchroniser le LCTF avec une caméra CCD et une caméra EMCCD. Les images acquises sont affichées et sauvegardées en temps réel.

2.3.3 Intégration au microscope neurochirurgical

Pour que notre caméra hyperspectrale soit utilisée en salle d'opération durant une chirurgie, plusieurs facteurs sont à prendre en considération. Premièrement, le système doit être facilement transportable et installable sur le microscope neurochirurgical. En effet, la salle d'opération est extrêmement occupée durant la chirurgie et dans les heures la précédent. De ce fait, le système doit pouvoir être amené dans la salle de chirurgie et installé en quelques minutes. De plus, étant donné qu'un tel système ne peut être stérilisé, il doit pouvoir être amené et installé à l'extérieur de champ stérile de l'opération et, préféablement, sous le drap chirurgical enveloppant le microscope. De ce fait, chacune des composantes du système ont été choisies de manière à pouvoir être installées facilement sur un chariot de chirurgie, comme on peut le voir en figure 2-13.



Figure 2-13: Système ultrasensible en champ large en salle d'opération sur un chariot chirurgical.

D'autre part, il est important que le système ne vienne pas déranger le chirurgien lors de la chirurgie, soit par son poids, soit par sa taille. De ce fait, considérant que la caméra que nous utilisons est plus lourde et volumineuse que les caméras précédemment utilisées, on ne peut la connecter directement au microscope. Pour ce faire, on utilise un guide cohérent de fibres optiques (Schott, Allemagne). On connecte donc le guide à un port optique latéral du microscope avec un adaptateur mécanique fait sur mesure qui vient aussi focuser l'image acquise sur l'aire active du guide. À la sortie du guide optique, un objectif, aussi fait sur mesure, vient imager l'aire active du guide et ensuite collimer la lumière. La lumière collimée passe ensuite dans le filtre accordable et est finalement imagée par un objectif connecté à la caméra. Les détails de l'optique utilisée sont présentés en annexe A.

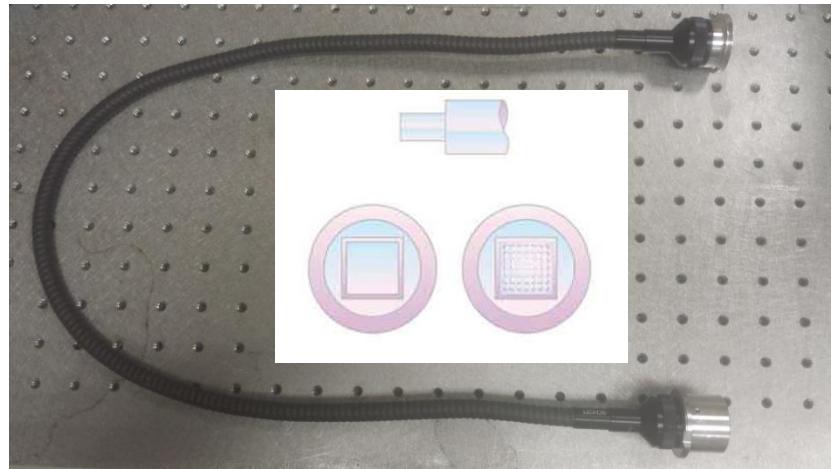


Figure 2-14: Guide optique de 91cm de long avec une aire active de 400 x 400 fibres optiques 10 μ m.

Par contre, un tel guide optique entraîne d'importantes pertes photoniques. En effet, le guide optique de 3 pieds que nous avons utilisé pour ces expériences entraîne des pertes de 28%. De plus, notre collimateur situé entre le guide optique et le filtre accordable ne collecte que 40% de la lumière totale. On collecte donc moins de 30% de la lumière qui serait collectée par un système directement connecté au microscope. Ainsi, malgré le fait que nous ayons un système avec un détecteur beaucoup plus sensible, il est important de comparer le nouveau système au système précédent pour s'assurer que la sensibilité du détecteur n'est pas contrebalancée par les pertes entraînées par les autres composantes optiques.

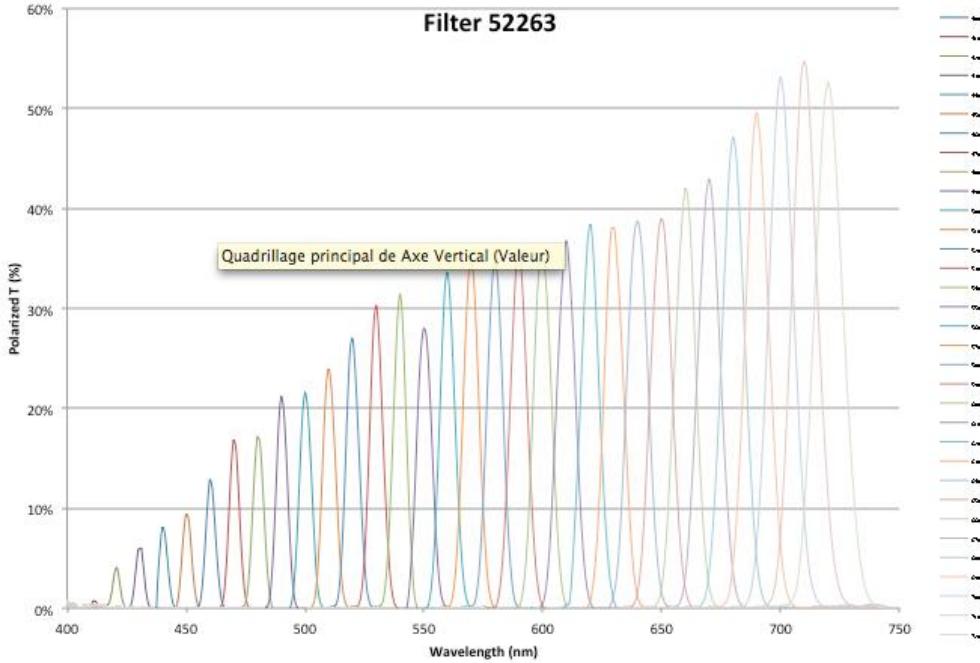


Figure 2-15: Graphique de transmission de la lumière du filtre LCTF visible utilisé. Source : spécifications VariSpec.

2.3.4 Expériences préliminaires et de caractérisation

2.3.4.1 Expérience préliminaire : besoin de sensibilité

Pour concevoir un système de quantification de la fluorescence plus sensible que le système précédent, la solution évidente est d'utiliser un détecteur d'une sensibilité accrue. Cependant, si le système est dominé par des sources de bruits autres que le bruit de la caméra utilisée, une amélioration de l'œil du système n'augmenterait pas sa sensibilité. En effet, le bruit de grenaille, qui est proportionnel à \sqrt{N} , où N est le nombre de photons détecté, peut rapidement devenir la source de bruit dominante si le budget photonique est élevé et si on considère que la pollution de la lumière ambiante est minimisée adéquatement. De ce fait, avant d'allier de l'avant avec un nouveau système intégrant une caméra plus sensible. Une simulation de l'influence de la sensibilité de la caméra sur le seuil de bruit du système en fonction du bruit de grenaille est présentée à la section 3.1.

Une caméra EMCCD de Nüvü caméra est amenée au Dartmouth-Hitchcock Medical Center, où le système de quantification de la fluorescence en champ large développé par le

Thayer School of Engineering est installé. Ainsi, il est possible de substituer l'œil de ce système par la caméra EMCCD et comparer la sensibilité du système avec chacun des détecteurs. Pour ce faire, des inclusions fluorescentes à deux différentes concentrations sont imagées dans un fantôme liquide à différentes concentrations et différents temps d'intégration. Le fluorophore utilisé dans cette expérience est l'alexa fluor 647 (Fisher Scientific, États-Unis). Ce fluorophore est utilisé pour simuler la fluorescence de la PpIX excitée à 635 nm, à un pic d'absorption secondaire. L'avantage de travailler avec l'alexa est son efficacité quantique et sa stabilité. L'inclusion fluorescente est immergée dans un fantôme liquide imitant les propriétés optiques du cerveau, avec l'hémoglobine (Sigma Aldrich, États-Unis) comme absorbeur et de l'intralipide comme diffuseur. Les propriétés optiques du fantôme optique à 635 nm sont $\mu_a = 0,04 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$.

Le système est connecté au microscope neurochirurgical OPMI FC-1 (Carl Zeiss Meditech, Allemagne) du DMHC. Le fluorophore est excité par un laser à 635nm CW (7404, Intense Co., USA). Il est à noter que, dans cette situation, la caméra EMCCD est connectée directement au microscope avec un support pour son poids, étant donné qu'on cherche à déterminer l'influence de la sensibilité du détecteur sur le système et non de créer un contexte réaliste à la chirurgie. Les résultats de cette expérience sont présentés à la section 3.1

2.3.4.2 Comparaison de sensibilité

Une fois le nouveau système construit, il est important de comparer ce nouveau système hyperspectral au système précédent. En effet, considérant les pertes photoniques importantes qu'entraîne l'optique nécessaire à connecter la nouvelle caméra au port optique du microscope, il faut déterminer si le nouveau système sera plus sensible que l'ancien et, dans le cas échéant, quantifier ce gain en sensibilité. Pour ce faire, la caméra hyperspectrale précédente, se connectant directement au microscope et utilisant une caméra sCMOS comme détecteur, a été amenée à Polytechnique Montréal. Ainsi, il est possible de connecter les deux systèmes simultanément aux ports optiques latéraux du microscope neurochirurgical NC-31 (Carl Zeiss, Allemagne) du Laboratoire de Radiologie Optique. De ce fait, il devient possible d'imager simultanément des fantômes fluorescents avec les deux systèmes en considérant seulement l'influence des caméras hyperspectrales comme contributeurs. Ainsi, on prépare 9 fantômes liquides avec différentes propriétés optiques à 4 différentes concentrations de fluorophore, c'est-à-dire à 5000, 1250, 313

et 78ng/ml. On vient ensuite les imager en réflectance et en fluorescence à 5 différents temps d'intégration de manière à comparer adéquatement la sensibilité des deux systèmes. On a donc 216 cubes hyperspectraux par caméras. Les détails sur les fantômes imités sont présentés dans la table 2-2. Les fantômes sont montrés à la figure 2.16.

Tableau 2-2: tableau résumant les propriétés d'absorption et de diffusion des fantômes liquides utilisés dans cette expérience. Les valeurs données dans le tableau sont mesurées à 405 nm.

	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
μ_a (cm ⁻¹)	20	20	20	40	40	40	60	60	60
μ_s' (cm ⁻¹)	15	20	25	15	20	25	15	20	25

Pour ces fantômes, l'absorbeur est du colorant alimentaire jaune (McCormick, Canada), le diffuseur est de l'intralipide et le fluorophore est de la PpIX (Sigma Aldrich, États-Unis). Les fantômes sont imités sous une boîte noire de manière à minimiser la pollution de la lumière ambiante et le fluorophore est excité à l'aide d'un laser à 405nm CW (Coherent inc., États-Unis). Il est ainsi possible de comparer adéquatement les deux systèmes. Cependant, étant donné qu'on utilise un microscope NC-31, qui n'est plus utilisé en chirurgie et que, de ce fait, on doit utiliser un laser comme source lumineuse, on ne peut mesurer la concentration absolue la plus faible de PpIX détectable avec les systèmes en chirurgie. Pour ce faire, il faut effectuer une expérience semblable, mais sur un microscope utilisé lors des chirurgies, qui intègre sa propre source lumineuse.

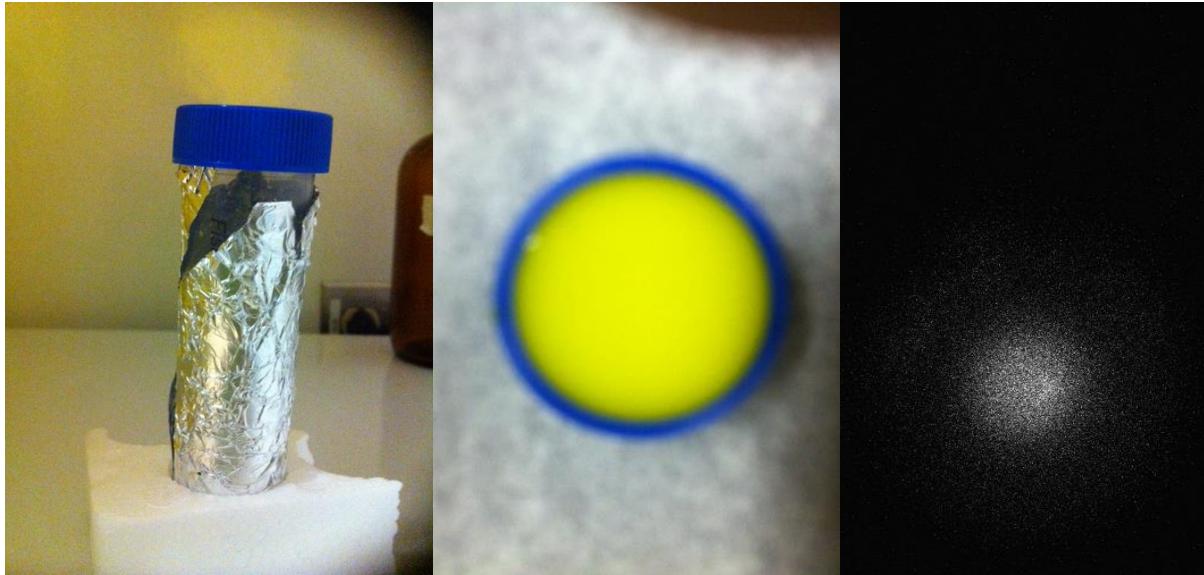


Figure 2-16 : Fantômes liquides utilisés pour la comparaison de sensibilité. Gauche : dans l'éprouvette. Milieu : Prêt à être imager. Droite : Image prise d'un fantôme avec la caméra EMCCD à 638nm.

