

**Titre:** Système d'endoscopie basé sur la tomographie par cohérence optique dédié à l'étude des cordes vocales pédiatriques et des pathologies associées  
Title: Title: Système d'endoscopie basé sur la tomographie par cohérence optique dédié à l'étude des cordes vocales pédiatriques et des pathologies associées

**Auteur:** Fouzi Benboujja  
Author: Author: Fouzi Benboujja

**Date:** 2016

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

**Référence:** Benboujja, F. (2016). Système d'endoscopie basé sur la tomographie par cohérence optique dédié à l'étude des cordes vocales pédiatriques et des pathologies associées [Ph.D. thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
Citation: Citation: Benboujja, F. (2016). Système d'endoscopie basé sur la tomographie par cohérence optique dédié à l'étude des cordes vocales pédiatriques et des pathologies associées [Ph.D. thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/2278/>

## Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/2278/>  
PolyPublie URL:

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

**Programme:** génie biomédical  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SYSTÈME D'ENDOSCOPIE BASÉ SUR LA TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE  
OPTIQUE DÉDIÉ À L'ÉTUDE DES CORDES VOCALES PÉDIATRIQUES ET DES  
PATHOLOGIES ASSOCIÉES

FOUZI BENBOUJJA  
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

SYSTÈME D'ENDOSCOPIE BASÉ SUR LA TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE  
OPTIQUE DÉDIÉ À L'ÉTUDE DES CORDES VOCALES PÉDIATRIQUES ET DES  
PATHOLOGIES ASSOCIÉES

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

M. MATHIEU Pierre-A., D. Sc. A., président  
Mme BOUDOUX Caroline, Ph. D., membre et directrice de recherche  
Mme CHERIET Farida, Ph. D., membre  
M. MONGEAU Luc, Ph. D., membre externe

## DÉDICACE

*Pour se réaliser il faut d'abord apprendre à avancer,  
une fois en mouvement, la seule façon de garder l'équilibre c'est de regarder en avant....*

## REMERCIEMENTS

L'accomplissement d'une thèse est sans aucun doute une contribution directe ou indirecte de plusieurs personnes. J'aimerais adresser toute ma gratitude à ceux et celles qui m'ont accompagné, et sans lesquelles il m'est difficile de concevoir que ce parcours aurait été le moindrement réalisable.

Je tiens à remercier tout d'abord mon mentor et ma directrice de thèse, Caroline Boudoux, pour son encadrement, son dévouement et sa générosité. Vos qualités humaines et scientifiques sont une inspiration pour ce travail, et j'en suis infiniment reconnaissant. Malgré mon expertise limitée en génie physique, vous m'avez donné l'opportunité d'apprendre énormément. C'est sincèrement un privilège et j'ai été comblé par ce projet envoutant. Enfin, j'ai toujours été très heureux et fier de faire partie de votre laboratoire.

Je voudrais également remercier particulièrement Farida Cheriet. Une femme de caractère extraordinaire à qui je dois beaucoup. Vous avez toujours été d'un support remarquable et votre rigueur est exemplaire. Vous avez cette capacité à faire ressortir le meilleur de vos étudiants. Je n'avais aucunement l'intention de faire des études doctorales avant d'arriver à votre laboratoire de recherche. Votre passion pour la recherche est bel et bien contagieuse. Dans votre laboratoire le LIV4D, j'ai eu un immense plaisir à collaborer avec un ensemble de collègues géniaux dont plusieurs sont maintenant des amis : Lama, Olivier, Fantin, Rola, Agnès, Hervé...

Je voudrais également remercier Dr. Hartnick, Professeur au Département d'Otologie et Laryngologie de Harvard Medical School pour sa passion contagieuse et son dévouement au projet. Son enthousiasme et son esprit critique ont fortement contribué à me dépasser sur le plan académique et personnel. Je suis reconnaissant pour les nombreuses réunions, vos précieux conseils et encouragements ont toujours été une source d'inspiration extraordinaire.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à un ensemble de collègues géniaux. Tout d'abord, Mathias Strupler, la seule personne qu'il ne faut pas vexer au laboratoire (pour les nouveaux, c'est la règle #1 du labo). Sincèrement mon expérience doctorale aurait été complètement différente sans ta collaboration précieuse. J'ai beaucoup appris grâce à toi. Tu fais preuve d'une grande générosité envers tous les membres du labo. Ta rigueur et ton enthousiasme que tu démontres quotidiennement sont une inspiration à tous membres du LODI et ça en vaut même pour le hockey !

Kathy Beaudette, j'ai eu un plaisir fou avec toi à durant le projet. Toujours calme et posée,

tu as réussi à m'inculquer une valeur essentielle en génie physique : rester calme devant un montage optique.

Julie et Etienne, merci pour les nombreux échanges aussi bien techniques que frivoles près de la machine à café. Ces moments très agréables ont contribué à me rendre sérieusement accro au café.

Simon Lemire-Renault, j'ai toujours admiré chez toi ton sens de la minutie. Je suis très reconnaissant pour les nombreuses discussions enrichissantes en physique, à la limite de la philosophie.

Romain Deterre, quel plaisir ce fut de discuter avec toi à élaborer des solutions de programmation. Merci également de m'accompagner dans mes folies entrepreneuriales. Je suis d'accord, nous devrions brevetter quelques idées (à suivre). Thomas Perrillat-Bottonet merci infiniment pour ta générosité et la pertinence de tes remarques dans la lecture de cette thèse. J'espère qu'elle est à la hauteur de tes nombreuses suggestions. Amy Alexander, tu es toujours au rendez-vous. Je te remercie de me ramener vers la bonne voie devant chaque distraction.

Je tiens à remercier tout le Laboratoire d'Optique Diagnostique et D'Imagerie (LODI). LODI, je te remercie pour ton ambiance conviviale car sans toi, pas de machine à café, et sans elle, pas d'expérience aux petites heures de la nuit.

Christine Dubuc, Louise Benoît, les Poupart, JSebbs et Marie-Ève vous m'avez montré au courant des dernières années la définition et valeur de l'amitié. Des amis présents dans les bons et surtout dans les moments plus difficiles. Je vous remercie du fond du cœur. Je sais que vous n'êtes jamais loin, peu importe la distance qui nous sépare.

Marcel Lavoie, Sam, Kathy Villeneuve, Marie-Christine et Dominic Isabel je vous remercie pour votre support formidable. Vous êtes tous exceptionnels. Votre joie de vivre a toujours été pour moi une source de motivation. En espérant vous garder encore longtemps longtemps. Causette Fortin, merci pour les encouragements continus. J'ai toujours adoré ta question : quand est-ce que tu finis ta maîtrise ? Hey bien, je crois qu'elle est terminée !

Sarah Lavoie merci de donner un sens à cette thèse. Je suis infiniment reconnaissant pour ton support émotionnel pendant toutes ces longues années d'études et sans qui je n'en serais sûrement pas là ! Merci de me garder les deux pieds bien au sol et de me faire sourire continuellement. Avec toi, tout devient soudainement possible.

Je voudrais également remercier mes parents et ma sœur qui m'ont appris que la détermination a un sens lorsque les efforts sont continuellement au rendez-vous. Je suis très fier de vous avoir dans ma vie. Vous avez toujours été d'un grand support et d'une motivation tout au long de mes études.

## RÉSUMÉ

Le larynx est responsable de la phonation, et son bon fonctionnement est essentiel pour assurer une respiration et une déglutition adéquates. Le développement de cette structure anatomique engendre une série de changement physiologique et morphologique. Au cours de sa vie, de 1 à 9% de la population sera affectée par une pathologie laryngée, dont un grand nombre affecte spécifiquement la population pédiatrique. Les enfants affectés par ces pathologies laryngées sont particulièrement susceptibles de développer des problèmes additionnels de nature médicale, académique et psychosociale. Bien que plusieurs recherches aient été effectuées pour comprendre le développement des cordes vocales et les pathologies laryngées, plusieurs questions restent encore sans réponse. Le cycle de développement de cette microstructure anatomique est incompris, principalement à cause des méthodes actuelles de dépistage qui demeurent invasives. Par conséquent, les traitements thérapeutiques ou chirurgicaux sont peu adaptés à la clientèle pédiatrique et certains résultats sont sous-optimaux. Cette problématique illustre un besoin urgent pour un système d'imagerie non invasif dédié à l'observation des cordes vocales en pédiatrie.

La conception et la validation d'un outil clinique pour l'imagerie intraopératoire des cordes vocales comportent de nombreux défis. L'hypothèse principale de cette thèse repose sur la possibilité de caractériser les cordes vocales pédiatriques de façon minimalement invasive. L'innovation est en grande partie attribuée à la conception et à la réalisation d'un système d'imagerie ainsi que d'une méthode permettant l'étude systématique des zones du larynx d'où émergent les pathologies. Cette thèse vise à développer un outil et une méthode menant à une compréhension plus approfondie de la maturation de cette microstructure.

La tomographie par cohérence optique (ou OCT, de l'anglais « Optical Coherence Tomography ») est une technologie d'imagerie laser utilisée depuis quelques années en ophtalmologie, et récemment en cardiologie. Elle permet d'obtenir des coupes transversales (en profondeur) avec une résolution de l'ordre de quelques microns. Cette technique permettrait donc d'imager les structures anatomiques des cordes vocales pédiatriques, jusqu'ici inaccessibles étant donné la nature invasive de la biopsie.

Ayant identifié l'OCT comme une modalité d'imagerie optique potentielle pour l'analyse des cordes vocales et des structures avoisinantes du larynx, l'objectif est de définir et de caractériser de façon optique la microstructure des cordes vocales. Une validation est réalisée dans un premier temps à partir d'une étude ex vivo sur différents spécimens cadavériques d'animaux et d'humains. Ces spécimens ont été analysés en OCT pour identifier les éléments

liés aux étapes de maturation des cordes vocales. Une comparaison systématique entre la tomographie par cohérence optique et l'histologie permet d'identifier, pour chaque population étudiée, des caractéristiques spécifiques à cette structure anatomique.

Ces résultats encourageants ont permis le développement d'une sonde intraopératoire adaptée à l'imagerie des cordes vocales pédiatriques couplée à un système SS-OCT (SS-OCT, de l'anglais pour « Swept Source Optical Coherence Tomography »). Le système permet d'acquérir des images du larynx en temps réel et des acquisitions tridimensionnelles en quelques secondes. La sonde et le protocole d'acquisition permettent d'obtenir systématiquement des données volumétriques de la région d'intérêt : les plis vocaux où de nombreuses pathologies prennent forme.

Cette approche permet d'élaborer les premières études quantitatives du développement vocal sur des patients avec des cordes vocales saines en salle opératoire. Le profil d'atténuation du signal OCT a été étudié au sein de jeunes enfants (0-2ans) et d'adolescents. Ces deux groupes de population pédiatrique possèdent des caractéristiques optiques significativement distinctes, pouvant potentiellement représenter un changement anatomique dans la microstructure de la corde vocale.

La caractérisation optique des cordes vocales pédiatriques saines permet d'identifier plus facilement les pathologies laryngées. Une étude réalisée auprès d'une dizaine de cas pathologiques pédiatriques en salle opératoire permet d'identifier le contraste OCT des lésions bénignes. La caractérisation des lésions comme les nodules, kystes, pseudo-kystes et lésions causées par le virus du papillome humain a été réalisée. La morphologie sous-épithéliale de ces lésions est différente de celle obtenue par endoscopie, qui est de nature superficielle. Les images OCT des lésions révèlent une indication d'hyperplasie ou d'hyperkératinisation dans certains cas de nodule. Les kystes et pseudo-kystes sont nettement localisés plus profondément dans la corde vocale. Les données volumétriques des lésions permettent également de délimiter les marges et extraire les dimensions des lésions.

Ces résultats apportent des données supplémentaires jusqu'ici inaccessibles avec les techniques traditionnelles, ce qui ouvre la voie vers des thérapies adaptée aux enfants. La nature non invasive et non ionisante de l'OCT permet aussi d'envisager son utilisation comme un compagnon diagnostique permettant de guider les interventions peropératoires pour préserver au maximum les fonctions de cette microstructure unique.

## ABSTRACT

The larynx is responsible for phonation, and its proper functioning is essential to breathing and swallowing. The development of this anatomical structure creates a series of physiological and morphological changes. In one's lifetime, 1 to 9 % of the population will be affected by a laryngeal pathology, many of which specifically affecting the pediatric population. Children afflicted by laryngeal pathologies are particularly likely to develop additional medical, academic and psycho-social issues. Although several research studies have been conducted to understand the development of the vocal folds and laryngeal lesions, several questions remain unanswered. The development cycle of this anatomical microstructure is poorly understood, which is mainly due of current lack of noninvasive evaluation tools. This results in therapeutic or surgical treatments not being perfectly adapted to the pediatric clientele and some results are thus suboptimal. This issue illustrates the urgent need for non-invasive imaging system dedicated to the observation of the vocal folds in the pediatric population.

The design and validation of a clinical tool for intraoperative imaging of the vocal folds have many challenges. The main hypothesis of this thesis related to the noninvasive characterization of pediatric vocal folds. The innovation is largely attributed to the design and implementation of an imaging system and a method for the systematic study of the larynx, especially in areas from where diseases originate. This thesis aims at developing a tool and a method leading to a deeper understanding of the maturation of this microstructure.

Optical coherence tomography (OCT) is an optical imaging technology adopted in ophthalmology and recently in cardiology. It provides cross sectional (in depth) images with a resolution of a few microns. This technique allows imaging of anatomical structures of the pediatric vocal folds, without the negative consequences associated with biopsy.

Having identified OCT as a potential optical imaging method for the analysis of the vocal folds and surrounding structures of the larynx, the objective is to define and characterize the microstructure of vocal folds. A validation is initially performed using an ex vivo study of different cadaveric specimens, animals and humans. These specimens were analyzed using OCT to identify elements associated with stages of maturation of the vocal folds. A systematic comparison of optical coherence tomography with histology was carried out to identify specific characteristics of each population.

These encouraging results have enabled the development of an OCT system coupled to a handheld probe adapted for intraoperative imaging of the pediatric vocal folds. The system can acquire laryngeal images in real time, and three-dimensional data sets in seconds.

The probe and its associated acquisition protocol were developed to systematically obtain volumetric data of the vocal fold edge: the origin of many pathologies.

This approach allows the development of the first quantitative studies of vocal development of healthy patients in the operating room. The OCT attenuation profile was studied in young children (0-2years) and teenager (11-16years). These two pediatric populations show a significant difference in their optical characteristics, which is associated with anatomical changes in the microstructure of the vocal folds.

Optical characterization of healthy pediatric vocal folds leads to easier identification of laryngeal pathologies. A study of ten pediatric pathological cases was performed in the operating room to identify OCT contrast of benign lesions. Characterization of lesions such as nodules, cyst and pseudocyst, as well as lesions caused by the human papilloma virus was performed. Subepithelial morphology of these lesions is different from that obtained by endoscope, which is superficial in nature. OCT images of the lesions reveal an indication of hyperplasia or hyperkeratinization in some nodule cases. Cysts and pseudocysts are clearly located deeper in the vocal cord. Volumetric data also help delineate the margins and extract the dimensions of the lesions.

