

**Titre:** Instrumentation optique pour l'identification per-opératoire des tissus durant les chirurgies de la thyroïde  
Title: Instrumentation optique pour l'identification per-opératoire des tissus durant les chirurgies de la thyroïde

**Auteur:** Etienne De Montigny  
Author:

**Date:** 2016

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** De Montigny, E. (2016). Instrumentation optique pour l'identification per-opératoire des tissus durant les chirurgies de la thyroïde [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
Citation: <https://publications.polymtl.ca/2268/>

## Document en libre accès dans PolyPublie Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/2268/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Caroline Boudoux  
Advisors:

**Programme:** Génie physique  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

INSTRUMENTATION OPTIQUE POUR L'IDENTIFICATION PER-OPÉRATOIRE DES  
TISSUS DURANT LES CHIRURGIES DE LA THYROÏDE

ETIENNE DE MONTIGNY  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIÆ DOCTOR  
(GÉNIE PHYSIQUE)  
AOÛT 2016

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

INSTRUMENTATION OPTIQUE POUR L'IDENTIFICATION PER-OPÉRATOIRE DES  
TISSUS DURANT LES CHIRURGIES DE LA THYROÏDE

présentée par : DE MONTIGNY Etienne  
en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiæ Doctor  
a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. LEBLOND Frédéric, Ph. D, président  
Mme BOUDOUX Caroline, Ph. D., membre et directrice de recherche  
M. COHEN-ADAD Julien, Ph. D., membre  
M. LAMOUCHE Guy, Ph. D, membre externe

## DÉDICACE

*À ma famille et mon épouse,  
merci pour votre support indéfectible... .*

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche, Prof. Caroline Boudoux, pour son support financier et scientifique tout au long de ce projet. Elle a guidé mon parcours de chercheur dès le début, d'abord dans des stages, puis à la maîtrise et au doctorat. Merci pour ta confiance. Tu m'as transmis ton enthousiasme et ta passion pour m'aider à poursuivre mon projet.

Je souligne aussi la contribution financière du CRSNG à mon doctorat par une bourse de doctorat Alexandre Graham Bell.

Je veux aussi remercier Dr. Tareck Ayad et Dr. Anastasios Maniakas. Merci d'avoir cru en moi et en mon projet. Vous m'avez permis d'amener mon projet jusqu'à son application. Ça m'a permis d'apprendre énormément sur des sujets qu'on n'enseigne pas à Polytechnique. Merci pour votre dévouement et votre motivation. Un gros merci aussi à toute l'équipe de patrons et de résidents ORL qui m'ont aidés : Dr. Guertin, Dr. Christopoulos, Dr. Bissada, Dre. Olivier, Dr. Tabet, Sarah, Ève, Badr et les autres.

Merci à mes collègues du laboratoire : Mathias Strupler, Fouzi Benboujja, Kathy Beaudette, Nadir Goulamhoussen, Romain Deterre, Dominic Morneau et tous les autres qui ont su laisser leur marque au laboratoire.

Je tiens aussi à remercier mes parents Martine et Pierre, et mes deux soeurs Jacinthe et Audrée pour leur support et leur compréhension durant ces longues années à l'université. Merci de m'avoir encouragé tout au long de mon parcours.

Merci à mes amis de toujours Marc-André, «Bob» et Pierre-Luc. Y'a rien de mieux pour le moral que de passer du temps avec vous.

Finalement, je ne saurais remercier assez ma coéquipière de tous les jours, Julie. Merci de faire partie de ma vie et de me soutenir dans toutes les épreuves. Je n'aurais pas réussi sans toi. Je t'aime.

## RÉSUMÉ

Cette thèse traite du développement d'instrumentation pour l'imagerie médicale optique. Ces travaux sont centrés sur une application particulière ; faciliter l'identification des tissus durant les chirurgies de la thyroïde et de la parathyroïde. La thyroïde est une glande située dans le cou, attachée au larynx à la hauteur de la pomme d'Adam. Elle est entourée de plusieurs structures importantes : muscles, nerfs et glandes parathyroïdes. Ces dernières contrôlent la calcémie et jouent donc un rôle essentiel dans le corps. Elles sont toutefois de petite taille et sont très difficiles à distinguer du gras et des ganglions environnants. L'objectif principal de cette thèse est de développer une instrumentation basée sur la microscopie optique pour permettre l'identification des tissus : thyroïde, parathyroïde, gras et ganglions, durant les chirurgies. Les choix sont donc faits en fonction de cette application et du contexte spécifique des mesures intra-opératoires sur des patients humains.

Plusieurs modalités d'imagerie optique sont identifiées pour atteindre l'objectif : microscopie confocale en réflectance, tomographie par cohérence optique, et mesure de l'autofluorescence des glandes parathyroïdes. Dans le but d'améliorer leur compatibilité avec l'environnement clinique qui requiert stabilité dans le temps et résistance aux vibrations et aux conditions environnementales, ce projet se concentre sur les implantations miniaturisables et basées sur des fibres optiques.

Pour implémenter un système d'imagerie en fluorescence à balayage laser rapide, un système d'imagerie en fluorescence par encodage spectral est proposé. Bien que l'utilisation de l'encodage spectral semble *a priori* incompatible avec le contraste en fluorescence, une implantation facile à réaliser est proposée. Une seconde version du montage, compatible avec la clinique et facilitant le développement d'un endoscope, est présentée. La preuve de principe de cette méthode est faite à 1300 nm, une longueur d'onde qui n'est pas appropriée pour la fluorescence intrinsèque des parathyroïdes. Pour adresser cette lacune, une nouvelle source laser à balayage centrée à 780 nm à haute puissance (100 mW) est montrée. Ces développements sont compatibles avec l'implémentation de la microscopie confocale en réflectance identifiée pour l'identification des tissus durant les chirurgies de la thyroïde. Cela permet de développer un montage combinant le contraste en réflectance et en fluorescence dans le même instrument.

La microscopie confocale en réflectance possède une très grande résolution permettant l'examen au niveau cellulaire des tissus. Cette technique souffre toutefois d'un faible rapport signal sur bruit et d'un bruit de tavelure important, réduisant l'interprétabilité des images.

L'utilisation de fibres à double gaine pour améliorer ce point faible a déjà été proposé, mais la séparation des signaux se propageant dans les deux zones guidantes de la fibre est un défi. Des coupleurs ont déjà été fabriqués en fibre à double-gaine, mais il est prévu qu'il n'est pas possible de fabriquer un coupleur efficace avec la fibre adaptée à la microscopie confocale. Une toute nouvelle fibre est conçue pour répondre aux besoins spécifiques de la microscopie confocale. Un nouveau design de coupleur en fibre à double gaine couplé à une nouvelle méthode de fabrication incluant un pré-traitement des fibres est proposé. Le composant fabriqué de cette manière offre des avantages indéniables pour l'imagerie : augmentation du signal détecté d'un facteur 30, réduction du contraste du bruit de tavelure d'un facteur 4 et augmentation de la résistance aux vibrations avec un coupleur en fibre optique monolithique et un montage auto-aligné par l'utilisation de cette fibre optique.

Ces deux nouvelles améliorations sont combinées dans un microscope tri-modal combinant la microscopie confocale en réflectance par encodage spectral, l'imagerie en fluorescence par encodage spectral et la tomographie par cohérence optique. Ce microscope permet l'imagerie co-enregistrée dans les trois modalités simultanément. La simultanéité est possible par le développement d'un laser à double bande combinant le laser à 780 nm précédemment développé et un laser à balayage en longueur d'onde à 1300 nm. Un logiciel est développé pour permettre l'acquisition, le traitement, l'affichage et l'enregistrement des données simultanément sur les trois canaux. Ce microscope est utilisé pour valider le contraste et les synergies entre les différentes modalités dans le but de sélectionner les modalités les plus adaptées à l'identification intra-opératoire des tissus du cou. Des images de tissu thyroïdien, parathyroïdien, adipeux et ganglionnaire porcins sont présentées pour montrer les différences entre les tissus dans chaque modalité.

Un protocole d'imagerie sur des tissus humain *ex vivo* est élaboré. Les tissus sont imaginés en salle de chirurgie directement après leur extraction avec un système de tomographie par cohérence optique. Cette modalité est choisie, car elle offre une bonne profondeur de pénétration et un grand champ de vue qui permettent de bien observer les tissus. Un système distinct est utilisé pour mesurer l'autofluorescence des glandes parathyroïdes humaines. L'étude est réalisée en collaboration avec le département d'otorhinolaryngologie, particulièrement le Dr. Tareck Ayad qui mène l'étude. Trente patients sont recrutés pour cette étude permettant d'imager plus de 100 échantillons sains et pathologiques différents et obtenir plus de 160 volumes tridimensionnels distincts. Ces données sont évaluées qualitativement et quantitativement, et comparées avec l'histopathologie qui est le standard de diagnostic médical. Qualitativement, des critères sont établis permettant de distinguer les différents tissus basés sur les images. Quantitativement, un algorithme de classification des données à base de réseaux de neurones permet d'identifier automatiquement les tissus en lui présentant une image. Des

taux de précision de classification supérieurs à 90 % sont atteints en classant les thyroïdes, les parathyroïdes et le tissu adipeux. L'autofluorescence de la thyroïde et de la parathyroïde est aussi mesuré, permettant d'estimer la puissance émise par un échantillon. Une des forces de cette étude est qu'elle inclue des tissus sains et pathologiques pour étendre le champ d'application dans les cas de maladie de la parathyroïde (adénome parathyroïdien) et de cancer de la thyroïde.

Un nouveau protocole est préparé pour reproduire les données dans un contexte *in vivo* en prenant des mesures sur des patients durant les chirurgies de la thyroïde ou de la parathyroïde. Deux prototypes de sonde à main sont développés pour réaliser des mesures *in vivo* avec la tomographie par cohérence optique. Le deuxième prototype est une sonde en contact, recouverte par un sac stérile pour prendre des mesures *in vivo*. La caractérisation de la sonde correspond bien avec la modélisation numérique réalisée. Huit patients sont recrutés dans l'étude et plus de 30 spécimens différents sont imaginés. L'utilisation des critères établis durant l'étude *ex vivo* pour interpréter les images permet de bien reconnaître les tissus. La sonde est rapide à préparer pour les mesures *in vivo* et facile à utiliser. Un exemple de tissu mal identifié par le chirurgien, mais correctement identifié avec la sonde est présenté. Cette étude pilote présente de résultats encourageants et ouvre la voie à une étude de plus grande importance pour recruter un plus grand nombre de patients.

Les étapes futures envisagées pour ce projet incluent entre autres un recrutement de plus grande envergure pour les études *ex vivo* et *in vivo*. Ce plus grand nombre d'échantillons permettra de couvrir davantage de cas pathologiques, fréquemment rencontrés lors des chirurgies. Un nouveau design de sonde est proposé à la suite de l'étude pilote *in vivo*, suivant les recommandations issues des discussions avec l'équipe médicale. Ces travaux ont généré un grand intérêt autant pour les contributions en ingénierie optique que pour les nouvelles perspectives médicales. Ce projet adresse un besoin concret des chirurgiens et promet de faciliter leur travail dans le futur.

## ABSTRACT

This thesis aims to develop optical imaging instrumentation for mouth and throat tissue identification. This work is centered on a specific application, helping the surgeons to identify parathyroid glands during thyroid and parathyroid surgery. The thyroid gland is located in the neck, attached to the larynx near the Adam's apple cartilage. This gland is surrounded by some important structures, namely muscles, nerves and parathyroid glands. The latter play an important role in controlling the blood calcium level. These glands are very small and challenging to identify because they can macroscopically look like adipose tissue or lymph nodes. The main objective of this thesis is to develop dedicated instrumentation for intra-operative identification of neck tissue to help locate and preserve the parathyroid glands while removing the thyroid gland.

A few optical imaging modalities have been proposed in literature to help regarding this difficulty. The ones we have retained are reflectance confocal microscopy (RCM), optical coherence tomography (OCT) and fluorescence imaging. In order to translate these optical imaging modalities to a clinical setting, implementations have been selected based on their potential for miniaturization and robustness to environmental conditions. These implementations are based on the use of optical fibers and fibered components.

To implement a rapid method for laser scanning fluorescence imaging, a novel spectrally encoded fluorescence imaging scheme is developed. Albeit fluorescence seems incompatible with spectral encoding, the implementation suggested here is simple and yields high pixel density images at high line rates. The proof-of-principle is based on a 1300 nm wavelength-swept source by imaging fluorescent quantum dots. For this system to be useful in a thyroid surgery application setting, a novel 780 nm-centered high power wavelength-swept laser is developed. This source can be used to excite the intrinsic fluorescence of the parathyroid glands. This allows for the combination of a reflectance and fluorescence imaging in the same setup.

Reflectance confocal microscopy is another candidate technique for intra-operative tissue identification, because it allows for high resolution cellular imaging on thick samples. However, this modality generally suffers from high speckle noise and poor signal-to-noise ratio as imaging depth increases. The use of double-clad fibers has been proposed in the literature to alleviate these issues, but signal separation is still complicated. A double-clad fiber can be used for coherent illumination of the sample through the single-mode core and high efficiency collection through the carefully designed inner cladding. The challenge is to sep-

arate the signal traveling in the core from the one traveling in the inner cladding. A beam splitter approach is generally used, but leads to high losses and vulnerability to mechanical vibrations and misalignment. Double-clad fiber couplers have been developed in other cases, but it was thought impossible to fabricate such a coupler for efficient confocal microscopy through a double-clad fiber. This coupler was developed during the thesis and leads to a 30-fold increase in signal collection and a 4-fold reduction in speckle contrast.

These two aforementioned improvements have been used to combine the three optical imaging modalities identified as candidates for intra-operative tissue identification: reflectance confocal microscopy, spectrally encoded fluorescence imaging and optical coherence tomography. A custom microscope was built and allows for simultaneous, co-registered imaging in all three modalities. This was made possible by the development of a dual-band wavelength-swept laser based around the 780 nm laser previously demonstrated. A novel imaging software was also developed by the candidate for real-time acquisition, processing, display and saving of data in all three channels. Swine *ex vivo* samples of thyroid, parathyroid, adipose tissue and lymph node were imaged with the tri-modal microscope.

Moving forward towards the end goal, a research protocol based on OCT imaging on freshly excised human specimens from surgery was submitted to the institutional ethics committee for approval. Human tissue samples are imaged in the surgery room on a cart-mounted OCT imaging system optimized for this application. Thirty patients were recruited in this study and more than 100 different specimens were imaged, yielding more than 160 different OCT volumes of  $10\text{ mm} \times 10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ . Qualitative and quantitative analysis was carried out and confirmed with histopathology, the gold standard in medical diagnosis. More than 90 % accuracy was achieved with neural network automated classification. Parathyroid auto-fluorescence signal was also detected with a different probe specially designed to measure extremely low signals. Pathological specimens were also studied to extend the application field to parathyroid surgery and thyroid cancer surgery.

A new research protocol was then submitted for *in vivo* measurements during thyroid surgeries. Two hand-held imaging probes were developed for intra-operative imaging. Eight patients were recruited in the study and results are in good agreement with the previous *ex vivo* study. The contact imaging probe is easy to handle and can access most tissue in the surgical opening. The qualitative criteria established during *ex vivo* imaging proved to be reliable in an *in vivo* context. Some tissue mistakenly identified by the surgeon were correctly identified with the imaging probe. This pilot study showed the potential of optical imaging for intra-operative tissue identification.

Future steps of this project include the recruitment of more patients to increase the reliability

of the results and extend to more pathologies. This project sparks the interest of the medical community and targets a real need for surgeons. In the future, this instrument paves the way towards a reliable instrument to be used in thyroid and parathyroid surgeries.

## TABLE DES MATIÈRES

|   |       |
|---|-------|
| DÉDICACE . . . . .  | iii   |
| REMERCIEMENTS . . . . .   | iv    |
| RÉSUMÉ . . . . .  | v     |
| ABSTRACT . . . . .  | viii  |
| TABLE DES MATIÈRES . . . . .  | xi    |
| LISTE DES TABLEAUX . . . . .  | xiv   |
| LISTE DES FIGURES . . . . .   | xv    |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS . . . . .  | xxiii |
| LISTE DES ANNEXES . . . . .   | xxv   |
| <br>CHAPITRE 1 INTRODUCTION . . . . .   | 1     |
| 1.1 Contexte médical . . . . .  | 1     |
| 1.2 Problématique . . . . .   | 3     |
| 1.3 Cahier de charges . . . . .   | 5     |
| 1.4 Objectifs de recherche . . . . .  | 6     |
| 1.5 Plan de la thèse . . . . .  | 6     |
| <br>CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE . . . . .                                       | 8     |
| 2.1 Approches actuelles . . . . .   | 8     |
| 2.2 Modalités optiques proposées . . . . .  | 12    |
| 2.3 Considérations de design . . . . .  | 25    |
| 2.4 Technologies fibrées . . . . .  | 27    |
| <br>CHAPITRE 3 IMAGERIE ENCODÉE SPECTRALEMENT EN FLUORESCENCE                       | 37    |
| 3.1 Principes de l'encodage spectral . . . . .                                      | 37    |
| 3.2 Encodage spectral en fluorescence avec une source à balayage en longueur d'onde | 39    |
| 3.3 Implémentation fibrée . . . . .   | 43    |
| 3.4 Laser à 780 nm . . . . .  | 45    |

|   |     |
|---|-----|
| 3.5 Discussion et conclusion . . . . .  | 49  |
| CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : DOUBLE-CLAD FIBER COUPLER FOR PARTIALLY COHERENT DETECTION . . . . .   |     |
| 4.1 Abstract . . . . .  | 51  |
| 4.2 Introduction . . . . .  | 52  |
| 4.3 Small-ratio double-clad fiber coupler . . . . .   | 53  |
| 4.4 Application to confocal microscopy . . . . .  | 58  |
| 4.5 Discussion and conclusion . . . . .   | 63  |
| CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : TRI-MODAL MICROSCOPE FOR HEAD AND NECK TISSUE IDENTIFICATION . . . . . |     |
| 5.1 Abstract . . . . .  | 65  |
| 5.2 Introduction . . . . .  | 66  |
| 5.3 Methodology . . . . .   | 68  |
| 5.4 Results . . . . .   | 73  |
| 5.5 Discussion . . . . .  | 78  |
| 5.6 Conclusion . . . . .  | 80  |
| CHAPITRE 6 IMAGERIE EX VIVO DE TISSUS HUMAINS . . . . .                                       |     |
| 6.1 Introduction . . . . .  | 82  |
| 6.2 Méthodologie . . . . .  | 83  |
| 6.3 Résultats . . . . .   | 90  |
| 6.4 Discussion . . . . .  | 102 |
| 6.5 Conclusion . . . . .  | 106 |
| CHAPITRE 7 IMAGERIE IN VIVO . . . . .   |     |
| 7.1 Introduction . . . . .  | 107 |
| 7.2 Prototype avec garde . . . . .  | 107 |
| 7.3 Design de la sonde en contact . . . . .   | 110 |
| 7.4 Méthodologie . . . . .  | 110 |
| 7.5 Résultats . . . . .   | 111 |
| 7.6 Discussion . . . . .  | 118 |
| 7.7 Conclusion . . . . .  | 120 |
| CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE . . . . .  |     |
| CHAPITRE 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS . . . . .  |     |
|   | 124 |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 9.1 | Synthèse des travaux . . . . .                | 124 |
| 9.2 | Limitations de la solution proposée . . . . . | 125 |
| 9.3 | Améliorations futures . . . . .               | 126 |
| 9.4 | Perspectives . . . . .                        | 127 |
|     | RÉFÉRENCES . . . . .                          | 129 |
|     | ANNEXES . . . . .                             | 141 |

## LISTE DES TABLEAUX

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| Tableau 2.1 | Caractéristiques principales des systèmes OCT selon leur implémentation [1, 2] . . . . .   | 22  |
| Tableau 2.2 | Tissus d'intérêt à identifier lors des chirurgies de la thyroïde et leurs caractéristiques importantes. Les +, -, et ± indiquent la capacité de chaque modalité à observer ces caractéristiques selon mon analyse de la littérature. (1). La capsule entourant la thyroïde est une structure d'épaisseur variable qui peut empêcher la MCR de visualiser les follicules thyroïdiens. Certains autres tissus comme les ganglions et les glandes parathyroïdes peuvent aussi être recouverts de tissu conjonctif ou fibro-adipeux. (2). La quantité de tissu adipeux entourant les ganglions et glandes parathyroïdes varie en fonction de plusieurs paramètres dont l'âge et l'indice de masse corporelle du patient. . . . . | 24  |
| Tableau 5.1 | Imaging modalities applied to neck tissue identification . . . . .   | 68  |
| Tableau 5.2 | Theoretical and experimental resolution values for the tri-modal imaging system . . . . .  | 74  |
| Tableau 6.1 | Sensibilité et spécificité . . . . .   | 90  |
| Tableau 6.2 | Matrice de confusion . . . . .   | 90  |
| Tableau 6.3 | Nombre total de spécimens imagés durant l'étude <i>ex vivo</i> , selon la condition et le type de tissu. . . . .   | 91  |
| Tableau 6.4 | Résultats de classification avec les métriques de contraste et de corrélation par la méthode <i>Boosted Trees</i> . . . . .  | 101 |
| Tableau 6.5 | Résultats de classification avec les métriques de contraste et de corrélation par la méthode des réseaux neuronaux convolutifs. . . . .  | 101 |
| Tableau 7.1 | Performances modélisées et mesurées de la sonde à main en fonction des contraintes de design. . . . .  | 115 |
| Tableau 7.2 | Nombre total de spécimens imagés durant l'étude <i>in vivo</i> , selon type de tissu tel que déterminé par le chirurgien. . . . .  | 115 |

## LISTE DES FIGURES

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figure 1.1 | (a) Glande thyroïde (vue de face). (b) Thyroïde et parathyroïdes (vue de dos).  | 2  |
| Figure 1.2 | Photographie du champ chirurgical. On peut observer de nombreuses structures qu'il est difficile d'identifier macroscopiquement, même pour un chirurgien expérimenté.   | 4  |
| Figure 2.1 | Diagramme de Jablonski de la fluorescence. Un photon est absorbé et la molécule passe à un niveau excité. Une transition non-radiative permet à la molécule de redescendre au niveau vibrationnel fondamental de l'état excité. L'émission d'un photon de fluorescence survient quelques nanosecondes plus tard accompagné par le retour de la molécule à l'état fondamental.           | 13 |
| Figure 2.2 | Microscopie confocale. (a) Schéma tel qu'il apparaît dans le brevet de Minsky, l'inventeur de la technique. (b) Schéma général d'un microscope confocal à balayage laser. G : miroirs montés sur des galvanomètres. Det. : DéTECTEUR  | 17 |
| Figure 2.3 | Schéma d'un montage de microscopie confocale encodée spectralement. Toutes les longueurs d'onde de la source sont envoyées séquentiellement pour illuminer l'échantillon. Les longueurs d'onde sont dispersées par le réseau de diffraction qui fait diffracter chaque longueur d'onde à un angle différent. De cette manière, la longueur d'onde encode la position sur l'échantillon. | 20 |
| Figure 2.4 | Principe d'utilisation de la lentille objectif pour accommoder les contraintes de design du système SECM et OCT.  | 28 |
| Figure 2.5 | Différents types de fibres optiques avec leur profil d'indice de réfraction respectif. Le coeur est identifié en rouge, la gaine interne est en blanc et la gaine externe est en bleu. (a) fibre monomode, (b) fibre multimode (c) fibre double gaine à grande gaine interne et (d) fibre double gaine à petite gaine interne.  | 30 |
| Figure 2.6 | Transmission multimode théorique (ligne pleine) en fonction du rapport d'étendue ( $\frac{G_3}{G_1}$ ). Les points expérimentaux sont en rouge.   | 33 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figure 3.1 | Montage expérimental d'imagerie encodée spectralement en fluorescence. La fluorescence est ré-émise à une longueur d'onde plus grande, ce qui permettra à ce signal de réfléchir sur le dichroïque pour aller dans une voie de détection séparée du canal en réflectance, tout en préservant l'encodage temporel par la source. SS : Source à balayage en longueur d'onde. C : Circulateur. D1,D2 : Photodiodes. CL : Lentille de collimation. GR : Réseau de diffraction. DM : Miroir dichroïque. OL : Lentille objectif. LF : Filtre passe-long à 1400 nm. CL : Lentille de focalisation. Reproduit avec permission de [3]. . . . .  | 41 |
| Figure 3.2 | (a) Schéma de l'échantillon construit au laboratoire pour tester le système. (b) Image en réflectance montrant très faiblement les canaux. La flèche indique une interface air-polycarbonate qui produit une plus grande réflexion. (c) Image en fluorescence où les canaux contenant des fluorophores sont bien visibles. (d) Graphique représentant une ligne horizontale prise sur les signaux de fluorescence et de réflectance. Cette figure illustre l'intensité détectée sur chaque canal. (e) Linéarité de l'intensité du signal de fluorescence en fonction de la concentration. (f) Recouvrement des champs de vue en réflectance (noir) et en fluorescence(rouge) avec une partie de la courbe d'absorption des points quantiques utilisés. . . . . | 42 |
| Figure 3.3 | Montage fibré de fluorescence encodé spectralement pouvant être implémenté dans une sonde endoscopique. Ce montage est plus compact, car la fibre monomode d'illumination et la fibre multimode de détection sont une à côté de l'autre et colinéaires. La lumière émise par fluorescence est déviée à un plus grand angle par le réseau en raison de sa longueur d'onde plus grande. . . . .  | 44 |
| Figure 3.4 | Schéma du montage du laser à 780 nm. La cavité initiale de la diode laser est étendue pour intégrer un filtre accordable rapidement composé d'un réseau de diffraction, d'un télescope et d'un polygone rotatif. Cela permet de faire varier rapidement la longueur d'onde amplifiée dans la cavité. . . . .   | 46 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figure 3.5 | Caractérisation du laser à 780 nm.(a) Puissance de sortie du laser en fonction du courant d'injection. Le seuil pour l'émission laser est d'environ 50 mA. (b) Trace temporelle de la puissance du laser. On mesure de cette courbe un régime d'utilisation de 90 %. (c) Densité spectrale de puissance tracée en fonction du courant d'injection. Le laser n'atteint sa pleine largeur spectrale qu'au courant maximal. (d) Puissance de sortie normalisée en fonction de la vitesse d'accordabilité du laser. Le signe négatif indique que le polygone tourne dans l'autre sens. . . . . | 48 |
| Figure 4.1 | (a) Schematic diagram of a small-ratio double-clad fiber coupler achieved by fusing a double-clad fiber (top) with a coreless multimode fiber (bottom). The core, inner cladding and outer cladding regions are shown in red, blue and white, respectively. The guiding region of the coreless fiber is shown in white and its guiding jacket is shown in green. (b) and (d) Cross-sections of the double-clad and multimode fibers, respectively. (c) Refractive index profile of the coupler's central section. . . . .  | 54 |
| Figure 4.2 | (a) Schematic diagram of the tapered DCF with representations of the fundamental mode (red) and inner cladding modes (blue) at the beginning and in the center of the taper. (b) Effective refractive indices of the fundamental mode (solid line) and cladding modes (gray area) as they propagate in the DCF, transition section (TS) and constant section (CS), respectively. . . . .   | 55 |
| Figure 4.3 | Single mode transmission (blue curve) of the sDCFC, measured from Port 1 to Port 2. Multimode extraction (green curve) as measured from Port 2 to Port 3. Ports are defined on Fig. 4.1 . . . . .  | 59 |
| Figure 4.4 | Diagram of the laser scanning confocal microscopy setup using the sDCFC. In this setup, the sDCFC inner cladding is used as the spatial filter for confocal detection. Coll : Collimator, PD : Photodetector, BD : Beam dump, G : Galvanometer-mounted mirrors, Tel : Telescope, Obj : Microscope objective. . . . .   | 60 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figure 4.5 | Coherent (left column) and partially coherent (right column) detection images of swine thyroid tissue. (c) and (d) respectively show coherent and partially coherent detection magnified views of the top inset taken from (a) and (b). Arrows show a structure whose texture changes with the reduction of speckle contrast. (e) and (f) respectively show magnified views of the bottom inset in (a) and (b). Arrows point to bright spots that are still visible when speckle contrast is decreased. Scale bar is 100 $\mu\text{m}$ . Intensity colorbars are in arbitrary units. . . . .  | 61 |
| Figure 4.6 | Coherent (left column) and partially coherent (right column) detection images of swine muscular tissue taken at 72 $\mu\text{m}$ deep measured from the tissue surface. A movie shows the confocal images as depth increases from 15 $\mu\text{m}$ to 105 $\mu\text{m}$ ( <a href="#">Media 1</a> ). Scale bar is 100 $\mu\text{m}$ . . . . .   | 62 |
| Figure 5.1 | Schematic diagram of the dual-band wavelength-swept laser. A detailed diagram of the dual-band laser (a) shows the 1310 nm OCT laser in red and the 780 nm laser for SECM in blue. Output spectra are shown at 1300 nm (b) and 780 nm (c). (d) 780 nm (blue) and 1300 nm (red) laser and trigger (green) signals as a function of time. . . . .   | 70 |
| Figure 5.2 | Schematic diagram of the tri-modal imaging microscope. The OCT path (1300 nm) is shown in red, the SECM path (800 nm) is shown in blue and the fluorescence detection path is shown in green. C : Circulator, G : Galvanometer-mounted mirror, DB : Dual-balanced detector, Obj. : Objective lens, PD : Photodiode, BD : Beam dump, sDCFC : small inner cladding double-clad fiber coupler, APD : Avalanche photodiode, SMF : single mode fiber, MMF : multimode fiber . . . . .  | 71 |
| Figure 5.3 | SECM (a) and OCT (b) images of a USAF 1951 resolution target. Co-registered images (c) of SECM (grey) and fluorescence (green) of three sewing threads dipped in AlexaFluor 790 at different concentrations : (from left to right) 0 $\mu\text{M}$ , 6.5 $\mu\text{M}$ and 65 $\mu\text{M}$ fluorophore concentration. Scale bar is 50 $\mu\text{m}$ . Co-registered in vivo SECM (d) and OCT (e) images of a human finger. Features such as a sweat duct (arrow) can be observed in both images. The red line in (d) represents the projection of the OCT image plane in the confocal image. The blue line in (e) represents the projection of the confocal image in the OCT plane. Arrows show a sweat duct. Scale bar is 100 $\mu\text{m}$ . . . . . | 75 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figure 5.4 | Images of different ex vivo neck tissue samples. The left and right columns show the SECM image and the center column shows the co-registered OCT image. The position of the SECM image in the OCT image is shown with the curly bracket ({} ) and black arrows. (a) and (b) show thyroid tissue, (c) and (d) show thyroid tissue, (e) lymph node (f) lymph node and adipose lobules, (g) parathyroid gland, cellular area, (h) parathyroid gland with heterogeneous aspect. OCT scale bars are 200 µm , SECM scale bars are 100 µm. . . . .  | 77 |
| Figure 5.5 | Still frame from the video recording of an ex vivo thyroid tissue sample covered by a fibrous capsule. On the left is presented the SECM image and on the right the co-registered OCT image. . . . .  | 78 |
| Figure 6.1 | Chariot et système d'imagerie en salle d'opération. Le chariot est amené en salle d'opération après que le patient ait été endormi. . . . .   | 84 |
| Figure 6.2 | Instrumentation pour les mesures de l'autofluorescence de la parathyroïde. (a) Schéma du montage de mesure de l'autofluorescence. La diode laser est connectée à la sonde pour l'illumination. La fibre de détection de la sonde est connectée à un tube contenant deux filtres passe-longs à 810 nm. Le signal est ensuite envoyé sur le spectromètre. (b) Photographie de la sonde où on peut voir les connecteurs temporaires en haut à gauche et la sonde à droite dont le bout apparaît en bleu, qui est la couleur de la colle époxy une fois durcie. La fibre blanche sert pour l'illumination et la fibre orange est pour la détection. (c) Agrandissement du bout de la sonde. Le bout bombé a été poli pour optimiser la transmission et protéger les fibres. . . . . | 86 |
| Figure 6.3 | Hémi-thyroïde marquée avec des fils bleus et noirs pour identifier les zones imagées. L'hémi-thyroïde fait environ 4 cm par 2 cm. . . . .   | 87 |
| Figure 6.4 | Histologie (40x) et image OCT d'un échantillon de thyroïde. . . . .   | 92 |
| Figure 6.5 | Histologie (20x) (a) et image OCT (b) d'un échantillon de thyroïde hyperplasique. (c) et (d) Images OCT d'échantillons de thyroïde recouverts d'une épaisse couche fibreuse qui limite la profondeur de pénétration dans le tissu. . . . .  | 93 |
| Figure 6.6 | Tissu adipeux (a) Photographie du spécimen. (b) Histologie (40x). (c) et (d) Images OCT en coupe représentatives de cet échantillon. . . .  | 94 |
| Figure 6.7 | Parathyroïde (a) Photographie du spécimen. (b) Histologie (20x). (c) et (d) Images OCT en coupe représentatives de cet échantillon. Les flèches indiquent la présence de gras stromal sur l'histologie et les images OCT. 95  | 95 |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| Figure 6.8  | Ganglion (a) Photographie du spécimen. (b) Histologie (40x). (c) et (d) Images OCT en coupe représentatives de cet échantillon. A : région riche en tissu adipeux. L : région riche en tissu lymphoïde. . . . .   | 96  |
| Figure 6.9  | Trois spécimens d'adénomes parathyroïdiens (a) On observe un adénome parathyroïdien au centre (P) avec une masse adipeuse du côté droit (A). On note l'absence de gras stromal présent dans la glande. (b) Adénome parathyroïdien où des vaisseaux sanguins sont visibles près de la surface (flèches) (c) Adénome parathyroïdien présentant des sections contenant ce qui ressemble à du gras stromal. . . . .   | 98  |
| Figure 6.10 | Trois spécimens de ganglions positifs à la présence de cellules cancéreuses avec les histologies correspondantes à ces échantillons. (a) Image OCT d'un ganglion montrant une structure similaire au carcinome papillaire de la thyroïde (ellipse jaune). La thyroïde de ce patient contenait ce type de cancer. (b) Histologie correspondante à ce ganglion où la structure papillaire du cancer de la thyroïde est observable (ellipse jaune). (c) Image OCT d'un ganglion montrant plusieurs régions circulaires brillantes, indiquées par les flèches. (d) Histologie correspondant à cet échantillon montrant des micro-calcifications (flèches). Ces micro-calcifications peuvent être la source des points très réfléchissants dans l'image OCT. (e) Image OCT d'un ganglion où des formes rappelant les follicules de la thyroïde sont visibles (pointes de flèches). (f) Histologie de cet échantillon montrant un envahissement du tissu thyroïdien dans le ganglion et la présence de follicules thyroïdiens (pointes de flèches). | 100 |
| Figure 6.11 | Signal d'autofluorescence des parathyroïdes (bleu) et de la thyroïde (rouge). La courbe foncée représente la valeur moyenne et la région pâle représente l'étalement des données avec comme bornes deux fois l'écart-type. . . . .  | 102 |
| Figure 7.1  | Photographies de la sonde : (a) sonde à main, (b) sonde à main avec sac stérile, (c) sonde à main avec sac stérile et garde, (d) sonde en utilisation en champ opératoire. . . . .  | 109 |
| Figure 7.2  | Photographies des tissus avant d'utiliser la sonde selon l'identification du chirurgien : (a) thyroïde, (b) gras, (c) parathyroïde et (d) ganglion. On remarque que les tissus sont visuellement semblables et qu'il est difficile de bien les distinguer. . . . .  | 111 |

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Figure 7.3 | Photographies du second prototype de sonde utilisé pour l'étude <i>in vivo</i> . (a) Sonde comprenant la tête de la sonde contenant la lentille de collimation et le mécanisme de balayage du faisceau, et le tube de la sonde contenant l'optique de relais et de focalisation sur l'échantillon. (b) La sonde recouverte d'un sac stérile pour l'utilisation <i>in vivo</i> . La sonde est disposée sur une table stérile en attendant la prise de mesures. (c) Le sac stérile est maintenu en place par une bande autocollante fournie avec le sac stérile. Elle permet que le sac stérile soit libre de plis et bien en contact avec la fenêtre pour limiter les réflexions parasites. (d) La sonde durant une prise de mesures <i>in vivo</i> . . . . .  | 113 |
| Figure 7.4 | Modélisation de la sonde dans Zemax OpticsStudio. (a) Schéma de la sonde telle que modélisée. Les lentilles utilisées sont des doublets achromatiques pour l'infrarouge proche. Une fenêtre de 3 mm est placée en bout de la sonde pour être en contact avec le tissu. (b) Diagramme de tache ( <i>Spot Diagram</i> ) représentant l'arrivée des rayons dans le plan image en fonction de leur angle à l'entrée du système et de la longueur d'onde (dans l'ordre : sur l'axe, +5° et -5°). (c) Diagramme de tache pour le faisceau sur l'axe au meilleur focus. On peut observer qu'à ce point, la taille du faisceau est limitée par la diffraction. (d) Variation de la longueur focale en fonction de la longueur d'onde. Comme des doublets achromatiques sont utilisés, cette variation est d'environ 100 µm sur la plage de 1250 nm à 1350 nm. . . . . | 114 |
| Figure 7.5 | Images représentatives de tissus rencontrés durant une thyroïdectomie obtenues avec la sonde à main. De haut en bas, thyroïde, parathyroïde, gras et muscle. En (a), les follicules thyroïdiens sont visibles sur tout le champ de vue. En (b), la parathyroïde occupe la partie gauche de l'image, les inclusions de gras stromal correspondent à ce qui a été observé <i>ex vivo</i> . En (c), les taches circulaires de petite taille représentatives du tissu adipeux sont reconnaissables sur toute l'image. En (d), l'organisation du muscle crée une biréfringence qui mène à une alternance de bandes horizontales claires et sombres. La barre d'échelle est de 500 µm. . . . .  | 117 |

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Figure 7.6 | Échantillon identifié par le chirurgien comme un ganglion, mais qui a été identifié comme du tissu thyroïdien à l'OCT. La position atypique de ce tissu thyroïdien explique pourquoi il a été pris pour un ganglion. (a) et (b) montrent des images acquises avec la sonde <i>in vivo</i> . (c) et (d) montrent les images OCT acquises <i>ex vivo</i> . Les barres d'échelle sont de 500 µm. . . . . | 118 |
| Figure B.1 | Images en microscopie confocale à l'aide du sDCFC ((a) réflectance, (b) fluorescence et (c) composite) de cellules fibroblastes où les mitochondries ont été marquées avec une molécule fluorescente. La barre d'échelle représente 100 µm. . . . .   | 147 |
| Figure C.1 | Capture d'écran de l'interface graphique du logiciel d'acquisition montrant les images acquises simultanément en microscopie confocale (gauche) et en OCT (droite) d'un ganglion porcin. . . . .  | 151 |
| Figure D.1 | Schéma de principe d'un coupleur asymétrique . . . . .  | 154 |
| Figure D.2 | Performances optiques multimode et monomode du coupleur asymétrique   | 157 |
| Figure D.3 | Preuve de principe d'utilisation du coupleur asymétrique dans un montage d'imagerie par encodage spectral. . . . .  | 158 |
| Figure D.4 | Prédiction théorique et vérification expérimentale des performances multimode du coupleur asymétrique avec le modèle de l'étendue. . . . .  | 160 |
| Figure E.1 | Schéma du montage pour démontrer la combinaison de l'OCT et de la fluorescence à l'aide d'un coupleur à double gaine. . . . .   | 161 |
| Figure E.2 | Image composite d'un tube rempli d'Alexa Fluor 790, un agent fluorescent excitable à 785 nm. Le signal de fluorescence n'est pas résolu axialement (en hauteur), il a été placé à cet endroit étant donné la connaissance <i>a priori</i> de l'origine du signal de fluorescence. . . . .   | 162 |

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

|       |  |
|-------|--|
| BOA   | Booster Optical Amplifier  |
| CD    | Détection cohérente, de l'anglais <i>Coherent Detection</i>  |
| CHUM  | Centre hospitalier de l'Université de Montréal   |
| CM    | Microscopie confocale, de l'anglais <i>Confocal Microscopy</i>   |
| COPL  | Centre d'optique, photonique et laser  |
| CS    | Constant Section   |
| CT    | Tomographie calculée, de l'anglais <i>Computed Tomography</i>  |
| DAQ   | Data Acquisition System  |
| DCF   | Fibre à double gaine, de l'anglais <i>Double Clad Fibre</i>  |
| DCFC  | Coupleur en fibre à double gaine, de l'anglais <i>Double Clad Fibre Coupler</i>  |
| FDA   | Food and Drug Administration   |
| FFT   | Fast Fourier Transform   |
| FOV   | Champ de vue, de l'anglais <i>Field of View</i>  |
| FWHM  | Full Width at Half Maximum   |
| ICG   | Indocyanine Green  |
| IRM   | Imagerie par résonnance magnétique nucléaire   |
| ITR   | Inverse du taux de réduction   |
| MCR   | Microscopie confocale en réflectance   |
| MEMS  | Micro Electro-Mechanical System  |
| MFD   | Mode-Field Diameter  |
| MM    | Multimode  |
| MMF   | Multimode Fibre  |
| NA    | Ouverture numérique, de l'anglais <i>Numerical Aperture</i>  |
| NSERC | Conseil de recherche en sciences naturelles et génie du Canada, de l'anglais <i>National Sciences and Engineering Research Council of Canada</i> |
| OCT   | Tomographie par cohérence optique, de l'anglais <i>Optical Coherence Tomography</i>  |
| ORL   | Otorhinolaryngologie   |
| PCD   | Détection partiellement cohérente, de l'anglais <i>Partially Coherent Detection</i>  |
| PTH   | Hormone parathyroïdienne, de l'anglais <i>Parathyroid Hormone</i>  |
| QPTH  | Bioanalyse rapide de l'hormone parathyroïdienne, dde l'anglais <i>Quick Parathyroid Hormone Assay</i>  |

|        |  |
|--------|--|
| RCM    | Reflectance Confocal Microscopy  |
| SD-OCT | OCT dans le domaine spectral basé sur un spectromètre, de l'anglais<br><i>Spectral Domain Optical Coherence Tomography</i> |
| sDCFC  | Coupleur en fibre à double gaine de petit ratio, de l'anglais <i>Small-ratio Double Clad Fibre Coupler</i>                 |
| SECM   | Microscopie confocale encodée spectralement, de l'anglais <i>Spectrally-Encoded Confocal Microscopy</i>                    |
| SEFI   | Spectrally-Encoded Fluorescence Imaging  |
| SS-OCT | OCT dans le domaine spectral basé sur une source à balayage, de l'anglais <i>Swept-Source Optical Coherence Tomography</i> |
| SSD    | Solid State Drive  |
| Tc     | Technicium   |
| TD-OCT | OCT dans le domaine temporel, de l'anglais <i>Time-Domain Optical Coherence Tomography</i>                                 |
| TS     | Transition Section   |
| USAF   | United States Air Force  |
| UV     | Ultra-violet   |
| VCSEL  | Vertical Cavity Side-Emitting Laser  |

**LISTE DES ANNEXES**

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| Annexe A | LISTE DES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES . . . . .  | 141 |
| Annexe B | RÉSULTATS ET DISCUSSION SUPPLÉMENTAIRES AU CHAPITRE<br>4 . . . . .                                     | 144 |
| Annexe C | LOGICIEL D'ACQUISITION . . . . .   | 150 |
| Annexe D | CONTRIBUTION AU DÉVELOPPEMENT DE COUPLEURS DCF<br>À GRANDE GAINÉ . . . . .                             | 152 |
| Annexe E | IMAGERIE MULTIMODALE COMBINANT L'OCT ET LA FLUO-<br>RESCENCE AVEC UN COUPLEUR À DOUBLE GAINÉ . . . . . | 161 |

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

De nos jours, les chirurgies de la glande thyroïde font partie des procédures chirurgicales les plus sûres [4, 5]. Cela n'a toutefois pas toujours été le cas. En 1866, Samuel Gross<sup>1</sup> comparait le chirurgien de la thyroïde à un boucher : *lucky will it be for him if his victim lives long enough to survive his hard butchery* [4]. Heureusement, la médecine a beaucoup évolué et la pratique de la thyroïdectomie est devenue commune et sécuritaire. Theodor Kocher est considéré comme le père de la chirurgie de la thyroïde. Son travail fut récompensé par un prix Nobel de médecine en 1909 «pour ses travaux sur la physiologie, la pathologie et la chirurgie de la thyroïde» [6]. Ses travaux ont permis d'établir les bases pour rendre les chirurgies de la thyroïde sûres.

### 1.1 Contexte médical

Plusieurs pathologies peuvent affecter la glande thyroïde. Les désordres de la thyroïde regroupent l'hyperthyroïdisme (sur-production d'hormones), l'hypothyroïdisme (sous-production d'hormones), la thyroïdite (inflammation de la glande) et les nodules, qui peuvent se révéler bénins ou cancéreux. Toutes ces conditions peuvent aussi mener à un goître, c'est-à-dire une augmentation importante du volume de la glande [7]. L'ablation chirurgicale de la thyroïde, une procédure appelée thyroïdectomie, peut être recommandée pour des cas bénins et pour la très grande majorité des cas de cancer [8, 9]. Dans ces derniers cas, la chirurgie peut précéder un traitement adjuvant tel l'iode radioactif ou parfois la radiothérapie externe qui ont pour but d'éliminer des cellules cancéreuses qui pourraient potentiellement persister. Au Canada en 2015, 6300 nouveaux cas de cancer de la thyroïde ont été diagnostiqués [10]. Heureusement, le taux de mortalité est très faible, 185 personnes étant décédées d'un cancer de la thyroïde en 2010 au Canada. Le traitement chirurgical est donc très efficace. Le cancer de la thyroïde présente le plus haut taux d'augmentation de nouveaux cas chaque année [10], il faut donc s'attendre à une augmentation du nombre de thyroïdectomies réalisées dans les prochaines années.

#### 1.1.1 Anatomie

La glande thyroïde est une glande située dans le cou [4]. Sa forme est comparée à celle d'un papillon, car elle est constituée de deux lobes rattachés ensemble par un isthme plus fin

---

1. Samuel D. Gross a été un des fondateurs de l'association américaine de médecine et le fondateur et premier président de l'association américaine de chirurgie.

comme on peut l'observer sur la figure 1.1. Elle est attachée au larynx vis-à-vis du cartilage thyroïdien (pomme d'Adam) et aux anneaux supérieurs de la trachée. Elle est recouverte d'une couche fibreuse appelée capsule dont l'épaisseur varie entre 100 µm et 1 mm.

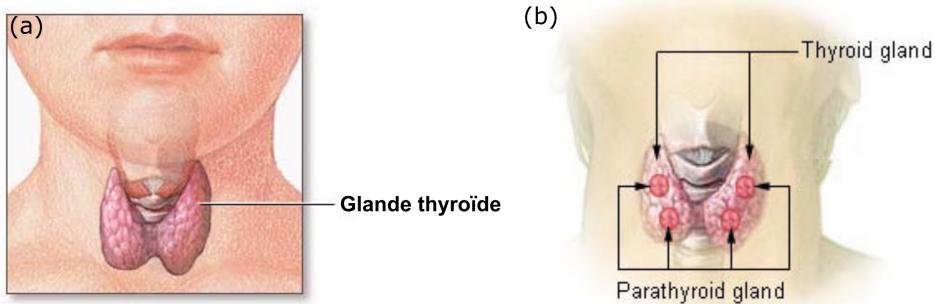


Figure 1.1 (a) Glande thyroïde (vue de face). (b) Thyroïde et parathyroïdes (vue de dos).

Plusieurs structures se retrouvent dans cette région du cou. De nombreux vaisseaux sanguins, dont la carotide et la jugulaire, passent près de la glande thyroïde. La thyroïde est elle-même très bien irriguée et contient beaucoup de sang. Plusieurs muscles doivent être écartés pour atteindre la glande lors d'une chirurgie. Des nerfs importants dont les nerfs récurrents laryngés passent très près de la glande thyroïde et doivent être identifiés et préservés.

D'autres glandes, appelées glandes parathyroïdes, sont aussi localisées à proximité de la thyroïde. Les parathyroïdes normales font environ 3 à 4 mm de longueur et ont une forme légèrement allongée. Elles sont accolées à la mince capsule qui entoure la glande thyroïde, tel que montré à la figure 1.1 (b). Leur petite taille et position anatomique pourrait expliquer pourquoi leur découverte fut aussi tardive [11, 12]. La découverte de la parathyroïde est attribuée à Richard Owen en 1850. L'identification, la description histologique et le nom ont été attribués à Ivar Sandström, dans un article publié en 1880. Il se passa de nombreuses années sans que la fonction de ces glandes ne soit découverte. Ces glandes régulent la concentration de calcium dans le sang à travers la production d'une protéine, l'hormone parathyroïdienne. Cette hormone contrôle entre autres la réabsorption du calcium et la dégradation des os pour augmenter la concentration de calcium sanguin. Ce calcium sanguin est impliqué dans la contraction des muscles. Une défaillance de ces glandes peut entraîner de sévères problèmes osseux et des contractions tétaniques des muscles, pouvant entraîner la mort suite à une obstruction des voies respiratoires ou une arythmie. Ces problèmes sont toutefois extrêmement rares de nos jours [13], car un suivi post-opératoire de la calcémie est effectué.

## 1.2 Problématique

Bien que la pratique de la thyroïdectomie ait grandement évolué, il existe toujours des risques de complications post-opératoires [14]. La plus morbide est probablement une atteinte au nerf récurrent laryngé, qui peut causer la paralysie d'une corde vocale. Cela entraîne des problèmes de déglutition et de parole. De nombreux travaux ont été consacrés à cette problématique. Ces travaux ont mené à de nouvelles pratiques où le nerf est systématiquement identifié et protégé. Un nouvel outil sous la forme d'un neurostimulateur permet de vérifier l'intégrité du nerf durant la chirurgie en mesurant son activité électrique. Cependant, cette complication est rare, n'advenant que dans 1 à 2 % des cas.[15]

La complication la plus fréquente est toutefois l'hypocalcémie, résultat d'une dévascularisation d'une ou de plusieurs glandes parathyroïdes. Les glandes peuvent avoir été retirées accidentellement, et peuvent parfois même se retrouver à l'intérieur de la capsule thyroïdienne. Cette hypocalcémie peut être temporaire, dans 7 % à 25 % [16] des cas selon les études. Elle peut aussi être définitive dans une moindre proportion, de 0.4 à 13.8 % [17]. Dans le deux cas, ces complications entraînent une hospitalisation prolongée et des coûts importants pour le système de santé, car le patient doit être pris en charge sur une plus longue période. En considérant seulement l'augmentation du temps de convalescence post-chirurgie, les coûts passent de 2 534\$ à 8 367\$ par patient dans les cas d'hypocalcémie post-opératoire pour les patients sur le territoire québécois [18]. Ceci a aussi un impact important pour le patient, car lorsque l'hypocalcémie est définitive, il doit prendre des suppléments de calcium et de vitamine D pour le reste de ses jours. À long terme, il doit aussi avoir un contrôle de sa calcémie à intervalles réguliers à travers des prises de sang.

Bien que des recherches aient tenté d'établir des guides de pratique pour diminuer l'advenue de ces complications [19], il reste que l'identification intra-opératoire des parathyroïdes est un défi, même pour des chirurgiens expérimentés [5]. Cette difficulté provient de nombreux facteurs. Par exemple, les glandes parathyroïdes peuvent avoir des localisations ectopiques avec notamment une variante dans laquelle elles se retrouvent en position intracapsulaire dans la glande thyroïde plutôt qu'en position extracapsulaire en surface de la glande thyroïde [4]. Aussi, elles sont très difficiles à distinguer visuellement des tissus environnants, car leur couleur typique «jaune chamois» se rapproche beaucoup de la couleur jaune du gras qui les entoure et leur taille est proche de celle des ganglions normaux dans le cou. Identifier et préserver les quatre glandes parathyroïdes est donc un défi qui se répète à chaque chirurgie. La figure 1.2 montre l'ouverture chirurgicale pratiquée pour atteindre la thyroïde.

La situation se complique dans des cas de cancer de la thyroïde où des métastases peuvent

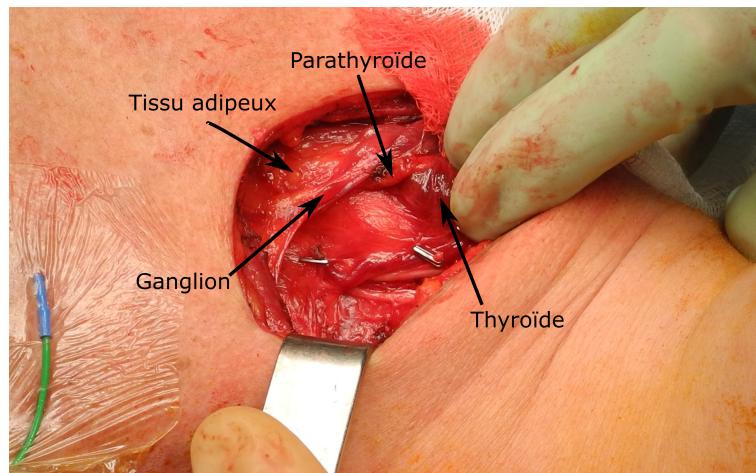


Figure 1.2 Photographie du champ chirurgical. On peut observer de nombreuses structures qu'il est difficile d'identifier macroscopiquement, même pour un chirurgien expérimenté.

être présentes dans le cou et avoir infiltré des ganglions. Ces ganglions doivent aussi être retirés pour limiter le risque de récidive du cancer. Plusieurs procédures sont possibles selon la gravité du cas. Une procédure appelée évidemment cervical consiste à retirer les ganglions et tous les tissus environnants potentiellement envahis par le cancer. Cela implique de retirer tous les ganglions des zones affectées. L'identification des glandes parathyroïdes est particulièrement importante ici, car l'objectif est de retirer toute la maladie en conservant les glandes parathyroïdes si possible. Ceci est délicat, car une fois de plus, les glandes parathyroïdes peuvent être difficiles à distinguer du gras et des ganglions.

En plus des pathologies requérant l'ablation de la thyroïde, des dysfonctionnements de la parathyroïde sont aussi possibles. Les problèmes arrivent généralement lorsqu'une glande devient hyperactive et produit de l'hormone parathyroïdienne sans égard aux stimuli externes. Ce dysfonctionnement peut entraîner de graves problèmes dus à l'hypercalcémie résultante [20]. Le patient peut souffrir d'un impact sur son système urinaire (lithiasies urinaires), système digestif (douleurs, constipations), système musculosquelettique (douleurs osseuses, déformations osseuses) et même psychiatriques (dépression, psychose). Une intervention chirurgicale pour retirer la glande fautive peut aider à rétablir la condition normale. Cette opération est appelé parathyroïdectomie et requiert d'identifier les glandes parathyroïdes afin de retirer la glande dysfonctionnelle, qui est généralement de plus grande taille. Là encore, il n'est pas évident d'identifier cette glande parathyroïde dysfonctionnelle parmi le reste des tissus sains du patient.

La difficulté pour les chirurgiens réside dans l'absence d'outil per-opératoire instantané pour identifier les tissus et les distinguer entre eux. Ils peuvent seulement s'appuyer sur un examen

macroscopique leur donnant la position, la couleur et la texture pour reconnaître un tissu en particulier [21]. Dans les cas où ils ont de fortes chances de croire qu'ils ont identifié une parathyroïde , il est possible de la retirer et de procéder à une analyse extemporanée. La parathyroïde suspectée peut être coupée pour envoyer une petite partie pour analyse en sections congelées en pathologie. Cette analyse permet de confirmer s'il s'agit d'une parathyroïde, et dans ce cas, elle peut être réimplantée. Une incision dans le muscle sterno-cléido mastoïdien ou dans l'avant-bras est faite pour y insérer le reste de la glande parathyroïde. Comme elle peut bénéficier de l'apport sanguin du muscle, elle pourra potentiellement retrouver sa fonction après un temps variable suivant la chirurgie.

Les analyses histologiques par sections congelées prennent un temps considérable, en moyenne 30 minutes, et peuvent retarder la fin de la chirurgie dans certains cas. Aussi, elles requièrent le sacrifice d'une portion de la glande afin de l'analyser. Malheureusement, le spécimen qui est envoyé en analyse ne peut être récupéré pour réimplantation, car il n'est plus stérile.

### 1.3 Cahier de charges

Ce projet de recherche veut apporter une solution à l'identification per-opératoire des tissus du cou. Cette problématique s'accentue, car les chirurgies de la thyroïde et de la parathyroïde sont pratique courante dont la fréquence augmentera progressivement. Pour pouvoir identifier correctement les tissus, particulièrement les glandes parathyroïdes, un instrument dédié doit être développé. De manière générale, il s'agit d'un senseur capable de distinguer les tissus rencontrés dans le cou : thyroïde, gras, ganglions, parathyroïdes. Même s'ils sont plus faciles à reconnaître pour un chirurgien, distinguer les nerfs et les muscles des autres tissus pourrait aussi être avantageux. Comme une chirurgie est recommandée dans de nombreux cas, distinguer les tissus pathologiques des tissus sains est aussi un aspect important. Il ne s'agit toutefois pas d'un outil de diagnostic, l'objectif n'est pas de déterminer quelle maladie est présente, mais bien de reconnaître un tissu même s'il est rencontré sous une forme pathologique.

Cette identification des tissus doit se réaliser durant la chirurgie. Il existe déjà des modalités d'imagerie pour planifier l'intervention ; leur rôle sera exploré plus en détails dans le chapitre 2. Le temps pour réaliser une identification doit être court. Bien que l'analyse par sections congelées prenne du temps, le chirurgien peut s'affairer à d'autres tâches dans le champ chirurgical en attendant les résultats. Pour apporter un bénéfice, l'aspect temporel est important ici. De manière générale, l'instrument doit pouvoir bien s'intégrer dans la procédure chirurgicale actuelle. Idéalement, l'instrument doit pouvoir fournir une réponse au chirurgien quand à l'identité du tissu dans un court délai suivant la mesure. Le temps de pré-

paration de l'instrument pour être apporté dans le champ stérile doit aussi être court. Pour être le plus efficace possible, il est impératif que les tissus puissent être identifiés sans être coupés ou dévascularisés. Dans le cas contraire, il serait plus difficile d'apporter un bénéfice significatif en comparaison avec l'histologie par congélation, qui est le standard actuel. L'instrument doit donc pouvoir prendre une mesure par l'ouverture pratiquée pour la chirurgie. La mesure doit être non-invasive pour éviter les dommages aux tissus qui doivent être préservés. Évidemment, l'instrument doit être sécuritaire pour le patient et l'équipe chirurgicale. La précision de l'identification doit être maximale, le bénéfice et le potentiel d'utilisation de l'instrument en dépendent fortement.

#### **1.4 Objectifs de recherche**

Une série de contraintes a été identifiée pour le développement d'un instrument permettant l'identification per-opératoire des tissus du cou. Les travaux de cette thèse sont orientés sur le développement d'une sonde d'imagerie optique pouvant être utilisée durant les chirurgies de la thyroïde et de la parathyroïde. Plusieurs objectifs spécifiques ont été établis dans le but d'atteindre l'objectif principal qui est de développer un instrument d'imagerie optique permettant la distinction et l'identification des tissus du cou : thyroïde, parathyroïde, tissu adipeux et ganglion. Les objectifs spécifiques sont les suivants :

1. Déterminer les modalités d'imagerie optique permettant la distinction des différents tissus identifiés ;
2. Concevoir et fabriquer un instrument permettant des mesures *ex vivo* sur des tissus frais intacts ;
3. Établir des critères qualitatifs et quantitatifs permettant la distinction des tissus ;
4. Développer un instrument permettant la prise de mesures per-opératoires sur des patients humains ;
5. Valider cet instrument dans une étude pilote en comparant les résultats obtenus avec les standards de la médecine.

#### **1.5 Plan de la thèse**

Cette thèse présente plusieurs contributions scientifiques en instrumentation optique, dans le but d'atteindre les objectifs mentionnés. La revue critique de la littérature présentée au chapitre 2 examinera d'abord les techniques actuelles et celles proposées par d'autres groupes de recherche pour identifier les tissus particulièrement les glandes parathyroïdes.