Pour cette raison, une deuxième expérience est réalisée, mais cette fois à l'Institut de Neurologie de Montréal (MNI). Les deux systèmes sont donc connectés à un microscope neurochirurgical Pentero (Carl Zeiss Meditech, Allemagne). Ainsi, il est possible d'imager des fantômes fluorescents simultanément avec les deux caméras hyperspectrales, de la même manière qu'à l'expérience précédente. Encore une fois, on vient imager des fantômes aux propriétés optiques présentés dans la table 2-3. Ces fantômes comportent 4 différentes concentrations de PpIX, soit : 5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 200ng/mL, 40ng/mL et 8ng/mL. On vient cette fois comparer les caméras sur jusqu'à 8 temps d'acquisition. On a donc 324 cubes hyperspectraux par mode d'acquisition. Les résultats de ces deux expériences sont présentés à la section 3.2

CHAPITRE 3 RÉSULTATS

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, certaines applications de chirurgie guidée par la fluorescence requièrent la détection de très faibles concentrations de marqueurs fluorescents associées à des cellules cancéreuses. En particulier, il a été présenté que les techniques actuelles de neurochirurgie (imagerie par résonance magnétique, microscopes chirurgicaux, imagerie de la fluorescence associée à la molécule PpIX) sont incapables de détecter les cellules invasives pour les gliomes de haut grade (glioblastomes) ainsi que de détecter les faibles concentrations de PpIX dans les gliomes de bas grade [3], [4], [22], [23]. L'hypothèse principale à la base de ce mémoire est donc qu'une détection plus sensible (en termes de détection photonique) permettra la détection des régions invasives (tissus normaux envahis par de très faibles densités de cellules cancéreuses) et les gliomes de bas grade durant la chirurgie étant donné la quasi-absence de PpIX dans les tissus normaux [2], [3], [14], [16]. Dans ce chapitre, nous présentons les résultats des expériences décrites au chapitre 2 en lien avec l'évaluation détaillée du système d'imagerie.

3.1 Expérience 1 : Besoin de sensibilité

Tout d'abord, pour développer un système de sensibilité supérieure aux systèmes neurochirurgicaux existants décrits dans les sections 2.1.1 et 2.2.2, il est possible de substituer l'ancien détecteur par un détecteur moins bruité. Ainsi, pour une application d'imagerie médicale donnée, si la contribution du détecteur au seuil de bruit du système est significative, un détecteur moins bruité augmenterait la sensibilité du système. Cependant, il est aussi possible qu'un détecteur plus sensible ne diminue pas significativement le seuil de bruit du système. En effet, si l'intensité lumineuse détectée est élevée, par exemple, issue de lumière associée à un signal de fonds non relié avec le marqueur biologique d'intérêt, le bruit de grenaille [34], aussi appelé le bruit photonique, peut facilement devenir la source de bruit dominante du système, étant proportionnel à la racine carrée du nombre de photons détectés :

$$\text{Bruit}_{\text{grenaille}} = \sqrt{N}, \quad (9)$$

où N est le nombre de photons détectés. Des simulations illustrant l'impact de l'intensité lumineuse détectée par le système sur l'influence qu'a le détecteur sur le seuil de bruit sont présentées à la figure 3-1.

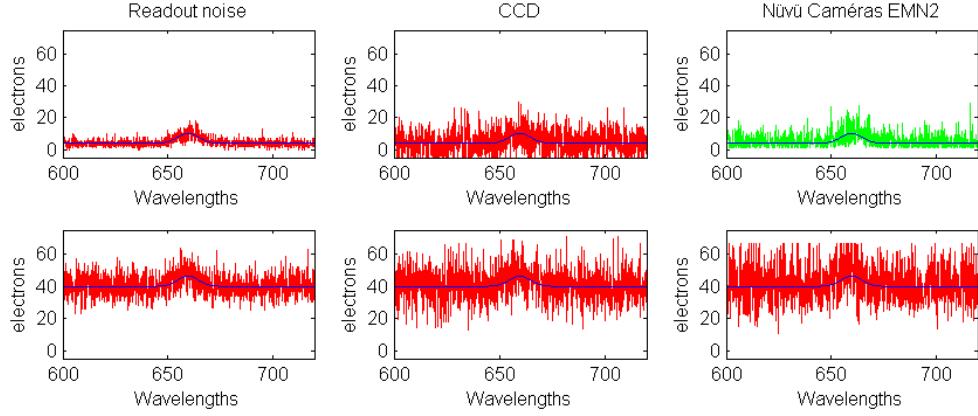


Figure 3-1: Simulation de l'influence de l'intensité du signal sur la contribution du détecteur au seuil de bruit du système. Les graphiques de gauches montrent le signal détecté par un détecteur parfait, c'est-à-dire un détecteur non bruité avec un QE de 100%. Les graphiques du milieu montrent le signal détecté par une caméra CCD. Les graphiques de droite montrent le signal détecté par la caméra EMCCD de Nüvü Caméras. La ligne noire représente le signal détecté par les caméras pour un pixel donné, c'est-à-dire un signal gaussien d'amplitude constante dans un bruit de fond variable. Les graphiques du haut montrent un bruit de fond de 6 électrons alors que les graphiques du bas montrent un bruit de fond de 40 électrons. La caméra EMCCD se compare seulement avantageusement à la caméra CCD dans la situation où le bruit est illustré en vert (comparé au bruit illustré en rouge pour les autres situations).

Comme on peut voir à figure précédente, l'utilisation d'une caméra EMCCD contribue significativement au seuil de bruit du système seulement lorsque le signal détecté est faible. Effectivement, dans les autres situations, le bruit photonique, expliqué à la l'équation (9) domine majoritairement les images. De ce fait, un détecteur plus sensible n'influence pas significativement le niveau de bruit dans pixel.

Pour ces raisons, avant de concevoir un nouveau système, une expérience a été planifiée afin de comparer la sensibilité d'un système hyperspectral de quantification en fluorescence en fonction du détecteur qu'il utilise. Pour cette expérience, les détecteurs comparés sont la caméra CCD et la caméra EMCCD. Une discussion critique sur les performances de différentes technologies d'imagerie en neurochirurgie est présentée en section 4.3. Les équations suivantes décrivent le ratio signal sur bruit (RSB) pour les deux détecteurs:

$$RSB_{CCD} = \frac{S*QE(\lambda)*t_{exp}}{\sqrt{S*QE(\lambda)*t_{exp}+B*QE(\lambda)*t_{exp}+t_{exp}*D+\sigma^2}}, \quad (10)$$

$$RSB_{EMCCD} = \frac{S*QE(\lambda)*t_{exp}}{\sqrt{F^2(S*QE(\lambda)*t_{exp}+B*QE(\lambda)*t_{exp}+t_{exp}*D+C)+\frac{\sigma^2}{G^2}}}, \quad (11)$$

où S est le signal détecté, $QE(\lambda)$ est l'efficacité quantique du détecteur, t_{exp} est le temps d'exposition de la caméra, F est le facteur de bruit excédentaire, B est la contamination lumineuse, D est le bruit thermique, C est le bruit d'injection de charges, σ est le bruit de lecture et G est le gain électronique de la caméra [34]. On remarque aussi que les équations (10) et (11) sont en fait la même équation, mais avec un F et un G de 1 dans le cas de la CCD.

Ces formules démontrent que dans le cas où le bruit de lecture est dominant, et non par exemple le bruit de grenaille, la caméra EMCCD offrira un RSB supérieur à la caméra CCD. Ceci est dû, dans le cas des caméras utilisées dans cette expérience, à son gain G pouvant aller jusqu'à 5000, qui vient diminuer le bruit de lecture σ de 3 ordres de grandeurs, à son efficacité quantique QE supérieure et que le bruit associé à l'injection de charges est négligeable. Le bruit d'injection de charges C , comme mentionné dans le chapitre 1, est des dizaines de fois plus faible que le bruit de lecture d'une CCD. C'est pourquoi il n'est que significatif lors d'une acquisition à faible flux lumineux avec une caméra EMCCD.

Une première étude comparative (EMCCD vs. CCD) est réalisée au Dartmouth-Hitchcock Medical Center (DHMC), le centre médical affilié au Thayer School of Engineering au Dartmouth College avec qui le LRO collabore dans le cadre du développement de technologies en lien avec la chirurgie guidée par fluorescence. Pour ce faire, le système hyperspectral utilisé au DHMC est connecté à un microscope neurochirurgical et des fantômes imitant les tissus du cerveau avec des inclusions de fluorescence sont imagés tour à tour avec les caméras CCD et EMCCD. Pour cette expérience, le microscope est placé de manière à pouvoir supporter le poids et la taille de la caméra EMCCD sur une table. Ceci ne sera pas possible durant une chirurgie, mais suffisait à des fins de comparaisons. Les fantômes sont décrits en détail dans la section 2.3.5. L'installation expérimentale est montrée en Figure 3-2.



Figure 3-2: Montage expérimental utilisé pour comparer les deux détecteurs sur le système hyperspectral utilisé au Dartmouth Hitchcock Medical Center.

Pour comparer les deux détecteurs en termes de sensibilité et de vitesse, un indice de performance $I = RSB/t_{exp}$ est défini. Comme le démontre les équations 10 et 11, un tel indice est nécessaire considérant que la caméra CCD peut, lorsque le flux lumineux est grand, mener à un RSB comparable à l'EMCCD pour des temps d'exposition beaucoup plus longs. En effet, dans ces situations, le bruit de lecture σ devient négligeable comparativement aux sources de bruits dépendantes du temps d'exposition t_{ex} , comme le bruit thermique, et du signal S , comme le bruit photonique. Ici, le RSB a été mesuré en divisant le l'intensité moyenne de la fluorescence détectée par l'intensité moyenne du bruit de fond (défini par une région éloignée de l'inclusion fluorescente dans l'image).

Aussi, les caméras doivent être comparées sur une base utile en lien avec l'application d'intérêt soit la chirurgie guidée par la fluorescence. On compare ainsi la performance des caméras en lien avec leur capacité à détecter de faibles concentrations de fluorophores. La mesure de la détectabilité d'un fluorophore est ici basée sur la forme générale connue du spectre d'émission et l'emplacement du pic de fluorescence détecté par les caméras à l'aide du filtre à cristaux liquides. La détectabilité mesurée avec les deux caméras est représentée à la figure 3-3 pour deux concentrations, soit 10ng/mL et 1ng/mL d'alexa fluor 647.

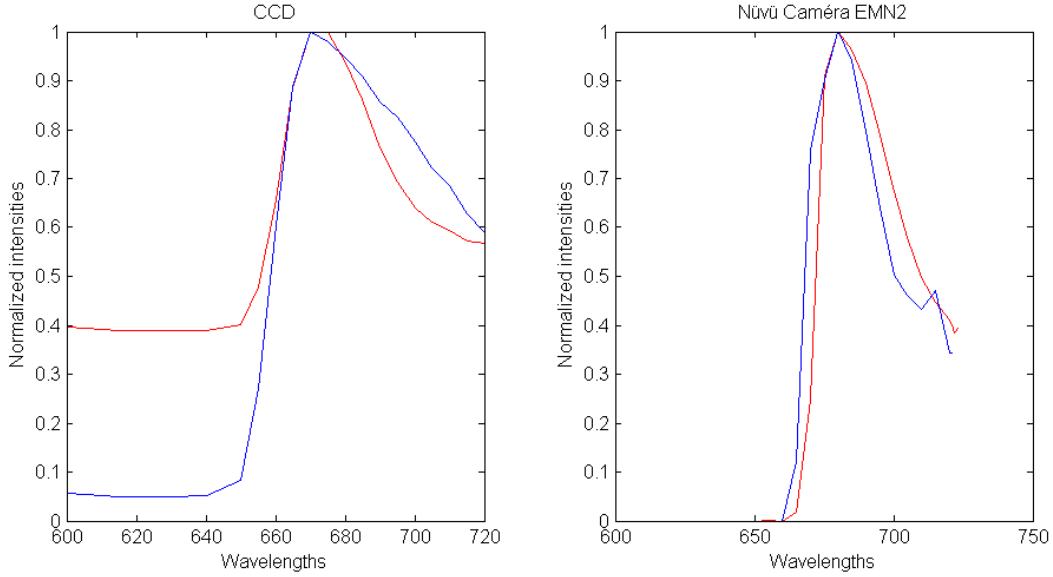


Figure 3-3: Detectabilité de l'alexa fluor 647 à différentes concentrations pour des caméras CCD et EMCCD Nüvü Cameras. 10ng/mL en red et 1ng/mL en bleu.