These results provide additional information previously inaccessible with traditional techniques, which paves the way for therapies suitable for children. The non-invasive nature of OCT also allows to consider intraoperative guidance in order to preserve this unique microstructure.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE . . . . .	iii
REMERCIEMENTS . . . . .	iv
RÉSUMÉ . . . . .	vi
ABSTRACT . . . . .	viii
TABLE DES MATIÈRES . . . . .	x
LISTE DES TABLEAUX . . . . .	xiv
LISTE DES FIGURES . . . . .	xv
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS . . . . .	xix
LISTE DES ANNEXES . . . . .	xxi
 CHAPITRE 1 INTRODUCTION . . . . .	1
1.1 Mise en contexte . . . . .	1
1.2 Problématique clinique . . . . .	2
1.3 Contribution originale . . . . .	8
1.4 Plan de la thèse . . . . .	10
 CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE . . . . .	12
2.1 Anatomie et physiologie . . . . .	12
2.1.1 Les cordes vocales . . . . .	14
2.2 Analyse fonctionnelle . . . . .	16
2.2.1 Histologiques . . . . .	16
2.2.2 Chimiques . . . . .	17
2.2.3 Biomécaniques . . . . .	17
2.3 Développement des cordes vocales . . . . .	18
2.4 Imagerie du larynx . . . . .	21
2.4.1 Laryngoscopie . . . . .	22
2.4.2 TDM et IRM . . . . .	23

2.5	Émergence des techniques microscopiques pour l'évaluation des cordes vocales pédiatriques . . . . .	23
2.5.1	Microscopie confocale . . . . .	24
2.5.2	Microscopie non linéaire . . . . .	25
CHAPITRE 3 PRINCIPES DE LA TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE OPTIQUE		28
3.1	Introduction . . . . .	28
3.2	Tomographie par cohérence optique . . . . .	30
3.2.1	OCT dans le domaine temporel . . . . .	31
3.2.2	OCT dans le domaine spectral . . . . .	32
3.3	Résolution . . . . .	35
3.4	Profondeur de champ . . . . .	36
3.5	Propriétés optiques des tissus . . . . .	38
3.6	Sondes endoscopiques en OCT . . . . .	39
3.6.1	Balayage radial . . . . .	41
3.6.2	Balayage linéaire . . . . .	43
3.6.3	Balayage en face . . . . .	43
3.7	Traitements des images OCT . . . . .	45
3.7.1	Atténuation du signal OCT . . . . .	47
3.7.2	Analyse de texture . . . . .	48
3.8	Application de l'OCT en laryngologie . . . . .	50
3.9	Discussion . . . . .	52
CHAPITRE 4 ANALYSE DES COUCHES VOCALES AVEC LA TOMOGRAPHIE PAR COHERENCE OPTIQUE . . . . .		54
4.1	Introduction . . . . .	54
4.2	Expérimentations précliniques . . . . .	55
4.2.1	Modèle expérimental . . . . .	55
4.2.2	Protocole . . . . .	56
4.2.3	Comparaison avec l'histopathologie . . . . .	60
4.3	Analyse quantitative . . . . .	61
4.3.1	Prétraitements des données brutes . . . . .	61
4.3.2	Atténuation relative du signal des cordes vocales . . . . .	62
4.3.3	Plateforme logicielle . . . . .	63
4.4	Résultats . . . . .	65
4.4.1	Analyse qualitative des structures morphologiques . . . . .	65
4.4.2	Définition quantitative des couches vocales . . . . .	72

4.5 Discussion . . . . .	89
4.6 Conclusion . . . . .	90
CHAPITRE 5 DESIGN ET CONCEPTION D'UN SYSTÈME D'IMAGERIE CLINIQUE . . . . .	91
5.1 Architecture du système clinique . . . . .	91
5.2 Design d'une sonde adaptée à la pédiatrie . . . . .	93
5.3 Sécurité laser et matérielle . . . . .	101
5.4 Conception de la sonde endoscopique OCT . . . . .	102
5.4.1 Laser de guidage . . . . .	104
5.4.2 Bras de référence . . . . .	105
5.4.3 Source laser fibrée OCT . . . . .	106
5.4.4 Fabrication des micro-miroirs . . . . .	107
5.4.5 Sensibilité et calibration de l'intensité . . . . .	109
5.4.6 Méthode de balayage . . . . .	110
5.4.7 Plateforme logicielle . . . . .	111
5.4.8 Système clinique . . . . .	112
5.5 Résultats . . . . .	112
5.5.1 Intégration à l'environnement chirurgical . . . . .	113
5.5.2 Caractérisation de la sonde . . . . .	114
5.6 Discussion . . . . .	117
CHAPITRE 6 ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DES CORDES VOCALES À PARTIR DE L'IMAGERIE OCT INTRAOPERATOIRE . . . . .	121
6.1 Introduction . . . . .	121
6.2 Protocole intraopératoire . . . . .	122
6.2.1 Analyse des images . . . . .	125
6.2.2 Coefficients d'atténuation relatifs de la lamina propria . . . . .	126
6.3 Résultats . . . . .	127
6.3.1 Cartographie optique du larynx pédiatrique . . . . .	127
6.4 Dimensions des microstructures des cordes vocales . . . . .	132
6.5 Analyse quantitative de la lamina propria entre jeunes enfants et adolescents . . . . .	133
6.6 Discussion . . . . .	135
6.7 Conclusion . . . . .	137
CHAPITRE 7 IMAGERIE DES CORDES VOCALES PATHOLOGIQUES . . . . .	138
7.1 Introduction . . . . .	138

7.2	Protocole . . . . .	139
7.3	Résultats . . . . .	140
7.3.1	Imagerie des lésions vocales ex vivo . . . . .	140
7.3.2	Imagerie des lésions intraopératoires . . . . .	142
7.4	Discussion . . . . .	147
7.5	Conclusion . . . . .	148
CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS . . . . .		150
8.1	Synthèse des travaux . . . . .	150
8.1.1	Expériences ex vivo . . . . .	150
8.1.2	Système d'imagerie OCT intraopératoire . . . . .	152
8.1.3	Expériences in vivo . . . . .	153
8.2	Limites des études cliniques et améliorations futures . . . . .	153
RÉFÉRENCES . . . . .		158
ANNEXES . . . . .		176

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 2.1	Développement de la lamina propria. . . . .	20
Tableau 3.1	Comparaison des mécanisme de balayage en OCT . . . . .	45
Tableau 5.1	Caractéristiques physiques de la sonde à respecter selon le groupe d'âge. .	94
Tableau 5.2	Spécifications techniques de la sonde OCT . . . . .	105
Tableau 5.3	Spécifications techniques de la source OCT utilisée . . . . .	107

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Coupe histologique du larynx sur le plan coronal. . . . .	3
Figure 1.2	Comparaison entre un larynx adulte et celui d'un enfant. . . . .	4
Figure 1.3	Résolution des modalités optiques. . . . .	6
Figure 2.1	Coupes anatomiques du larynx adulte . . . . .	12
Figure 2.2	Vue supérieure du larynx avec les cordes vocales en période d'abduction et lors de l'adduction. . . . .	13
Figure 2.3	Section transverse d'une vraie corde vocale adulte. . . . .	15
Figure 2.4	Modèle biomécanique à deux masses des cordes vocales. . . . .	18
Figure 2.5	Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine de cordes vocales pédiatriques. . . . .	19
Figure 2.6	Coupes histologiques du muscle vocal. . . . .	21
Figure 2.7	La laryngoscopie par voie nasales et par voie buccale. . . . .	22
Figure 2.8	Larynx d'un enfant de 8 ans. . . . .	23
Figure 2.9	Images confocales des cordes vocales de spécimens pédiatriques et porcins. . . . .	24
Figure 2.10	Microscopie confocale et multiphoton. . . . .	26
Figure 3.1	Le nombre de publications par année avec la tomographie par cohérence optique depuis son invention. . . . .	29
Figure 3.2	Principe de la tomographie par cohérence optique. . . . .	31
Figure 3.3	Profil de réflectivité recueilli après le balayage du miroir de référence. . . . .	32
Figure 3.4	Schéma des systèmes OCT dans le domaine spectral. . . . .	34
Figure 3.5	Effet de l'ouverture numérique sur la résolution latérale et la profondeur de champ. . . . .	37
Figure 3.6	Spectres d'absorption des principales composantes des tissus biologiques aux concentrations typiques. . . . .	39
Figure 3.7	Représentation schématique des méthodes de balayage les plus utilisées sur les sondes endoscopique en OCT. . . . .	41
Figure 3.8	Image OCT d'un doigt avec une jonction rotative et un balayage linéaire. . . . .	44
Figure 4.1	Vue sagittale et frontale d'un larynx porcin. . . . .	58
Figure 4.2	Environnement d'acquisition OCT ex vivo. . . . .	59
Figure 4.3	Corde vocale d'un échantillon porcin imagée à l'OCT et comparée à l'histologie. . . . .	60
Figure 4.4	Rehaussement du contraste à l'OCT d'une corde vocale humaine. . . . .	62

Figure 4.5	Diagramme de flux pour l'extraction des coefficients d'atténuation des cordes vocales. . . . .	63
Figure 4.6	Plateforme de traitement d'images et d'analyse quantitative développée pour ce projet. . . . .	64
Figure 4.7	Section transverse d'une voie aérodigestive normale d'un échantillon foetal imagée à l'OCT et comparée à l'histologie. . . . .	67
Figure 4.8	Section transverse d'une voie aérodigestive normale d'un échantillon porcin imagée à l'OCT et comparée à l'histologie. . . . .	68
Figure 4.9	Section transverse d'une voie aérodigestive normale d'un échantillon humain cadavérique imagée à l'OCT et comparée à l'histologie. . . .	70
Figure 4.10	Mesure morphologique de l'épaisseur de l'épithélium et de la lamina propria selon les spécimens analysés en OCT. . . . .	71
Figure 4.11	Région d'intérêt de la vraie corde vocale des spécimens foetaux. . . .	73
Figure 4.12	Profil d'intensité normalisée et courbe de régression linéaire en fonction de la profondeur pour les échantillons foetaux. . . . .	74
Figure 4.13	Région d'intérêt de la vraie corde vocale des spécimens porcins. . . .	75
Figure 4.14	Profil d'intensité normalisée et courbe de régression linéaire en fonction de la profondeur pour les échantillons porcins. . . . .	76
Figure 4.15	Région d'intérêt de la vraie corde vocale des spécimens humains. . . .	77
Figure 4.16	Profil d'intensité normalisée et courbe de régression linéaire en fonction de la profondeur pour les échantillons humains. . . . .	78
Figure 4.17	Coefficients d'atténuation relatifs pour la lamina propria des spécimens foetaux, porcin et humain. Lp1-3 : Couches de la lamina propria. . .	79
Figure 4.18	Spécimen porcin injecté avec une solution de collagénase et spécimen contrôle injecté avec une solution saline. . . . .	81
Figure 4.19	Coupe histologique colorée au Picro Sirius Red d'un spécimen porcin contrôle. . . . .	83
Figure 4.20	Coupe histologique colorée au Picro Sirius Red d'un spécimen porcin injecté à la collagénase. . . . .	83
Figure 4.21	Images OCT en fonction du temps pour les spécimens traités à la collagénase et les spécimens contrôles injectés avec une injection saline. .	85
Figure 4.22	Intensité normalisée en fonction du temps pour les spécimens traités à la collagénase et les spécimens contrôles injectés avec une injection saline. . . . .	86

Figure 4.23	Coupe transverse OCT de la lamina propria de spécimen pré-injection et post-injection après 180 minutes d'incubation d'un spécimen traité à la collagénase et d'un spécimen contrôle. . . . .	87
Figure 4.24	Évaluation du contraste dans la direction perpendiculaire aux fibres de collagène. . . . .	88
Figure 5.1	Diagramme de flux des données du système OCT clinique. . . . .	92
Figure 5.2	Les composants matériels clés d'un système OCT. . . . .	92
Figure 5.3	Géométrie du larynx en suspension. . . . .	94
Figure 5.4	Représentation schématique du design retenu pour la sonde endoscopique. . . . .	95
Figure 5.5	Configuration de la simulation sur Zemax. . . . .	97
Figure 5.6	Prototype d'une sonde endoscopique pédiatrique. . . . .	98
Figure 5.7	Diagramme de Siedel obtenu à partir des simulations Zemax. . . . .	99
Figure 5.8	Résultats des performances optiques obtenus sous Zemax. . . . .	100
Figure 5.9	Schéma du système d'imagerie OCT proposé. . . . .	103
Figure 5.10	Sonde endoscopique OCT illustrant les marqueurs d'orientation et la fenêtre de visualisation. . . . .	104
Figure 5.11	Design du mécanisme d'arrimage. . . . .	105
Figure 5.12	Spectre et sensibilité du laser utilisé. . . . .	106
Figure 5.13	Fabrication des micro-miroirs à 45 degrés. . . . .	108
Figure 5.14	Objet de calibration réalisé à la CNC. . . . .	109
Figure 5.15	Mécanisme de balayage 2D par galvanomètres. . . . .	110
Figure 5.16	Plateforme logicielle ThorImageOCT. . . . .	111
Figure 5.17	Système OCT développé pour l'analyse intraopératoire des cordes vocales. . . . .	112
Figure 5.18	Positionnement du système dans la salle de chirurgie. . . . .	113
Figure 5.19	Artéfacts liés aux réflexions internes dans la sonde endoscopique. . . .	115
Figure 5.20	Calibration de la sonde endoscopique. . . . .	116
Figure 5.21	Mesure de sensibilité de la sonde évaluée à plusieurs distances à partir de la première interface d'un objet de calibration et d'un tissu biologique (doigt). . . . .	117
Figure 5.22	Prototypes réalisés durant le projet. . . . .	119
Figure 5.23	Lentilles GRIN exposées à une flexion avec un tube externe inférieur à 800 microns d'épaisseur. . . . .	120
Figure 6.1	Séance d'imagerie OCT intraopératoire pendant une microlaryngoscopie en suspension. . . . .	123

Figure 6.2	Schéma anatomique et positionnement de la sonde portable OCT pendant la procédure d'acquisition. . . . .	124
Figure 6.3	Zone d'analyse quantitative de la vraie corde vocale d'un adolescent.	126
Figure 6.4	Vue endoscopique peropératoire de la glotte d'un sujet sain masculin de 9 ans. . . . .	128
Figure 6.5	Collage d'une acquisition 2D intraopératoire de la voie aérodigestive.	128
Figure 6.6	Représentation typique d'une projection OCT de la région infraglottique chez des patients sains. . . . .	129
Figure 6.7	Représentation typique d'une projection OCT de la région de transition entre l'espace infraglottique et la vraie corde vocale chez des patients sains. . . . .	130
Figure 6.8	Représentation typique de la vraie corde vocale. . . . .	131
Figure 6.9	Représentation typique d'une fausse corde vocale. . . . .	132
Figure 6.10	Épaisseur des couches vocales obtenue à partir des images intraopératoires OCT. . . . .	133
Figure 6.11	Profils d'atténuation de deux populations pédiatriques. . . . .	134
Figure 6.12	Coefficients d'atténuation relatif selon l'âge et la zone d'intérêt. . . . .	134
Figure 7.1	Section transversale OCT et histologiques d'un nodule et d'un pseudokyste obtenus chez des spécimens cadavériques. . . . .	140
Figure 7.2	Rendu volumétrique de cordes vocales adultes avec une pathologie bénigne du larynx. . . . .	142
Figure 7.3	Acquisition OCT intraopératoire de nodules bilatéraux chez une patiente de 11 ans. . . . .	143
Figure 7.4	Acquisition OCT intraopératoire de kyste chez un patient de 12 ans..	145
Figure 7.5	Acquisition OCT intraopératoire d'une papillomatose laryngée chez un patient de 3 ans. . . . .	146
Figure 7.6	Caractéristiques morphométriques des lésions bénignes. . . . .	147
Figure A.1	Schéma d'un microscope optique non linéaire développé pour la visualisation des cordes vocales. . . . .	177
Figure A.2	Section d'une corde vocale d'un spécimen porcin imagé avec le microscope non linéaire. . . . .	179
Figure A.3	Grossissement de la section d'une corde vocale d'un spécimen porcin.	180
Figure A.4	Schéma d'un microscope multimodal non linéaire et OCT développé pour la visualisation des cordes vocales <i>in vivo</i> . . . . .	182

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

VPH	Virus du papillome humain
IRM	Imagerie par résonance magnétique
TDM	Tomodensitométrie
OCT	Optical Coherence Tomography
LPS	Lamina propria superficielle
LPI	Lamina propria intermédiaire
LPP	Lamina propria profonde
AFM	Atomic Force Microscopy
SECM	Spectrally Encoded Confocal Microscopy
TiSa	Laser Titane : Saphire
F2P	Fluorescence à deux photons
GSH	Génération de seconde harmonique
GTH	Génération de troisième harmonique
CARS	Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy
OLCR	Optical Low-Coherence Reflectometry
TD-OCT	Time-Domain Optical Coherence Tomography
FD-OCT	Fourier-Domain Optical Coherence Tomography
Ligne-A	Profil de réflectivité
OFDI	Optical Frequency Domain Imaging
SS-OCT	Swept Source Optical Coherence Tomography
PS-OCT	Polarisation Sensitive Optical Coherence Tomography
CCD	Charge Coupled Device
OCM	Optical Coherence Microscopy
NA	Numerical Aperture
FDA	Food and Drug Administration
GRIN	Gradient-index
MEMS	Microelectromechanical Systems
MEEI	Massachusetts Eye and Ear Infirmary
H&E	Hématoxyline et à l'éosine
Ep	Couche épithéliale
Lp	Couche de la lamina propria
Ms	Couche musculaire vocale
G	Structures glandulaires

M	Marque à encre de Chine
V	Ventricule
Mb	Membrane basale
Ss	Cellules stratifiées
Ps	Cellules cillées pseudostratifiées
SNR	Noise-to-signal ratio
RSB	Rapport signal sur bruit
ANOVA	Analysis of variance
ANSI	American National Standards Institute
EPM	Exposition maximale permise
FWHM	Full Width at Half Maximum
VSCEL	Vertical-Cavity-Surface-Emitting Laser
RIN	Relative Intensity Noise
CNC	Machine-outil à commande numérique
FEP	Éthylène-propylène fluorées

**LISTE DES ANNEXES**

Annexe A	MICROENDOSCOPIE NON LINÉAIRE DES CORDES VOCALES	176
Annexe B	PROTOCOLE . . . . .	183
Annexe C	COMPLÉMENT OCT . . . . .	185

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

### 1.1 Mise en contexte

Ryan est admis à l'hôpital. Il a une pathologie récurrente : le virus du papillome humain (VPH). C'est la troisième fois qu'il est admis à l'hôpital cette année. D'une voix quelque peu effarouchée, il cache mal son mécontentement d'être dans la salle d'attente à 7 :00 du matin. La procédure prévue consiste à lui brûler, au laser, des papillomes localisés sur ses cordes vocales et sur les structures anatomiques avoisinantes. Ces papillomes envahissent littéralement la trachée et non seulement empêchent de parler librement, mais peuvent également nuire à la respiration.

Étant donné la sévérité de la situation, Ryan entre rapidement sur une civière dans la salle de chirurgie, avec sa mère et deux infirmières. La salle ne fait pas plus de 5 m<sup>2</sup>. Entre ses mains et toujours conscient, il joue avec une tablette électronique. Souvent en pédiatrie, une tablette électronique est disponible pour distraire les enfants. Tranquillement, avec un doigté efficace et une grande considération, l'anesthésiste enfile un petit masque au jeune homme qui est emballé par les jeux animés. Il suffit de quelques minutes pour s'apercevoir que Ryan est tombé dans un profond sommeil. C'est alors que les membres de la famille quittent la salle d'opération et le corps médical se met à l'oeuvre.

Une trentaine de minutes se sont écoulées entre l'entrée de Ryan et le « timeout ». Le « timeout » est un moment critique où le silence complet règne en salle d'opération afin de permettre à l'infirmière en chef de donner l'âge du patient, les antécédents médicaux et un rappel de la procédure clinique prévue. Bien que Ryan ne soit pas tout à fait conscient de la raison pour laquelle il est traité ou combien de temps ce manège risque encore de durer, aujourd'hui Ryan vient de bénéficier de la première intervention sur les cordes vocales pédiatriques avec une technologie laser nommée la tomographie par cohérence optique. Cette sonde laser nouvellement développée permet de visualiser les structures anatomiques sous la couche superficielle, jusqu'ici invisible au clinicien autrement qu'avec un prélèvement et l'analyse histopathologique du tissu.