Le chapitre 3 présente une amélioration à l'encodage spectral, une implémentation spécifique utilisée entre autres en microscopie confocale. Cette amélioration permet d'intégrer un contraste de fluorescence, ce qui n'était pas possible précédemment. Le chapitre 4 présente le développement, la fabrication et la validation d'un coupleur en fibre à double gaine optimisé pour la microscopie confocale. L'implémentation de la détection partiellement cohérente est connue pour apporter de grands bénéfices en microscopie confocale, mais son implémentation est complexe et peu robuste. Ce chapitre présente une solution pour réaliser de la microscopie confocale efficace en utilisant un coupleur à fibre à double gaine pour la détection partiellement cohérente en microscopie confocale. Le chapitre 5 présente un microscope tri-modal développé pour étudier les tissus du cou avec plusieurs modalités d'imagerie optique simultanément. Ce microscope, basé sur un laser à double-bande à balayage en longueur d'onde, combine la microscopie confocale encodée spectralement, la tomographie par cohérence optique et l'imagerie encodée spectralement en fluorescence. Ce travail est basé sur le développement présenté dans le chapitre 3, c'est-à-dire l'intégration du contraste de fluorescence dans un montage d'imagerie en encodage spectral et utilise le composant en fibre optique à double gaine développé au chapitre 4 pour une détection partiellement cohérente en microscopie confocale. Ce microscope est utilisé pour étudier les tissus du cou dans le but de déterminer les modalités d'imagerie optique permettant la distinction des différents tissus identifiés. Le chapitre 6 présente une étude *ex vivo* sur 30 patients utilisant la tomographie par cohérence optique pour étudier les tissus du cou humains. En se basant sur les résultats obtenus au précédent chapitre, un système de tomographie par cohérence optique est adapté pour prendre des mesures sur des tissus humains fraîchement excisés. Le chapitre 7 aborde la suite de l'étude *ex vivo* en présentant le développement d'une sonde pour réaliser des mesures *in vivo* sur des patients humains. Une étude pilote sur 8 patients est réalisée pour valider les performances de la sonde et son utilité dans le cadre de chirurgies de la thyroïde. Finalement, la conclusion discutera des limitations du projet, ainsi que les ouvertures pour des développements futurs.

## CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

*«...it seems hardly credible that the loss of bodies so tiny as the parathyroids should be followed by a result so disastrous.»*  
 - William Halsted [22]

Une revue de la littérature est présentée afin de mieux cerner la pratique clinique incluant les méthodes actuelles pour l'identification des glandes parathyroïdes. La seconde partie du présent chapitre sera concentrée sur les modalités d'imagerie optique identifiées dans la littérature comme étant potentiellement utiles dans cette application.

### 2.1 Approches actuelles

Cette section discute des méthodes présentement utilisées en milieu hospitalier. Ces méthodes sont divisées en deux groupes selon le moment d'utilisation. Le premier groupe présente les modalités couramment utilisées pour réaliser le diagnostic et planifier les interventions chirurgicales avec de l'imagerie pré-opératoire. Le deuxième groupe permet d'aborder les techniques qui peuvent être utilisées pour identifier les tissus ou les glandes parathyroïdes durant les chirurgies. Bien qu'elles existent, les méthodes d'identification peropératoire sont peu utilisées et ne sont pas recommandées par les associations médicales. Le chirurgien se fie donc à son entraînement et à l'identification macroscopique pour étudier les tissus et protéger les tissus à préserver.

#### 2.1.1 Imagerie pré-opératoire

Plusieurs méthodes d'imagerie sont actuellement disponibles et accessibles en milieu hospitalier. Leur utilisation ici dépend du contraste qu'elles offrent et de leur résolution. La technique la plus utilisée est l'échographie ultrasonore. La tomographie calculée (CT de l'anglais *computed tomography*) à base de rayons X et l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) sont aussi des techniques disponibles, mais utilisées dans une moindre mesure.

#### Imagerie ultrasonore

L'imagerie ultrasonore est une technique non-invasive qui permet d'obtenir des images en profondeur en envoyant des ondes ultrasonores et en détectant les échos [23]. Cette technique

est largement utilisée pour le diagnostic et le suivi de nombreuses conditions, car elle présente de nombreux avantages : l'imagerie est indolore, largement disponible, peu coûteuse, sécuritaire et n'utilise pas de rayons ionisants. Elle offre généralement un bon contraste pour les tissus mous et la résolution peut être ajustée en sélectionnant la fréquence centrale du système utilisé.

L'imagerie ultrasonore est largement utilisée en première ligne pour examiner la glande thyroïde [24]. À partir des images, un radiologue peut déterminer la taille de la glande, la présence et le nombre de nodules ainsi que leur taille. Certaines caractéristiques aident à déterminer si un nodule est bénin ou non [7]. Par exemple, un centre hypoéchogène peut indiquer la présence de fluide et ainsi suggérer un kyste. La présence de nombreux nodules indique généralement un goître multi-nodulaire, une autre condition bénigne. L'examen de la thyroïde seul ne permet pas de conclure à la présence de cancer dans la glande. Un échantillon de tissu provenant du nodule doit être pris pour permettre une analyse histopathologique. L'imagerie ultrasonore permet de guider la prise de biopsie pour faciliter le positionnement de l'aiguille dans le nodule. Cette procédure améliore les chances d'obtenir un échantillon représentatif et de bonne qualité.

Les images ultrasonores permettent aussi de bien reconnaître les différentes structures de grande taille du cou, telles que le larynx et la jugulaire. Le chirurgien utilise cette information pour planifier son intervention en connaissant l'étendue du tissu à extraire, ainsi que son positionnement relatif aux structures environnantes. L'ultrasonographie ne permet toutefois pas d'identifier les parathyroïdes. Les parathyroïdes saines sont généralement trop petites pour être observées et présentent un faible contraste. Les adénomes parathyroïdiens peuvent parfois être observés [25].

## CT et IRM

Ces deux modalités d'imagerie sont présentes dans la majorité des centres hospitaliers. La CT, car elle est basée sur des rayons X, offre un meilleur contraste pour les os, mais permet aussi de localiser certains organes. L'IRM utilise un contraste sur les temps de relaxation de spins nucléaires de certains atomes, particulièrement l'hydrogène. Plusieurs modes de contraste sont possibles selon les séquences utilisées, mais le contraste est le plus important sur les tissus mous, grâce à la grande fraction d'eau des tissus, et donc d'atomes d'hydrogène. Cette modalité est particulièrement utile pour l'examen du cerveau.

Dans le cadre de l'imagerie pour la thyroïde, l'IRM est plus fréquemment utilisée que la CT [26]. Ces deux méthodes ne sont toutefois que rarement nécessaires, et évitées lorsque possible étant donné leur coût plus important. L'IRM permet d'avoir un bon contraste sur les

tissus mous ou cartilagineux entourant la glande thyroïde et peuvent aider à déterminer si un cancer a envahi les structures environnantes. Dans ces cas, le chirurgien peut devoir modifier son approche ou devoir laisser une partie du tissu cancéreux si une structure très importante comme la carotide est touchée. Il tentera ensuite d'éradiquer complètement le cancer à l'aide de techniques complémentaires comme la radiothérapie. La CT peut parfois être utilisée pour jouer le même rôle, mais l'IRM est préférée dans la majorité des cas. Ces deux techniques servent donc à planifier la thyroïdectomie et ne sont pas utilisées pour localiser la parathyroïde de façon préopératoire [27].

### 2.1.2 Sections congelées

L'histopathologie est le standard médical pour l'identification des tissus et la classification des pathologies [28]. L'examen normal d'un tissu ou d'un échantillon de tissu est fait en plusieurs étapes. Le tissu est analysé macroscopiquement, pesé et fixé dans la formaline ou autre agent fixateur similaire. Des coupes sont ensuite faites dans le tissu fixé pour examiner le tissu en entier. Lorsque la maladie peut être distinguée à l'oeil nu, l'étendue de la maladie est évaluée. Certaines coupes représentant le mieux le tissu ou la partie qui semble la plus envahie par la maladie sont ensuite incluses dans la paraffine. Le tissu est subséquemment coupé en fines tranches d'environ 5 µm. Ces tranches de tissu sont déposées sur des lames de microscope qui sont ensuite trempées successivement dans une série de bains contenant entre autres des colorants spécifiques aux différents composés cellulaires. Il existe de nombreuses colorations, mais la plus commune et celle utilisée pour la thyroïde est l'hématoxyline et l'éosine (H&E). Cette combinaison de colorants colore le cytoplasme des cellules en rose et leur noyau en mauve/bleu foncé. Les lames sont ensuite analysées par un pathologiste à l'aide d'un microscope en lumière blanche. L'utilisation de divers grossissements est essentielle pour voir l'ensemble du tissu et agrandir l'image pour se concentrer sur certaines régions particulières. Par exemple, un examen rapide à faible grossissement permet de localiser un nodule de la thyroïde qui semble cancéreux. En augmentant le grossissement, le pathologiste peut observer la forme des noyaux et d'autres marqueurs qualitatifs particuliers pour déterminer le type de cancer. L'histologie prend plus de 24 h pour traiter un tissu, car le processus de fixation des tissus prend de nombreuses heures. Toutefois, dû au grand nombre d'échantillons à analyser dans un centre hospitalier, il faut généralement compter plus de 4 semaines pour obtenir les résultats.

Un examen alternatif peut être réalisé dans un délai beaucoup plus court. Il s'agit d'une analyse en sections congelées (*frozen sections*)[29]. Au lieu de fixer le tissu à l'aide de formaline, le tissu est congelé rapidement, souvent à l'azote liquide. Il obtient donc la rigidité

nécessaire pour être tranché et peut être coloré tout de suite après. Le pathologiste peut ensuite l'étudier au microscope et fournir une réponse durant une procédure. Cette méthode est utilisée en chirurgie de la thyroïde entre autres pour confirmer l'identification d'une parathyroïde ou l'extraction d'un adénome parathyroïdien et évaluer l'envahissement de certains ganglions [30, 13]. Elle n'est toutefois pas utilisée systématiquement pour toutes les parathyroïdes, seulement lorsque celles-ci ont été dévascularisées durant la dissection ou lorsqu'elles peuvent être confondues avec un ganglion durant un évidement cervical. Cette technique donne généralement des résultats fiables, même s'il est parfois nécessaire de prendre un second échantillon. Les résultats sont généralement transmis au chirurgien 30 minutes après que l'échantillon ait été envoyé. Une étude a évalué les coûts reliés à la pathologie pour réaliser des sections congelées [31]. On peut déduire de leur étude qu'une section congelée coûte en moyenne 300\$, sans compter les frais d'anesthésie et de salle d'opération dans les cas où la durée de la chirurgie est étendue pour attendre les résultats.

### **2.1.3 Bioanalyse rapide de l'hormone parathyroïdienne**

La bioanalyse rapide de l'hormone parathyroïdienne (*Quick Parathyroid Hormone Assay (QPTH)*) est une méthode biochimique de déterminer le niveau d'hormone parathyroïdienne (PTH) dans l'organisme. Cette technique est basée sur la chemoluminescence et permet de déterminer la concentration d'hormone parathyroïdienne en 8 à 15 minutes après avoir pris un échantillon [32, 33]. Cet outil peut être utilisé dans le cadre de parathyroïdectomies pour déterminer si la glande malade a été retirée. Une diminution du taux de PTH permet de prédire avec une bonne sensibilité et spécificité si la ou les glandes malades ont été retirées. Un avantage de cette technique est qu'elle peut indiquer au chirurgien s'il a trouvé la glande problématique et mettre fin à la chirurgie ou s'il doit poursuivre l'exploration. Une mesure prise 10 min après l'excision d'une glande permet d'obtenir une mesure fiable, ce qui est plus rapide qu'avec des sections congelées. Il est rapporté que cette technique peut diminuer le temps d'opération et réduire le risque d'hypoparathyroïdie et de dommages au nerf récurrent laryngé.

Toutefois, plusieurs inconvénients font que cette méthode n'est pas très répandue. Une mesure pré-opératoire doit être prise pour pouvoir comparer avec les mesures post-excision. Il faut donc au moins deux mesures, mais parfois plus pour obtenir un haut taux de succès. Il est rapporté qu'une trousse de QPTH coûte de 1000 à 1200 \$, et qu'il contient 9 fioles, chacune pouvant faire une mesure. Comme il n'est pas possible de réutiliser les fioles non utilisées à la fin de la journée, cette méthode peut être sujette au gaspillage et à un coût élevé [34]. Pour être efficace économiquement, une synchronisation des cas pour pouvoir opérer plusieurs

patients atteints de problèmes parathyroïdiens dans la même journée est prescrite. Ce n'est toutefois pas toujours possible. Cette technique peut donc être très utile lorsque les bonnes conditions sont rencontrées, mais ne permet pas le suivi des glandes parathyroïdes saines et n'est pas utilisable durant les chirurgies de la thyroïde. Cette technique n'est actuellement pas utilisée dans le centre hospitalier (Centre hospitalier de l'Université de Montréal, CHUM) avec lequel nous avons collaboré.

#### **2.1.4 Imagerie basée sur la radioactivité**

Une autre méthode utilisée dans le cadre de parathyroïdectomies est la scintigraphie au Technicium-99<sup>m</sup>-sestamibi (<sup>99m</sup>Tc-Sestamibi) [35]. Cette méthode consiste à injecter un agent radioactif qui peut s'accumuler préférentiellement dans les glandes parathyroïdes anormales. En utilisant une sonde qui peut détecter les rayons gamma émis par radioactivité, les glandes parathyroïdes peuvent être localisées avant ou pendant une chirurgie [36]. Cette technique est seulement utilisée pour détecter les glandes parathyroïdes anormales. Cette méthode est difficilement utilisable dans un autre contexte car l'accumulation d'agent radioactif n'est pas très spécifique. Il s'en retrouve beaucoup dans la thyroïde ce qui rend la détection des parathyroïdes près de la thyroïde difficile. Cette technique n'est pas non plus utilisée dans le centre hospitalier où nous avons travaillé.

### **2.2 Modalités optiques proposées**

Les modalités d'imagerie basées sur l'optique ont été proposées pour faciliter le diagnostic ou le dépistage dans de nombreuses applications médicales. Le fort contraste obtenu grâce aux ondes lumineuses permet de proposer des instruments pouvant complémer ou remplacer les méthodes actuelles. Quelques modalités ont été envisagées pour faciliter l'identification des glandes parathyroïdes durant les chirurgies de la thyroïde [37]. J'ai identifié certaines modalités présentant un fort potentiel : la fluorescence, la microscopie confocale en réflectance et la tomographie par cohérence optique. Pour chacune, un rappel de la technique est présenté, les implémentations possibles sont recensées et l'applicabilité pour les chirurgies de la thyroïde est discutée.

#### **2.2.1 Imagerie en fluorescence**

La fluorescence est une méthode de contraste qui permet de sonder les tissus avec une longueur d'excitation précise pour obtenir une émission de lumière à une longueur d'onde plus grande. Ce contraste est spécifique à certaines molécules qui ont chacune un spectre d'excita-

tion et d'émission propre. La fluorescence peut être endogène si elle se base sur des molécules naturellement présentes dans le tissu biologique. La fluorescence endogène peut aussi être appelée autofluorescence. Autrement, un agent de contraste exogène peut être apporté dans le tissu pour permettre d'obtenir un contraste entre ce tissu et les tissus environnants. Le défi des agents fluorescents exogènes est la spécificité. Leur absorption doit être spécifique au tissu souhaité. Toute absorption non-spécifique ajoute du signal d'arrière-plan et limite le rapport signal sur bruit de la mesure. Une molécule fluorescente est caractérisée par son spectre d'excitation et d'émission, mais aussi par son coefficient d'absorption et son efficacité quantique. Le coefficient d'absorption permet de mesurer à quel point la molécule est efficace à absorber la lumière d'excitation. L'efficacité quantique permet de mesurer la probabilité qu'une molécule émette un photon de lumière fluorescente lorsqu'elle a été excitée en absorbant un photon. Lorsque la molécule passe à l'état excité, une perte d'énergie se produit car la molécule passe d'un état vibrationnel excité au niveau vibrationnel fondamental. Ce phénomène s'appelle décalage de Stokes et est responsable de la séparation en longueur d'onde de l'excitation et de l'émission. Le phénomène de fluorescence est décrit à la figure 2.1 [38]. Un photon est absorbé par la molécule et celle-ci se retrouve dans un niveau électronique excité. Cette absorption est quasi-instantanée. Une transition non-radiative fait redescendre la molécule au niveau vibrationnel fondamental de l'état excité en quelques picosecondes. La molécule reste dans l'état excité pendant un temps variable de l'ordre de la nanoseconde, puis retourne à l'état fondamental en émettant un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre les deux niveaux.

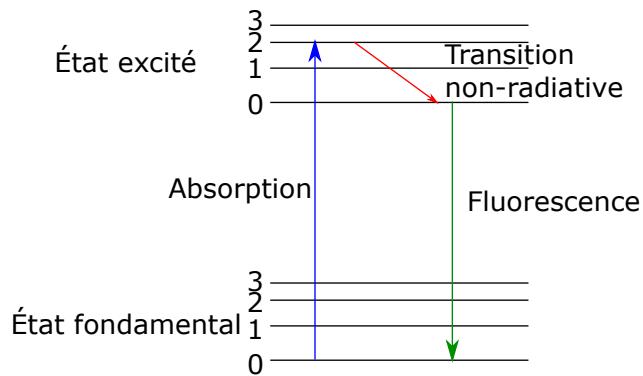


Figure 2.1 Diagramme de Jablonski de la fluorescence. Un photon est absorbé et la molécule passe à un niveau excité. Une transition non-radiative permet à la molécule de redescendre au niveau vibrationnel fondamental de l'état excité. L'émission d'un photon de fluorescence survient quelques nanosecondes plus tard accompagné par le retour de la molécule à l'état fondamental.

## Agents exogènes

Dans le contexte des chirurgies de la thyroïde, plusieurs approches ont été proposées. Deux agents fluorescents exogènes peuvent s'accumuler préférentiellement dans les glandes parathyroïdes : le bleu de méthylène [39] et l'*indocyanine green* (ICG) [40]. Le bleu de méthylène est une molécule fluorescente excitable à 650 nm et qui émet à 700 nm. Il peut être utilisé à faible dose ( $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). L'absorption se fait préférentiellement dans les glandes parathyroïdes hyperactives, mais la thyroïde emmagasine aussi une grande partie des molécules fluorescentes. L'absorption est plus faible dans les glandes parathyroïdes saines. Cette méthode peut permettre d'identifier les glandes parathyroïdes hyper-actives comme les adénomes, idéalement lorsqu'ils sont situés loin de la glande thyroïde. Le bleu de méthylène peut être neurotoxique lorsque combiné à certains médicaments et colore les tissus ce qui peut interférer avec le traitement histologique normal.

L'ICG est un autre agent fluorescent qui a été approuvé pour utilisation chez l'humain par la Food and Drug Administration (FDA), l'agence américaine responsable de l'approbation de l'utilisation de produits ou d'instruments médicaux [41, 42]. Son pendant canadien est Santé Canada. Ce fluorophore est utilisé en cardiologie et est déjà utilisé pour visualiser la vasculature entre autres dans l'œil [43]. Des systèmes commerciaux basés sur la fluorescence de l'ICG existent aussi pour l'exploration des ganglions sentinelles dans les cas de cancer du sein [42]. Ce fluorophore peut être injecté par intraveineuse et possède une faible demi-vie dans le corps humain (3 min). Il est excitable à 785 nm et émet entre 800 nm et 850 nm. Les spectres d'excitation et d'émission peuvent varier en fonction de la concentration et du solvant. Un des avantages de cet agent est qu'il est excitable dans le proche infra-rouge ce qui permet une plus grande profondeur de pénétration dans les tissus biologiques. Ce fluorophore a montré une accumulation légèrement plus grande dans les parathyroïdes saines que dans la glande thyroïde environ 50 s après injection de l'agent [40]. Après 100 s, le signal n'était plus détectable dans cette étude. Ce court temps peut être un avantage ou un inconvénient. Il assure qu'on peut recommencer la mesure de nombreuses fois et permet de s'affranchir de la fluorescence de la thyroïde dans les bonnes conditions de visualisation. Toutefois, il faut agir très vite après l'injection. Cela peut aussi nécessiter de multiples injections, si la mesure n'est pas effectuée suffisamment rapidement. Cette technique est donc prometteuse, malgré la faible différence d'intensité entre les parathyroïdes saines et la glande thyroïde. Elle peut être utilisée dans le cadre de chirurgies de la thyroïde, car elle ne dépend pas de l'hyperactivité des parathyroïdes [44].

## Autofluorescence

Une série d'études récentes a montré que la parathyroïde exhibe une fluorescence endogène lorsqu'elle est excitée à 780 nm.[45–47] Il s'agit donc aussi de fluorescence dans le proche infrarouge bénéficiant de la plus grande profondeur de pénétration due à la plus faible absorption et diffusion de la lumière à cette longueur d'onde. La molécule responsable de cette fluorescence est inconnue à ce moment. L'hypothèse actuelle est qu'il s'agit des récepteurs de calcium, très présents dans la parathyroïde. La thyroïde présente aussi une faible fluorescence avec un spectre d'émission similaire, mais avec une intensité plus faible. L'autofluorescence présente de nombreux avantages, principalement le fait qu'elle soit présente pour les glandes saines et malades [47, 46] et qu'elle ne nécessite pas d'injection de substances étrangères. L'intensité du signal est par contre très faible et il a été impossible d'extraire un ordre de grandeur de la sensibilité nécessaire pour détecter cette auto-fluorescence à partir des publications. Cette méthode de contraste sera donc explorée plus en détails dans cette thèse pour tenter de l'utiliser pour identifier les parathyroïdes.

## Implémentations

L'instrumentation pour détecter la fluorescence est généralement simple. Une source d'excitation, des filtres en longueur d'onde et un détecteur sont nécessaires. Parmi les publications précédemment citées, deux implémentations ressortent pour la détection intra-opératoire de la fluorescence. La première implémentation en est une à champ large basée sur une caméra. Une source étendue puissante est utilisée pour illuminer toute la plaie chirurgicale et une caméra placée au-dessus de la plaie du patient sert à collecter la fluorescence et à former une image. En changeant les filtres, on peut obtenir une image couleur et la superposer à l'image en fluorescence pour obtenir une bonne corrélation [42, 46].

L'autre implémentation est basée sur une sonde à fibre optique [47, 45]. La sonde est constituée de plusieurs fibres, une servant à apporter la lumière d'excitation et les autres servent à collecter la fluorescence. La lumière collectée est filtrée optiquement puis détectée avec un spectromètre. Cette implémentation ne permet pas de détecter les glandes parathyroïdes dans une zone, mais sert plutôt à confirmer l'identification d'une glande parathyroïde. Cette implémentation semble plus compatible avec la procédure chirurgicale telle que j'ai pu l'observer, où le chirurgien n'a pas toujours besoin de trouver les glandes parathyroïdes, mais peut vouloir obtenir une confirmation à un moment. Une sonde à main correspond aussi mieux aux attentes des chirurgiens. Ils n'ont pas à déplacer ou éteindre les lampes de chirurgie pour prendre mesure avec une caméra ou un microscope chirurgical et à installer l'instrument. Une sonde à main peut être préparée dans la zone stérile, prête à être utilisée au moment

opportun. Il y a très peu de temps lié à l'installation et la mise en route du système dans ce cas. La sonde à main basée sur des fibres optiques semble l'option préférable.

### 2.2.2 Microscopie confocale

La microscopie confocale se distingue de la microscopie conventionnelle en lumière blanche en permettant de faire des images d'un échantillon épais [48]. En histologie, l'échantillon doit être tranché en fines tranches d'environ  $5\text{ }\mu\text{m}$  d'épaisseur. Cela permet d'éviter qu'il y ait une partie de l'échantillon qui soit hors focus et donc floue. La microscopie confocale permet de réaliser des coupes virtuelles d'un échantillon en filtrant la lumière qui ne provient pas du plan focal. Cela est réalisé en filtrant spatialement la lumière à l'illumination et à la détection. La microscopie confocale peut être réalisée avec un contraste de réflectance, la lumière réfléchie par l'échantillon est collectée, ou en fluorescence. Le schéma original d'un microscope confocal tel qu'imaginé par Minsky, son inventeur, est présenté à la figure 2.2(a) [49]. Comme on peut l'observer sur la figure, une source ponctuelle permet l'illumination. Le point formé sur l'échantillon est conjugué au filtre spatial placé devant le détecteur. De cette manière, la lumière provenant des autres plans hors focus est filtrée. Comme cette méthode conjugue un point avec un autre, un mécanisme permettant de déplacer le point d'illumination et de détection est nécessaire pour reconstruire une image. Une approche possible est d'utiliser des miroirs montés sur des galvanomètres pour réaliser un balayage angulaire en deux dimensions. Ce schéma est montré à la figure 2.2(b).

Comme l'histologie avec un microscope conventionnel, la microscopie confocale possède une grande résolution latérale permettant d'observer des détails à l'échelle sous-cellulaire. Bien que les méthodes de coloration de l'histologie ne soient pas compatibles avec l'évaluation d'échantillons épais, le contraste des images en réflectance est similaire et de nombreuses structures observables à l'histologie sont reconnaissables sur des images de microscopie confocale. L'utilisation d'agents fluorescents permet d'obtenir une plus grande spécificité semblable aux colorations de l'histologie. La microscopie confocale est caractérisée par sa grande résolution axiale, essentielle pour imager de minces tranches virtuelles d'un échantillon. Cette résolution axiale est fortement dépendante de l'ouverture numérique de l'objectif utilisé et de la taille du filtre spatial [50].

La microscopie confocale présente donc des avantages similaires à l'histologie tout en éliminant certains inconvénients, comme le traitement des tissus avec l'analyse microscopique. Toutefois, certains facteurs limitent l'utilité de la microscopie confocale. Tout d'abord, l'utilisation des filtres spatiaux pour améliorer la résolution et offrir un sectionnement optique vient au coût d'un signal recueilli très faible. L'atténuation du signal optique dans les tis-

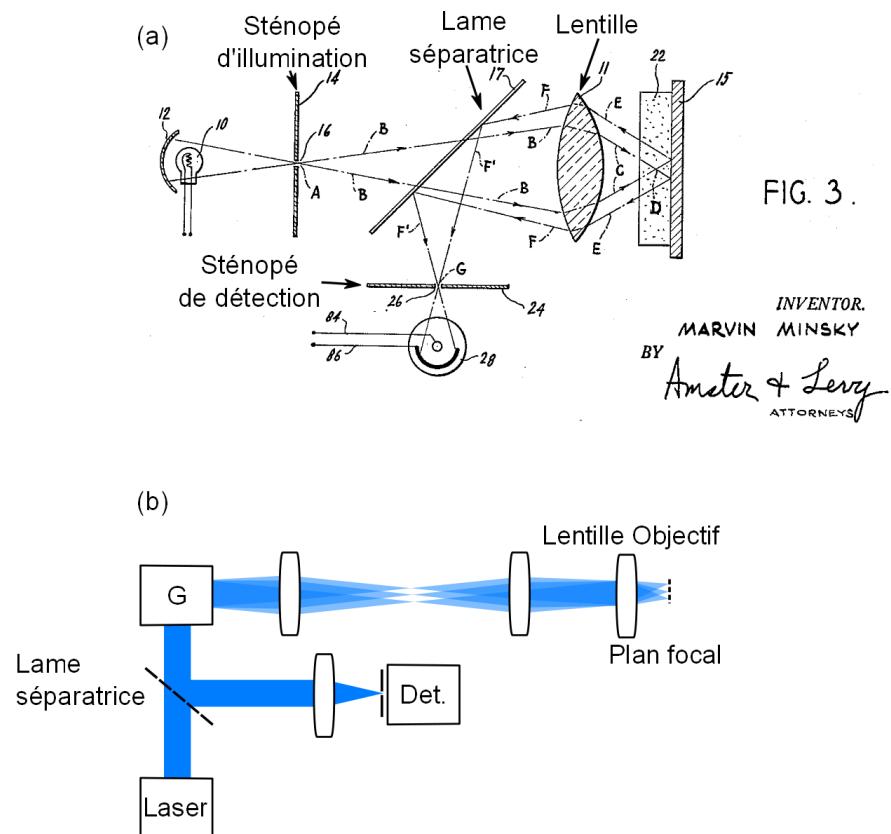


Figure 2.2 Microscopie confocale. (a) Schéma tel qu'il apparaît dans le brevet de Minsky, l'inventeur de la technique. (b) Schéma général d'un microscope confocal à balayage laser. G : miroirs montés sur des galvanomètres. Det. : Détecteur

sus biologiques limite la profondeur de pénétration à l'ordre de la centaine de microns. Peu de systèmes arrivent à produire des images de bonne qualité à des profondeurs dépassant 300 µm. La nature cohérente de la lumière utilisée (généralement des lasers utilisés pour leur grande cohérence spatiale et puissance) introduit un phénomène de bruit de tavelure. Il s'agit d'un patron d'interférence produit par la nature aléatoire du parcours de la lumière dans des milieux turbides. Ce bruit de tavelure prend la forme d'un bruit de fort contraste superposé aux images [51]. La taille des éléments de bruit est de l'ordre de la résolution optique et donc, des pixels adjacents peuvent avoir des intensités différentes à cause du bruit de tavelure. Des compromis peuvent être réalisés pour détecter plus de lumière et diminuer le bruit de tavelure au coût de réduire les résolutions latérales et axiale. En effet, il a été montré qu'en modifiant la taille du filtre spatial à la détection, l'efficacité de détection peut être augmenté au coût de la résolution axiale qui est plus fortement affectée par l'utilisation du filtre spatial. Une valeur optimale de 5 unités normalisées a été proposée par Glazowski et Rajadhyaksha [52].

## Implémentations

Dans le but de miniaturiser les microscopes confocaux pour réaliser des mesures à l'intérieur du corps, plusieurs implémentations ont été développées. Les défis reliés à cette miniaturisation incluent le développement de petites lentilles objectifs avec des grandes ouvertures numériques et déplacer les mécanismes de balayage à la partie proximale de la sonde, la partie qui est hors du patient.

La méthode la plus répandue est d'utiliser des faisceaux de fibres optiques [53, 54]. Ces faisceaux sont des assemblages de 10 000 à 100 000 fibres optiques. Une façon de faire de la microscopie confocale avec un faisceau de fibres est d'illuminer séquentiellement chaque fibre et de détecter par la fibre illuminée. Le nombre de points résolvables grâce à cette méthode est égal au nombre de fibres utilisées. La taille finale de l'assemblage varie aussi avec le nombre de fibres. Les avantages reliés à cette implémentation sont le petit diamètre et la flexibilité de la sonde résultante. De même, le montage est fiable et peu complexe. Par contre, les faisceaux de fibre optique sont peu adaptés pour utiliser un contraste en réflectance. En effet, le polissage de l'embout du faisceau crée des réflexions variables à chaque bout de fibre ce qui entraîne la superposition d'un patron de forte intensité sur l'image résultante. Ce problème n'apparaît pas en fluorescence, car la lumière d'illumination est filtrée. Les endomicroscopes confocaux à base de faisceaux de fibre optique sont les plus utilisés en médecine et de nombreuses applications ont été étudiées pour bénéficier de la résolution microscopique de la microscopie confocale.

Un autre moyen de miniaturiser le microscope confocal est de réduire la taille des méca-

nismes de balayage. C'est l'approche proposée avec les MEMS (de l'anglais *Micro Electro-Mechanical Systems*) [55, 56]. Il s'agit ici de produire des mécanismes de balayage avec des miroirs contrôlés par des systèmes électro-mécaniques micro-fabriqués. En ajustant les propriétés mécaniques des ensembles, le balayage mécanique peut être opéré à sa fréquence de résonance, ce qui permet d'atteindre de grandes vitesses de balayage. Le balayage est sinusoïdal, car il est opéré à la résonance mécanique, ce qui entraîne des distorsions dans l'image et un échantillonnage non-uniforme. De manière générale, les angles de balayage possibles sont petits ce qui réduit le champ de vue obtenu avec ce mécanisme de balayage. Les mécanismes de balayage à base de MEMS sont plutôt restreints à la recherche, mais certaines compagnies commencent à offrir des produits.

Une autre technique est appelée encodage spectral [57]. Cette méthode propose d'éliminer un axe de balayage mécanique et de le remplacer par la combinaison d'une source à large spectre et d'un réseau de diffraction. Une illumination linéaire est ainsi formée. En l'absence de fluorescence, la mesure de la densité spectrale de puissance réfléchie par l'échantillon permet de reconstruire l'information de réflectance selon cette ligne. Cette mesure de la densité spectrale de puissance peut être réalisée à l'aide d'un spectromètre. Cela est dû au fait que chaque position de la ligne formée sur l'échantillon est encodée par la longueur d'onde. Chacune d'elle est diffractée à un angle différent par le réseau de diffraction ce qui forme un étalement angulaire du faisceau. La lentille objectif fait converger ces rayons selon une ligne. Une autre façon d'implémenter l'encodage spectral est d'utiliser une source à large spectre à balayage en longueur d'onde et une photodiode rapide au lieu d'un spectromètre [58]. La source émet une onde quasi-monochromatique qui change dans le temps. À un instant donné, un seul point est illuminé sur l'échantillon et la lumière réfléchie par celui-ci est récoltée pour obtenir un point de réflectance de l'image. Le laser change ensuite légèrement de longueur d'onde et le point illuminé sur l'échantillon se déplace aussi, car le réseau a dévié cette nouvelle longueur d'onde à un angle légèrement différent. En balayant tout le spectre de la source, la même ligne est formée dans le plan d'imagerie. Le schéma de cette implémentation est présenté à la figure 2.3.

En complémentant ce balayage spectral avec un balayage mécanique dans un axe perpendiculaire, une image en deux dimensions peut être formée. Cette technique a été utilisée pour fabriquer des sondes basées sur une seule fibre optique avec un diamètre total de 350 µm [59]. Le potentiel de miniaturisation est donc très fort. Le balayage en longueur d'onde ou la mesure avec un spectromètre peuvent être effectués beaucoup plus rapidement qu'un balayage mécanique, permettant ainsi d'atteindre de grandes vitesses d'imagerie (100 klinnes/s) [60]. Cette technique permet aussi des images à grande densité de pixels (se rapprochant du mégapixel) ce qui est supérieur à ce qui est possible avec les faisceaux de fibres optiques. Les angles

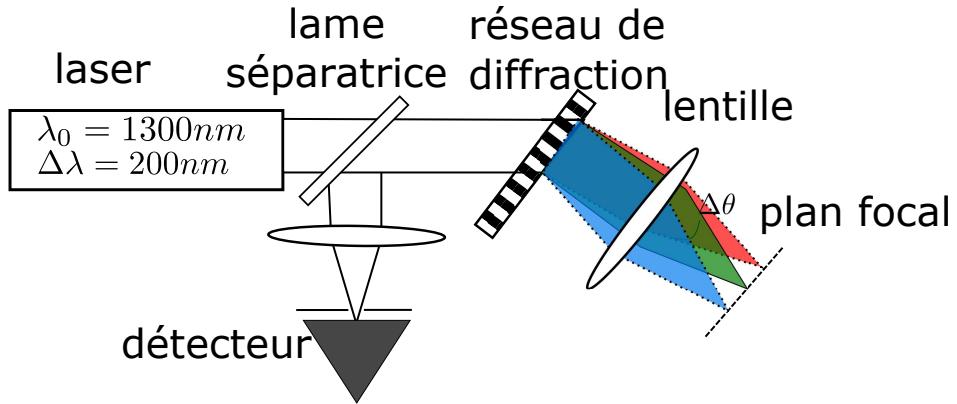


Figure 2.3 Schéma d'un montage de microscopie confocale encodée spectralement. Toutes les longueurs d'onde de la source sont envoyées séquentiellement pour illuminer l'échantillon. Les longueurs d'onde sont dispersées par le réseau de diffraction qui fait diffracter chaque longueur d'onde à un angle différent. De cette manière, la longueur d'onde encode la position sur l'échantillon.

de déviation peuvent être grands, selon la source utilisée, ce qui permet d'obtenir des champs de vue conséquents ( $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ ) [61]. Cette méthode comporte certains inconvénients comme un incompatibilité *a priori* avec le contraste de fluorescence et une complexité accrue du système, déplacée au niveau de la source lumineuse et de la détection. Une preuve de principe de l'intégration d'un contraste de fluorescence a été réalisée, mais à un coût très élevé sur la complexité et la stabilité du système [62]. L'encodage spectral a été choisie dans ce projet doctoral comme technique potentielle pour intégrer la microscopie confocale dans un contexte clinique, car elle présente une grande vitesse d'imagerie et un fort potentiel de miniaturisation.

### Applications pour la thyroïde

Quelques études ont employé la microscopie confocale en réflectance (MCR) pour étudier les tissus du cou rencontrés durant les chirurgies de la thyroïde [63, 64, 61]. *White et al.* ont d'abord étudié la différence entre les glandes parathyroïdes saines et malades, puis ils ont étudié plusieurs tissus du cou, dont la glande thyroïde. La MCR a ensuite été proposée pour distinguer dans un contexte *ex vivo* la thyroïde, la parathyroïde, les ganglions, le tissu adipeux, les nerfs et les muscles [61]. Dans ces trois publications, des comparaisons qualitatives avec des histologies ont permis de faire ressortir des différences entre les différents tissus. Les spécimens étaient toutefois coupés pour exposer la surface interne et s'affranchir des capsules fibreuses, recouvrant certains tissus comme la thyroïde. Un agent de contraste (acide acétique) a aussi été employé pour favoriser la condensation des noyaux pour qu'ils apparaissent plus

clairement sur les images de microscopie confocale. Le contexte opératoire n'est donc pas entièrement reproduit, car les tissus ne doivent pas être altérés durant les mesures en chirurgie. Ces résultats montrent toutefois un fort potentiel pour distinguer tous les tissus rencontrés en chirurgie de la thyroïde avec la microscopie confocale.

### 2.2.3 Tomographie par cohérence optique

La tomographie par cohérence optique (OCT de l'anglais : *Optical Coherence Tomography*) est une modalité d'imagerie proposée en 1991 par *Huang et al.* [65]. Elle permet d'acquérir des images en coupe d'un tissu sans devoir le couper. Ces images en coupe permettent donc d'observer les structures sous la surface du tissu. Le contraste est basé sur la rétro-diffusion et la réflectivité de l'échantillon. L'atténuation du signal avec la profondeur dépend de la diffusion et de l'absorption du tissu. Les propriétés optiques des tissus sont donc sondées indirectement. Cette méthode est analogue à l'imagerie ultrasonore. Une onde, lumineuse dans le cas de l'OCT, est envoyée sur l'échantillon. Les différentes réflexions et rétro-diffusions produites par les inhomogénéités d'indice de réfraction (et donc de vitesse de l'onde) sont détectées avec un délai par rapport à l'onde initiale par interférométrie. Un profil de réflectivité est retrouvé en faisant varier la différence de marche de l'interféromètre ou en faisant varier la longueur d'onde. L'OCT est utilisée dans de nombreuses applications pour faciliter le dépistage ou le diagnostic de différentes pathologies, mentionnons par exemple, le dépistage de l'oesophage de Barret [66], le dépistage du cancer du colon [67], l'évaluation des plaques d'athérosclérose en cardiologie [68], le diagnostic de plusieurs pathologies de l'oeil en ophtalmologie [69]. Plusieurs autres applications sont à l'étude en pneumologie, en gastro-entérologie , en cardiologie et dans d'autres domaines. Plusieurs systèmes commerciaux sont approuvés pour l'utilisation clinique ou sont en voie de l'être. Un seul système a été approuvé pour l'utilisation dans le cou et la gorge, Imalux, mais n'est plus disponible.

## Implémentations

Pour détecter des délais aussi courts, l'interférométrie est utilisée. La lumière réfléchie par l'échantillon interfère avec une onde de référence pour retrouver le délai. Pour obtenir une bonne résolution spatiale (axiale), c'est-à-dire retrouver la position d'un réflecteur particulier de manière précise, une faible cohérence est nécessaire. L'OCT est donc de l'interférométrie en lumière faiblement cohérente. Trois implantations ont été proposées pour retrouver les profils de réflectivité : OCT dans le domaine temporel (TD-OCT de l'anglais *Time-Domain OCT*) et deux implantations dans le domaine de Fourier : OCT dans le domaine spectral à base de spectromètre (SD-OCT, de l'anglais *Spectral Domain OCT*)[69] et à base de

source à balayage en longueur d'onde (SS-OCT de l'anglais *Swept-Source OCT*) [70]. Les deux implémentations équivalentes utilisées actuellement sont les deux techniques dans le domaine de Fourier, puisqu'elles ont été démontrées comme supérieures en terme de rapport signal sur bruit [71, 72]. De manière similaire à l'instrumentation utilisée en encodage spectral, il est possible d'utiliser une source large et un spectromètre pour retrouver l'interférogramme dans le domaine spectral, ou utiliser une source à large spectre à balayage en longueur d'onde et une photodiode. Dans ce dernier cas, la longueur d'onde change dans le temps permet à la photodiode d'enregistrer l'intensité pour chaque longueur d'onde et ainsi reconstruire la densité spectrale de puissance. La formation des images se fait à partir de l'élément de base, un profil de réflectivité en fonction de la profondeur. La même nomenclature que celle utilisée en imagerie ultrasonore a été conservée. Cette ligne en profondeur est appelée une ligne-A (*A-line* en anglais). En balayant latéralement cette ligne selon un axe  $x$ , les lignes-A sont concaténées et une image en deux dimensions est formée. Celle-ci s'appelle un scan-B (*B-scan* en anglais). En concaténant plusieurs scans-B ensemble, un volume en trois dimensions est formé et s'appelle un scan-C (*enphC-scan* en anglais).

Selon les matériaux utilisés pour fabriquer les sources et le détecteurs, certaines longueurs d'onde sont plus favorables à une implémentation plutôt qu'à l'autre. Toutefois, les deux méthodes sont équivalentes en termes de performances, le choix de la longueur d'onde est donc basé sur l'application et les spécifications recherchées. Le tableau 2.1 regroupe les différentes implémentations et quelques spécifications importantes. Toutes les implémentations sont capables de former des volumes tridimensionnels adaptés à la géométrie de l'organe étudié. Il existe d'autres formes de contraste en complément du contraste morphologique de l'OCT, comme la vitesse de déplacement des diffuseurs avec l'effet Doppler ou les mesures de la biréfringence avec les mesures en polarisation [1].

Tableau 2.1 Caractéristiques principales des systèmes OCT selon leur implémentation [1, 2]

| Implémentation | Longueurs d'onde centrale (nm) | Vitesse (A – lines/s) |
|----------------|--------------------------------|-----------------------|
| TD-OCT         | 800-1600                       | $\approx 2000$        |
| SD-OCT         | 800-1100                       | $>100\ 000$ [73]      |
| SS-OCT         | 1000-1600                      | $>1\ 000\ 000$ [74]   |

### Applications aux chirurgies de la thyroïde

Quelques études ont utilisé l'OCT pour étudier certains tissus du cou dont la thyroïde [75, 76]. Ces deux publications ont appliqué l'OCT au diagnostic des pathologies de la thyroïde en imageant cette glande dans des conditions saines et pathologiques. Par contre, ces études

*ex vivo* ont été réalisées sur des tissus tranchés pour assurer une bonne visualisation de la structure interne du tissu. En effet, la thyroïde possède une capsule qui peut empêcher la visualisation des follicules thyroïdiens et autres structures présentes sous la capsule. Durant ce projet de doctorat, deux groupes ont aussi présenté des études utilisant l'OCT pour distinguer les tissus durant les chirurgies de la thyroïde [77–80]. Ces études se sont toutefois concentrées sur les tissus sains et n'ont pas présenté de résultats sur des tissus pathologiques. La première de ces études a utilisé l'OCT pour présenter les premières images de tissus *ex vivo* imagés après la chirurgie. L'autre groupe [78–80] a utilisé le système Imalux pour obtenir des images en deux dimensions de tissus thyroïdien, parathyroïdien, ganglionnaire et adipeux. Ils ont aussi tenté de classifier les images automatiquement [79] et ont obtenu les premières images *in vivo*[80]. Toutefois, selon les auteurs : *The disappointing *in vivo* results may primarily be due to technical problems but also show the limitations of the system used with respect to both axial and lateral resolution.* Ces études montrent donc que l'OCT fonctionne de façon satisfaisante pour réaliser des mesures *ex vivo*, mais que de nouveaux développements sont nécessaires pour obtenir des résultats convenables *in vivo*. Le système Niris de Imalux est un système OCT dans le domaine temporel centré à 1300 nm permettant d'acquérir des images de 200 pixels par 200 pixels à une image toutes les 1.5 s. Il peut être utilisé avec une sonde de 2.7 mm avec une profondeur d'imagerie de 1 à 2 mm de profondeur.

#### 2.2.4 Récapitulatif

À partir de sections histologiques, on peut reconnaître certaines structures et patrons qui sont typiques de chaque tissu. En utilisant une modalité d'imagerie morphologique (basée sur la réflectance et donnant une information structurelle sur l'échantillon), nous pouvons nous attendre à retrouver certaines de ces structures. Ce sont ces structures d'intérêt qui ont permis à certains auteurs d'affirmer qu'ils pouvaient distinguer certains tissus avec l'OCT ou la microscopie confocale. Le tableau 2.2 regroupe les différents tissus à bien distinguer ainsi que certaines caractéristiques clés pour l'interprétation des images. Il s'agit de mon analyse de la littérature basée sur des connaissances acquises sur ces différents tissus durant ce projet et à la suite de discussions avec des médecins et pathologiste. Les symboles +, – et ± indiquent la capacité à bien distinguer ces tissus des autres en se basant sur la visualisation de certains caractéristiques. Comme certains échantillons étaient tranchés avant d'être analysés, les caractéristiques ne seront probablement pas les mêmes dans le contexte de cette application de mesure *in situ* car les échantillons ne doivent pas être altérés. La profondeur de pénétration de chaque modalité influencera ce qui sera possible d'observer. Il est donc à prévoir que la capsule recouvrant la thyroïde et certains autres tissus sera un obstacle important. Parmi les structures permettant de reconnaître les tissus morphologiquement, on note les follicules

thyroïdiens, les zones denses en cellules (parenchyme) et les adipocytes, les cellules contenant le gras et formant le tissu adipeux. Les zones denses en cellules sont présentes dans plusieurs tissus dont les glandes parathyroïdes et les ganglions.

| Tissu (caractéristiques) \ Modalité                         | MCR              | OCT         | Fluorescence |
|---|------------------|-------------|--------------|
| Thyroïde<br>- follicules                                    | ± (1)[64, 61]    | + [77, 75]  | + [45, 47]   |
| Parathyroïde<br>- parenchyme cellulaire<br>- adipocytes (2) | + [63]<br>+ [63] | - [77]<br>+ | ++ [45, 47]  |
| Ganglion<br>- Parenchyme cellulaire<br>- adipocytes (2)     | + [61]<br>+      | -<br>+      | N/A [45]     |
| Tissu adipeux<br>- adipocyte                                | + [61]           | +           | N/A [45]     |

Tableau 2.2 Tissus d'intérêt à identifier lors des chirurgies de la thyroïde et leurs caractéristiques importantes. Les +, -, et ± indiquent la capacité de chaque modalité à observer ces caractéristiques selon mon analyse de la littérature. (1). La capsule entourant la thyroïde est une structure d'épaisseur variable qui peut empêcher la MCR de visualiser les follicules thyroïdiens. Certains autres tissus comme les ganglions et les glandes parathyroïdes peuvent aussi être recouverts de tissu conjonctif ou fibro-adipeux. (2). La quantité de tissu adipeux entourant les ganglions et glandes parathyroïdes varie en fonction de plusieurs paramètres dont l'âge et l'indice de masse corporelle du patient.

De par l'analyse de la littérature, il est difficile de conclure si un instrument basé sur une seule modalité permettra de produire un instrument respectant toutes les contraintes de l'application clinique ou si une approche multimodale est impérative. Les caractéristiques nécessaires pour répondre à ces questions ne sont pas adressées dans la littérature. La thèse adresse ces questions dans le contexte spécifique des mesures intra-opératoires. Le choix de modalités optiques doit donc être fait en tenant compte d'une part, de leur intégration dans un instrument portable de petite taille et d'autre part, de la rapidité d'imagerie nécessaire pour acquérir des résultats satisfaisants en champ opératoire. Certaines implémentations proposées peuvent être incompatibles avec la vision des collaborateurs cliniques, ces facteurs seront à prendre en compte pour développer un instrument qui sera pratique et utilisé par la communauté médicale.

Ce chapitre présente un microscope combinant la microscopie confocale en réflectance, la tomographie par cohérence optique et l'imagerie encodée spectralement en fluorescence, trois modalités qui ont été préalablement identifiées comme étant candidates pour l'application visée. Bien que l'imagerie encodée spectralement en fluorescence soit nouvelle, le contraste de

fluorescence, particulièrement d'autofluorescence de la parathyroïde, a été identifié comme un bon candidat pour identifier les tissus du cou. Dans le but de valider ces différentes modalités et d'étudier les synergies possible entre elles, un instrument de table permettant l'imagerie simultanée dans ces trois modalités a été développé. Le laser à balayage en longueur d'onde à 780 nm développé au chapitre 3 est intégré à un autre laser à balayage centré à 1300 nm. Cela a permis de développer un laser changeant les longueurs d'onde sur deux plages simultanément au même rythme permettant l'imagerie simultanée dans les trois modalités. Le chapitre débute avec un bref rappel des considérations de design nécessaire au développement et à l'optimisation du montage multimodal. Par la suite, le montage tri-modal est présenté. Ce microscope est basé sur le nouveau laser à double bande permettant d'acquérir des images dans les trois modalités simultanément. Ces travaux ont été publiés dans la revue *Biomedical Optics Express* en 2016. Un addendum à l'article sur le logiciel d'acquisition que j'ai développé est présenté à la fin du chapitre.

### 2.3 Considérations de design

Un instrument combinant efficacement l'OCT et la microscopie confocale encodée spectralement (SECM) présente de nombreux défis de conception. Ces défis sont d'autant plus grands que l'imagerie par ces deux modalités doit être simultanée et co-localisée, donc partager une partie du trajet optique dans le microscope. Des contraintes propres à chaque modalités d'imagerie sont en opposition lors de l'implémentation d'un tel microscope. Certaines caractéristiques sont dues à la source laser employée, alors que d'autres dépendent des composants optiques utilisés.

Il a été établi que l'OCT est réalisée à une longueur d'onde centrale de 1300 nm avec une source à balayage en longueur d'onde, alors que la SECM est plutôt réalisée à la longueur d'onde centrale de 780 nm. Le laser pour le SECM balaie en longueur d'onde de façon synchrone avec le laser d'OCT. Chacun de ces lasers possède une plage spectrale d'accordabilité qui confère, entre autres, le nombre de points résolvables en SECM et la résolution axiale en OCT. Le nombre de points résolvables  $n$  en SECM est déterminé par la largeur spectrale de la source  $\Delta\lambda$ , la longueur d'onde centrale  $\lambda_0$  et la période du réseau de diffraction  $\Lambda$  du réseau particulier employé pour disperser les longueurs d'onde. Cette quantité  $n$  peut être exprimée selon [58] comme :

$$n = \frac{\Delta\lambda}{\delta\lambda} \quad (2.1)$$

où  $\delta\lambda$  est soit la largeur spectrale instantanée de la source ou la résolution spectrale du réseau

de diffraction, défini de la manière suivante :

$$\delta\lambda_G = \frac{\lambda_0\Lambda}{mD} \quad (2.2)$$

avec  $m$  l'ordre de diffraction (=1) et  $D$  le diamètre du faisceau sur le réseau.

L'autre facteur important déterminé par la largeur spectrale de la source est la longueur de cohérence globale, quantité directement proportionnelle à la résolution axiale en OCT. La longueur de cohérence de la source est obtenue de la largeur à mi-hauteur de la fonction d'auto-corrélation de la source. On rappelle que cette quantité est proportionnelle à la transformée de Fourier de la densité spectrale de puissance de la source par le théorème de Wiener-Khintchine. De plus, la longueur de cohérence d'une source à spectre gaussien ayant une longueur d'onde centrale  $\lambda_0$  et une largeur spectrale  $\Delta\lambda$  est donnée par :

$$l_c = \frac{4 \ln(2)\lambda_0^2}{\pi\Delta\lambda} \quad (2.3)$$

Dans le cas de l'OCT basée sur une source à balayage, la longueur de cohérence instantanée de la source est aussi à prendre en compte, car elle peut limiter la profondeur d'imagerie du système. Ainsi, plusieurs paramètre d'imagerie dépendent directement de la source d'imagerie employée. Cependant, certains paramètres du microscope dépendent plutôt des composants optiques employés et de la longueur d'onde centrale d'imagerie. La résolution latérale, en SECM comme en OCT, dépend de l'ouverture numérique (NA) de la lentille objectif employée, de même que de la longueur d'onde centrale de la source. Le critère de Rayleigh peut être utilisé comme critère de résolution et établit cette dépendance :

$$\Delta x = 0.61 \frac{\lambda}{\text{NA}} \quad (2.4)$$

La longueur de Rayleigh est également reliée à la résolution latérale et devient donc un paramètre de design important. Cette longueur de Rayleigh est définie comme la distance entre la position de la section transverse minimale du faisceau et la position où la surface du faisceau est le double de sa section transverse minimale.

$$z_R = \frac{\pi\omega_0^2}{\lambda} \quad (2.5)$$

avec  $\omega_0$  le diamètre du faisceau. Cette quantité peut être reliée à  $\omega_0 \approx 2\Delta x$ . En imagerie biomédicale, cette quantité correspond à la profondeur d'imagerie.

Enfin, un dernier paramètre à prendre en compte est la résolution axiale en SECM, donnée

par

$$\Delta z = \frac{1.5n\lambda}{NA^2}. \quad (2.6)$$

L'interdépendance de ces paramètres nous pousse à réfléchir sur les compromis à faire sur les performances d'imagerie de chacune des deux modalités visées. En SECM, tout comme en microscopie confocale en général, les résolutions latérales et axiales sont entièrement déterminées par la longueur d'onde centrale de la source employée et l'ouverture numérique de la lentille objectif. Ainsi, il est intéressant d'intégrer une longueur d'onde centrale petite de même qu'une grande ouverture numérique (typiquement plus grande que 0.6) afin d'exploiter la fine résolution et le sectionnement optique propres à l'imagerie confocale. En OCT, la résolution latérale dépend aussi de l'ouverture numérique de la lentille objectif, mais la résolution axiale est déterminée par la longueur d'onde centrale et la largeur spectrale de la source employée. Il est alors intéressant d'intégrer une source avec une grande largeur de bande par rapport à sa longueur d'onde centrale. Il est ici à considérer qu'un compromis doit être réalisé : dans la mesure où on cherche à imager en profondeur, sur quelques millimètres, on doit intégrer de faibles ouvertures numériques (typiquement inférieures à 0.1), au coût d'une résolution latérale moins performante.

Il est maintenant évident que la lentille objectif, empruntée à la fois par le SECM et l'OCT, doit satisfaire aux particularités des deux modalités d'imagerie. En préférant la laser à 780 nm pour le SECM et le laser à 1300 nm pour l'OCT, un pas dans la bonne direction est déjà réalisé pour maximiser les performances conjointes des deux modalités d'imagerie. Les composants optiques du trajet commun devront également assurer une bonne transmission dans les deux bandes spectrales et assurer un relai du balayage laser sur l'échantillon. La stratégie employée pour optimiser les performances optiques et les résolutions de chaque modalité est la suivante : employer la totalité de l'ouverture numérique de la lentille objectif pour le SECM et sous-remplir la lentille pour n'exploiter qu'une fraction de son ouverture numérique en OCT, tout en tirant profit d'une plage de balayage s'étalant sur tout le diamètre de la lentille. Ce principe est illustré à la figure 2.4.

## 2.4 Technologies fibrées

L'implémentation des technologies d'imagerie optique dans un milieu médical requiert robustesse, rapidité et stabilité. Les technologies optiques sont reconnues pour leur grande sensibilité, ce qui peut être un inconvénient, car elles sont sujettes aux problèmes d'alignement et sensibles aux vibrations. Les fibres optiques permettent de résoudre une partie de

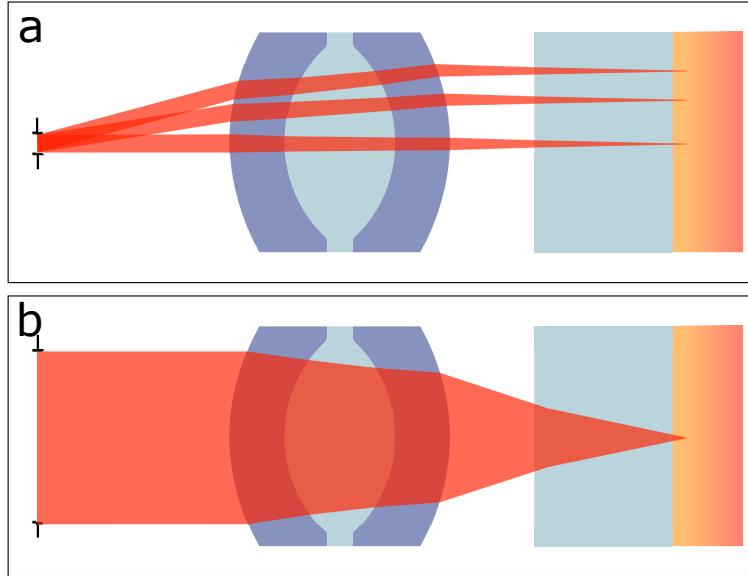


Figure 2.4 Principe d'utilisation de la lentille objectif pour accommoder les contraintes de design du système SECM et OCT.

ces problèmes. Les implémentations tout-fibre sont reconnues pour leur grande résistance aux vibrations et aux conditions environnementales. De plus, les fibres optiques permettent de miniaturiser plusieurs composants. Cette section couvre plusieurs technologies basées sur des fibres optiques utiles dans le domaine de l'imagerie médicale. Le survol de ces technologies est orienté sur les besoins reliés aux modalités d'imagerie identifiées précédemment.

#### 2.4.1 Fibres optiques

Il existe quelques types principaux de fibres optiques qui seront étudiés ici : la fibre monomode, la fibre multimode et la fibre à double-gaine. Des sections de ces fibres avec leur profil d'indice de réfraction associé sont illustrés à la figure 2.5. La fibre optique de manière très générale est un guide d'onde cylindrique permettant de guider la lumière avec des pertes minimales. Il existe plusieurs variables reliées au guidage de la lumière dans une fibre optique : longueur d'onde, angles d'entrée, dimensions de la fibre, etc. Le paramètre de fréquence normalisée  $V$ , ou paramètre de guide, permet de décrire la manière dont la lumière est guidée dans une fibre optique selon ces paramètres et le nombre de modes associés. Le paramètre  $V$  est décrit par l'équation suivante pour les fibres à saut d'indice :

$$V = \frac{2\pi}{\lambda} a \text{NA} = \frac{2\pi}{\lambda} a \sqrt{(n_{\text{coeur}}^2 - n_{\text{gaine}}^2)} \quad (2.7)$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde d'intérêt,  $a$  est le rayon de la région guidante délimitée par les indices de réfraction  $n_{\text{coeur}}$  et  $n_{\text{gaine}}$ . NA est l'ouverture numérique de cette région guidante. Les fibres à saut d'indice sont donc décrites par une région d'indice élevé et une région d'indice plus faible. On fait généralement référence au coeur de la fibre comme la région centrale d'indice élevé et la gaine, la région entourant le coeur avec un indice plus faible permettant le guidage. Lorsque le paramètre  $V$  est inférieur à 2.405, le guidage est dit monomode, c'est-à-dire qu'il n'existe qu'une seule distribution de champ électrique possible dans cette région. Plus le paramètre  $V$  est élevé, plus le nombre de modes permis est élevé. Asymptotiquement, pour un très grand paramètre  $V$ , le nombre de modes peut être estimé par :  $\frac{V^2}{2}$ . Les fibres multimodes ont donc des paramètres  $V$  supérieurs à 2.405. Un exemple de profil d'indice de réfraction d'une fibre monomode, d'une fibre multimode et de deux types de fibres à double gaine sont présentés à la figure 2.5.

Les fibres à double gaine sont un type de fibre plus récent, originellement développées pour les lasers à fibre. Ces fibres sont composées de deux régions guidantes distinctes et présentent donc deux sauts d'indice formés par trois régions d'indices de réfraction distincts. Ces régions sont appelées respectivement coeur, gaine interne et gaine externe. Ces fibres sont conçues pour avoir un coeur monomode à la longueur d'onde choisie et une gaine multimode. Dans le contexte des lasers à fibre, la gaine interne est de plus grande taille et permet d'injecter beaucoup de puissance pour pomper le laser. Le coeur est dopé avec des terres rares qui absorbent à la longueur d'onde de pompe et l'émission laser est confinée dans le coeur. En connectant la cavité laser avec une fibre monomode à la longueur d'onde du laser, un profil de sortie monomode de grande qualité peut être obtenu. Cette technologie permet de fabriquer des lasers entièrement fibrés à haute puissance.

Dans des applications d'imagerie, les fibres à double gaine (DCF pour *Double Clad Fibre*) ont récemment été proposées pour apporter des améliorations. L'avantage principal est de pouvoir guider à la fois un signal monomode, donc cohérent, et un signal multimode incohérent. La plus grande surface de collection de la gaine interne peut augmenter l'efficacité de détection de faibles signaux. Dans le cadre de cette thèse, une distinction est à apporter. Tel que décrit à la figure 2.5, on peut classer les fibres à double gaine en deux catégories : celles à grande gaine et celles à petite gaine. Cette distinction est basée sur la taille relative de la gaine par rapport au diamètre du mode fondamental (de coeur, MFD de l'anglais *Mode-Field Diameter*). Une fibre possédant un rapport de 10 entre le diamètre de la gaine interne et du mode fondamental est appelée une fibre à grande gaine. Ce rapport est environ 5 pour les fibres à petite gaine. Dans la très grande majorité des applications, les fibres à grande gaine ont été utilisées.