À 10ng/mL, nous avons obtenu un indice I de 165 fois plus grand pour la caméra EMCCD et 470 fois plus grand à 1ng/mL. Ainsi, on peut conclure de ces expériences qu'il y a effectivement un besoin pour davantage de sensibilité au niveau du détecteur pour ce qui est de la détection et quantification hyperspectrale de la fluorescence durant la chirurgie.

De ce fait, on peut voir à la suite de cette expérience qu'il y a définitivement un besoin pour l'utilisation de détecteurs plus sensible en imagerie hyperspectral durant la neurochirurgie. Un système doit donc être développé pour intégrer une caméra EMCCD dans un outil hyperspectral, considérant que ces caméras sont trop lourdes et volumineuses pour être connectés directement au microscope neurochirurgical comme nous avons fait durant cette expérience sans nuire au chirurgien.

3.2 Expérience 2 : Comparaison de sensibilité

Une fois le système, décrit à la section 2.3, intégrant la caméra EMCCD sur le microscope conçu, assemblé, programmé et testé, une étude détaillée est effectuée afin de comparer sa performance au système de quantification de fluorescence en champ large le plus sensible ayant été testé [11]. Ce système utilise une caméra de type sCMOS (PCO.Edge, Allemagne). Le capteur a 2560x2160 pixels, mais, étant donné que les pixels sont petits ($6,5 \mu\text{m} \times 6,5 \mu\text{m}$ pour la

caméra sCMOS, 13 μm x 13 μm pour la EMCCD), un binning 4x4 est nécessaire afin d'obtenir suffisamment de sensibilité. De ce fait, les senseurs ont sensiblement le même nombre de pixels, ce qui facilite la comparaison. Comme on peut le voir dans la Table 3-1, la caméra EMCCD est plus sensible en théorie, grâce à son efficacité quantique (QE) et son bruit de lecture σ . Il est à noter que, dans les détecteurs sCMOS, le bruit de lecture augmente avec le binning. Pour un binning de 4x4, le bruit de lecture montré dans la Table 3-1 est multiplié par deux.

Tableau 3-1: Propriétés de la caméra sCMOS PCO.EGDE et de la caméra EMCCD hNü de Nüvü Camēras.

	sCMOS (Système Dartmouth)	EMCCD (Système Polytechnique)
Taille du détecteur	2560x2160	512x512
Efficacité Quantique (QE)	60% @ peak	92% @ peak
Images par secondes	33 fps	60 fps
Bruit de lecture (σ)	1.5 ē @ 12MHz	< 1 ē @ 20MHz gain > 100
Bruit thermique (D)	< 0.08 ē/pixel/s @ -30 °C	< 0.001 ē/pixel/s @ -85 °C
Facteur de bruit excédentaire (F)	1	$\sqrt{2}$

Par contre, une comparaison des deux systèmes est de rigueur. En effet, pour plusieurs raisons maintenant expliquées, le nouveau système pourrait être moins performant que le précédent. La raison principale vient du fait que, bien que le nouveau système utilise une caméra plus sensible, il se connecte au microscope en utilisant un guide optique. Comme mentionné dans la section 2.3.3, le guide optique induit d'importantes pertes durant la transmission et à sa sortie, selon les spécifications des composantes optiques. De ce fait, ces pertes pourraient contrebalancer le gain amené par le nouveau. Pour ce faire, une expérience est réalisée où les deux systèmes sont connectés simultanément au microscope neurochirurgical du LRO (NC-31, Carl Zeiss,

Allemagne). Des fantômes imitant les tissus du cerveau avec des inclusions de PpIX sont illuminés à l'aide d'un laser bleu à 405nm (en continu, 100mW) et imaginés simultanément avec les deux systèmes. Les fantômes sont décrits en détail dans la section 2.3.5. L'installation expérimentale est montrée en Figure 3-4.

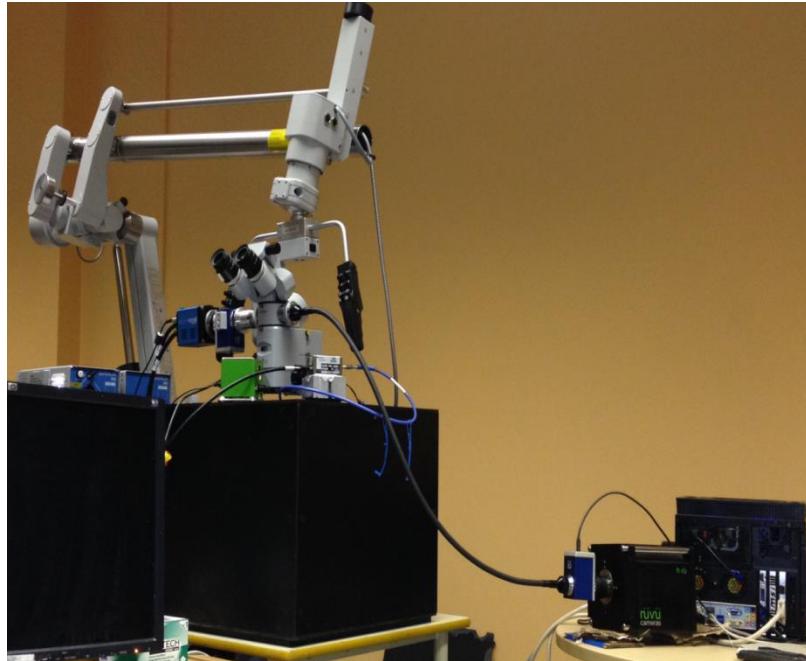


Figure 3-4: Configuration expérimentale pour la comparaison de sensibilité.

Les résultats obtenus, sous forme de cube hyperspectral, sont traités de façon à extraire le spectre de fluorescence détecté, à corriger pour la déformation spectrale due aux propriétés optiques des fantômes et à quantifier la fluorescence détectée en valeurs relatives ou absolues. Pour des fins de clarté, seulement les résultats du fantôme avec les propriétés optiques à 405 nm de $\mu_a=40\text{cm}^{-1}$ $\mu'_s=20\text{cm}^{-1}$ sont présentés à la figures 3-5.

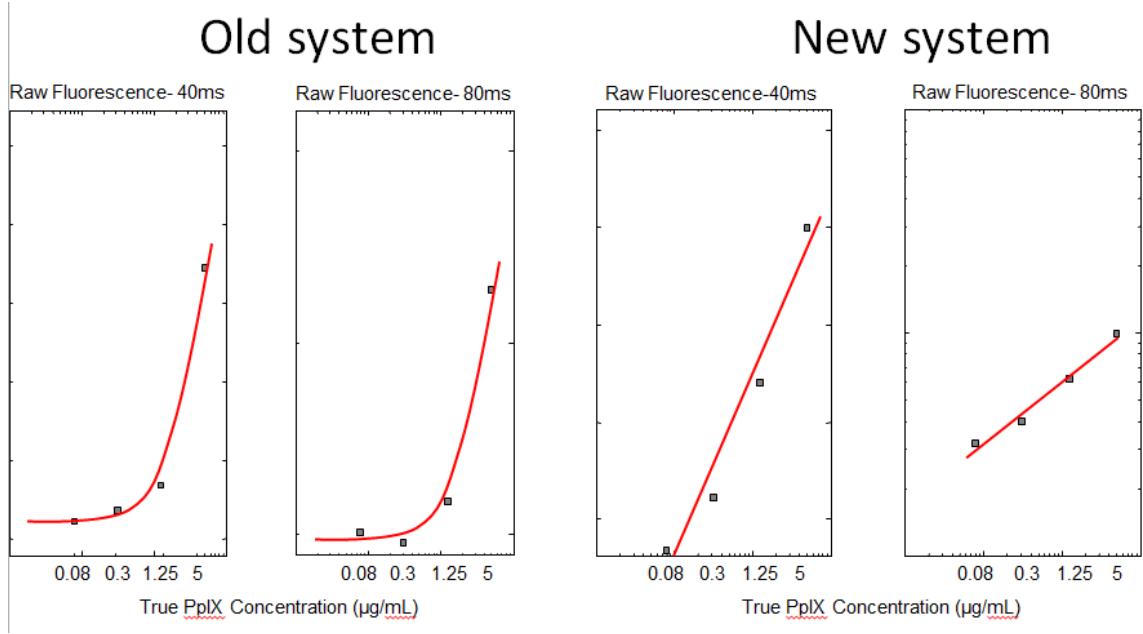


Figure 3-5: Intensité de fluorescence en unités arbitraires mesurée en fonction de la concentration réelle de PpIX contenue dans les fantômes.

La concentration la plus faible détectée est définie ici comme étant la concentration à laquelle la courbe perd sa linéarité. Comme on peut le voir à la figure précédente, la concentration la plus faible détectée par la caméra sCMOS est de 1250ng/mL alors que la concentration la plus faible détectée par la caméra EMCCD hNü est de 80ng/mL dans cette expérience. La concentration la plus faible détectée est définie ici comme étant la concentration à laquelle la courbe perd sa linéarité. On peut donc conclure que dans ces conditions expérimentales, le nouveau système avec EMCCD est au moins 16 fois plus sensible que le système hyperspectral précédent, qui utilisait dans cette expérience un détecteur sCMOS. Le système sCMOS perd rapidement sa linéarité entre le signal détecté et la concentration réelle de molécules fluorescentes et donc on considère qu'il atteint son seuil de bruit. Le seuil de bruit du nouveau système n'est pas atteint dans cette expérience. De ce fait, l'écart en sensibilité entre le nouveau système et l'ancien système pourrait être beaucoup plus que 16 fois.

Par contre, bien que la source lumineuse utilisée pour cette expérience soit adéquate à une comparaison des systèmes, elle diffère en bande spectrale et en puissance de la source utilisée en chirurgie par nos collègues chirurgiens à DHMC et à l’Institut de Neurologie de Montréal (Zeiss Pentero avec module d’excitation en lumière bleue pour la fluorescence). De ce fait, on ne peut obtenir dans cette expérience de concentration absolue de fluorophore pouvant être mesurée avec

le nouveau système en chirurgie. En effet, étant donné que notre source diffère de la source utilisée dans les microscopes neurochirurgicaux et que l'intensité de la fluorescence dépend de la concentration et de la source lumineuse utilisée, la concentration la plus faible pouvant être détectée avec un système dépend de la source utilisée.

3.3 Expérience 3: Comparaison de sensibilité en salle d'opération

Ainsi, de manière à pouvoir mesurer la concentration la plus faible pouvant être mesurée avec le nouveau système en salle d'opération, la prochaine expérience effectuée pour comparer les deux systèmes prend place à l'Institut de Neurologie de Montréal où les deux systèmes sont connectés sur un microscope neurochirurgical Pentero (Carl Zeiss, Allemagne). Les détails concernant cette expérience sont présentés en section 2.3.5.

Encore une fois, des fantômes liquides fluorescents imitant les tissus du cerveau sont imaginés à différentes concentrations par les deux systèmes. Cette fois-ci par contre, la source lumineuse utilisée est la source bleue du microscope neurochirurgical. Ceci nous permettra d'obtenir une concentration absolue de fluorescence pouvant être détectée en plus de comparer une seconde fois les deux systèmes.

Les résultats de la quantification de fluorescence détectée en fonction de la fluorescence réelle sont présentés en figure 3-8. Les valeurs quantitatives de fluorescence sont calculées avec les équations 6, 7 et 8 présentées au chapitre 2. Encore une fois, on voit que le système EMCCD détecte la plus faible concentration, à 8ng/mL de fluorescence, quand l'ancien système ne détecte dans ce cas que la concentration 200ng avec une bonne sensibilité. On peut donc dire que le nouveau système est plus de 25 fois plus sensible que l'ancien système selon cette expérience. La différence en sensibilité entre les deux systèmes est illustrée en figure 3-6. Pour chacune des expériences, le traitement des données a été fait au Dartmouth College par le Dr. Pablo Valdés, étant donné qu'ils ont tous les algorithmes nécessaires. Une expertise en quantification est actuellement en développement au LRO.