Sachant que près d'un dixième de la population sera touchée par un trouble de la voix au cours de sa vie, il serait intéressant d'évaluer le potentiel de cette technologie non invasive. Pouvons-nous améliorer les traitements à l'aide de ce nouvel outil ? Si oui, Ryan, tout comme 6 à 9% des enfants pourront éventuellement bénéficier d'un traitement adapté à leur âge, sexe et degré de maturité anatomique. Il pourrait également permettre d'observer et d'identifier

différentes lésions bénignes comme les nodules, les kystes, les polypes et les lésions causées par le virus du papillome humain. Les conséquences de cette intervention seront surprenantes pour tous. Je vous propose, au travers de l'histoire de Ryan, le dévoilement de la problématique clinique et la mise en oeuvre d'un instrument médical afin de comprendre un peu mieux les cordes vocales et la mise en examen de certaines pathologies laryngées chez les enfants.

## 1.2 Problématique clinique

Le larynx joue un rôle vital dans la préservation des fonctions essentielles comme la respiration et la déglutition. Bien que la plupart des mécanismes en jeu ne soient pas sous notre contrôle, ils demeurent capitaux. À titre d'exemple : l'aiguillage de la nourriture vers le canal digestif (œsophage) ou bien la fermeture automatique des cordes vocales ou encore le mouvement ondulatoire des cellules ciliées qui permettent de faire remonter à la surface les substances étrangères sont tous des mécanismes mis en oeuvre par le larynx. Ces nombreux mécanismes visent tous à protéger les voies respiratoires. Sur une échelle moins vitale, mais tout de même essentielle, le larynx permet la phonation : transformer l'air expulsé par les poumons en une onde sonore. Ces exemples illustrent tout juste la complexité des mécanismes en jeu dans le larynx.

Malgré l'importance individuelle de chaque élément constitutif du larynx : cartilage, ligament, muscle et nerf, les cordes vocales (ou plis vocaux) demeurent la structure anatomique centrale du larynx. Elles sont au cœur de tous les mécanismes physiologiques effectués par le larynx. Ces plis vocaux participent à la fois à la fonction respiratoire, à la fonction de déglutition et à la fonction de phonation. L'intérêt porté aux cordes vocales est multiple. D'une part, il est de nature médicale étant donné que les cancers reliés au larynx apparaissent souvent à l'interface glottique (l'ouverture formée par les cordes vocales) [Lalwani (2011)]. D'autre part, il est physiologique, car un changement même mineur aux cordes vocales (élasticité, viscosité, lésion) peut entraîner des troubles sévères de la phonation [Hirano *et al.* (2009)]. La phonation n'est possible que si les cordes vocales arrivent à régulariser adéquatement la pression et le flux d'air provenant de l'espace sous-glottique (sous les cordes vocales). Elles agissent comme un régulateur d'air vers les poumons [Noordzij et Ossoff (2006)]. Cette ouverture synchronisée des cordes vocales est alors essentielle non seulement à la respiration, mais également à la génération de la voix. La Figure 1.1 illustrée à la page suivante montre une coupe histologique coronale du larynx. Elle permet de localiser les nombreuses structures importantes du larynx. On y retrouve notamment au centre les cordes vocales et l'espace glottique.

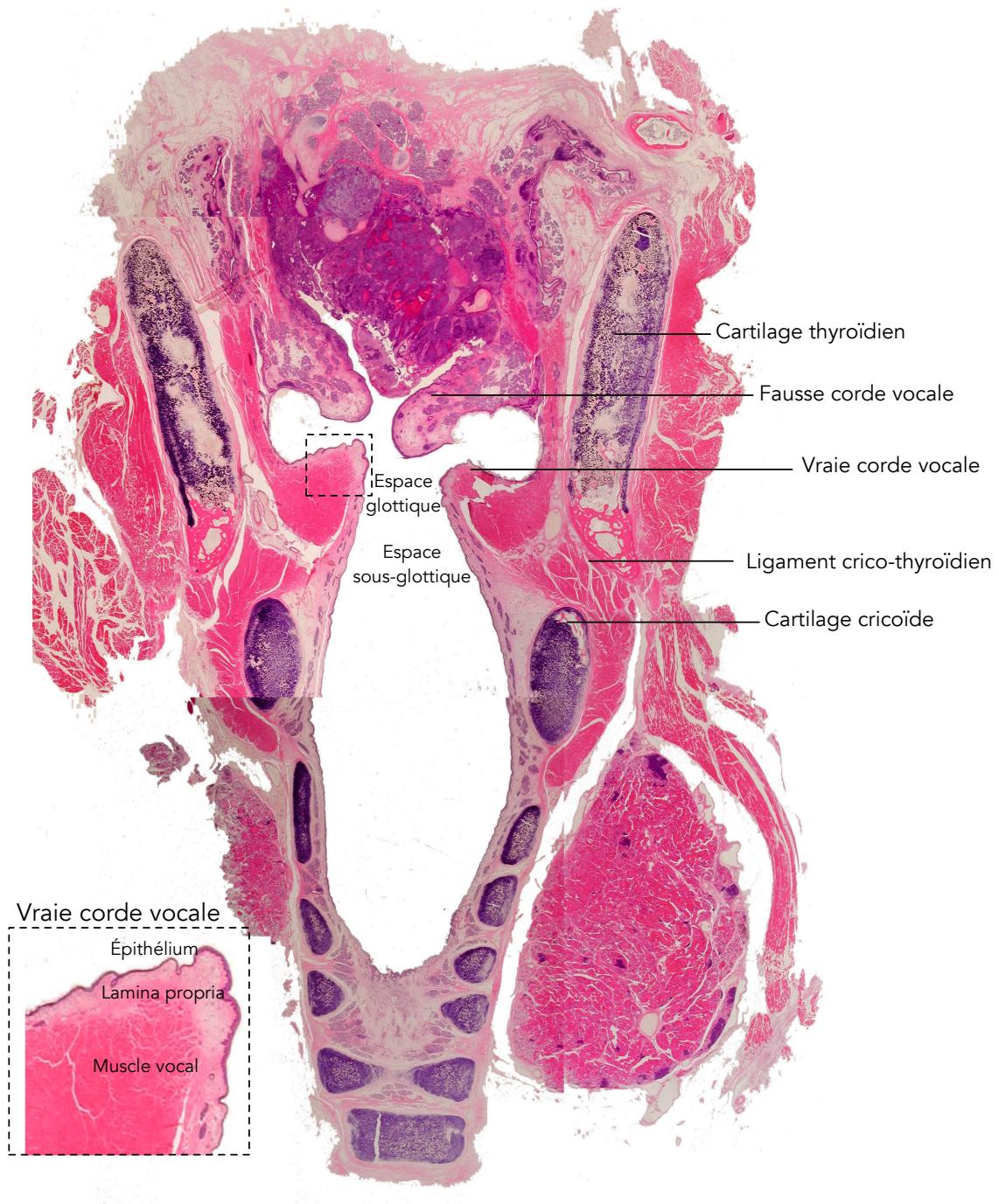


Figure 1.1 Coupe histologique du larynx sur le plan coronal. Insert représentant la position des cordes vocales au sein du larynx. Les couches de la muqueuse sont : l'épithélium, la lamina propria et le muscle de vocal (adapté de Netter (2010)).

Un dérèglement dans la synchronisation ou l'apparition d'une lésion peut engendrer des complications multiples dont la sévérité dépend de la nature et de l'ampleur de la pathologie. Les pathologies bénignes peuvent être provoquées par des troubles de communication typiquement attribuables à une surutilisation de la voix. Cette manifestation est de plus en plus visible dans les sociétés occidentales où l'usage de la voix est essentiel dans le milieu professionnel [Martins *et al.* (2010)]. L'exposition à certains facteurs pathogènes, tels que le tabagisme, l'abus d'alcool et la pollution de l'air contribuent à accentuer ces troubles de la voix [Pelucchi *et al.* (2006)]. Il existe également des pathologies beaucoup plus sévères comme la paralysie d'une corde vocale, les laryngites chroniques, la sténose du larynx et l'apparition de tumeurs vocales. Dans ces situations, les conséquences sont très sérieuses et peuvent provoquer une insuffisance respiratoire et même la mort [Hartnick et Boseley (2008)]. Les troubles du larynx et les facteurs étiologiques qui y sont associés sont multiples et dépendent grandement de l'âge des patients atteints. En effet, le larynx subit d'importants changements d'un point de vue anatomique et physiologique durant son développement. Comme illustré à la Figure 1.2, le larynx de l'enfant est particulier et n'est en aucun cas une version réduite du larynx adulte, mais plutôt un organe en cours de développement. Cette distinction, entre l'anatomie adulte et pédiatrique, est essentielle à l'évaluation clinique et au traitement des pathologies [Sapienza *et al.* (2004)].

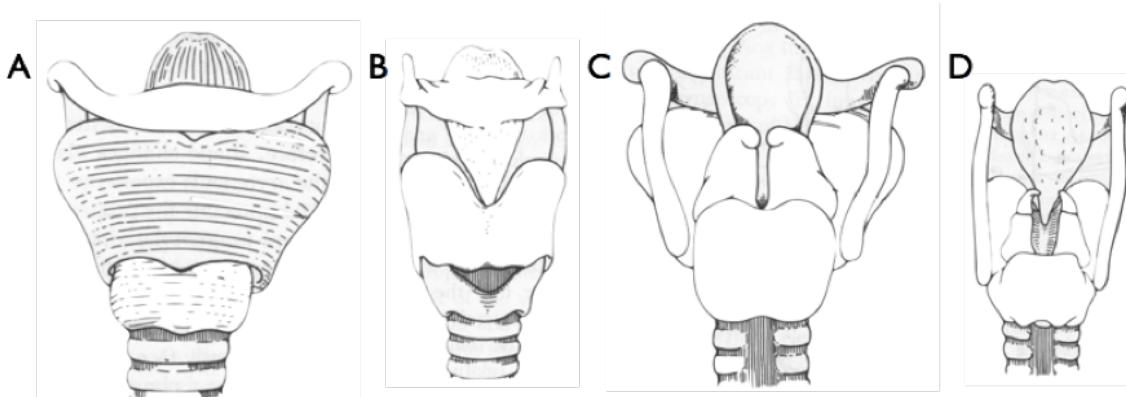


Figure 1.2 Comparaison entre un larynx adulte et celui d'un enfant (adapté de Hartnick et Boseley (2008)). (a) Adulte vue antérieure (b) enfant vue antérieure (c) adulte vue postérieure (d) enfant vue postérieure.

Malgré les nombreuses études biomécaniques [Goodyer *et al.* (2006); Dailey *et al.* (2009); Goodyer *et al.* (2009); Šidlof *et al.* (2008); Heris *et al.* (2016); Miri *et al.* (2014)], biologiques [Awd Allah *et al.* (2009); Valter *et al.* (2005); Bartlett *et al.* (2012)] et physiologiques [Fink (1974); Branski *et al.* (2006)] réalisées, peu d'études portent sur les mécanismes qui gouvernent le développement ou la maturation des cordes vocales. Cette situation est principalement tribu-

taire d'un manque de spécimens cadavériques pédiatriques. Les conclusions tirées des études histopathologiques chez l'adulte ont permis d'émettre des hypothèses quant à un modèle pédiatrique. Cependant, ce modèle, qui est basé sur le contenu en élastine et en collagène des plis vocaux, est imprécis et ne permet pas d'identifier le moment opportun pour intervenir en cas de pathologie. Enfin, les conclusions de plusieurs études convergent pour établir que le traitement des pathologies laryngées pédiatriques exige une compréhension complète des mécanismes en jeu lors de la différenciation structurelle des couches vocales. À ce jour, il n'existe aucun moyen d'évaluer le degré de maturité vocale de façon non invasive.

Actuellement, l'évaluation clinique des troubles de la voix s'effectue au moyen d'une laryngoscopie directe (sous anesthésie générale) ou indirecte (avec ou sans anesthésie locale) afin d'identifier tout élément irrégulier : une géométrie ou une rigidité particulière. Ces examens par endoscopie vidéo s'avèrent utiles pour visualiser des endroits autrement inaccessibles. Les endoscopes en laryngologie ou dans toute autre discipline offrent autrement des optiques angulaires et la possibilité de visualiser en gros plan des structures d'intérêts. Bien que ceci soit crucial au diagnostic, l'endoscopie vidéo n'offre aucune information quantitative ou complémentaire sur le métabolisme, la physiologie ou la concentration cellulaire. Enfin, le diagnostic repose principalement sur l'apparence de la surface des cordes vocales ou des structures environnantes. Les limites de l'endoscopie sont rapidement atteintes en laryngologie : étant très peu vascularisée, la vraie corde vocale offre très peu de signes précurseurs d'une pathologie. En fait, la plupart des pathologies prennent naissance sous la couche épithéliale qui est invisible au clinicien.

De plus, il est difficile de différencier ces lésions sous-épithéliales cliniquement et histologiquement [Dailey *et al.* (2009); Goodyer *et al.* (2009); Šidlof *et al.* (2008); Barriga *et al.* (2007)]. Par exemple, la surface des nodules et kystes est relativement similaire à l'endoscopie, étant donné qu'ils apparaissent comme une déformation de la couche épithéliale. À ce jour, considérant que les stratégies de traitement diffèrent pour chaque type de lésion, la recherche de caractéristiques déterminante pour l'évaluation des lésions bénignes demeure essentielle [Awd Allah *et al.* (2009)].

Les modalités d'imagerie radiologique telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomodensitométrie (TDM) (anglais, « CT-Scan »), les rayons X et les ultrasons ne sont malheureusement pas en mesure d'évaluer correctement l'intégrité de la muqueuse des cordes vocales. Leur résolution est insuffisante pour visualiser les caractéristiques microscopiques et leur contraste dans ce contexte est faible. Malgré les risques associés, la seule option pour déterminer le type et l'étendue des pathologies affectant le larynx demeure l'utilisation

de biopsies chirurgicales. Bien que la biopsie suivie par l'histologie soit le « gold standard » clinique, elle produit une grande quantité de faux résultats négatifs dus à des erreurs d'échantillonnage, et n'est donc pas adaptée pour analyser de grandes surfaces. De façon encore plus importante, la biopsie de la corde vocale peut provoquer des cicatrices, ce qui peut nuire à la qualité de la voix [Valter *et al.* (2005)]. D'autant qu'un prélèvement chez de jeunes enfants risque de perturber l'intégrité et le développement la corde vocale.

Le caractère invasif des traitements actuels en laryngologie donne lieu à une recherche de solutions alternatives. Une option de plus en plus explorée consiste en l'utilisation de technologies d'imagerie optique. Quelques études ont montré que l'utilisation de modalités optiques non invasives permet d'éviter la biopsie et les conséquences qui y sont associées [Wong *et al.* (2005); Klein *et al.* (2006); Boudoux *et al.* (2007)]. La Figure 1.3 permet d'illustrer le positionnement des technologies optiques par rapport aux modalités radiologiques traditionnelles en ce qui a trait à la résolution et à la profondeur du champ de vue (appelée pénétration).

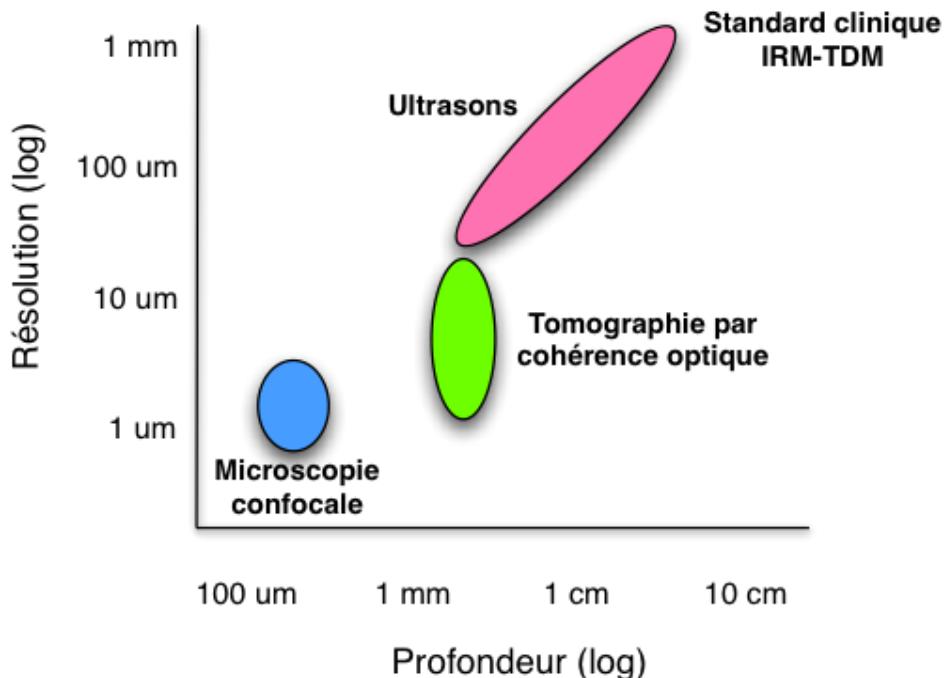


Figure 1.3 Résolution des modalités optiques (adapté de Drexler et Fujimoto (2008)).