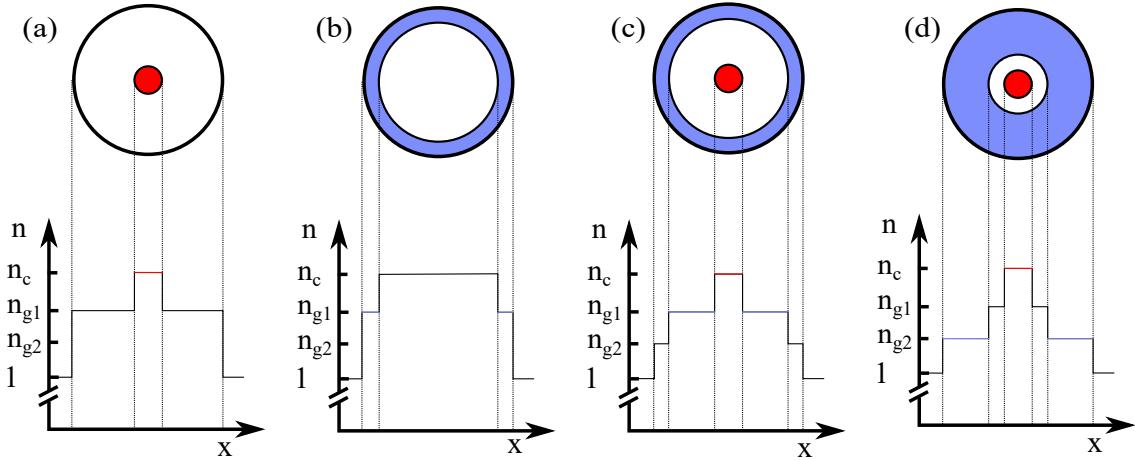


Figure 2.5 Différents types de fibres optiques avec leur profil d'indice de réfraction respectif. Le coeur est identifié en rouge, la gaine interne est en blanc et la gaine externe est en bleu. (a) fibre monomode, (b) fibre multimode (c) fibre double gaine à grande gaine interne et (d) fibre double gaine à petite gaine interne.

Les bénéfices d'utiliser les fibres à double gaine sont nombreux. Dans une application d'imagerie en réflectance, il a été montré qu'illuminer l'échantillon par le coeur et détecter la lumière réfléchie par la gaine augmente le signal détecté et réduit le contraste de bruit de tavelure tout en maintenant la résolution par rapport à illuminer et détecter par le coeur d'une fibre monomode [81]. Ces fibres peuvent aussi être utilisées dans des applications d'imagerie multimodale. Par exemple, il est possible d'utiliser le signal cohérent se propageant dans le coeur de la fibre pour faire de l'OCT et utiliser la grande surface de détection de la gaine interne pour collecter un signal de fluorescence [82–84]. Un des défis dans l'utilisation de la fibre à double gaine est la séparation des signaux. En effet, il faut un moyen de séparer le signal voyageant dans le coeur du signal se propageant dans la gaine interne. Plusieurs groupes ont utilisés un assemblage en espace libre composé d'une lame séparatrice 50/50 ou d'un miroir dichroïque dans les applications de fluorescence. Ces schémas impliquent donc des pertes de 50 % sur le signal d'illumination et le signal détecté. Pour la même puissance laser, on peut donc s'attendre à un signal quatre fois moins puissant. Un composant en fibre optique appelé coupleur en fibre à double gaine (DCFC, pour *Double-clad fiber coupler*) a été proposé [85–89]. Un coupleur à double gaine idéal est un composant à trois ports. La lumière injectée dans le coeur de la fibre double-gaine au port 1 traverse le composant sans être affectée pour illuminer l'échantillon situé au port 2. La lumière qui recoupe dans le coeur retourne sans perte au port 1. La lumière qui recoupe dans la gaine interne au port 2 est transférée, avec le moins de pertes possibles, au port 3 où elle peut être détectée. Ce composant permet donc de séparer le signal du coeur de celui de la gaine interne. Tous les composants proposés ont

été réalisés avec des fibres à grande gaine interne.

La microscopie confocale en réflectance a été identifiée comme une modalité pouvant servir à l'identification des tissus durant les chirurgies de la thyroïde. Cette modalité d'imagerie permet d'atteindre des résolutions semblables à la microscopie conventionnelle utilisée en histologie, mais sans devoir trancher l'échantillon. Ceci présente donc un avantage certain en permettant l'imagerie non-invasive. Toutefois, la microscopie confocale souffre d'une profondeur de pénétration très faible et d'un rapport signal sur bruit généralement faible. Ce chapitre présente le travail réalisé pour améliorer cette modalité en développant un composant en fibre optique améliorant les performances tout en rendant le système plus robuste pour une éventuelle utilisation en clinique.

En microscopie confocale, un filtre spatial est nécessaire pour assurer le sectionnement optique permettant d'imager des échantillons épais. Toutefois, ce filtre coupe beaucoup de la lumière provenant de l'échantillon, résultant en un très faible signal. De plus, les sources laser généralement utilisées pour leur grande cohérence spatiale entraînent l'apparition d'un bruit de tavelure dû à l'interférence de plusieurs ondes cohérentes entre elles revenant d'un point de l'échantillon. Ces deux limitations rendent plus difficiles l'interprétation des images de microscopie confocale et l'utilisation de cette technique en milieu clinique. En ouvrant le filtre spatial, on permet à plus de lumière d'atteindre le détecteur, au prix de réduire la discrimination en profondeur, donc la résolution axiale. On parle de détection partiellement cohérente (spatialement), car elle permet la détection de plusieurs modes spatiaux. Cela réduit le bruit de tavelure, augmente l'intensité détectée et réduit la capacité de sectionnement optique.

Dans la plupart des systèmes endoscopiques, le trou sténopéïque qui sert de filtre spatial est remplacé par le coeur d'une fibre optique monomode. Cette fibre joue à la fois le rôle de source d'illumination et de collection. Il n'est donc pas possible d'obtenir une détection partiellement cohérente, car la taille du point source d'illumination et du point de détection sont les mêmes. Pour obtenir une détection partiellement cohérente, il a été proposé d'utiliser des fibres à double gaine. Ces fibres contiennent 2 régions guidantes distinctes, typiquement un coeur monomode et une gaine multimode. Il a été montré qu'il était possible de réaliser de la microscopie confocale partiellement cohérente en sélectionnant la fibre avec les bons paramètres de guide, qui correspondent à environ un facteur 5 le diamètre de la gaine interne et le diamètre du mode de coeur.

Le défi en utilisant les fibres à double gaine est la séparation des signaux d'illumination et de détection. En MCR en espace libre, une lame séparatrice 50/50 est utilisée, mais impose des pertes de 50 % à chaque passage. Pour séparer le signal voyageant dans le coeur d'une fibre à

double gaine du signal voyageant dans la gaine de cette même fibre, le choix est limité à une lame séparatrice 50/50, qui en plus d'introduire des pertes, rend le système très sensible à l'alignement, et donc aux vibrations et conditions environnementales. Le coupleur à double gaine idéal est donc un dispositif à 3 ports permettant d'acheminer le signal du coeur du port 1 au port 2 avec un minimum de pertes, et d'acheminer le signal de la gaine interne du port 2 au port 3 pour y être détecté.

Il a même été indiqué qu'il n'était pas possible de fabriquer un coupleur en fibre optique à petite gaine efficace : « *Their fabrication methods [...] are however not suitable for DCF having smaller  $d/MFD$  ratios (such as 5) required to preserve confocal sectioning. The major limitation is that light propagating in a DCFC made of, for example, a 9 : 45 : 125  $\mu\text{m}$  DCF would couple significant power in the outer cladding modes of the side polished, twisted or fused structure. These modes are then lost at the output of the DCFC, making such a coupler very inefficient* » [90]. J'ai participé à développer un modèle théorique pour prédire l'efficacité d'un coupleur en fibre en double gaine [91]. Cette efficacité dépend du rapport des étendues des deux fibres utilisées tel que décrit par :

$$T_{2-3} = \frac{1}{1 + \frac{G_1}{G_3}} \quad (2.8)$$

où  $G_n$  est l'étendue optique du port  $n$  déterminée par :

$$G = \pi S(\text{NA})^2 \quad (2.9)$$

où  $S$  est la surface de la région guidante et  $\text{NA}$ , son ouverture numérique. L'équation 2.8 permet d'établir une limite maximale sur le transfert multimode de ce composant. La figure 2.6 montre ce comportement théorique accompagné de points expérimentaux.

Plusieurs méthodes de fabrication de ces composants ont été proposées : torsadage, polissage et torsadage, et fusion-étirage. La méthode de fusion-étirage a donné les meilleures performances selon la littérature. Cette méthode sera développé dans la prochaine section.

#### 2.4.2 Fusion-étirage

Le principe de base de la méthode de fusion-étirage pour des coupleurs à deux fibres est le suivant : disposer les deux fibres sur un banc permettant de chauffer les fibres jusqu'à rendre le verre visqueux pour que les deux fibres fusionnent ensemble, puis tirer sur les fibres tout en chauffant pour étirer la structure. Lorsque la réponse optique désirée est atteinte, l'étirage est arrêté. Il y a toutefois une grande quantité de paramètres théoriques, mesurables et

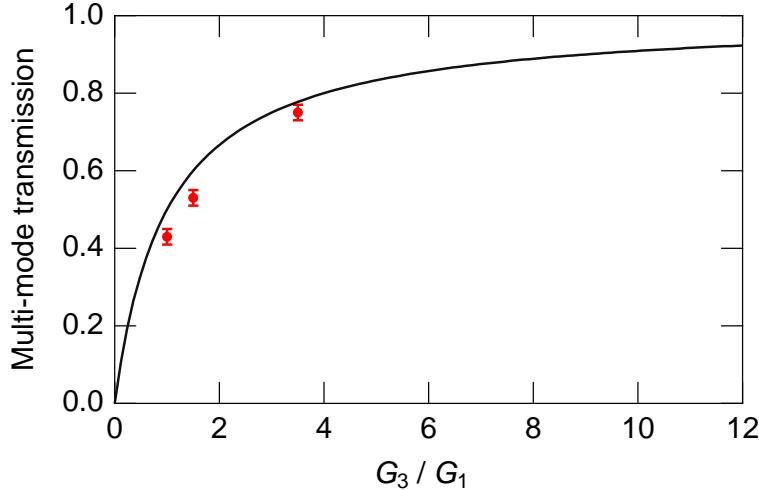


Figure 2.6 Transmission multimode théorique (ligne pleine) en fonction du rapport d'étendue ( $\frac{G_3}{G_1}$ ). Les points expérimentaux sont en rouge.

expérimentaux à déterminer avant de fabriquer un composant. La première section se concentrera sur les paramètres théoriques, puis ceux mesurables. Le second paragraphe traitera des paramètres expérimentaux et de la fabrication plus concrètement.

Les coupleurs en fibre optique servent à transférer de la puissance optique d'une fibre à une autre. Bien que des composants à plus de deux fibres sont possibles, cette section se concentrera sur les composants à deux fibres. Selon le paramètre de guide, une fraction de la puissance guidée dans une fibre se retrouve dans la gaine. Cette puissance prend la forme d'un champ évanescents qui décroît exponentiellement avec la distance. L'idée générale est de rapprocher les coeurs des deux fibres optiques pour qu'il y ait chevauchement des champs évanescents des deux fibres, permettant l'échange de puissance. Dans le but de permettre à ces champs évanescents de se chevaucher, les fibres doivent d'abord être fusionnées ensemble. Cette première étape de fusion est caractérisée par un degré de fusion allant de 0, un composant formé de deux fibres côte-à-côte, à 1, une structure complètement circulaire contenant deux coeurs. La seconde étape de la fabrication du coupleur est l'étirage, étape qui permet de réduire de façon homothétique la taille de la structure. Cela permet de réduire la distance totale séparant les coeurs. Cette homothétie est caractérisée par l'inverse du taux de réduction (ITR) de la façon suivante :

$$\text{ITR} = \sqrt{\frac{S}{S_0}} \quad (2.10)$$

où  $S$  est la surface transverse de la structure fusionnée et étirée et  $S_0$  est la surface transverse

fusionnée avant l'étirage. Ce paramètre varie donc entre 0 et 1. L'étirage est un processus qui doit être fait de façon adéquate pour éviter les pertes. Il existe deux mécanismes de transfert de puissance dans un coupleur : par couplage et par battement. Le transfert par couplage implique qu'il y a recouvrement entre les modes et qu'un transfert de puissance s'effectue. Dans les coupleurs en fibre monomode, le couplage implique de coupler dans des modes supérieurs au mode fondamental et entraîne donc des pertes. Pour éviter le couplage entre les modes, l'étirage doit être fait de manière adiabatique, c'est-à-dire suffisamment lentement pour qu'il n'y ait pas de couplage. La manière dont l'étirage est fait et la vitesse à laquelle il est fait influence le couplage. À partir d'une modélisation du composant, il est possible d'établir les longueurs caractéristique de couplage et de battement en fonction de l'ITR et du degré de fusion. Ces paramètres servent à déterminer la longueur du composant et la pente maximale applicable sans causer de pertes. Ces paramètres sont mesurables de manière destructive sur un composant, mais ne sont pas des paramètres pratiques de fabrication.

À partir des paramètres mesurables, l'étape suivante consiste à transformer ces valeurs en paramètres de recette. La recette est la série d'étapes à réaliser pour fabriquer le composant. Chaque recette est donc propre à un composant. Pour rendre le verre visqueux, il doit être chauffé à environ 1550 °C. Dans le montage utilisé, une micro-torche apportant un mélange de propane et d'oxygène permet de chauffer le verre. La distance entre la torche et le composant influence donc la température. Pour assurer une distribution de température uniforme sur la zone du composant, la torche balaie continuellement le composant sur une distance à déterminer. La vitesse de balayage de cette flamme est un paramètre critique pour éviter de créer des points chauds et liquéfier localement le verre ou qu'il refroidisse localement et perde en viscosité. Le temps de fusion permet de contrôler indirectement le degré de fusion. Il faut généralement procéder à des essais destructifs pour estimer le degré de fusion en clivant le composant pour observer la surface transverse. De même, la vitesse et le temps d'étirage contrôle l'ITR. Encore une fois, des essais destructifs permettent de vérifier expérimentalement le degré de réduction de la structure. La réponse optique monomode est mesurée en temps réel durant l'étirage pour s'assurer qu'il n'y a pas de couplage intermodal résultant en l'apparition de pertes dans le composant. La réponse optique permet aussi de déterminer le critère d'arrêt de l'étirage. Ce temps d'étirage peut être estimé avec la longueur du composant et la vitesse d'étirage. À partir de ces principes de base, il est possible d'établir une recette sur mesure pour fabriquer un coupleur en particulier.

Dans le cas des coupleurs en fibre à double gaine, il faut favoriser l'échange de puissance entre la gaine interne de la DCF et une autre fibre, tout en préservant le signal voyageant dans le cœur de la fibre DCF. Dans le cas de coupleurs à base de fibre à grande gaine, il est donc souhaitable d'avoir un fort degré de fusion pour rapprocher les zones de guidage multimode,

mais d'étirer le composant le moins possible pour limiter les pertes en monomode.

### 2.4.3 Lasers fibrés

Un autre composant qui bénéficie des fibres optiques est le laser pour l'imagerie. L'implémentation des systèmes d'imagerie dans un milieu clinique demande une grande stabilité dans le temps et une robustesse aux vibrations. Comme il a été établi dans les sections sur la microscopie confocale et la tomographie par cohérence optique, les sources laser à balayage en longueur d'onde sont utilisées dans certaines implémentations. Cette section se concentrera sur les implémentations de lasers à balayage basés sur des fibres optiques. En MCR et en OCT, un laser avec une grande largeur spectrale ( $\Delta\lambda$ ) est désiré, avec une faible largeur spectrale instantanée ( $\delta\lambda$ ). Pour obtenir une grande largeur spectrale, il faut un milieu amplificateur pouvant fournir du gain sur une large bande. Les amplificateurs basés sur des semi-conducteurs sont idéaux pour ce genre d'application. Plusieurs milieux de gain peuvent être directement couplés à des fibres optiques permettant de minimiser les pertes d'insertion. Pour obtenir une largeur instantanée étroite, il faut introduire un filtre en longueur d'onde. Dans le cas d'un laser à balayage, il faut aussi que ce filtre soit accordable dans le temps, idéalement le plus rapidement possible. Pour maximiser la puissance de sortie, il a été montré que le filtre doit être inséré dans la cavité laser plutôt que placé à la sortie de celle-ci. Cela permet de bénéficier du gain laser sur la plage de longueur d'onde filtrée.

Une implémentation avec un filtre rotatif basé sur un réseau de diffraction a été proposée par Yun *et al.* [92], puis modifiée pour augmenter la vitesse ou la largeur spectrale [93, 94]. Ce concept sera réutilisé dans cette thèse. D'autres implémentations ont aussi été proposées comme utilisée un filtre Fabry-Perot dans la cavité laser [95]. Cette idée a été réutilisée pour créer un laser à modes bloqués dans le domaine de Fourier (FDML : *Fourier-Domain Mode Locked*). Ce type de laser à balayage offre possiblement les plus grandes vitesses de balayage spectral, dépassant les 2 millions de scans par seconde [74]. Les longueurs d'onde centrales utilisées dépendent principalement des milieux de gains disponibles. Ceux-ci sont pour la plupart centrés à 1550 nm et 1300 nm [96]. Ces bandes de longueur d'onde correspondent aux bandes des télécommunications, où il existe de nombreux composants fibrés développés pour cette industrie. Plus récemment, des milieux de gain à 1050 nm [97] et à 850 nm [98–100] ont été développés. Ceux-ci ont généralement une largeur de bande plus restreinte qu'à 1300 nm et une plus faible puissance de sortie. Peu de lasers à balayage ont été développés à des longueurs d'onde plus courtes. Il y a peu de milieux de gain disponibles et ceux-ci n'offrent pas une largeur de bande suffisamment grande pour être intéressants pour l'imagerie optique. En particulier, les lasers à 850 nm présentent un très faible seuil de dommages optiques ce

qui limite la puissance de sortie de ce type de laser actuellement à moins de 1 mW.

## CHAPITRE 3 IMAGERIE ENCODÉE SPECTRALEMENT EN FLUORESCENCE

L'encodage spectral a été identifié au chapitre 2 comme une stratégie permettant l'imagerie à balayage laser rapide, entre autres pour l'utilisation de la microscopie confocale *in vivo*. Par contre, lorsque cette technique est employée avec un contraste en fluorescence, cette notion d'encodage spectral est perdue, ce qui limite son champ d'application à un contraste en réflectance. Un groupe de recherche a déjà proposé une solution pour combler cette lacune [62], toutefois requérant une implémentation complexe qui semble incompatible avec le contexte clinique. Ce chapitre propose une nouvelle approche plus simple et plus rapide pour intégrer un contraste de fluorescence dans un montage d'imagerie par encodage spectral. Ces travaux ont mené à deux publications : Mathias Strupler, **Etienne De Montigny**, Dominic Morneau et Caroline Boudoux, «*Rapid spectrally encoded fluorescence imaging using a wavelength-swept source*», *Optics Letters*, (2010) [3] et Mathias Strupler, Nadir Goulamhoussen, **Etienne De Montigny** et Caroline Boudoux, «*Rapidly Wavelength-Swept Laser at 780 nm*», *Photonic Technology Letters*, (2011) [101].

Ce chapitre est divisé en quatre parties. D'abord un rappel des principes de l'encodage spectral est présenté, avec un emphase sur l'adaptation du contraste en fluorescence. Ensuite, une preuve de principe du système d'imagerie en fluorescence avec des points quantiques excités à 1300 nm est décrite en détails. Par la suite, une amélioration critique pour l'utilisation clinique est présentée. Il s'agit d'une implémentation fibrée du système de détection. Enfin, un laser à balayage à 780 nm bâti sur mesure est décrit et caractérisé, ce dernier permettant d'exploiter des fluorophores approuvés pour utilisation chez l'humain et l'autofluorescence des glandes parathyroïdes.

### 3.1 Principes de l'encodage spectral

Le concept général de l'encodage spectral est d'utiliser une source à large bande et de la combiner avec un réseau de diffraction pour former une illumination linéaire sur la lentille objectif. En détectant le spectre de la lumière réfléchie, le profil de réflectivité de l'échantillon selon une dimension est retrouvé. Une image en deux dimensions peut être formée en utilisant un balayage mécanique comme un miroir monté sur un galvanomètre ou, dans le cas d'une sonde, une rotation de celle-ci. Une variante implique une source large bande à balayage en longueur d'onde et une détection temporelle rapide. En utilisant une telle source, chaque longueur d'onde illumine séquentiellement l'échantillon. Le réseau de diffraction permet que

chaque longueur d'onde illumine un point différent sur l'échantillon ; la longueur d'onde encode la position de cette manière. Il existe toutefois une deuxième forme d'encodage : la source balaie temporellement les longueurs d'onde, ce qui implique un encodage temporel. En détectant le signal avec une photodiode rapide, on reconstruit en même temps la réflectivité en fonction de la position, ce qui permet de former une image. Trois aspects importants de conception sont à étudier.

Le premier aspect est la dispersion angulaire du système. Cette dernière est déterminée par une combinaison de la largeur de bande de la source  $\Delta\lambda$  et du pas du réseau utilisé  $\Lambda$ . Pour une lentille objectif de longueur focale  $f$ , le champ de vue (FOV) devient :

$$\text{FOV} = 2f \tan \left( \frac{\Delta\lambda}{2 \cos(\theta_L)\Lambda} \right). \quad (3.1)$$

Le second aspect important est le nombre de points résolvables  $n$ , qui peut être calculé à partir de la largeur spectrale instantanée de la source à balayage ( $\delta\lambda$ ) :

$$n = \frac{\Delta\lambda}{\delta\lambda} = \frac{\Delta\lambda d}{\Lambda\lambda_0} \quad (3.2)$$

où  $d$  est la taille du faisceau incident sur le réseau de diffraction et  $\lambda_0$  est la longueur d'onde centrale de la source.

Le troisième aspect à prendre en compte est la vitesse d'acquisition et d'imagerie. Que le système soit implanté avec une source à balayage en longueur d'onde ou un spectromètre, le temps pour imager une ligne est dicté par la vitesse nécessaire pour mesurer la densité spectrale de puissance provenant de l'échantillon. Il s'agit respectivement du temps pour balayer toutes les longueurs d'onde ou de faire une mesure spectrale avec un spectromètre. Ces deux méthodes de mesure présentent généralement des vitesses de quelques dizaines jusqu'à la centaine de kHz. Certaines sources à balayage peuvent dépasser ces taux en atteignant les dizaines de MHz.

### 3.1.1 Encodage spectral en fluorescence

L'élément principal qui rend le contraste de fluorescence difficile à intégrer dans un montage d'encodage spectral est le décalage de Stokes. Lorsqu'une molécule absorbe un photon et passe dans un état électronique excité, il se produit une relaxation vers le niveau vibrationnel minimum lié à ce niveau électronique. La molécule retourne au niveau inférieur après un certain temps appelé temps de vie de la fluorescence. Lors de cette désexcitation, un photon de plus faible énergie est émis. Comme la position est encodée avec la longueur d'onde, le

changement entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission fait que la lumière ne pourra reprendre le chemin inverse pour être détectée. Le réseau dévierà la lumière émise par fluorescence à un plus grand angle.

### **3.2 Encodage spectral en fluorescence avec une source à balayage en longueur d'onde**

Tel que mentionné précédemment, une approche pour intégrer le contraste de fluorescence a déjà été proposée dans la littérature. Cette technique est basée sur une source à large spectre modulée en amplitude à l'aide d'un interféromètre de Michelson. Le spectre émis par l'échantillon est détecté à l'aide d'un spectromètre. Une transformée de Fourier est ensuite appliquée au spectre pour obtenir un profil de réflectivité. Cette implémentation présente des inconvénients : une complexité accrue, un traitement de signal additionnel et une plus grande sensibilité à l'alignement. Je propose ici une nouvelle approche basée sur une source à balayage en longueur d'onde qui vient adresser ces problématiques.

Bien que l'encodage spectral de la position soit perdu dans le processus de fluorescence, l'encodage temporel mentionné précédemment persiste ; les points sur l'échantillon sont séquentiellement illuminés. En mesurant le signal sur une photodiode rapide et en filtrant la longueur d'onde d'excitation, un profil d'intensité en fluorescence est retrouvé. Cette approche est limitée temporellement par le temps de vie de la fluorescence : on doit passer un temps suffisant sur chaque pixel pour avoir le temps de récolter la fluorescence. Toutefois, la plupart des fluorophores ont des temps de vie de l'ordre de la nanoseconde, ainsi une imagerie très rapide est toujours possible. Pour fixer un ordre de grandeur, un temps de relaxation de 10 ns correspond à une fréquence d'échantillonnage de 100 MHz.

Une autre condition pour que cette technique soit utilisable est que le spectre de la source soit plus étroit que le spectre d'excitation de la fluorescence. Dans le cas contraire, certaines zones de l'image ne pourraient générer de signal de fluorescence. Avec cette méthode, il est à prévoir que des variations de l'intensité sur l'image seront dues à la variation de la longueur d'onde d'excitation et à la variation de la puissance en fonction de la longueur d'onde. Ces variations peuvent toutefois être calibrées et corrigées si les spectres d'excitation et d'émission de l'agent fluorescent sont connus.

#### **3.2.1 Matériel et méthodes**

Le montage pour la preuve de principe est illustré à la figure 3.1. La preuve de principe est réalisée avec un laser à balayage en longueur d'onde centré à 1300 nm. Un circulateur optique

(C) permet de diriger la lumière de la source vers le montage de microscopie. Une lentille asphérique permet de collimer le faisceau en sortie, où il se dirige vers un réseau de diffraction. Le réseau disperse les longueurs d'onde, qui traversent un miroir dichroïque et sont focalisées sur l'échantillon. La lumière réfléchie directement par l'échantillon prendra le trajet inverse et se recouplera en partie dans la fibre d'illumination. Le circulateur optique redirigera la lumière vers une photodiode pour qu'elle soit détectée. Dans le cas où le processus de fluorescence a lieu, de la lumière à plus grande longueur d'onde sera émise au niveau de l'échantillon. Cette lumière sera réfléchie par le miroir dichroïque et focalisée sur une photodiode large (1 mm). Cette photodiode a une bande passante de 775 kHz et un gain de  $2.4 \text{ V W}^{-1} \times 10^4$ . Des points quantiques (Evidot 1500, PbS quantum dots) servent d'échantillons fluorescents pouvant être excités à 1300 nm. Ces points quantiques émettent de la lumière par fluorescence centrée à 1500 nm.

Le système a été testé à l'aide d'un échantillon fabriqué au laboratoire contenant plusieurs puits de 1 mm où des concentrations différentes de fluorophores ont été déposées (QDot1 : 11.7  $\mu\text{mol/L}$ , QDot2 : 4.5  $\mu\text{mol/L}$ , QDot3 : 1.55  $\mu\text{mol/L}$ , QDot4 : 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ). Cet échantillon a ensuite été imaginé en obtenant une ligne avec le balayage en longueur d'onde de la source et en utilisant une platine de translation motorisée pour le déplacement dans l'axe perpendiculaire.

### 3.2.2 Résultats

Le système permet d'acquérir 9920 lignes de 1024 pixels par seconde sur les deux canaux simultanément. La figure 3.2 présente les principaux résultats enregistrés avec ce système. La figure 3.2(a) montre un schéma de l'échantillon. En (b), l'image en réflectance obtenue avec le signal recouplé dans le cœur de la fibre. En (c), l'image obtenue avec la détection de la fluorescence. Un puits rempli de toluène, solvant dans lequel les points quantiques étaient gardés, a été imaginé pour s'assurer que le solvant n'était pas fluorescent. En (d), l'intensité du signal mesuré en fonction de la position dans le champ de vue est présentée.

Pour montrer la linéarité du système avec la concentration, la courbe d'intensité du signal en fonction de la concentration est présentée en (e).

Finalement, les champs de vue en réflectance et en fluorescence sont comparés en traçant l'intensité en fonction de la position pour un échantillon diffusant (papier à polir) et une solution homogène de points quantiques dans le toluène en (f).

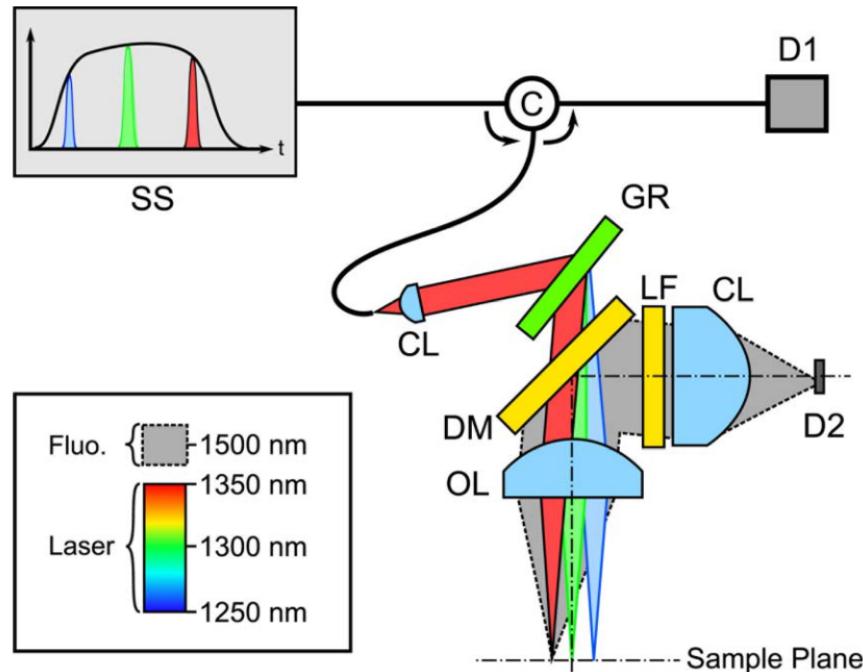


Figure 3.1 Montage expérimental d'imagerie encodée spectralement en fluorescence. La fluorescence est ré-émise à une longueur d'onde plus grande, ce qui permettra à ce signal de réfléchir sur le dichroïque pour aller dans une voie de détection séparée du canal en réflectance, tout en préservant l'encodage temporel par la source. SS : Source à balayage en longueur d'onde. C : Circulateur. D1,D2 : Photodiodes. CL : Lentille de collimation. GR : Réseau de diffraction. DM : Miroir dichroïque. OL : Lentille objectif. LF : Filtre passe-long à 1400 nm. CL : Lentille de focalisation. Reproduit avec permission de [3].

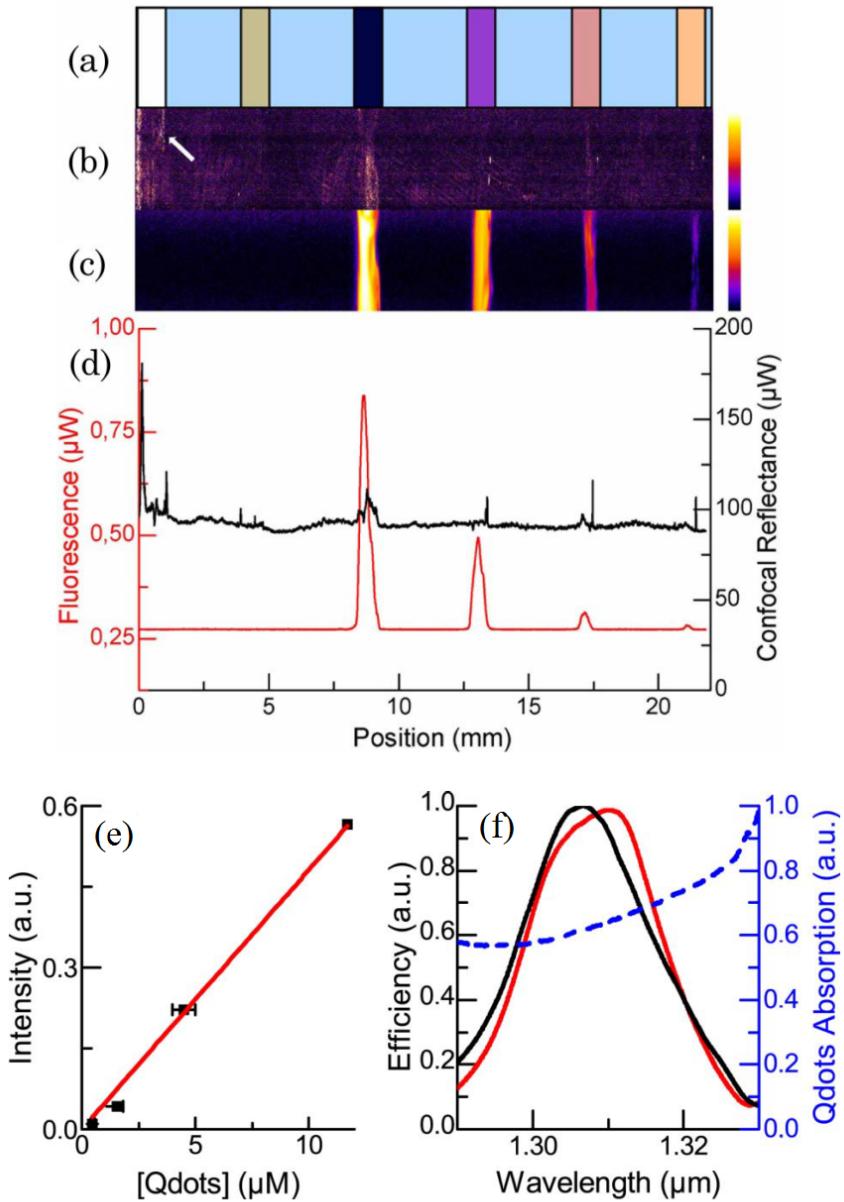


Figure 3.2 (a) Schéma de l'échantillon construit au laboratoire pour tester le système. (b) Image en réflectance montrant très faiblement les canaux. La flèche indique une interface air-polycarbonate qui produit une plus grande réflexion. (c) Image en fluorescence où les canaux contenant des fluorophores sont bien visibles. (d) Graphique représentant une ligne horizontale prise sur les signaux de fluorescence et de réflectance. Cette figure illustre l'intensité détectée sur chaque canal. (e) Linéarité de l'intensité du signal de fluorescence en fonction de la concentration. (f) Recouvrement des champs de vue en réflectance (noir) et en fluorescence(rouge) avec une partie de la courbe d'absorption des points quantiques utilisés.

### 3.2.3 Discussion

Une nouvelle implémentation d'encodage spectral en fluorescence est présentée ici. Cette approche est plus robuste que ce qui a été proposé dans la littérature ; elle ne requiert pas d'interféromètre avec des pièces mobiles ou de traitement de signal additionnel. Notre approche est aussi plus rapide. Cette vitesse pourrait être augmentée, car le polygone de notre laser à balayage en longueur d'onde peut tourner plus rapidement (jusqu'à 30 kHz ou 50 000 rpm). Il faudrait toutefois obtenir une photodiode plus rapide, la bande passante de notre photodiode venant limiter la performance de notre système. Ce montage permet de détecter des faibles concentrations de fluorophores ( $0.5 \mu\text{mol/L}$ ) avec un gain relativement faible sur le détecteur. Un facteur qui empêche d'utiliser un gain plus élevé est le fait qu'une photodiode à grande surface est nécessaire (1 mm), car le faisceau de lumière fluorescente balaie sur le détecteur. Le faisceau ne repasse pas par le réseau de diffraction, ce qui aurait permis de ne pas reproduire le même balayage sur l'échantillon et sur le détecteur. La tendance linéaire entre la puissance détectée et la concentration indique que le seuil de détection ne semble pas atteint, malgré que d'autres points de mesure à plus faible concentration auraient été nécessaires pour établir le véritable seuil de détection, qui est tout de même inférieur à  $0.5 \mu\text{mol/L}$ . La comparaison entre les champs de vue en fluorescence et en réflectance à la figure 3.2(f) met en évidence un faible changement dû au spectre d'absorption des points quantiques. Les champs de vue dans les deux modes de détection sont très similaires. Le faible changement de l'absorption des points quantiques en fonction de la longueur d'onde dans la bande spectrale choisie facilite l'imagerie en fluorescence. Le champ de vue pourrait être plus fortement déformé avec un fluorophore dont l'absorption est plus fortement dépendante de la longueur d'onde.

## 3.3 Implémentation fibrée

Bien que ce montage collecte en épi-détection comme le ferait un endoscope, le chemin de détection perpendiculaire au chemin d'illumination est un obstacle à la fabrication d'un endoscope ergonomique. Le design d'un endoscope serait facilité si l'illumination et la détection se faisaient au même endroit, idéalement à base de fibres optiques pour augmenter la robustesse du montage. En repassant par le réseau de diffraction, le phénomène de balayage pourrait aussi être éliminé. Un nouveau montage implémentant ces nouvelles idées a donc été élaboré. Il est présenté à la figure 3.3.

Lorsque la lumière de fluorescence (à 1500 nm) repasse par le réseau de diffraction, elle est déviée à un plus grand angle que la lumière de réflectance (à 1300 nm). Il y a donc séparation spatiale des ces signaux. En plaçant une fibre multimode de grand diamètre (500  $\mu\text{m}$ ) près

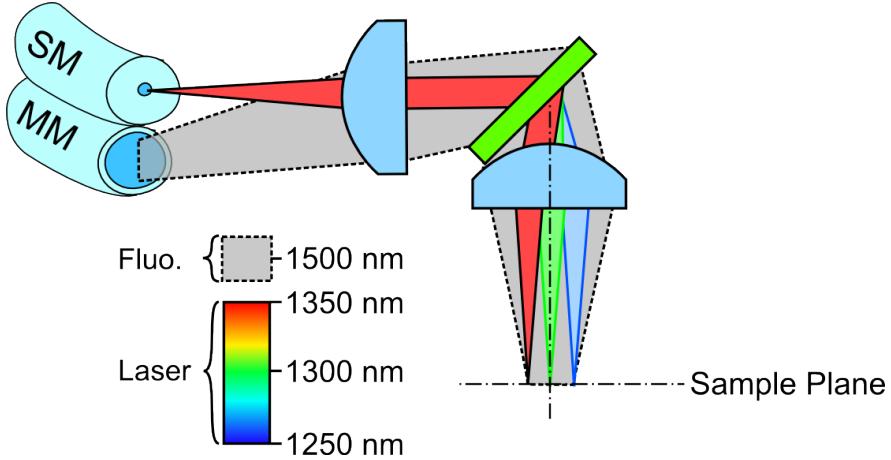


Figure 3.3 Montage fibré de fluorescence encodé spectralement pouvant être implémenté dans une sonde endoscopique. Ce montage est plus compact, car la fibre monomode d'illumination et la fibre multimode de détection sont une à côté de l'autre et colinéaires. La lumière émise par fluorescence est déviée à un plus grand angle par le réseau en raison de sa longueur d'onde plus grande.

de la fibre d'illumination, on peut récolter un maximum de fluorescence. En choisissant avec soin la lentille de collimation en fonction de la séparation spectrale entre l'illumination et la fluorescence, ainsi que du pas du réseau, la distance entre les faisceaux de réflectance et de fluorescence peut être ajustée. Une difficulté avec ce montage est justement l'alignement de la fibre de détection de fluorescence. Elle doit être précisément positionnée, mais le signal de fluorescence est difficilement détectable, ce qui complique la tâche. J'ai élaboré une méthode pour simplifier grandement l'alignement de ce montage. Une fibre monomode est placée au plan focal du système. Le positionnement de cette fibre est optimisé en maximisant la puissance injectée dans cette dernière. Lorsque la fibre est à la position optimale, elle est connectée à une source émettant à la longueur d'onde de fluorescence (1500 nm). Ce signal peut ensuite être suivi dans son trajet à travers le montage. Les pertes peuvent être calculées à travers le montage et le positionnement de la fibre multimode de détection peut être optimisé en maximisant le signal détecté. De cette manière, nous mesurons une efficacité de collection de 90 %, qui en incluant toutes les pertes du montage, se traduit en une détection nette de 75 % de la lumière injectée à 1500 nm.

Ce montage est beaucoup plus robuste, efficace, et permet d'utiliser une photodiode de plus petit diamètre pour détecter la fluorescence. Cela élargit le choix de détecteurs et permet d'avoir un détecteur avec un meilleur produit gain bande passante et ainsi améliorer notre seuil de détection. Les deux fibres utilisées pour l'illumination et la détection sont disposées côte à côté, ce qui facilite le design et l'implémentation de ce montage dans une sonde à main

pour une potentielle utilisation clinique.

### **3.4 Laser à 780 nm**

Un élément charnière qui reste à adresser avant l'implémentation clinique est que ce montage utilise une source à 1300 nm, une plage spectrale où il y a peu de fluorophores endogènes et exogènes. D'office, il n'y a aucun fluorophore exogène approuvé par la FDA dans l'infrarouge. La fluorescéine et l'Indocyanine Green (ICG) comptent parmi ceux qui sont approuvés, mais sont excitables dans le visible (488 nm et 780 nm de longueur d'onde centrale d'absorption respectivement). La faible disponibilité de milieux de gain à large bande dans le visible et le proche infrarouge rend l'utilisation de ces fluorophores difficile en encodage spectral. Tel que mentionné dans la revue de littérature, les quelques sources à balayage au moment de réaliser ce travail à des plus courtes longueurs d'onde (830 nm) souffrent d'un manque de fiabilité et d'une faible puissance de sortie dues au faible seuil de dommage optique des milieux amplificateurs. Dans cette section, je présente la première source à balayage centrée à 780 nm à grande puissance.

#### **3.4.1 Design**

Le design du laser à balayage est basé sur un laser accordable disponible commercialement (Lynx TEC-120-780-150, Sacher Lasertechnik GmbH, Allemagne). Ce laser est prévu pour être accordable sur une large plage, mais conçu pour émettre avec une très faible largeur spectrale. Un réseau de diffraction à haute efficacité est présent dans la cavité pour accorder le laser. La diode laser qui sert de milieu amplificateur a une face avec un revêtement anti-réflexions pour réduire les pertes dans la cavité, tandis que la face de sortie est partiellement réfléchissante. Nous avons modifié le laser en tournant le réseau de diffraction pour que la lumière diffractée ne retourne pas directement vers le milieu de gain, mais plutôt vers un filtre accordable en longueur d'onde basé sur un miroir polygonal rotatif. À un instant donné, une faible composante spectrale est réfléchie et retourne dans la cavité pour être amplifiée. Lorsque le polygone tourne, la longueur d'onde amplifiée change. Un système télécentrique permet de faire converger les rayons sur le polygone et d'augmenter la dispersion angulaire du faisceau de manière à couvrir entièrement la facette du polygone. La sortie du laser est couplée à une fibre monomode à 780 nm pour permettre l'intégration à différents montages d'imagerie. Le faisceau de sortie étant elliptique, une paire de lentilles cylindriques et une lentille asphérique sont utilisées pour respectivement rendre le faisceau circulaire et coupler un maximum de puissance dans la fibre monomode de sortie.

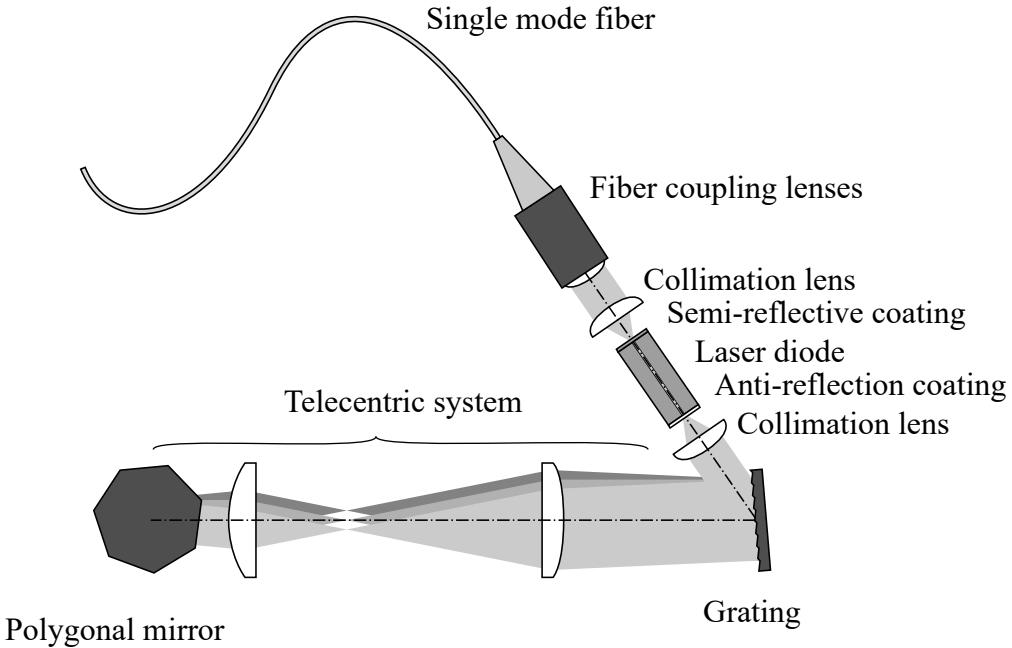


Figure 3.4 Schéma du montage du laser à 780 nm. La cavité initiale de la diode laser est étendue pour intégrer un filtre accordable rapidement composé d'un réseau de diffraction, d'un télescope et d'un polygone rotatif. Cela permet de faire varier rapidement la longueur d'onde amplifiée dans la cavité.

### 3.4.2 Performances

La figure 3.5 établi les performances du laser. La figure 3.5(a), la puissance à la sortie de la fibre optique en fonction du courant d'injection est présentée. La puissance maximale de sortie est de 54 mW. Une efficacité de couplage dans la fibre monomode de 46 % est obtenue ; la puissance totale mesurée à la sortie du laser étant 117 mW. La figure 3.5(b) montre la trace temporelle du balayage du laser pour une vitesse de rotation correspondant à 12 kHz. On mesure un cycle d'utilisation de 90 %. Dans la figure 3.5(c), le spectre à la sortie est mesuré en fonction du courant d'injection. Le spectre total de 761 nm à 798 nm est obtenu avec un courant de 200 mA. La largeur à mi-hauteur du spectre est de 30 nm, avec une puissance maximale de sortie de 54 mW. La figure 3.5(d) montre la variation de la puissance de sortie en fonction de la vitesse de rotation. Lorsque le polygone tourne plus rapidement, la lumière fait moins d'allers-retours dans la cavité pour une longueur d'onde donnée. Nous observons une diminution d'environ 6 % de la puissance maximale lorsque le polygone tourne à sa vitesse maximale de 54 400 rpm correspondant à une fréquence d'environ 33 kHz et une vitesse de balayage de  $1330 \text{ nm s}^{-1}$ . Le signe négatif indique seulement que la direction de rotation du polygone est inversée. Nous observons une diminution plus significative de la puissance

lorsque la rotation est inversée. Ceci est un phénomène connu dans la littérature pour les amplificateurs à semi-conducteur [102]. La cohérence instantanée du laser a été mesurée à l'aide d'un interféromètre de Michelson en espace libre à plusieurs vitesses de rotation. À 6 kHz, la longueur de cohérence instantanée est de 16 mm et diminue à 11 mm à 30 kHz. Ces valeurs correspondent à des largeurs spectrales instantanées de 17 pm et 24 pm. De ces largeurs spectrales instantanées, on peut calculer un nombre maximal de points résolvables de 2176 points à 6 kHz et 1541 points à 30 kHz.

### 3.4.3 Discussion

Ce laser présente des caractéristiques importantes pour l'imagerie en encodage spectral. Il offre une grande puissance, supérieure à ce qui est disponible sur le marché ou pour les lasers accordables de cette région du spectre. La longueur d'onde centrale et la plage spectrale couverte correspondent bien aux longueurs désirées pour exciter l'autofluorescence de la parathyroïde et l'indocyanine green. Le laser a un cycle d'utilisation de 90 % ce qui optimise la période utile de la source. Les performances du laser se dégradent peu lorsque la vitesse de rotation du polygone est augmentée, ce qui en fait un outil idéal autant à basse vitesse qu'à haute vitesse. Cette source permet un très grand nombre de points résolvables, ce qui résulte en des images à très haute résolution.

Ce laser peut avoir des nombreuses applications en imagerie grâce à sa grande puissance et sa vitesse de balayage. Cette plage de longueur d'onde étant très peu explorée au moment de publier ces travaux, cette source amène de nouvelles options en apportant une longueur d'onde plus courte que les autres sources à balayage typiquement à 1500 nm, 1300 nm ou 1060 nm. Cette source peut être utilisée en OCT, tel que démontré par M. Goulamhoussen [103]. La grande longueur de cohérence de ce laser permet d'avoir une profondeur de pénétration limitée par les propriétés optiques du tissu et non par la diminution de la visibilité des franges. Dans le contexte présent, cette source peut être utilisée pour exciter la fluorescence de la parathyroïde et d'agents de contraste exogènes comme l'ICG ou l'AlexaFluor 790, dont l'utilisation est répandue en imagerie de petits animaux [104]. Pour l'imagerie encodée spectralement, ce laser, combiné à un réseau de 1800 l/mm, permet d'obtenir plus de 1200 points résolvables, permettant une imagerie à grande densité de pixels. La puissance de sortie et la longueur de cohérence varient très peu avec la vitesse de rotation du polygone, ce qui permet d'imager plus rapidement sans faire de compromis sur les performances du laser.

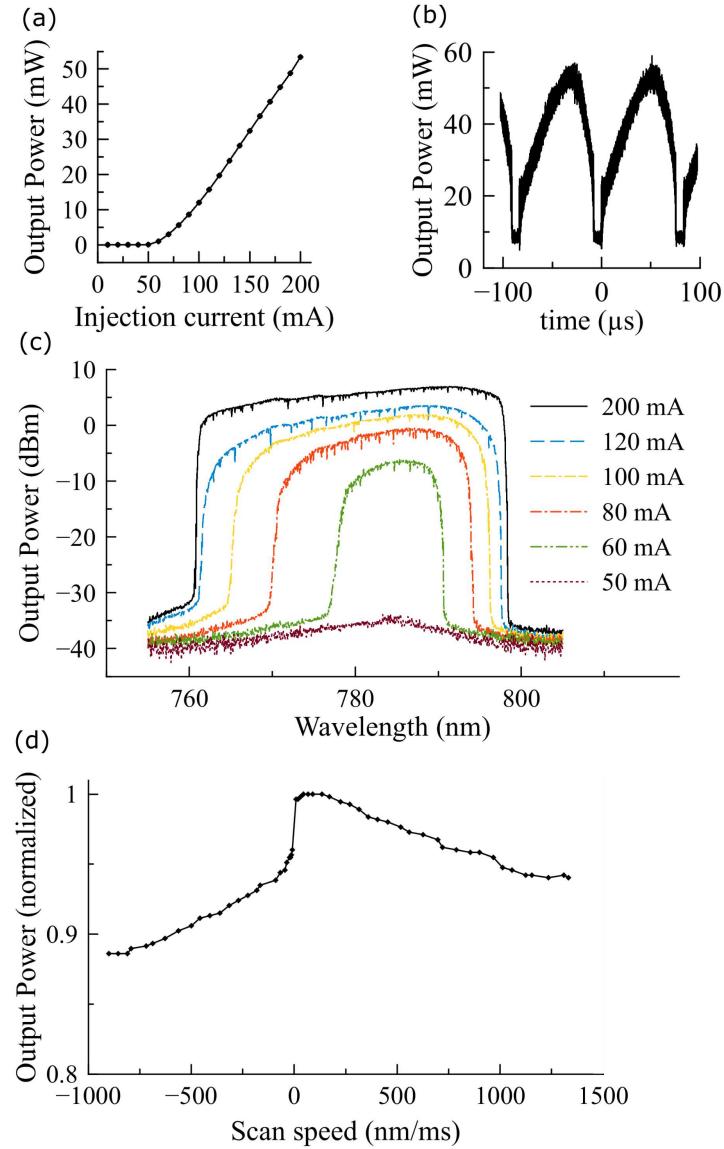


Figure 3.5 Caractérisation du laser à 780 nm.(a) Puissance de sortie du laser en fonction du courant d'injection. Le seuil pour l'émission laser est d'environ 50 mA. (b) Trace temporelle de la puissance du laser. On mesure de cette courbe un régime d'utilisation de 90 %. (c) Densité spectrale de puissance tracée en fonction du courant d'injection. Le laser n'atteint sa pleine largeur spectrale qu'au courant maximal. (d) Puissance de sortie normalisée en fonction de la vitesse d'accordabilité du laser. Le signe négatif indique que le polygone tourne dans l'autre sens.

### 3.5 Discussion et conclusion

Dans ce chapitre, je présente une nouvelle technique d'imagerie : l'imagerie en fluorescence encodée spectralement. Cette technique ajoute un contraste de fluorescence jusqu'à maintenant incompatible avec les méthodes d'encodage spectral. Cette technique ne nécessite que peu de modifications à un montage d'endoscopie encodée spectralement ou de microscopie confocale encodée spectralement. Il est donc facile d'ajouter le contraste moléculaire à haute résolution en plus du contraste morphologique. Je présente aussi un second design avec une détection basée sur des fibres optiques pour améliorer l'efficacité et la robustesse du montage. Les deux fibres étant placées côté à côté, il est facile de concevoir une sonde à main de petit diamètre facile à manipuler et ergonomique. Ce design est aussi compatible avec l'utilisation de fibre à double gaine en endoscopie encodée spectralement, un développement auquel j'ai contribué et qui sera discuté dans le chapitre suivant. Les résultats incluent une forte augmentation du signal détecté, une diminution du contraste de tavelure et une augmentation de la profondeur de champ. L'article qui a découlé de ces travaux est présenté à l'annexe D.

Certains inconvénients sont inhérents à la méthode, mais sont gérables lorsqu'il est question de l'appliquer à la détection des glandes parathyroïdes dans un contexte per-opératoire. Il est nécessaire d'appliquer des corrections par rapport au spectre d'excitation de la source et du spectre d'émission du fluorophore pour obtenir un signal quantitativement représentatif. Ces corrections posent seulement problème dans le cas où deux ou plusieurs fluorophores sont excités simultanément. Dans l'application d'identification des parathyroïdes, un seuil de détection d'un signal de fluorescence peut être suffisant comme contrôle. De plus, comme il est supposé que la même molécule est responsable de la fluorescence de la thyroïde et de la parathyroïde, les mêmes corrections peuvent s'appliquer. L'autre aspect qui peut être considéré comme un inconvénient est l'impossibilité d'avoir un sectionnement optique sur le signal de fluorescence. Toutefois, dans le cadre de l'utilisation de cette méthode pour une imagerie avec un champ de vue de plusieurs millimètres, la profondeur de champ est en fait un avantage et permet d'éviter des pertes de signal pour des objets qui ne sont pas au plan focal du système. Les zones où on retrouve des parathyroïdes peuvent être inégales, une grande profondeur de champ peut se révéler un atout.

Dans le cadre de ce travail, la preuve de principe a été réalisée avec des points quantiques excitables à 1300 nm. Ces fluorophores peuvent être considérés comme idéaux pour ce genre d'imagerie, car le champ de vue est très peu affecté par la courbe d'absorption des points quantiques et leur émission est très espacée spectralement de l'excitation. Il faut toutefois être très prudent en manipulant ces agents, car leur effet sur la santé est inconnu. Pour mesurer l'autofluorescence des parathyroïdes ou utiliser des fluorophores approuvés pour utilisation chez

l'humain, nous avons conçu et bâti un laser à 780 nm pour exciter des fluorophores exogènes et endogènes dans le proche infrarouge. De cette manière, cette technique peut être transposée vers l'imagerie *in vivo* et *ex vivo* pour les humains, mais également pour les animaux. En combinant ce nouveau laser avec des composants optimisés pour le proche infrarouge, un outil d'identification grand champ des parathyroïdes peut être envisagé. Cet instrument peut fournir des images à très grande densité de pixels à un taux de rafraîchissement de niveau vidéo (30 images par seconde) en réflectance et en fluorescence. Il n'apporterait toutefois pas d'information sur la structure microscopique du tissu ou en profondeur.

La question qui reste en suspens à ce moment est de déterminer si les parathyroïdes sont bien fluorescentes, et si oui, quelle sensibilité est nécessaire pour la détecter. Notre accès à des tissus animaux provenant d'abattoirs à ce moment du projet nous empêche de trouver des réponses à ces questions. En effet, il est très fréquent que nous n'ayons que des fragments partiels de tissu thyroïdien et il n'est pas possible d'identifier des glandes parathyroïdes. Nos mesures de fluorescence sur des thyroïdes de porc se sont avérées non concluantes ou négatives. En plus des méthodes identifiées précédemment, l'imagerie en fluorescence encodée spectralement serait à évaluer comme technique potentielle d'identification des parathyroïdes. Le chapitre 5 visera à déterminer les méthodes d'imagerie les plus pertinentes pour accomplir cette tâche et lesquelles peuvent bien fonctionner dans un contexte peropératoire.

## CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : DOUBLE-CLAD FIBER COUPLER FOR PARTIALLY COHERENT DETECTION

### Auteurs

Etienne De Montigny,\* Wendy-Julie Madore,\* Olivier Ouellette, Gabriel Bernard, Mikael Leduc, Mathias Strupler, Caroline Boudoux, and Nicolas Godbout

\* These authors contributed equally to this work

Etienne De Montigny et Wendy-Julie Madore ont participé au design et à la caractérisation des fibres optiques, au design, à la fabrication, à la caractérisation du coupleur ainsi qu'à son application à l'imagerie confocale. Ils ont aussi rédigé et révisé l'article. Olivier Ouellette et Gabriel Bernard ont participé à la fabrication et à la caractérisation des coupleurs. Mikael Leduc a fourni de l'aide technique sur la fabrication des coupleurs. Mathias Strupler, Caroline Boudoux et Nicolas Godbout ont contribué aux révisions de l'article et à des discussions sur les résultats. Nicolas Godbout a aussi participé au design du composant.

### 4.1 Abstract

Double-clad fibers (DCF) have many advantages in fibered confocal microscopes as they allow for coherent illumination through their core and partially coherent detection through their inner cladding. We report a double-clad fiber coupler (DCFC) made from small inner cladding DCF that preserves optical sectioning in confocal microscopy while increasing collection efficiency and reducing coherent effects. Due to the small inner cladding, previously demonstrated fabrication methods could not be translated to this coupler's fabrication. To make such a coupler possible, we introduce in this article three new design concepts. The resulting DCFC fabricated using two custom fibers and a modified fusion-tapering technique achieves high multimodal extraction ( $\geq 70\%$ ) and high single mode transmission ( $\geq 80\%$ ). Its application to reflectance confocal microscopy showed a 30-fold increase in detected signal intensity, a 4-fold speckle contrast reduction with a penalty in axial resolution of a factor 2. This coupler paves the way towards more efficient confocal microscopes for clinical applications.

(060.2340) Fiber optics components ; (060.2310) Fiber optics ; (110.4980) Partial coherence in imaging ; (180.1790) Confocal microscopy ; (170.2150) Endoscopic imaging ; (170.3890) Medical optics instrumentation.

## 4.2 Introduction

Partially coherent detection presents advantages in imaging such as improvement in signal collection efficiency and reduction of coherence effects [81]. It may be achieved through coherent illumination of a sample combined to a less spatially coherent detection scheme [105, 106]. Systems exploiting partially coherent detection can be fiber-based using a single mode fiber for coherent illumination and a multimode fiber for the detection of several spatial modes lowering the spatial coherence of the detected signal.

Confocal microscopy (CM) is an example of an imaging system exploiting partial coherence. In bench-top implementations, it was shown that using a larger detection pinhole [107, 52] yields images with higher contrast, lower speckle noise with a minimal penalty in optical sectioning. Fiber-based confocal microscopes have the potential to translate the benefits of confocal microscopy to clinical applications such as dermatology [108, 109] and ophthalmology [110–112]. Using fiber bundles or scanned single fibers, confocal microscopy may be incorporated into endoscopes for gastroenterology [113–117], laryngology [118] and pneumology [119, 120] applications.

Single-fiber confocal microscopes may benefit from partially coherent detection when replacing the single mode fiber with a double-clad fiber (DCF) [61, 121]. DCFs provide both coherent and partially coherent guiding regions through concentric areas having different refractive indices : a single mode core (for coherent illumination), an inner cladding (for partially coherent detection) and an outer cladding.

Partially coherent detection presents advantages in imaging such as improvement in signal collection efficiency and reduction of coherence effects [81]. It may be achieved through coherent illumination of a sample combined to a less spatially coherent detection scheme [105, 106]. Systems exploiting partially coherent detection can be fiber-based using a single mode fiber for coherent illumination and a multimode fiber for the detection of several spatial modes lowering the spatial coherence of the detected signal.

Confocal microscopy (CM) is an example of an imaging system exploiting partial coherence. In bench-top implementations, it was shown that using a larger detection pinhole [107, 52] yields images with higher contrast, lower speckle noise with a minimal penalty in optical sectioning. Fiber-based confocal microscopes have the potential to translate the benefits of confocal microscopy to clinical applications such as dermatology [108, 109] and ophthalmology [110–112]. Using fiber bundles or scanned single fibers, confocal microscopy may be incorporated into endoscopes for gastroenterology [113–117], laryngology [118] and pneumology [119, 120] applications.