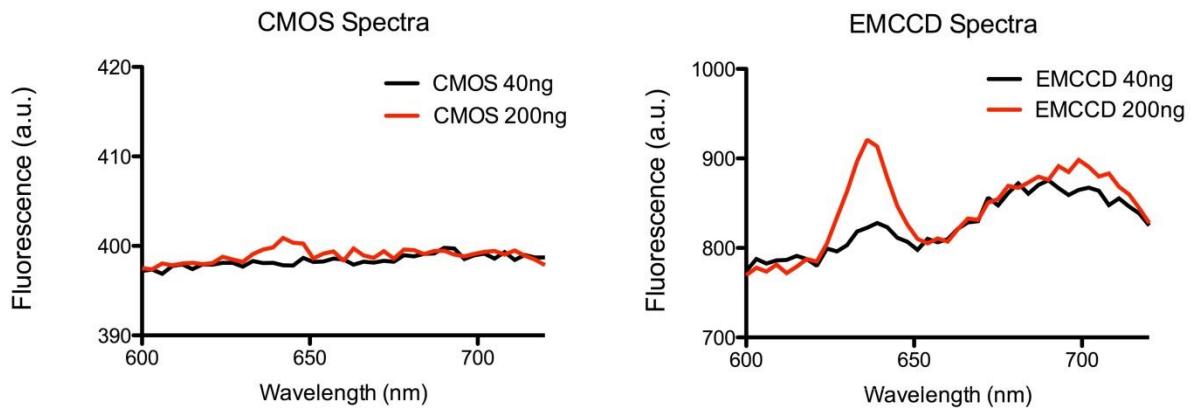


Figure 3-6: Déetectabilité de la fluorescence à 40ng/mL et à 200ng/mL pour les deux systèmes.

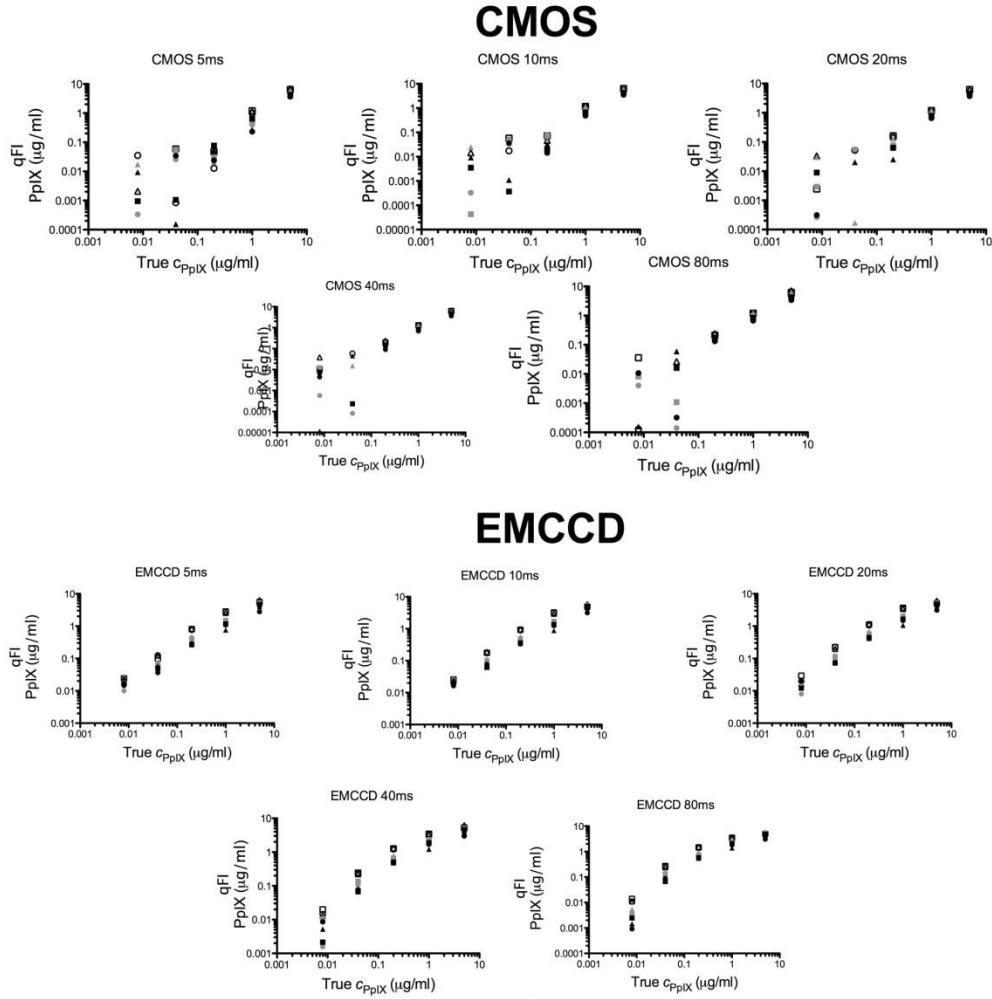


Figure 3-7: Fluorescence détectée en fonction de la concentration réelle de PpIX pour l'ancien système (sCMOS) et le nouveau système (EMCCD).

De façon plus détaillée, on voit en figure 3-7 la concentration détectée de façon quantitative en fonction de la concentration réelle dans les fantômes détectée par 2 systèmes. À chaque concentration réelle de fluorescence dans les fantômes, on trouve 9 points, qui représentent 9 différents fantômes aux propriétés optiques (μ_a et μ'_s) différentes. De ce fait, lorsque les points sont groupés pour une même concentration réelle (axe de x), la correction des propriétés optiques est réussie.

CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif général de ce projet était de développer un système d'imagerie pour la neurochirurgie dans le but de quantifier la concentration de molécules fluorescentes en utilisant: (a) une détection hyperspectrale pour maximiser la spécificité, (b) un mécanisme de photo-détection hyper-sensible pour maximiser la sensibilité, (c) un long câble d'imagerie flexible composé d'une couette de fibres pour permettre l'intégration du système d'imagerie dans le plan de travail du chirurgien. L'étendue de cet ouvrage se limite à la fluorescence qui peut être actuellement détectée au niveau macroscopique en chirurgie et aux technologies pouvant la détecter en champ large à l'échelle centimétrique en salle d'opération. Pour atteindre cet objectif général, que ce soit au niveau de la conception optique, mécanique ou logicielle, plusieurs objectifs spécifiques ont été choisis.

En premier lieu, besoin de sensibilité au niveau du détecteur dans ce type de système devait être établi. C'est pourquoi a été réalisé la première expérience préliminaire. Pour ce faire, un détecteur EMCCD a été comparé au détecteur CCD utilisé dans le système hyperspectral à champ large utilisé pour la quantification de la PpIX au Dartmouth Hitchcock Medical Center [10]. L'expérience a été faite dans un environnement ressemblant en tous points celui d'une salle de chirurgie. L'objectif était donc de déterminer si les applications de chirurgie guidée par la fluorescence nécessitent l'introduction de détecteurs ayant des capacités supérieures par rapport aux systèmes représentant l'état de l'art. Cette étape est importante, car, si les conditions expérimentales en salle d'opération et la nature biologique sous-jacente à l'origine du contraste optique font en sorte que les signaux détectés sont dominés par des sources de bruit indépendantes au détecteur, alors l'utilisation d'un senseur plus sensible pourrait n'avoir qu'un effet mineur sur la sensibilité globale du système.

Ensuite, l'approche adoptée fut de comparer directement le nouveau système conçu dans le cadre de cette maîtrise à un autre système de même fonction, dans un contexte où l'on peut mesurer leur sensibilité et leur vitesse d'acquisition. En effet, cette étape est essentielle de manière à situer la performance du nouveau système dans le domaine de la quantification de fluorescence en neurochirurgie. Pour ce faire, 2 expériences sont furent réalisée, une au LRO et une à l'Institut de Neurologie de Montréal (MNI).

Dans ce chapitre, les résultats obtenus sont résumés et discutés de manière à situer le nouveau système d'imagerie par rapport à l'état de l'art, à en extraire ses principales forces et limites ainsi que de discuter des améliorations futures qui y seront apportées au Laboratoire de Radiologie Optique.

4.1 Synthèse des résultats

4.1.1 Expérience 1: Détermination du besoin en terme de sensibilité

La raison pour laquelle la caméra EMCCD de Nüvü Cameras est comparée avec une caméra CCD dans le système de quantification de la fluorescence en neurochirurgie utilisée au DHMC n'est pas de comparer la sensibilité des deux caméras. En effet, la caméra EMCCD génère beaucoup moins de bruit, et ce à plusieurs niveaux. Il s'agit en fait d'une caméra hypersensible typiquement utilisée dans le cadre d'applications telles que l'astronomie pour lesquelles de très faibles flux photoniques doivent être détectés. Cependant, pour qu'une telle caméra diminue significativement le seuil de bruit d'un système, il est nécessaire que le bruit intrinsèque de la caméra soit un contributeur important par rapport aux autres sources de bruits liés aux conditions expérimentales. En effet, il est commun que dans le cadre d'une application donnée un système d'imagerie soit par exemple davantage dominé par le bruit de grenaille (*shot noise*), pollué par la lumière ambiante, une lumière interne au système ou simplement contaminée par des effets reliés aux composantes optiques utilisées. Dans ces situations où le bruit du détecteur est un contributeur mineur au bruit du système, un gain de sensibilité au niveau de la caméra elle-même n'aura pas d'impact significatif au niveau du seuil de bruit du système.

Dans le cas de l'imagerie hyperspectrale en champ large pour la quantification de fluorescence associée à la molécule PpIX en neurochirurgie, l'analyse de la figure 3-3 révèle des pics de fluorescence plus définis et rapprochés du spectre attendu du fluorophore détecté. Ainsi, cette expérience a démontré que la caméra EMCCD offre une meilleure détectabilité du spectre de fluorescence. De façon plus quantitative, le gain en sensibilité et en rapidité est mesuré simultanément avec l'indice composé $I = RSB/t_{exp}$. En effet, pour une même image, il est important de non seulement mesurer le *RSB* (qui doit être le plus grand possible), mais aussi le temps d'intégration (qui doit être le plus petit possible), car la quantité de signal détecté, et donc le *RSB*, en est dépendante. Ceci est d'autant plus vrai pour l'imagerie hyperspectrale, pour

laquelle 60 images peuvent être acquises pour l'imagerie d'un seul cube hyperspectral. Nous avons déterminé qu'à une concentration de 10ng/mL et pour des conditions expérimentales compatibles avec la salle d'opération, la caméra EMCCD a une indice I 165 fois plus grand que la caméra CCD alors qu'à une concentration de 1ng/mL, ce rapport est 470 fois plus grand. Ceci indique que la caméra EMCCD performe non seulement mieux que la caméra CCD dans un contexte neurochirurgical, mais aussi que cet écart est d'autant plus grand plus le budget photonique est faible. En d'autres mots, plus la concentration du marqueur fluorescent est faible, plus l'application nécessite une grande sensibilité. De ce fait, on peut conclure qu'un système intégrant une telle caméra profiterait d'un gain considérable en sensibilité et en vitesse d'acquisition. Cependant, pour que cette caméra soit connectée au microscope et utilisée dans un contexte neurochirurgical, des composantes optiques doivent être ajoutées, ce qui pourrait potentiellement nuire à la sensibilité globale du système et diminuer l'intensité du signal détecté.

4.1.2 Expériences 2 et 3: Comparaison de la sensibilité et de la vitesse d'acquisition avec l'état de l'art

Pour que la caméra EMCCD soit intégrée dans un système pouvant être installé sur un microscope neurochirurgical et utilisé lors de neurochirurgies, plusieurs composantes optiques doivent être ajoutées de manière à ce que la caméra n'encombre pas le chirurgien et puisse éventuellement être intégrées dans les microscopes chirurgicaux commerciaux. Ces composantes optiques, soient un guide d'imagerie de fibres optiques et un collimateur (Figure 2-13), amènent, comme mentionné à la section 1.3.3, des pertes de 71% de la lumière sortant du microscope. Ces pertes ne sont pas présentes dans un système utilisant une caméra plus petite et plus légère connectée directement sur le port optique. De ce fait, une comparaison du nouveau système avec l'état de l'art est nécessaire pour voir si la caméra EMCCD amène un gain ou si cet apport en sensibilité au niveau du détecteur est contrebalancé par les pertes lumineuses au niveau de l'optique spécifique à la caméra.

Dans une première expérience de comparaison, on remarque tout de suite, en analysant la figure 3-5, la perte de linéarité de la caméra sCMOS, qui a remplacé le détecteur CCD dans système utilisé dans l'expérience préliminaire de Dartmouth College, entre la concentration détectée et la concentration réelle de PpIX. Une telle perte de linéarité, qui n'est pas présente dans le nouveau système EMCCD, montre une contamination du signal aux faibles concentrations par le bruit du

système. On remarque aussi sur cette figure que la concentration la plus faible détectée par le nouveau système est 16 fois plus faible que la concentration la plus faible détectée par la caméra sCMOS, et ce malgré l'atténuation lumineuse associée au câble d'imagerie flexible. De ce fait, on peut conclure que le nouveau système est au moins 16 fois plus sensible que le système de quantification de la fluorescence neurochirurgical en champ large le plus sensible [11]. Cependant, il est important de noter que le seuil de bruit du nouveau système n'a pas été atteint lors de cette expérience. La différence de sensibilité entre les deux systèmes peut donc être encore plus grande. Finalement, bien que l'on retrouve des courbes de linéarité semblables à celles retrouvées à la figure 3-5 dans la littérature [10], [11], le fait que nous utilisions pour cette expérience un microscope différent de ceux actuellement employés en neurochirurgie, et, de ce fait, employions une source lumineuse différente, nous empêche de comparer nos courbes avec celles de la littérature en valeurs absolues.