On remarque que les modalités traditionnelles comme l'IRM et la tomodensitométrie (TDM) peuvent imager très profondément, mais leur résolution est limitée. Ces modalités sont excellentes dans la détection des tumeurs de plus d'un centimètre de diamètre<sup>1</sup>. Toutefois, seules

1. Certains IRM à haut champ peuvent détecter des lésions plus petites, mais ces instruments sont très peu déployés en milieux hospitaliers.

les tumeurs avancées ont cette dimension dans la région anatomique du cou et de la tête. Identifier une tumeur de l'ordre du millimètre est très difficile à réalisé. Observer une lésion cancéreuse ou bénigne dans la lamina propria de la corde vocale est présentement impossible autrement que par le prélèvement d'un échantillon suivi d'une histologie.

L'ultrason avec une résolution typiquement de 100 microns à 1 millimètre, selon la fréquence utilisée, représente une avenue intéressante pour la visualisation des tissus mous. Toutefois, le contraste de cette technique d'imagerie est insuffisant pour visualiser ou fournir des mesures quantitatives précises sur les couches internes des plis vocaux.

Au centre de la figure, on note une technique d'imagerie médicale non invasive et en temps réel, dotée d'une grande résolution : la tomographie par cohérence optique (ou OCT, de l'anglais « Optical coherence tomography »). L'OCT est une technique introduite par Huang *et al.* (1991). Basée sur le principe d'interférométrie, elle permet de mesurer la provenance de la lumière rétrodiffusée pour obtenir des coupes transversales d'échantillons semi-transparents, tels les tissus mous. Les premières images ont été obtenues de la rétine [Fercher *et al.* (1993); Swanson *et al.* (1993)] et des artères coronaires [Huang *et al.* (1991)]. Depuis, cette modalité minimalement invasive a grandement évolué. Elle est maintenant bien établie en ophtalmologie. Certes, des conditions favorables aux modalités optiques ont permis à l'OCT de se répandre plus rapidement dans cette discipline médicale. L'accessibilité : la cornée transparente permet une atténuation minimale de la lumière avant d'atteindre le tissu à analyser. L'imagerie à haute résolution : permet d'acquérir des images « en face » avec une précision de l'ordre de quelques microns. Enfin, les motifs économiques : les faibles frais d'exploitation et d'entretien sont des facteurs contributifs. Ces conditions favorables sont également valables en laryngologie. C'est plutôt l'incompatibilité avec l'appareillage endoscopique existant et le manque de paramètres quantitatifs, pouvant caractériser la pathologie, qui sont des facteurs limitants l'intégration en clinique [Betz *et al.* (2008)].

Cette problématique souligne la nécessité de développer une sonde adaptée à l'observation laryngale, notamment pour la clientèle pédiatrique. Une sonde qui possède la capacité de générer, de façon non invasive, des images de qualité comparable à celle de l'histologie. La caractérisation du développement des cordes vocales, de la naissance jusqu'à l'âge adulte, permettrait ainsi d'apporter des prédictions fiables et d'élucider certaines propriétés complexes de cette structure multicouche, encore peu connue. Ces informations complémentaires, permettraient d'enrichir les approches préopératoire, peropératoire et postopératoire.

### 1.3 Contribution originale

Bien que plusieurs sondes endoscopiques aient été développées ces dernières années dans les laboratoires de recherche, aucune n'est adaptée à un contexte laryngologique et encore moins pour une clientèle pédiatrique. Nous avons, dans le cadre de ce projet, conçu, développé et validé une sonde endoscopique OCT spécialement dédiée à la clientèle pédiatrique.

Au terme de ce projet, plusieurs livrables ont été réalisés. L'originalité de cette proposition réside, d'une part, dans l'élaboration d'une étude sur le développement des cordes vocales, jusqu'ici très difficile à réaliser compte tenu du caractère invasif des approches actuelles ; et, d'autre part, dans le perfectionnement d'outils et de techniques chirurgicales pour l'identification des pathologies vocales.

Nous avons réalisé la première étude *in vivo* avec la tomographie par cohérence optique sur le développement des cordes vocales et des pathologies pédiatriques. Cette approche permet d'apporter des conclusions complémentaires aux études préalables sur les spécimens cadavériques. Une nouvelle méthode de caractérisation des cordes vocales a également été créée. Cette méthode de quantification des images OCT est basée sur des descripteurs morphologiques (épaisseur, courbure, atténuation et texture). Ces informations servent à l'interprétation de la densité de collagène et d'élastine, essentielles à la caractérisation des couches vocales. Cette technique de caractérisation des couches de lamina propria apporte un regard et une richesse additionnelle avec une combinaison d'informations structurelles et fonctionnelles.

Les publications suivantes listent les contributions réalisées durant le projet. La liste présente les contributions à la littérature scientifique sous forme d'articles, de chapitres de livre ainsi que de conférences internationales.

*Article scientifiques*

**Benboujja, F.**, Garcia, J. A., Beaudette, K., Strupler, M., Hartnick, C. J. and Boudoux, C., Towards a combined OCT-nonlinear probe for intraoperative imaging of pediatric vocal fold. *The Laryngoscope*. (In preparation)

Garcia, J. A., **Benboujja, F.**, Beaudette, K., Guo, R., Boudoux, C. and Hartnick, C. J., Collagen content limits optical coherence tomography image depth in vocal fold tissue. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. doi : 10.1177/0194599816658005 2016.

**Benboujja, F.**, Garcia, J. A., Beaudette, K., Strupler, M., Boudoux, C. and Hartnick, C. J., Intraoperative imaging of pediatric vocal fold lesions using optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*. doi :10.1117/1.JBO.21.1.016007, 2015.

Garcia, J. A., **Benboujja, F.**, Beaudette, K., Guo, R., Boudoux, C. and Hartnick, C. J., Using attenuation coefficients from optical coherence tomography as markers of vocal fold maturation. *The Laryngoscope*. doi : 10.1002/lary.25765, 2015.

Strupler, M., Beckley, A.M., **Benboujja, F.**, F., Dubois, S., Noiseux, I., Mermut, O., Bouchardeau, J., Boudoux, C., Towards an automated method for OCT characterization. *Journal of Biomedical Optics*. doi :10.1117/1.JBO.20.12.126007, 2015.

Maturo S, **Benboujja, F.**, Boudoux C, Hartnick C., "Quantitative distinction of unique vocal fold subepithelial architectures using optical coherence tomography," *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 121(11) :754-60, 2012.

Kathy Beaudette, Mathias Strupler, **Fouzi Benboujja**, Stefan Parent, Carl-Eric Aubin, and Caroline Boudoux, "Optical coherence tomography for the identification of musculoskeletal structures of the spine : a pilot study," *Biomed. Opt. Express* 3, 533-542, 2012.

Simon Lemire-Renaud, Mathias Strupler, **Fouzi Benboujja**, Nicolas Godbout, and Caroline Boudoux, Double-clad fiber with a tapered end for confocal endomicroscopy, *Biomed. Opt. Express* 2, 2961-2972, 2011.

Wendy-Julie Madore ; Etienne De Montigny ; Andréanne Deschênes ; **Benboujja, Fouzi** ; Mikael Leduc ; Anne-Marie Mes-Masson ; Diane Provencher ; Kurosh Rahimi ; Caroline Boudoux ; Nicolas Godbout ; Morphologic 3D scanning of fallopian tubes to assist ovarian cancer diagnosis. *Proc. SPIE* 9689, *Photonic Therapeutics and Diagnostics XII*, 96894D, 2016.

### Chapitres de livre

Strupler, M., Deterre, R., Goulamhoussen, N., **Benboujja, F.**, Hartnick, C. J., Boudoux, C., Biomedical Optics in Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Principles and Practice. In B. Wong, J. Ilgner (Eds.), Nonlinear microscopy of the vocal folds, (Submitted, 2016).

Boudoux, C., **Benboujja, F.**, Deterre, R., Strupler, M., Maturo, S., Hartnick, C. J., Normal and Abnormal VocalFolds Kinematics :. In B. Wong. J. Ilgner (Eds.), Emerging microscopy techniques for pediatric vocal fold evaluation, (Submitted, 2016).

### Conférences internationales

**Benboujja, F.**, Garcia, J. A., Beaudette, K., Strupler, Hartnick, C. J., Boudoux, C. (2016), Pediatric vocal fold lesion imaging using optical coherence tomography ; American Society for Laser Medicine and Surgery 2016. Boston, MA, USA.

**Benboujja, F.**, Garcia, J. A., Beaudette, K., Strupler, M., Boudoux, C. and Hartnick, C. J. (2016), Intraoperative imaging of pediatric vocal fold lesions using optical coherence tomography. SPIE Photonics 2016. San Francisco, CA, USA.

**Fouzi Benboujja**, Derek Rogers, Scott Infusino, Mathias Strupler, Christopher J. Hartnick, Caroline Boudoux ; (2014). Vocal fold maturation study using Optical Coherence Tomography. SPIE Photonics West 2014. San Francisco, CA, USA.

**Fouzi Benboujja**, Shilpa Ojha, Mathias Strupler, Stephen Maturo, Scott Infusino, Christopher J. Hartnick, Caroline Boudoux ;(2013), Study of Vocal Fold Development using Optical Coherence Tomography. SPIE Photonics 2013. San Francisco, CA, USA.

### 1.4 Plan de la thèse

L'objectif général de cette dissertation est d'évaluer de façon non invasive le développement et les lésions des cordes vocales pédiatriques afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la maturation des plis vocaux et dans la formation des pathologies. Cette thèse comprend 8 chapitres. Outre l'introduction (Chapitre 1) et le retour sur les travaux antérieurs de recherches énoncé dans le deuxième chapitre, le chapitre trois porte sur les principes de la tomographie par cohérence optique et son application dans l'analyse des cordes vocales. Le chapitre suivant (Chapitre 4) propose une modélisation du développement vocale et la

validation à l'histologie des structures anatomiques des cordes vocales. Ensuite, le chapitre cinq énonce la démarche et les étapes de conceptions réalisées pour le développement d'un endoscope *in vivo* à haute résolution adapté à la laryngologie pédiatrique. Les étapes du design, suivies par la caractérisation et la validation de l'outil sont exposées. Les chapitres six et sept permettent d'évaluer l'outil dans un contexte *in vivo* pour l'observation des structures saines et pathologiques des cordes vocales. Le dernier chapitre (Chapitre 8) propose une discussion générale destinée à synthétiser les travaux réalisés jusqu'ici et énoncés les perceptives d'une étude longitudinale du nouveau-né à l'adulte pour déceler les mécanismes structurels et biologiques impliqués dans le cycle de développement et de réhabilitation de cette structure anatomique. Enfin, l'annexe A propose des pistes possibles pour joindre la tomographie par cohérence optique avec une méthode de contraste complémentaire, telles l'imagerie non linéaire ou l'imagerie hyperspectrale.

## CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Cette revue de littérature portera sur deux thèmes, l'un clinique et l'autre technologique. D'une part, afin de bien évaluer les besoins liés au suivi non invasive des cordes vocales, nous commencerons par réviser la description des structures anatomiques et de la physiologie du larynx. Cette étape servira en quelque sorte au cahier de charges de la modalité d'imagerie choisie, l'OCT, qui sera, d'autre part comparée aux méthodes présentement utilisées pour examiner le larynx.

### 2.1 Anatomie et physiologie

Le larynx illustré à la Figure 2.1 consiste, à l'exception de l'os hyoïde, en une structure entièrement composée de tissus mous. Les muscles, les ligaments et la muqueuse sont rigidifiés par une matrice de cartilage. De forme tubulaire, le larynx est localisé derrière la langue, sous le pharynx, et s'étend jusqu'au cartilage cricoïde, au-dessus de la trachée. Il est antérieur à l'œsophage et se situe à un niveau entre la troisième et la sixième vertèbre cervicale.

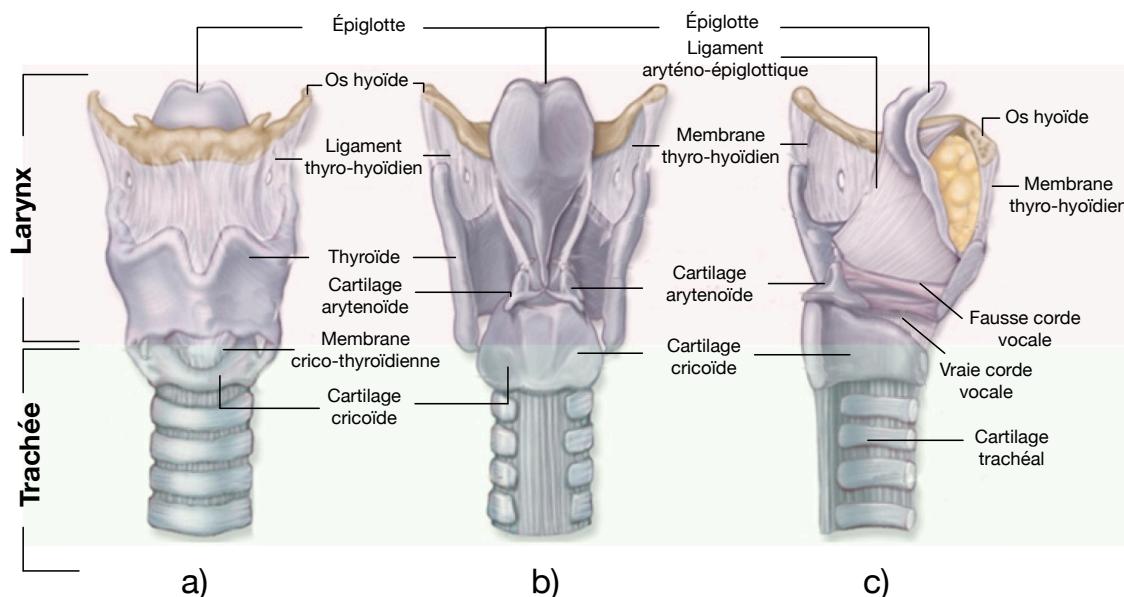


Figure 2.1 Larynx adulte avec vue antérieure (a), postérieure (b) et sagittale (c) (adapté de Netter (2010)).

Le larynx possède neuf structures cartilagineuses dont trois uniques (nommées cricoïde, thyroïde et épiglotte) et trois formant une paire (nommées arytenoïdes, cornicules et cunéiformes). À la base de cette armature de tissus cartilagineux solide, on retrouve le cartilage cricoïde où vient s'articuler le ligament cricothyroïdien, relié au-dessus par le cartilage thyroïdien : le plus visible des cartilages du larynx. Sa forme, plus prononcée chez l'homme, correspond au relief perçu à la surface du cou, aussi connu sous le nom de pomme d'Adam. Les cartilages thyroïde et cricoïde permettent de renforcer et de protéger le larynx. Enfin, le cartilage arytenoïde permet de contrôler la longueur et la position du ligament vocal. L'épiglotte quant à elle contribue à aiguiller la nourriture vers l'oesophage. Les muscles intrinsèques (nommés thyroaryténoides, cricoaryténoides, interaryténoides et cricothyroïdes) permettent d'articuler le mouvement et la vibration des cordes vocales tandis que les muscles extrinsèques (suprahyoïde et infrahyoïde) permettent le mouvement global du larynx au sein du cou. L'étude d'Hirano [Hirano (1974)] souligne que les muscles intrinsèques ont une structure unique et très complexe.

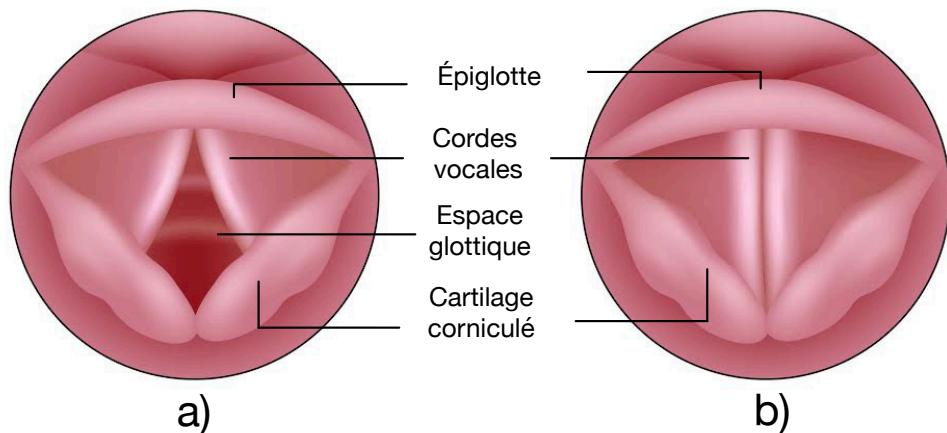


Figure 2.2 Vue supérieure du larynx avec les cordes vocales en période d'abduction (a) et lors de l'adduction (b).

La description du processus de déglutition ou de respiration permet mieux d'illustrer la complexité et la synchronisation des éléments constitutifs du larynx. Durant la déglutition, le larynx subit un mouvement vers le haut, grâce aux muscles extrinsèques. L'épiglotte s'aplatit et s'appuie sur le larynx pour ainsi en obstruer entièrement l'entrée. Au même moment, la fermeture des cordes vocales est actionnée par les muscles intrinsèques. Ces mécanismes visent tous à protéger les voies respiratoires de substances étrangères. En ce qui concerne la respiration, lors de l'inspiration initiée par le diaphragme, la trachée, poussée vers le bas,

entraîne la descente du cartilage cricoïde. Par conséquent, tout le larynx est attiré vers la cage thoracique. Comme un ressort, l'anneau cricoïdien permet de supporter la pression négative qui s'exerce dans la trachée afin de compléter l'inspiration. Le larynx permet alors de réguler la pression intrathoracique. Le maintien de cette pression est essentiel à l'accomplissement des mouvements volontaires lors des exercices physiques ou involontaires lors des vomissements. Une description plus détaillée des processus physiologiques est présentée dans l'ouvrage de Fink [Fink (1974)].