Single-fiber confocal microscopes may benefit from partially coherent detection when replacing the single mode fiber with a double-clad fiber (DCF) [61, 121]. DCFs provide both coherent and partially coherent guiding regions through concentric areas having different refractive indices : a single mode core (for coherent illumination), an inner cladding (for partially coherent detection) and an outer cladding.

We introduce here three new design concepts to enable the fabrication of an sDCFC : an adiabatic single mode capture, a complete multimode expulsion and a double asymmetry in the coupler's structure. Single mode capture is defined as the adiabatic transition in a tapered fiber structure allowing for the surrounding inner cladding of the fiber to behave as a single mode waveguide under specific conditions. Complete multimode expulsion is defined as the migration of all supported modes of a specific guiding area in the fiber to a surrounding guiding area. The last concept, double asymmetry, is linked to the fabrication process in which the tapered DCF is longitudinally displaced (longitudinal asymmetry) prior to fusion with a fiber having a different diameter (transverse asymmetry) [91] to form a doubly-asymmetric structure.

In this paper, we report the first DCFC made from small-ratio DCF, which also exploits a novel fabrication technique specifically tailored for small-ratio double-clad fiber coupler (sDCFC) fabrication. We describe the underlying coupling mechanisms at play for efficient separation of illumination and sample signals within the sDCFC ; namely the adiabatic single mode capture and the complete multimode expulsion. We then present designs for the custom fibers and for the sDCFC, a description of the fabrication process including double asymmetry and a characterization of the coupler performances both in single- and multimode regimes. To further demonstrate the new capabilities of the device, we inserted the sDCFC into a laser scanning confocal microscope operating at 785nm and compared its imaging performances to that of standard fiber coupler. Imaging performances were tested on a resolution target as well as on a freshly excised piece of biological tissue.

### 4.3 Small-ratio double-clad fiber coupler

The sDCFC is an all-fiber four-port device built with two branches on each side of the coupler. In the context of CM with partially coherent detection, only three ports are used. Figure 4.1 shows a schematic diagram of the sDCFC. Excitation light is launched in the core of the DCF at Port 1 through a splice with a mode-matched single mode fiber. This allows for coherent illumination of a sample through dedicated optics placed at Port 2. Backscattered light from the sample is collected by the core and by the inner cladding of the DCF at Port 2. Core signal returns quasi-losslessly to Port 1 whereas the partially coherent signal

propagating in the inner cladding is redirected through the multimode fiber (MMF) to Port 3. For ideal illumination and imaging performances, an sDCFC should allow for quasi-lossless transmission of core light from Port 1 to Port 2 (and back) while transferring all inner cladding light from Port 2 to Port 3.

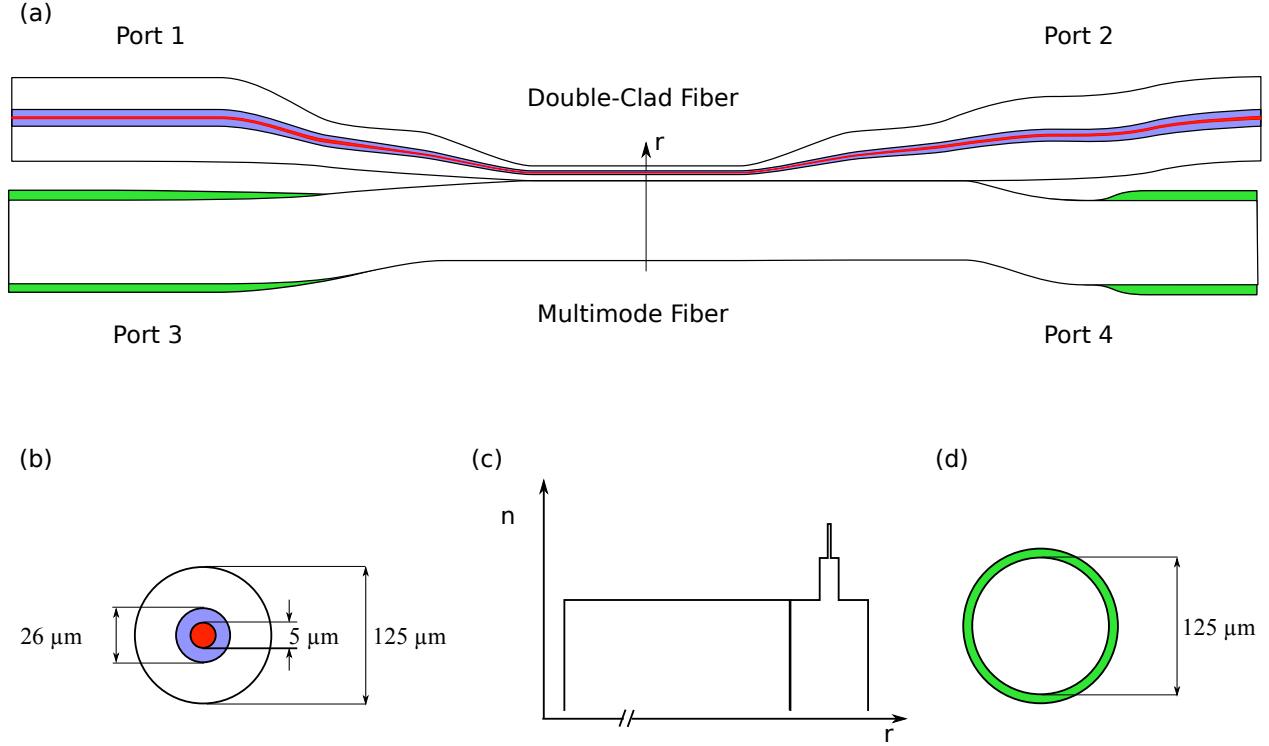


Figure 4.1 (a) Schematic diagram of a small-ratio double-clad fiber coupler achieved by fusing a double-clad fiber (top) with a coreless multimode fiber (bottom). The core, inner cladding and outer cladding regions are shown in red, blue and white, respectively. The guiding region of the coreless fiber is shown in white and its guiding jacket is shown in green. (b) and (d) Cross-sections of the double-clad and multimode fibers, respectively. (c) Refractive index profile of the coupler's central section.

### 4.3.1 Design

Two fibers, an sDCF and an MMF, were designed to meet the stringent requirements imposed by CM. The sDCF's single mode core (diameter 4.5 μm, numerical aperture NA=0.12, cutoff wavelength 610 nm) permits efficient coherent illumination from 610 nm to 1000 nm. In addition, the core is mode-matched ( $MFD \approx 5 \mu m$ ) with a commercially available single mode fiber at 785 nm (780-HP, Nufern, USA). The sDCF's inner cladding has a diameter of 26 μm, to embody the condition on the optimal inner cladding of  $\approx 5 \times MFD$ . At this wavelength, the inner cladding supports approximately 150 modes. The multimode fiber used in

the coupler is a highly multimode coreless pure silica fiber (diameter 125  $\mu\text{m}$ , 0.5 NA), which matches the refractive index of the DCF's outer cladding. Guiding within the coreless fiber relies on a fluoroacrylate cladding, also serving as a protective jacket. This silica-based fiber has a standard outer diameter of 125  $\mu\text{m}$ .

Both fibers were custom-drawn at Université Laval (Canada) and validated according to our specific fiber design. The combination of these two specific fibers allows for adiabatic single mode capture and multimode expulsion. The coupler is fabricated using the fusion-tapering technique described in [88, 91] with modifications to accommodate the new design concepts.

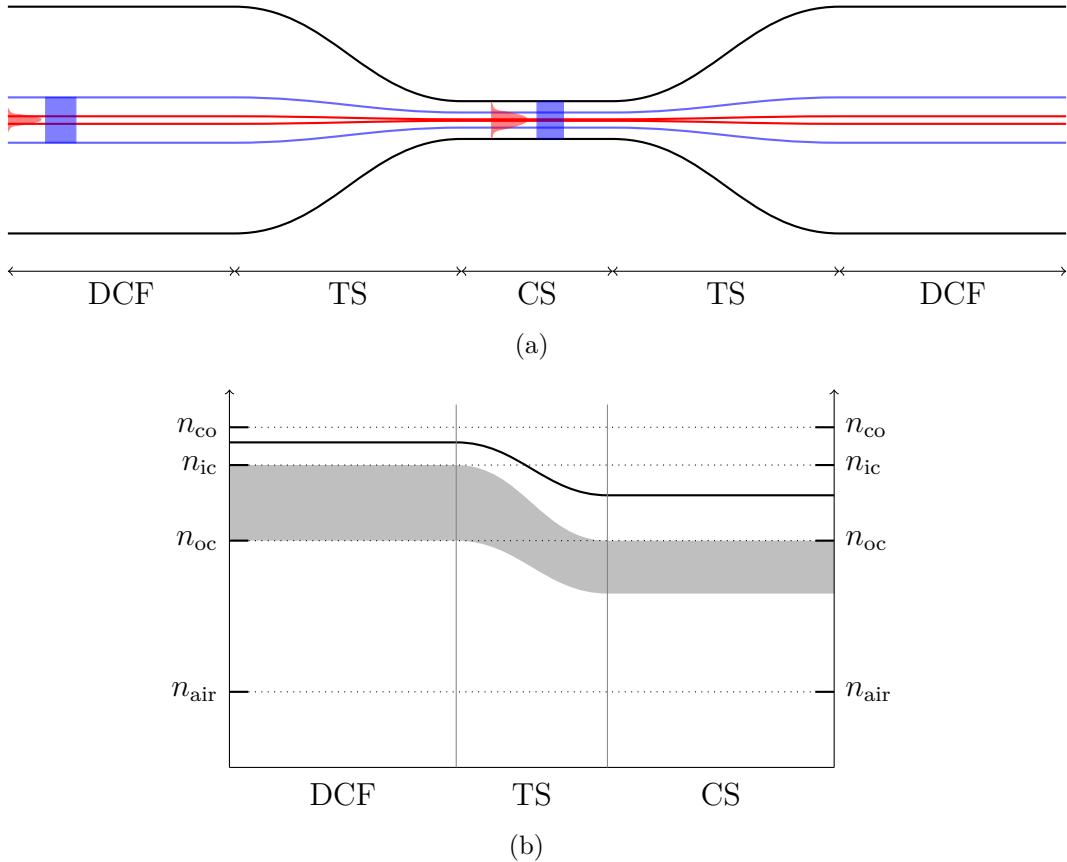


Figure 4.2 (a) Schematic diagram of the tapered DCF with representations of the fundamental mode (red) and inner cladding modes (blue) at the beginning and in the center of the taper. (b) Effective refractive indices of the fundamental mode (solid line) and cladding modes (gray area) as they propagate in the DCF, transition section (TS) and constant section (CS), respectively.

### 4.3.2 Modal propagation through the coupler

Figure 4.2(a) is a schematic diagram of the resulting DCF taper composed of two transition sections (TS) and one constant section (CS). Representations of the fundamental (red) and inner cladding (blue) modes are also shown in the unmodified DCF section and in the CS. Figure 4.2(b) plots the evolution of the modes' effective indices ( $n_{\text{eff}}$ ) in the intact DCF and in the constant section of the taper. The various modes can either be guided by or radiated out of the structure, each mode having its own effective refractive index. The only guided mode within the core is the fundamental mode with its  $n_{\text{eff}}$  between the refractive index of the core  $n_{\text{co}}$  and that of the inner cladding  $n_{\text{ic}}$ . The major part of its electric field is confined within the core. An inner cladding mode is a mode whose  $n_{\text{eff}}$  is comprised between  $n_{\text{ic}}$  and  $n_{\text{oc}}$ , the refractive index of the outer cladding. This type of guided mode has an electric field mostly confined within the inner cladding area. Radiated modes have an  $n_{\text{eff}} \leq n_{\text{air}}$  and are not detected after a short propagation length since they propagate mostly in the jacket or in air.

In order to achieve adiabatic single mode capture, the slopes of the tapered region were chosen to provide an adiabatic transition of the fundamental mode and a short taper length [122, 123]. A structure is said to be adiabatic if the coupling between the fundamental mode and the higher order modes is negligible [124]. The geometry of the single mode core along the structure is shown in red whereas the inner cladding is shown in blue. On the left hand of Fig. 4.2(a), representative power distributions in both areas are shown as they enter the taper. The fundamental mode adapts to the structural change as it travels down the taper until the structure reaches approximately 40 % of its initial diameter. At this point, the fundamental mode diffracts out of the core and spreads into the inner cladding. In the CS, it becomes an inner cladding mode. The reduction in fiber dimensions is chosen such that the inner cladding behaves as a single mode waveguide, thus enabling adiabatic single mode capture. In this configuration, the fundamental mode is confined inside the DCF along the whole structure. As the fundamental mode propagates into the second transition section, it gradually transforms back into a core mode, since an adiabatic transition is a reversible process. As the core increases in size in the second TS, the fundamental mode couples back into the core.

The taper also allows for the multimode expulsion. The structure changes inner cladding modes into outer cladding modes, as their  $n_{\text{eff}}$  in CS are comprised between  $n_{\text{oc}}$  and  $n_{\text{air}}$ . When launched in the structure, the modes are confined in the inner cladding. As they progress in the transition section (TS), the modes gradually leak to the outer cladding. The cladding modes are guided by the outer cladding-air interface. This means that all cladding

modes extend to the interface and may radiate out or couple into another fiber, achieving complete multimode expulsion.

The MMF is a coreless fiber with a refractive index equal to or higher than that of the DCF's outer cladding. This way, the coupler can efficiently extract the multimode signal and fully benefit from the complete multimode expulsion. At the same time, it leaves the core signal (in the fundamental mode) quasi-unperturbed, achieving adiabatic single mode capture. The third design concept, the double asymmetry, is implemented by fusing the two fibers in one of the TS, as seen on Fig. 4.1, which enables efficient extraction of the MM signal. The second transition section being unfused, the signal remains in the MMF. Therefore, the device functions as designed : it transmits the single mode signal in the DCF throughout the coupler and it extracts the multimode signal in the inner cladding of the DCF into a second fiber for detection.

#### 4.3.3 Model for predicting performances

A theoretical prediction of the power transfer in DCFCs was suggested in [91], where the etendue ratio of the two regions guiding the cladding modes of the fibers dictates the multimode signal extraction. Since optical etendue, which can be expressed according to the number of supported modes, is a metric that can only grow in a system, similar to entropy, the coupling process tends to send more power in the fiber with a higher etendue. Therefore, we prefer a combination of fibers that support a very different number of modes. With this specific fiber combination, a theoretical multimode power transfer of 98 % is predicted.

#### 4.3.4 Fabrication and characterization

The fusion-tapering technique is modified to implement a double-asymmetry in the coupler. A first asymmetry is introduced in the transverse cross-sections to enable a high multimode signal extraction. The second asymmetry is introduced in the longitudinal axis of the coupler, as the fibers are fused in the transition section and not symmetrically distributed with respect to the middle of the constant section. The new fabrication technique requires to pre-taper the DCF prior to the fusion step. In order to handle the fragile tapered structure and bring into contact the two fibers of the device, the taper is twisted around the MMF before the fusion step.

A 2 m segment of sDCF is spliced at both ends with single mode fiber (780-HP, Nufern, USA) and then connected to a laser diode and optical spectrum analyzer (OSA, AQ6317, Ando Electric, Japan) to monitor single mode response during fabrication. The DCF is stripped

cleaned of its protective polymer jacket in the middle portion of the DCF over a 30 mm span and cleaned with acetone. The fiber is then fixed mechanically on a custom-made fusion-tapering setup. A micro-torch is used to heat up the fiber to temperatures around 1550 °C and is fuelled with propane and oxygen.

For the tapering part of the process, the micro-torch heats the DCF while traveling steadily over 8 mm. The heating length has been selected to ensure that the adiabaticity criterion is respected for the fundamental mode along the whole structure. The motors pull on the fibers at a speed of 0.1 mm s<sup>-1</sup>. The final size of the structure is determined by the tapering time. The DCF is tapered down until an outside diameter of 20 µm is reached. The single mode transmission is not measurably degraded after tapering, which confirms that the adiabatic single mode capture is achieved.

A fiber segment of coreless fiber is stripped over 60 mm and cleaned. The MMF is then installed on the fusion-tapering setup next to the tapered DCF. Both fibers are placed in close contact mechanically onto blocks and the twist is manually performed. Both fibers are then fused in the TS and CS until they coalesce into a nearly circular cross-section. The micro-torch travels along the fibers to heat the structure over a length of 4 mm to 8 mm. The final single mode transmission spectrum is inspected and low losses are measured. The sDCFC is finally packaged in a stainless tube and sealed at both ends.

Further characterization is performed as described previously [91]. Single mode transmission is characterized from Port 1 to Port 2 and from Port 2 to Port 1. Multimode transmission is characterized from Port 2 to Port 3. The single mode and multimode responses are shown in Fig. 4.3. Multimode characterization is performed over the 600 nm to 800 nm range with a broadband source, a tunable narrow-band filter and a calibrated powermeter. The single mode performance is characterized with a single mode broadband source and an optical spectrum analyzer. Single mode transmission is ≥80 % over the entire spectral band. Multimode transmission is 70 % at 600 nm and reaches 80 % at 800 nm.

#### 4.4 Application to confocal microscopy

In this section, we present results from confocal imaging using the sDCFC. Imaging performances of this coupler were characterized using a standard resolution target as well as freshly excised swine tissues representative of turbid biological samples. Images were also compared to that obtained with a similar setup using single mode fiber coupler.

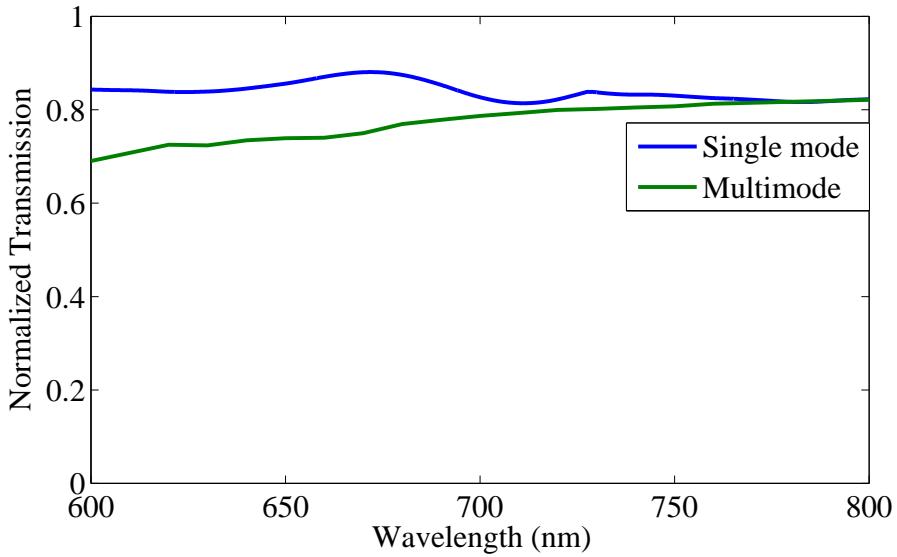


Figure 4.3 Single mode transmission (blue curve) of the sDCFC, measured from Port 1 to Port 2. Multimode extraction (green curve) as measured from Port 2 to Port 3. Ports are defined on Fig. 4.1

#### 4.4.1 Imaging setup

Figure 4.4 shows a schematic diagram of the sDCFC-based laser scanning confocal microscopy setup. A fiber pigtailed laser diode (LP785-SF100, 785 nm, 100 mW, Thorlabs, USA) is spliced to Port 1 of the sDCFC. Light propagates into the core of the DCF and is launched into the imaging system at Port 2 of the sDCFC. Light from Port 2 is collimated (CFC-11-X-B, Thorlabs, USA) and scanned on the sample with dual-axis galvanometer-mounted mirrors (GVSM002, Thorlabs, USA). The beam is expanded ( $3\times$  magnification) with a telecentric telescope and focused on the sample with a microscope objective (LUMFLN 60XW, NA=1, water, Olympus, Japan). Light backscattered by the sample couples partly into the core of the DCF and partly into the inner cladding. The inner cladding of the sDCFC acts as a detection spatial filter, thus removing the need for a pinhole in the setup.

The multimode signal is sent to Port 3 of the sDCFC and is detected with a photodiode (PDA36A, Thorlabs, USA). The unused branch of the coupler (Port 4) is connected to a beam dump to prevent noise coming from back reflections. A single mode power splitter (FC780-50B-APC, 50 :50, Thorlabs, USA) can replace the sDCFC in the setup for fully coherent imaging in reflectance for comparison with the sDCFC.

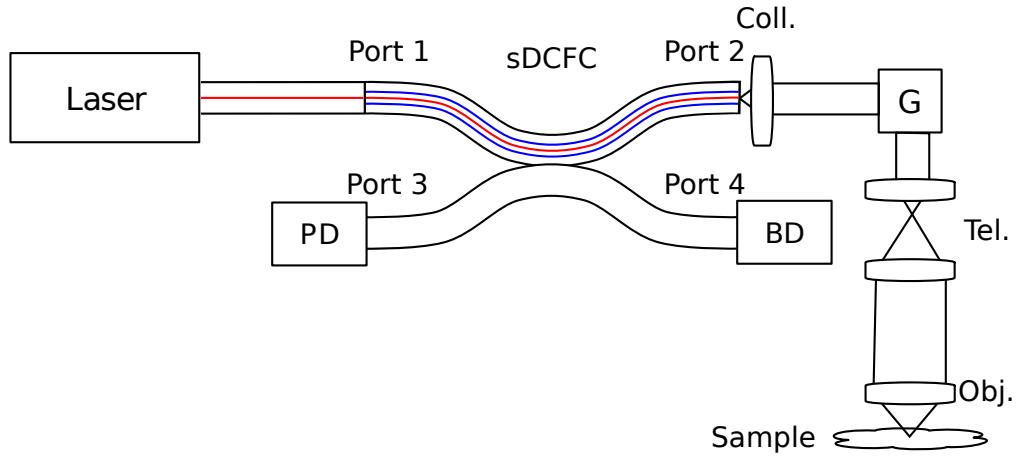


Figure 4.4 Diagram of the laser scanning confocal microscopy setup using the sDCFC. In this setup, the sDCFC inner cladding is used as the spatial filter for confocal detection. Coll : Collimator, PD : Photodetector, BD : Beam dump, G : Galvanometer-mounted mirrors, Tel : Telescope, Obj : Microscope objective.

#### 4.4.2 Results

Imaging performances (resolution, signal intensity, speckle contrast) were characterized in partially coherent detection (PCD) with the sDCFC and in coherent detection (CD) by replacing the sDCFC by a single mode power splitter. Resolutions were measured with a USAF1951 resolution target (Edmund Optics, USA) mounted on a translation stage (M-112.1, Physik Instrumente, Germany). Signal intensity as a function of mirror axial position in CD and PCD channels were recorded. Axial resolution (full-width half-maximum of axial response) in CD and PCD were  $2.0 \mu\text{m}$  and  $4.0 \mu\text{m}$  respectively, compared to theoretical values of  $1.2 \mu\text{m}$  and  $2.6 \mu\text{m}$  respectively.

Lateral resolution was measured with the 10 % to 90 % edge criterion. CD and PCD lateral resolutions of  $0.40 \mu\text{m}$  and  $0.65 \mu\text{m}$  respectively were measured, whereas the theoretical values are  $0.35 \mu\text{m}$  and  $0.49 \mu\text{m}$ . Signal collection and speckle contrast values were measured on a diffusive sample (20 % intralipid solution). The detected PCD signal with the sDCFC was 31 times higher than in the CD configuration with the SM 50 :50 coupler. Following [51], we define speckle contrast as  $C = \sigma/I$ , where  $\sigma$  is the pixel intensity standard deviation of a featureless field of view within an image of intralipid, while  $I$  is the mean pixel intensity within the same field of view. Coherent imaging yielded an almost fully developed speckle pattern with  $C = 0.89 \pm 0.03$  ( $C = 1$  for fully developed speckle pattern) while this value dropped to  $C = 0.23 \pm 0.03$  for the partially coherent channel.

Figure 4.5 compares images of biological tissues acquired sequentially by using a 50 :50

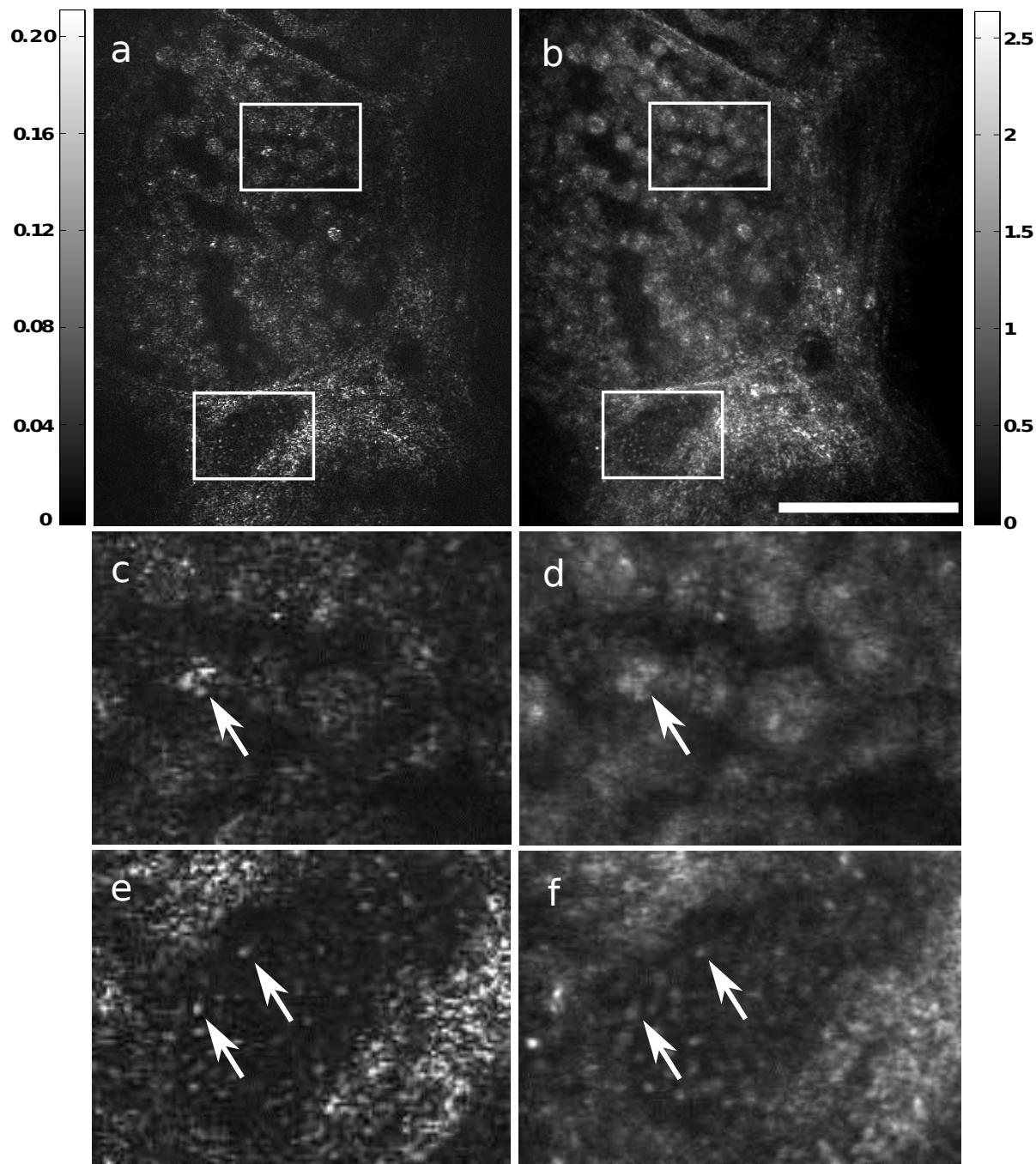


Figure 4.5 Coherent (left column) and partially coherent (right column) detection images of swine thyroid tissue. (c) and (d) respectively show coherent and partially coherent detection magnified views of the top inset taken from (a) and (b). Arrows show a structure whose texture changes with the reduction of speckle contrast. (e) and (f) respectively show magnified views of the bottom inset in (a) and (b). Arrows point to bright spots that are still visible when speckle contrast is decreased. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ . Intensity colorbars are in arbitrary units.

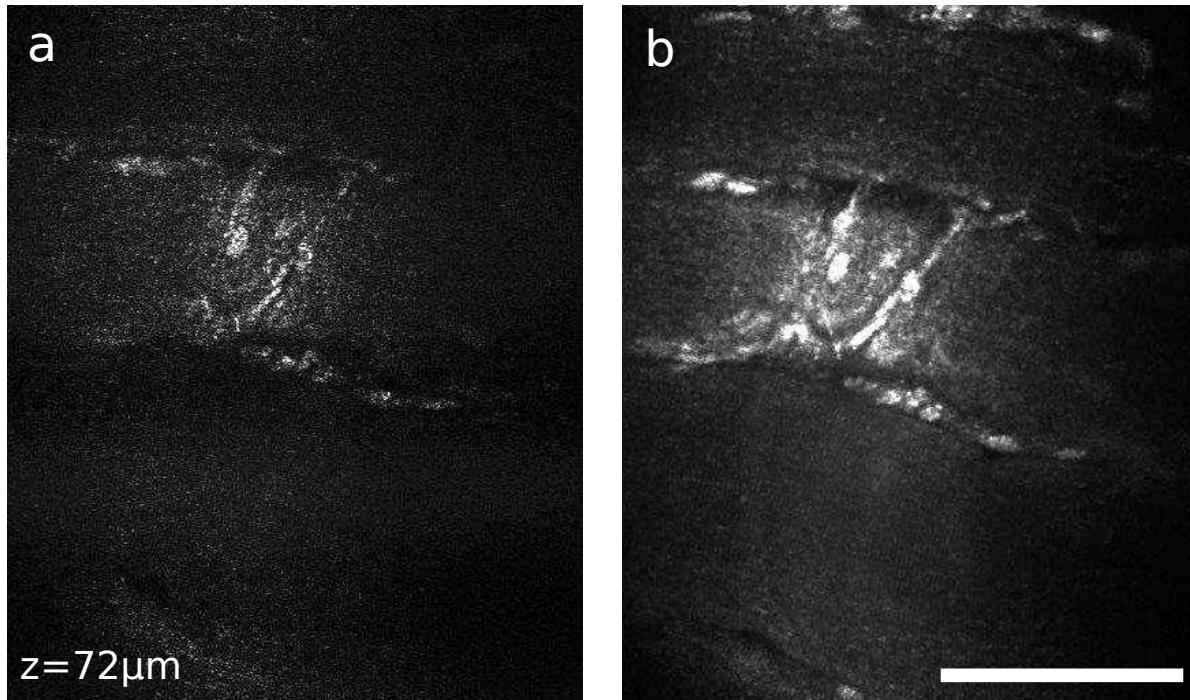


Figure 4.6 Coherent (left column) and partially coherent (right column) detection images of swine muscular tissue taken at  $72\text{ }\mu\text{m}$  deep measured from the tissue surface. A movie shows the confocal images as depth increases from  $15\text{ }\mu\text{m}$  to  $105\text{ }\mu\text{m}$  ([Media 1](#)). Scale bar is  $100\text{ }\mu\text{m}$ .

fiber coupler (left column) and an sDCFC (right column). The sample consists of freshly excised swine thyroid tissue and was imaged at 1 frame/second. Image brightness and contrast were adjusted separately to allow for comparison despite differing intensities. Insets illustrate the effect of speckle reduction in imaging of biological tissue. The top inset (magnified in Fig. 4.5(c) (CD) and 4.5(d) (PCD) respectively) highlights a structure (arrow) which is the product of speckle noise as its texture changes in the PCD image. Structures shown by arrows in the bottom inset (magnified in Fig 4.5(e) (CD) and 4.5(f) (PCD)) are not speckle grains but real cellular features which are still present when speckle contrast is decreased.

To demonstrate the improvement in signal-to-noise ratio when using the sDCFC, swine muscle tissue was imaged at increasing depths. A movie shows the confocal images as depth increases from  $15\text{ }\mu\text{m}$  to  $105\text{ }\mu\text{m}$  ([Media 1](#)). Still frames from the movies are presented in Fig. 4.6, where (a) shows CD and (b) shows PCD images taken at a depth of  $72\text{ }\mu\text{m}$ . Contrast and brightness were adjusted independently for each image to better highlight its content.

#### 4.5 Discussion and conclusion

We demonstrated the first small-ratio double-clad fiber coupler operating at 785 nm dedicated to partially coherent detection. The fabrication of this device is possible due to the combination of three new design concepts : an adiabatic single mode capture, a complete multimode expulsion and a double asymmetry in the coupler's structure. The reported device shows achromatic transmission of the core signal and high multimode signal extraction. Fabrication of this coupler can be further improved, at the mechanical twist and fusion steps. Greater multimode transmission could be obtained with a stronger fusion of the fibers, at the cost of larger single mode losses. Minor spectral features as well as the lower than expected transmission can be explained by the presence of residual stress in the fibers.

Further development should help us bridge the gap between theoretical predictions and our experimental results. The addition of three design concepts makes the coupler design scalable to different wavelength ranges with appropriate double-clad fibers. Coherent illumination combined with both efficient single mode and multimode detections is possible, paving the way for more applications.

Image improvements observed on freshly excised swine thyroid tissues include increased signal-to-noise ratio and reduced speckle contrast. The obtained speckle contrast of 0.23 is similar to results previously obtained by [52, 125] and significantly better than that provided by the single-mode scheme at 0.89. The optimal inner cladding diameter to MFD ratio also resulted in a two-fold penalty in resolution, from 2.0  $\mu\text{m}$  to 4.0  $\mu\text{m}$ . This penalty is modest and still allows for discrimination of very fine features such as muscle striation (Fig. 4.6). In [Media 1](#), we further notice slower degradation of signal to background ratio in PCD as depth increases. This exemplifies the usefulness of this coupler for imaging of turbid tissues. Advantages in signal intensity and speckle contrast reduction coming from having a larger inner cladding are however rapidly lost when increasing from a small ratio (5) to a larger ratio (10). Multiply scattered background and out of focus light contributions dramatically reduce contrast and signal to noise ratio when imaging a scattering sample such as biological tissue.

The sDCFC was used at 785 nm in reflectance, but can be used at other wavelengths ranging from 610 nm to 1000 nm in reflectance and/or combined with fluorescence confocal microscopy. It can also be integrated into an endoscope for confocal endomicroscopy by coupling the imaging branch of the coupler to a miniaturized scanning mechanism such as a piezoelectric scanner [126], a micro-electro-mechanical-system [55], or using spectral encoding [58, 121] through a double-clad fiber rotating joint [127]. A DCF-based endomicroscope would benefit

from ease of alignment, improved stability over time and reduced preparation time between imaging sessions [128]. Another unique feature is the ability to separate both coherent and partially coherent signals, paving the way for applications combining speckle and phase detection to high throughput partially coherent detection.

A double-clad fiber with a small-ratio used in combination with a sDCFC offers an efficient and robust way to improve image quality. It also allows for auto-alignment of the illumination and detection channels by the structure of the fiber. This coupler was demonstrated in confocal microscopy setups as a more stable, robust and environment insensitive alternative to traditional free-space beamsplitter or dichroic mirror assemblies. While fiber bundles and two fibers [129] approaches have distinct advantages, the DCF approach yields a small footprint and can be used in both reflectance and fluorescence. This sDCFC paves the way towards more efficient confocal microscopy and endomicroscopy for clinical applications. Additional results and discussion are presented in Appendix B.

## **Acknowledgments**

The authors would like to gratefully acknowledge Dr. Amber M. Beckley for fruitful discussions. The authors also thank Pr. Younes Messaddeq and his team (COPL, Université Laval, Quebec City, Canada) for drawing the custom fibers. Mrs. Madore, Mr. De Montigny and Mr. Ouellette are Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) scholars. This work was supported by an NSERC Idea to Innovation grant.

## CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : TRI-MODAL MICROSCOPE FOR HEAD AND NECK TISSUE IDENTIFICATION

### Auteurs

Etienne De Montigny, Nadir Goulamhoussen, Wendy-Julie Madore, Mathias Strupler, Olguta Ecaterina Gologan, Tareck Ayad, Caroline Boudoux

J'ai travaillé sur le design et l'assemblage du laser à double-bande, ainsi que sur le design, l'assemblage et la caractérisation du microscope multimodal. J'ai aussi développé le logiciel pour l'acquisition simultanée sur les trois canaux, le traitement des données OCT, l'affichage des images et l'enregistrement des données. J'ai obtenu et imaginé les échantillons et assisté dans leur identification. J'ai rédigé et révisé l'article. Nadir Goulamhoussen a participé au design, à l'assemblage et à la caractérisation du laser à double bande. Il a aussi travaillé sur l'assemblage et la caractérisation du microscope multimodal. Wendy-Julie Madore a assisté dans l'obtention des échantillons et leur imagerie subséquente, ainsi qu'à la rédaction et la révision de l'article. Mathias Strupler a contribué au design du laser à double-bande et a fabriqué la lentille utilisée dans ce montage. Olguta Gologan a identifié les échantillons porcins par histologie. Tareck Ayad et Caroline Boudoux ont contribué à la conception du projet et à la révision de l'article.

### 5.1 Abstract

A novel tri-modal microscope combining optical coherence tomography (OCT), spectrally encoded confocal microscopy (SECM) and fluorescence imaging is presented. This system aims at providing a tool for rapid identification of head and neck tissues during thyroid surgery. The development of a dual-wavelength polygon-based swept laser allows for synchronized, co-registered and simultaneous imaging with all three modalities. Further ameliorations towards miniaturization include a custom lens for optimal compromise between orthogonal imaging geometries as well as a double-clad fiber coupler for increased throughput. Image quality and co-registration is demonstrated on freshly excised swine head and neck tissue samples to illustrate the complementarity of the techniques for identifying signature cellular and structural features.

## 5.2 Introduction

Intraoperative tissue identification is standard practice in head and neck surgeries, especially during total or partial removal of the thyroid gland, a procedure called thyroidectomy. Thyroid is one of the largest endocrine gland of the human body. Located in the neck below the thyroid cartilage, it is typically covered by a thin fibrous capsule, to which are often attached the small-sized (3-4 mm in diameter) parathyroid glands. These glands regulate calcium concentration in the body and are typically located at each corner of the thyroid gland, with left-right symmetry, although their precise location and number (4 on average) varies from one individual to another [4]. Partial or total thyroidectomy is the recommended choice of treatment for most of the malignant or suspicious thyroid diseases and for some benign cases [9, 8]. While thyroidectomy is considered a safe surgery, complications may arise. Inadvertent removal of or damage to the parathyroid is the most common complication, with iatrogenic removal ranging from 9% to 21% of cases [17]. Inadvertent damage is harder to quantify, but studies relate transient or permanent hypocalcaemia to damage to, and/or removal of, parathyroid glands. From retrospective studies, persistent hypocalcaemia has been observed in 0.5% to 4% [130] of patients undergoing total thyroidectomy, while transient hypocalcaemia is more common, with numbers ranging from 5.4% to 20% [130]. Severe postoperative hypocalcemia translates into a prolonged hospitalization and heavier economic burden. All these studies suggest careful dissection and examination of the thyroid capsule and gland in order to identify and preserve parathyroid glands during the operative procedure. Unfortunately in some cases, parathyroid glands can be embedded within the thyroid, increasing the risk of inadvertent removal during total thyroidectomy. A significant number of these could be prevented with a dedicated tool for examination of the thyroid capsule and surrounding tissues intra-operatively [16]. Intraoperative tissue identification is typically performed by frozen section biopsy [29]. This procedure allows rapid histological examination of fresh samples to be performed under a microscope. It is faster than conventional paraffin-embedded histopathology, which usually takes up to one day. It is performed on a biopsy sample frozen in liquid nitrogen before being cut in  $\approx 5\text{ }\mu\text{m}$  slices and stained for examination by a pathologist with a wide-field microscope. This procedure takes up to 20 min, but is less reliable than conventional histopathology [31]. Additionally, since a frozen section relies on imaging a very small sample of a larger gland, sampling errors can lead to false negative diagnoses. Multiple frozen section biopsies may also be required to obtain a satisfying diagnosis or identification. While frozen section is more sparsely used for thyroidectomy, a significant amount of time and money could be saved with a dedicated tool capable of rapidly identifying tissues with great accuracy. If these procedures were replaced with minimally invasive optical techniques

that do not require tissue slicing, results could be obtained *in vivo* and in real time. We herein investigate techniques for rapid intra-operative tissue identification using a combination of optical imaging modalities allowing for the visualization of microscopic features in real time and minimally invasively, but without the burden associated with the sampling-based time-consuming frozen section examination. While frozen section relies on microscopic inspection of the tissue of interest, optical imaging modalities may provide similar information, without tissue resection or degradation. Candidates for real-time tissue identification include reflectance confocal microscopy (RCM) [48], optical coherence tomography (OCT) [65, 131] and fluorescence imaging [132, 42]. Identification of parathyroid glands requires distinguishing its key histological features from that of neighboring glands and tissues including : thyroid, lymph node, adipose and connective tissues. Table 1 summarizes these three imaging modalities and how accurately relevant neck tissue samples can be identified qualitatively. The + and – signs indicate how adequate a modality is at identifying key features of a particular tissue type and at differentiating it from others. Certain requirements need to be met for an instrument to be clinically relevant. One of the main requirements is to image sufficiently fast to avoid motion artifacts. Size can also be a constraint, thus small footprint scanning mechanisms are favorable. When possible, changing a distal scanning mechanism in a proximal scanning mechanism can also improve the odds of success in a clinical setting.

RCM [133] provides en-face images at cellular resolution using optical sectioning. Typical lateral resolution is on the order of 1  $\mu\text{m}$ , with a depth resolution of a few microns ( $\approx 5 \mu\text{m}$ ). The field of view is approximately hundreds of microns wide with a penetration depth of up to 300  $\mu\text{m}$  [48] depending on tissue and wavelength. To ease its use in a clinical setting, we opted for a spectrally encoded implementation of RCM, named spectrally encoded confocal microscopy (SECM) [57]. In this implementation the fast scanning mechanism is replaced with a wavelength swept laser and a grating, removing one distal mechanical scanning mechanism. On the other hand, OCT provides cross-sectional images, with a lateral resolution of about 20  $\mu\text{m}$  and a depth resolution of approximately 10  $\mu\text{m}$ . The field of view is larger, typically a few millimeters, with a penetration depth of 1 mm to 3 mm depending of tissue. Its fast imaging speed allows for comprehensive volumetric imaging. OCT can also be performed with a light source based on a wavelength-swept laser [70]. The combination of OCT and RCM has already been demonstrated on gastro-intestinal (sequential acquisition) [125] and skin burn lesion assessment (simultaneous acquisition) [134]. Recently, autofluorescence of some neck structures has been observed near 800 nm, with excitation at 785 nm and with higher signal for parathyroid with an emission peaking at 820 nm [45]. Thyroids appear to be barely autofluorescent, while other tissues are not at all, thus potentially providing additional specificity. While RCM can provide images with resolutions on the same scale as frozen

| Organ Modality                 | RCM       | OCT        | Fluorescence |
|--------------------------------|-----------|------------|--------------|
| Thyroid                        |           |            | + [45, 47]   |
| - follicles                    | +/- a[64] | + [77, 75] |              |
| Parathyroid                    |           |            | ++ [45, 47]  |
| - cellular parenchyma          | + [63]    | - [77]     |              |
| - adipocytes (scarce)b         | + [63]    | +          |              |
| Lymph node                     |           |            | - [45]       |
| - cellular parenchyma          | + [61]    | -          |              |
| - adipocytes (scarce)b         | +         | +          |              |
| Adipose tissue                 |           |            | - [45]       |
| - adipocytes (ubiquitous) [61] | +         |            |              |
| Capsule                        |           |            | -            |
| - fibers                       | +         | +          |              |
| - adipocytes (scarce)          | +         | +          |              |

Tableau 5.1 Imaging modalities applied to neck tissue identification

section histology, it lacks penetration depth to see through the thyroid capsule. It also has a small field of view, leading to sampling errors when imaging heterogeneous areas. OCT, on the other hand, has a greater penetration depth, an intrinsic cross-sectional point of view, but lacks the higher resolution of microscopy techniques or the specificity of molecular contrast. Fluorescence offers a different contrast mechanism that can be implemented in a wide-field imaging system, or a in a point measurement system. This contrast can potentially be more specific and in a smaller footprint instrument. In this article, we demonstrate a tri-modal imaging system based on a dedicated wavelength-swept laser optimized for simultaneous OCT, SECM and spectrally encoded fluorescence imaging (SEFI). Demonstration of this imaging system was performed quantitatively on standard resolution targets, and qualitatively on ex vivo samples of head and neck tissues.

### 5.3 Methodology

In this section we describe the tri-modal microscope. We first present the dual-band wavelength-swept laser for simultaneous OCT and SECM at 1300 nm and 780 nm, respectively. We then present the benchtop tri-modal microscope, as a combination of three imaging sub-systems : OCT, SECM and SEFI. All three sub-systems are merged through the same objective lens to allow for co-registration. We finally present three improvements to the benchtop implementation that facilitates clinical translation and handheld probe development.

### 5.3.1 Dual-band wavelength-swept laser

Figure 5.1 shows a schematic of the dual-band wavelength-swept laser and the corresponding output spectra. It consists of two polygon-based wavelength-swept filters [70] coupled to two laser cavities. Two facets of the same rotating polygon scanner are used to provide synchronized wavelength scanning, with wavelength bands specifically chosen for this application. A similar source was previously reported by [135] albeit at different wavelengths and using different cavity configurations. The first laser is made of a ring-fiber cavity and consists of a booster optical amplifier (BOA, Covega, BOA-4892) with gain centered at 1300 nm and 70 nm  $-3$  dB bandwidth. A 60/40 fiber optic coupler is used for the laser output, extracting 40 % of intra-cavity light. An optical circulator is used to send light to the rapid wavelength tunable filter. A second BOA (Covega, BOA-6170) (not shown) is used to increase source stability and to reach a maximum output power of 33 mW. Instantaneous coherence length is approximately 6 mm, measured as the full-width half maximum of the autocorrelation. The second laser cavity at 780 nm was previously published in [101]. It consists of a Sacher LaserTechnik 780 nm external-cavity laser diode, with a  $-3$  dB bandwidth of 30 nm. The diode cavity was modified to allow wavelength dispersion by a diffraction grating and selection by the polygon scanner. Maximum output power is 110 mW, but due to beam ellipticity, a maximum of 35 mW was coupled into a single mode fiber to reach the imaging system.

Synchronized wavelength sweep is achieved by using the same polygon scanner for both wavelength bands. Each laser cavity has a separate optical fiber output. With careful alignment, the delay between both scans can be adjusted to have both scans start at the same time. This also eliminates the need for doubling the acquisition trigger setup. Figure 1 b and c show spectra of the 1310 nm and the 780 nm, respectively. Figure 1d shows the linear scale output of each laser (red and blue lines, respectively) with the trigger signal (green) as a function of time. Polygon rotating speed was chosen to provide 12,000 spectra per second. Speed can be increased to over 30,000 spectra per second where faster imaging speed is required. Curves were offset and amplitude-adjusted for visibility purposes.

### 5.3.2 Benchtop multimodal optical microscope

Fig. 5.2 shows a schematic diagram of the co-registered tri-modality microscope exploiting the dual-band wavelength-swept laser. The two different wavelengths take different paths and are combined near the objective lens for simultaneous imaging. Light from the 780 nm laser is used for confocal microscopy to provide high resolution from a shorter wavelength and to excite near-infrared fluorescence. The 1310 nm band is used for OCT to benefit from increased penetration depth. The blue path represents 780 nm light used for SECM imaging

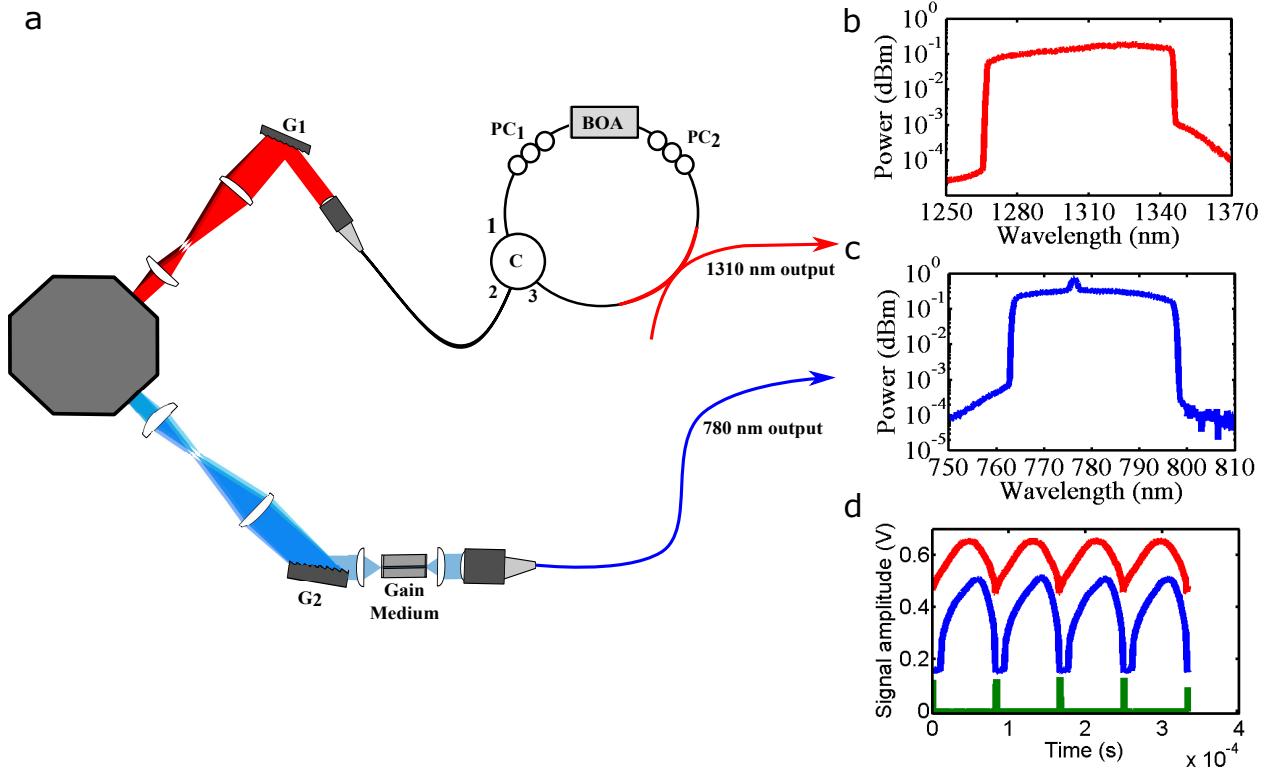


Figure 5.1 Schematic diagram of the dual-band wavelength-swept laser. A detailed diagram of the dual-band laser (a) shows the 1310 nm OCT laser in red and the 780 nm laser for SECM in blue. Output spectra are shown at 1300 nm (b) and 780 nm (c). (d) 780 nm (blue) and 1300 nm (red) laser and trigger (green) signals as a function of time.

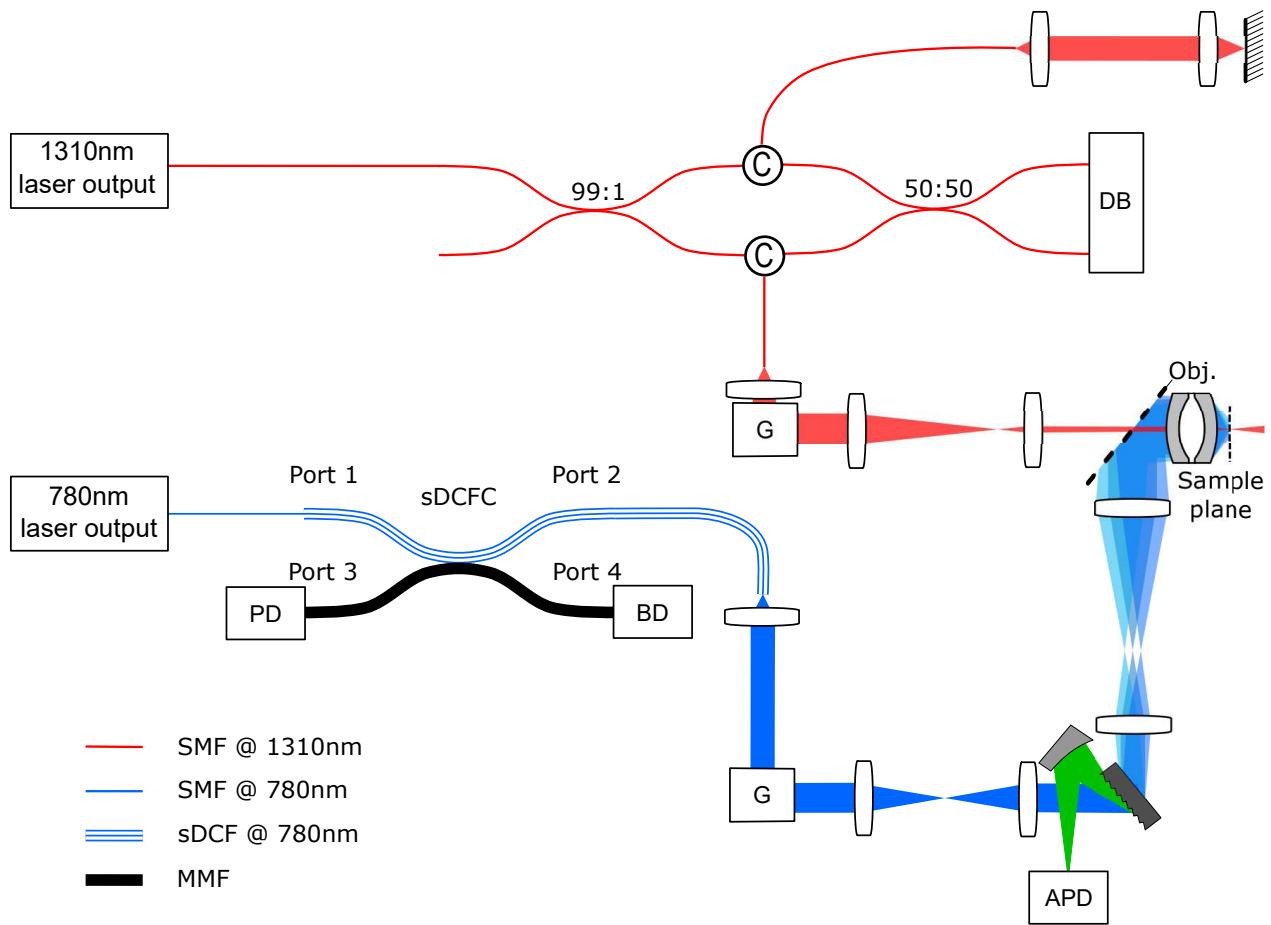


Figure 5.2 Schematic diagram of the tri-modal imaging microscope. The OCT path (1300 nm) is shown in red, the SECM path (800 nm) is shown in blue and the fluorescence detection path is shown in green. C : Circulator, G : Galvanometer-mounted mirror, DB : Dual-balanced detector, Obj. : Objective lens, PD : Photodiode, BD : Beam dump, sDCFC : small inner cladding double-clad fiber coupler, APD : Avalanche photodiode, SMF : single mode fiber, MMF : multimode fiber

and fluorescence. Light from the 780 nm laser output is connected to a small-ratio double-clad fiber coupler [136] allowing for single-mode illumination and multi-mode detection. The imaging fiber output is then connected to the collimator of the SECM imaging arm. Slow axis scanning is performed with a galvanometer-mounted mirror while a transmission diffraction grating (1800 lines/mm, Wasatch Photonics) combined with the wavelength sweep of the source serves as fast axis scanning. Telecentric telescopes are used to magnify the beam and relay the scanning to the objective lens. A dichroic mirror (LWP-45-RU780-TU1250-PW-1025-C, CVI Melles-Griot) is used to reflect the SECM laser beam towards the objective lens. Fluorescence at 800 nm can be detected on the setup with minor modification of the SECM arm based on previous work [101]. The fluorescent light passes through the diffraction grating and is deviated at a greater angle due to the Stokes shift. This light is collected by an off-axis parabolic mirror and focused on a silicon avalanche photodiode (APD110A, Thorlabs) by an achromatic doublet. Two long-pass filters (ET810LP, Chroma) were used to reject ambient and laser light.

Light from the 1310 nm band is represented in red in Fig. 2. The laser beam is sent through a 90/10 coupler (not shown) to trigger acquisition for both wavelengths. The trigger consists of a fixed wavelength filter formed by a diffraction grating (GR13-1210, Thorlabs) and a mirror. The remaining 90 % of the laser is split again in two arms of the interferometer. 1 % of the signal is sent to the reference arm, as the 99 % remaining is going through the OCT imaging arm. The imaging arm consists of 5 mm focal length collimator (Thorlabs), a galvanometer mounted mirror and a telecentric telescope. The dichroic mirror transmits a large wavelength band centered at 1310 nm. An optical circulator is used in both arms to connect the input coupler to the interference coupler (50/50). A dual-balanced detector (PDB420C, Thorlabs) detects the resulting interference signal. Signal acquisition and processing was performed on custom C++ software controlling a high-speed DAQ board (ATS9440, AlazarTech). OCT signal is interpolated to be linear in wavenumber ( $k$ ) [137]. The source spectrum is then divided and a Hanning window is applied to reduce spectral leakage. Fast Fourier Transform (FFT) is finally applied to obtain the depth reflectivity profile. Images are displayed in real-time at more than 10 frames per second (fps).

### 5.3.3 Towards a hand-held device

Technological improvements were developed towards translating this tri-modality system towards the operating room. The first is spectral encoding as the fast axis scanning mechanism for the confocal imaging sub-system. Spectrally encoded confocal microscopy [57] was shown to allow rapid imaging [58] of large FOVs [138], while being miniaturizable for endoscopic

use [121]. This paper presents the first swept-source implementation of SECM at 800 nm to allow for simultaneous reflectance and fluorescence based imaging. The second improvement is the incorporation of a small inner-cladding double-clad fiber coupler (sDCFC) for higher collection efficiency and reduced speckle noise for the confocal sub-system. The sDCFC is an all-fiber device made of a small inner-cladding double-clad fiber (sDCF) and a highly multimode fiber. The fabrication and characterization of such device, as well as the proof-of-principle for optical sectioning are presented in [136]. This coupler transmits light injected into the single-mode core quasi-losslessly to the imaging port of the coupler. Light backscattered from the sample is coupled to the small inner cladding, which behaves as the traditional detection pinhole. Light traveling in the inner cladding is extracted from the double clad fiber and transferred to the highly multimode fiber to get to the confocal detector. Such coupler allows for a significant increase in signal detected and a substantial decrease in speckle contrast. From a clinical point of view, this coupler replaces a beam splitter, adding mechanical stability and ease of alignment. These advantages lead to ease of use and reduced downtime between imaging sessions, which are valuable in a clinical setting. The third improvement is a custom made and designed objective lens for efficient combination of OCT and confocal microscopy. A custom objective lens is a key component in this system as the combination of the requirements for OCT imaging and confocal imaging are very different. A Hasting's triplet was especially designed for confocal operation in the 780 nm range and OCT operation centered at 1310 nm. The final lens is 8 mm in diameter with a focal length of 10 mm and allows for a field of view of 500  $\mu\text{m}$  for the confocal sub-system and a numerical aperture of 0.3 as well as field of view of 2.5 mm for the OCT sub-system and a numerical aperture of 0.05. The design and characterization of this lens will be detailed in a future article.

## 5.4 Results

### 5.4.1 Characterization of the tri-modality imaging system

In this section, we present the imaging performances of the tri-modal system. The field-of-view, lateral resolution and axial resolution are described for the OCT and confocal modalities. Characterization of the reflectance performance of the system (SECM and OCT) was performed on a USAF 1951 resolution target. The 10 % to 90 % edge response criterion is used to measure lateral resolution. En-face imaging is obtained in OCT by scanning the resolution target with a translating stage. Axial resolution is measured in SECM by axially scanning a mirror and taking the full width at half maximum (FWHM) of the resulting intensity profile. Axial resolution in OCT was measured on a custom-made phantom and uses the FWHM

criteria. Table 5.2 presents the resolution values based on the images presented in Fig. 3. Co-registration was measured and adjusted using the corner of a square mirror. Translation of the mirror allowed for field of view measurements in both modalities. Theoretical values are presented for comparison.

Fig. 5.3 a and b show a USAF1951 resolution target in SECM and OCT, respectively. A 3D volume was acquired in OCT by scanning the sample with a translation stage. Image distortion can be observed in the SECM image. Fig. 5.3c shows an overlay of the confocal (gray) and fluorescence (green) images of three sewing threads where two have been dipped in fluorescent solutions of 6.5  $\mu\text{M}$  and 65  $\mu\text{M}$  respectively. One can notice the lack of optical sectioning in fluorescence imaging resulting in a seemingly imperfect registration between the confocal and fluorescence images. Figure 5.3d-e show a SECM image (d) and an OCT image (e) of a finger pad of a volunteer. Colored lines represent the location of the perpendicular field of view of the complementary modality. A sweat duct (arrows) can be seen in both images, showing co-registration.