De ce fait, une seconde expérience de comparaison en sensibilité, mais cette fois sur un microscope neurochirurgical actuellement employé en neurochirurgie et intégrant sa propre source lumineuse est pertinente afin de situer les performances du nouveau système dans la littérature. Ainsi, les deux systèmes sont transportés au MNI pour être connectés simultanément au microscope Pentero (Carl Zeiss, Allemagne). On image ensuite des fantômes semblables à ceux utilisés à l'expérience précédente, mais avec comme concentrations de PpIX : 5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 200ng/mL, 40ng/mL et 8ng/mL. On remarque dans la littérature que le système auquel on compare notre caméra hyperspectrale peut détecter sur un microscope Pentero une concentration d'environ 100ng/mL [10], [11]. On peut aussi atteindre des concentrations plus faibles que dans l'expérience précédente effectuée au LRO, car la lampe du microscope utilisé au MNI est plus puissante en champ large que le laser utilisé précédemment. Peu de travail a été effectué dans la littérature sur la comparaison des technologies d'imagerie et détection de la fluorescence en neurochirurgie. Par contre, une étude a récemment comparé dans ce contexte les caméra sCCD et EMCCD [35]. Cet article et ses conclusions, en comparaison avec nos résultats, seront discutés plus en détails dans la section 4.3.

Encore une fois, on remarque en analysant les résultats présentés à la figure 3-7 que le nouveau système est plus sensible que le système précédent, détectant de la fluorescence jusqu'à 8ng/mL alors que le système sCMOS n'en détecte seulement jusqu'à 200ng/mL. Ceci place le système EMCCD dans la même plage de détection que la sonde présentée à la section 2.2.1, en

imagerie en champ large, contrairement au mode point par point de la sonde. On remarque que la fluorescence quantitative détectée pour la caméra EMCCD vient varier pour différents fantômes aux propriétés optiques différentes, mais à la même concentration. Ceci signifie que la quantification n'est pas effectuée parfaitement avec le nouveau système. On peut expliquer partiellement ce phénomène par le fait que les filtres LCTF utilisés ont une mauvaise réjection de la lumière. En effet, comme on peut le remarquer à la figure 3-6, de la lumière d'excitation à 405nm traverse le filtre aux longueurs d'onde élevées (à environ 700nm). Cette imperfection du filtre vient déformer le spectre, ce qui peut entraîner des problèmes dans l'algorithme de quantification. On remarque que cet effet est plus prononcé pour les grands temps d'intégrations. Une étude plus détaillée sur le sujet serait nécessaire de manière à confirmer le phénomène observé en figure 3-7 pour le système EMCCD.

En résumé, un système hyperspectral pour la quantification de la fluorescence en neurochirurgie a été développé. Ce système effectue une détection spectralement résolue, de manière à obtenir un spectre lumineux en chacun des pixels. De ce fait, l'utilisation du système permet une meilleure sensibilité que la simple utilisation d'un microscope chirurgical, étant donné qu'on peut ainsi identifier la signature spectrale du signal détecté. Des algorithmes permettent de corriger la fluorescence détectée en fonction des propriétés optiques des tissus, ce qui permet d'obtenir une fluorescence quantitative. Le système développé utilise une caméra EMCCD et des composantes optiques lui permettant d'atteindre une sensibilité non seulement supérieure à l'utilisation d'un microscope neurochirurgical, mais aussi supérieure aux systèmes de l'état de l'art. En effet, des expériences en contexte neurochirurgical ont montré que le nouveau système détectait adéquatement des concentrations de PpIX aussi basses que 8ng/mL. Une telle concentration de l'ordre de l'unité de ng/mL est plus de 20 fois plus faible que la concentration la plus faible détectée par les systèmes en champ large de l'état de l'art [10] et est comparable à la limite de sensibilité des systèmes de détection avec une sonde spectroscopique [9].

4.2 Limitations du système et améliorations possibles

Tout d'abord, il est important de noter que ce nouveau système est utilisé pour détecter la fluorescence afin de guider l'exérèse de tumeurs en neurochirurgie. Il est important de noter que même avec une sensibilité photonique idéale, cette technique ne sera jamais plus sensible et

spécifique que le marqueur moléculaire imagé. Actuellement, les fluorophore utilisés cliniquement sont la PpIX, l'indocyanine green (ICG) et la fluorescéine [3], [4], [16], [40], [41], [45], [50]. L'ICG et la fluorescéine s'accumulent passivement dans les tissus, se liant à des molécules contenues dans le plasma sanguin [3]. Il s'agit donc de marqueurs fluorescents efficaces pour des processus liés à l'hémodynamique. Pour les applications en chirurgie oncologique, ces marqueurs sont utilisés pour la détection de régions tumorales angiogéniques ainsi que la détection de nodules lymphatiques [3], [4], [22], [25], [33], [40]. Étant donné la spécificité limitée de ces marqueurs, les applications leur étant liées ne nécessitent pas nécessairement un système ultrasensible puisque les fluorophores peuvent s'être accumulés non-spécifiquement dans les tissus autour de la région d'intérêt. Il s'agit ici d'un problème que l'imagerie hyperspectrale ne peut contourner. Cependant, la situation est différente dans le cas de la fluorescence associée à la PpIX lorsque considérée pour l'exérèse de glioblastomes suivant l'injection de l'ALA. En effet, dans ce cas la PpIX est générée spécifiquement dans les tissus tumoraux et ne se retrouve pas en quantités mesurables dans les tissus normaux [9], [16]. De plus, contrairement à la méthode de détection qualitative de la fluorescence actuellement utilisée en neurochirurgie à l'aide de microscopes commerciaux, le nouveau système de quantification de la fluorescence pourrait en théorie détecter de la fluorescence dans différents types de tumeurs. En effet, le nouveau système a été comparé au système neurochirurgical de quantification de la fluorescence développé à Dartmouth qui est en mesure de détecter différents types de tumeurs [10], [11]. Étant donné que le nouveau système a une sensibilité supérieure, on peut affirmer que ce nouveau système pourra faire de même.

Pour ce qui est des limitations spécifiques au système, bien qu'il ait été conçu de manière à limiter ces impacts, son prix est peut-être une difficulté. En effet, bien que l'optique, le filtre accordable et l'ordinateur de contrôle soient comparables pour les deux systèmes, le système EMCCD utilise un détecteur au prix supérieur et un guide de fibres optiques. De ce fait, le coût total du nouveau système est environ 70 000\$ alors que le système de Dartmouth vaut environ 30 000\$. Cependant, cet outil chirurgical opère de pair avec un microscope neurochirurgical, dont le prix actuel est de plusieurs centaines de milliers de dollars. De ce fait, en comparaison avec le prix total nécessaire à effectuer la résection de tumeur du cerveau, la différence de prix entre les deux systèmes devient presque négligeable.

D'autre part, bien que ce système est actuellement la caméra de quantification de fluorescence en champ large en neurochirurgie la plus sensible à notre connaissance, beaucoup d'améliorations pourraient y être apportées. En effet, entre le microscope et le détecteur, d'énormes pertes lumineuses sont causées par les différentes composantes optiques. Effectivement, comme mentionné dans les sections 2.3.3, le filtre accordable entraîne des pertes entre 50% et 90%, dépendant de la longueur d'onde de transmission, alors que la combinaison de l'optique et du guide optique entraînent des pertes de 71%. On détecte donc entre 3% et 14% de la lumière sortant du port optique latéral du microscope neurochirurgical, sans prendre en considération les pertes mineures dans les lentilles utilisées. Considérant que le port latéral du microscope neurochirurgical ne reçoit que 1/3 de la lumière imagée au plan focal et que l'efficacité quantique de la PpIX est inférieure à 1%, la lumière collectée par le système est minimale. Malgré tout, le détecteur EMCCD de Nüvü Caméras nous permet d'avoir une sensibilité supérieure aux systèmes existants. Cependant, en améliorant l'efficacité de l'optique précédant le détecteur, une augmentation dramatique de la sensibilité du système est possible. Par exemple, il serait possible d'utiliser de l'optique en espace libre pour remplacer le guide de fibres optiques en utilisant des miroirs. De ce fait, la transmission serait dépendante de la réflectivité des miroirs dans le visible et le proche infrarouge, qui approche 96% par miroir, selon les spécifications de miroirs de Thorlabs, États-Unis. Du côté du fluorophore, actuellement, plusieurs sondes moléculaires au ciblage actif et à l'efficacité quantique élevée sont en étude préclinique et même clinique [50], [57]. Ainsi, la lumière émise de la tumeur pourrait être plus élevée de plusieurs ordres de grandeur. Finalement, la majeure partie de la lumière perdue se retrouve au niveau du filtre accordable. Bien que peu de technologies existent présentement pour permettre un filtrage spectral sélectif et accordable, comme pour les filtres à cristaux liquides et les filtres opto-acoustiques, les performances en transmission sont assez faibles. Une alternative possible est l'application de filtres Fabry-Pérot directement sur le détecteur, comme démontré par un laboratoire en Belgique [58].

4.3 Comparaison des technologies d'imagerie

Malgré la multitude des technologies d'imagerie présentement disponibles, peu de travail a été effectué durant les dernières années dans le but de déterminer la technologie la plus efficace pour imager de fluorescence dans un contexte clinique durant la chirurgie. De ce fait, différents

laboratoires de recherche utilisent différentes technologies d'imagerie pour différentes raisons, sans nécessairement savoir si ce type de détecteur est adapté à leurs besoins cliniques. Un article récemment publié par le Centre de Santé de l'Université du Texas dans le journal *Medical Physics* [35] traite de façon détaillée du sujet, plus précisément appliqué à l'imagerie durant la chirurgie dans le proche infrarouge. En effet, cette étude vient comparer des caméras CCD, iCCD et EMCCD, lors de l'imagerie de points quantiques à 800nm d'émission. Les points quantiques ont été sélectionnés en raison de leur stabilité et leur résistance au photo-blanchiment, mais la concentration imagée est calculée de manière à ce que la concentration utilisée corresponde à une concentration d'ICG pertinente pour des applications cliniques. La fluorescence étant toujours proportionnelle à la concentration locale du marqueur (c), son coefficient d'excitation molaire (ε) et son efficacité quantique (QE), la formule (2) de l'article en question a été utilisée afin de convertir la concentration de points quantique en une concentration d'ICG:

$$c_{ICG} = \frac{\varepsilon_{Qdots800}(\lambda_x) QE_{Qdots800}(\lambda_m)}{\varepsilon_{ICG}(\lambda_x) QE_{ICG}(\lambda_m)} c_{Qdots800}. \quad (12)$$

On utilise ici λ_m pour signifier la longueur d'onde d'émission du fluorophore et λ_x pour signifier la longueur d'onde d'excitation. Une telle étude est extrêmement profitable au domaine de l'imagerie de fluorescence pour guider la chirurgie afin d'établir des standards mesurables permettant de déterminer quel type de mécanisme de photo-détection est requis pour une application donnée. Cependant, nous avons noté plusieurs erreurs systématiques et omissions dans cette étude menant à des conclusions erronées concernant le niveau d'efficacité des différentes technologies considérées. Nous présentons ici une analyse des principales erreurs de cet article étant donné l'importance de cette étude dans notre domaine d'étude et son impact menant à la contextualisation de notre travail.

Tout d'abord, les auteurs présentent leur choix de l'utilisation d'une caméra iCCD par le fait que l'efficacité quantique des caméras CCD chute dramatiquement dans la région du proche infrarouge, c'est-à-dire aux alentours de 800nm. En effet, comme on peut le voir à la figure 4-1, l'efficacité quantique d'un détecteur à base de silicium peut passer de plus de 90% à 560 nm à environ 70% à 800 nm, tout dépendant du revêtement optique utilisé. Un revêtement optique est une mince couche d'un matériau appliquée à la surface d'une composante optique dans le but de modifier ses capacités de réflexion et de transmission de la lumière.