### 2.1.1 Les cordes vocales

L'anatomiste français Ferrein (1693-1796) est le premier à avoir imaginé les cordes vocales comme une structure composée de plusieurs couches. Ses études exhaustives ont permis d'établir le premier modèle multicouche. Par la suite, les travaux de Bishop en 1830 ont permis d'ajouter les variables de viscosité et de flexibilité au modèle afin d'établir les premières hypothèses biomécaniques des couches vocales. Ces travaux font état d'une couche superficielle qui vibre en fonction d'une tension exercée sur la membrane. Il faudra attendre les travaux majeurs d'Hirano et coll. [Hirano (1974, 1975)] pour enfin avoir une description partielle du développement de la microanatomie des cordes vocales. Cet ouvrage marque un point tournant en laryngologie selon Hartnick *et al.* (2005); Boseley et Hartnick (2006). À l'aide de coupes histologiques, Hirano décrit minutieusement cette structure composée de tissus conjonctifs, de cellules épithéliales et de muscles. La Figure 2.3 permet d'illustrer le modèle développé par les travaux d'Hirano et coll. [Hirano (1974, 1975)]. Le modèle proposé décompose la corde vocale en cinq couches distinctes : l'épithélium, les trois couches de la lamina propria et le muscle vocal.

#### Épithélium

Chez l'adulte, l'épithélium possède une épaisseur de 70 à 150 µm. Il protège essentiellement les cordes vocales de l'environnement intrinsèque et extrinsèque. En surface, les cellules épithéliales pavimenteuses stratifiées permettent le maintien d'un mucus pour préserver une lubrification adéquate. De plus, toujours selon Hirano, ces cellules épithéliales ont la capacité de résister au choc provoqué par les vibrations. Ce dernier point permet d'expliquer la différenciation dans la disposition et dans le type de cellules épithéliales (pavimenteuses stratifiées) retrouvées sur les cordes vocales comparativement à d'autres cellules épithéliales (prismatiques) retrouvées dans le larynx. L'épithélium de la corde vocale est suivi d'une struc-

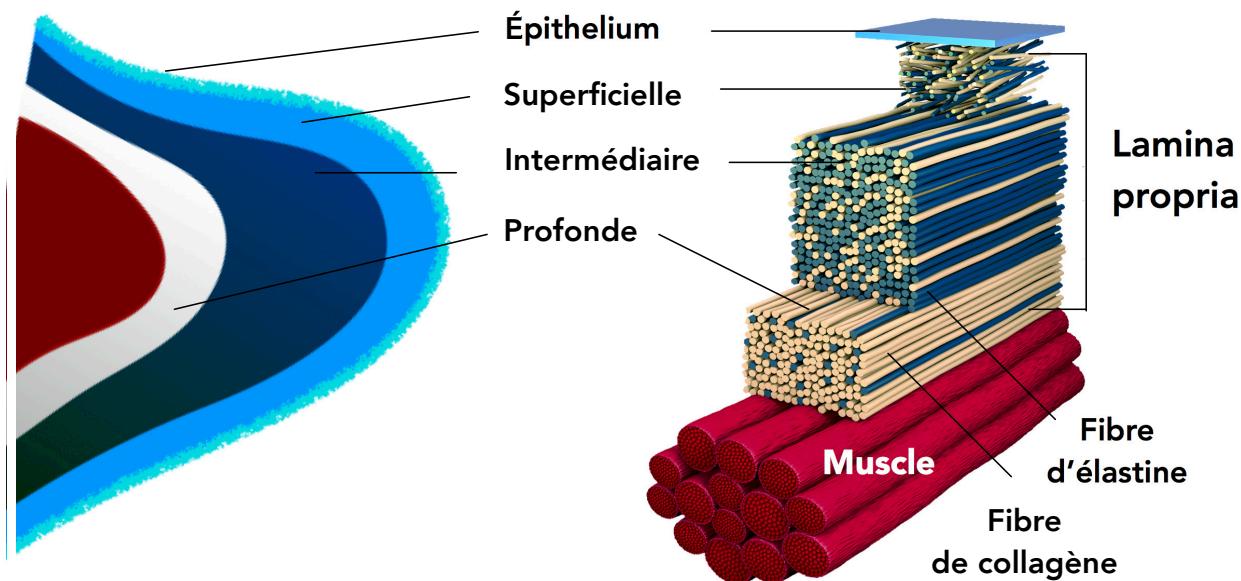


Figure 2.3 Section transverse d'une vraie corde vocale adulte. La structure anatomique des couches vocales chez l'adulte comprend l'épithélium, les sous-couches de lamina propria et le muscle vocal. Les sous-couches se distinguent selon leur contenu en élastine et collagène.

ture trilaminaire nommée la lamina propria. Celle-ci est subdivisée en couche superficielle, intermédiaire et profonde. La membrane basale est le tissu de transition entre l'épithélium et la lamina propria. Elle fournit principalement le support physique aux cellules épithéliales à travers des fibres d'ancre. Les pathologies prennent souvent naissance à cette interface [Gray *et al.* (1994)].

### Lamina propria superficielle (LPS)

La couche superficielle de la lamina propria, nommée espace de Reinke ou encore la muqueuse, mesure environ 160 microns à l'âge adulte [Prades *et al.* (2010)]. Principalement dû à sa composition de fibres élastiques dispersées et d'une concentration élevée de protéines (nommés protéoglycane, glycoprotéine, glycosaminoglycane), la LPS a une liberté de mouvement unique durant la vibration des cordes vocales [Finck (2005)]. Le rôle de la LPS et de l'épithélium consiste essentiellement à l'exécution et au maintien de la vibration vocale [Hammond *et al.* (2000)].

## Lamina propria intermédiaire (LPI)

La présence accrue de fibres d'élastine et un contenu réduit en protéines sont des caractéristiques intrinsèques de la couche superficielle et intermédiaire de la lamina propria. Les fibres sont orientées parallèlement à l'extrémité vibrante de la corde vocale afin de permettre une élongation antéropostérieure. La couche intermédiaire mesure environ 630 microns à l'âge adulte [Prades *et al.* (2010)].

## Lamina propria profonde (LPP)

La couche profonde de la lamina propria contient une grande densité de fibres de collagène et mesure 440 µm d'épaisseur [Prades *et al.* (2010)]. Ces fibres sont également alignées parallèlement avec l'extrémité vibrante de la corde vocale [Bless et Abbs (1983)]. Contrairement aux fibres d'élastine, les fibres de collagène sont beaucoup moins extensibles et offrent plutôt un support afin d'éviter un grand étirement des cordes vocales. Le collagène offre une résistance à la traction tandis que les fibres d'élastine permettent une flexibilité vocale [Prades *et al.* (2010)]. C'est la distribution de ces fibres le long des couches de la lamina propria qui permet de donner une résistance aux contraintes mécaniques produites par les vibrations [Hammond *et al.* (2000)].

L'architecture de chacune des couches décrite précédemment sert de fondation théorique pour une analyse fonctionnelle des cordes vocales.

## 2.2 Analyse fonctionnelle

Étant donnée la complexité des cordes vocales, plusieurs études histologiques, chimiques et biomécaniques ont été menées sur l'analyse fonctionnelle des cordes vocales. Ces études complémentaires apportent des justifications en ce qui a trait à la morphologie et le dynamisme exercé par les cordes vocales.

### 2.2.1 Histologiques

L'analyse histologique démontre une organisation particulière, spécialisée et unique. L'étude d'Hirano regroupe les couches vocales selon leurs fonctions : la couverture regroupe l'épi-

thélium et la LPS, alors que le corps représente plutôt les couches LPP et le muscle vocal [Hirano (1975)]. La couche intermédiaire est représentée comme une zone de transition. Le mouvement ondulatoire des cordes vocales est très complexe et permet de définir la gamme fréquentielle de son possible. Les travaux Kakita et coll. [Kakita *et al.* (1976)] et de Fujimura et coll. [Fujimura (1981)], sur la rigidité de l'épithélium, permettent de conclure que la lamina propria superficielle est beaucoup moins rigide. C'est ce gradient de rigidité entre les couches qui permet à la corde vocale de vibrer [Fujimura (1981)].

### 2.2.2 Chimiques

La composition chimique de la lamina propria joue également un rôle prédominant dans la capacité d'entrer en vibration. De récentes études immunohistochimiques permettent d'affirmer que des protéines de la matrice extracellulaire (molécules interstitielles) jouent un rôle sur l'hydratation, la viscosité et l'épaisseur du tissu. Ces résultats sont corroborés avec l'imagerie histologique colorée au rouge de Picro Sirius [Prades *et al.* (2010)] (colorant qui souligne la biréfringence des tissus). Ces études ont permis de dévoiler le type et l'organisation du collagène inclus dans les cordes vocales. On retrouve principalement des fibres de collagène de type I et III. L'orientation globale semble favoriser une forme tridimensionnelle parabolique.

### 2.2.3 Biomécaniques

Avec une approche complémentaire, l'ouvrage Titze poursuit les travaux d'Hirano afin de différencier les couches sous un angle biomécanique plutôt qu'histologique [Titze et Martin (1998)]. Le tissu vocal est analysé selon des critères de masse, de longueur, de viscosité, de rigidité et d'élasticité. Ces caractéristiques sont, selon l'auteur, directement liées à la capacité d'entrer en vibration. Son modèle d'oscillations harmoniques à deux masses permet de décrire un ensemble de mouvements de fermeture et d'ondulations des cordes vocales.

L'étude biomécanique de cette structure demeure complexe et plusieurs progrès ont été réalisés durant cette dernière décennie [Li *et al.* (2013)]. Des études récentes ont permis de raffiner le modèle et d'investiguer plus précisément l'élasticité des cordes vocales. Les effets des protéines comme l'élastine et le versican sur la rigidité de la matrice extracellulaire ont été analysés [Miri *et al.* (2014)]. Les résultats suggèrent qu'une diminution de l'élastine engendre une diminution significative de la rigidité de la corde vocale. De plus, la présence et la configuration du collagène des cordes vocales porcines saines [Miri *et al.* (2013)] et des cordes

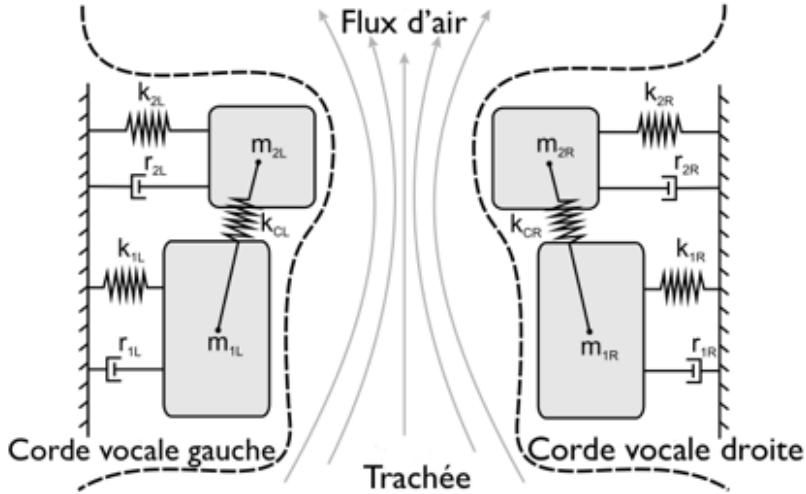


Figure 2.4 Modèle biomécanique à deux masses des cordes vocales (adapté de Titze et Martin (1998)).

vocales de rats, affectées d'une blessure [Heris *et al.* (2016)] ont été quantifiées à partir d'un microscope à force atomique (AFM, pour Atomic Force Microscopy) et de l'imagerie non linéaire.

Bien que l'histologie soit bien décrite et que des modèles biomécaniques aient été développés, peu d'ouvrage sont dédiés au développement des cordes vocales [Hartnick *et al.* (2005)]. Quoiqu'une étude récente à fournit la première détermination systématique de la progression cellulaire et moléculaire du développement de l'épithélium des cordes vocales dans un modèle murin. [Lungova *et al.* (2015)]. Le processus du développement de la lamina propria demeure cependant peu compris. Une compréhension en profondeur du développement vocal est primordiale. Elle permettrait de générer des traitements spécialisés et adaptés aux patients [Kutty (2009)].

### 2.3 Développement des cordes vocales

Le larynx prend forme très tôt au cours de la vie du fœtus. Aux alentours du 57e jour de grossesse, alors que l'embryon a une dimension de 27 à 31 mm, le larynx est déjà complètement constitué [Fried (1988)]. De grands changements prendront forme durant la première phase de l'enfance, puis à l'adolescence, pour devenir mature vers le début de l'âge adulte. La maturation de la phonation est une conséquence directe des changements morphologiques et physiologiques encourus par le larynx. Ces changements sont d'autant plus évidents entre

les périodes de l'enfance et de l'adolescence où les changements hormonaux jouent un rôle prédominant [Newman *et al.* (2000)]. D'un point de vue macroscopique et toutes proportions gardées, le larynx de l'enfant est situé plus haut dans le cou par rapport à celui de l'adulte. Il s'abaissera progressivement au cours de la croissance. Le cartilage qui apparaît comme des tissus mous aux rayons X possèdera une plus grande densité calcique à l'âge adulte [Hertegard *et al.* (1993); Hudgins *et al.* (1997)]. Les cordes vocales présentent une croissance très rapide au cours des premières années de vie, d'une dimension de 3 mm chez le nouveau-né à environ 17 mm chez la femme et 22 mm chez l'homme adulte [Hirano K.S. (1983)]. Sous un angle microscopique, plusieurs études histologiques [Boseley et Hartnick (2006); Hirano K.S. (1983); Sato *et al.* (2001); Ishii *et al.* (2000)], immunohistochimiques [Schweinfurth et Thibeault (2008)], ont permis d'affirmer qu'il n'existe aucune structure en couche à la naissance : la lamina propria est uniforme [Fig.2.5a]. D'ailleurs, une étude récente arrive également à la même conclusion après avoir calculé la densité de cellules présente dans les cordes vocales de 14 larynx cadavériques, âgés de 19 à 36 semaines [Rosenberg et Schweinfurth (2009)]. À l'enfance, les résultats diffèrent selon les études, étant donné la variabilité et le nombre insuffisant de spécimens. On note cependant, à l'âge de 2 mois, un début de différenciation cellulaire et à 11 mois la présence d'une organisation en couche de la lamina propria [Fig.2.5b]. Les spécimens analysés au-dessus de sept ans manifestent tous trois couches. La concentration d'élastine et de collagène augmente graduellement entre l'âge de 12 à 16 ans. Les spécimens observés dont l'âge est supérieur à 17 ans possèdent une lamina propria semblable à celle de l'adulte. La Figure 2.5 permet d'illustrer le changement graduel de la lamina propria chez l'enfant.

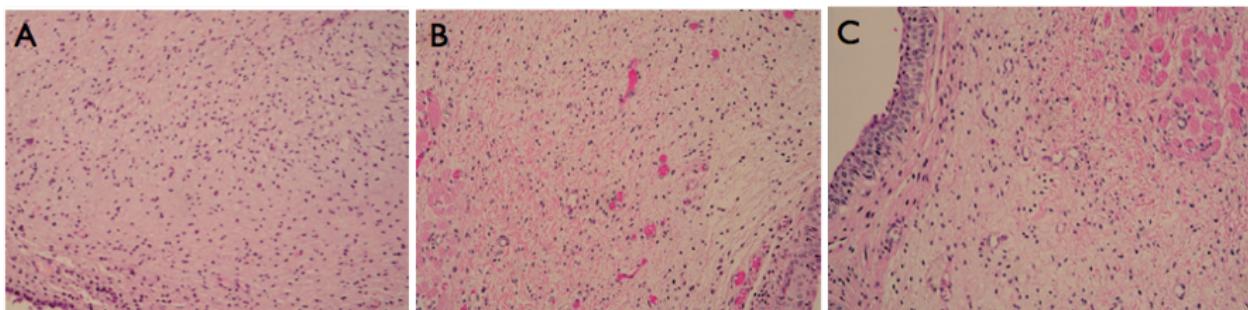


Figure 2.5 Coupes histologiques de 4 µm d'épaisseur avec un grossissement 20X et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine d'une corde vocale d'un spécimen cadavérique de (a) 2 jours, (b) 11 mois et (c) 3 ans. À la naissance la lamina propria semble être uniforme. À partir de l'âge de deux mois, un début de différenciation débute et est visible sur les spécimens cadavériques de 11 mois (b) et 3 ans (c) (adapté de Hartnick *et al.* (2005)).

Tableau 2.1 Développement de la lamina propria adapté de [Boseley et Hartnick (2006)]

Age	LP supérieure ( $\mu\text{m}$ )	LP intermédiaire ( $\mu\text{m}$ )	LP profonde ( $\mu\text{m}$ )	Total
2 jours	630	0	0	630
2 mois	371	745	0	1116
11 mois	195	694	0	889
5 ans	150	577	0	727
7 ans	218	563	208	989
10 ans	143	587	576	1306
13 ans	215	604	298	1117

Selon [Zeitels *et al.* (2002)], le développement des plis vocaux est lié à son utilisation. À la naissance, la voix permet d'exprimer la douleur, la faim ou le plaisir. Le cri du nouveau-né est son seul moyen de communication, étant donné que l'habileté de contrôler la voix n'est pas encore acquise [Robb *et al.* (1997)]. À l'âge adulte, la capacité de générer une gamme dynamique de fréquence impressionnante est un signe de maturité physiologique et anatomique du larynx [Kahane (1982)]. Pour une utilisation normale, les premiers déclins de la voix arrivent vers l'âge de 65 ans. L'étude du groupe d'Hirano [Hirano *et al.* (1989)], effectuée sur 64 patients, de 70 ans à 105 ans démontre la transformation des couches vocales selon l'âge des spécimens, à partir d'un point de vue histologique. Les travaux tendent à démontrer que les cordes vocales s'amincissent avec l'âge, ce phénomène étant plus accentué après l'âge de 70 ans et plus significatif chez les hommes. La concentration des fibres d'élastine semble diminuer tandis que la concentration en collagène augmente. En vieillissant, les fibres de collagènes tendent à se désorganiser et prendre des directions aléatoires. Dans les cas extrêmes, l'auteur note la présence de fibrose. Les fibres musculaires aussi semblent changées selon l'âge. À la naissance, les fibres musculaires sont très minces et semblent encore immatures. À l'âge adulte, près de la trentaine, les fibres musculaires sont matures. Elles s'atrophient vers la soixantaine comme le démontre la Figure 2.6. Une analyse morphométrique récente permet d'établir que les fibres musculaires peuvent s'atrophier de quelques microns [Martins *et al.* (2015)].