#### 5.4.2 Ex vivo tissue imaging

This section presents results from ex vivo imaging performed on freshly excised swine neck tissue samples. Co-registered images are presented for different tissue types : thyroid, adipose, lymph node and parathyroid. A video recording of a typical imaging session is presented to show the ease of use of the system for ex vivo imaging. In addition, this video was recorded using a heterogeneous sample to simulate real per-operative conditions. Figure 4 shows four different samples imaged with the tri-modality system. These ex vivo samples were taken in a swine model during necropsy where tissues were identified by an experienced veterinarian. Parathyroid localization procedure was based on [139]. The left and right columns of Fig. 5.4 show SECM images (a, c, e, g) and center column the co-registered and simultaneously acquired OCT images (b, d, f, h). Thyroid tissue can be seen in (a) and (b), adipose tissue in (c) and (d), lymph node in (e) and (f), and parathyroid gland tissue in (g) and (h). The curly

| Specifications | SECM                          | OCT    | Fluo     |
|----------------|-------------------------------|--------|----------|
| x-resolution   | 2.6[1.3](spectral)            | 10[10] | 5[4]     |
| y-resolution   | 2.8[1.3](slow)                | 10[10] | 5[4]     |
| z-resolution   | 16.8[11.5]                    | 20[18] | -        |
| Field of view  | 600 (spectral) by 1000 (slow) | 2820   | 450[500] |
| Imaging depth  | 80                            | 2000   | -        |

Tableau 5.2 Theoretical and experimental resolution values for the tri-modal imaging system

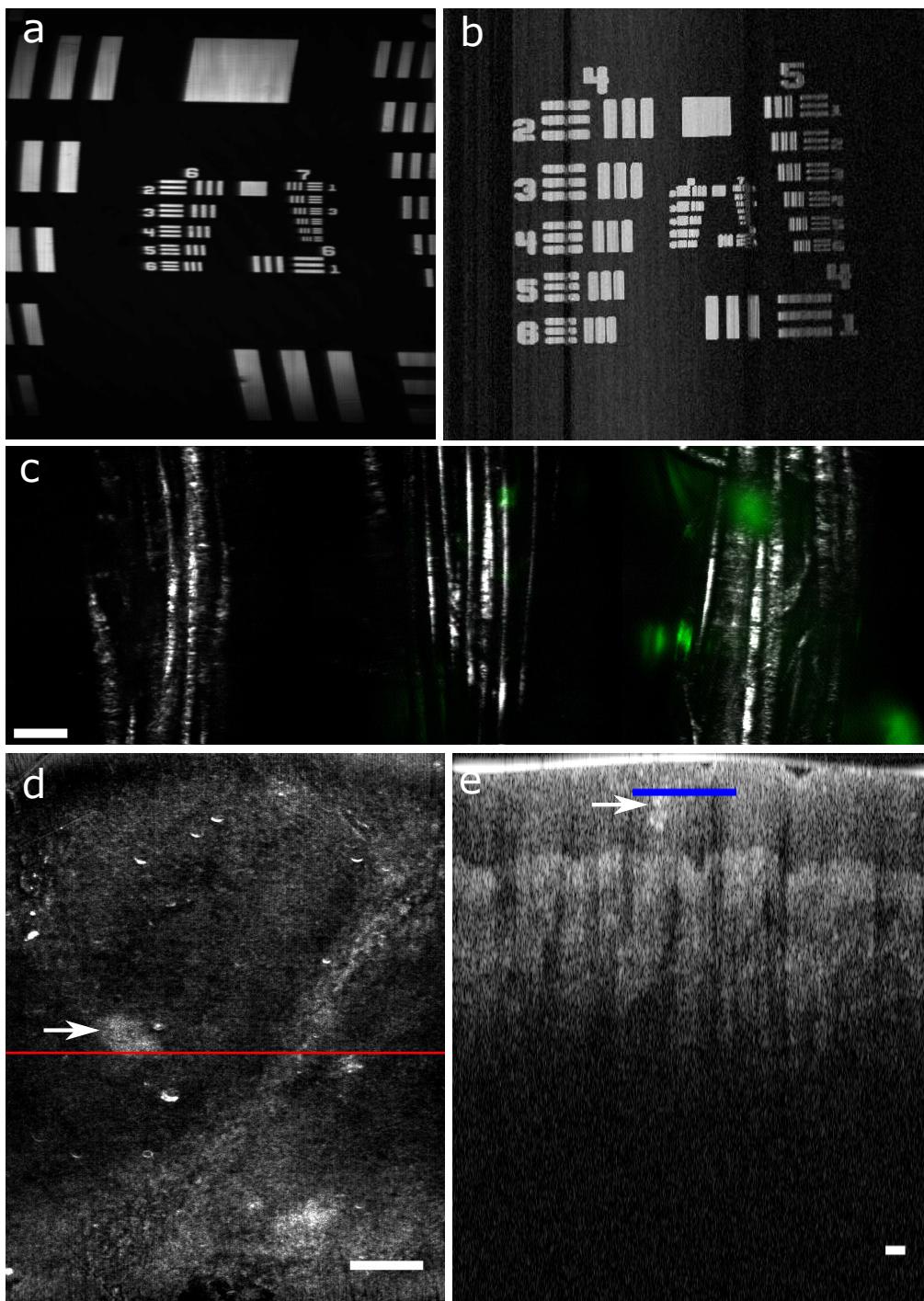


Figure 5.3 SECM (a) and OCT (b) images of a USAF 1951 resolution target. Co-registered images (c) of SECM (grey) and fluorescence (green) of three sewing threads dipped in Alexa-Fluor 790 at different concentrations : (from left to right) 0  $\mu\text{M}$ , 6.5  $\mu\text{M}$  and 65  $\mu\text{M}$  fluorophore concentration. Scale bar is 50  $\mu\text{m}$ . Co-registered *in vivo* SECM (d) and OCT (e) images of a human finger. Features such as a sweat duct (arrow) can be observed in both images. The red line in (d) represents the projection of the OCT image plane in the confocal image. The blue line in (e) represents the projection of the confocal image in the OCT plane. Arrows show a sweat duct. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .

bracket in Fig. 5.4 represents the lateral position of the SECM image relatively to the OCT image. Arrows point at the corresponding depth where the SECM images are taken on the OCT images. Tissue identification was confirmed post-imaging with frozen section histology by a pathologist.

Some of the key features of each tissue type as highlighted by Table 1 can be observed on the results of Fig. 5.4. In Figure 5.4a-b, for both SECM and OCT images, thyroid follicles can be seen as oval, hypoechoic, empty-looking structures, surrounded by a bright epithelial lining in a honeycomb-like pattern. Figure 5.4c shows bright, round, solid lobules of adipocytes, fairly uniform in size and distribution in a mosaic pattern. OCT does not have a sufficient lateral resolution to resolve individual adipocytes and presents a more uniform signal with small brighter areas. This tissue type is very scattering and OCT signal is attenuated faster than other tissue types. Since fat has a higher index of refraction, intense light reflection is received from this tissue type, both in SECM and OCT. Lymph nodes consist of uniformly backscattering tissue in a diffuse pattern and the occasional adipose tissue inclusion as seen in SECM (Fig. 5.4e). This uniform signal is due to the structure of the lymph node, consisting of tightly packed lymphocytes. This uniform signal is also seen in OCT, with less attenuation than adipose tissue. Parathyroid gland tissue is composed of glandular cells in clusters and fat cells, the proportion of fat increasing with age. While glandular cell clusters cannot be clearly distinguished in SECM (Fig. 5.4g), regions rich in stromal fat can be seen, represented by bright round structures. In Figure 5.4h, the heterogeneous texture of the parathyroid is a mixture of irregular size and shape areas of tissue resembling adipose tissue and interspersed areas (especially the right section of the image) with a different, more diffuse attenuation profile. Again, in human tissue, the parathyroid adipose contents will vary with age, body weight, pathological conditions (such as renal failure), etc.

An example of a very heterogeneous sample is presented in Fig. 5.5 where a fibrous/fatty capsule is located above the thyroid tissue. In this case, the confocal imaging sub-system cannot image deep enough to display the thyroid tissue underneath the capsule, but the OCT sub-system shows the representative structure of thyroid follicles. This video demonstrates the ease of use of the imaging system, as the user places the sample directly into contact with the objective lens for real time simultaneous and co-registered imaging. Aspect ratios of images were modified to better fit in the video. Video frame rate was slowed down to 7 fps, from 10 fps, to better assess the visible structures in the sample. No fluorescence signal was detected while scanning several thyroid and parathyroid glands. We further attempted to record fluorescence using a four fiber optic probe [140] with a spectrometer (Maya 2000 Pro, Ocean Optics, USA) and a 100 mW, 785 nm laser diode. The same filters from the setup were used for laser-light rejection. The protocol used was similar to what is reported in [45]

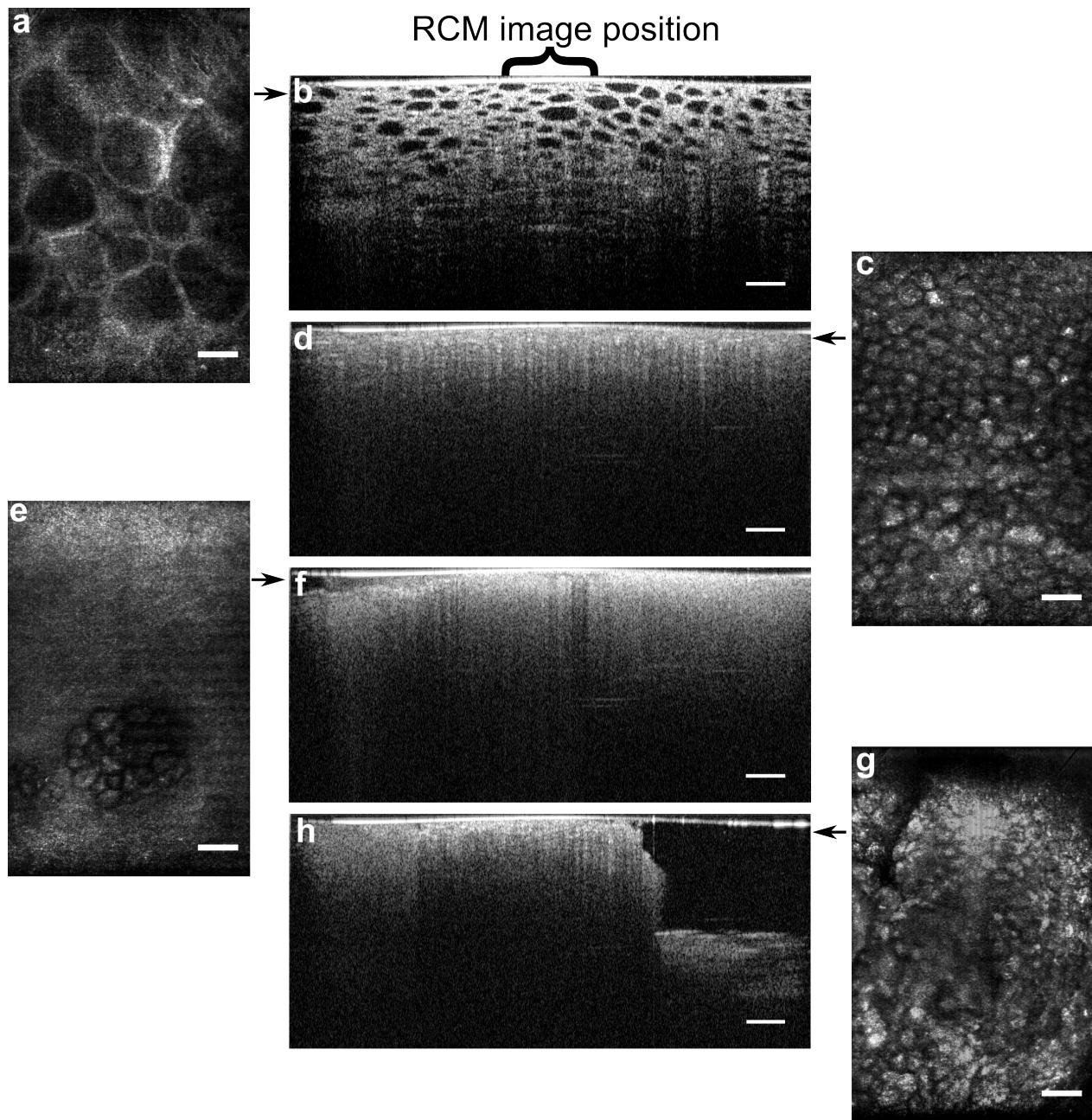


Figure 5.4 Images of different ex vivo neck tissue samples. The left and right columns show the SECM image and the center column shows the co-registered OCT image. The position of the SECM image in the OCT image is shown with the curly bracket ({} ) and black arrows. (a) and (b) show thyroid tissue, (c) and (d) show thyroid tissue, (e) lymph node (f) lymph node and adipose lobules, (g) parathyroid gland, cellular area, (h) parathyroid gland with heterogeneous aspect. OCT scale bars are 200  $\mu\text{m}$ , SECM scale bars are 100  $\mu\text{m}$ .

albeit on ex vivo swine tissue. No signal was measured with this probe either.

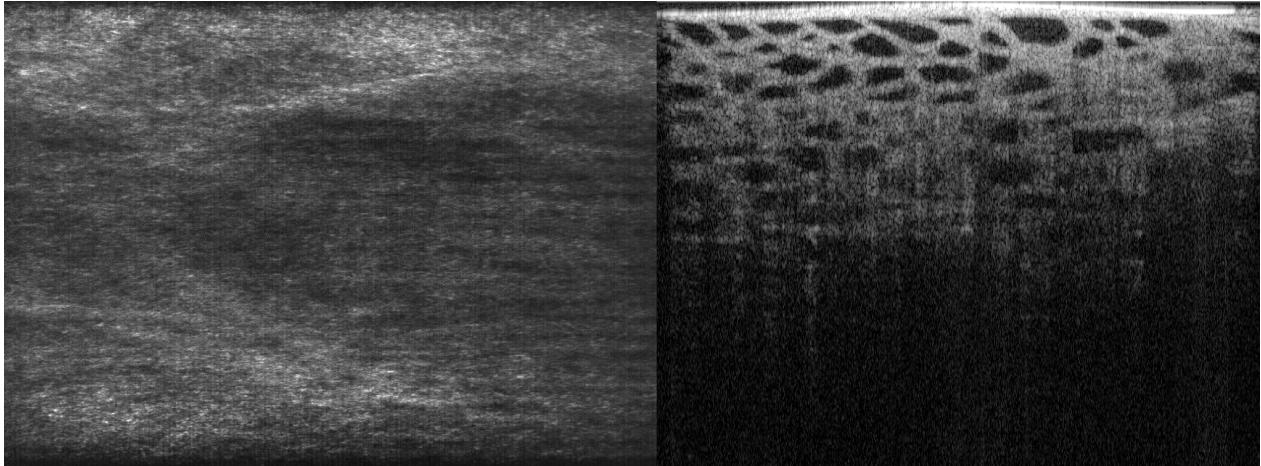


Figure 5.5 Still frame from the video recording of an ex vivo thyroid tissue sample covered by a fibrous capsule. On the left is presented the SECM image and on the right the co-registered OCT image.

## 5.5 Discussion

In this paper, we investigate a novel technique for rapid intra-operative identification of tissue. Frozen section histology provides high contrast and high resolution of a thin slice of the sample, at the cost of tissue fixation, slicing and staining prior to analysis. The surgeon obtains the identification of the tissue tens of minutes later. Our approach allows for rapid identification of fresh tissue intra-operatively. While contrast, resolution or penetration depth may not be as high, images show clear distinction between the four tissue types to enable fast recognition. Feedback can be given to the surgeon within a few minutes. In some cases, additional frozen sections may still be required to ascertain the result given by the optical probe or allow the screening of structures deeper than a few millimeters, but the probe could shorten the procedure in many cases. Distinguishing healthy and pathological specimens requires additional research beyond the scope of this paper. The reported tri-modality imaging system combines SECM for microscopic scale real-time tissue assessment, OCT for in-depth morphological tissue identification and fluorescence imaging for a molecular and specific identification of parathyroid. The combination of these three imaging modalities allows for multi-scale optical imaging using orthogonal field of views. The complementarity of the three techniques is relevant for functional and morphological contrast. This synergistic combination is well suited for head and neck tissue identification, as some tissue may look

similar under the same imaging modality. For example, adipose tissue, lymph node and parathyroid gland may look qualitatively similar in OCT (Fig. 5.4 d, f and h), but images in RCM (Fig. 5.4 c, e and g) show distinctive features for each tissue type. RCM (or SECM) does present some difficulties for use in ex vivo or in vivo imaging, mostly due to the limited penetration depth. In our setup, penetration depth is fixed by the imaging window, facilitating the positioning of the sample at the focal plane of the objective lens. This may result in incorrect tissue identification with tissue sample covered by adipose tissue or a connective tissue capsule, as can be seen in Fig. 5. However, the combination with OCT allows for observation of tissue heterogeneities and the determination that the image in RCM is not a representative sample of the tissue. The dual-band wavelength-swept laser offers adequate power (over 30 mW at each output) at a scanning rate of 12 kHz, which can be increased up to 30 kHz. The limit in scanning speed is dictated by the settings of the polygon. However, vibrations and increased air flow cause instability in the laser output signal at speeds of 30 kHz (50 000 rpm). Recent articles have shown schemes for increasing the laser scanning rate without increasing the polygon rotation speed [36]. Even if only half of the 6 mm coherence length of the 1310 nm laser can be used in our OCT implementation, it should not limit the penetration depth in our application where sample attenuation is the main limiting factor. If required, several techniques could be implemented to remove depth degeneracy [141–143] and thus use all the coherence length. Imaging with an sDCFC in SECM presents several advantages : increased signal intensity, reduced speckle contrast and auto-alignment. This comes at the cost of a factor of 2 in axial resolution due to the larger effective pinhole. In the context of imaging biological samples, the benefits outweigh the limitations, as was previously shown [136, 52]. A greater numerical aperture could be used to obtain the desired lateral and axial resolutions if the need for better resolution arises. Image distortion can be observed in the SECM images, most notably on the resolution target image presented in Fig.3a. This distortion is due to the interaction between the diffraction grating and the galvanometer scan. Using conical diffraction formalism [144], it is possible to show that the diffracted beam direction not only depends on the beam wavelength but also on the galvanometer scan angle. Because this is fixed, and not dependent of the objective lens, it could be corrected using post-processing. Discrepancies between theoretical and experimental values for axial and lateral resolutions can be explained by a slight under-filling of the objective lens pupil. While SEFI provides an interesting, more functional contrast in regard to the morphological information collected with SECM and OCT, some limitations must be mentioned. This imaging scheme provides a non-uniform illumination along the spectral axis, in addition to the non-uniform response of the fluorophores to different excitation wavelengths. This leads to images that are difficult to interpret and quantitatively analyze. However, in

the context of parathyroid identification, the aim here is to detect parathyroid glands which would exhibit a much larger signal than surrounding tissues. SEFI images could be interpreted in this context as a binary map of fluorescence presence. Human parathyroid glands are also typically larger than the field of view in SECM and SEFI, therefore non-uniform illumination would be a minor issue. We are still investigating on the lack of autofluorescence signal from our ex vivo swine tissue samples. The molecule responsible for autofluorescence is still unknown, and since reported measurements have been performed on human patients, in vivo, it is possible that ex vivo swine samples do not exhibit, or exhibit a much weaker, fluorescence signal. We are moving our setup to a hospital to acquire images from freshly excised human tissues. We are also working on miniaturizing the setup into a handheld probe for in vivo measurements on human patients. Imaging performances of a clinically compatible tri-modality system were demonstrated, leveraging from three technological improvements. A dedicated dual-color wavelength-swept laser allows combining OCT, SECM and fluorescence detection for rapid, synchronized, co-registered imaging. The DCFC with a small inner cladding specially designed for confocal applications at 780 nm paves the ways towards clinical applications since it allows for higher signal collection, reduction of speckle contrast and increased mechanical stability. Auto-alignment of the confocal pinholes decrease down-time due to alignment. Additionally, the contact window of the custom objective lens permits tissue placement, which is furthermore facilitated by the co-registered OCT cross-sectional imaging. With a mostly fiber-based setup coupled to a contact objective lens, this imaging scheme is a step closer to a hand-held probe for rapid intra-operative tissue identification. This is made easier with only one slow scanning mechanism necessary for both modalities. The dual-band laser can be packaged on a medical cart for easy transportation. This system coupled to an imaging probe will allow *in situ* neck tissue imaging.

## 5.6 Conclusion

We demonstrated a tri-modal imaging system based on a dedicated wavelength-swept laser optimized for simultaneous OCT, SECM and spectrally encoded fluorescence imaging. This system is designed for head and neck tissue identification and can be translated from bench top microscope to a handheld probe. Such probe could be used *in vivo* within the surgical field for live and real-time tissue assessment. This could translate into shorter operative times and less postoperative complications. Future work includes ex vivo tissue identification and development of a hand-held probe for *in vivo* experiments during thyroidectomies or similar procedures.

## Acknowledgements

Authors would like to gratefully acknowledge Prof. Frédéric Leblond and his team for the fluorescence probe and help with fluorescence data processing, Fouzi Benboujja for fruitful discussions, and Hélène Héon and Maryse Boulay for help with the swine tissue excision. This work was supported by an NSERC grant.

## Comment

Parmi les modalités étudiées, la microscopie confocale ressort comme celle présentant le plus de détails permettant l'identification des tissus. Toutefois, comme la plupart des tissus rencontrés dans le cadre des chirurgies de la thyroïde sont recouverts d'une capsule fibreuse ou adipeuse, la faible profondeur de pénétration peut compliquer l'identification des tissus sans devoir les altérer en retirant la capsule. En regardant attentivement les résultats obtenus, nous avons extrait des caractéristiques qui permettent de distinguer les tissus imagés avec la tomographie par cohérence optique, qui permet généralement de voir les tissus sous la capsule. Il est par contre difficile d'établir à cette étape des critères distinctifs, car des différences significatives entre les tissus porcins et les tissus humains ont été remarqués à l'histologie. Il était aussi difficile d'obtenir suffisamment d'échantillons de chaque type de tissu, particulièrement les glandes parathyroïdes, car même accompagné de vétérinaires expérimentés, il était très difficile d'identifier les glandes parathyroïdes. Considérant ces facteurs, il a été déterminé que le meilleur choix pour la suite du projet serait d'utiliser la tomographie par cohérence optique pour imager des tissus humains, pour valider si cette modalité permet d'atteindre l'objectif de distinguer les tissus thyroïdien, parathyroïdien, adipeux et ganglionnaire.

## CHAPITRE 6 IMAGERIE EX VIVO DE TISSUS HUMAINS

### 6.1 Introduction

Un système d'imagerie de table multimodal a été fabriqué, amélioré avec un coupleur à double gaine et une lentille adaptée dans le chapitre précédent. L'imagerie de tissus porcins a montré que la combinaison de microscopie confocale et d'OCT permet de distinguer les différents tissus rencontrés en chirurgie de la thyroïde : thyroïde, tissu adipeux, parathyroïde et ganglion. Nous avons toutefois noté des différences significatives entre les tissus porcins et humains au niveau histologique. La différence majeure réside dans la proportion de tissu adipeux à l'intérieur des parathyroïdes et des ganglions porcins, significativement moins élevée en comparaison avec les tissus humains. De plus, comme l'application finale est d'identifier les tissus humains de manière per-opératoire, il est impératif de déplacer le système d'imagerie pour avoir accès à des échantillons humains frais. À partir des résultats du précédent chapitre, nous avons pu noter que la MCR souffre de limitations importantes, spécialement en terme de profondeur de pénétration ( $<300\text{ }\mu\text{m}$ ). Cette limitation pourrait diminuer sa pertinence en situation opératoire, car les tissus peuvent être recouverts de gras ou par une couche fibreuse d'épaisseur variable (100  $\mu\text{m}$  à 1 mm). La dissection chirurgicale permet d'exposer les tissus à un certain degré, mais certains tissus fibro-conjonctifs ou conjonctifs demeurent intacts. Prenons par exemple le cas de la capsule de la thyroïde : la retirer entraînerait des saignements importants et dévierait des procédures chirurgicales prescrites. Les pertes sanguines ainsi générées compliqueraient l'intervention chirurgicale, en plus de rendre l'imagerie plus difficile. Il est également à noter que durant le cours opératoire, il n'est pas possible de couper les échantillons, comme il a été fait dans d'autres études [76, 63, 61]. Pour cette première phase clinique, nous avons donc choisi délibérément de diminuer la complexité du système d'imagerie en prenant un système OCT et un système de fluorescence distinct. Les mesures de fluorescence sur les parathyroïdes de porc n'ont pas donné de résultats concluants. Nous souhaitons donc estimer l'ordre de grandeur du signal pour déterminer la sensibilité requise. Cette information n'est toutefois pas disponible dans la littérature.

L'objectif de cette étude est de déterminer si l'OCT comme modalité morphologique a un contraste suffisant pour distinguer les tissus ou si l'ajout d'une modalité moléculaire comme l'autofluorescence est nécessaire. À cet effet, les hypothèses à vérifier dans cette étude sont donc : 1) est-ce que l'OCT est une modalité d'imagerie qui permet de différencier les quatre types de tissus humains rencontrés en chirurgie de la thyroïde ? et 2) est-ce que le signal d'autofluorescence des parathyroïdes comme modalité moléculaire est mesurable ? Si oui,

quelle est la valeur ajoutée à l'OCT ?

Afin de valider ces hypothèses, j'ai mené une étude en collaboration avec le département d'otorhinolaryngologie (ORL) du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), dirigée par le Dr. Tareck Ayad. Ce chapitre couvre cette étude où nous avons pris des mesures OCT et en fluorescence sur des échantillons *ex vivo* obtenus durant des chirurgies de la thyroïde, de la parathyroïde et des dissections cervicales dans des cas de cancer de la thyroïde. Ce projet a été approuvé par les comités d'éthique de Polytechnique et du CHUM, ainsi que par le comité scientifique du CHUM.

## 6.2 Méthodologie

Cette section couvre le système d'imagerie utilisé, le protocole pour obtenir les échantillons, le protocole d'imagerie et de correspondance avec l'histologie.

### 6.2.1 Système d'imagerie

#### Système OCT

Le système d'imagerie utilisé pour les expériences réalisées au CHUM est un système d'OCT commercial (OCS1310V1, Thorlabs, É-U). La source utilisée par ce système est un laser à balayage basé sur un MEMS et un VCSEL (Vertical Cavity Side-Emitting Laser). Ce laser a une vitesse de balayage de 100 kHz, ce qui permet une grande vitesse d'imagerie. La courte longueur de cavité de ce laser et la finesse du filtre MEMS permet une émission fine spectralement ce qui donne une grande longueur de cohérence instantanée. La profondeur d'imagerie maximale avec ce système est de 12 mm<sup>1</sup>. La source est centrée à 1320 nm et a une largeur de bande de 100 nm, pour une résolution axiale spécifiée de 16 µm dans l'air. La puissance de la source est d'environ 30 mW, avec une puissance à l'échantillon d'environ 9 mW. La résolution latérale spécifiée par le fabricant est de 25 µm, lorsque la lentille objectif fournie est utilisée. Nous avons modifié le système pour utiliser un bras de référence externe pour l'interféromètre afin d'avoir une plus grande plage d'ajustement sur la position du zéro de l'interféromètre.

Tout le système d'imagerie est installé sur un chariot pour être facilement déplacé dans le bloc opératoire jusqu'à la salle d'opération (2466T19, McMaster Carr, É-U). Des roues en caoutchouc limitent la sensibilité du système aux vibrations. Les roues d'origine du chariot

---

1. La profondeur d'imagerie est limitée par le système d'acquisition des signaux. La profondeur de pénétration dans le tissu peut être inférieure selon les propriétés optiques du milieu sondé.

ont été remplacées pour installer quatre roues rotatives pour améliorer la maniabilité du chariot. L'ordinateur d'acquisition est équipé d'une carte d'acquisition rapide (ATS9350, Alazar Technologies, Canada) et d'une carte de sortie (National Instruments, Canada) pour contrôler les galvanomètres de la tête d'imagerie. Le logiciel ThorImage 4.2 est utilisé pour l'acquisition. Un disque *Solid State Drive* (SSD) a été installé pour augmenter la vitesse d'écriture sur le disque et réduire le temps entre les acquisitions. Des scripts Matlab développés par l'auteur sont utilisés pour traiter les données brutes, les normaliser et les exporter sous forme d'images.

La figure 6.1 présente le chariot et le système d'imagerie installés en salle d'opération.



Figure 6.1 Chariot et système d'imagerie en salle d'opération. Le chariot est amené en salle d'opération après que le patient ait été endormi.

## Système de fluorescence

Un second système a été élaboré pour mesurer l'autofluorescence de la thyroïde et de la parathyroïde sur des échantillons humains. Ce système a aussi été disposé sur le chariot du système OCT. Un schéma du montage est présenté à la figure 6.2(a). Il consiste en une diode laser à 785 nm de 100 mW (SF100-785, Thorlabs, É-U) comme source d'excitation de la fluorescence. Cette source est reliée à une sonde en fibre optique que j'ai conçue et fabriquée pour illuminer l'échantillon et collecter efficacement la fluorescence. La fibre de détection est connectée à un module de filtrage, qui lui est connecté à un spectromètre (Maya-2000-Pro,

Ocean Optics, É-U) sensible de 600 nm à 1000 nm. Le module de filtrage est détaillé à la figure 6.2(b). La lumière est collimée par un premier collimateur SMA, est filtrée par deux filtres de haute qualité (ET810LP, Chroma, É-U), puis recouplée à la fibre optique connectée au spectromètre (P200-1-UV-VIS, Ocean Optics, États-Unis). Les composants sont alignés passivement à l'aide d'un tube fileté d'un pouce de diamètre interne.

La sonde en fibre optique est illustrée à la figure 6.2(b) et (c). Elle consiste en deux fibres sans coeur de 250 µm ( $NA = 0.5$ ) disposées côte à côté dans un tube de verre. Les fibres sont d'abord dégainées sur une courte distance et clivées. Elles sont insérées dans un premier tube de 600 µm de diamètre interne puis collées avec une colle curable à l'UV biocompatible. Un second tube de 2 mm est ensuite utilisé pour assurer la rigidité de l'assemblage et protéger les fibres optiques. De la colle curable à l'UV est appliquée aux deux extrémités pour maintenir l'intégrité structurelle. Une gaine d'hytrel de 900 µm est ajoutée pour protéger les fibres. Des connecteurs temporaires sont installés pour connecter la sonde au montage.

### **6.2.2 Protocole d'imagerie et de recherche**

Un protocole de recherche a été soumis et approuvé par les comités scientifique et d'éthique du CHUM (15.045) et le comité d'éthique de Polytechnique (CÉR-14/15-26).

Les patients pressentis pour l'étude ont été sélectionnés parce qu'ils étaient programmés pour une chirurgie de la thyroïde, de la parathyroïde ou un évidement cervical pour retirer des métastases d'un cancer de la thyroïde. Les critères d'inclusion sont : 1) adultes pouvant fournir un consentement éclairé et 2) être admissible à une chirurgie mentionnée ci-dessus. Les mineurs et les majeurs inaptes sont donc exclus de ce protocole de recherche. Un formulaire d'information et de consentement est donné au patient et l'équipe responsable d'obtenir le consentement (un membre de l'équipe chirurgicale et moi-même) a répondu à ses questions. Le protocole de recherche ne modifie pas la procédure chirurgicale prévue pour le patient.

Lors de la chirurgie, le système d'imagerie est transporté dans la salle d'opération. Lorsque le chirurgien retire des spécimens dédiés à l'analyse extemporanée ou à l'analyse définitive par fixation, ces spécimens sont d'abord imités avec le système OCT. Le spécimen est placé sur un piqué pour éviter de contaminer le système et l'échantillon. Deux volumes de 10 mm par 10 mm par 5 mm sont pris par zone identifiée pour l'imagerie. Certains spécimens sont imités sur plusieurs zones, selon la condition du tissu et les recommandations de l'équipe médicale et de recherche, basé sur l'objectif d'obtenir des résultats représentant au mieux ce qui peut être rencontré dans une situation d'utilisation *in situ* d'imagerie OCT. Selon ce même objectif, l'intégrité des échantillons est préservée jusqu'à la remise en pot pour la pathologie. Tel que montré à la figure 6.3, les zones imitées sur les échantillons de thyroïde sont marquées avec des

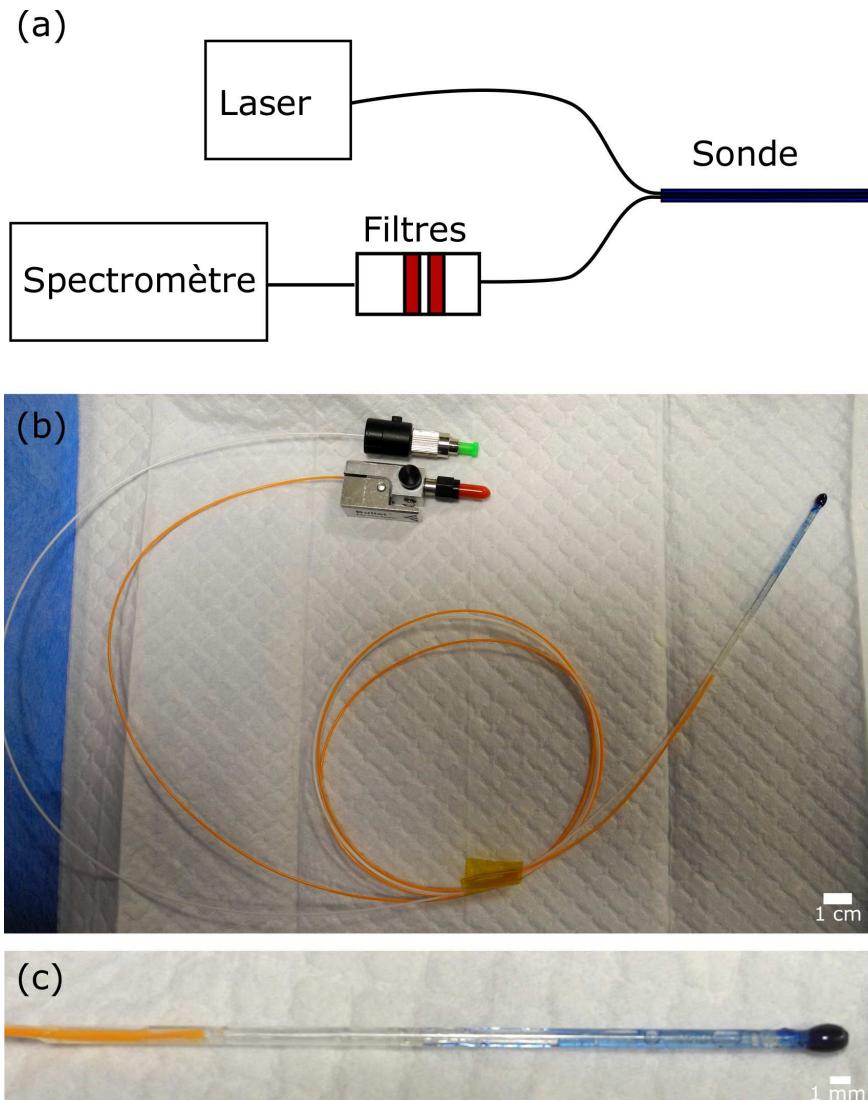


Figure 6.2 Instrumentation pour les mesures de l'autofluorescence de la parathyroïde. (a) Schéma du montage de mesure de l'autofluorescence. La diode laser est connectée à la sonde pour l'illumination. La fibre de détection de la sonde est connectée à un tube contenant deux filtres passe-longs à 810 nm. Le signal est ensuite envoyé sur le spectromètre. (b) Photographie de la sonde où on peut voir les connecteurs temporaires en haut à gauche et la sonde à droite dont le bout apparaît en bleu, qui est la couleur de la colle époxy une fois durcie. La fibre blanche sert pour l'illumination et la fibre orange est pour la détection. (c) agrandissement du bout de la sonde. Le bout bombé a été poli pour optimiser la transmission et protéger les fibres.

sutures pour permettre à l'équipe de pathologie de prendre des lames histologiques aux même sites que l'imagerie OCT. La marque avec des sutures est une méthode déjà employée pour identifier le spécimen principal lors de chirurgies de la thyroïde pour identifier la latéralité dans les cas de thyroïdectomie totale. Les autres échantillons n'étaient pas marqués avec des sutures pour éviter de détériorer les tissus ; ils étaient toutefois plus petits que le champ de vue utilisé ce qui permettait d'inclure la totalité de l'échantillon dans le volume acquis. Le temps nécessaire à l'imagerie de chaque échantillon a été noté. Les histologies ont été prises sur tous les échantillons, selon le protocole normal de l'hôpital. Dans le cas où des sutures étaient réalisées, des histologies ont été prises dans la région marquée par la suture. La correspondance a été faite en comparant les histologies disponibles avec le volume OCT de l'échantillon correspondant.

Au début de chaque chirurgie, le montage est apporté dans la salle d'opération. Il est testé pour s'assurer que le laser fonctionne bien et fournit la bonne puissance. Le bras de référence est vérifié et la qualité des images est validée qualitativement en imageant le doigt de l'utilisateur. Les critères de résolution et de profondeur de pénétration sont estimés à partir de ces images, permettant de vérifier que le système est en bon état de fonctionner.

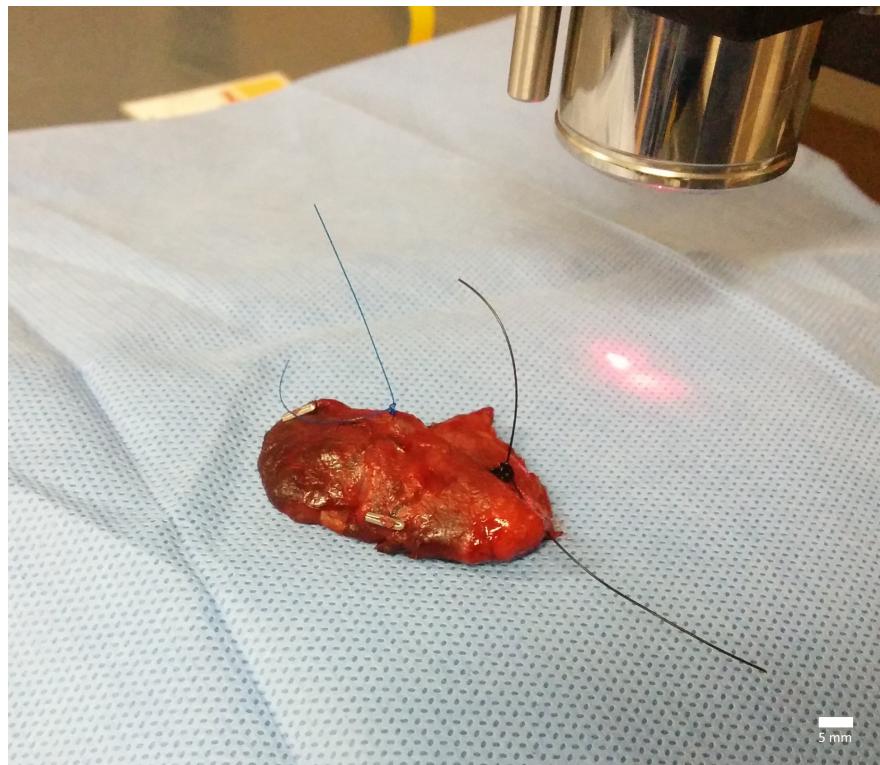


Figure 6.3 Hémi-thyroïde marquée avec des fils bleus et noirs pour identifier les zones imagées. L'hémi-thyroïde fait environ 4 cm par 2 cm.

Des mesures de fluorescence ont aussi été prises dans certains cas où le temps le permettait. Après les mesures en OCT, la sonde en fibre optique est délicatement placée en contact avec le tissu. Des spectres sont acquis à plusieurs endroits sur l'échantillon avec des temps d'intégration de 1 s. Des mesures ont été prises sur des parathyroïdes, un adénome parathyroïdien, des thyroïdes, du gras et des ganglions, de même que les mesures de référence requises.

### 6.2.3 Analyse qualitative et quantitative

Les images obtenues avec le système OCT sont d'abord comparées avec l'histopathologie, qui offre la référence pour le diagnostic. Les lames histologiques sont observées en deux temps : à différents niveaux de grossissement pour bien comprendre l'état du tissu et au grossissement 5X pour corrélérer avec les images OCT. Cela permet de comparer l'information fournie par l'histologie propre à chaque type d'échantillon avec celle fournie par l'OCT. L'analyse qualitative établi les textures et les patrons observables en histologie leur manifestation dans le signal OCT.

Une analyse quantitative permet d'extraire des valeurs numériques pour obtenir des critères objectifs de différenciation des tissus. En se basant sur les critères qualitatifs utilisés pour distinguer les images, certaines métriques quantitatives ont été calculées. Les descripteurs de Haralick comptent 14 caractéristiques quantitatives [145]. Une pré-sélection de quatre caractéristiques a été effectuée pour choisir celles présentant les plus grands écarts entre les classes à distinguer. Les valeurs calculées sur des régions d'intérêt ont été données en entrée à un algorithme de classification. Chaque région d'intérêt de 69 par 100 pixels a été sélectionnée sur une base manuelle parmi les images issues des volumes OCT. Une validation croisée réalisée sur la méthode de classification permet d'extraire des valeurs de précision, de sensibilité et de spécificité. Ces valeurs sont par la suite utilisées pour déterminer la performance des métriques. L'algorithme de classification employé s'appelle *Boosted Trees(BT)*. Cette méthode de classification construit un arbre binaire visant à guider le choix de la classe correspondant à l'échantillon donné en entrée. Il s'agit d'une méthode supervisée ; les classes associées aux données d'entraînement sont fournies en entrée avec les métriques déterminées plus tôt. L'implémentation utilisée est celle fournie par Matlab.

Une seconde approche basée sur des réseaux de neurones convolutifs (*Convolutional Neural Network*)(CNN) est employée à titre comparatif. Ce type de réseau comporte une ou plusieurs couches de convolution, ou volume de sortie, et un réseau entièrement connecté. Chaque donnée d'un ensemble local est reliée à un neurone de la couche de convolution. La totalité des ensembles locaux échantillonne toutes les entrées. La poids des connexions est ajusté pour associer au mieux la classe de sortie correspondant à chaque entrée. Les ré-

seaux neuronaux conventionnels connectent chaque entrée à chaque neurone. La particularité des réseaux convolutifs réside dans un nombre limité de connexions entre les entrées et les neurones de la couche cachée, ciblant chaque sous-échantillon de l'image. Ceci permet de traiter l'information contenue dans l'image de façon locale, puis de façon globale en reconnectant les résultats locaux. Cette méthode fait aussi partie des méthodes supervisées et l'implémentation de Matlab a été utilisée.

Le tableau 6.1 montre les résultats possibles dans le cas d'un test binaire. VP indique un vrai positif : la classe de sortie correspond à celle attendue. FN est le faux négatif, c'est-à-dire que la classe de sortie ne correspond pas à la classe attendue en particulier. De même, FP est le faux positif et VN est le vrai négatif. La sensibilité est définie comme la probabilité de détecter une tissu parmi tous les cas de même nature (selon la pathologie) et est calculée par :  $\frac{VP}{VP+FN}$ . La spécificité est définie comme la probabilité de ne pas classer un tissus d'une autre classe dans une classe en particulier et est déterminée par :  $\frac{VN}{VN+FP}$ . Dans les cas à trois classes ou plus, comme ce que nous avons étudié, la définition doit être élargie pour en tenir compte. Ces définitions peuvent être adaptées au cas d'une matrice  $3 \times 3$ . Un exemple de matrice de confusion est présenté au tableau 6.2. La première colonne indique les «vraies» classes et la première rangée présente les résultats de la classification. Dans le cas de la classe 2, l'élément b indique les éléments appartenant réellement à la classe 2 qui ont été bien classés. La valeurs a et c indiquent des éléments de la classe 2 classés dans une autre classe. Ils permettent de calculer la sensibilité avec  $\frac{b}{a+b+c}$ . Les éléments d et e indiquent des éléments classés dans la classe 2 respectivement estimés comme appartenant aux classes 1 et 3. Ils permettent de calculer la spécificité :  $\frac{b}{d+b+e}$ . La précision totale est définie comme la somme des éléments de la diagonale sur le nombre total d'échantillons.

La méthode de validation pour les deux méthodes de classification est appelée *Leave-One Out*. Elle consiste à itérer sur chaque échantillon en les retirant un à la fois et à réaliser la classification. Cet échantillon retiré est utilisé pour valider en vérifiant s'il est placé dans la bonne classe. Ce processus est répété pour tous les échantillons successivement et la performance globale est ainsi obtenue. Cela permet d'assurer que la classification est indépendante des données fournies à l'entraînement. En effet, si un échantillon est critique pour l'entraînement, l'algorithme ne performera pas bien lorsque cet échantillon sera retiré. En augmentant le nombre d'échantillons disponibles, il sera possible de retirer toutes les images correspondant à un patient pour obtenir un algorithme plus robuste.

Tableau 6.1 Sensibilité et spécificité

|            | Test Positif | Test Négatif |
|------------|--------------|--------------|
| Malade     | VP           | FN           |
| Non-Malade | FP           | VN           |

Tableau 6.2 Matrice de confusion

|   | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|
| 1 |   | d |   |
| 2 | a | b | c |
| 3 |   | e |   |

## 6.3 Résultats

Les résultats présentés dans cette section couvrent trois aspects. D'abord, les résultats d'imagerie OCT sont présentés. Ces résultats incluent chaque type de tissus sous sa forme saine. Deux types de tissus pathologiques sont ensuite présentés : des adénomes parathyroïdiens et des ganglions contenant des métastases de cancer de la thyroïde. L'aspect suivant inclut les mesures d'autofluorescence pour les tissus étudiés. Enfin, le dernier aspect couvre les résultats de l'analyse quantitative et de classification.

### 6.3.1 Résultats OCT

Une cohorte de 30 patients a été recrutée pour l'étude *ex vivo* comprenant 22 femmes et 8 hommes avec une moyenne d'âge de 53.5 ans. Cela représente 163 volumes OCT distincts de  $1024 \times 1024 \times 1200$  voxels. La plupart des volumes ont été acquis deux fois pour éviter des pertes de données. Ces duplicitas ne sont pas comptés comme des volumes distincts. Le temps moyen d'imagerie par échantillon est de 219 s, bien que plusieurs mesures de temps imprécises ont été retirées. En moyenne, les plus petits échantillons (gras, ganglion, parathyroïdes, etc.) nécessitaient moins de temps d'acquisition. Les spécimens de thyroïde prenaient significativement plus de temps dû au nombre plus élevé de zones à imager. En excluant, les échantillons de thyroïde, le temps moyen devient 168 s. Le tableau 6.3 recense le nombre total d'échantillons obtenus selon la condition et le type de tissu.

Ce tableau ne recense que le nombre d'échantillons, non pas le nombre d'acquisitions réalisées lors de chaque séance d'imagerie. L'état du tissu (sain/bénin ou pathologique) a été déterminé par histopathologie à la suite de l'étude. Ce tableau ne présente que le nombre d'échantillons, pas les zones individuellement imagées. Pour chaque chirurgie, la thyroïde

Tableau 6.3 Nombre total de spécimens imagés durant l'étude *ex vivo*, selon la condition et le type de tissu.

|               | Thyroïde | Parathyroïde | Tissu adipeux | Ganglion | Muscle |
|---------------|----------|--------------|---------------|----------|--------|
| Sains/Bénins  | 5        | 8            | 24            | 26       | 2      |
| Pathologiques | 22       | 2            | N/A           | 13       | N/A    |
| Total         | 27       | 10           | 24            | 39       | 2      |

était considérée comme pathologique et les seules thyroïdes considérées comme saines étaient des nodules détachés du spécimen principal. Les adénomes parathyroïdiens ont été classés dans la catégorie parathyroïde pathologique. Les spécimens de parathyroïde classés comme normaux ou hypercellulaires ont été classés comme sains/bénins. Il n'y a pas de forme pathologique pour le tissu adipeux, tous les échantillons sont classés comme sains. Au niveau de la pathologie, les spécimens de ganglions sont classés comme bénins ou positifs, c'est-à-dire contenant des cellules cancéreuses. Les ganglions positifs sont donc classés comme étant pathologiques. Quelques échantillons contenant plusieurs ganglions attachés ensemble n'ont pas été imaginés, étant donné la difficulté à identifier de façon claire et sans abîmer le tissu. Mis à part certains artefacts de repliement mineurs, toutes les données récoltées sont de bonne qualité et sont utilisables pour l'étude. Aucun problème majeur avec le système n'a été rencontré durant l'étude.

## Thyroïde

La thyroïde étant le spécimen principal à retirer, il est rarement nécessaire d'identifier la condition du tissu. Les formes de cancer de la thyroïde ne sont pas toujours apparentes en surface. La taille de la glande et sa position bien connue ne nécessitent donc pas d'instrument particulier pour l'identification. Il est par contre possible de rencontrer des spécimens de petite taille distincts du spécimen principal qui contiennent du tissu thyroïdien. Il peut aussi y avoir des métastases contenant majoritairement du tissu thyroïdien cancéreux. Ce tissu est donc le plus souvent rencontré, dans une ou l'autre de ses formes, et il est donc important de pouvoir le distinguer des tissus environnants.

À la figure 6.4, on observe une image en coupe d'un échantillon de thyroïde. Ce spécimen est un morceau de petite taille distinct du spécimen principal. Les follicules thyroïdiens sont observables à l'inspection de l'image. Leur structure régulière et leur forme ronde indique qu'il s'agit de tissu sain ou bénin. Certaines conditions bénignes de la thyroïde entraînent des changements dans l'architecture des follicules, leur taille et leur organisation. Les figures 6.5(a) et (b) montrent des follicules de forme et de taille variables à l'histologie et à l'OCT.

La thyroïde est un tissu très irrigué en sang et recouvert à plusieurs endroits d'une couche de tissu fibreux, analogue à une capsule. Cela limite souvent la profondeur de pénétration dans le tissu à moins de 1 mm. Il est parfois difficile d'apercevoir la structure cellulaire ou folliculaire du tissu sous la capsule à cause de la diffusion causée par cette dernière ou l'absorption du sang, tel qu'il est possible de l'observer aux sous-figures 6.5(c) et (d).

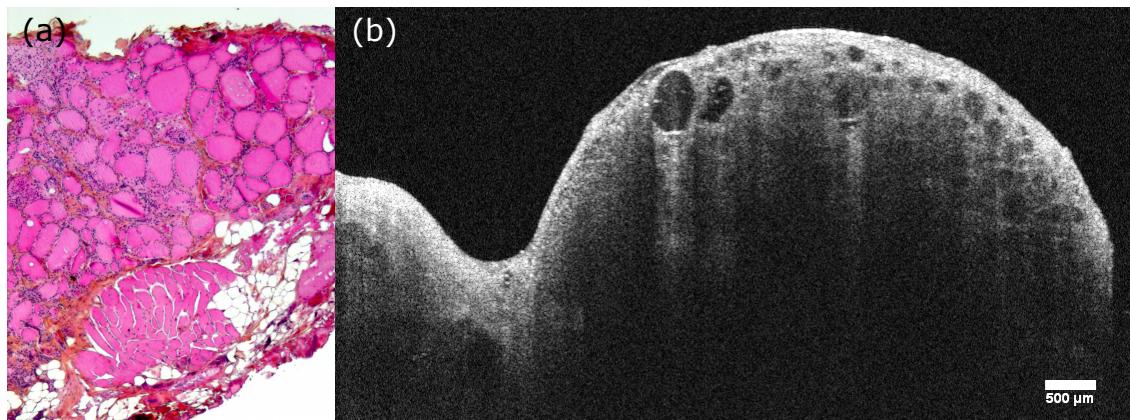


Figure 6.4 Histologie (40x) et image OCT d'un échantillon de thyroïde.

## Tissu adipeux

Le tissu adipeux ou fibro-adipeux est fréquemment rencontré dans les chirurgies de la thyroïde. Il peut recouvrir une partie de la glande thyroïde. Il peut occuper une grande proportion d'un spécimen autrement constitué de tissu ganglionnaire ou être confondu avec une parathyroïde. La couleur jaune du gras est très similaire à la couleur «jaune chamois» de la parathyroïde. Nous avons pu obtenir de nombreux échantillons de tissu adipeux provenant de diverses zones du cou et tous se ressemblent. Le même patron tissulaire est présent, composé de petites régions sombres entourées d'une bordure plus réfléchissante (brillante). Ce patron est observable sur les images OCT de la figure 6.6 (c) et (d). Ces observations sont cohérentes avec l'histologie où on peut observer les frontières des adipocytes avec le gras qui a été dissout durant le procédé de fixation. La taille et l'organisation caractéristiques en nid d'abeille (*honeycomb*) sont constantes d'un échantillon à l'autre.

## Parathyroïde

Les glandes parathyroïdes sont macroscopiquement similaires au gras et aux ganglions. Elles sont normalement composées de "cellules chefs" et de gras du stroma. Cela peut être observé sur les images OCT de tissu parathyroïdien normal présentées à la figure 6.7(c) et (d). Un

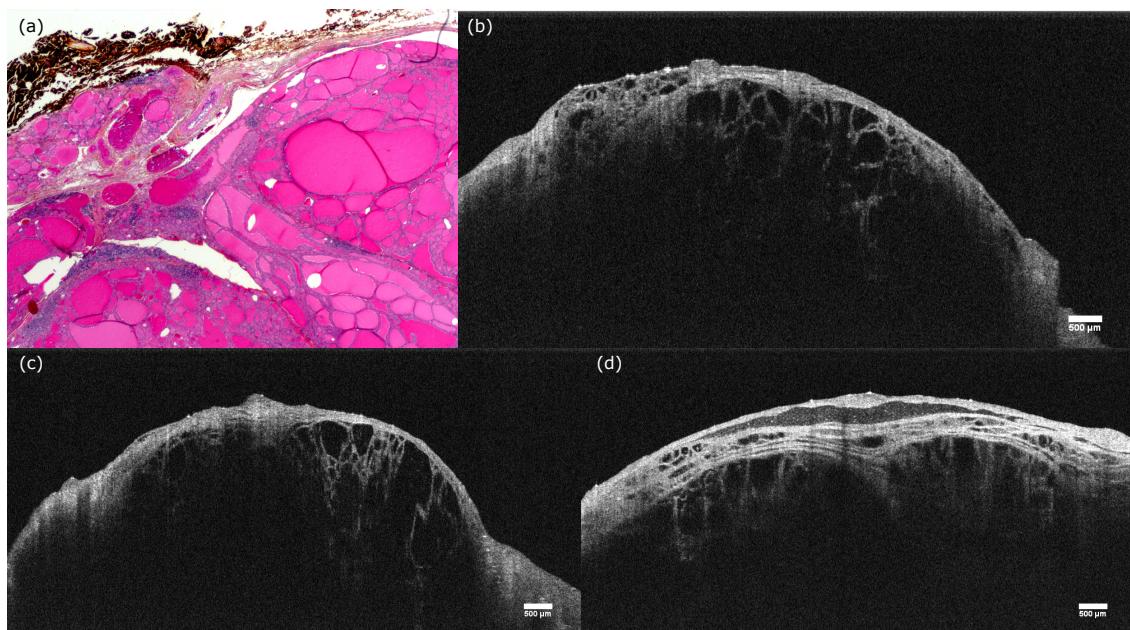


Figure 6.5 Histologie (20x) (a) et image OCT (b) d'un échantillon de thyroïde hyperplasique. (c) et (d) Images OCT d'échantillons de thyroïde recouverts d'une épaisse couche fibreuse qui limite la profondeur de pénétration dans le tissu.

signal uniforme est présent sur la majorité du tissu, signe d'une densité cellulaire quasi-constante. Bien que les cellules ne soient pas résolues, il y a peu de structures notables à l'intérieur du tissu, ce qui indique que l'architecture cellulaire est uniforme. Certaines zones de plus faible signal (flèches) représentent des zones riches en gras stromal. Le gras stromal est généralement présent en petite proportion et semble être plus présent en surface qu'en profondeur. Son apparence est qualitativement différente du tissu adipeux.

## Ganglions

Les ganglions sont les tissus étudiés qui montrent la plus grande hétérogénéité. Une alternance entre tissu adipeux et tissu lymphoïde est généralement présente comme montré à la figure 6.8. Le tissu lymphoïde est caractérisé par une intensité uniforme signe d'un tissu diffusant. Le tissu lymphoïde est similaire en apparence aux zones composées de cellules chefs de la glande parathyroïde. Cela peut donc rendre la distinction entre ganglions et glandes parathyroïdes difficile. Cette classe étant très hétérogène, il est à prévoir que c'est avec cette classe de tissus que la précision de classification sera la plus difficile.

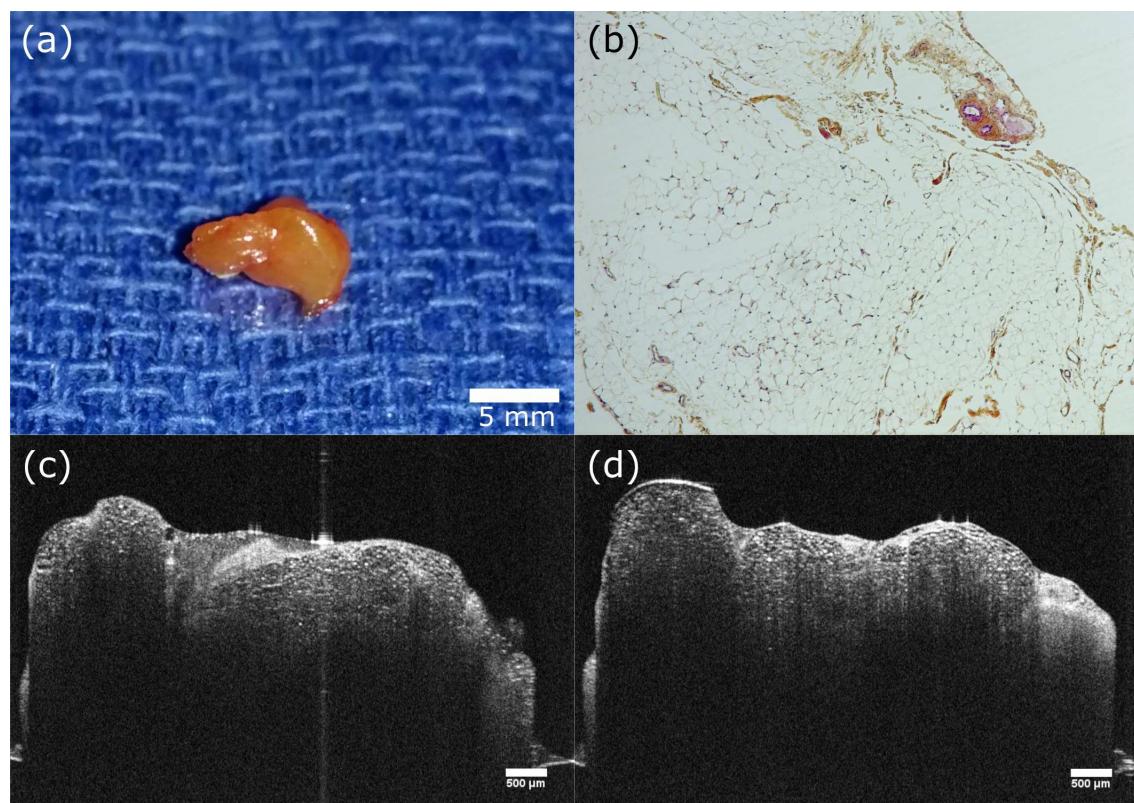


Figure 6.6 Tissu adipeux (a) Photographie du spécimen. (b) Histologie (40x). (c) et (d) Images OCT en coupe représentatives de cet échantillon.