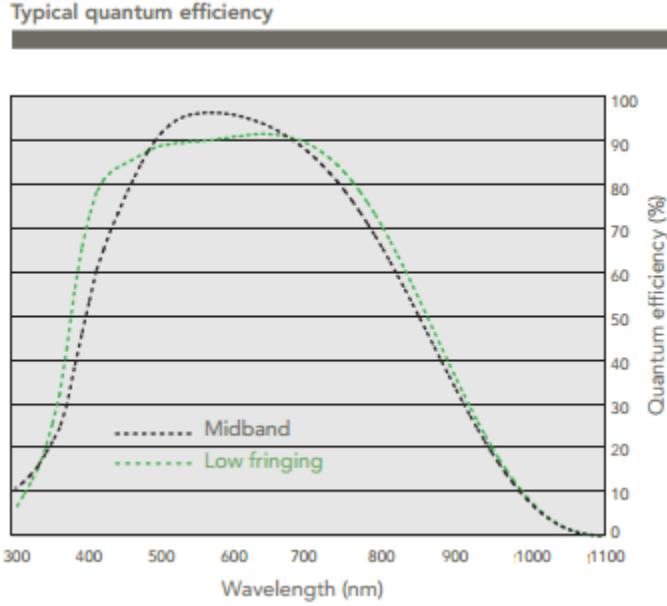


Figure 4-1: Efficacité quantique d'un détecteur EMCCD en fonction de la longueur d'onde détectée.

De ce fait, jusqu'à 30% des photons émis à 800nm qui frappent le détecteur ne seront pas détectés. Pour contourner ce phénomène, les auteurs de l'article de comparaison viennent installer une photocathode devant le détecteur CCD. Cette photocathode viendra amplifier les photons d'un facteur allant jusqu'à 10^6 . De plus, les photons émis par la photocathode sont à 550nm, soit au pic d'efficacité quantique des détecteurs CCD. De cette façon, bien qu'on vienne perdre jusqu'à près de 30% des photons à 800nm qui seraient détectés au pic de sensibilité du détecteur, on vient multiplier ces photons par un facteur allant jusqu'à 10^6 . Cependant, ceci est sans tenir compte des effets découlant de l'efficacité quantique de la photocathode, qui est de 40%.

Le deuxième problème majeur avec cette étude vient au moment de comparer les images acquises avec les différentes caméras de manière à en extraire les paramètres d'intérêts, comme le *RSB* et le contraste. En effet, les auteurs de l'article en question viennent à ce moment comparer les unités arbitraires de la fluorescence détectée par les caméras. Ceci entraîne une comparaison erronée des caméras pour plusieurs raisons, que ce soit pour la comparaison du *RSB* ou du contraste. Tout d'abord, pour mesurer le *RSB*, on vient diviser le signal dans l'image par le bruit, c'est-à-dire, en utilisant la formule (3) du papier en question :

$$RSB = 20 \log_{10} \frac{S^t(C)}{S^b(0)}, \quad (13)$$

Cependant, les différentes technologies d'imagerie ont différents fonctionnements qu'il faut bien comprendre avant de comparer de telles images tout simplement en divisant l'intensité moyenne du signal d'intérêt (S^t) par l'intensité moyenne de l'arrière-plan (S^b), c'est-à-dire un emplacement dans l'image où on ne détecte pas de fluorescence. En effet, contrairement à la technologie iCCD, les technologies CCD et EMCCD auront toujours une valeur constante ajoutée à leurs images, causée par différents effets électroniques internes à la caméra. Cette valeur dépend du manufacturier de la caméra et des paramètres utilisés pour obtenir l'image et cette valeur peut facilement éliminer à l'aide une image biais. Une image biais est un procédé commun en imagerie où l'on vient, pour une caméra et une combinaison de paramètres spécifiques, acquérir une multitude d'images dans le noir total, pour mesurer le niveau constant venant s'ajouter à l'image, pour pouvoir ensuite le soustraire.

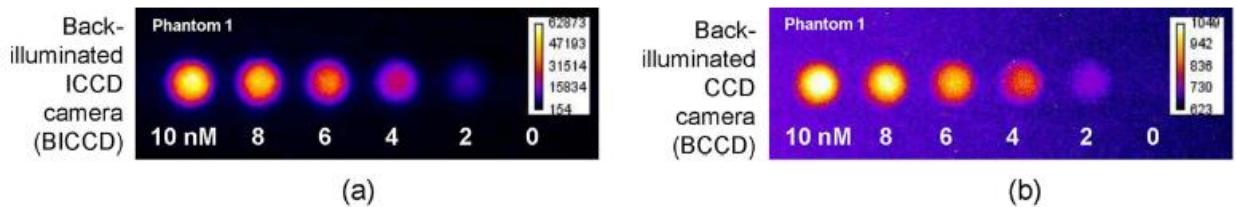


Figure 4-2: Images de 5 puits de points quantiques, à 5 concentrations différentes avec deux détecteurs, c'est-à-dire avec une caméra iCCD (gauche) et une caméra CCD (droite). Cette image est une reproduction de la figure 5 de l'article sevick-Muraca et al. [35]

Par exemple, nous considérons ici un cas particulier traité dans l'article du groupe du Texas pour lequel la soustraction de l'image biais a été omise. Dans la figure 5 (b) de l'article (ici reproduite et nommée figure 4-2), on peut approximer la différence entraînée par la soustraction du biais en utilisant l'équation (3) de l'article (reproduite plus haut). Il est à noter que les valeurs utilisées sont approximées, étant donné qu'il n'est pas possible de calculer $S^t(C)$, $S^b(0)$ et le biais sans avoir accès aux images brutes. Cependant, si on approxime $S^t(C) = 950$, $S^b(0) = 750$ et le biais = 500, on obtient avec l'équation (3) un RSB de ~2 sans soustraire le biais à l'image et un RSB de ~5 en soustrayant le biais, ce qui aurait dû être fait afin de comparer les caméras équitablement. En effet, d'expérience personnelle et après discussion avec Olivier Daigle, les biais sont habituellement de l'ordre de quelques centaines d'unités et un biais de 500 nous semble

réaliste. Après discussion personnelle avec l'auteur, nous avons la confirmation qu'une comparaison des images brutes des caméras a été effectuée dans cette étude pour arriver à leurs résultats.

De plus, le fonctionnement même d'une caméra iCCD vient aussi fausser une valeur de RSB obtenue dans l'article. En effet, comme mentionné à la section 1.3.4, les images des caméras iCCD sont des images reconstruites à partir des photons détectés. En effet, chaque photon venant frapper la photocathode engendre une multitude de photons à 550nm vers la CCD. Les photons venant d'un même photon sur la photocathode atteignent la CCD sous forme d'un nuage de points gaussien. Le centre de masse de ce nuage est alors calculé et établi comme étant un seul photon sur l'image résultante. Tout le reste du nuage est mis à zéro. Ainsi, l'arrière-plan d'une caméra iCCD est particulièrement noir, étant donné que tout bruit n'étant pas accompagné d'un nuage gaussien de centaines de milliers de photons est ignoré. De ce fait, l'arrière-plan de ces images étant égal à ou près de zéro, le RSB résultant est sensible au gain analogique de la caméra CCD utilisée. En effet, un gain analogique vient multiplier tous les pixels de l'image par une certaine valeur, de manière à utiliser adéquatement la plage dynamique de la caméra. Dans ce cas-ci, l'arrière-plan restera à zéro alors que le signal augmente. La valeur du gain analogique utilisé n'étant pas mentionnée dans l'article, il devient impossible de comparer ainsi de tels RSB. Avec un faible budget photonique, la source de bruit dominante des caméras iCCD est le facteur de bruit excédentaire. En effet, de façon similaire à la caméra EMCCD, comme mentionné en section 1.3.1, le gain de la photocathode de la caméra iCCD est elle aussi un procédé stochastique, ne dépendant qu'en partie de la tension appliquée à la photocathode. De ce fait, chacun des électrons amplifiés de cette manière ne sera pas amplifié du même facteur, ce qui induit un facteur F de 2, en comparaison avec le facteur de bruit excédentaire de $\sqrt{2}$ pour la caméra EMCCD (dans l'équation 11), comme on peut le voir dans l'équation suivante:

$$RSB_{iCCD} = \frac{S * QE(\lambda) * t_{exp}}{\sqrt{F^2(S * QE(\lambda) * t_{exp} + B * QE(\lambda) * t_{exp} + t_{exp} * D) + \frac{\sigma^2}{G^2}}}, \quad (14)$$

où S est le signal détecté, $QE(\lambda)$ est l'efficacité quantique du détecteur, t_{exp} est le temps d'exposition de la caméra, F est le facteur de bruit excédentaire, B est la contamination lumineuse, D est le bruit thermique, C est le bruit d'injection de charges, σ est le bruit de lecture et G est le gain électronique de la caméra. Ces équations ne peuvent être utilisées pour calculer le

RSB à partir d'une image, contrairement à l'équation (3) de l'article discuté, mais sont utiles pour déterminer les différentes contributions en termes de bruit à une image. Le terme de droite sous le radical devient négligeable pour les deux systèmes, alors on se retrouve avec une efficacité quantique plus faible pour l'iCCD en plus d'un facteur F plus élevé, ce qui montre le RSB supérieur pour les caméras EMCCD en imagerie à faible flux lumineux. Les mêmes principes s'appliquent au calcul du contraste, qui est mesuré dans cet article comme étant :

$$\text{Contraste} = \frac{s^t(c)}{s^b(0)} - 1, \quad (15)$$

Finalement, un dernier problème avec cette publication est son emploi large des termes de technologies d'imagerie. En effet, dans cette étude, le terme « EMCCD » est utilisé pour désigner la caméra utilisée, qui est en fait la caméra Photon Max (Princeton Instruments, États-Unis). Cette caméra, qui date de 2006, n'est pas un bon représentant de la technologie actuelle des caméras EMCCD. En effet, les caméras EMCCD existent actuellement depuis environ 14 ans et la caméra utilisée dans cette étude date d'environ 8 ans. Depuis cette date, la technologie des caméras EMCCD a fait des progrès considérables, dont cette étude ne prend pas compte.

Malgré le fait que peu de travail a été fait dans le domaine de la neurochirurgie pour comparer les différentes technologies d'imagerie, cette étude ne peut pas être utilisée comme référence considérant la multitude d'erreurs qu'elle contient. Contrairement, aux conclusions de l'étude, nous considérons toujours la technologie EMCCD comme étant la plus performante dans un contexte d'imagerie de fluorescence à faible flux en chirurgie. Nos conclusions à ce sujet, en plus de nos résultats de comparaisons entre notre nouveau système EMCCD et le système précédent, seront soumises plus tard cette année dans le journal scientifique *Optics Letters*.

4.4 Possibilités futures

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, un système de spectroscopie permettant la détection quantitative de PpIX dans un contexte neurochirurgical a été développé, au niveau mécanique, optique et logiciel. Le système peut être contrôlé à partir d'une interface personnalisée et peut être utilisé dans une salle de chirurgie. Les objectifs du projet sont donc atteints, mais plusieurs applications ou améliorations au système sont en cours de développement.

Tout d'abord, des algorithmes pour la quantification de marqueurs visible et NIR, ainsi que l'intégration d'algorithmes permettant l'imagerie quantitative de plusieurs marqueurs

fluorescents, incluant la fluorescence intrinsèque des tissus sont en développement dans notre laboratoire. La détection de marqueurs fluorescents, qui sont utilisés pour la détection en profondeur dans les tissus, nécessite une grande sensibilité. En effet, plus le marqueur est loin de la surface, plus son signal fluorescent sera absorbé et diffusé par le tissu. De plus, les détecteurs de silicium sont moins efficaces dans les longueurs d'onde NIR. Cet algorithme utilise les spectres de fluorescence et de réflectances diffuses acquis avec le système pour déterminer la surface du tissu imagé. On peut ensuite recréer une approximation de l'entièvre inclusion. Une image des premières simulations des algorithmes est montrée à la figure 4-3. Ces travaux sont actuellement effectués par Michael Jermyn, PhD du LRO et Kolbein Kolste de Dartmouth College.

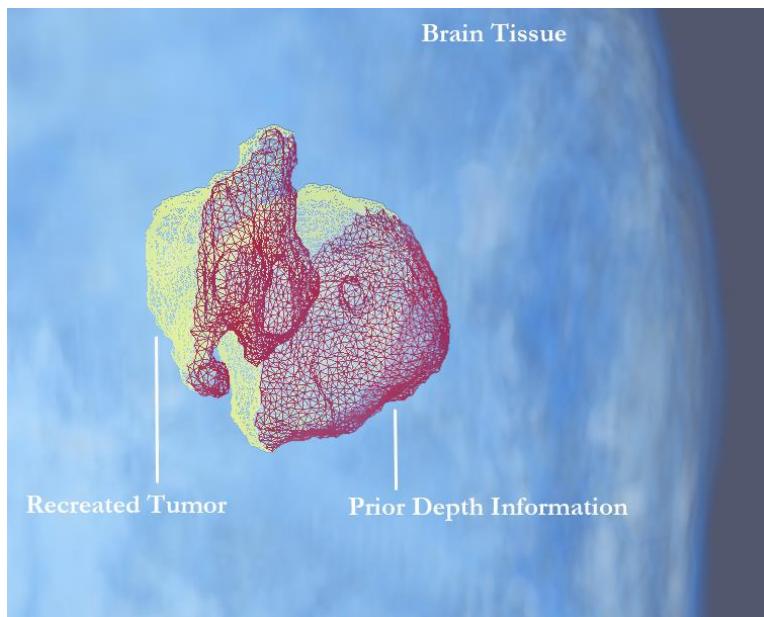


Figure 4-3: Approximation d'une inclusion fluorescente à partir de l'information surfacique acquise avec le système de détection de la fluorescence.