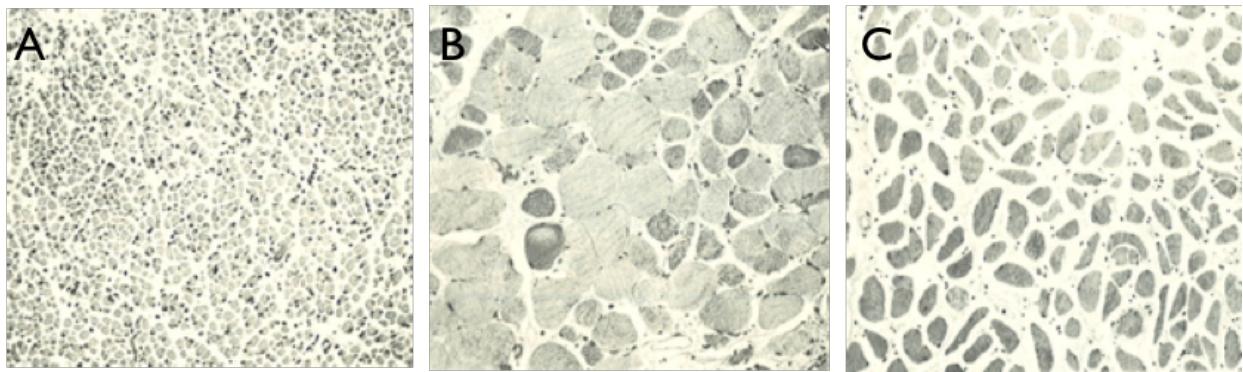


Figure 2.6 Coupes histologiques du muscle vocal d'un (a) nouveau-né, (b) d'un homme de 27 ans et (c) d'un homme de 61 ans. Selon l'âge, les fibres musculaires ont une taille et une densité différentes (adapté de Hirano K.S. (1983)).

Chose certaine, les études énoncées indiquent clairement que la taille du larynx et des cordes vocales diffèrent selon l'âge des patients. Bien qu'il soit souhaité d'inclure le facteur de maturité des cordes vocales dans l'élaboration des traitements, les approches actuelles ne le permettent tout simplement pas.

## 2.4 Imagerie du larynx

Bien que l'observation du larynx remonte à quelques siècles, voire à plus d'un millénaire, la conception d'un instrument permettant de visualiser cette structure anatomique n'apparut qu'en 1855. Son concepteur, le professeur de chant Manuel Garcia, curieux d'observer ses propres cordes vocales, utilisa un dispositif muni de deux miroirs. L'année suivante, il publia ces observations au sein du prestigieux journal de la société de Londres [Alberti (1996)]. C'est ainsi que le premier modèle du laryngoscope fut développé. Depuis, l'évaluation du larynx s'est complexifiée. Aujourd'hui il est plutôt commun de recourir à différentes modalités d'imagerie pour arriver à un diagnostic. Plusieurs aspects sont analysés, d'un point de vue anatomique et physiologique : l'historique du patient, la configuration vocale, le mouvement ondulatoire, la mobilité, le mouvement latéral, la fermeture symétrique des plis vocaux et l'analyse acoustique. Les principaux outils utilisés en clinique pour visualiser les cordes vocales sont le laryngoscope direct ou indirect. Dans certaines circonstances, la tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont recommandées, surtout lors des lésions cancéreuses.

### 2.4.1 Laryngoscopie

Il existe plusieurs stratégies pour examiner les structures du larynx. La laryngoscopie indirecte nécessite l'utilisation d'un miroir, normalement incliné à 120 degrés et d'une source de lumière. Les informations recueillies sont plutôt reliées à l'apparence externe des tissus : couleur, relief ou anomalies évidentes. La laryngoscopie directe peut s'exécuter par les voies nasales : la fibroscopie. La fibroscopie est un examen clinique très commun en laryngologie [Bisetti *et al.* (2009)]. L'utilisation d'un endoscope fibré, flexible, permet d'accéder au larynx. Cette procédure est cependant plus difficile à exécuter chez les enfants [Wolf *et al.* (2005); Yellon *et al.* (2007)]. Le cas échéant, on utilise plutôt le laryngoscope rigide par voie buccale sous anesthésie générale.

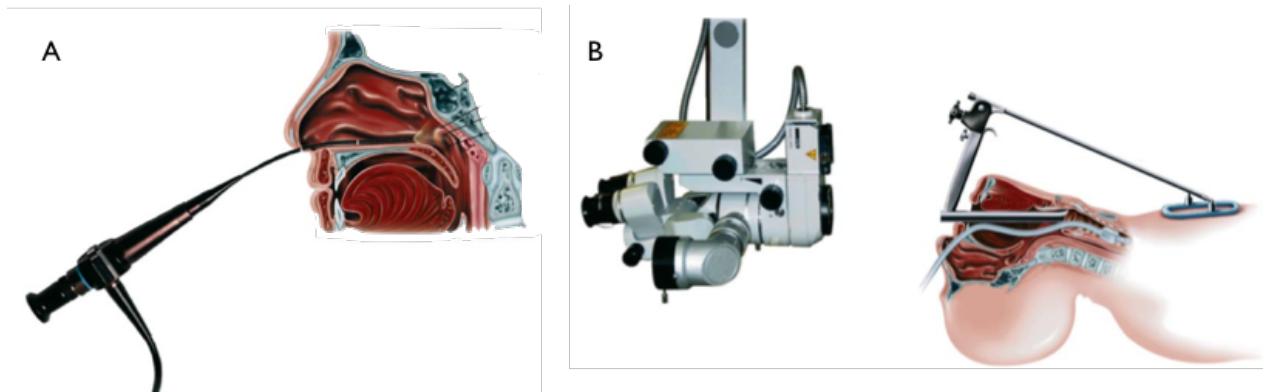


Figure 2.7 Laryngoscopie exécutée avec un (a) fibroscope par voies nasales (b) et avec un laryngoscope en suspension (adapté de Hermans (2012)).

L'analyse de la dynamique vocale est complexe. Le mouvement des cordes vocales est de l'ordre de quelques centaines de Hertz et à des vitesses s'approchant d'un mètre par seconde. À cette vitesse, les capteurs des caméras ne sont pas suffisamment rapides pour enregistrer le déplacement des cordes vocales. L'usage d'un stroboscope est souvent requis durant l'examen. La fréquence de modulation de la lumière est ajusté à la fréquence de vibration vocale de sorte à permettre une vue stationnaire des cordes vocales. Cependant, les récents progrès des équipements vidéos et informatiques donne lieu à l'émergence de l'endoscopie à haute vitesse. Ces systèmes cliniques permettent dorénavant d'acquérir des images à plus de 16 kHz [Mehta et Hillman (2008)].

#### 2.4.2 TDM et IRM

Utilisées pour compléter l'examen laryngoscopique, la tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont permis d'améliorer d'une façon significative les diagnostics en laryngologie [Gallivan et Gallivan (2002)]. Elles sont plus souvent prescrites lors de cas de cancers pour évaluer l'infiltration tumorale [Hermans (2012)] et afin de planifier la procédure chirurgicale [Ruffing *et al.* (2005); Rumboldt *et al.* (2006)]. Chacune des modalités est utilisée dans un contexte particulier : l'IRM étant plus sensible aux anomalies des tissus mous et la TDM pour localisation des irrégularités osseuses et du cartilage.

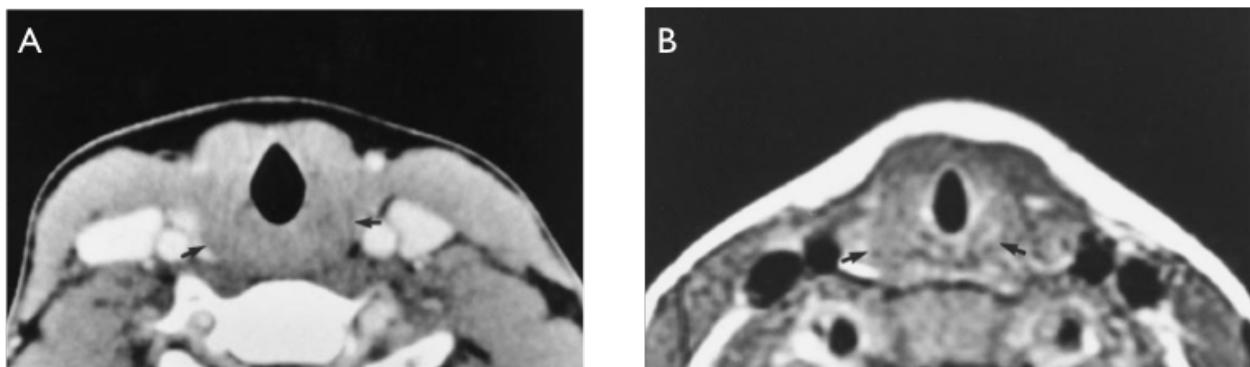


Figure 2.8 Larynx d'un enfant de 8 ans (a) par TDM (b) par IRM (adapté de Hermans (2012)).

La résolution de ces technologies est cependant nettement insuffisante et inadéquate pour résoudre la relation entre l'évaluation en surface et la microstructure des plis vocaux.

#### 2.5 Émergence des techniques microscopiques pour l'évaluation des cordes vocales pédiatriques

Les deux dernières décennies ont mené à l'émergence de nouvelles techniques d'imagerie optique, comme la tomographie par cohérence optique (OCT, de l'anglais pour « Optical Coherence Tomography »), la microscopie confocale et non linéaire. Ces techniques optiques offrent une résolution de deux à trois ordres de grandeur supérieure à celle offerte par les techniques radiologiques traditionnelles tout en exploitant des modalités de contraste jusqu'ici inexplorés.

### 2.5.1 Microscopie confocale

La microscopie confocale permet d'obtenir des images de haute résolution comparativement au système conventionnel de microscopie à lumière blanche. L'éclairage d'un point sur l'échantillon avec un laser et l'utilisation d'un sténopé au détecteur permettent d'éliminer la lumière diffuse provenant des plans au-dessus et au-dessous du plan focal. Les images obtenues sont ainsi beaucoup plus nettes [Webb (1999)]. Il existe plusieurs ouvrages de référence qui décrivent en profondeur les fondements mathématique et les applications de la microscopie confocale [Wilson (1990); Gu (1996)].

Par un mécanisme de balayage, miroirs (galvanomètres) ou des systèmes photoacoustiques, il est possible de ratisser point par point le tissu pour former une image 2D. On peut accumuler plusieurs images virtuelles 2D à différents plans à l'aide d'une platine de translation pour former un volume 3D. La microscopie confocale permet d'obtenir une résolution de l'ordre du micron. Cependant, cette technique souffre d'un faible taux de pénétration, la lumière étant rapidement diffusée dans les tissus biologiques. Cette technique permet au mieux d'imager à des profondeurs d'un demi-millimètre.

Les récents travaux de Boudoux et coll. [Boudoux *et al.* (2007, 2009a)] ont permis au moyen d'un balayage en longueur d'onde de miniaturiser une sonde endoscopique confocale : SECM (de l'anglais pour « Spectrally Encoded Confocal Microscopy »). Cet outil a donné lieu aux premières images confocales des cordes vocales pédiatriques. Celles-ci sont illustrées à la Figure 2.9. L'outil permet de discerner les fibres d'élastine dans la lamina propria superficielle.

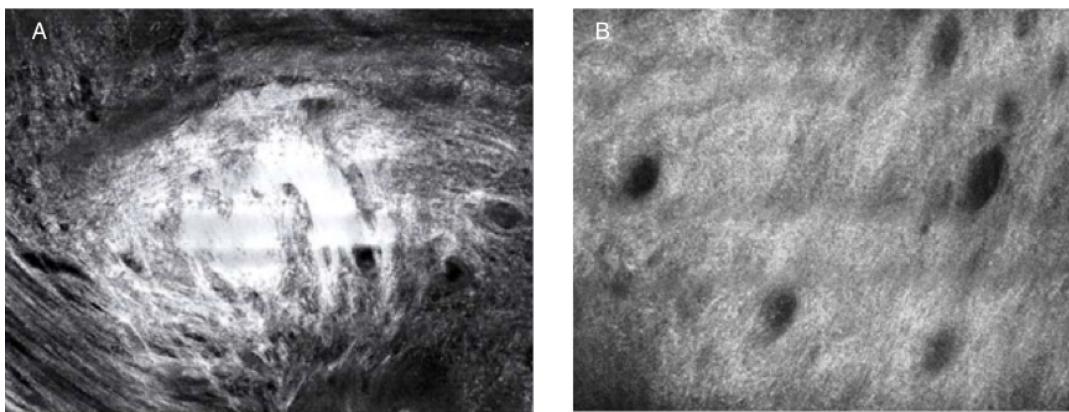


Figure 2.9 Images confocales des cordes vocales de spécimens pédiatriques (a) et porcins (b) adaptées de Boudoux *et al.* (2007, 2009a).

L'imagerie confocale est très performante, cependant celle-ci souffre d'un inconvénient majeur : une faible efficacité de collection. En fait, avec l'imagerie confocale, il est nécessaire d'utiliser un sténopé pour rejeter la lumière diffuse. La microscopie multiphoton, une technique optique non linéaire, permet de s'affranchir de cette problématique. Étant donné que les processus non linéaires ne se produisent qu'au point focal, l'utilisation d'un sténopé pour rejeter la lumière diffuse n'est plus nécessaire. Ceci permet d'obtenir un meilleur taux de pénétration dans les tissus jusqu'au millimètre.

### 2.5.2 Microscopie non linéaire

Tout comme l'imagerie confocale, la microscopie multiphoton permet l'acquisition d'images de très haute résolution (de l'ordre de quelques centaines de nanomètres). En maximisant la probabilité d'avoir une excitation générée par la présence de deux ou trois photons, on élimine la nécessité d'un sténopé à la collection. L'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique et d'un laser pulsé est cependant requise pour confiner spatialement et temporellement la densité de photons. La figure suivante [Fig. 2.10] illustre un schéma comparatif entre un système confocal et multiphoton.

Traditionnellement, les sources lasers Titane :Saphire ont été grandement utilisées pour l'imagerie non linéaire. Ces sources émettent généralement dans le proche infrarouge et ont une durée d'impulsion qui varie entre 10 à 150 femtosecondes avec une répétition d'environ 80 MHz. Cette fenêtre spectrale d'émission permet aux photons une meilleure propagation en profondeur étant donné que ceux-ci sont moins diffusés et absorbés qu'une longueur d'onde émise dans le visible. Le taux de pénétration peut atteindre, sous certaines conditions, avec des fluorophores spécifiques, une profondeur jusqu'à 1mm dans le tissu [Helmchen et Denk (2005)].

La possibilité de visualiser les molécules endogènes (autofluorescence) et le risque réduit d'endommager les cellules en font une technique attrayante. L'utilisation d'un laser à courte impulsion permet d'exciter les molécules selon leur spectre d'absorption. L'énergie remise par ces molécules, sous forme de fluorescence, peut alors être observée.

En plus de la fluorescence à deux photons (F2P), la diffusion en microscopie multiphoton permet également la génération de la seconde harmonique (GSH) ou des signaux de troisième harmonique (GTH). Le champ électrique envoyé au tissu provoque une distorsion du nuage électronique des molécules présentent. C'est cette distorsion du nuage électronique qui pro-

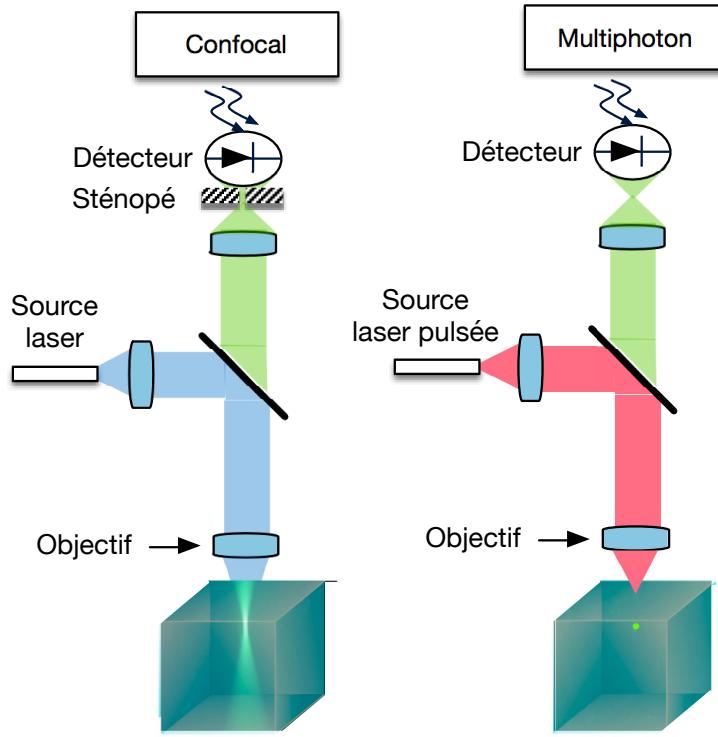


Figure 2.10 Microscopie confocale et multiphoton. La microscopie confocale utilise un sténopé pour rejeter la lumière hors du plan focal tandis que le sectionnement optique est inhérent à l'imagerie multiphoton étant donné du confinement spatial et temporel des photons.

duit des harmoniques. Ce phénomène cohérent (dépendant de la phase) est généré seulement dans des matériaux non centrosymétriques. La longueur d'onde recueillie en second d'harmonique correspond exactement à la moitié de celle émise. Les signaux (F2P et GSH) sont complémentaires et permettent une augmentation du contraste dans les images observées. La GSH est souvent exploitée pour visualiser une architecture organisée comme celle du collagène [Gusachenko *et al.* (2010)]. Enfin digne de mention, la technique de Raman Anti-Stokes cohérente (CARS) est une technique complémentaire qui permet de sonder, par l'analyse vibrationnelle, la composition moléculaire. Son utilisation en endoscopie est encore difficile à réaliser étant donné les défis inhérents à la miniaturisation et le contrôle de l'efficacité du processus du mélange à quatre ondes.