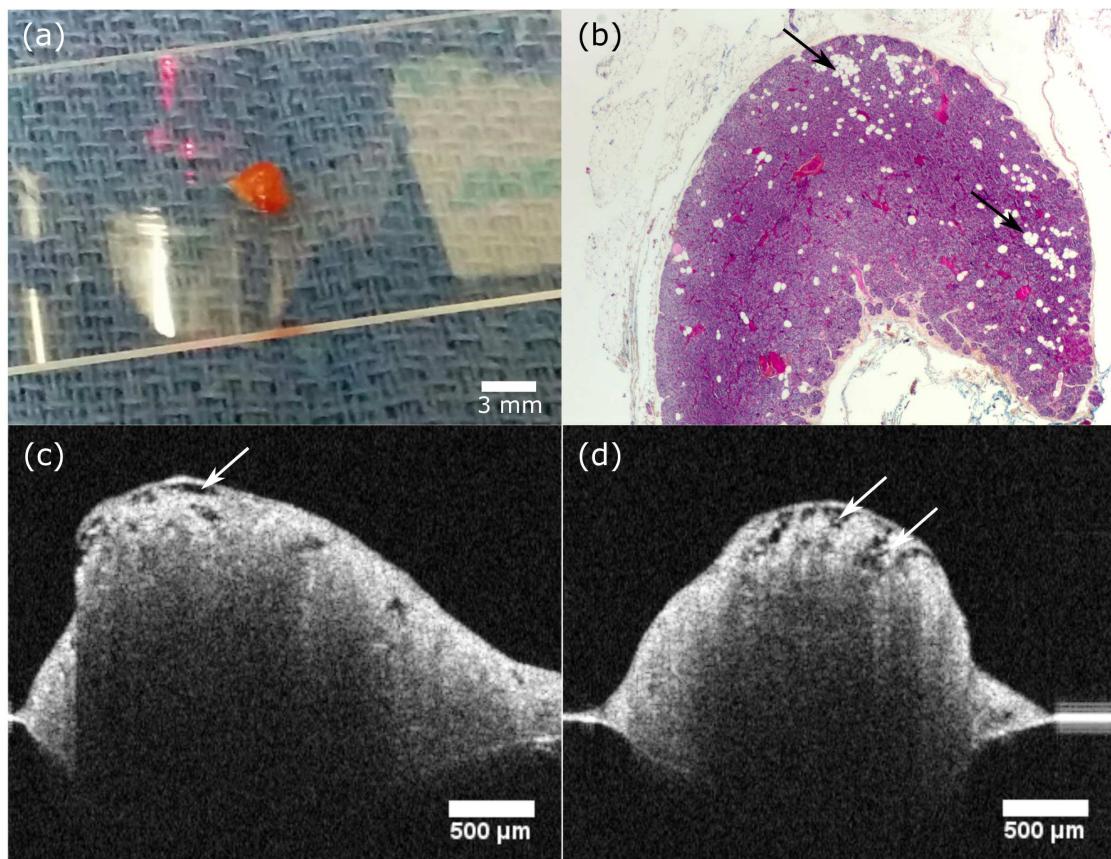


Figure 6.7 Parathyroïde (a) Photographie du spécimen. (b) Histologie (20x). (c) et (d) Images OCT en coupe représentatives de cet échantillon. Les flèches indiquent la présence de gras stromal sur l'histologie et les images OCT.

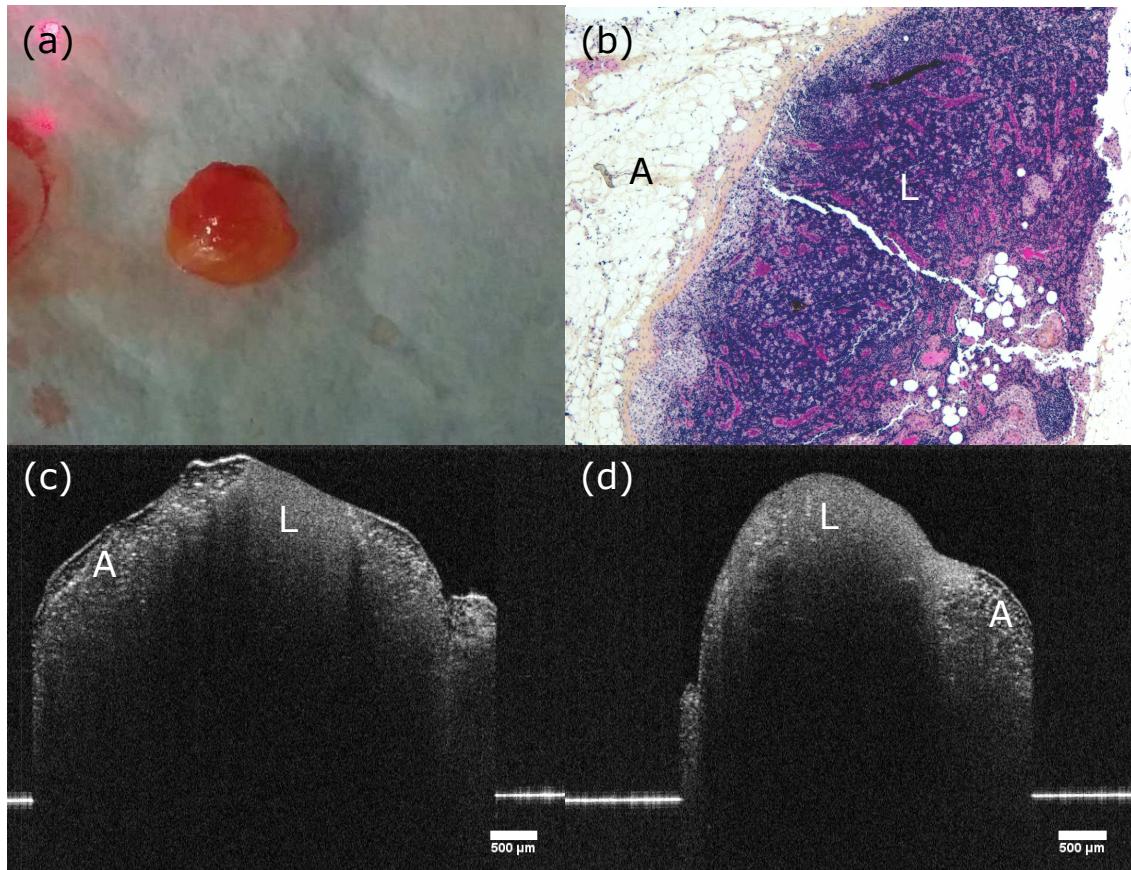


Figure 6.8 Ganglion (a) Photographie du spécimen. (b) Histologie (40x). (c) et (d) Images OCT en coupe représentatives de cet échantillon. A : région riche en tissu adipeux. L : région riche en tissu lymphoïde.

## Tissus pathologiques

Lors de chirurgies de la thyroïde, il est possible de rencontrer des formes pathologiques de tissus, en plus de la thyroïde. Des parathyroïdes hyperplasiques et des adénomes parathyroïdiens ont pu être analysés, deux formes bénignes de glandes parathyroïdes plus actives qu'à la normale. Des images représentatives de ces tissus sont présentées à la figure 6.9. La différence notable avec les parathyroïdes saines est la disparition des îlots adipeux représentés par des ronds sombres. Le tissu est uniformément diffusant, signe d'une structure cellulaire dense et uniforme. En fait, lorsque la glande devient hyper-active, elle gagne en taille et de nombreuses cellules sont produites pour augmenter la production d'hormone. Ce processus mène à la disparition graduelle du tissu adipeux à l'intérieur de la glande. Sur cette figure, on observe en (a) un adénome parathyroïdien (P) accompagné d'une masse adipeuse distincte du côté droit (A). Il était évident visuellement qu'il s'agissait de deux tissus différents attachés ensemble macroscopiquement. En (b), les flèches indiquent la présence de vaisseaux sanguins en surface de l'échantillon. Ces vaisseaux peuvent être identifiés en observant leur forme dans le volume complet. En (c), un adénome parathyroïdien présentant une région contenant ce qui ressemble au gras stromal est identifiée par la flèche. Ce gras stromal ressemble à ce qui est observé sur les glandes parathyroïdes saines.

Dans les cas agressifs de cancer où des métastases peuvent avoir infiltré les ganglions entourant la glande thyroïde, il est important de pouvoir identifier les glandes parathyroïdes pour les préserver. Dans ce cas, un évidement cervical peut être recommandé dans le but d'extraire toute la maladie. Si possible, les glandes parathyroïdes doivent être conservées, mais pas au risque de laisser des cellules cancéreuses en place. Nous avons étudié les parathyroïdes saines et hyperplasiques ainsi que les ganglions sains. L'autre tissu qu'il est possible de retrouver est le ganglion métastatique, qui est donc envahi par le cancer. La figure 6.10 montre quelques échantillons obtenus lors d'évidements cervicaux et présentant des structures différentes. L'apparence des ganglions pathologiques ressemble à des ganglions normaux, en ce sens où une alternance de tissu adipeux et de tissu plus cellulaire est présente. En (a), la région encerclée indique une section où une structure ressemblant à la structure papillaire du cancer thyroïdien est visible. Cette structure est mieux observable sur un volume tri-dimensionnel en observant une série d'images consécutives. En (b), l'histologie de ce même échantillon montrant une région de cancer papillaire de la thyroïde dans le ganglion. La région encerclée montre une structure similaire à celle observable dans l'image OCT. L'image OCT à la figure 6.10(c) montre des structures plus réfléchissantes indiquées par des flèches, apparaissant comme plus blanches sur l'image. Ces structures peuvent avoir des formes elliptiques ou allongées et sont disposées dans un ordre erratique. Ces structures sont présentes sur une partie du volume

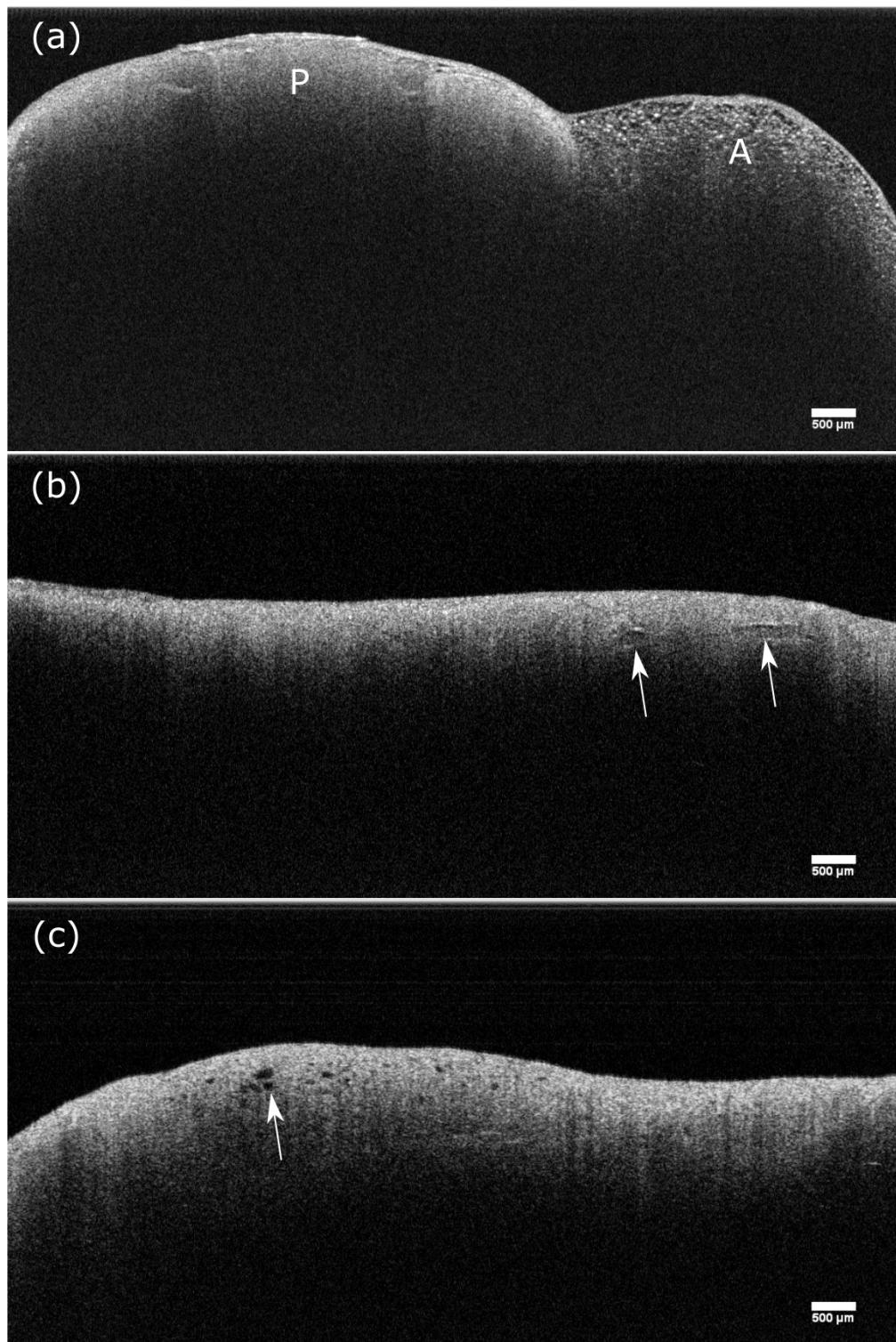


Figure 6.9 Trois spécimens d'adénomes parathyroïdiens (a) On observe un adénome parathyroïdien au centre (P) avec une masse adipeuse du côté droit (A). On note l'absence de gras stromal présent dans la glande. (b) Adénome parathyroïdien où des vaisseaux sanguins sont visibles près de la surface (flèches) (c) Adénome parathyroïdien présentant des sections contenant ce qui ressemble à du gras stromal.

acquis sur cet échantillon. En étudiant ces résultats avec la pathologiste spécialisée en ORL au CHUM, ces taches brillantes pourraient être des micro-calcifications qui se créent dans le tissu cancéreux. Ces micro-calcifications sont observables sur l'histologie correspondante présentée à la figure 6.10(d). Dans la sous-figure (2), des structures ressemblant à des follicules thyroïdiens sont montrées. Ces structures sont constituées d'un cercle de contour clair avec un centre plus foncé. Quelques structures circulaires comme celle-ci sont visibles dans cette région sur le volume, indiquées par les pointes de flèche. Ceci correspond à ce qui est observé à l'histologie en (f), où le tissu thyroïdien a envahi le ganglion et des follicules ont commencé à se former. En somme, les ganglions envahis par le cancer peuvent montrer des caractéristiques se rapprochant du tissu thyroïdien normal ou cancéreux. Certains des ganglions identifiés comme positifs à la pathologie ont un aspect qui semble normal à l'OCT. Il peut donc être difficile d'observer une faible quantité de cellules cancéreuses à l'OCT.

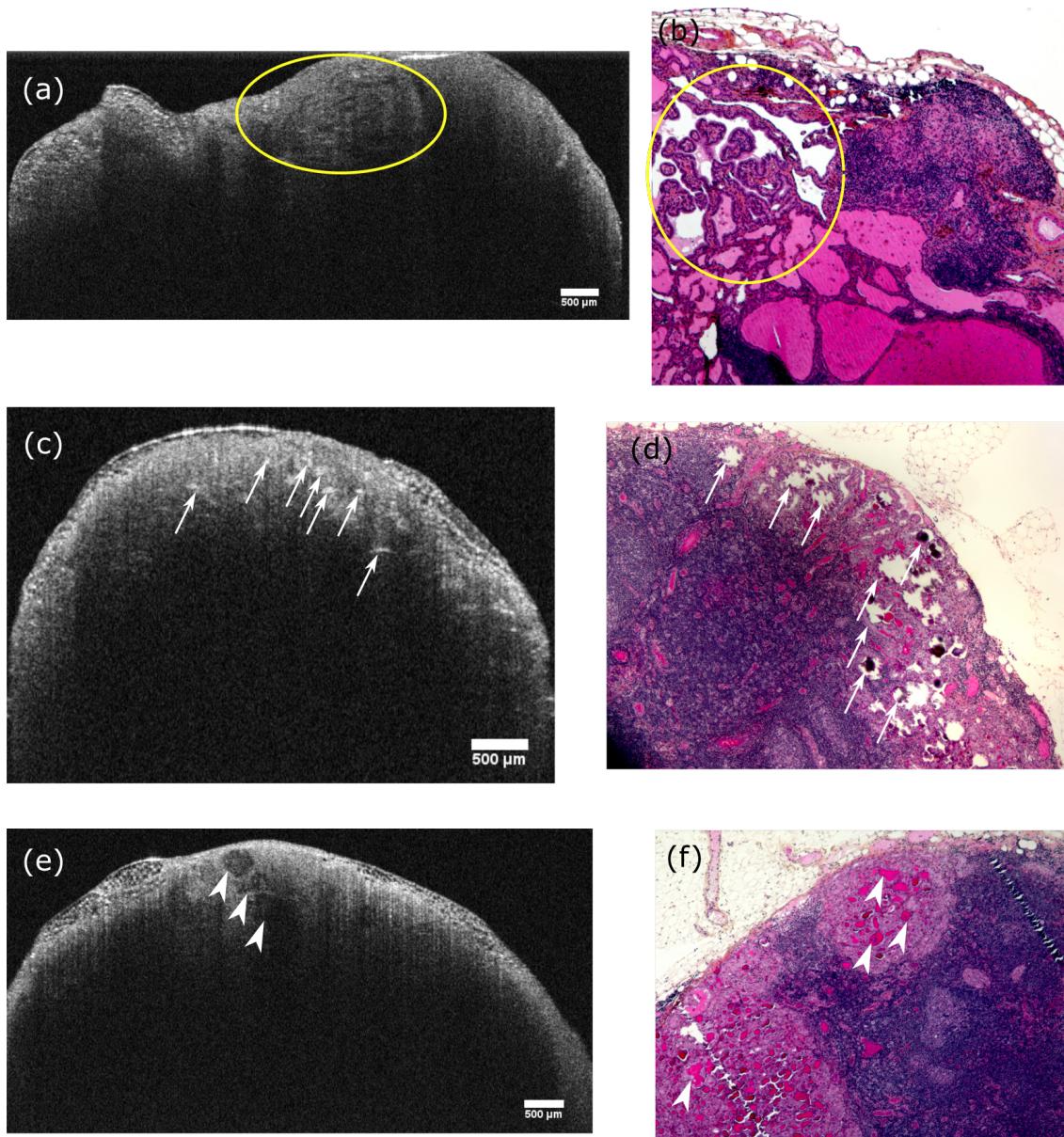


Figure 6.10 Trois spécimens de ganglions positifs à la présence de cellules cancéreuses avec les histologies correspondantes à ces échantillons. (a) Image OCT d'un ganglion montrant une structure similaire au carcinome papillaire de la thyroïde (ellipse jaune). La thyroïde de ce patient contenait ce type de cancer. (b) Histologie correspondante à ce ganglion où la structure papillaire du cancer de la thyroïde est observable (ellipse jaune). (c) Image OCT d'un ganglion montrant plusieurs régions circulaires brillantes, indiquées par les flèches. (d) Histologie correspondant à cet échantillon montrant des micro-calcifications (flèches). Ces micro-calcifications peuvent être la source des points très réfléchissants dans l'image OCT. (e) Image OCT d'un ganglion où des formes rappelant les follicules de la thyroïde sont visibles (pointes de flèches). (f) Histologie de cet échantillon montrant un envahissement du tissu thyroïdien dans le ganglion et la présence de follicules thyroïdiens (pointes de flèches).

### 6.3.2 Résultats de classification

Comme les observations sur les images mettaient en évidence la présence de structures ellipsoïdes de tailles différentes, des métriques de textures ont été évaluées. Les métriques telles que définies par Haralick ont été utilisées [145]. Il est ressorti que le contraste et la corrélation présentent des différences significatives. Ces deux dernières quantités ont servi d'entrées dans un algorithme de type BT, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.4. Les quatres classes sont présentées : gras, parathyroïde, thyroïde et ganglions. Avec les réseaux de neurones convolutifs, des sections d'images ont été fournies directement à l'algorithme pour la classification. Les premiers résultats avec trois classes sont présentés au tableau 6.5. Les trois classes sont le gras, la parathyroïde et la thyroïde. Seules quelques images de thyroïde et de parathyroïde ont été confondues pour du gras.

Tableau 6.4 Résultats de classification avec les métriques de contraste et de corrélation par la méthode *Boosted Trees*.

| Type         | Sensibilité | Spécificité |
|--------------|-------------|-------------|
| Gras         | 0.80        | 0.96        |
| Parathyroïde | 0.66        | 0.86        |
| Thyroïde     | 0.80        | 0.87        |
| Ganglions    | 0.77        | 0.93        |

Tableau 6.5 Résultats de classification avec les métriques de contraste et de corrélation par la méthode des réseaux neuronaux convolutifs.

| Type         | Sensibilité | Spécificité |
|--------------|-------------|-------------|
| Gras         | 1           | 0.85        |
| Parathyroïde | 0.91        | 1           |
| Thyroïde     | 0.94        | 1           |

### 6.3.3 Résultats de fluorescence

Les résultats de fluorescence sont présentés à la figure 6.11. Les courbe en bleu représente le signal de la parathyroïde et les courbe en rouge, celui de la thyroïde. La courbe centrale représente la moyenne du signal et la région colorée représente l'étalement des données borné par deux écarts-types. Il est possible de mesurer un faible signal d'autofluorescence de la parathyroïde, et un signal encore plus faible provenant de la thyroïde. Le maximum de la fluorescence est situé à 813 nm, ce qui diffère légèrement de la valeur dans la littérature de 820 nm. Le signal de fluorescence de la parathyroïde est environ 2.75 fois plus intense que

celui de la thyroïde, ce qui est cohérent avec les autres études sur le sujet. Les lumières de la salle sont restées allumées pour prendre les mesures. Certains pics dus aux sources néon de la pièce sont visibles sur les spectres de fluorescence de la thyroïde par des valeurs négatives. Ces valeurs négatives proviennent de la soustraction du bruit de fond qui contenait entre autres de la lumière ambiante. De ce résultat, nous pouvons estimer la puissance du signal de fluorescence de la parathyroïde intégrée sur tout le spectre. Pour la moyenne des échantillons de parathyroïde, la puissance du signal de fluorescence est d'environ 150 fW avec 100 mW à l'échantillon et un temps d'intégration de 1 s. Les deux filtres utilisés offrent environ une atténuation de douze unités de densité optique, ce qui est suffisant pour bloquer la lumière d'excitation dans la fibre de détection.

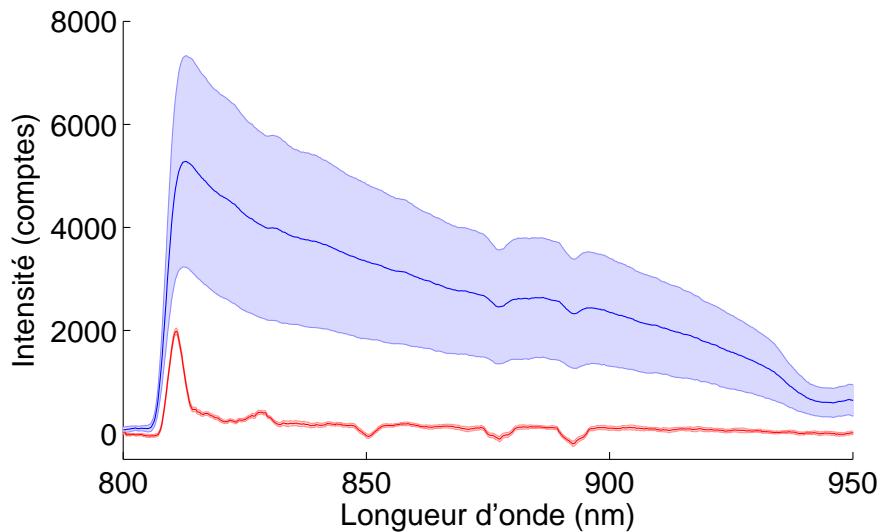


Figure 6.11 Signal d'autofluorescence des parathyroïdes (bleu) et de la thyroïde (rouge). La courbe foncée représente la valeur moyenne et la région pâle représente l'étalement des données avec comme bornes deux fois l'écart-type.

## 6.4 Discussion

Les résultats présentés ici montrent individuellement l'apparence microscopique et macroscopique de chaque tissu. Bien qu'il n'y ait pas de photos associée à la figure 6.4, l'apparence macroscopique de cet échantillon était similaire aux échantillons de gras, de ganglion et de parathyroïde. Il s'agissait toutefois d'un petit morceau de tissu thyroïdien, séparé de la glande thyroïde. Cet échantillon pouvait donc facilement être confondu avec les autres tissus. Le chirurgien a choisi de l'envoyer en congélation étant donné qu'il était difficile de connaître son identité. On peut observer sur les autres photos macroscopiques que les échantillons sont très

similaires visuellement. Le tissu thyroïdien peut être reconnu grâce à la présence des follicules sur les images OCT. De manière générale, les structures clés de l'histologie se retrouvent sur les images OCT. Sans pouvoir diagnostiquer avec précision le type de maladie présente dans la thyroïde, il est tout de même possible de reconnaître une hyperplasie de la thyroïde par les modifications à la taille et à l'organisation des follicules thyroïdiens. Ces derniers ont des tailles et des formes beaucoup plus variables en comparaison avec le tissu bénin où les follicules sont de forme circulaire et de taille semblable entre eux. Le tissu fibro-conjonctif et fibro-adipeux recouvrant la thyroïde peut être épais dans certaines régions et empêcher de bien apercevoir les follicules. Toutefois, cette épaisse capsule a majoritairement été observé sur le spécimen principal, i.e. la glande thyroïde. Lorsqu'il s'agissait de petits nodules de thyroïde séparés physiquement de la glande, la couche fibreuse était plus mince, mais toujours présente.

Le tissu adipeux, que ce soit sur un échantillon complet de gras ou une partie d'un échantillon autrement composé d'un autre type de tissu, est facilement reconnaissable par la texture en OCT. Le patron cellulaire en nid d'abeille composé de lignes blanches entourant un centre foncé est constant d'un échantillon à l'autre et se retrouve fréquemment sur des échantillons de ganglions ou de thyroïde. On peut l'observer par exemple à la figure 6.8 où les régions riches en tissu adipeux sont identifiées par la lettre «A». Ce tissu adipeux est aussi visuellement différent du gras retrouvé dans les parathyroïdes, qui est organisé différemment. Le gras stromal dans la parathyroïde apparaît comme des inclusions sombres et rondes dans le tissu autrement uniformément diffusant. La quantité de gras sur les tissus du cou varie fortement avec l'indice de masse corporelle du patient. Certains échantillons peuvent donc présenter une forte proportion de gras, cela peut rendre la distinction entre les tissus plus difficile. De manière générale, les ganglions sont plus difficiles à bien distinguer, car ils sont souvent composés de tissu adipeux en grande proportion. La portion qui n'est pas du gras est un tissu uniformément diffusant difficile à distinguer du parenchyme parathyroïdien. Comme le tissu adipeux est visuellement différent sur le ganglion et sur la glande parathyroïde, il est généralement possible de distinguer ces deux tissus. Des ganglions contenant des cellules cancéreuses ont aussi été imaginés. Ces ganglions présentent des caractéristiques plus variables, parfois semblables à ce qui est observable sur du tissus thyroïdien normal ou cancéreux. Bien qu'une plus grande variabilité est observée, ces ganglions présentent peu de similarités avec les glanges parathyroïdes. Étant donné la grande hétérogénéité de ces tissus, l'analyse tridimensionnelle possible grâce à l'OCT diminue le risque d'erreur. Deux images bidimensionnelles prises à différentes positions sur un même échantillon peuvent être différentes. Avoir la possibilité d'analyser un cube de plusieurs  $\text{mm}^3$  permet de bien analyser tout le tissu et non une faible fraction de ce dernier. Le risque d'erreur est donc grandement diminué. De plus,

l'analyse tri-dimensionnelle permet de distinguer les structures cylindriques des structures sphériques, qui peuvent être confondues. Avec une vue en coupe, ces structures apparaissent toutes deux comme circulaires ou elliptiques, selon l'angle. Les vaisseaux sanguins à la figure 6.9 ont pu être correctement identifiés en les suivant dans le volume 3D.

Les critères qualitatifs établis pour reconnaître les tissus sont semblables à ce qui a été décrit dans les récents articles publiés par d'autres groupes. L'inclusion dans notre étude de tissus pathologiques permet d'élargir le nombre de classes de tissus distinguables. L'inclusion de tissus pathologiques dans l'étude renforce l'impact que peut avoir l'OCT dans les chirurgies de la thyroïde, de la parathyroïde et les évidements cervicaux dans des cas de cancer de la thyroïde. L'analyse des images peut être réalisée très rapidement après l'acquisition du volume. Elle peut même être réalisée en temps réel en gardant le système en mode d'acquisition en deux dimensions, où les données sont traitées et affichées en temps réel. Cela respecte donc les critères établis dans l'introduction de cette thèse, c'est-à-dire pouvoir fournir une identification précise, rapide et sans dommage au tissu. Ces résultats pavent la voie à un sonde à main utilisant l'OCT pour l'identification *in vivo* per-opératoire des tissus.

Les résultats de classification sont en cours de raffinement et d'amélioration, mais les résultats préliminaires sont très encourageants. Les sensibilités et les spécificités sont comparables avec les deux techniques de classification employées. Pour les cas à trois classes, CNN offre de meilleures performances, avec plus de 91 % de spécificité et sensibilité. Tel qu'envisagé, l'ajout des ganglions fait chuter les performances. La texture de la parathyroïde et des ganglions est très similaire en l'absence de gras stromal. Un autre aspect est que le nombre d'échantillons est élevé, mais le nombre de patient par classe est peu élevé (4 patients pour les parathyroïdes au total). Il s'agit ici d'un travail préliminaire. Le nombre d'échantillons n'est pas suffisant pour établir un modèle fiable. Une analyse statistique serait nécessaire pour déterminer le nombre d'échantillons, mais cela dépasse le cadre de notre étude pilote. En effet, les données présentent un écart-type de chaque descripteur créant peu de chevauchement entre les classes. Cependant, comme les spécimens issus de chirurgie dépendent des cas cliniques, obtenir par exemple 30 patients par type de tissus nécessiterait le recrutement d'au moins 100 patients. En imageant plus d'échantillons, des classes supplémentaires comme les ganglions pathologiques et les adénomes parathyroïdiens pourront être intégrées.

Il est possible qu'il y ait une discordance entre ce qui est vu à l'imagerie et le classement à la pathologie, étant donné que la pathologie s'intéresse au spécimen en entier. Il est possible d'identifier spécifiquement ce qui est présent dans chaque zone imagée à l'OCT en comparant avec les lames histologiques spécifiques. Cela demande beaucoup de temps de pathologiste et donc, tous les spécimens n'ont pas été vérifiés et le rapport de pathologie a généralement été

utilisé pour classer les échantillons.

L'analyse a d'abord été faite en incluant trois tissus pour commencer et les ganglions sont progressivement ajoutés pour augmenter la complexité. Ce sont les ganglions qui sont ajoutés à la fin, car il s'agit de la classe la plus hétérogène et donc potentiellement la plus difficile à classifier. Notre méthodologie est robuste, car une standardisation des niveaux de gris est appliquées sur chaque ensemble de données. Les valeurs de gris représentent donc les mêmes intensités d'une image à l'autre. Cela permet de comparer les images entre elles. Une avenue intéressante au niveau de la classification serait d'inclure l'identification par le chirurgien, une donnée qui est disponible dans le contexte clinique, et de la combiner avec les images OCT lors de la classification pour augmenter la sensibilité et la spécificité. Des valeurs de sensibilité et de spécificité supérieures à 90 % semblent un objectif accessible et intéressant au point de vue clinique. Nous n'avons toutefois pas de valeurs de référence à se comparer, car l'identification per-opératoire des tissus est un concept nouveau dans le contexte des chirurgies de la thyroïde.

Un signal d'autofluorescence des glandes parathyroïdes mesuré chez l'humain. Le signal de la parathyroïde est plus intense que celui de la thyroïde. Toutefois, les propriétés intrinsèques des tissus n'ont pas été prises en compte. La plus grande concentration de sang dans la thyroïde pourrait expliquer le plus faible signal mesuré. Ce signal étant extrêmement faible, il est normal de constater que nous n'avons pas pu le mesurer avec les autres systèmes d'imagerie employés précédemment. Après avoir confirmé que le tissu parathyroïdien est autofluorescent, il a été possible d'identifier une faible fluorescence sur un échantillon de thyroïde. Ce signal est beaucoup plus faible et est fortement entaché par la lumière ambiante. Il est difficile d'envisager de faire une image en fluorescence avec un signal aussi faible avec les lumières de chirurgie allumées, qui sont beaucoup plus puissantes que les tubes fluorescents éclairant la salle de chirurgie. Il existe toutefois des méthodes simples pour s'affranchir du bruit causé par la lumière ambiante, par exemple en appliquant une modulation d'amplitude sur l'éclairage et en utilisant un amplificateur synchrome pour détecter. Un temps d'intégration de 1 s n'est pas compatible avec un système d'imagerie à balayage laser. Il serait toutefois possible d'avoir une sonde mesurant par un canal la fluorescence pendant l'acquisition d'un volume OCT sur un second canal. L'intégration de l'autofluorescence reste toutefois difficile étant donné que nous avons pu le mesurer avec une sonde présentant un minimum de pertes optiques. Passer à travers plusieurs lentilles augmenterait les pertes et pourrait nuire à la détection de l'autofluorescence. L'utilisation d'une source de 100 mW présente aussi un danger pour la santé. Une formation en sécurité laser serait donc à recommander pour les personnes utilisant la sonde, en plus d'équipement de protection incluant un obturateur automatique.

L'OCT permet de distinguer qualitativement trois sortes de tissus sur quatre avec confiance. Avec des mesures quantitatives, je m'attends à ce que nous puissions distinguer avec une très bonne précision ( $>90\%$ ) les quatre types de tissus. Donc, l'OCT est une modalité d'imagerie adaptée à distinguer les tissus du cou. Le signal d'autofluorescence des parathyroïdes est mesurable et apporte une information additionnelle pertinente. Toutefois, la mesure de ce signal augmente la complexité et la fiabilité de la mesure n'est pas garantie. De plus, cette technique s'inscrit moins bien dans la procédure clinique étant donné sa sensibilité à la lumière ambiante. C'est pourquoi je crois qu'il est important de se concentrer sur les mesures OCT. Si nécessaire, le système pour prendre des mesures OCT et en fluorescence est prêt et peut être utilisé quand il sera jugé nécessaire.

## 6.5 Conclusion

Dans ce chapitre, j'ai montré que l'OCT est une modalité d'imagerie optique idéale pour différencier les tissus rencontrés en chirurgie de la thyroïde. Des mesures ont été réalisées en salle opératoire sur 30 patients. Plus de 160 volumes OCT distincts ont été acquis. Des tissus pathologiques du cou ont été étudiés dans le cadre de cette application pour la première fois. Des critères qualitatifs ont été établis pour chaque type de tissu et ont été corrélés avec les caractéristiques-clés de l'histologie. Ces résultats servent à guider une analyse quantitative couplée à un algorithme de classification. Les signaux d'autofluorescence des glandes thyroïde et parathyroïde ont été mesurés et concordent avec la littérature. La dernière étape pour atteindre l'objectif global de la thèse est de prendre des mesures *in situ* durant une chirurgie. Le prochain chapitre détaillera l'instrumentation développée pour permettre ces mesures et les résultats obtenus.

## CHAPITRE 7 IMAGERIE IN VIVO

### 7.1 Introduction

L'OCT permet d'identifier les tissus du cou par analyse visuelle d'image ou par classification basée sur un réseau de neurones. La fluorescence intrinsèque des parathyroïdes est une signature moléculaire intéressante, mais passer d'une mesure ponctuelle à une imagerie locale (sur quelques mm) impose des contraintes qui sont incompatibles avec les procédures chirurgicales. Il est à envisager notamment d'éteindre les lumières de chirurgies et augmenter le temps des prises de mesure. L'implémentation d'un instrument de mesure intra-opératoire devra tenir compte d'un ensemble de contraintes qui doit être élaboré de concert avec l'équipe médicale (stérilisation, prise en charge dans le champ stérile, ergonomie, rapidité d'utilisation, qualité des données, résistance aux chocs et vibrations, obstruction du champ chirurgical, etc.) Nous avons choisi d'entreprendre cette validation instrumentale avec l'OCT, étant donné notre compréhension des images issues des tissus du cou.

Le prototype A (sonde avec garde) est présenté dans la première section, avec les déductions issues de l'essai *in vivo* sur un premier patient. Ces déductions ont permis de bâtir le prototype B (sonde en contact), présentée dans la seconde section. Cette section présente le design et les simulations associées à ce prototype. La troisième section détaille la méthodologie employée (protocole clinique et protocole d'imagerie). La quatrième section montre les résultats d'imagerie *in vivo* pour les 8 patients recrutés. La cinquième section discute des résultats obtenus et de l'atteinte des contraintes cliniques établies. La dernière section conclut le chapitre avec une rétrospective et des perspectives.

### 7.2 Prototype avec garde

J'ai d'abord élaboré une liste de contraintes et critères nécessaires à rencontrer pour tester cette première sonde. Un des critères les plus importants est que la sonde doit être stérile pour entrer dans le champ opératoire. Dans le but de se rapprocher le plus possible des mesures prises *ex vivo*, le premier prototype a été pensé en modifiant le moins possible la tête d'imagerie du système utilisé pour les mesures *ex vivo*. Cette sonde possède une lentille de grande qualité adaptée pour balayer le faisceau sur de grands angles, avec une grande distance de travail. Cette lentille a toutefois un diamètre important (34 mm). Pour améliorer l'utilisation de la sonde et permettre à l'utilisateur de garder la sonde stable durant une acquisition volumétrique, une garde a été fabriquée pour s'appuyer délicatement sur

l'échantillon et le garder au plan focal de la lentille. Cette garde doit aussi être stérile pour être utilisable.

Les pièces responsables du balayage, des miroirs montés sur des galvanomètres, sont fragiles mécaniquement et intègrent plusieurs composants électroniques. Il est à penser que ces pièces ne supporteront pas la haute température et l'humidité de l'autoclave, la méthode habituelle de stérilisation des instruments médicaux. La seconde option souvent utilisée pour des sondes endoscopiques utilisées en hôpital est le sac stérile. Ces sacs viennent en de multiples formats et ont été généralement conçus pour convenir à un instrument en particulier. Après avoir testé de nombreux sacs commercialement disponibles, un modèle de sac stérile pour caméra vidéo a été identifié comme idéal (5900, Microtek Medical Inc., États-Unis). Le sac a une très bonne transmission dans le visible et le proche infra-rouge et est très mince (environ 100 µm), ce qui réduit au maximum les artefacts causés par l'ajout de cet élément dans le trajet de la lumière.

La forme de la garde réplique un adaptateur fourni par la compagnie qui a fabriqué le système d'imagerie. La garde peut s'installer facilement à l'aide de vis et trous filetés déjà présents sur la tête d'imagerie. La sélection du matériau de la garde doit être faite avec diligence. En effet, certains matériaux supportent mal la stérilisation par autoclave, généralement pour deux raisons. Soit ils ne résistent pas à la chaleur intense, plus de 130 °C, soit le matériau ne se stérilise pas complètement après un passage à l'autoclave. L'option que nous avons retenue après avoir étudié les propriétés thermiques de plusieurs polymères est le téflon, qui peut résister à de hautes températures et peut servir à la fabrication de sacs stériles pour le milieu médical. La pièce a donc été fabriquée en téflon par un technicien à Polytechnique et stérilisée à l'hôpital Notre-Dame par autoclave. Pour s'assurer du succès de la stérilisation, les éléments ont été retirés de leur sac stérile et testés pour la présence de bactéries ou autres agents pathogènes. Comme l'analyse biochimique s'est révélée négative, les éléments ont été stérilisés de nouveau, avant d'être utilisés.

La figure 7.1 montre les différentes parties du premier prototype de sonde. À la figure 7.1(a), on voit d'abord la sonde qui a servi à prendre les mesures *ex vivo*. En (b), la sonde a été recouverte du sac stérile. En (c), la garde a été ajoutée sur la sonde. Comme elle est stérile, elle est hors du sac stérile. Finalement en (d), on observe la sonde en utilisation lors de la première série de mesures *in vivo*.



Figure 7.1 Photographies de la sonde : (a) sonde à main, (b) sonde à main avec sac stérile, (c) sonde à main avec sac stérile et garde, (d) sonde en utilisation en champ opératoire.

### 7.3 Design de la sonde en contact

Cette première expérience a permis d'évaluer les contraintes en matière de maniabilité et d'espace. Les impressions du chirurgien sur l'utilisabilité de la sonde ont guidé ce nouveau design de sonde.

Premièrement, le diamètre de la sonde devrait être réduit grandement, car les ouvertures chirurgicales sont souvent de 4 ou 5 cm. La section de la sonde contenant les galvanomètres devrait être plus éloignée pour permettre de bien voir où la sonde pointe. Un modèle de sonde en contact a été préféré pour maximiser la stabilité durant la prise de mesures. Le sac stérile et la garde sont faciles d'utilisation et ne gênent pas la qualité des images. La taille de la garde est cependant trop large par rapport à l'ouverture chirurgicale.

D'un point de vue design optique, réduire le diamètre de la sonde mène généralement à une diminution du champ de vue. Il est important de maintenir un champ de vue supérieur à 4 mm, la taille approximative d'une parathyroïde. La résolution latérale est aussi importante, car les caractéristiques à résoudre pour bien distinguer les types de tissus sont de l'ordre de 30 µm, comme par exemple les adipocytes font environ 40 µm.

Rappelons aussi les contraintes de design présentées dans l'introduction. Les mesures doivent être non-invasives, sans causer de dommage aux tissus et sans devoir les altérer. Les mesures doivent être réalisées dans un temps minimal et permettre une interprétation des résultats rapide. L'utilisation de l'instrument doit être sécuritaire et facile.

### 7.4 Méthodologie

Cette nouvelle étude fait partie de la seconde phase du projet présenté aux comités scientifique et d'éthique. Cette série d'expériences a donc aussi été approuvée par les comités d'éthique de Polytechnique (CÉR-14/15-26) et du CHUM (15.045). L'objectif est de reproduire ici le contexte réel de l'utilisation de la sonde, c'est-à-dire imager des tissus pouvant ressembler à des parathyroïdes dans des situations où le chirurgien n'est pas confiant sur l'identité du tissu. Durant cette étude *in vivo*, il est donc probable que nous n'ayons pas accès aux histologies de chaque tissu. Comme pour la phase *ex vivo*, les tissus sont retirés seulement si le chirurgien les aurait retirés dans le cours normal de sa chirurgie. Le chirurgien détermine le moment idéal pour utiliser la sonde et identifie macroscopiquement les tissus à imager. Un exemple de tissus imaginés est illustré à la figure 7.2. Cette figure illustre différents tissus tel qu'ils sont rencontrés dans le cadre normal d'une chirurgie. Une combinaison de l'identification macroscopique du chirurgien et des images obtenues avec la sonde nous permet d'avoir un niveau de confiance raisonnable quant à l'identité de chaque tissu. Le nombre et le type de

tissus imaginés dépendent de chaque cas et vont selon les recommandations du chirurgien.

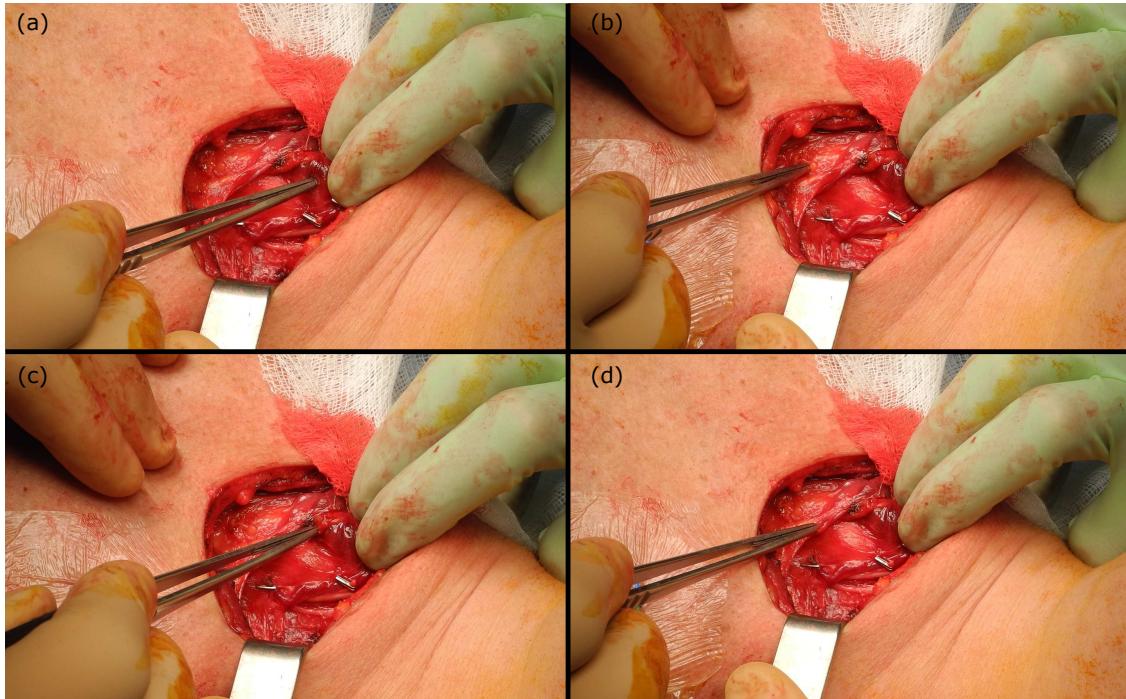


Figure 7.2 Photographies des tissus avant d'utiliser la sonde selon l'identification du chirurgien : (a) thyroïde, (b) gras, (c) parathyroïde et (d) ganglion. On remarque que les tissus sont visuellement semblables et qu'il est difficile de bien les distinguer.

La sonde est placée dans un sac stérile et déposée sur une table stérile. Lorsque le chirurgien est prêt à utiliser la sonde, elle est placée en contact léger avec le tissu. Une rétroaction sur le contact entre la sonde et le tissu tel que vu à l'OCT est donnée au chirurgien. Une acquisition tridimensionnelle est ensuite lancée, durant laquelle on demande au chirurgien de rester immobile. L'acquisition prend environ 20 s. Dans certains cas, le volume acquis est traité et observé pour vérifier que les données sont de bonne qualité. Tous les tissus sont imaginés dans la même période pour minimiser l'impact sur la chirurgie.

## 7.5 Résultats

Cette section de résultats présente la sonde en contact développée pour l'imagerie *in vivo*, la caractérisation de cette sonde et les résultats d'imagerie *in vivo* sur 8 patients.

### 7.5.1 Sonde pour l'imagerie *in vivo*

La figure 7.3 présente le nouveau design de sonde qui vient répondre aux critères précédemment énoncés. La sonde entière est montrée en (a). Le même assemblage de lentille de collimation et de galvanomètres qu'utilisé pour l'étude *ex vivo* est utilisé. Un tube d'environ 160 mm de longueur et 18 mm de diamètre externe est ajouté pour augmenter la longueur et faciliter la visée sur la région désirée. L'optique est maintenue dans les tubes de 12.7 mm de diamètre interne. Un relais optique composé de deux doublets achromatiques de 30 mm de longueur focale permet de relayer le balayage du faisceau avec un agrandissement unitaire. La lentille objectif est aussi un doublet achromatique avec une longueur focale de 30 mm, qui est donc similaire à la longueur focale de la lentille précédemment utilisée.

À la figure 7.3(b), on peut voir la sonde prête à être utilisée, enveloppée par un sac stérile. La sonde est déposée sur une table drapée afin de créer un support stérile pour la sonde à portée de l'équipe médicale. Le sac stérile est maintenu en place autour de la sonde par une bande autocollante stérile incluse avec le modèle de sac stérile sélectionné tel que montré à la figure 7.3(c). La sous-figure (d) montre la sonde en utilisation lors d'une thyroïdectomie.

### Caractérisation de la sonde

Les performances optiques de la sonde ont été simulées puis mesurées après l'assemblage de la sonde. Celles-ci sont présentées dans le tableau 7.1. La résolution latérale mesurée au centre d'une cible de résolution USAF 1951 est de 20  $\mu\text{m}$ . La résolution axiale est inchangée par rapport au système de table. Le champ de vue a été établi avec des angles d'entrée de  $\pm 5^\circ$ . Ces angles ont été déterminés par simulation et expérimentalement comme la limite où les performances ne sont pas trop dégradées. La modélisation de la sonde est présentée à la figure 7.4. Le schéma optique de la sonde est d'abord présenté en (a). La taille du faisceau au meilleur compromis (500  $\mu\text{m}$  après la fenêtre) est présentée en (b), où on peut observer que la performance optique se dégrade rapidement avec l'augmentation de l'angle d'entrée. On note la présence d'astigmatisme et de courbure de champ. En (c), on peut observer le diagramme de tache (*spot diagram* en anglais) qui montre que la performance sur l'axe à environ 1 mm est limitée par la diffraction. La taille du faisceau à ce plan focal est égale au diamètre de la tache d'Airy qui est de 17  $\mu\text{m}$ . En (d), on peut observer que la position du plan focal ne varie pas beaucoup avec la longueur d'onde. Elle varie de 100  $\mu\text{m}$  sur la plage spectrale de 100 nm de la source.

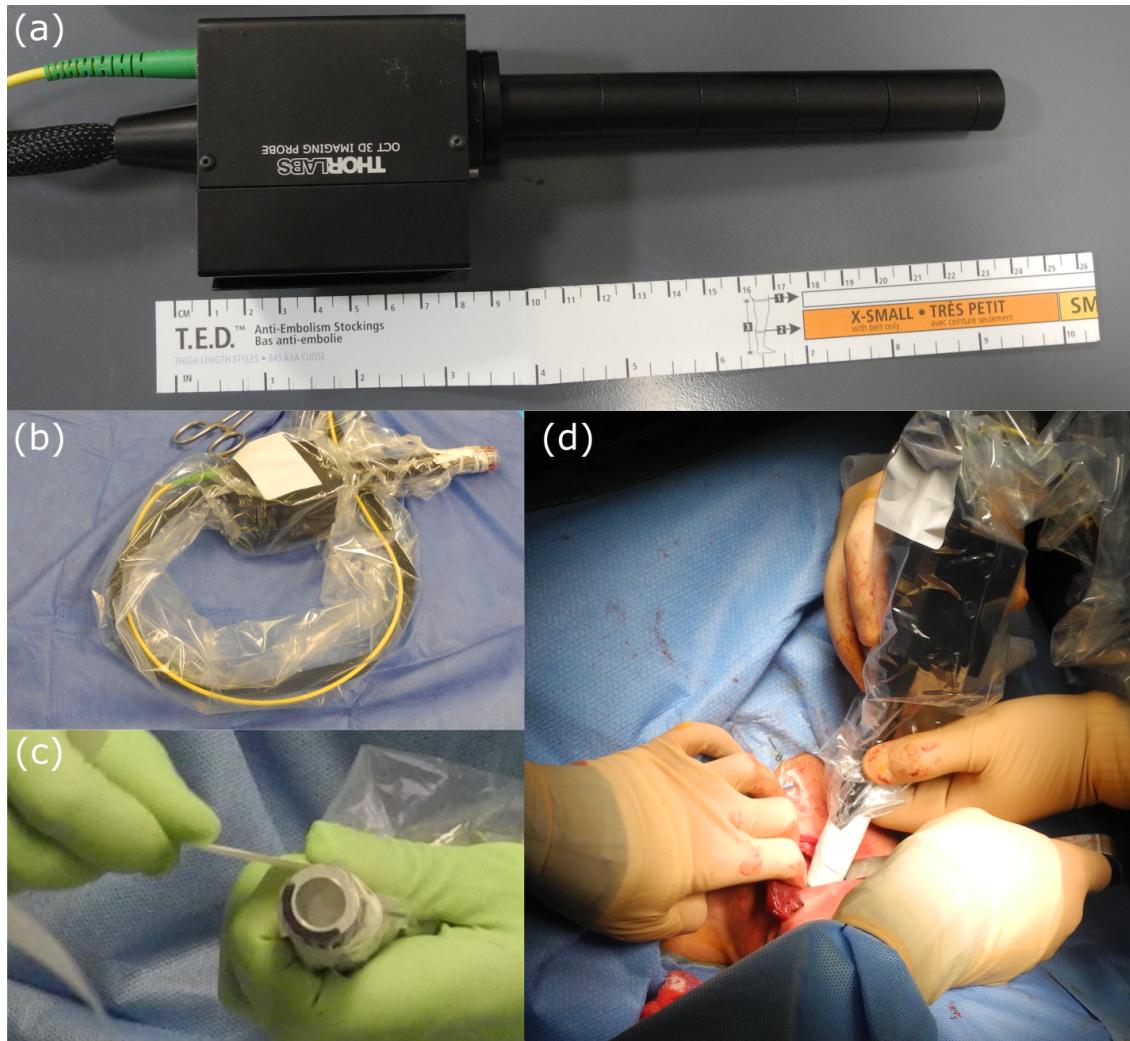


Figure 7.3 Photographies du second prototype de sonde utilisé pour l'étude *in vivo*. (a) Sonde comprenant la tête de la sonde contenant la lentille de collimation et le mécanisme de balayage du faisceau, et le tube de la sonde contenant l'optique de relais et de focalisation sur l'échantillon. (b) La sonde recouverte d'un sac stérile pour l'utilisation *in vivo*. La sonde est disposée sur une table stérile en attendant la prise de mesures. (c) Le sac stérile est maintenu en place par une bande autocollante fournie avec le sac stérile. Elle permet que le sac stérile soit libre de plis et bien en contact avec la fenêtre pour limiter les réflexions parasites. (d) La sonde durant une prise de mesures *in vivo*.

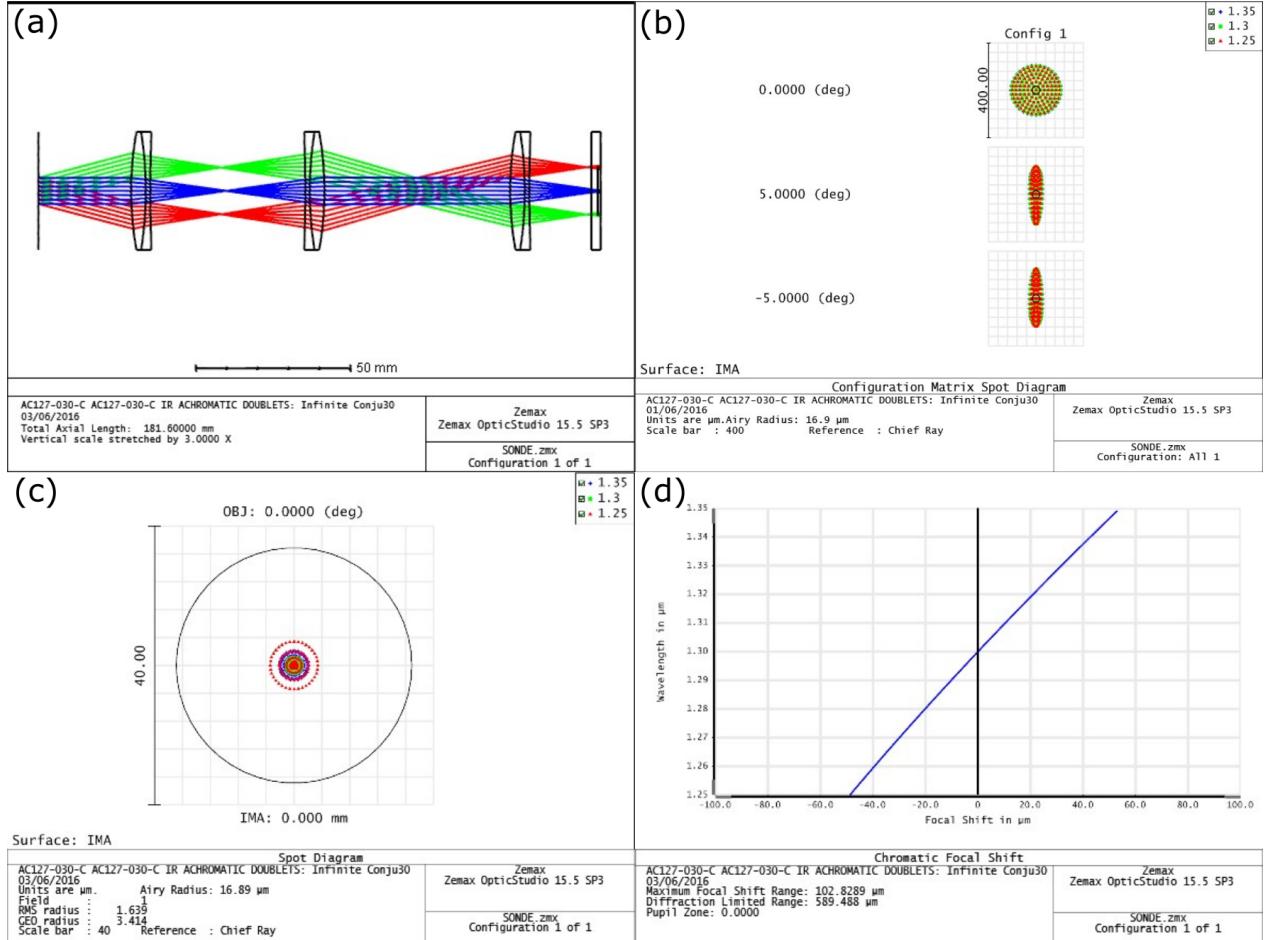


Figure 7.4 Modélisation de la sonde dans Zemax OpticStudio. (a) Schéma de la sonde telle que modélisée. Les lentilles utilisées sont des doublets achromatiques pour l'infrarouge proche. Une fenêtre de 3 mm est placée en bout de la sonde pour être en contact avec le tissu. (b) Diagramme de tache (*Spot Diagram*) représentant l'arrivée des rayons dans le plan image en fonction de leur angle à l'entrée du système et de la longueur d'onde (dans l'ordre : sur l'axe,  $+5^\circ$  et  $-5^\circ$ ). (c) Diagramme de tache pour le faisceau sur l'axe au meilleur focus. On peut observer qu'à ce point, la taille du faisceau est limitée par la diffraction. (d) Variation de la longueur focale en fonction de la longueur d'onde. Comme des doublets achromatiques sont utilisés, cette variation est d'environ 100  $\mu\text{m}$  sur la plage de 1250 nm à 1350 nm.

Tableau 7.1 Performances modélisées et mesurées de la sonde à main en fonction des contraintes de design.

| Caractéristique                                 | Modélisation | Mesure      | Contraintes |
|---|--------------|-------------|-------------|
| Résolution latérale ( $\mu\text{m}$ )           | 16.9         | $20 \pm 3$  | <25         |
| Résolution axiale ( $\mu\text{m}$ , dans l'air) | 12           | $12 \pm 2$  | 12          |
| Champ de vue (mm)                               | 5            | $5 \pm 0.3$ | >4          |

### 7.5.2 Imagerie *in vivo*

Pour cette phase d'imagerie *in vivo*, nous avons recruté 8 patients et enregistré 4 volumes OCT par patient, chacun des volumes est acquis sur un spécimen différent. Le temps moyen d'utilisation de la sonde est de 6 minutes par patient. Le tableau recense les volumes acquis selon la classification du spécimen par le chirurgien.

Tableau 7.2 Nombre total de spécimens imaginés durant l'étude *in vivo*, selon type de tissu tel que déterminé par le chirurgien.

| Tissu  | Thyroïde | Parathyroïde | Tissu adipeux | Ganglion | Muscle | Nerf |
|--------|----------|--------------|---------------|----------|--------|------|
| Nombre | 11       | 8            | 5             | 3        | 5      | 2    |

Après chaque cas, les impressions du chirurgien ou du résident qui maniait la sonde ont été récoltées. Les utilisateurs ont apprécié l'ergonomie de la sonde et ont trouvé qu'elle se manie bien. Le diamètre de la sonde a permis d'accéder facilement aux différents tissus. Il serait toutefois important de diminuer le diamètre, même au coût du champ de vue dans le but de faciliter le positionnement de la sonde sur le tissu à étudier. Dans certains cas, il était difficile de pointer précisément le tissu désiré. Le fait de pouvoir placer la sonde en contact a facilité beaucoup l'utilisation de la sonde, l'utilisateur n'a pas à se soucier du positionnement durant l'acquisition et doit seulement se concentrer à limiter les mouvements. Le temps pour les acquisitions est acceptable, mais une réduction du temps serait appréciée.

Le design et la sonde respectent les critères de design élaborés. Les mesures sont réalisées sur des échantillons intacts, sans les altérer. La sonde accède aux tissus par l'ouverture chirurgicale pratiquée et permet d'atteindre la majorité des tissus visibles par l'ouverture. Les tissus non accessibles sont situés en périphérie de l'ouverture et ne sont donc pas de grand intérêt du point de vue de la chirurgie. Le temps par mesure est d'environ 1 min et inclus une visualisation en 2D de la zone d'intérêt et une acquisition d'un volume 3D. L'interprétation des images peut généralement se faire à partir des données 2D obtenues, mais l'imagerie 3D aide dans les cas plus difficiles à interpréter contenant plusieurs types de tissus dans le champ de vue.

Les images ont d'abord été analysées pour déterminer les valeurs de signal moyen, d'écart-type et de maxima pour toutes les acquisitions faites avec la sonde. Les images ont ensuite été exportées avec le même facteur de normalisation pour permettre la comparaison entre les niveau de gris d'une acquisition à l'autre. Pour les images présentées ici, une moyenne mobile sur 4 images a été prise pour diminuer le bruit de tavelure.

La figure 7.5 présente une compilation de résultats *in vivo* obtenus avec la sonde des divers tissus observables en chirurgie. De (a) à (d), on retrouve respectivement du tissu thyroïdien, une glande parathyroïde, du tissu adipeux et du tissu musculaire. Des interfaces sont visibles sous la forme de lignes horizontales brillantes correspondant à fenêtre en bout de sonde et au sac stérile. On peut constater que la profondeur de pénétration est similaire des les tissus que pour l'étude *ex vivo*. Sur l'échantillon de thyroïde en (a), on observe la présence de follicules thyroïdiens sur la majorité de l'échantillon. Dans ce cas précis, la capsule fibreuse recouvrant la thyroïde était très fine. En (b), le patron observé *ex vivo* de tissu diffusant uniformément parsemé de points sombres de petite taille est observé de nouveau. La présence de ce gras stromal permet de dire avec précision qu'il s'agit d'une parathyroïde. En (c), le patron reconnaissable du tissu adipeux est observé. Des séparations fibreuses sont aussi observables et prennent la forme de longues lignes blanches. Finalement, en (d), on retrouve le tissu musculaire reconnaissable au patron de bandes claires et sombres qui apparaît.