Un système d'imagerie à deux caméras a aussi été développé au cours de l'année dernière dans le cadre d'un projet de fin d'études en génie biomédical. Un tel système permettrait d'imager l'information structurelle du cerveau avec une caméra tout en obtenant l'information moléculaire fournie par la fluorescence avec la caméra sensible EMCCD. Une superposition d'une image du cerveau et d'une image hyperspectrale quantitative de la fluorescence peut ensuite être fournie au chirurgien durant la procédure. Un tel système utilise un séparateur de faisceau (*beam splitter*) pour rediriger 10% de la lumière sortant du port optique latéral du

microscope neurochirurgical vers une caméra CCD. Le 90% restant continu vers le système hyperspectral. Ce nouveau système peut aussi être utilisé pour imager des fluorophores sur une plus grande plage spectrale. En effet, les filtres utilisés ayant une plage spectrale limitée, on peut imager des marqueurs dans la plage du visible avec une caméra, et imager dans la plage du NIR avec une caméra sensible. Pour ce faire, il suffit de remplacer le séparateur de faisceau séparant la lumière avec un ratio 0,1/0,9 par une lame séparant la lumière visible de la lumière NIR et en utilisant un filtre accordable NIR devant une caméra et un filtre visible devant l'autre caméra. Le logiciel a été adapté de manière à contrôler les deux caméras et à afficher en temps réel leurs acquisitions. Le système à deux caméras est montré en figure 4-4.

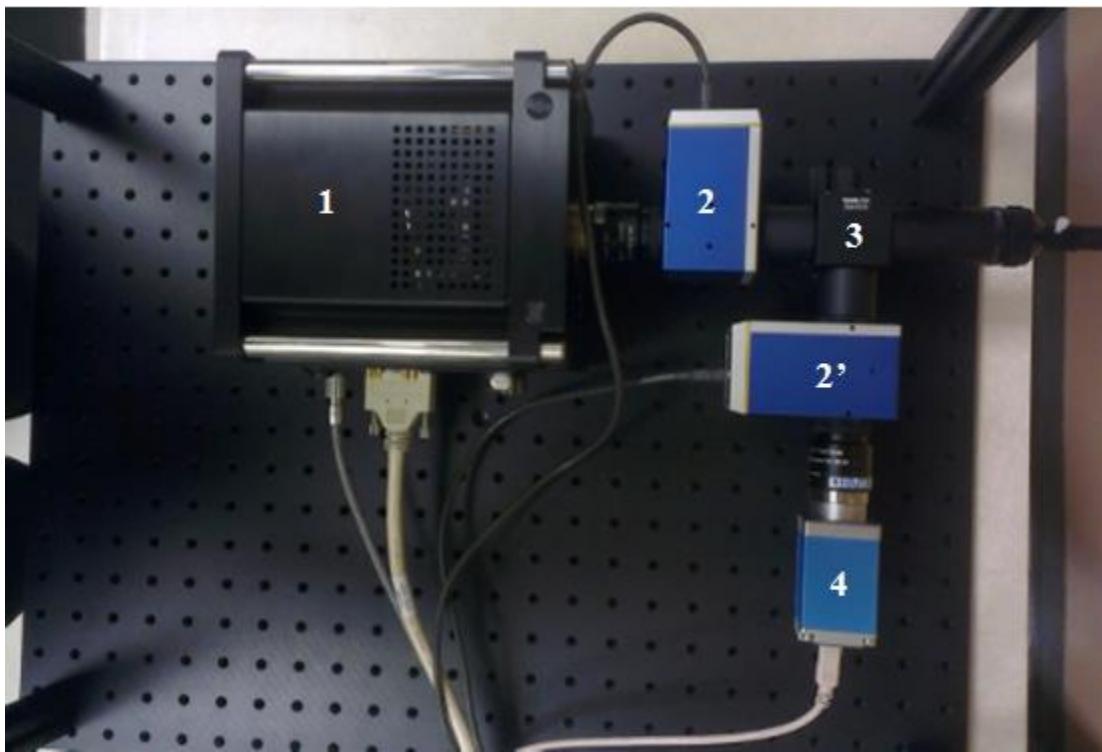


Figure 4-4: 1) Caméra EMCCD hNü de Nüvü Cameras; (2 et 2') Filtres accordables de type à cristaux liquide dans le NIR et visible. Le filtre en (2') peut être enlevé, dépendant de l'utilisation du système. (3) C'est ici qu'on installe le séparateur de faisceau 0,1/0,9 ou NIR/VIS, dépendant de l'utilisation du système (4) Caméra CCD Pixelfly.USB de PCO.

Le système sera aussi utilisé prochainement pour effectuer l'imagerie fonctionnelle du cerveau lors d'une chirurgie sur patients épileptiques. Un plan bidimensionnel de l'activité du cerveau pourra alors être obtenu en temps réel en effectuant un ratio de l'hémoglobine oxy- et

desoxy- en chacun des pixels. Une telle étude pourrait permettre de mieux comprendre différentes propriétés des crises d'épilepsie. Ces travaux sont effectués en collaboration avec le laboratoire du prof. Frederic Lesage.

Un module d'illumination modulé est actuellement en développement pour utilisation avec le système développé dans le cadre de cette maîtrise. Un système d'illumination modulée peut être utilisé pour reconstruire une surface en 3D. En effet, ce système vient illuminer la surface d'intérêt avec un motif d'onde sinusoïdale 2D à 3 phases différentes. La différence entre les motifs déformés et les motifs originaux sont utilisés pour reconstruire la surface en 3D. Ceci peut être utilisé entre autres pour compenser les déformations du cerveau entre le moment de la chirurgie et le moment où les images CT ou IRM préopératoires sont acquises. Une image tirée d'une vidéo réalisée dans notre laboratoire est montrée en figure 4-5.

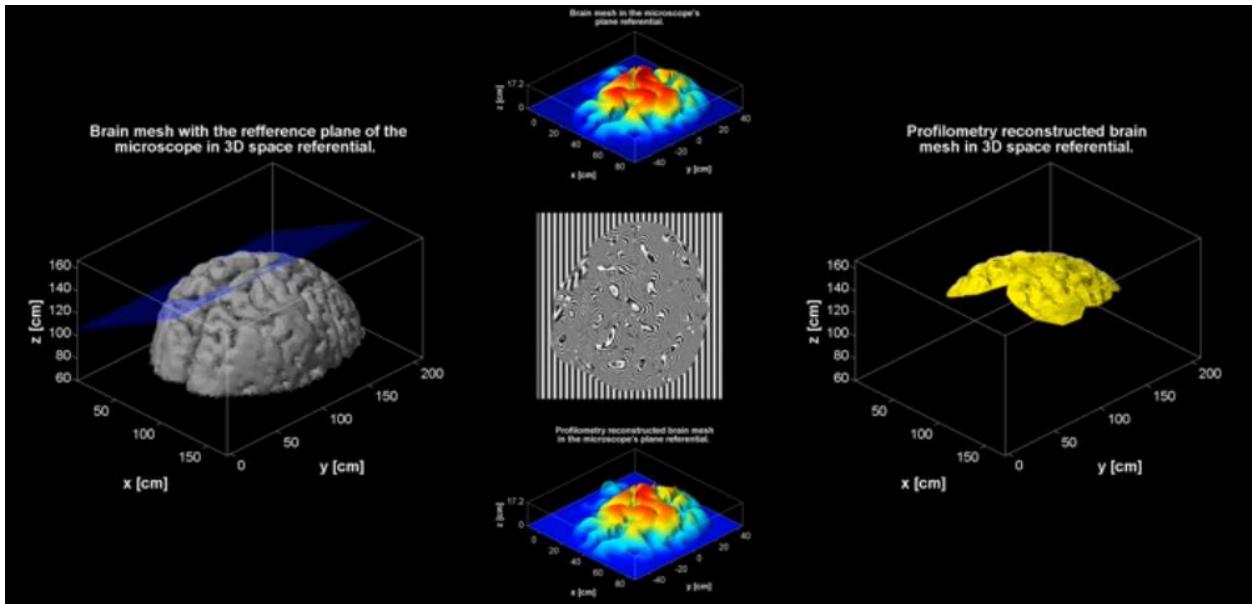


Figure 4-5: (gauche) Plan de référence du champ de vue du microscope imageant le cerveau dans un référentiel 3D. (haut) Cerveau dans le plan de référence du champ de vue du microscope. (milieu) Motif déformé de l'illumination modulée du cerveau (bas) Reconstruction du cerveau avec la profilométrie dans le plan de référence du champ de vue du microscope. (droite) Reconstruction du cerveau avec la profilométrie dans le référentiel 3D.

Finalement, un adaptateur optique et mécanique est en développement pour connecter une source permettant l'excitation de plusieurs marqueurs fluorescents au microscope neurochirurgical. La source utilise différentes DEL pour une illumination sélective à différentes

longueurs d'onde. Ainsi, plusieurs fluorophores pourront être détectés avec le système hyperspectral de manière à augmenter la spécificité de la détection. En effet, le système est actuellement limité à la spécificité de la PpIX pour le contraste durant la chirurgie. L'utilisation de plusieurs marqueurs pourrait augmenter significativement l'efficacité de la résection. Ces travaux sont actuellement effectués par Julien Pichette, PhD, Michael Jermyn, PhD et Guillaume Sheehy du LRO.

CONCLUSION

L'objectif principal de ce projet était de développer un système spectroscopique permettant la détection quantitative de PpIX en champ large dans un contexte neurochirurgical. Le système devait également pouvoir être connecté sur un port latéral libre d'un microscope neurochirurgical Carl Zeiss. Un tel système a été développé. Chacune des composantes optiques, mécaniques et logicielles ont été conçues, assemblées et caractérisées. Ce système a été comparé lors de plusieurs expériences d'imagerie de fantômes fluorescents dans un contexte neurochirurgical au système de l'état de l'art. Dans les deux cas, notre système s'est révélé entre 16 et 25 fois plus sensible en conditions expérimentales identiques. Le système hyperspectral EMCCD a atteint des niveaux sensibilité comparables à une sonde spectroscopique de l'état de l'art, avec une détection d'une concentration de 8ng/mL de PpIX en tissus absorbant. Le système peut être installé rapidement sur le microscope neurochirurgical durant la chirurgie. Les différentes composantes du système sont contrôlées à partir d'une interface personnalisée sur un ordinateur. Cette interface permet l'affichage et la sauvegarde des images acquises en temps réel.

Les travaux effectués avec ce système ont permis de situer le nouveau système hyperspectral EMCCD dans l'état de l'art en tant qu'un système ultra-sensible pouvant être facilement utilisé en chirurgie. La technologie EMCCD c'est aussi démarquée comme le détecteur le plus sensible dans un contexte d'imagerie de fluorescence en faible flux, contrairement aux conclusions récemment publiées dans la littérature.

Enfin, ce système, en dehors du contexte de la présente maîtrise, sera utilisé prochainement lors d'une étude clinique en neurochirurgie avec l'Institut Neurologique de Montréal. Le système sera aussi utilisé dans divers projets, comme l'imagerie fonctionnelle du cerveau durant une chirurgie pour l'épilepsie, l'imagerie quantitative en profondeur de biomarqueurs dans le proche infrarouge et la détection de multiples fluorophores durant la chirurgie de manière à augmenter la spécificité de détection.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. Weissleder and M. J. Pittet, “Imaging in the era of molecular oncology.,” *Nature*, vol. 452, pp. 580–589, 2008.
- [2] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, and H. J. Reulen, “Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 7, pp. 392–401, 2006.
- [3] P. A. Valdés, F. Leblond, V. L. Jacobs, K. D. Paulsen, W. David, and N. Cotton, “In vivo Fluorescence Detection in Surgery : A Review of Principles , Methods , and Clinical Applications,” *Curr. Med. Imaging Rev.*, vol. 8, no. 3, pp. 4–8, 2012.
- [4] B. W. Pogue, S. Gibbs-strauss, P. A. Valdés, K. Samkoe, W. Roberts, and K. D. Paulsen, “Review of Neurosurgical Fluorescence Imaging Methodologies,” *NIH Public Access*, pp. 1–30, 2010.
- [5] P. A. Valdés, F. Leblond, A. Kim, B. T. Harris, B. C. Wilson, X. Fan, T. D. Tosteson, A. Hartov, S. Ji, K. Erkmen, N. E. Simmons, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, “Quantitative fluorescence in intracranial tumor: implications for ALA-induced PpIX as an intraoperative biomarker.,” *J. Neurosurg.*, vol. 115, pp. 11–17, 2011.
- [6] D. W. Roberts, P. a Valdés, B. T. Harris, K. M. Fontaine, A. Hartov, X. Fan, S. Ji, S. S. Lollis, B. W. Pogue, F. Leblond, T. D. Tosteson, B. C. Wilson, and K. D. Paulsen, “Coregistered fluorescence-enhanced tumor resection of malignant glioma: relationships between δ-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence, magnetic resonance imaging enhancement, and neuropathological parameters. Clinical article.,” *J. Neurosurg.*, vol. 114, no. 3, pp. 595–603, Mar. 2011.
- [7] A. Kim, M. Khurana, Y. Moriyama, and B. C. Wilson, “Quantification of in vivo fluorescence decoupled from the effects of tissue optical properties using fiber-optic spectroscopy measurements.,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 6, p. 067006, 2010.
- [8] A. Kim, M. Roy, F. Dadani, and B. C. Wilson, “A fiberoptic reflectance probe with multiple source-collector separations to increase the dynamic range of derived tissue optical absorption and scattering coefficients.,” *Opt. Express*, vol. 18, pp. 5580–5594, 2010.
- [9] P. a Valdés, A. Kim, F. Leblond, O. M. Conde, B. T. Harris, K. D. Paulsen, B. C. Wilson, and D. W. Roberts, “Combined fluorescence and reflectance spectroscopy for in vivo quantification of cancer biomarkers in low- and high-grade glioma surgery.,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 11, p. 116007, Nov. 2011.