L'information obtenue par le biais de la microscopie confocale et non linéaire est unique. Ces techniques optiques offrent une résolution comparable à l'histologie sans les artéfacts associés à coloration et à la déformation liée au sectionnement des tissus. Elles permettent d'acquérir

une information intrinsèque sur les couches superficielles des cordes vocales. En laryngologie, ces techniques optiques ont été exploités pour identifier et caractériser l'organisation du collagène et de l'élastine [Miri *et al.* (2012, 2013)]. Les cellules épithéliales (cytoplasmes et noyaux), les fibres d'élastine et de collagène sont clairement visibles sur les acquisitions. Bien que le potentiel de l'imagerie non linéaire pour l'assistance chirurgicale en laryngologie ait été évalué [Hoy *et al.* (2012)], il est encore difficile d'adapter ces modalités au contexte intraopératoire. Les défis techniques sont nombreux. Dans un premier temps, la profondeur de champ est trop faible pour imager l'ensemble des couches de la lamina propria. De plus, le champ de vue limité rend difficile l'évaluation des structures anatomiques ou des lésions de quelques millimètres. Ceci est particulièrement important dans le larynx où les structures avoisinantes peuvent être très hétérogènes. Enfin, pour l'instant ces techniques ont eu une vitesse d'acquisition insuffisante pour envisager leur intégration en salle opératoire. Une comparaison plus complète des avantages et inconvénient de chaque technique optique pour l'imagerie des cordes vocales est exprimé dans les ouvrages suivants [Boudoux *et al.* (2015); Strupler *et al.* (2016)].

Il existe cependant une technique optique avec une résolution moins élevée, mais qui peut adresser les contraintes de la salle opératoire : la tomographie par cohérence optique. Le prochain chapitre lui est entièrement consacré.

## CHAPITRE 3 PRINCIPES DE LA TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE OPTIQUE

L'étude de la tomographie par cohérence optique (ou « OCT » de l'anglais « optical coherence tomography ») constitue le troisième volet de cette dissertation. Les principes physiques et les propriétés optiques des tissus sont abordés. L'état de l'art, les contributions des auteurs dans ce champ d'activité, et les progrès dans l'élaboration des sondes OCT sont énoncés. Enfin, le chapitre se conclut sur les techniques de traitement d'images utilisés pour caractériser les images OCT et les applications en laryngologie.

### 3.1 Introduction

La tomographie par cohérence optique est analogue à l'imagerie ultrasons à la distinction près qu'une onde lumineuse est utilisée à la place d'une onde sonore et que le système de détection est différent. En imagerie par ultrasons, nommée échographie, une impulsion sonore est envoyée dans les tissus. Celle-ci est partiellement réfléchie ou dispersée selon l'hétérogénéité du milieu. Des échos sont générés à chaque interface où il existe une différence d'impédance acoustique. Ces différences ont lieu à la jonction des différents types de tissus, vaisseaux sanguins, graisse, os et muscle. Les échos sont ensuite reçus et traités par l'électronique interne du transducteur. Connaissant la vitesse de l'onde sonore dans les tissus (1540 m/s) et le temps écoulé entre l'aller et le retour d'un écho, on peut localiser spatialement l'interface correspondante.

En tomographie par cohérence optique, l'onde lumineuse se propage dans le tissu et des réflexions sont générées à chaque fois que la lumière rencontre une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents. Étant donné que la lumière est mille fois plus rapide que le son ( $3 \times 10^8$  m/s), les dispositifs électroniques actuels sont incapables de détecter les variations rapides du signal (champ électromagnétique). C'est par le biais d'un processus interférométrique qu'il est possible de détecter les réflexions générées à différente profondeur. La nature ondulatoire de la lumière permet l'observation d'interférences qui peuvent révéler des caractéristiques propres à l'onde elle-même ou à propos des matériaux sondés. L'OCT est une modalité d'imagerie laser basée sur le principe de l'interférométrie. Elle est non invasive et permet d'obtenir des images avec une résolution de l'ordre de quelques microns ( $\approx 10$   $\mu\text{m}$ ). En fonction du niveau de diffusion de l'échantillon et de la source de lumière utilisée,

l'OCT peut acquérir des images en coupe sur une profondeur de 2 à 3 mm dans un milieu turbide, comme les tissus biologiques. Enfin, lorsque la méthode de balayage est appropriée, cette modalité permet de couvrir un grand champ de vue (quelques centimètres) en temps réel.

Les premières applications biomédicales de l'OCT apparaissent en ophtalmologie [Huang *et al.* (1991)]. La rétine de l'œil peut être imaginée sur toute sa profondeur sans difficulté étant donné que les structures anatomiques de l'œil sont relativement transparentes à la lumière proche infrarouge. Ces images ont permis d'identifier des patients atteints d'une dégénérescence maculaire [Fercher *et al.* (1993)]. Depuis, le nombre d'articles de recherche en OCT a explosé, passant à moins de 50 articles en 1998 à plus de 2700 articles en 2015 (PubMed) et le nombre d'entreprises commerciales en OCT ne cesse d'augmenter dans différents secteurs d'activité. Aujourd'hui, on compte plus d'une cinquantaine d'entreprises dans le monde et plus d'une centaine de groupes de recherche qui développent et innovent autour de cette modalité d'imagerie (liste complète disponible en annexe C). Le schéma 3.1 illustre la progression du nombre de publications en tomographie par cohérence optique depuis son introduction en 1991.

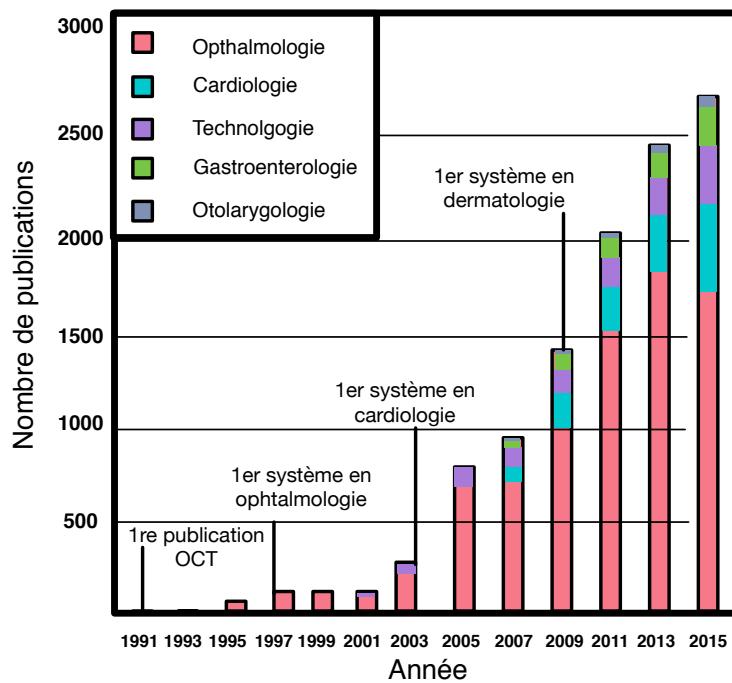


Figure 3.1 Le nombre de publications par année avec la tomographie par cohérence optique depuis son invention [tirée à partir de PubMed].

Les applications en OCT destinées à d'autres disciplines de la médecine sont grandissantes. En excluant l'ophtalmologie, l'imagerie cardiovasculaire avec la détection des plaques artérielles est le secteur d'activité le plus actif. Le domaine de la laryngologie représente environ 11% des publications.

Cependant, avant d'aborder l'OCT dans le contexte de la laryngologie, il est important de revoir quelques principes physiques fondamentaux qui régissent cette technologie.

### 3.2 Tomographie par cohérence optique

L'OCT provient d'un concept développé à partir de la réflectométrie à faible cohérence (OLCR, pour « Optical Low-Coherence Reflectometry ») [Danielson et Whittenberg (1987)]. Cette technique permet d'obtenir un profil de la réflectivité en fonction d'une distance axiale. Elle est utilisée, entre autres, pour repérer les défauts de fabrication dans les fibres optiques avec une excellente sensibilité [Takada *et al.* (1987)]. Bien que la forme soit différente, le principe central de l'OCT est similaire : évaluer la position d'une interface à l'aide de la lumière rétrodiffusée. Les deux mécanismes développés pour évaluer le temps de vol sont : le déclenchement « gating » et l'interférométrie. La technique de déclenchement nécessite un laser à courte impulsion. Étant couteuse et imprécise, elle est rarement utilisée [Bouma (2001)]. La technique la plus utilisée est l'interférométrie. Elle permet de remédier aux difficultés reliées à la vitesse de propagation de la lumière en utilisant une propriété d'une onde électromagnétique : la cohérence. La cohérence est la faculté de l'onde d'interférer avec une copie d'elle même décalée dans le temps ou dans l'espace. Cette propriété fondamentale permet de détecter des interférences issues de deux ou plusieurs ondes. L'interféromètre de type Michelson est l'implémentation typique [Bouma (2001)]. La Figure 3.2 illustre le principe de la tomographie par cohérence optique.

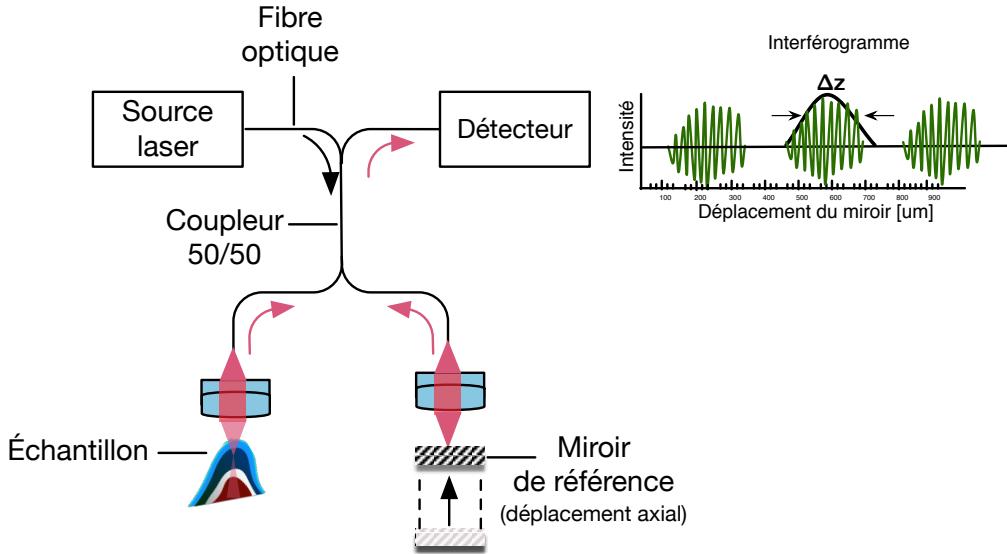


Figure 3.2 Principe de la tomographie par cohérence optique. Les flèches noires et rouges indiquent le trajet respectif utilisé par la lumière à l'aller et au retour, respectivement. La lumière de la source laser est dirigée vers un coupleur qui sépare une partie du signal vers l'échantillon et l'autre partie au bras de référence. La lumière rétrodiffusée dans l'échantillon et sur le miroir est collectée par les fibres optiques respectives et recombinée au coupleur pour une détection cohérente. Le déplacement axial du miroir permet de recueillir le profil de réflectivité de l'échantillon donné par l'enveloppe de l'interférogramme.

La lumière de la source optique est divisée en deux par un coupleur (ou une lame séparatrice). Une partie de la lumière est dirigée vers un bras de référence tandis que l'autre partie est dirigée vers l'échantillon. Au retour, les faisceaux réfléchis sont recombinés avec un coupleur 50/50 avant d'être acheminés au détecteur. Une interférence à lieu si la différence de marche est inférieure à la longueur de cohérence de la source.

### 3.2.1 OCT dans le domaine temporel

Dans sa version temporelle, nommée TD-OCT (TD, de l'anglais « Time-Domain »), l'amplitude de la modulation du signal au détecteur est liée à la réflectivité du diffuseur présent. Chaque position en profondeur de l'échantillon correspond à une position particulière du miroir de référence. La position du miroir dans le bras de référence détermine alors la profondeur à laquelle les interférences peuvent avoir lieu. Le déplacement axial du miroir en continu permet de recueillir le profil de réflectivité de l'échantillon, nommé ligne-A.

La Figure 3.3 permet de visualiser le profil 1D et l'image OCT résultante après un balayage transverse d'une corde vocale. Un miroir monté sur un galvanomètre est souvent utilisé pour collecter l'ensemble des lignes-A de l'échantillon et générer ainsi une image. Par extension, un volume 3D, appelé scan C, peut également être obtenu si le balayage se produit sur les deux axes orthogonaux à la ligne-A. Les images sont représentées sous forme logarithmique.

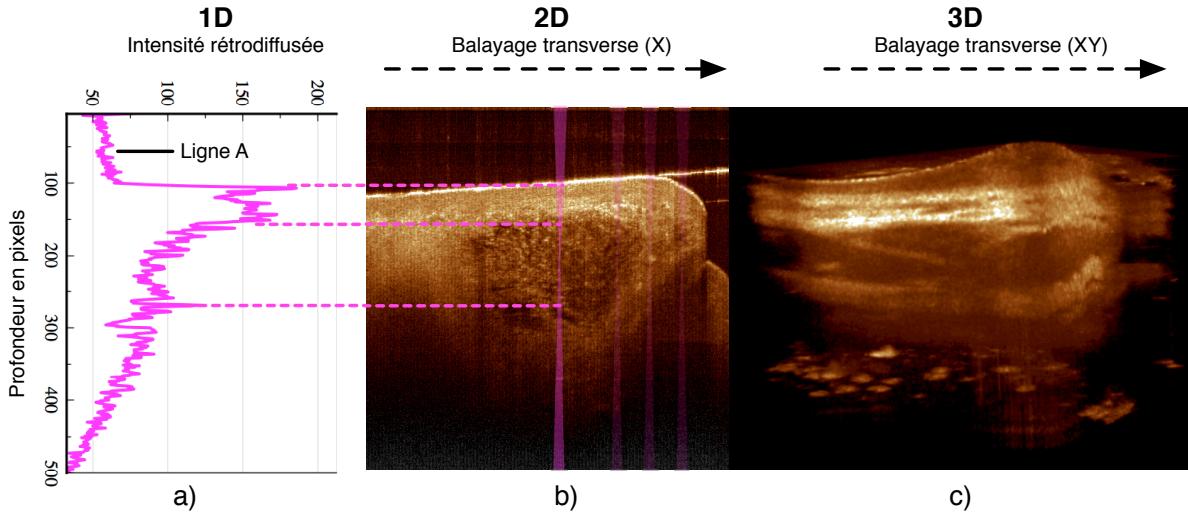


Figure 3.3 Profil de réflectivité (ligne-A) recueilli après le balayage du miroir de référence (a) et image 2D (b) obtenue après le déplacement latéral du faisceau laser le long de d'une corde vocale. Le balayage dans les deux axes transveses xy permet d'obtenir le volume (c) de l'échantillon.

La vitesse de scan du miroir de référence ainsi que la piète sensibilité de la détection limitent la résolution temporelle du TD-OCT. La respiration, le battement cardiaque ou tout mouvement plus rapide que le temps d'acquisition introduit des artéfacts importants dans les images en TD-OCT, ce qui limite considérablement son utilisation clinique.

### 3.2.2 OCT dans le domaine spectral

La transition d'une acquisition dans le domaine temporel au domaine fréquentiel figure comme un moment important dans la jeune histoire de cette modalité d'imagerie. Démontrée théoriquement par Wojkowsky et coll.[Wojtkowski *et al.* (2003)], l'acquisition simultanée des longueurs d'onde(differentes couleurs) permet l'étalement du bruit sur l'ensemble des mesures

acquises. Ceci a pour effet d'améliorer substantiellement le rapport signal-sur-bruit (RSB). La sensibilité supérieure qu'offre ce principe [Leitgeb *et al.* (2003); Choma *et al.* (2003)] permet d'augmenter la vitesse d'acquisition des systèmes OCT de façon considérable [Yun *et al.* (2003)]. Depuis, des sources permettant l'acquisition de lignes-A à plus de 1.5 MHz ont été développées avec des puissances de 100 mW [Wieser *et al.* (2015)]. À cette vitesse, plusieurs volumes 3D en haute résolution peuvent être acquis à l'intérieur d'une seconde.