Des images en deux dimensions sont présentées ici, mais un avantage de ma sonde est qu'elle permet de réaliser des images tridimensionnelles. Cette information tridimensionnelle peut être utile pour bien identifier certaines structures, comme les vaisseaux sanguins. En effet, dans ce cas, une section transverse d'un vaisseau sanguin donnera une forme circulaire ou légèrement elliptique. Une vue tridimensionnelle permet de distinguer la forme cylindrique du vaisseau par rapport à une inclusion sphérique comme un follicule thyroïdien.

Un exemple de tissu incorrectement identifié par le chirurgien, mais aisément identifiable avec l'OCT est présenté à la figure 7.6. Durant une séance d'imagerie intra-opératoire, le chirurgien a pointé la sonde vers un tissu en indiquant qu'il s'agissait d'un ganglion. Toutefois, en observant les images obtenues à l'OCT, il est clair qu'il s'agit de tissu thyroïdien. Comme cela ne représentait pas de risques pour le patient, le chirurgien a préféré retirer le tissu pour pouvoir confirmer avec l'histologie. Le tissu a aussi pu être imaginé dans un contexte *ex vivo* lorsqu'il a été retiré. La pathologie a confirmé qu'il s'agissait d'une extension de la thyroïde séparée du spécimen principal à un endroit atypique. Les sous-figures 7.6 (a) et (b) montrent les images acquises *in vivo* et les sous-figures (c) et (d) montrent les images *ex vivo* du même échantillon. Les similarités étant très grandes, nous avons pu conclure que le tissu a été imaginé correctement avec la sonde. Dans ce cas-ci, l'identification erronée par le chirurgien

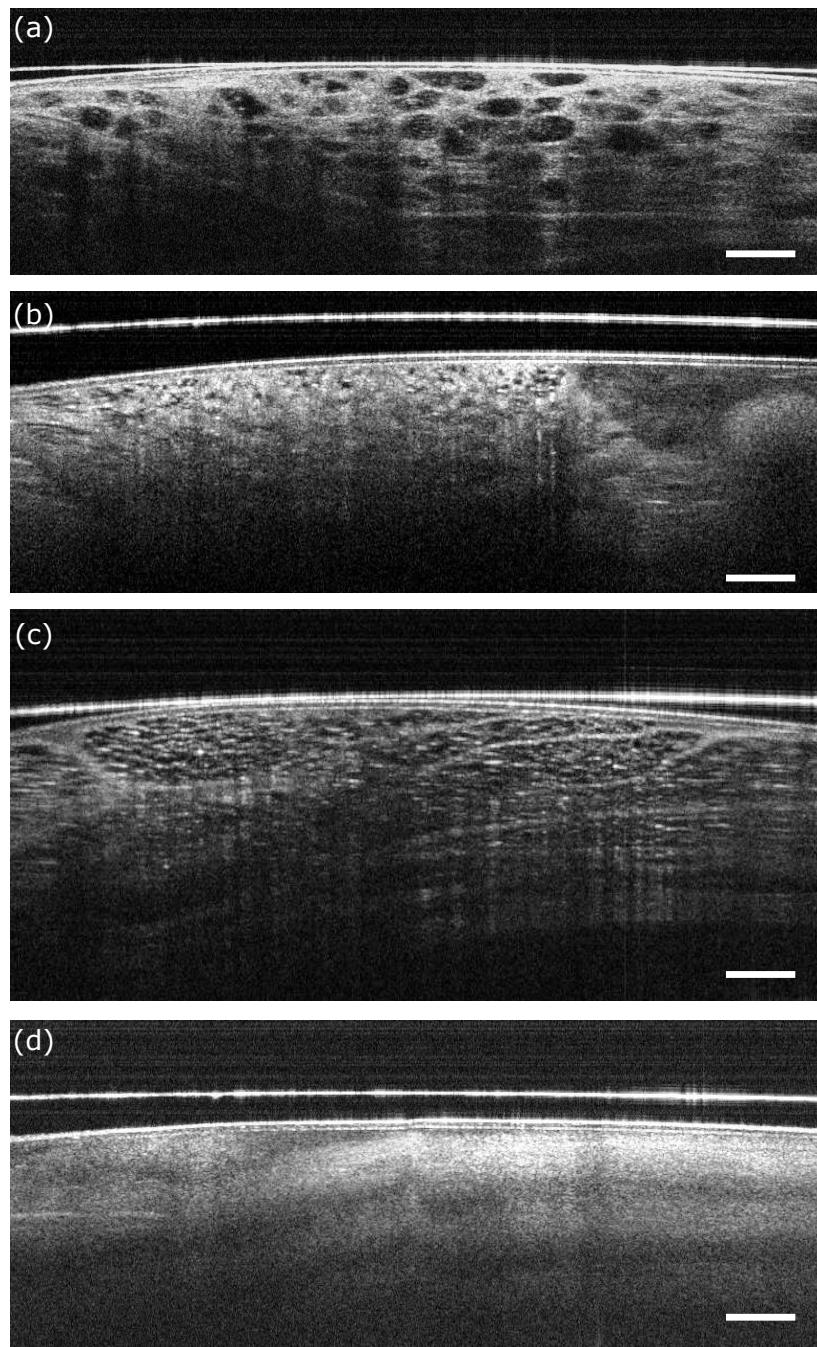


Figure 7.5 Images représentatives de tissus rencontrés durant une thyroïdectomie obtenues avec la sonde à main. De haut en bas, thyroïde, parathyroïde, gras et muscle. En (a), les follicules thyroïdiens sont visibles sur tout le champ de vue. En (b), la parathyroïde occupe la partie gauche de l'image, les inclusions de gras stromal correspondent à ce qui a été observé *ex vivo*. En (c), les taches circulaires de petite taille représentatives du tissu adipeux sont reconnaissables sur toute l'image. En (d), l'organisation du muscle crée une biréfringence qui mène à une alternance de bandes horizontales claires et sombres. La barre d'échelle est de 500 µm.

ne présentait aucun danger pour le patient, mais cette situation permet de montrer l'utilité de la sonde dans le contexte clinique.

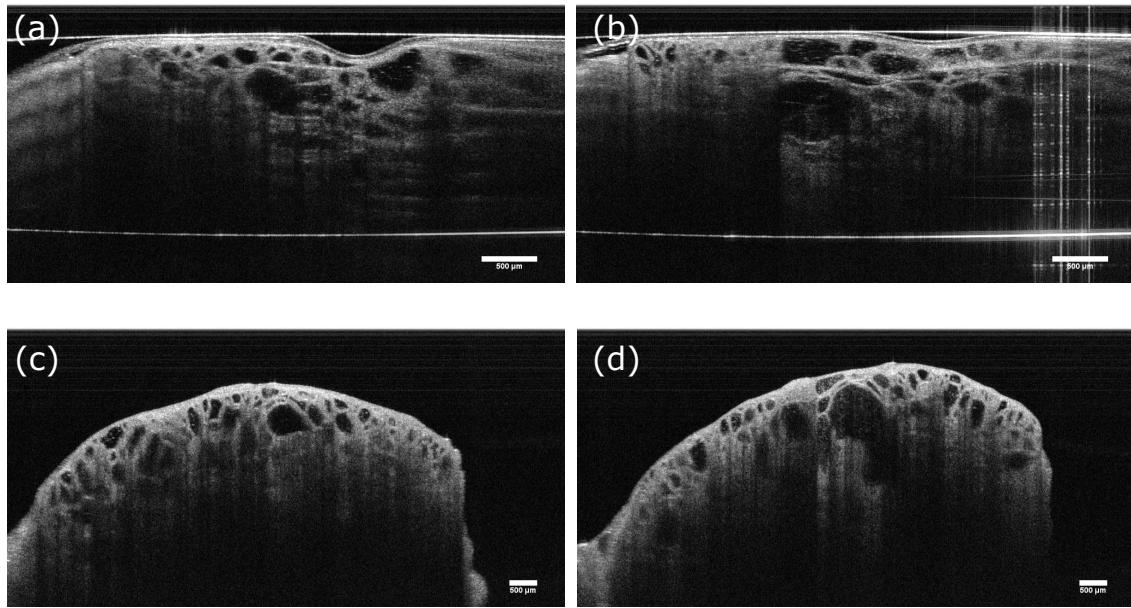


Figure 7.6 Échantillon identifié par le chirurgien comme un ganglion, mais qui a été identifié comme du tissu thyroïdien à l'OCT. La position atypique de ce tissu thyroïdien explique pourquoi il a été pris pour un ganglion. (a) et (b) montrent des images acquises avec la sonde *in vivo*. (c) et (d) montrent les images OCT acquises *ex vivo*. Les barres d'échelle sont de 500 µm.

## 7.6 Discussion

Dans ce chapitre, j'ai montré deux prototypes de sonde que nous avons utilisé pour prendre des mesures *in vivo*. La sonde à garde a permis de vérifier la méthode qui semble la plus appropriée pour rendre la sonde stérile. Il a aussi permis d'établir l'utilisation optimale de la sonde dans le cadre de ce genre d'opérations : en contact direct avec le tissu. Nous avons aussi déduit qu'il était impératif de réduire le diamètre de la sonde pour accéder aux différentes structures. Le deuxième prototype, la sonde en contact a donc été conçu pour fournir un instrument adapté à ces contraintes. Cette nouvelle sonde permet d'imager en contact, recouverte par un sac stérile, avec un diamètre de 18 mm. Une modélisation de la sonde a été faite pour optimiser son design optique et ses performances.

Le design de la sonde a d'abord été fait en fonction des pièces optiques disponibles et dans le but de s'adapter à la tête de balayage de la sonde existante. Le tube de la sonde peut être enlevé très rapidement, permettant le passage rapide à la partie *ex vivo* de l'étude après

la prise de mesures *in vivo*. Ce tube est aussi très robuste ; ce premier prototype n'est pas fragile. Ceci représente un avantage dans le contexte médical où le personnel doit opérer dans le champ stérile avec rapidité, précision et un espace limité. Cette sonde rigide peut entrer en contact avec d'autres instruments sans craindre que la qualité des images soit compromise. Le système en entier est aussi robuste. Il est déplacé régulièrement à travers le bloc opératoire sans besoin de réalignement ou d'optimisation. Il est aussi fiable ; nous avons pris des mesures sur 8 patients *in vivo* et aucun résultat n'a été rejeté. Cela se traduit aussi par un faible temps de préparation avant les mesures.

Les résultats montrés à la figure 7.5 présentent de fortes similarités avec les images *ex vivo* du précédent chapitre. Les critères qualitatifs établis permettent de bien différencier les tissus rencontrés dans le contexte intra-opératoire. Par contre, tout n'est pas simple : de nombreuses structures peuvent être visibles et difficiles à interpréter. La vue tridimensionnelle est un aspect important qui permet de gérer ces difficultés. Une vue volumétrique permet d'observer dans leur contexte les structures et permet une interprétation des images mieux informée. L'interprétation qualitative des images est complexe et il est important qu'elle soit faite en synergie avec les éléments apportés par le chirurgien. Ce dernier reste la personne la plus expérimentée et apte à déterminer le type de tissu. Même dans le cas d'une analyse extemporanée, les résultats peuvent être non concluants et la responsabilité retombe sur les épaules du chirurgien d'agir en conséquence. C'est pourquoi l'outil proposé ici ne vient pas remplacer ce qui se fait actuellement, mais propose plutôt un outil qui peut apporter une information microscopique en profondeur en quelques minutes, ce qui peut mener vers des gains de temps considérables en chirurgie.

L'avantage à ce niveau de la sonde en contact est qu'elle est facile à préparer pour imager. Il faut une à deux minutes à l'infirmier interne pour insérer la sonde dans le sac stérile et la rendre disponible au chirurgien. De plus, comme la sonde n'a pas besoin d'être envoyée à la stérilisation, la même sonde peut être utilisée pour tous les cas de la même journée. Notre chariot se déplace facilement pour être à portée du patient et l'écran sur un bras articulé permet aux personnes concernées de regarder les résultats en temps réel. À ce moment, il faut encore un opérateur expérimenté pour utiliser le logiciel et le système, mais il est concevable qu'une courte formation puisse permettre au personnel médical d'utiliser le système. Cette hypothèse est confirmée par les travaux de Dr. Fouzi Benboujja dans sa thèse [146]. Dans son projet, il utilise un système très similaire à celui utilisé dans ce projet et est entièrement opéré par le personnel médical.

L'interprétation des images OCT demande aussi une certaine expérience ou une formation. Plusieurs structures peuvent être visibles dans le champ de vue et cela peut être difficile à

interpréter. Le champ opératoire comporte de nombreuses zones cauterisées pour limiter les pertes sanguines. Cette cauterisation dénature les tissus, ce qui ajoute des difficultés supplémentaires d'interprétation. Nous avons réalisé des mesures «à l'aveugle», où le chirurgien ne mentionne pas ce qu'il image et les images sont interprétées sans *a priori*. Ces résultats n'ont pas été officiellement compilés, mais ont quand même mis en exergue deux points importants. Cette technologie démontre un fort potentiel pour identifier les tissus. Toutefois, l'information provenant du chirurgien est nécessaire dans plusieurs cas. Bien que des structures comme du tissu adipeux peuvent être identifiées facilement sur les images, la présence de glandes parathyroïdes ou de ganglions reste difficile à établir de manière certaine dans toutes les situations.

C'est pourquoi dans le but de rendre cet outil accessible et utilisable en chirurgie, nous débutons un projet de formation des patrons et résidents ORL à interpréter les images OCT. Cette étude montrera d'abord une série d'images identifiées avec des explications permettant de comprendre comment on peut déduire de quel type de tissu il s'agit. Ensuite, une série d'images non identifiées sera présentée aux participants qui devront utiliser leurs connaissances nouvellement acquises pour déterminer leur habileté à différencier les tissus entre eux. Cela nous permettra d'établir la difficulté pour les professionnels médicaux à s'approprier cette nouvelle technologie. Cela initiera une transition durant laquelle les patrons et résidents apprendront à utiliser la sonde tout en générant davantage de données pour entraîner un algorithme de classification des tissus.

Les utilisateurs de la sonde ont fait ressortir un point important. Le design de la sonde doit être amélioré en réduisant le diamètre de la sonde à une valeur de 5 mm à 8 mm. Cette «taille d'un crayon» permettrait une visée beaucoup plus précise pour le chirurgien. Ce dernier sait précisément le tissu qu'il veut identifier et pouvoir pointer précisément ce tissu et obtenir une image contenant seulement ce tissu serait la situation idéale. Cela faciliterait aussi l'interprétation des images. La diminution de champ de vue qui accompagne la diminution du diamètre de la sonde ne devrait pas être un problème selon les chirurgiens sondés. L'utilisation de la sonde permet donc d'orienter le prochain design de sonde. Ce changement de paradigme est venu avec l'utilisation de la sonde et aurait été difficilement pu être prévu.

## 7.7 Conclusion

Ce chapitre a permis de montrer que l'OCT est une technique adaptée à l'identification intra-opératoire des tissus du cou durant les chirurgies de la thyroïde et de la parathyroïde. Une sonde adaptée au contexte chirurgical et à l'imagerie *in vivo* est présentée, appuyée par les premiers résultats sur huit patients. Ces mesures démontrent un fort lien avec les résultats *ex*

*vivo*, tout en montrant qu'il faut obtenir plus de données *in vivo* pour améliorer la sonde et devenir meilleur à interpréter les images. Les commentaires des chirurgiens et résidents ayant utilisé la sonde permettent de guider le design d'une nouvelle version de la sonde, encore mieux adaptée au contexte et à l'utilisation que le personnel médical veut en faire. Cette étude pilote avec 8 patients montre la place de l'OCT pour identifier les tissus durant les chirurgies. L'impact sur le déroulement des chirurgies reste à évaluer dans une étude future, mais les résultats tendent à montrer que l'implantation de cette technologie pourrait réduire le nombre d'échantillons envoyés en congélation et réduire le temps de la dissection, donc le temps de l'opération.

## CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le sujet de ce doctorat est de proposer une instrumentation permettant l'identification des tissus durant les chirurgies de la thyroïde et de la parathyroïde. Les résultats présentés dans les chapitres précédents montrent des améliorations technologiques à des systèmes d'imagerie pour améliorer leur implémentation clinique et montrent l'application des systèmes développés à l'identification des tissus d'abord *ex vivo* puis *in vivo*.

Cette thèse adresse une série d'objectifs dans le but de développer un instrument utilisable par les chirurgiens. Les choix ont donc été réalisés en fonction des résultats obtenus en tenant compte des contraintes de l'implantation en salle de chirurgie. Les différentes modalités d'imagerie identifiées dans la littérature : microscopie confocale en réflectance, tomographie par cohérence optique et imagerie en fluorescence ont été étudiées pour leur potentiel à adresser la problématique. Comme ces technologies sont complètement nouvelles pour le personnel médical, il est important de ne pas surcharger d'information les utilisateurs et se concentrer sur ce qui peut fonctionner à tout coup. En salle de chirurgie, il n'y a pas de temps disponible pour la résolution de problèmes. Toutes les parties du système d'imagerie doivent fonctionner à tous les coups. C'est pourquoi nous avons laissé de côté les modalités qui, bien qu'elles apportent de l'information pertinente et potentiellement nécessaire pour bien distinguer tous les tissus, elles présentent un risque de ne pas fonctionner ou de ne pas fournir de données utilisables. La profondeur de pénétration de la MCR, même améliorée par le coupleur à double gaine, n'est pas suffisante pour imager à travers la capsule de chacun des échantillons systématiquement. Cela mène directement à un grand nombre d'occasions où les données acquises *ex vivo* ou *in vivo* ne seraient pas concluantes.

Les mesures de la fluorescence de la parathyroïde n'ont pas fourni des résultats positifs à toutes les mesures. Dans les mêmes conditions expérimentales (instrument utilisé, temps d'intégration, puissance d'illumination), des mesures sur des échantillons de parathyroïde et de thyroïde ne permettaient pas de mesurer un signal d'autofluorescence à tous les coups. De plus, il faudrait éteindre les lampes en salle de chirurgie pour obtenir un rapport signal-sur-bruit adéquat, ce que les chirurgiens n'étaient pas prêts à faire. Cela perturbe trop le flot normal de la chirurgie.

Nous avons donc finalement sélectionné l'OCT. En améliorant le système d'imagerie, il peut maintenant s'adapter à des mesures sur le microscope et avec la sonde à main. Il est possible de passer d'un instrument à l'autre très rapidement. Il suffit de remplacer la lentille de scan du microscope par le tube contenant l'optique de la sonde et déplacer le miroir du bras de

référence à la marque pré-installée pour la sonde. Cela permet de prendre des mesures *ex vivo* et *in vivo* avec un délai très court entre les deux. Notre choix a aussi été confirmé par le fait que toutes nos données sont utilisables. Mis à part quelques artefacts de repliement sur certains volumes très irréguliers, tous les volumes présentent un fort rapport signal sur bruit et une grande profondeur de pénétration dans les tissus. Les mesures *in vivo* sont aussi de très bonne qualité. L'imagerie n'est pas gênée par la présence de sang sur le sac stérile ou sur le tissu imagé. Nos résultats montrent donc que notre système d'imagerie OCT est bien adapté au contexte. Les données de classification montrent aussi que cette modalité peut très bien remplir l'objectif de distinguer les tissus et de fournir une réponse très rapide au chirurgien sans qu'il ait à interpréter les images.

## CHAPITRE 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

### 9.1 Synthèse des travaux

Dans cette thèse, j'ai présenté plusieurs contributions en instrumentation optique et en imagerie peropératoire. J'ai d'abord montré une méthode rapide et efficace pour intégrer un contraste de fluorescence à un montage d'encodage spectral. Cette méthode présente une grande amélioration par rapport à la solution précédemment proposée par un autre groupe de recherche [62]. De plus, un laser à balayage en longueur d'onde à 780 nm rapide et puissant a été fabriqué pour utiliser cette technologie avec des fluorophores approuvés pour l'utilisation clinique ou endogènes. J'ai ensuite démontré qu'il était possible de fabriquer un coupleur en fibre optique à double gaine pour la microscopie confocale. Il était d'abord cru qu'il était impossible de fabriquer un coupleur efficace avec un tel type de fibres. En plus d'avoir fabriqué et caractérisé ce coupleur, je l'ai utilisé dans un montage de microscopie confocale à balayage laser pour une preuve de concept et dans un microscope confocal à encodage spectral. Un microscope tri-modal combinant efficacement la microscopie confocale en encodage spectral, l'imagerie en fluorescence par encodage spectral et la tomographie par cohérence optique a été conçu, assemblé et caractérisé. Cette combinaison a été rendue possible grâce aux contributions précédemment nommées et par la conception d'un laser à double bande à balayage en longueur d'onde. Ce microscope a été utilisé pour valider le contraste des différentes modalités de microscopie optique identifiées pour distinguer les tissus du cou pour assister durant les chirurgies de la thyroïde.

Dans le but de démontrer le potentiel de la microscopie optique pour l'identification des tissus du cou chez l'humain, un système de tomographie par cohérence optique a été optimisé puis transporté à l'hôpital Notre-Dame pour réaliser des mesures *ex vivo* sur des tissus retirés durant les thyroïdectomies. Le système d'imagerie permet de réaliser des mesures *ex vivo* sur des tissus retirés lors de chirurgies de la thyroïde ou de la parathyroïde. Une étude pilote sur 30 patients a été réalisée pour récolter un maximum de spécimens différents pour établir des critères pour bien différencier la thyroïde, la parathyroïde, le ganglion et le gras. Les résultats obtenus ont été corrélés à l'histologie et des critères qualitatifs de description de chaque tissu ont été extraits. Des tissus sains et pathologiques ont été étudiés dans le but de mieux répondre au besoin clinique. Une étude préliminaire de classification par apprentissage machine est en cours et classe les tissus à partir de métriques de texture et de reconnaissance de formes. Enfin, dans le but de démontrer l'applicabilité de la tomographie par cohérence optique à l'imagerie intra-opératoire, une sonde à main a été conçue, simulée numériquement,

bâtie et utilisée sur 8 patients durant des chirurgies de la thyroïde et de la parathyroïde. Les résultats obtenus concordent avec les résultats *ex vivo* et permettent d'identifier les structures durant l'opération. L'instrument résultant est rapide, facile à utiliser et facile à intégrer dans la zone stérile. Les avantages reliés à l'imagerie tridimensionnelle ont été mis en évidence pour la reconnaissance de formes et structures d'intérêt.

## 9.2 Limitations de la solution proposée

J'ai présenté des résultats d'imagerie *ex vivo* sur des tissus humains sains et pathologiques. Ces tissus montrent une grande variabilité, particulièrement dans les cas pathologiques. Ce projet reste dans le spectre d'une étude pilote, en ce qui a trait au nombre de patients (30) et d'échantillons (136). Une limitation évidente est qu'il faut augmenter le nombre d'échantillons pour pouvoir tenir des conclusions plus solides et renforcer l'étude. Une première approximation du nombre de spécimens par type de tissu est de 50. Ce nombre a été approximé après discussion avec l'équipe médicale de recherche. Une étude statistique est nécessaire pour déterminer avec précision ce nombre de spécimens. Pour certains tissus, il est difficile d'établir des critères clairs de distinction et une analyse visuelle ne permet pas une discrimination claire de tissus pathologiques. Il est possible qu'à ce point-ci, l'OCT seule ne puisse permettre de distinguer tous les tissus rencontrés et que des méthodes de contraste additionnelles soient nécessaires pour améliorer la sensibilité et la spécificité de l'instrument.

Le temps est un élément critique dans le cadre de chirurgies. C'est sur cet aspect que nous pensons pouvoir avoir un impact en réduisant les délais liés à l'identification des tissus. Plusieurs facteurs influencent le temps nécessaire de la prise de données jusqu'à la prise de décision. Les données volumétriques doivent être traitées pour afficher des images qui doivent ensuite être interprétées pour qu'une identification puisse être faite. Ces étapes viennent augmenter le temps nécessaire à l'identification d'un tissu. Ce temps nécessaire est du temps de chirurgie, ce qui est différent du temps de pathologie actuellement utilisé pour identifier les tissus par analyse extemporanée. La difficulté principale de cette étape est l'analyse des images. Pour l'instant, seulement quelques personnes ont étudié suffisamment d'images pour être capable de tirer des conclusions sur les résultats. Il est difficile pour un médecin de regarder les images OCT et en retirer un type de tissu. C'est généralement le travail du pathologiste d'analyser des images et d'identifier le tissu et de le communiquer au chirurgien.

L'étude *in vivo* a permis d'évaluer le prototype de sonde pour son utilisabilité en chirurgie et certains points d'amélioration ont été soulevés. Le diamètre de la sonde est le point le plus important. Il faut le réduire pour faciliter la visée sur un échantillon et couvrir un champ de vue plus faible. Les utilisateurs de la sonde ont déterminé qu'il est plus important d'avoir

une sonde de plus petit diamètre que d'avoir un grand champ de vue. Le chirurgien préfère prendre en charge la localisation précise de l'endroit qu'il veut inspecter plutôt que d'imager une grande région et sélectionner une région d'intérêt. En obtenant un champ de vue plus petit que le tissu à identifier, on peut plus facilement interpréter les images, car il n'y aurait potentiellement qu'un type de tissu. Cela est un changement de point de vue par rapport au design original. Ce nouveau design doit rester ergonomique, facile à prendre en main et à utiliser.

### 9.3 Améliorations futures

Les travaux futurs proposés ici permettront d'adresser certaines des limitations identifiées à la section précédente et de repousser les limites des connaissances actuelles.

Le tissu le plus important à identifier pour notre sonde est la glande parathyroïde. Bien que plusieurs tissus se ressemblent fortement à l'OCT et qu'il est intéressant de tous les distinguer, la parathyroïde reste la priorité, car elle est le tissu à préserver pour limiter les complications post-opératoires. Dans cette ligne de pensée, la méthode de contraste supplémentaire à intégrer est l'autofluorescence dans le proche infrarouge pour pouvoir distinguer la glande parathyroïde des tissus environnants. Plus de mesures en fluorescence doivent être prises pour mieux caractériser ce signal et pouvoir l'intégrer à une sonde combinant l'OCT et la fluorescence. Des travaux préliminaires ont déjà été réalisés dans ce sens en utilisant une fibre à double gaine pour guider le signal OCT et le signal d'autofluorescence. J'ai participé au développement d'un coupleur à double gaine pour ce genre d'applications et j'ai réalisé un montage d'OCT et de fluorescence à 780 nm conjointement avec Wendy-Julie Madore. Les résultats préliminaires sont présentés à l'annexe E. En optimisant la détection et l'acquisition du signal d'autofluorescence, quelques mesures spectroscopiques pourraient être extraites par volume OCT et fourniraient des indices sur la présence d'une parathyroïde dans le volume sondé. À ce stade et avec les mesures préliminaires d'intensité du signal d'autofluorescence, il est ambitieux de croire que nous pourrions réaliser une image en deux dimensions de la distribution du signal d'autofluorescence, mais quelques mesures ponctuelles pourraient suffire à établir la présence ou non d'une glande parathyroïde.

En ce qui a trait au temps consacré à l'analyse des images, certaines pistes ont déjà été explorées et méritent d'être approfondies dans des travaux futurs. Le traitement des données volumétriques prend un certain temps qu'il serait intéressant d'éliminer pour l'utilisation en chirurgie. Plusieurs groupes ont proposé des traitement sur processeur graphique pour traiter massivement les données en parallèle, ce qui peut réduire le temps de traitement de manière importante. Sur le marché, il existe maintenant des cartes d'acquisition qui peuvent calculer

la transformée de Fourier du signal en temps réel sur le processeur programmable embarqué sur la carte [147]. Les données traitées peuvent donc être récupérées directement de la carte et limiter grandement la demande sur le processeur pour gérer ces grandes quantités de données. Le processeur graphique est donc libéré pour réaliser l'affichage du volume de données. Il serait donc très bénéfique d'implanter ces améliorations. Il faudrait toutefois repenser le logiciel dans son entièreté, il faudrait abandonner le logiciel fourni par la compagnie et repartir du début avec un logiciel maison adapté aux besoins que nous avons identifiés.

Pour l'interprétation des images, deux options principales se présentent et devraient être poursuivies en parallèle. D'abord, il faut apprendre aux premiers utilisateurs de la sonde à reconnaître les critères qualitatifs pour discriminer les tissus. Cela permettra d'augmenter la quantité de données à notre disposition si les chirurgiens peuvent utiliser la sonde de leur côté. Ces données supplémentaires pourront être utilisées pour alimenter l'analyse quantitative. Cette analyse quantitative pourra ensuite être combinée à une méthode de classification qui pourra fournir une identification automatique des tissus ou une segmentation des volumes pour montrer les différents tissus présents. Cela permettra finalement d'éliminer l'interprétation par l'utilisateur de la sonde. Toutefois, la classification des données OCT est un défi très complexe et les résultats actuels n'atteignent pas ce qui se voit dans d'autres domaines comme en spectroscopie Raman [148]. Comme il existe des différences qualitatives claires sur la plupart des tissus, il est logique de croire que cette application se prête bien à la classification machine des résultats.

L'objectif initial de ce projet était de combiner la microscopie confocale à l'OCT et bien que ce soit accompli dans un montage de table, la combinaison dans une sonde à main n'est pas atteinte. Le design de ce genre de sonde est assez complexe et il est difficile de maintenir une grande ouverture numérique pour la microscopie confocale tout en ayant une sonde de petit diamètre. L'arrivée prochaine sur le marché de mécanismes de balayage à base de miroirs actionnés par des MEMS pourrait simplifier le design et diminuer l'empreinte de la sonde. La combinaison de la microscopie confocale et de l'OCT pourrait, lorsque tout fonctionne bien, aider à distinguer les ganglions métastatiques des ganglions normaux et des parathyroïdes et faciliter les dissections cervicales dans le cas de métastases de cancer de la thyroïde.

#### 9.4 Perspectives

L'instrumentation développée durant ce doctorat a permis de faire avancer le domaine de l'instrumentation optique. Mon travail a couvert tous les niveaux de développement d'instrumentation optique, du laser au logiciel en passant par le microscope et la sonde. Certains éléments qu'il était cru comme impossible à fabriquer, tel un coupleur à double gaine pour

la microscopie confocale, ont été développés avec succès avec un impact potentiel très grand dans le domaine de la microscopie et de l'endomicroscopie. Ce travail multi-disciplinaire a requis d'interagir aussi avec des chirurgiens et des pathologistes pour valider les résultats et les progrès. Le groupe de chirurgiens ORL du CHUM sont très enthousiastes à utiliser ces nouveaux outils. Par plusieurs présentations dans des conférences médicales, la réponse de la communauté médicale semble très positive.

Dans le but de faire approuver cette technologie pour l'utilisation chez l'humain, il est impératif de poursuivre la prise de mesures *ex vivo* et *in vivo*. D'un point de vue instrumentation, le système est stable, robuste et simple à utiliser. Un plus grand nombre de patients est nécessaire pour démontrer de façon claire ce que nous pensons : cet instrument peut faire gagner du précieux temps de chirurgie et réduire le risque de complications. Cet instrument peut aussi permettre de favoriser un rapprochement entre la chirurgie et la pathologie. Les pathologistes ont une grande habileté à remarquer des détails sur des images microscopiques et leur aide pourrait aider à faciliter l'intégration de nouvelles technologies en chirurgie.

## RÉFÉRENCES

- [1] A. Fercher et W. Drexler, "Optical coherence tomography-principles and applications," *Reports on progress in Physics*, vol. 239, 2003.
- [2] W. Drexler *et al.*, "Optical coherence tomography today : speed, contrast, and multimodality." *Journal of biomedical optics*, vol. 19, no. 7, p. 71412, jul 2014.
- [3] M. Strupler *et al.*, "Rapid spectrally encoded fluorescence imaging using a wavelength-swept source." *Optics letters*, vol. 35, no. 11, pp. 1737–9, jun 2010.
- [4] D. Linos et W. Y. Chung, *Minimally Invasive Thyroidectomy*, Springer ed., 2012.
- [5] J. A. Sosa *et al.*, "The importance of surgeon experience for clinical and economic outcomes from thyroidectomy." *Annals of surgery*, vol. 228, no. 3, pp. 320–30, 1998.
- [6] N. Foundation, *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1901-1921*, N. Foundation, Ed. Elsevier Publishing Company, 1967.
- [7] G. M. Doherty, *Thyroid and Parathyroid*, A. E. C. et al., Ed. Springer, 2006.
- [8] I. Vassiliou *et al.*, "Total thyroidectomy as the single surgical option for benign and malignant thyroid disease : a surgical challenge." *Archives of medical science : AMS*, vol. 9, no. 1, pp. 74–8, feb 2013.
- [9] E. I. Efremidou *et al.*, "The efficacy and safety of total thyroidectomy in the management of benign thyroid disease : a review of 932 cases." *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie*, vol. 52, no. 1, pp. 39–44, feb 2009.
- [10] Société Canadienne du Cancer. (2015, mai) Comité consultatif de la Société canadienne du cancer - Statistiques canadiennes sur le cancer 2015. [En ligne]. Disponible : <http://www.cancer.ca/statistiques>
- [11] G. Eknayan, "A history of the parathyroid glands." *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, vol. 26, no. 5, pp. 801–807, 1995.
- [12] J. DuBose, T. Ragsdale, et J. Morvant, ""Bodies so tiny" : The history of parathyroid surgery," *Current Surgery*, vol. 62, no. 1, pp. 91–95, 2005.
- [13] Z. W. Baloch et V. A. LiVolsi, "Pathology of the parathyroid glands in hyperparathyroidism," *Seminars in Diagnostic Pathology*, vol. 30, no. 3, pp. 165–177, 2013.
- [14] L. Rosato *et al.*, "Complications of Thyroid Surgery : Analysis of a Multicentric Study on 14,934 Patients Operated on in Italy over 5 Years," *World Journal of Surgery*, vol. 28, no. 3, pp. 271–276, 2004.

- [15] M. Hermann *et al.*, "Laryngeal recurrent nerve injury in surgery for benign thyroid diseases : effect of nerve dissection and impact of individual surgeon in more than 27,000 nerves at risk." *Annals of surgery*, vol. 235, no. 2, pp. 261–8, feb 2002.
- [16] R. S. Sippel *et al.*, "Risks and consequences of incidental parathyroidectomy during thyroid resection." *ANZ journal of surgery*, vol. 77, no. 1-2, pp. 33–6, 2007.
- [17] A. Manouras *et al.*, "Unintentional parathyroidectomy during total thyroidectomy," *Head & Neck*, vol. 30, no. 4, pp. 497–502, 2008.
- [18] N. Zahedi Niaki *et al.*, "The Cost of Prolonged Hospitalization due to Postthyroidectomy Hypocalcemia : A Case-Control Study," *Advances in Endocrinology*, vol. 2014, no. JANUARY, pp. 1–4, 2014.
- [19] D. Glinoer *et al.*, "Clinical aspects of early and late hypocalcaemia afterthyroid surgery." *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, vol. 26, no. 6, pp. 571–7, 2000.
- [20] K. Becker, *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, ser. Prin & Practice of Endocrinolo. Lippincott Williams & Wilkins, 2001, no. p. 957.
- [21] B. Abboud *et al.*, "Careful examination of thyroid specimen intraoperatively to reduce incidence of inadvertent parathyroidectomy during thyroid surgery." *Archives of otolaryngology—head & neck surgery*, vol. 133, no. 11, pp. 1105–1110, 2007.
- [22] W. Halsted, "Hypoparathyreosis, status parathyreoprivus, and transplantation of the parathyroid glands," *Americal Journal of the Medical Sciences*, 1907.
- [23] J. L. Prince et J. M. Links, *Medical Imaging Signals and Systems*. Pearson Prentice Hall, 2006.
- [24] A. Brander *et al.*, "Clinical versus ultrasound examination of the thyroid gland in common clinical practice," *Journal of clinical ultrasound*, vol. 20, no. 1, pp. 37–42, 1992.
- [25] C. N. Patel *et al.*, "Clinical utility of ultrasound and 99mTc sestamibi SPECT/CT for preoperative localization of parathyroid adenoma inpatients with primary hyperparathyroidism," *Clinical Radiology*, vol. 65, no. 4, pp. 278–287, 2010.
- [26] Y. Noda *et al.*, "MRI of the thyroid for differential diagnosis of benign thyroid nodules and papillary carcinomas," *AJR. American journal of roentgenology*, vol. 204, no. 3, pp. W332–W335, 2015.
- [27] J. S. Choi *et al.*, "Preoperative staging of papillary thyroid carcinoma : comparison of ultrasound imaging and CT." *AJR. American journal of roentgenology*, vol. 193, no. 3, pp. 871–8, 2009.

- [28] G. Orchard et B. Nation, *Histopathology*, ser. Fundamentals of Biomedical Science. OUP Oxford, 2011.
- [29] E. Brender, A. Burke, et R. M. Glass, “Frozen Section Biopsy,” *Journal of the American Medical Association*, vol. 294, no. 24, p. 7424, 2005.
- [30] E. A. Darr et G. W. Randolph, “Management of laryngeal nerves and parathyroid glands at thyroidectomy,” *Oral Oncology*, vol. 49, no. 7, pp. 665–670, 2013.
- [31] L. J. DiNardo *et al.*, “Accuracy, utility, and cost of frozen section margins in head and neck cancer surgery.” *The Laryngoscope*, vol. 110, no. 10 Pt 1, pp. 1773–6, oct 2000.
- [32] G. L. Irvin, C. C. Solorzano, et D. M. Carneiro, “Quick intraoperative parathyroid hormone assay : surgical adjunct to allow limited parathyroidectomy, improve success rate, and predict outcome.” *World journal of surgery*, vol. 28, no. 12, pp. 1287–92, dec 2004.
- [33] L. L. Gordon *et al.*, “The validity of quick intraoperative parathyroid hormone assay : an evaluation in seventy-two patients based on gross morphologic criteria.” *Surgery*, vol. 126, no. 6, pp. 1030–5, dec 1999.
- [34] Q. Y. Duh *et al.*, “Intraoperative Parathyroid Aspiration and Parathyroid Hormone Assay as an Alternative to Frozen Section for Tissue Identification,” *World journal of surgery*, vol. 24, pp. 1319–1322, 2000.
- [35] D. A. Martinez *et al.*, “Intraoperative Identification of Parathyroid Gland Pathology : A New Approach,” *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 30, no. 9, pp. 1306–1309, 1995.
- [36] V. Pasta *et al.*, “Original technique for preoperative preparation of patients and intraoperative localization of parathyroid adenomas,” *G Chir*, vol. 36, no. 3, pp. 97–100, 2015.
- [37] M. P. Branda et al., “Optical Diagnosis for Thyroid and Parathyroid Tissues — A Review,” *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 50, no. January, pp. 670–677, 2015.
- [38] P. Atkins et J. de Paula, *Physical Chemistry*, 7th ed. Oxford University Press, 2002.
- [39] G. Pollack *et al.*, “Parathyroid surgery and methylen blue : a review with guidelines for safe intraoperative use.” *Laryngos*, vol. 119, no. 10, pp. 1941–1946, 2009.
- [40] Y. J. Suh *et al.*, “Indocyanine green as a near-infrared fluorescent agent for identifying parathyroid glands during thyroid surgery in dogs,” *Surgical Endoscopy*, vol. 29, no. 9, pp. 2811–2817, 2014.
- [41] C.-H. Tung, “Fluorescent peptide probes for in vivo diagnostic imaging.” *Biopolymers*, vol. 76, no. 5, pp. 391–403, jan 2004.

- [42] E. A. Te Velde *et al.*, "The use of fluorescent dyes and probes in surgical oncology." *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, vol. 36, no. 1, pp. 6–15, jan 2010.
- [43] R. B. Rosen *et al.*, "Simultaneous OCT/SLO/ICG imaging." *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 50, no. 2, pp. 851–60, mar 2009.
- [44] N. Zaidi *et al.*, "The utility of indocyanine green near infrared fluorescent imaging in the identification of parathyroid glands during surgery for primary hyperparathyroidism," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 113, no. 7, pp. 771–774, 2016.
- [45] C. Paras *et al.*, "Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands." *Journal of biomedical optics*, vol. 16, no. 6, p. 067012, jun 2011.
- [46] M. A. McWade *et al.*, "Label-free Intraoperative Parathyroid Localization With Near-Infrared Autofluorescence Imaging," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 99, no. 12, pp. 4574–4580, 2014.
- [47] M. a. McWade *et al.*, "A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands." *Surgery*, vol. 154, no. 6, pp. 1371–7; discussion 1377, dec 2013.
- [48] J. B. Pawley et R. Masters Barry R., *Handbook of Biological Confocal Microscopy, Second Edition*, J. Pawley, Ed. Springer, 1996, vol. 35, no. 9.
- [49] M. Minsky, "Microscopy apparatus," American Patent US 3 013 467 A, 1961.
- [50] R. H. Webb, "Confocal optical microscopy," *Reports on Progress in Physics*, vol. 59, no. 3, pp. 427–471, 1996.
- [51] J. Goodman, *Speckle phenomena in optics : Theory and applications*. Roberts and Co., 2007.
- [52] C. Glazowski et M. Rajadhyaksha, "Optimal detection pinhole for lowering speckle noise while maintaining adequate optical sectioning in confocal reflectance microscopes." *Journal of biomedical optics*, vol. 17, no. 8, p. 085001, aug 2012.
- [53] B. a. Flusberg *et al.*, "Fiber-optic fluorescence imaging." *Nature methods*, vol. 2, no. 12, pp. 941–50, dec 2005.
- [54] G. Oh, E. Chung, et S. H. Yun, "Optical fibers for high-resolution *in vivo* microendoscopic fluorescence imaging," *Optical Fiber Technology*, aug 2013.
- [55] K. C. Maitland *et al.*, "Single fiber confocal microscope with a two-axis gimbaled MEMS scanner for cellular imaging," *Optics Express*, vol. 14, no. 19, p. 8604, 2006.

- [56] C. Yin *et al.*, "Miniature in vivo MEMS-based line-scanned dual-axis confocal microscope for point-of-care pathology," *Biomedical Optics Express*, vol. 7, no. 2, p. 251, 2016.
- [57] G. J. Tearney, R. H. Webb, et B. E. Bouma, "Spectrally encoded confocal microscopy." *Optics letters*, vol. 23, no. 15, pp. 1152–4, aug 1998.
- [58] C. Boudoux *et al.*, "Rapid wavelength-swept spectrally encoded confocal microscopy," *Optics . . .*, vol. 13, no. 20, pp. 8214–8221, 2005.
- [59] D. Yelin *et al.*, "Three-dimensional miniature endoscopy." *Nature*, vol. 443, no. 7113, p. 765, oct 2006.
- [60] S. C. Schlachter *et al.*, "Spectrally encoded confocal microscopy of esophageal tissues at 100 kHz line rate." *Biomedical optics express*, vol. 4, no. 9, pp. 1636–45, jan 2013.
- [61] C. Boudoux, "Wavelength swept spectrally encoded confocal microscopy for biological and clinical applications," Thèse Ph.D. , Massachusetts Institute of Technology, 2007.
- [62] J. Motz *et al.*, "Spectral-and frequency-encoded fluorescence imaging," *Optics letters*, vol. 30, no. 20, pp. 2760–2762, 2005.
- [63] W. M. White *et al.*, "A novel, noninvasive imaging technique for intraoperative assessment of parathyroid glands : confocal reflectance microscopy." *Surgery*, vol. 128, no. 6, pp. 1088–1100 ; discussion 1100–1, dec 2000.
- [64] W. White *et al.*, "Confocal Reflectance Imaging of Head and Neck Surgical Specimens - A Comparison With Histologic Analysis," *Archives otolaryngology Head and Neck Surgery*, vol. 130, pp. 923–928, 2004.
- [65] D. Huang *et al.*, "Optical coherence tomography," *Science*, vol. 254, no. 5035, pp. 1178–1181, nov 1991.
- [66] M. J. Suter *et al.*, "Comprehensive microscopy of the esophagus in human patients with optical frequency domain imaging," *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 68, no. 4, pp. 745–753, 2008.
- [67] P. R. Pfau *et al.*, "Criteria for the diagnosis of dysplasia by endoscopic optical coherence tomography," *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 58, no. 2, pp. 196–202, 2003.
- [68] L. J. Diaz-Sandoval *et al.*, "Optical coherence tomography as a tool for percutaneous coronary interventions." *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, vol. 65, no. 4, pp. 492–6, aug 2005.
- [69] M. Wojtkowski *et al.*, "In vivo human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography." *Journal of biomedical optics*, vol. 7, no. 3, pp. 457–463, 2002.

- [70] S. Yun *et al.*, “High-speed optical frequency-domain imaging.” *Optics express*, vol. 11, no. 22, pp. 2953–63, nov 2003.
- [71] M. Choma *et al.*, “Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography.” *Optics express*, vol. 11, no. 18, pp. 2183–9, sep 2003.
- [72] J. F. de Boer *et al.*, “Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time-domain optical coherence tomography.” *Optics letters*, vol. 28, no. 21, pp. 2067–9, nov 2003.
- [73] Y. Jian, K. Wong, et M. V. Sarunic, “Graphics processing unit accelerated optical coherence tomography processing at megahertz axial scan rate and high resolution video rate volumetric rendering.” *Journal of biomedical optics*, vol. 18, no. 2, p. 26002, feb 2013.
- [74] T. Wang *et al.*, “Heartbeat OCT : in vivo intravascular megahertz-optical coherence tomography.” *Biomedical optics express*, vol. 6, no. 12, pp. 5021–32, 2015.
- [75] L. Pantanowitz *et al.*, “High-resolution imaging of the thyroid gland using optical coherence tomography.” *Head & neck*, vol. 26, no. 5, pp. 425–34, may 2004.
- [76] C. Zhou *et al.*, “Ex vivo imaging of human thyroid pathology using integrated optical coherence tomography and optical coherence microscopy.” *Journal of biomedical optics*, vol. 15, no. 1, p. 016001, 2010.
- [77] L. C. C. de Freitas *et al.*, “Optical coherence tomography during thyroid and parathyroid surgery : A novel system of tissue identification and differentiation to obviate tissue resection and frozen section,” *Head & Neck*, 2013.
- [78] R. Ladurner *et al.*, “Optical coherence tomography as a method to identify parathyroid glands,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 45, no. 10, pp. 654–659, 2013.
- [79] S. Sommerey *et al.*, “Backscattering intensity measurements in optical coherence tomography as a method to identify parathyroid glands,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 47, no. 6, pp. 526–532, 2015.
- [80] S. Sommerey *et al.*, “Intraoperative optical coherence tomography imaging to identify parathyroid glands.” *Surgical endoscopy*, vol. 29, no. 9, pp. 2698–704, 2015.
- [81] D. Yelin *et al.*, “Double-clad fiber for endoscopy.” *Optics letters*, vol. 29, no. 20, pp. 2408–10, oct 2004.
- [82] H. Yoo *et al.*, “Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging in vivo.” *Nature medicine*, vol. 17, no. 12, pp. 1680–4, dec 2011.
- [83] D. Lorensen *et al.*, “Dual-modality needle probe for combined fluorescence imaging and three-dimensional optical coherence tomography.” *Optics letters*, vol. 38, no. 3, pp. 266–8, feb 2013.

- [84] L. Scolaro *et al.*, “Molecular imaging needles : dual-modality optical coherence tomography and fluorescence imaging of labeled antibodies deep in tissue.” *Biomedical optics express*, vol. 6, no. 5, pp. 1767–81, 2015.
- [85] L. Fu, X. Gan, et M. Gu, “Nonlinear optical microscopy based on double-clad photonic crystal fibers.” *Optics express*, vol. 13, no. 14, pp. 5528–34, jul 2005.
- [86] L. Wang *et al.*, “Optical probe based on double-clad optical fiber for fluorescence spectroscopy.” *Optics express*, vol. 15, no. 26, pp. 17681–9, dec 2007.
- [87] S. Y. Ryu *et al.*, “Combined system of optical coherence tomography and fluorescence spectroscopy based on double-cladding fiber.” *Optics letters*, vol. 33, no. 20, pp. 2347–9, oct 2008.
- [88] S. Lemire-Renaud *et al.*, “Double-clad fiber coupler for endoscopy.” *Optics express*, vol. 18, no. 10, pp. 9755–64, may 2010.
- [89] J. Mavadia *et al.*, “An all-fiber-optic endoscopy platform for simultaneous OCT and fluorescence imaging.” *Biomedical optics express*, vol. 3, no. 11, pp. 2851–9, nov 2012.
- [90] S. Lemire-Renaud *et al.*, “Double-clad fiber with a tapered end for confocal endomicroscopy.” *Biomedical optics express*, vol. 2, no. 11, pp. 2961–72, nov 2011.
- [91] W.-J. Madore *et al.*, “Asymmetric double-clad fiber couplers for endoscopy.” *Optics letters*, vol. 38, no. 21, pp. 4514–7, nov 2013.
- [92] S. H. Yun *et al.*, “Extended-Cavity Semiconductor Wavelength-Swept Laser for Biomedical Imaging.” *IEEE photonics technology letters : a publication of the IEEE Laser and Electro-optics Society*, vol. 16, no. 1, pp. 293–295, jan 2004.
- [93] W. Y. Oh *et al.*, “115 kHz tuning repetition rate ultrahigh-speed wavelength-swept semiconductor laser.” *Optics letters*, vol. 30, no. 23, pp. 3159–61, dec 2005.
- [94] M. K. K. Leung *et al.*, “High-power wavelength-swept laser in Littman telescope-less polygon filter and dual-amplifier configuration for multichannel optical coherence tomography.” *Optics letters*, vol. 34, no. 18, pp. 2814–6, sep 2009.
- [95] R. Huber *et al.*, “Amplified, frequency swept lasers for frequency domain reflectometry and OCT imaging : design and scaling principles.” *Optics express*, vol. 13, no. 9, pp. 3513–28, may 2005.
- [96] B. R. Biedermann *et al.*, “Recent developments in Fourier domain mode locked lasers for optical coherence tomography : Imaging at 1310 nm vs. 1550 nm wavelength,” *Journal of Biophotonics*, vol. 2, no. 6-7, pp. 357–363, 2009.
- [97] A. Unterhuber *et al.*, “In vivo retinal optical coherence tomography at 1040 nm - enhanced penetration into the choroid.” *Optics express*, vol. 13, no. 9, pp. 3252–3258, 2005.

- [98] V. J. Srinivasan *et al.*, “High-speed, high-resolution optical coherence tomography retinal imaging with a frequency-swept laser at 850 nm,” *Optics Letters*, vol. 32, no. 4, p. 361, 2007.
- [99] S. W. Lee, C. S. Kim, et B. M. Kim, “External line-cavity wavelength-swept source at 850 nm for optical coherence tomography,” *IEEE Photonics Technology Letters*, vol. 19, no. 3, pp. 176–178, 2007.
- [100] H. Lim *et al.*, “Optical frequency domain imaging with a rapidly swept laser in the 815-870 nm range.” *Optics express*, vol. 14, no. 13, pp. 5937–44, jun 2006.
- [101] M. Strupler *et al.*, “Rapidly Wavelength-swept Laser at 780 nm,” *Photonics Technology Letters, IEEE*, vol. 23, no. 99, pp. 1–1, 2011.
- [102] K. Inoue, T. Mukai, et T. Saitoh, “Nearly degenerate four-wave mixing in a traveling-wave semiconductor laser amplifier,” *Applied Physics Letters*, vol. 51, no. 14, pp. 1051–1053, 1987.
- [103] N. Goulamhoussen, “Laser à balayage spectral double-bande pour l'imagerie biomédicale multimodale,” Thése Ph.D. , Ecole Polytechnique Montréal, 2013.
- [104] D. Schellingerhout *et al.*, “Fluorescence imaging of fast retrograde axonal transport in living animals,” *Molecular Imaging*, vol. 8, no. 6, pp. 319–329, 2009.
- [105] C. Sheppard et T. Wilson, “Image Formation in Scanning Microscopes with Partially Coherent Source and Detector,” *Optica Acta : International Journal of Optics*, vol. 25, no. 4, pp. 315–325, nov 2010.
- [106] R. Juskaitis et T. Wilson, “Differential confocal scanning microscope with a two-mode optical fiber.” *Applied optics*, vol. 31, no. 7, pp. 898–902, 1992.
- [107] T. Wilson et a. R. Carlini, “Size of the detector in confocal imaging systems,” *Optics Letters*, vol. 12, no. 4, p. 227, apr 1987.
- [108] M. Rajadhyaksha *et al.*, “In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II : advances in instrumentation and comparison with histology.” *The Journal of investigative dermatology*, vol. 113, no. 3, pp. 293–303, sep 1999.
- [109] G. Pellacani *et al.*, “The impact of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnostic accuracy of melanoma and equivocal melanocytic lesions.” *The Journal of investigative dermatology*, vol. 127, no. 12, pp. 2759–65, dec 2007.
- [110] R. H. Webb, G. W. Hughes, et F. C. Delori, “Confocal scanning laser ophthalmoscope,” *Applied Optics*, vol. 26, pp. 1492–1499, 1987.
- [111] A. Bindewald *et al.*, “Visualization of retinal pigment epithelial cells in vivo using digital high-resolution confocal scanning laser ophthalmoscopy,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 137, pp. 556 – 558, 2004.

- [112] L. M. Zangwill *et al.*, “The rate of structural change : The confocal scanning laser ophthalmoscopy ancillary study to the ocular hypertension treatment study,,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 155, pp. 971 – 982, 2013.
- [113] V. Becker *et al.*, “Needle-based confocal endomicroscopy for in vivo histology of intra-abdominal organs : first results in a porcine model (with videos).” *Gastrointestinal endoscopy*, vol. 71, no. 7, pp. 1260–6, jun 2010.
- [114] V. J. a. Konda *et al.*, “First assessment of needle-based confocal laser endomicroscopy during EUS-FNA procedures of the pancreas (with videos).” *Gastrointestinal endoscopy*, vol. 74, no. 5, pp. 1049–60, nov 2011.
- [115] H. Neumann *et al.*, “Confocal laser endomicroscopy : technical advances and clinical applications.” *Gastroenterology*, vol. 139, no. 2, pp. 388–92, 392.e1–2, aug 2010.
- [116] R. Kiesslich *et al.*, “In vivo histology of Barrett’s esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy.” *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, vol. 4, no. 8, pp. 979–87, aug 2006.
- [117] N. Q. Nguyen et R. W. L. Leong, “Current application of confocal endomicroscopy in gastrointestinal disorders.” *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 23, no. 10, pp. 1483–91, oct 2008.
- [118] P. S.-P. Thong *et al.*, “Laser confocal endomicroscopy as a novel technique for fluorescence diagnostic imaging of the oral cavity.” *Journal of biomedical optics*, vol. 12, no. 1, p. 014007, 2014.
- [119] L. Thiberville *et al.*, “Confocal fluorescence endomicroscopy of the human airways.” *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 6, no. 5, pp. 444–9, aug 2009.
- [120] F. S. Fuchs *et al.*, “Fluorescein-aided confocal laser endomicroscopy of the lung.” *Respiration ; international review of thoracic diseases*, vol. 81, no. 1, pp. 32–8, jan 2011.
- [121] D. Kang *et al.*, “Endoscopic probe optics for spectrally encoded confocal microscopy.” *Biomedical optics express*, vol. 4, no. 10, pp. 1925–36, jan 2013.
- [122] T. Birks et Y. Li, “The shape of fiber tapers,” *Lightwave Technology, Journal of*, vol. 10, no. 4, pp. 432–438, Apr 1992.
- [123] S. Lacroix, N. Godbout, et X. Daxhelet, *Optical fiber components : Design and applications*, H. Hamam, Ed. Research Signpost, 2006.
- [124] J. Bures, *Guided Optics : Optical Fibers and fiber components*, Wiley et Sons, Eds. John Wiley and Sons, 2009.

- [125] D. K. Kang *et al.*, “Co-registered spectrally encoded confocal microscopy and optical frequency domain imaging system.” *Journal of microscopy*, vol. 239, no. 2, pp. 87–91, aug 2010.
- [126] E. Barhoum, R. Johnston, et E. Seibel, “Optical modeling of an ultrathin scanning fiber endoscope, a preliminary study of confocal versus non-confocal detection,” *Optics Express*, vol. 13, no. 19, pp. 1180–1185, 2005.
- [127] H. Pahlevaninezhad *et al.*, “A high-efficiency fiber-based imaging system for co-registered autofluorescence and optical coherence tomography.” *Biomedical optics express*, vol. 5, no. 9, pp. 2978–87, sep 2014.
- [128] H. Bao *et al.*, “Nonlinear endomicroscopy using a double-clad fiber coupler.” *Optics letters*, vol. 35, no. 7, pp. 995–7, Avr. 2010.
- [129] A. Abramov, L. Minai, et D. Yelin, “Multiple-channel spectrally encoded imaging.” *Optics express*, vol. 18, no. 14, pp. 14 745–51, jul 2010.
- [130] T. Rix et P. Sinha, “Inadvertent parathyroid excision during thyroid surgery,” *The Surgeon*, vol. 4, no. 6, pp. 339–342, dec 2006.
- [131] S. Yuan *et al.*, “Combining optical coherence tomography with fluorescence molecular imaging : towards simultaneous morphology and molecular imaging,” *Physics in medicine and biology*, vol. 55, no. 1, pp. 191–206, 2010.
- [132] J. Frangioni, “In vivo near-infrared fluorescence imaging,” *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 7, no. 5, pp. 626–634, oct 2003.
- [133] M. Rajadhyaksha, R. R. Anderson, et R. H. Webb, “Video-rate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues in vivo.” *Applied optics*, vol. 38, no. 10, pp. 2105–15, apr 1999.
- [134] N. Iftimia *et al.*, “Combined reflectance confocal microscopy/optical coherence tomography imaging for skin burn assessment.” *Biomedical optics express*, vol. 4, no. 5, pp. 680–95, may 2013.
- [135] Y. Mao *et al.*, “Simultaneous dual-wavelength-band common-path swept-source optical coherence tomography with single polygon mirror scanner.” *Optics letters*, vol. 36, no. 11, pp. 1990–2, jun 2011.
- [136] E. De Montigny *et al.*, “Double-clad fiber coupler for partially coherent detection,” *Opt. Express*, vol. 23, no. 7, pp. 9040–9051, 2015.
- [137] S. Vergnole, D. Lévesque, et G. Lamouche, “Experimental validation of an optimized signal processing method to handle non-linearity in swept-source optical coherence tomography.” *Optics express*, vol. 18, no. 10, pp. 10 446–61, may 2010.

- [138] D. Yelin *et al.*, “Spectral-domain spectrally-encoded endoscopy.” *Optics express*, vol. 15, no. 5, pp. 2432–44, mar 2007.
- [139] T. Soshin *et al.*, “A method for sampling and tissue preparation of the parathyroid glands in miniature pigs for toxicity studies,” *The Journal of Toxicological Sciences*, vol. 35, no. 2, pp. 235–238, 2010.
- [140] A. Kim *et al.*, “A fiberoptic reflectance probe with multiple source-collector separations to increase the dynamic range of derived tissue optical absorption and scattering coefficients,” *Optics express*, vol. 18, no. 6, pp. 5580–94, 2010.
- [141] S. H. Yun *et al.*, “Removing the depth-degeneracy in optical frequency domain imaging with frequency shifting,” *Optics Express*, vol. 12, no. 20, p. 4822, 2004.
- [142] M. Sarunic *et al.*, “Instantaneous complex conjugate resolved spectral domain and swept-source OCT using 3x3 fiber couplers.” *Optics express*, vol. 13, no. 3, pp. 957–67, feb 2005.
- [143] L. Wang *et al.*, “Optical probe based on double-clad optical fiber for fluorescence spectroscopy,” *Opt. Express*, vol. 15, no. 26, pp. 17 681–17 689, Dec 2007.
- [144] T. Antonakakis *et al.*, *Gratings : Theory and Numeric Applications*, E. Popov, Ed. Marseille : Presses Universitaires de Provence, 2014.
- [145] R. M. Haralick, “Statistical and structural approaches to texture,” *Proceedings of the IEEE*, vol. 67, no. 5, pp. 786–804, 1979.
- [146] F. Benboujja *et al.*, “Intraoperative imaging of pediatric vocal fold lesions using optical coherence tomography,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 21, no. 1, p. 016007, 2016.
- [147] Alazar Technologies Inc. (2016, June) On-FPGA-FFT. [En ligne]. Disponible : <http://www.alazartech.com/Technology/On-FPGA-FFT>
- [148] M. Jermyn *et al.*, “Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans,” *Science Translational Medicine*, vol. 7, no. 274, pp. 274ra19–274ra19, 2015.
- [149] M. Gu, X. Gan, et C. Sheppard, “Three-dimensional coherent transfer functions in fiber-optical confocal scanning microscopes,” *JOSA A*, vol. 8, no. 7, pp. 1019–1025, 1991.
- [150] L. Zenteno, “High-power double-clad fiber lasers,” *Journal of Lightwave Technology*, vol. 11, no. 9, pp. 1435–1446, 1993.
- [151] S. Y. Ryu *et al.*, “Combined system of optical coherence tomography and fluorescence spectroscopy based on double-cladding fiber.” *Optics letters*, vol. 33, no. 20, pp. 2347–9, Oct. 2008.