- [10] P. a Valdés, F. Leblond, V. L. Jacobs, B. C. Wilson, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, “Quantitative, spectrally-resolved intraoperative fluorescence imaging.,” *Sci. Rep.*, vol. 2, p. 798, Jan. 2012.
- [11] P. a Valdes, V. L. Jacobs, B. C. Wilson, F. Leblond, D. W. Roberts, and K. D. Paulsen, “System and methods for wide-field quantitative fluorescence imaging during neurosurgery.,” *Opt. Lett.*, vol. 38, no. 15, pp. 2786–8, 2013.
- [12] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues, “The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.,” *Acta Neuropathol.*, vol. 114, no. 2, pp. 97–109, Aug. 2007.
- [13] P. A. Valdés, A. Kim, M. Brantsch, C. Niu, Z. B. Moses, T. D. Tosteson, B. C. Wilson, K. D. Paulsen, D. W. Roberts, and B. T. Harris, “Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX concentration correlates with histopathologic markers of malignancy in human gliomas: The need for quantitative fluorescence-guided resection to identify regions of increasing malignancy,” *Neuro. Oncol.*, vol. 13, pp. 846–856, 2011.
- [14] D. W. Roberts, P. a Valdés, B. T. Harris, A. Hartov, X. Fan, S. Ji, F. Leblond, T. D. Tosteson, B. C. Wilson, and K. D. Paulsen, “Glioblastoma multiforme treatment with clinical trials for surgical resection (aminolevulinic acid).,” *Neurosurg. Clin. N. Am.*, vol. 23, no. 3, pp. 371–7, Jul. 2012.
- [15] K. Bekelis, P. a Valdés, K. Erkmen, F. Leblond, A. Kim, B. C. Wilson, B. T. Harris, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, “Quantitative and qualitative 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in skull base meningiomas.,” *Neurosurg. Focus*, vol. 30, no. 5, p. E8, May 2011.
- [16] W. Stummer, H. J. Reulen, A. Novotny, H. Stepp, and J. C. Tonn, “Fluorescence-guided resections of malignant gliomas--an overview.,” 2003.
- [17] W. Stummer, H. Stepp, G. Miller, A. Ehrhardt, M. Leonhard, and H. J. Reulen, “Technical principles for protoporphyrin-IX-fluorescence guided microsurgical resection of malignant glioma tissue,” *Acta Neurochir. (Wien).*, vol. 140, pp. 995–1000, 1998.
- [18] W. Stummer, S. Stocker, S. Wagner, H. Stepp, C. Fritsch, C. Goetz, A. E. Goetz, R. Kiefmann, and H. J. Reulen, “Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence.,” *Neurosurgery*, vol. 42, pp. 518–525; discussion 525–526, 1998.
- [19] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2006, pp. 1–954.
- [20] et al. Rollakanti, Kishore R., Stephen C. Kanick, Scott C. Davis, “Techniques for fluorescence detection of protoporphyrin IX in skin cancers associated with photodynamic therapy,” *Photonics and Lasers in Medicine*, vol. 2. p. 287, 2013.

- [21] G. A. Wagnieres, W. M. Star, and B. C. Wilson, “In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 68, no. 5, pp. 603–632, 1998.
- [22] N. Ramanujam, “Fluorescence Spectroscopy of Neoplastic and Non-Neoplastic Tissues,” *Neoplasia*, vol. 2, pp. 89–117, 2000.
- [23] R. Richards-Kortum and E. Sevick-Muraca, “Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis.,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 47, pp. 555–606, 1996.
- [24] W. G. Roberts and T. Hasan, “Role of neovasculature and vascular permeability on the tumor retention of photodynamic agents.,” *Cancer Res.*, vol. 52, pp. 924–930, 1992.
- [25] B. W. P. Frederic Leblond, Scott C. Davis, Pablo A. Valdés, “Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications.,” *J. Photochem. Photobiol.*, vol. 98, no. 1, pp. 77–94, Jan. 2010.
- [26] S. L. Jacques and B. W. Pogue, “Tutorial on diffuse light transport,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 4, pp. 41302–41319, 2008.
- [27] Q. Fang and D. R. Kaeli, “Accelerating mesh-based Monte Carlo method on modern CPU architectures.,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 3, pp. 3223–30, 2012.
- [28] Q. Fang, “Mesh-based Monte Carlo method using fast ray-tracing in Plücker coordinates,” *Biomedical Optics Express*, vol. 1. p. 165, 2010.
- [29] R. S. Bradley and M. S. Thorniley, “A review of attenuation correction techniques for tissue fluorescence.,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 3, pp. 1–13, 2006.
- [30] S. R. Ennis, X. D. Ren, and A. L. Betz, “Transport of alpha-aminoisobutyric acid across the blood-brain barrier studied with in situ perfusion of rat brain.,” *Brain Res.*, vol. 643, pp. 100–107, 1994.
- [31] S. R. Ennis, A. Novotny, J. Xiang, P. Shakui, T. Masada, W. Stummer, D. E. Smith, and R. F. Keep, “Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain,” *Brain Res.*, vol. 959, pp. 226–234, 2003.
- [32] J. S. Dysart and M. S. Patterson, “Photobleaching kinetics, photoproduct formation, and dose estimation during ALA induced PpIX PDT of MLL cells under well oxygenated and hypoxic conditions.,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 5, pp. 73–81, 2006.
- [33] K. Moghissi, M. R. Stringer, and K. Dixon, “Fluorescence photodiagnosis in clinical practice,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 5, pp. 235–237, 2008.
- [34] O. Daigle, “Spectro-imagerie optique à faible flux et comparaison de la cinématique Ha et HI d’un échantillon de galaxies proches,” Université de Montréal, 2010.

- [35] B. Zhu, J. C. Rasmussen, and E. M. Sevick-Muraca, “A matter of collection and detection for intraoperative and noninvasive near-infrared fluorescence molecular imaging: to see or not to see?,” *Med. Phys.*, vol. 41, no. 2, p. 022105, Feb. 2014.
- [36] P. a Valdés, K. Bekelis, B. T. Harris, B. C. Wilson, F. Leblond, A. Kim, N. E. Simmons, K. Erkmen, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, “5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in meningioma: qualitative and quantitative measurements in vivo.,” *Neurosurgery*, vol. 10 Suppl 1, pp. 74–82; discussion 82–3, Mar. 2014.
- [37] S. D. Konecky, C. M. Owen, T. Rice, P. a Valdés, K. Kolste, B. C. Wilson, F. Leblond, D. W. Roberts, K. D. Paulsen, and B. J. Tromberg, “Spatial frequency domain tomography of protoporphyrin IX fluorescence in preclinical glioma models.,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 5, p. 056008, May 2012.
- [38] P. a Valdés, F. Leblond, a Kim, B. C. Wilson, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, “A spectrally constrained dual-band normalization technique for protoporphyrin IX quantification in fluorescence-guided surgery.,” *Opt. Lett.*, vol. 37, no. 11, pp. 1817–9, Jun. 2012.
- [39] P. a Valdés, F. Leblond, A. Kim, B. T. Harris, B. C. Wilson, X. Fan, T. D. Tosteson, A. Hartov, S. Ji, K. Erkmen, N. E. Simmons, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, “Quantitative fluorescence in intracranial tumor: implications for ALA-induced PpIX as an intraoperative biomarker.,” *J. Neurosurg.*, vol. 115, no. 1, pp. 11–7, Jul. 2011.
- [40] N. Kosaka, M. Mitsunaga, M. R. Longmire, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, “Near infrared fluorescence-guided real-time endoscopic detection of peritoneal ovarian cancer nodules using intravenously injected indocyanine green,” *Int. J. Cancer*, vol. 129, pp. 1671–1677, 2011.
- [41] S. Luo, E. Zhang, Y. Su, T. Cheng, and C. Shi, “A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging.,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 29, pp. 7127–38, Oct. 2011.
- [42] V. Ntziachristos, “Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology.,” *Nat. Methods*, vol. 7, pp. 603–614, 2010.
- [43] T. G. Phan and A. Bullen, “Practical intravital two-photon microscopy for immunological research: faster, brighter, deeper,” *Immunol Cell Biol*, vol. 88, no. 4, pp. 438–444, May 2010.
- [44] F. Leblond, Z. Ovanesyan, S. C. Davis, P. a Valdés, a Kim, a Hartov, B. C. Wilson, B. W. Pogue, K. D. Paulsen, and D. W. Roberts, “Analytic expression of fluorescence ratio detection correlates with depth in multi-spectral sub-surface imaging.,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 56, no. 21, pp. 6823–37, Nov. 2011.
- [45] R. L. Galloway, “The process and development of image-guided procedures.,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 3, pp. 83–108, 2001.

- [46] M. Jansen, S. Yip, and D. N. Louis, “Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers.,” *Lancet Neurol.*, vol. 9, pp. 717–726, 2010.
- [47] L. Marcu, J. A. Jo, P. V Butte, W. H. Yong, B. K. Pikul, K. L. Black, and R. C. Thompson, “Fluorescence lifetime spectroscopy of glioblastoma multiforme.,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 80, pp. 98–103, 2004.
- [48] B. Montcel, L. Mahieu-Willame, X. Armoiry, D. Meyronet, and J. Guyotat, “Two-peaked 5-ALA-induced PpIX fluorescence emission spectrum distinguishes glioblastomas from low grade gliomas and infiltrative component of glioblastomas.,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, no. 4, pp. 548–58, Apr. 2013.
- [49] S. S. Nazeer, A. Saraswathy, A. K. Gupta, and R. S. Jayasree, “Fluorescence spectroscopy as a highly potential single-entity tool to identify chromophores and fluorophores: study on neoplastic human brain lesions.,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 6, p. 067002, Jun. 2013.
- [50] Q. T. Nguyen and R. Y. Tsien, “Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation--a new cutting edge.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 9, pp. 653–62, Sep. 2013.
- [51] J. Svensson and S. Andersson-Engels, “Modeling of spectral changes for depth localization of fluorescent inclusion.,” *Opt. Express*, vol. 13, pp. 4263–4274, 2005.
- [52] J. Swartling, J. Svensson, D. Bengtsson, K. Terike, and S. Andersson-Engels, “Fluorescence spectra provide information on the depth of fluorescent lesions in tissue.,” *Appl. Opt.*, vol. 44, pp. 1934–1941, 2005.
- [53] K. M. Tichauer, K. S. Samkoe, K. J. Sexton, S. K. Hextrum, H. H. Yang, W. S. Klubben, J. R. Gunn, T. Hasan, and B. W. Pogue, “In vivo quantification of tumor receptor binding potential with dual-reporter molecular imaging,” *Mol. Imaging Biol.*, vol. 14, pp. 584–592, 2012.
- [54] J. Wu, M. S. Feld, and R. P. Rava, “Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media.,” *Appl. Opt.*, vol. 32, pp. 3585–3595, 1993.
- [55] M. G. Müller, I. Georgakoudi, Q. Zhang, J. Wu, and M. S. Feld, “Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption.,” *Appl. Opt.*, vol. 40, pp. 4633–4646, 2001.
- [56] F. G. Smith, T. A. King, and D. L. Dawes, “Optics and Photonics: An Introduction,” *American Journal of Physics*, vol. 69. p. 236, 2001.
- [57] M. Rudin and R. Weissleder, “Molecular imaging in drug discovery and development,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, pp. 123–131, 2003.
- [58] B. Geelen, N. Tack, and A. Lambrechts, “A snapshot multispectral imager with integrated tiled filters and optical duplication,” *SPIE Proced.*, vol. 8613, no. 0, p. 861314, Mar. 2013.

ANNEXE 1 – Adaptateur optique