- [152] S. Lemire-Renaud *et al.*, “Double-clad fiber coupler for endoscopy,” *Opt. Express*, vol. 18, no. 10, pp. 9755–9764, May 2010.
- [153] A. Sayah *et al.*, “Fiber tips for scanning near-field optical microscopy fabricated by normal and reverse etching,” *Ultramicroscopy*, vol. 71, no. 1–4, pp. 59 – 63, 1998.
- [154] G. J. Tearney, M. Shishkov, et B. E. Bouma, “Spectrally encoded miniature endoscopy,” *Opt. Lett.*, vol. 27, no. 6, pp. 412–414, Mar 2002.
- [155] W. Wolfe, *Introduction to Radiometry*, ser. SPIE tutorial texts. SPIE Optical Engineering Press, 1998.

## ANNEXE A LISTE DES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

### A.1 Publications

#### A.1.1 Articles de revue dans des journaux avec comité de lecture

- **E. De Montigny**, N. Goulamhoussen, W-J. Madore, M. Strupler, O. E. Gologan, T. Ayad, and C. Boudoux, “Tri-modal microscope for head and neck tissue identification”, Biomed. Opt. Express 7, 732-745 (2016)
- **E. De Montigny\***, W.J. Madore\*, O. Ouellette, G. Bernard, M. Leduc, , M. Strupler, C. Boudoux, N. Godbout, “Double-clad fiber coupler for partially coherent detection”, Opt. Express, 23, 9040-9051 (2015). \*These authors contributed equally to this work.
- M. Baiad, M. Gagné, W.J. Madore, **E. De Montigny**, N. Godbout, C. Boudoux, and R. Kashyap, “Surface plasmon resonance sensor interrogation with a double-clad fiber coupler and cladding modes excited by a tilted fiber Bragg grating”, Optics Letters, Vol. 38 Issue 22, pp.4911-4914 (2013)
- W.J. Madore, **E. De Montigny**, O. Ouellette, S. Lemire-Renaud, M. Leduc, X. Daxhelet, N. Godbout, C. Boudoux, “Asymmetric double-clad fiber couplers for endoscopy”, Optics Letters, Vol. 38 Issue 21, pp.4514-4517 (2013)
- M. Baiad, M. Gagné, S. Lemire-Renaud, **E. De Montigny**, W.J. Madore, N. Godbout, C. Boudoux, and R. Kashyap, “Capturing reflected cladding modes from a fiber Bragg grating with a double-clad fiber coupler”, Opt. Express 21, 6873-6879 (2013).
- **E. De Montigny**, “Photoacoustic Tomography : Principles and applications”, Journal de Génie physique de Polytechnique, 4, 13p. (2010).
- M. Strupler, N. Goulamhoussen, **E. De Montigny**, C. Boudoux, “Rapidly wavelength-swept laser at 780 nm”, IEEE Photonics Technology Letters, 23, 4,197-199 (2011)
- M. Strupler, **E. De Montigny**, D. Morneau, C. Boudoux, “Rapid spectrally encoded fluorescence imaging using a wavelength-swept source”, Optics Letters 35, 11, 1737-1739, (2010)

#### A.1.2 Présentation dans des conférences avec comité de lecture

- **E. De Montigny et al.**, “OCT as a tool for rapid neck tissue identification in thyroid surgery”, American Society for Laser Medicine and Surgery Annual meeting, Accepted for oral presentation, (2016).
- A. Maniakas, **E. De Montigny**, et al., “Intra-operative Rapid Tissue Identification in

Thyroid and Parathyroid Surgery : A Novel High Resolution Optical Biopsy Tool”Canadian Society Of Otolaryngology-Head And Neck Surgery Annual Meeting, Accepted for oral presentation, (2016).

- **E. De Montigny**,*et al.*, “Simultaneous multi-scale microscopy as a potential dedicated tool for intra-operative parathyroid identification during thyroid surgery”, Optical Imaging, Therapeutics, and Advanced Technology in Head and Neck Surgery and Otolaryngology, Photonics West, [9689-82, (2016)].
- W-J. Madore, **E. De Montigny**, A. Deschenes, F. Benboujja, M. Leduc, A-M. Mes-Masson, D. Provencher, K. Rahimi, C. Boudoux, N. Godbout, “Morphologic 3D scanning of fallopian tubes to assist ovarian cancer diagnosis,”,Diagnosis and Treatment of Diseases in the Breast and Reproductive System II, 9689-159, (2016).
- W. J. Madore, **E. De Montigny**, O. Ouellette, G. Bernard, M. Leduc, N. Godbout, C. Boudoux, “Double-clad fiber coupler for confocal endomicroscopy at 800 nm”, Endoscopic Microscopy IX, Photonics West, 8927-20 (2014).
- W. J. Madore, **E. De Montigny**, O. Ouellette, G. Bernard, M. Leduc, C. Boudoux et N. Godbout, “Double-clad fiber couplers for efficient multi-modal sensing,” Photonic Instrumentation Engineering, Photonics West, 8992-5 (2014).
- **E. De Montigny**, W. J. Madore, M. Strupler, A.M. Beckley, F. Leblond, N. Godbout et C. Boudoux, “Multimodal confocal microscopy based on a double-clad fiber coupler,” Multimodal Biomedical Imaging IX, Photonics West, 8937-7 (2014).
- **E. De Montigny**, M. Strupler, N. Goulamhoussen, W. J. Madore, T. Ayad, F. Leblond, et C. Boudoux, “Multi-scale and functional microscopy for head and neck tissue identification”, Optical Imaging, Therapeutics, and Advanced Technology in Head and Neck Surgery and Otolaryngology, Photonics West, 8926-126 (2014).
- K. Beaudette, H. W. Baac, W. J. Madore, **E. De Montigny**, M.L. Villiger, N. Godbout, B.E. Bouma et C. Boudoux, “Towards simultaneous and co-localized optical frequency domain imaging and laser therapy through a double clad fiber,” Optical Fibers and Sensors for Medical Diagnostics and Treatment Applications XIV, Photonics West, 8938-22 (2014).
- W. J. Madore, **E. De Montigny**, O. Ouellette, E. D. Lamotte, M. Strupler, N. Goulamhoussen, N. Godbout et C. Boudoux, “Novel double clad fiber coupler for endoscopy,” Fibers for biomedical applications II, Frontiers in Optics, Orlando, FL, USA, FW5B.3 (2013).
- M. Baiad, M. Gagné, **E. De Montigny**, W. J. Madore, N. Godbout, C. Boudoux, and R. Kashyap, “High-efficiency, double-clad fiber coupler, cladding mode sensor using a tilted fiber Bragg grating,” CLEO-PR and OECC/PS, Japan, 1569731221 (2013).

- M. Baiad, M. Gagné, **E. De Montigny**, W. J. Madore, N. Godbout, C. Boudoux, and R. Kashyap, “Optical fibre Bragg grating Cladding mode sensors”, 5th Workshop on Optical Fiber Sensors (2013).
- W. J. Madore, **E. De Montigny**, N. Goulamhoussen, Olivier Ouellette, E. Duchesne De Lamotte, N. Godbout, C. Boudoux, “Asymmetric double-clad fibre coupler for endoscopy,” Photonics North, Invited Presentation, Ottawa (2013).
- W. J. Madore, **E. De Montigny**, S. Lemire-Renaud, E. Duchesne De Lamotte, M. Strupler, N. Godbout, C. Boudoux, “Novel double-clad fiber couplers for spectrally encoded endoscopy”, Endoscopic Microscopy VIII, Photonics West, 8575-22 (2013).
- **E. De Montigny**, N. Goulamhoussen, W. J. Madore, M. Strupler, C. Boudoux, “Simultaneous multimodal microscopy for head and neck tissue identification”, Multimodal Biomedical Imaging VIII, Photonics West, 8574-6 (2013).
- R. Deterre, M. Strupler, N. Goulamhoussen, **E. De Montigny**, S. Ojha, C. Hartnick, C. Boudoux, “Simultaneous two-photon fluorescence (2PEF), second harmonic generation (SHG) and confocal large field imaging of vocal folds”, Photonics West, Optical Imaging, Therapeutics, and Advanced Technology in Head and Neck Surgery and Otolaryngology, Février 2013
- M. Strupler, **E. De Montigny**, C. Boudoux, “Optical design of a compound lens satisfying both optical coherence tomography and confocal microscopy constraints”, Photonics West, Multimodal Biomedical Imaging VIII, Février 2013
- W.-J. Madore, **E. De Montigny**, S. Lemire-Renaud, E. Duchesne De Lamotte, M. Strupler, N. Godbout, C. Boudoux, “Novel double clad fiber couplers for spectrally encoded endoscopy”, Photonics West, Endoscopic Microscopy VIII, Février 2013

## ANNEXE B RÉSULTATS ET DISCUSSION SUPPLÉMENTAIRES AU CHAPITRE 4

### B.1 Design de fibres

Cette section traite des différentes contraintes que les fibres optiques doivent respecter pour être efficace pour l'endomicroscopie confocale et être utilisée pour fabriquer un coupleur en fibre à double gaine. Bien que les dimensions générales de principales régions de la fibre puissent être déduites rapidement, plusieurs paramètres devaient être pris en compte pour rendre possible la fabrication d'un coupleur basé sur cette fibre.

#### B.1.1 Contraintes pour la microscopie confocale

Comme il a été proposé que  $v_p = 5$  est la valeur optimale pour la microscopie confocale, la fibre devrait respecter cette condition. La théorie pour une détection utilisant deux fibres séparées a été précédemment développée par Gu *et al.*[149], et plus récemment, pour une fibre à double gaine par Lemire-Renaud *et al.* [90]. Puisque le parcours de la lumière est le même à l'illumination et à la détection, les expressions se simplifient pour exprimer  $v_p$  [90] :

$$v_p = \frac{d}{\text{MFD}} \sqrt{2A} \quad (\text{B.1})$$

où  $d$  est le diamètre de la gaine interne de la fibre qui sert à acheminer la lumière vers le détecteur, MFD est le diamètre du mode fondamental de la fibre (de l'anglais *mode-field diameter*) et  $A$  est un paramètre de remplissage de l'objectif de microscope.

En respectant la condition sur le facteur de remplissage, qui est un paramètre dépendant de l'objectif de microscope utilisé et de la lentille de collimation, nous pouvons donc établir que :

$$v_p \approx \frac{d}{\text{MFD}} = 5 \quad (\text{B.2})$$

et donc que la gaine interne doit être environ 5 fois plus grande que la taille du mode fondamental du cœur.

#### B.1.2 Contraintes pour l'utilisation de la fibre

Pour que cette fibre soit utilisable au laboratoire, il est intéressant d'avoir un diamètre ex-

terne standard de 125 μm. Cela permet une compatibilité optimale avec les instruments ainsi que pour la manipulation et la transformation de cette fibre. Cela assure aussi une facilité d'utilisation avec des fibres commerciales.

Dans le but d'intégrer cette fibre au système existant utilisant une source laser centrée à 780 nm de 30 nm de large où une fibre commerciale monomode dans cette partie du spectre est employée (Corning 780-HP), le coeur de la fibre à double-gaine adaptée pour maximiser la transmission d'une fibre à l'autre. Un coeur dopé au germanium avec un MFD d'environ 5.2 μm est donc souhaité pour le coeur de la DCF.

Cela permet de fixer les dimensions des différentes régions de la fibre à double-gaine : coeur d'environ 4.5 μm (pour mener à un MFD de 5.2 μm), une gaine interne d'environ 26 μm et une gaine externe de 125 μm.

### B.1.3 Contraintes pour la fabrication d'un coupleur efficace

Les précédents travaux dans l'optimisation des coupleurs à double-gaine auxquels j'ai participé [91] ont permis de proposer un modèle théorique décrivant le transfert multimode maximal pouvant être obtenu d'un couple de fibres, ainsi que certains paramètres pouvant augmenter les pertes ou diminuer l'efficacité du transfert. En effet, la gaine externe de la DCF et de la fibre multimode utilisées était gravée chimiquement pour exposer la gaine interne de la DCF et la zone guidante interne de la fibre multimode. Les gaines externes en silice dopée au fluor créaient une discordance d'indice qui limitait le transfert. En éliminant ce gap, les deux zones guidantes pouvaient être rapprochées et ainsi optimiser le transfert. De plus, le fluor est un dopant qui diffuse assez rapidement sous l'effet de la chaleur, ce qui venait déformer le profil d'indice de la fibre et venait amplifier cette discordance.

Pour les fibres utilisées dans ce coupleur, nous avons la flexibilité de déterminer les profils d'indice et les dopants étant donné qu'aucune fibre commercialement disponible n'a les dimensions appropriées. Pour permettre un transfert maximal, les zones guidantes multimode de la DCF et la fibre multimode doivent être au même indice de réfraction. La méthode la plus aisée pour fabriquer deux fibres avec des surfaces au même indice est de s'assurer qu'elles sont en silice pure. La gaine externe de la DCF et le centre de la fibre multimode sont donc en silice. La DCF a un coeur dopé au germanium pour augmenter l'indice de réfraction ( $\Delta n \approx 5 \times 10^{-3}$ ) et une gaine interne dopée plus faiblement au germanium. Le germanium est un dopant qui diffuse moins avec la chaleur. C'est la gaine externe de la DCF ici qui a le même indice que la fibre multimode. Dans ce cas, il n'y a pas de discordance d'indice au niveau de la fibre multimode et la gaine externe de la fibre DCF. Le transfert peut donc être réalisé avec un minimum de pertes, en limitant l'étirage du composant et en évitant

complètement la gravure chimique.

## B.2 Résultats additionnels

Cette section présente certains résultats additionnels obtenus avec le coupleur à double-gaine en microscopie confocale en fluorescence qui n'ont pas été retenu dans la version finale de l'article.

Dans le but de démontrer l'utilisation du sDCFC pour la détection de faibles signaux, nous avons modifié le montage présenté à la figure 4.4 pour l'excitation et la détection de la fluorescence. Une lame de microscope présentant des cellules fibroblastes dont certaines molécules sont marquées avec des agents fluorescents a été imagée. Les mitochondries des cellules sont marquées avec de l'AlexaFluor555 qui possède un pic d'excitation à 555 nm. La source lumineuse utilisée est un laser semi-conducteur émettant à 532 nm couplé au cœur de la fibre sDCF. La lumière d'excitation est filtrée au niveau du port de détection avec des filtres *long-pass* à 550 nm. Le signal de fluorescence est détecté à l'aide d'un tube photo-multiplicateur (H10492-003, Hamamatsu, Japon). La figure B.1 montre une image en réflectance (a) à 785 nm, une image en fluorescence des mitochondries (b) et une image composite (c). La comparaison avec le signal obtenu avec un coupleur en fibre monomode n'a pas pu être obtenue, le signal étant trop faible pour qu'il puisse être distingué du bruit.

## B.3 Discussion additionnelle sur la caractérisation de composants en multimode

La caractérisation de composants en fibre optique présente certains défis. En général, caractériser la transmission d'un composant consiste à mesurer une puissance de référence injectée dans le composant et de mesurer la puissance en sortie du composant.

Pour la caractérisation en régime monomode, une fibre monomode peut être utilisée de chaque côté du composant de manière à filtrer toute la lumière qui pourrait voyager dans la gaine interne de la DCF. En fusionnant avec un alignement précis sur les coeurs la fibre monomode avec la fibre DCF, les pertes à la fusion peuvent être gardées au minimum de même que les fuites de la lumière du cœur vers la gaine interne. La transmission spectrale du composant peut être quantifiée en mesurant d'abord le spectre de la source, puis en mesurant la lumière transmise par le composant après qu'il ait été fusionné à de la fibre monomode à chaque extrémité. Une dernière mesure est reprise en brisant la jonction entre la fibre monomode d'excitation et la DCF d'entrée du composant. Cette dernière mesure permet de tenir compte des variations de la source et du couplage de la source utilisée pour la transmission. Lorsque la différence entre les mesures au début et à la fin est trop grande, la mesure de transmission du composant est rejetée, car la puissance injectée dans le composant au moment de la mesure

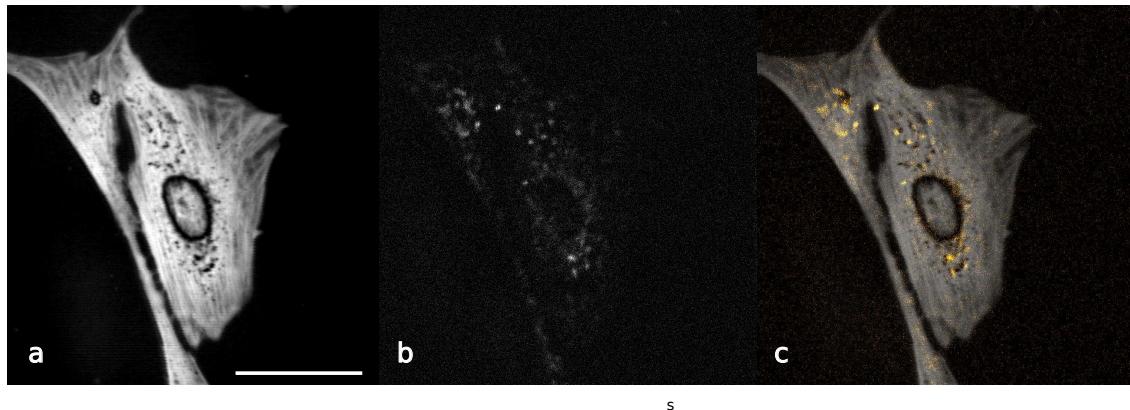


Figure B.1 Images en microscopie confocale à l'aide du sDCFC ((a) réflectance, (b) fluorescence et (c) composite) de cellules fibroblastes où les mitochondries ont été marquées avec une molécule fluorescente. La barre d'échelle représente 100 µm.

n'est pas bien connue. Toutes les mesures spectrales peuvent être prises avec un analyseur de spectre optique.

Pour la caractérisation en régime multimode, la philosophie est semblable, mais les difficultés expérimentales sont plus grandes. Il s'agit d'abord d'avoir une source, idéalement large bande, stable temporellement, qui permet d'avoir une excitation multimode convenable. La définition de convenable n'est pas très claire. En effet, peu de littérature est disponible pour expliquer les conditions idéales d'excitation pour une caractérisation multimode fiable. La définition qui a été utilisée ici est que la source idéale permettrait d'exciter de manière égale tous les modes d'une fibre. D'un point de vue géométrique, une source dont l'étendue est plus grande que celle de la fibre, avec un contenu angulaire supérieur à l'ouverture numérique de la fibre pourrait remplir ces conditions. Ces conditions peuvent être remplies par une source incandescente comme une lampe halogène : large bande, grande étendue et grand contenu angulaire. L'aspect qui rend la partie expérimentale difficile est la grande génération de chaleur de ces lampes, qui fait dilater les composants utilisés et mène à des variations du taux de couplage dans une fibre optique. La détection spectrale à l'aide d'un spectromètre ajoute aussi une complexité. En effet, l'analyseur de spectre utilisé pour la détection monomode ne peut plus être utilisé ici. La très grande majorité de ces instruments possède une fente d'entrée qui limite la taille des fibres connectées à l'entrée à 50 µm. Les fibres de 200 µm utilisées ne sont donc pas appropriées. Un spectromètre sans fente (où le cœur de la fibre agit comme fente) permet d'obtenir des mesures lorsqu'une source blanche est utilisée. Toutefois, la répétabilité et la reproductibilité des mesures a empiriquement été trouvée faible.

Plusieurs options ont été explorées pour obtenir des mesures plus fiables. Une source blanche

couplée à un monochromateur avec détection *lock-in* a été testée. Toutefois, le rapport signal sur bruit des mesures a été jugé insuffisant. La méthode que nous avions développé pour les composants précédents [91] fonctionnait bien dans le cas présent, mais les sources disponibles ne présentaient pas une largeur spectrale suffisante pour caractériser pleinement le composant. Pour résumer, cette méthode consiste à utiliser une source à balayage en longueur d'onde monomode où la sortie est envoyée sur un diffuseur et recouplée à la fibre DCF. Le diffuseur permet d'exciter un grand nombre de modes de la fibre et le balayage en longueur d'onde permet d'utiliser une simple photodiode et d'enregistrer le signal en fonction du temps pour obtenir le spectre de transmission. La source large bande disponible était un laser centré à 780 nm de 30 nm de largeur. La solution finalement retenue a été l'utilisation d'une source supercontinuum commerciale (Fianium, Angleterre) couplée à un filtre accordable programmable (Photon Etc., Canada). Cela permettait une simple mesure de puissance pour chaque fine bande spectrale transmise en sortie du filtre. Bien que les sources supercontinuum ne soient pas réputées stables temporellement, la durée des mesures était suffisamment courte pour assurer la reproductibilité des résultats. Une nouvelle option s'est présentée après la fin de ce projet lorsque notre laboratoire a fait l'acquisition d'un laser titane-saphir accordable sur une très grande plage. Les impulsions présentent une faible largeur de bande ( $\approx 3 \text{ nm}$ ) accordables de 750 nm à 920 nm. Des instruments de caractérisation du spectre et de la puissance de sortie intégrés au laser permettent de surveiller et de tenir compte des variations d'une mesure à l'autre. La grande puissance de ce laser permet de ne pas se soucier des grandes pertes associées au passage dans un diffuseur, pour transformer le faisceau monomode en faisceau multimode. Cette option, bien qu'elle n'ait pas été utilisée lors de ce travail car le matériel a été acquis après la publication, pourrait être la solution la plus appropriée pour la caractérisation de ces composants.

#### B.4 Conclusion

Pour conclure, ce chapitre a présenté les travaux entourant la fabrication d'un coupleur en fibre à double gaine optimisé pour la microscopie confocale. Ce composant était impossible à fabriquer avec les concepts utilisés précédemment [90]. Il fallait repenser la fabrication du composant du départ en fabriquant sur mesure deux nouvelles fibres. Les dimensions, les matériaux et les profils d'indice ont été optimisés pour favoriser les performances du composant et rendre possible sa fabrication. La méthode de fabrication a été repensée en appliquant un pré-traitement à la fibre DCF qui rapprochait le signal à extraire dans la fibre multimode en le faisant fuir dans la gaine externe. Le signal du cœur, qui ne doit pas être affecté, est guidé par la gaine interne qui est devenue monomode grâce à la réduction de la fibre DCF. En appliquant des nouveaux concepts pour optimiser le contact mécanique entre les fibres, un

coupleur avec des transmissions monomode et multimode qui supplantent tout ce qui était disponible auparavant. Les gains au niveau de l'imagerie ont été mesurés : augmentation du signal mesuré d'un facteur 30 et réduction du contraste de tavelue d'un facteur 4. Ces améliorations résultent en des images plus faciles à interpréter et provenant des plus grandes profondeurs dans le tissu. La diminution de la résolution axiale d'un facteur 2 était déjà un phénomène connu et ne limite pas les performances du microscope confocal utilisé. Ce composant sera utilisé dans le prochain chapitre dans un microscope tri-modal combinant la microscopie confocale, l'OCT et l'imagerie en fluorescence par encodage spectral.

## ANNEXE C LOGICIEL D'ACQUISITION

### C.1 Logiciel d'acquisition

Un aspect peu discuté dans l'article est le logiciel l'acquisition des données et leur traitement. Le logiciel associé à ce microscope remplit plusieurs tâches : numériser les signaux, effectuer le traitement des données OCT, afficher les images en temps réel et enregistrer les données brutes pour post-traitement. Ces opérations sont réalisées pour tous les canaux simultanément en temps réel. Pour gérer ces grands flux de données, le logiciel a été développé en C++ à l'aide de la structure logicielle *Qt 5.2*. La plateforme logiciel opère sur plusieurs boucles d'événement pour réaliser toutes ces tâches. Cette architecture se nomme traitement multithreaded (*multithread operation* en anglais). Le principe est que chaque bloc logique du programme doit pouvoir opérer sans dépendre du temps que prennent les autres blocs à effectuer leur travail. Par exemple, l'interface graphique doit opérer sur une boucle d'événements différente pour pouvoir arrêter l'acquisition même si le logiciel est dans le processus d'acquisition des données.

Les blocs critiques sont le transfert des données de la carte d'acquisition à l'application et le traitement des données OCT. Ces deux blocs doivent gérer une grande quantité de données entrantes et sortantes à un rythme rapide. Le bloc d'acquisition des données fonctionne à 20 Méchantillons/s par canal sur quatre canaux. Ceci est une limitation de la carte d'acquisition qui ne fonctionnent qu'à un, deux ou quatre canaux à la fois. Les données sont désentrelacées pour retrouver l'information appartenant à chaque modalité avant d'être acheminées dans les autres modules. Dans le cas du signal OCT, il passe par un module de traitement de données qui permet de former l'image OCT. Les données sont corrigées pour les non-linéarités de la source laser à 1300 nm par une interpolation linéaire. Le signal est ensuite fenêtré avant de calculer sa transformée de Fourier rapide. L'amplitude au carré est calculée à partir des parties réelles et imaginaires de la transformée de Fourier et le logarithme de ce résultat est pris pour afficher les images dans une échelle en décibels.

Les images se retrouvent dans un registre d'images qui sert d'instance pour fournir les données à l'affichage et au module de sauvegarde. Les métadonnées comme le canal associé à ces données ou l'amplitude du signal en volts sur ce canal sont conservées avec l'image. Un signal est envoyé à l'affichage chaque fois qu'une nouvelle image est reçue sur un canal et l'affichage récupèrera cette image lorsqu'il se mettra à jour, ce qu'il fait toutes les 33 ms correspondant à un rafraîchissement de 30 images par seconde. Une capture d'écran de l'affichage est pré-

sentée à la figure C.1 montrant l'affichage simultané d'une image de microscopie confocale (gauche) et de thyroïde (droite) d'un ganglion porcin. Lorsque l'utilisateur signale qu'il veut sauvegarder des images, un groupe d'unités d'exécution (*Thread-pool*) est activé et récupère les images à partir du registre d'images. Chaque unité d'exécution s'occupe d'enregistrer une image ce qui n'empêche pas les autres images d'être sauvegardées si l'écriture sur le disque est ralenti pour une raison ou une autre. .

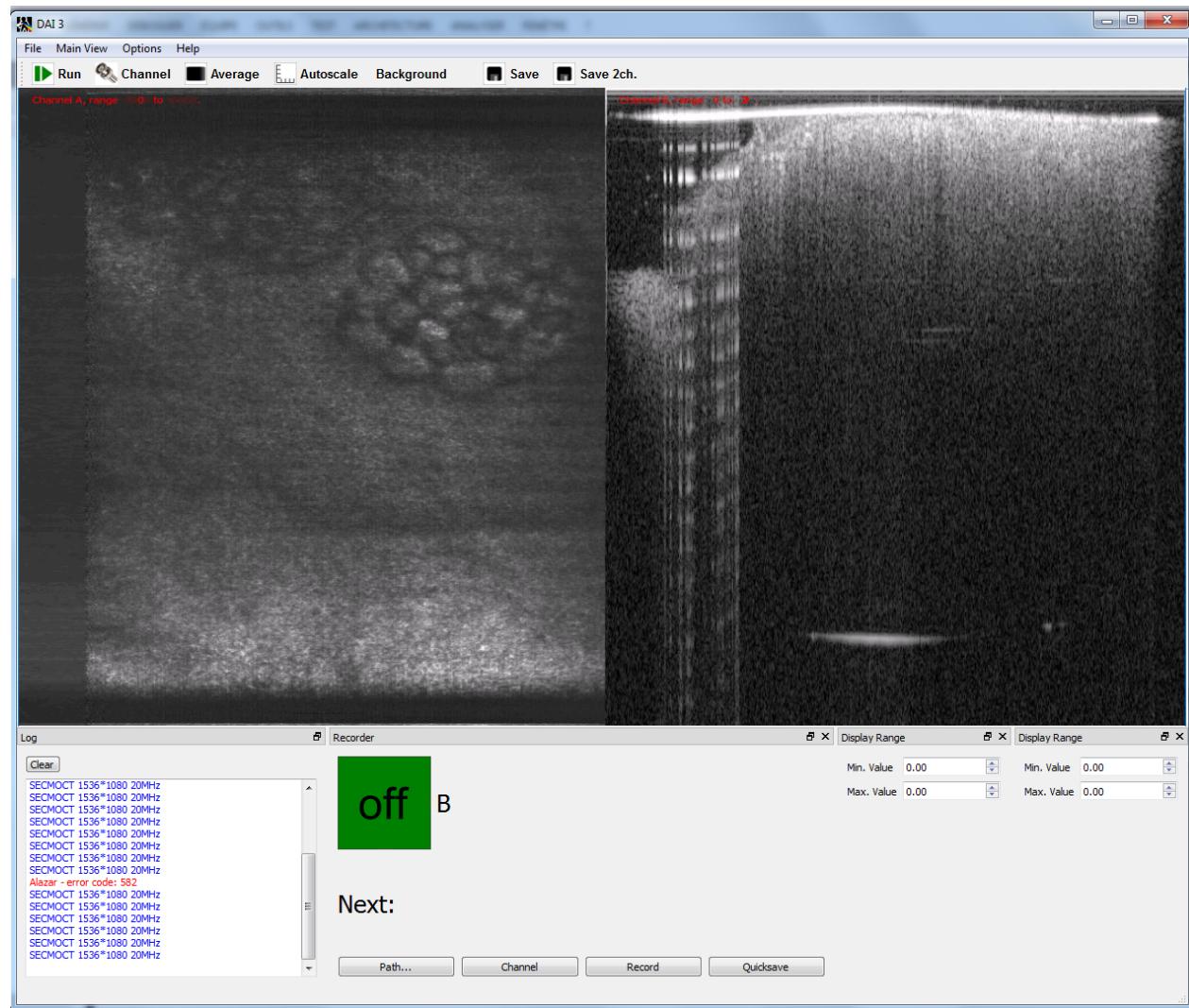


Figure C.1 Capture d'écran de l'interface graphique du logiciel d'acquisition montrant les images acquises simultanément en microscopie confocale (gauche) et en OCT (droite) d'un ganglion porcin.

## ANNEXE D CONTRIBUTION AU DÉVELOPPEMENT DE COUPLEURS DCF À GRANDE Gaine

Cet annexe reproduit un article où j'ai contribué à titre de deuxième auteur et qui porte sur le développement de coupleurs asymétriques en fibre à double gaine. Ces coupleurs ont permis de repousser les performances des coupleurs en fibre à double gaine, qui étaient jusqu'à ce moment limitées à environ 42 % de transmission multimode. Ce papier présente un composant permettant plus de 70 % de transmission multimode. Cet article présente aussi une nomenclature précise et des méthodes de caractérisation pour ce genre de composants et plus de prédire une limite supérieure théorique sur les performances de ce genre de composants.

### **Asymmetric double-clad fiber couplers for endoscopy**

**Wendy-Julie Madore,<sup>1</sup> Etienne De Montigny,<sup>1</sup> Olivier Ouellette,<sup>1</sup> Simon Lemire-Renaud,<sup>1</sup>, Mikael Leduc,<sup>1</sup> Xavier Daxhelet,<sup>1</sup> Nicolas Godbout<sup>1</sup> and Caroline Boudoux<sup>1,2,\*</sup>**

<sup>1</sup> *Centre d'Optique Photonique et Lasers, Ecole Polytechnique Montreal, Department of Eng. Physics, Montreal, Quebec, H3D 3A7, Canada*

<sup>2</sup> *Sainte-Justine Mother and Child University Hospital Center, 3175 Côte Sainte-Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada*

\* Corresponding author : caroline.boudoux@polymtl.ca

**Abstract :** We present an asymmetric double-clad fiber coupler (A-DCFC) exploiting a disparity in fiber étendues to exceed the equipartition limit ( $\leq 50\%$  extraction of inner cladding multi-mode light). The A-DCFC is fabricated using two commercially available fibers and a custom fusion-tapering setup to achieve  $>70\%$  extraction of multi-mode inner cladding light without affecting ( $>95\%$  transmission) single-mode light propagation in the core. Imaging with the A-DCFC is demonstrated in a spectrally encoded imaging setup using a weakly backscattering biological sample. Other applications include the combination of optical coherence tomography with weak fluorescent or Raman scattering signals.

**OCIS codes :** 060.2340(Fiber optics components), 170.2150(Endoscopic imaging), 170.3880(Medical and biological imaging), 170.3890(Medical optics instrumentation), 170.4500(Optical coherence tomography).

Double-clad fibers (DCFs) - originally developed for high power lasers [150] - are gaining popularity in biomedical imaging and sensing as they allow the combination of coherent and

incoherent imaging through their single-mode core and multi-mode inner cladding regions, respectively. While this combination was first used to obtain speckle-free high-resolution endoscopic images [81], DCFs were rapidly used for dual-modality imaging requiring coherent and incoherent light detection. The combination of optical coherence tomography (OCT) with fluorescence maps, for instance, provides high resolution imaging based on backscattering with specific molecular contrast [65, 151, 143, 82].

In order to minimize coupling losses and improve the robustness of current free-space beam-splitter (or dichroic filter) approaches, all-fiber DCF couplers (DCFCs) can be fabricated using twisting [151], polishing [143] or fusion-tapering [152, 128]. These techniques typically involve two identical commercially available DCFs. We previously reported such a coupler designed for OCT and fluorescence detection [83] with an achromatic transmission of 90 % single-mode light and more than 40 % multi-mode light extraction. This previous design was limited to a theoretical equipartition limit of 50 %, dictated by the symmetry imposed by the combination of the two identical fibers. For detection of weak signals, however, an ideal DCFC would show a more efficient multi-mode extraction capability over a wide spectral range, without affecting the single-mode transmission.

In this Letter, we present a novel DCFC design exceeding the equipartition limit by exploiting an asymmetry of the fiber diameters in the fused section of the coupler. Fig. 1(a) shows a schematic diagram of this asymmetric DCFC (A-DCFC) combining a commercially available DCF with a multi-mode fiber (MMF) having a larger diameter. The coupler was realized with a fusion-tapering technique modified to allow maximum multi-mode signal extraction without affecting the single-mode signal propagation in the core of the DCF. We describe the setup that was used to characterize the coupler for single-mode and multi-mode propagation over a broad spectrum and provide a comparison with its symmetric counterpart for imaging of a weakly backscattering biological sample.

The A-DCFC is an all-fiber coupler capable of quasi-lossless transmission of single-mode light propagating through the core as well as efficient extraction of multimode light from the inner cladding of a DCF. Excitation light is launched in the core of the DCFC at Port 1 (Fig. 1(a)), which allows for coherent illumination of a sample (Port 2). Backscattered light from the sample is collected by the core and by the inner cladding of the DCF at Port 2. The core signal returns to Port 1 while the inner cladding signal is extracted by the MMF and is sent to Port 3.

Fig. 1((b),(d)) shows schematic diagrams (left) and photographs (right) of the cross-sections of the two commercially available fibers used for fabricating the A-DCFC. The DCF is a 125  $\mu\text{m}$ -diameter fiber (Nufern SM-9/105/125-20A) having a 9  $\mu\text{m}$  core (numerical aperture

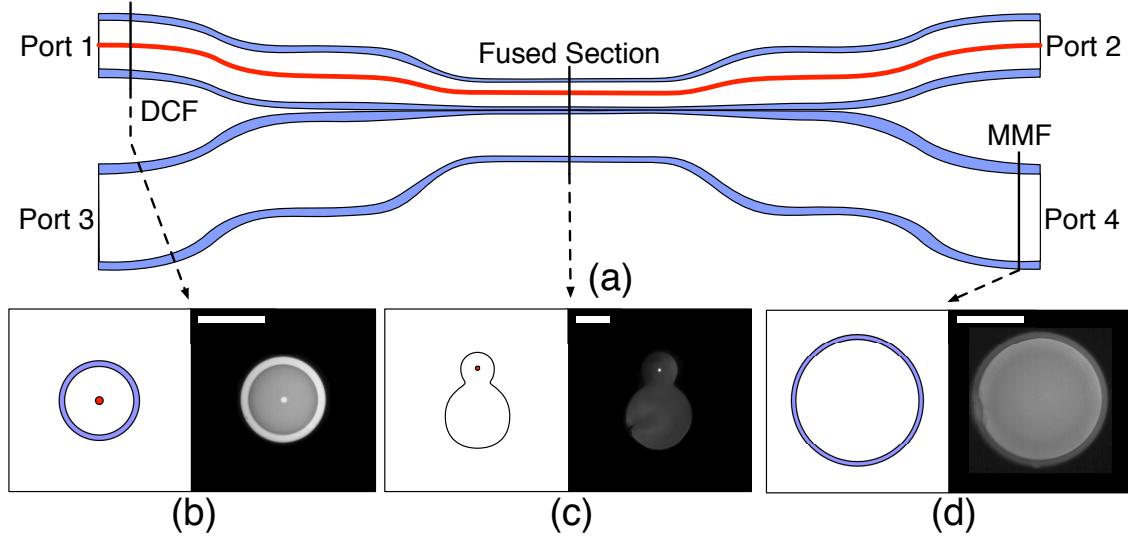


Figure D.1 (a) Schematic diagram of an asymmetric DCF coupler achieved by fusing a DCF (top) with a MMF (bottom). The core, inner cladding and outer cladding regions are shown in red, white and blue, respectively. (b-d) Schematic diagrams (left) and photographs (right) of cross-sections of the DCF (b), a representative fused-section (c), and the MMF (d). In (c), one can appreciate the absence of outer cladding, which was removed chemically. Scale bar : 100  $\mu\text{m}$ .

(NA) of 0.12, cut-off at 1210 nm) and a 105  $\mu\text{m}$  inner cladding (0.2 NA), while the MMF is a 220  $\mu\text{m}$ -diameter coreless multimodal fiber (Nufern MM200/220-22A, 0.22 NA). Fig. 1(c) shows a schematic diagram (left) and a photograph (right) of the cross-section of the fused section of the coupler.

Higher extraction of the multi-mode signal is achieved by modifying the fusion process. After removing both fibers' acrylic coating on a span of 30 mm, this zone is etched with hydrofluoric acid in order to remove the external cladding which lowers the multimodal signal transfer. The etching rate is tuned in order to have sufficient surface quality before the fusion of both fibers ( $0.2 \mu\text{m min}^{-1}$  in a 49 % HF solution diluted 1 :2 with demineralized water)[153].

The fibers are installed side by side and maintained mechanically with appropriate tension and geometry on a custom fusion-tapering setup. Both fibers are fused with a micro-torch fuelled with an oxygen-propane mix in order to heat the glass up to temperatures ranging from 1500 °C to 1600 °C. The fusion initiates a coalescence of the structure into an ellipse (within  $\approx 200$  s), preserving the refractive index profiles over the cross-section of the coupler. During the fusion step of the process, the single-mode response is monitored with a broadband source (BBS : Hewlett-Packard, Broadband Light Source, 83437A, 1200 nm to 1650 nm) injected in the core of the DCF and sent to an optical spectrum analyzer (OSA : ANDO Electric, AQ6317). Tapering of the coupler is then performed until losses begin to appear on the

single-mode signal. The coupler is glued on a glass substrate using low-shrinkage UV curing glue and secured in a stainless steel tube, which is sealed on both ends with flexible boots.

Two alternate metrics are used to characterize DCFCs. A first metric is the coupling ratio,  $\gamma$ , defined as :

$$\gamma_2 = \frac{P_2}{P_2 + P_4}, \quad (\text{D.1})$$

where  $P_2$  and  $P_4$  are powers measured at Port 2 and Port 4, respectively. This metric shows signal imbalance between the two outputs of the device. A second metric is the transmission,  $T$ , defined as :

$$T_{i-j} = \frac{P_j}{P_i}, \quad (\text{D.2})$$

where  $P_j$  is the power measured at Port  $j$  compared to the power launched at Port  $i$ . This metric measures signal imbalance, but also takes into account both insertion and excess losses of the device and can be measured both in single-mode ( $T_{1-2}$ , from Port 1 to Port 2) and multi-mode ( $T_{2-3}$ , from Port 2 to Port 3) regimes. This second metric will be used throughout this paper as it unambiguously represents the performances of the device.

While the single-mode transmission of the A-DCFC is monitored during the fabrication process, the multi-mode transmission is measured on a different setup once the device has been packaged. Fig. 2 shows the multi-mode characterization setup consisting of a swept-source laser centered at 1310 nm (20 kHz, 25 mW, 75 nm bandwidth)[70] focused on the cleaved face of a DCF through a diffuser in order to excite a high number of modes. This DCF segment is placed in a mode scrambler to promote uniform excitation of modes. The free end of the DCF is then first spliced with Port 1 of the device under test and signal is measured at Ports 2 and 4 using a calibrated integrating sphere (Thorlabs, NJ, S145C). The injection power is measured afterwards by sectioning the input branch of the coupler to take into account possible loss due to the splice (cutback technique). Figs. 2(b) and (c) show transmission curves for near-infrared (using the wavelength-swept source and a photodetector) and visible spectra (using a BBS and an OSA).

This A-DCFC transmits more than 95 % of the single-mode signal (from Port 1 to Port 2, as well as from Port 2 to Port 1) and more than 75 % of the multi-mode signal (from Port 2 to Port 3, as well as from Port 1 to Port 4) over the near-infrared spectral band (1260 nm to 1340 nm). In the visible range, the A-DCFC transmits  $\approx 72\%$  in either direction. The propagation of visible light through the core however is slightly multi-mode (15 to 20

supported modes) as the cut-off of the DCF has been measured at 1210 nm using the 0.2 dB criterion.

Our A-DCFC compares well with previously reported DCFCs, as these iterations exploited symmetric designs which are subjected to the equipartition limit. In the near-infrared region, multi-mode transmission around 40 % was achieved [152, 128]. In the visible region, used for fluorescence detection, the A-DCFC nearly doubles the extracted light from the inner cladding. It also shows a lower chromaticity from 450 nm to 1000 nm, compared with the symmetric version. This can be explained by the additional chemical etching step in the asymmetric version, exposing the inner cladding, and thus facilitating transmission at shorter wavelengths. Single-mode core propagation in the A-DCFC is slightly better than that of the symmetric version, since only a shallow taper is imposed to the structure.

To demonstrate the potential of this new device for biomedical applications, we integrated the A-DCFC in a spectrally encoded (SE) wide-field imaging setup [154], which allows for rapid imaging while adding an additional requirement that the A-DCFC be achromatic. In a SE imaging setup (shown in Fig. 3(a)), the fast-axis scanner is replaced by a diffraction grating which spreads wavelengths from a broadband source across a sample. The slow axis is achieved using a galvanometer-mounted mirror (Thorlabs, NJ, GVSM001). The polygon-based wavelength-swept laser is coupled to the core of the DCF (Port 1) through a splice with single-mode fiber (Corning, SMF-28). Light travels to the imaging arm (Port 2) and is collimated into an 2.8 mm-diameter beam (Thorlabs, NJ, F260APC-C). The wavelengths are then spread using a diffraction grating (Wasatch Photonics, 1004-1, 1145 l/mm) and finally focused through a 100 mm focal achromatic doublet (Thorlabs, NJ, AC254-100-C) on the sample. Backscattered light couples in part coherently through the core and is sent to a photodetector (New Focus, FC-1117) via an optical circulator (Thorlabs, NJ, CIR-1310-50-APC) for single-mode imaging. A larger fraction of the backscattered light from the sample couples back into the inner cladding and is extracted by the A-DCFC (to Port 3) to a photodetector (Thorlabs, NJ, PDA10CS). A custom beam dump is installed on the end of Port 4 to prevent backreflections. Imaging is performed at a rate of 20 images/s over a field of view of 1 cm<sup>2</sup>. We acquired 800 by 800 pixel images of a 28-day-old mouse embryo fixed in 4 % paraformaldehyde shown in Fig. 3(b).

Fig. 3 further compares images acquired in single-mode detection (Fig. 3(c), taken from Media 1) with images acquired in the multi-mode detection using a symmetric DCFC (Fig. 3(d), taken from Media 2) and an A-DCFC (Fig. 3(e), taken from Media 3). As reported previously, the multi-mode detection allows for both speckle reduction, increased signal collection (factor varying from 4 to 10 depending on the sample) and for depth of field improvement.

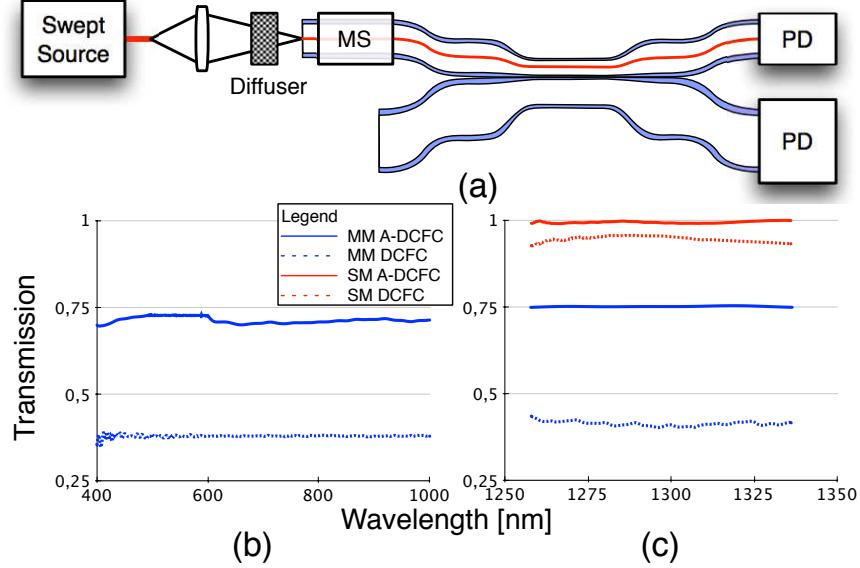


Figure D.2 (a) Characterization setup for the multi-mode transmission. (b) Comparison of multi-mode transmission in the visible range for symmetric (dashed line) and asymmetric (solid line) designs. (c) Comparison of single-mode (red) and multi-mode (blue) transmission for symmetric (dashed line) and asymmetric (solid line) designs in the near infrared range. MS : Mode scrambler, PD : Photodetector.

In both multi-mode images, we can appreciate the three-dimensional aspect of the sample and more easily identify features such as paws, eyeballs and nostrils. While displayed in different intensity scales, the multi-mode image comparison allows appreciating the increased collection efficiency (factor of 1.5 to 2 depending on the sample) of the A-DCFC for weakly backscattering sample.

The equipartition limit being overcome, we define a new theoretical limit for multi-mode transmission. This can be achieved by comparing the etendues of the fibers used, leading to new guidelines for asymmetric designs. The optical etendue (or throughput),  $G$ , is commonly defined [155] as follows :

$$dG = n^2 dS \int \cos \theta d\Omega, \quad (\text{D.3})$$

where  $n$  is the refractive index of the material,  $dS$  is a surface element and  $d\Omega = \sin \theta d\theta d\phi$  is a solid angle element. By integrating  $\phi$  from 0 to  $2\pi$  and  $\theta$  from 0 to  $\alpha$  over the total mode area  $S$ , we obtain

$$G = \pi S n^2 \sin^2 \alpha. \quad (\text{D.4})$$

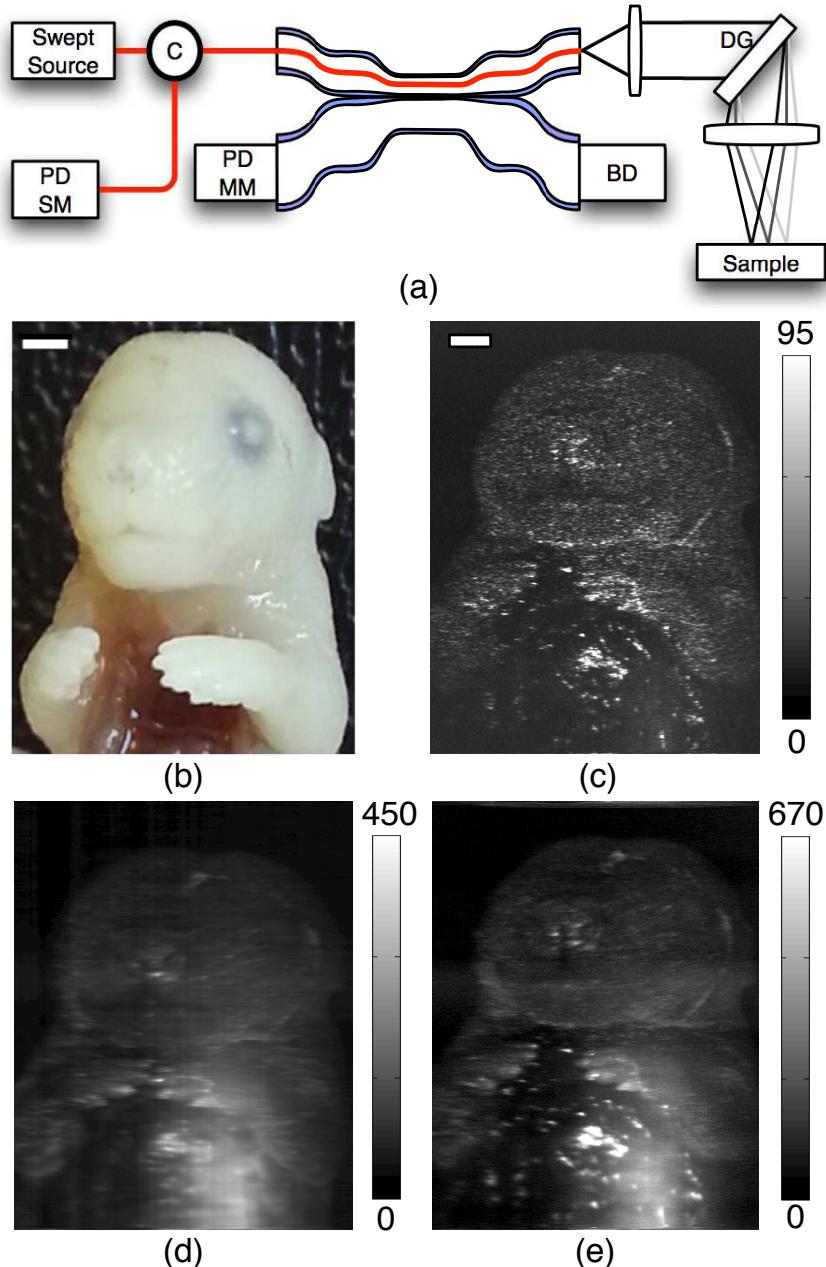


Figure D.3 (a) Diagram of the SE imaging setup. PD : Photodetector, BD : Beam dump, DG : Diffraction grating, C : Circulator, galvanometer-mounted mirror not shown. (b) Picture of the sample : a mouse embryo fixed in 4 % paraformaldehyde. (c-e) Images of the embryo with the A-DCFC ((c) single-mode (Media 1) and (e) multi-mode (Media 3)) compared with a DCFC ((d) multi-mode (Media 2)). Scale bar : 1 mm. Grey scale in nW.

Noting that  $\text{NA} = n \sin \alpha$ , we finally deduce that the etendue depends on the mode area and numerical aperture of the waveguide as

$$G = \pi S(\text{NA})^2. \quad (\text{D.5})$$

Maximizing the multi-mode power transfer from Port 2 to Port 3 entails maximizing the ratio of  $G_3$  (optical etendue at Port 3) over  $G_1$  (optical etendue at Port 1), as light coupling into Port 2 will split between Ports 1 and 3 (following the convention of Fig. 1(a)). Neglecting excess loss, the power transmission is predicted to be

$$T_{2-3} = \frac{G_3}{G_3 + G_1} = \frac{1}{1 + \frac{G_1}{G_3}}. \quad (\text{D.6})$$

This curve is shown on Fig. 4 along with experimental data points from three couplers having different etendue ratios. We experimentally compared three devices : a symmetric DCFC (42 % transmission,  $\frac{G_3}{G_1} = 1$ ), a weakly asymmetric DCFC (53 % transmission,  $\frac{G_3}{G_1} = 1.5$ ) and the A-DCFC presented in this article (75 % transmission,  $\frac{G_3}{G_1} = 3.6$ ). The asymmetry was tuned by chemical etching of the fibers until the desired etendue ratios were obtained. Experimental data shows good agreement with the upper limit predicted by Eq. 6. The A-DCFC presented in this Letter was realized with a combination of commercially available fibers having a theoretical multimode transmission of 78 %. By tailoring the fusion-tapering process to new custom-drawn fibers, we predict the feasibility of asymptotically perfect multi-mode transmission, while preserving the core signal transmission, as when the ratio  $\frac{G_1}{G_3}$  goes to zero, the multi-mode transmission goes to 1.

In conclusion, we demonstrated an asymmetric DCFC capable of more than 70 % multi-mode transmission, while leaving the core signal unperturbed (more than 95 % transmission). This design exceeds the previous equipartition limit exploiting the asymmetry in the fiber combination. The coupler was realized using two commercially available fibers, as well as fabricated and characterized using a systematic and detailed approach. To demonstrate the potential of this new device, we integrated the coupler in a spectrally encoded imaging setup with a low reflectivity sample. We finally defined a new theoretical multi-mode transmission limit using the concept of optical etendue and predicted the feasibility of an asymptotically perfect device. Several applications can benefit from this improved signal collection such as optical coherence tomography combined with fluorescence imaging, spectroscopy or Raman scattering.

The authors would like to gratefully acknowledge the technical contribution of Dr. Ma-

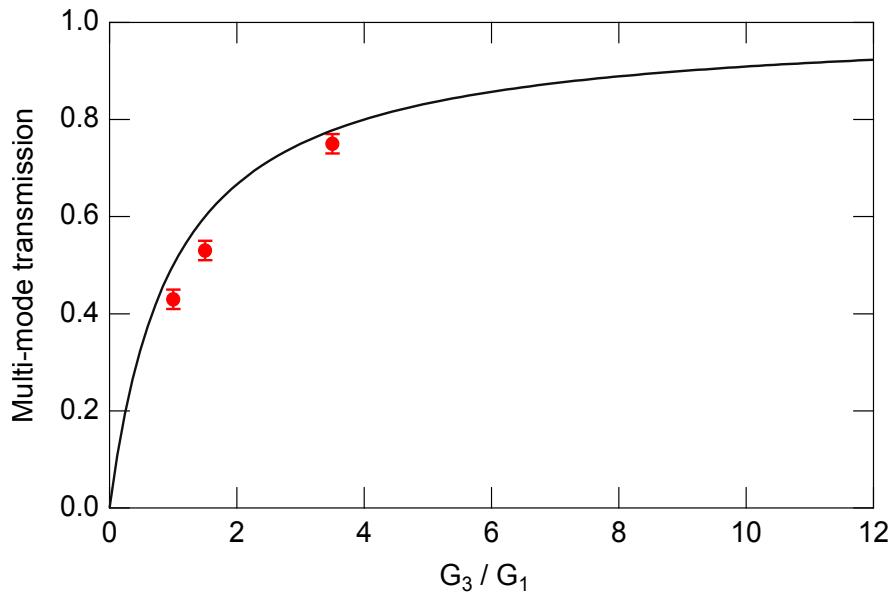


Figure D.4 Multi-mode transmission as a function of etendue ratio. The solid line shows the theoretical prediction, while the dots show experimental data points from couplers with different combinations of fibers.

thias Strupler, Dr. Amber M. Beckley, Mr. Fouzi Benboujja, Mr. Nadir Goulamhoussen and Mr. Etienne Duchesne de Lamotte. This work was funded by Canada Foundation for Innovation (CFI) Leaders grant and a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Ideas to Innovation grant. Ms. Madore, Mr. De Montigny and Mr. Ouellette are NSERC scholars.

## ANNEXE E IMAGERIE MULTIMODALE COMBINANT L'OCT ET LA FLUORESCENCE AVEC UN COUPLEUR À DOUBLE Gaine

Dans le but de démontrer la combinaison de l'OCT et de l'imagerie en fluorescence, un montage a été élaboré. Ce montage utilise plusieurs composants en fibres optiques fabriqués par Wendy-Julie Madore. Un multiplexeur en longueur d'onde (WDM) permet de combiner le laser d'OCT à 1300 nm dans la même fibre que le laser d'excitation de la fluorescence à 785 nm. Les deux lasers combinés sont ensuite injectés dans le cœur d'une fibre double gaine à grande gaine. Cette fibre est monomode à 1300 nm, mais elle supporte quelques modes à 785 nm. Pour préserver la cohérence du signal pour faire de l'interférométrie, il est important que la fibre soit monomode à 1300 nm. Le cœur de la fibre sert donc à collecter le signal d'OCT et la grande gaine interne sert à collecter le signal de fluorescence. Ce dernier est redirigé vers une photodiode pour être détecté à l'aide d'un coupleur à double gaine asymétrique (DCFC) [91]. Le schéma du montage développé est présenté à la figure E.1.

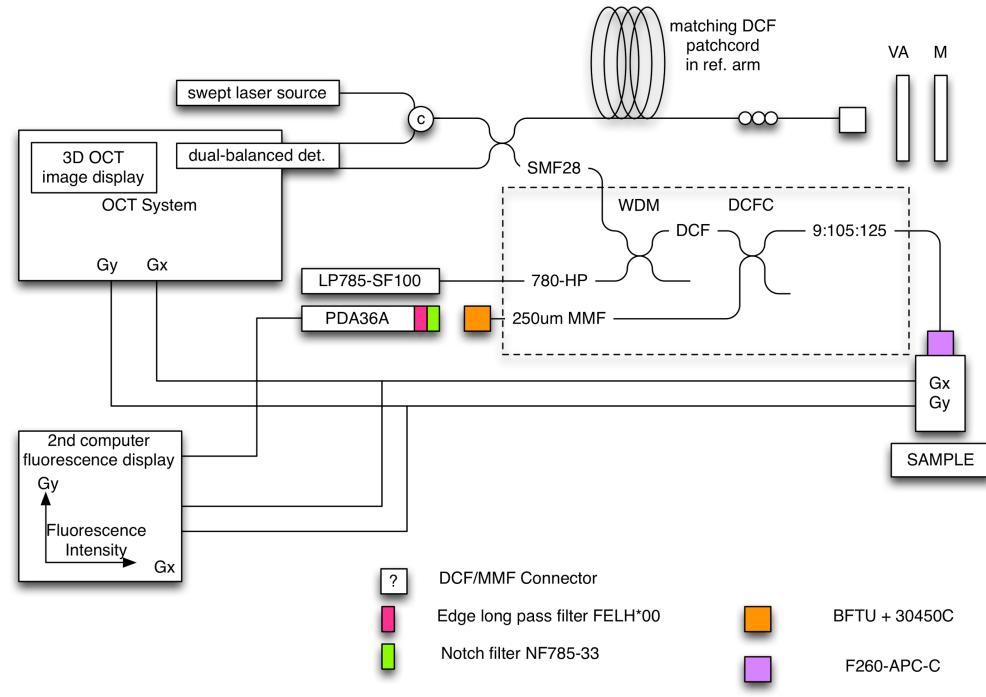


Figure E.1 Schéma du montage pour démontrer la combinaison de l'OCT et de la fluorescence à l'aide d'un coupleur à double gaine.

L'échantillon imagé pour la preuve de principe est un tube rempli d'Alexa Fluor 790, un agent fluorescent excitable à 785 nm. L'image du tube est présentée en tons de gris avec le

signal de fluorescence superposé sur l'image OCT en rouge. Le signal de fluorescence n'est pas résolu en profondeur (hauteur sur l'image). La position du signal de fluorescence a été disposée à cet endroit, car l'origine du signal de fluorescence était connue *a priori*. L'image composite résultante est présentée à la figure E.2.

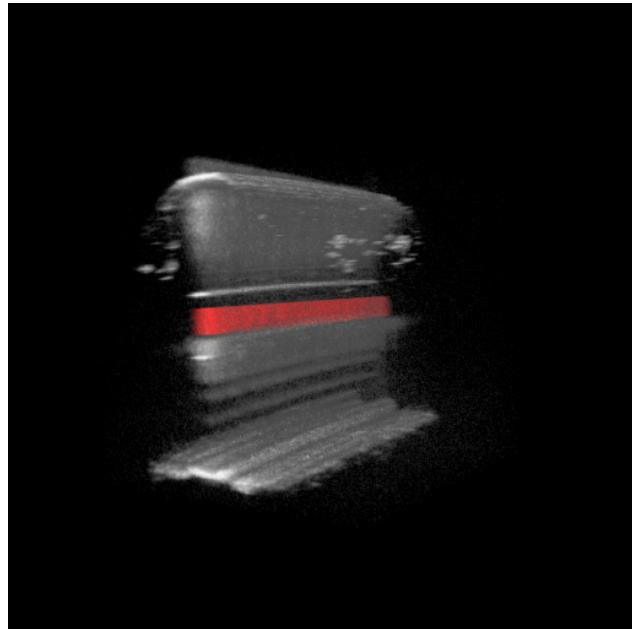


Figure E.2 Image composite d'un tube rempli d'Alexa Fluor 790, un agent fluorescent excitable à 785 nm. Le signal de fluorescence n'est pas résolu axialement (en hauteur), il a été placé à cet endroit étant donné la connaissance *a priori* de l'origine du signal de fluorescence.