Le domaine spectral permet de s'affranchir du mouvement du miroir en acquérant l'interférogramme en fonction du nombre d'onde  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  et à l'aide d'une transformée de Fourier pour repérer la position spatiale des diffuseurs. La Figure 3.4 représente les implémentations classiques de l'OCT dans l'espace de Fourier, soit à l'aide d'une source à balayage spectral (OFDI, de l'anglais « Optical Frequency Domain Imaging » ou SS-OCT, pour « Swept Source OCT ») [Chinn *et al.* (1997)] ou d'un spectromètre (FD-OCT, pour *Fourier Domain OCT*) [Fercher *et al.* (1995)]. Indépendamment de l'implémentation, cette variante spectrale est beaucoup plus exploitée principalement pour sa rapidité et sa sensibilité accrues [de Boer *et al.* (2003)].

Quelque soit la modalité, l'accès à la phase du signal permet d'introduire une série de variantes à l'OCT : la détection sensible à la polarisation (PS-OCT, de l'anglais « Polarisation Sensitive OCT ») [de Boer *et al.* (1997)] qui détecte la biréfringence des tissus, OCT-Doppler [Leitgeb *et al.* (2004)] qui permet la détection de la vitesse des diffuseurs en mouvement, la détection OCT par spectroscopie (SOCT) [Morgner *et al.* (2000)] et l'élastographie OCT [Schmitt (1998)].

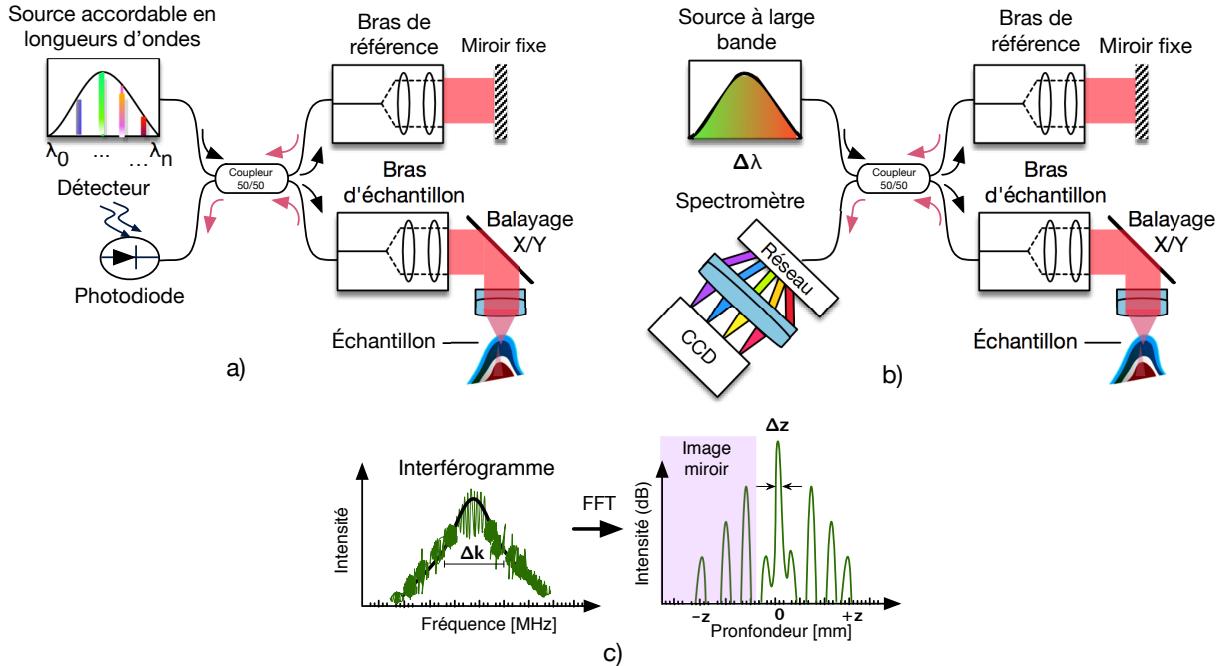


Figure 3.4 Schéma des systèmes OCT dans le domaine spectral. Les flèches noires et rouges indiquent le trajet respectif utilisé par la lumière à l'aller et au retour, respectivement. Les implémentations existantes utilisent soit un balayage spectral temporel (SS-OCT) (a), soit un spectromètre (SD-OCT) (b). Dans le cas d'un spectromètre, une source à large bande est utilisée et l'interférogramme est divisé et détecté selon ses composantes spectrales avec un réseau et une caméra CCD respectivement. Le balayage spectral temporel quant à lui nécessite une diode à la détection étant donné que l'acquisition se fait pour différentes longueurs d'onde en fonction du temps. Dans les deux implémentations la localisation des diffuseurs dans l'échantillon requiert une transformée de Fourier de l'interférogramme (c).

Le principe de base consiste à recueillir la somme  $E_D$  des ondes électromagnétiques du bras de référence  $E_R$  et du bras d'échantillon  $E_S$  dont le nombre d'onde  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  et la fréquence angulaire  $\omega = 2\pi\nu$ , correspondent respectivement à la fréquence spatiale et temporelle de chaque composante spectrale du champ électrique à une longueur d'onde  $\lambda$  :

$$E_D = E_S e^{-i(2kz-\omega t)} + E_R e^{-i(2kz-\omega t)} \quad (3.1)$$

L'intensité perçue par le détecteur  $I_D$  consiste en la norme du champ électrique  $E_D$  :

$$I_D = \left| E_S e^{-i(2kz-\omega t)} + E_R e^{-i(2kz-\omega t)} \right|^2 \quad (3.2)$$

En développant l'expression 3.2, il devient possible de décomposer le signal en une partie continue et une partie variable :

$$I_D = [\left| E_S \right|^2 + \left| E_R \right|^2 + 2\Re \{(E_S E_R^*)\}] \quad (3.3)$$

C'est la partie variable  $2\Re \{(E_S E_R^*)\}$  qui est d'intérêt en OCT : elle contient l'information à la fois sur la position et la réflectivité des diffuseurs. Plus simplement formulé en 3.4, la fonction d'autocorrélation  $G(\tau)$ , apparaît uniquement lorsque les longueurs des chemins optiques sont appariées entre les deux bras de l'interféromètre. Ce phénomène d'interférence ne peut avoir lieu qu'à l'intérieur de la longueur de cohérence de la lumière, car au-delà, les faisceaux recombinés ne peuvent plus interférer. Une fois filtré, démodulé et numérisé, le signal OCT est stocké en mémoire vive ou sur le disque dur de l'ordinateur.

$$I_D = I_S + I_R + 2G(\tau) \quad (3.4)$$

Bien que le temps d'acquisition soit un atout avec le développement de l'OCT spectral, la profondeur de champ et la résolution axiale et latérale demeurent les paramètres fondamentaux pour tout système d'imagerie.

### 3.3 Résolution

La résolution est directement reliée à la longueur d'onde utilisée. Le choix de celle-ci gouverne la dimension des structures qu'il est possible d'observer. Cependant, contrairement à d'autres modalités microscopiques, en OCT les résolutions axiale et transverse sont complètement découplées. La résolution axiale est déterminée par la longueur de cohérence de la source et la résolution transverse par les composants optiques sélectionnés. La longueur de cohérence correspond à la largeur à mi-hauteur du signal d'autocorrélation,  $G(\tau)$ , de la source.

Dans un régime gaussien, la densité spectrale d'énergie,  $S(\omega)$ , est donnée par :

$$S(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_\omega} \exp\left(\frac{-(\omega - \omega_0)^2}{2\sigma_\omega^2}\right) \quad (3.5)$$

où  $\omega_0$  représente la fréquence angulaire centrale et  $\sigma_\omega$  l'écart type de la distribution en fréquence angulaire. Le théorème de Wiener-Khinchin stipulant que la densité spectrale est la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrelation [Khintchine (1934)] nous permet de calculer la largeur à mi-hauteur du signal OCT comme étant :

$$\Delta z = \frac{2 \ln 2}{\pi} \left( \frac{\lambda^2}{\Delta \lambda} \right) \quad (3.6)$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde centrale de la source et  $\Delta\lambda$  la largeur à mi-hauteur du spectre de puissance. D'après 3.6, la résolution axiale est inversement proportionnelle à la largeur spectrale de la source.

La résolution latérale en OCT est semblable à n'importe quel système d'imagerie microscopique : elle est reliée aux composants optiques qui permettent de focaliser le faisceau sur l'échantillon. La résolution transverse est donnée par la relation 3.7 :

$$\Delta x = \frac{4\lambda}{\pi} \left( \frac{f}{d} \right) \quad (3.7)$$

où  $d$  représente le diamètre du faisceau à l'entrée de l'objectif et  $f$  sa distance focale. La résolution transverse, selon les systèmes, varie de 2 à 20 microns. Augmenter la taille d'un faisceau permet une meilleure résolution transverse. Toutefois, ce changement affecte directement la profondeur de champ.

### 3.4 Profondeur de champ

Augmenter la résolution transverse  $\Delta x$  n'est pas sans conséquence, elle a pour effet de limiter la profondeur d'observation des diffuseurs dans l'échantillon selon 3.8 :

$$2z_R = \frac{\pi \Delta x^2}{2\lambda} \quad (3.8)$$

En OCT, il s'agit de trouver un compromis entre ces deux paramètres en prenant en considération que la profondeur de champ est souvent un facteur prépondérant.

La figure suivante permet d'illustrer la relation entre la profondeur de champ (zone de Rayleigh) et la dimension du faisceau. Le maximum d'efficacité de collection de la lumière rétrodiffusée provient du plan focal. En OCT, le montage traditionnel consiste en une ouverture numérique faible ( $\approx 0.03$ ). Ceci à pour effet d'obtenir une grande zone de Rayleigh beaucoup plus grande que la longueur de cohérence afin d'obtenir des images en coupe sur  $\approx 2$  à  $3$  mm. Une grande ouverture numérique ( $NA \geq 0.3$ ) permet une bonne résolution transverse, mais par conséquent offre une très petite zone de Rayleigh. Cette approche dérivée de l'OCT qui privilégie une grande ouverture numérique se nomme la microscopie à cohérence optique (OCM, de l'anglais « Optical Coherence Microscopy »).

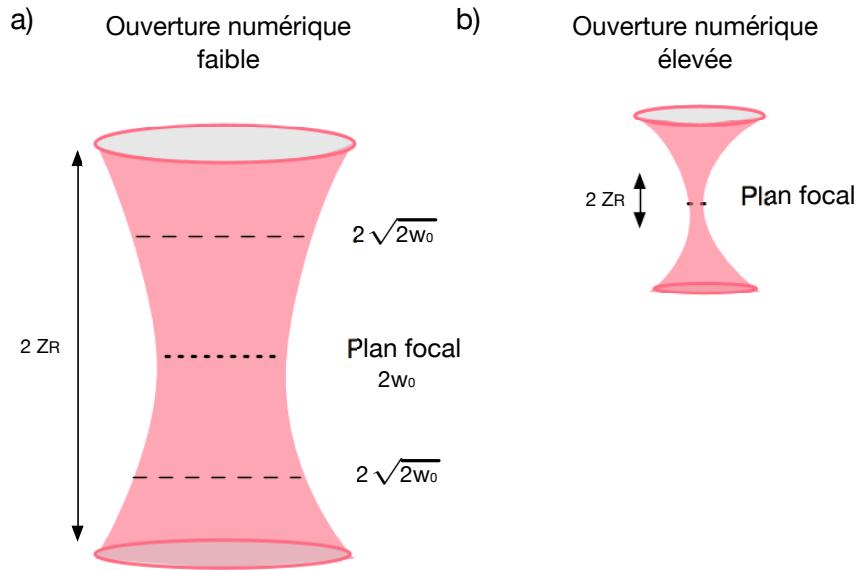


Figure 3.5 Effet de l'ouverture numérique sur la résolution latérale et la profondeur de champ. En OCT, la faible ouverture numérique (a) permet d'obtenir une profondeur de champ plus grande que la cohérence du laser afin de générer des images en coupe. Une grande ouverture numérique (b) de l'ordre de la cohérence du laser favorise la résolution latéral et des images en face. Cette technique est à l'origine de l'OCM.  $Z_R$  : zone de Rayleigh ;  $\omega_0$  : largeur du faisceau.

La possibilité de découpler la résolution latérale et transverse confère à l'OCT une propriété attrayante pour l'endoscopie. Des images à haute résolution axiale peuvent être acquises malgré la faible ouverture numérique. Bien que la profondeur de champ est ajustée pour

sonder quelques millimètres en profondeur, les milieux biologiques sont très hétérogènes. Constitué de fibres de collagène, d'élastine ainsi que de nombreuses cellules, ces milieux turbides peuvent rapidement atténuer la lumière. Au-delà d'une certaine profondeur, les photons ne contribuent plus au signal OCT utile (détection des photons quasi balistiques), mais plutôt au bruit associé à la diffusion multiple. La profondeur de pénétration de la lumière est principalement gouvernée par les propriétés intrinsèques des tissus.

### 3.5 Propriétés optiques des tissus

La propagation de la lumière dans un tissu biologique dépend des coefficients d'absorption  $\mu_a$  et diffusion  $\mu_s$ . Ces propriétés optiques permettent de quantifier la probabilité qu'un photon puisse être absorbé ou diffusé. La rétroréflexion de la lumière dans le tissu est directement liée à l'effet combiné de ces deux paramètres, soit  $\mu_t$ , ou coefficient d'atténuation totale. Elle s'exprime selon l'équation 3.9 :

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (3.9)$$

De façon équivalente, le libre parcours moyen peut être exprimée par  $l_t$  avec la relation suivante :

$$l_t = \frac{1}{\mu_t} = \frac{1}{\mu_a + \mu_s} \quad (3.10)$$

Bien que la puissance des sources puisse être augmentée afin d'accentuer la réflectivité et la profondeur de pénétration, elle est souvent minimisée pour éviter les effets nocifs de l'irradiation. En effet, l'absorption du milieu contribue à limiter la profondeur de pénétration possible dans les tissus. Dans les milieux biologiques, le sang, l'eau et la mélamine absorbent fortement la lumière. Toutefois, il est également possible d'utiliser l'absorption pour évaluer les processus métaboliques comme l'angiogénèse [Vakoc *et al.* (2012)] ou le taux d'hémoglobine [Chong *et al.* (2015)]. Les valeurs typiques du coefficient d'absorption dans les tissus biologique est de l'ordre de 0.1 à 1 mm<sup>-1</sup> [Wilson et Jacques (1990)] selon la longueur d'onde utilisée.

Les sources utilisées en OCT pour observer les tissus sont généralement dans l'infrarouge

proche, de 800 à 1500 nm. Les motivations sont justifiées par les faibles coûts des composants optiques issus de l'industrie des télécommunications et la faible diffusion à ces longueurs d'onde. En proche infrarouge on bénéficie d'une diminution de la diffusion dont la section efficace est proportionnelle à  $\lambda^{-4}$  [Schmitt *et al.* (1994)]. Les longueurs d'onde inférieures à 1000 nm sont absorbées par la mélanine et l'hémoglobine. Aux longueurs d'onde supérieures à 1000 nm, l'atténuation de la lumière est principalement dominée par l'absorption de l'eau. La fenêtre thérapeutique, représentée à la Figure 3.6, illustre l'absorption en fonction de la longueur d'onde.

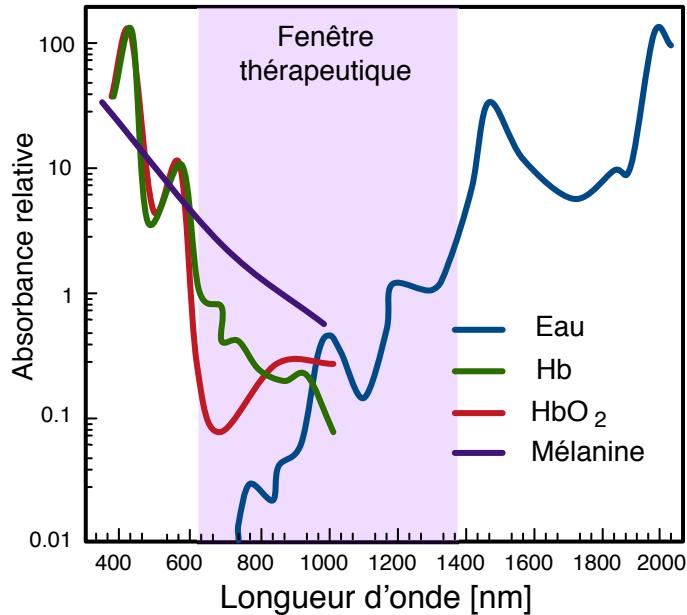


Figure 3.6 Spectres d'absorption des principales composantes des tissus biologiques aux concentrations typiques.

Compte tenu du faible taux de pénétration des modalités optiques, la conception d'une sonde endoscopique OCT est souvent essentielle pour l'imagerie in vivo.

### 3.6 Sondes endoscopiques en OCT

Les sondes optiques sont fabriquées et utilisées dans l'objectif de visualiser, mesurer et caractériser les structures ou les processus biologiques. Les paramètres fondamentaux qui orientent le design optique doivent être adaptés au contexte de l'application envisagée. On retrouve en l'occurrence, la taille externe, le champ de vue, la vitesse, la robustesse du système et la

flexibilité de la sonde endoscopique. Les sondes utilisent généralement des optiques de petite taille avec une ouverture numérique réduite permettant une résolution latérale de l'ordre de quelques dizaines de microns (10 à 30 μm).

Chaque sonde optique doit employer un mécanisme de balayage pour construire une image ou un volume de l'échantillon. Basé sur ce mécanisme de balayage, on distingue trois types de sondes endoscopiques en OCT : les sondes avec un balayage linéaire, radial et en face. Ce mécanisme de balayage peut être installé d'une façon proximale ou bien d'une façon distale, directement à la pointe de la sonde. La Figure 3.7 illustre le design des sondes endoscopiques les plus utilisées en OCT et la géométrie de leur mécanisme de balayage respectif (linéaire, radial et en face).

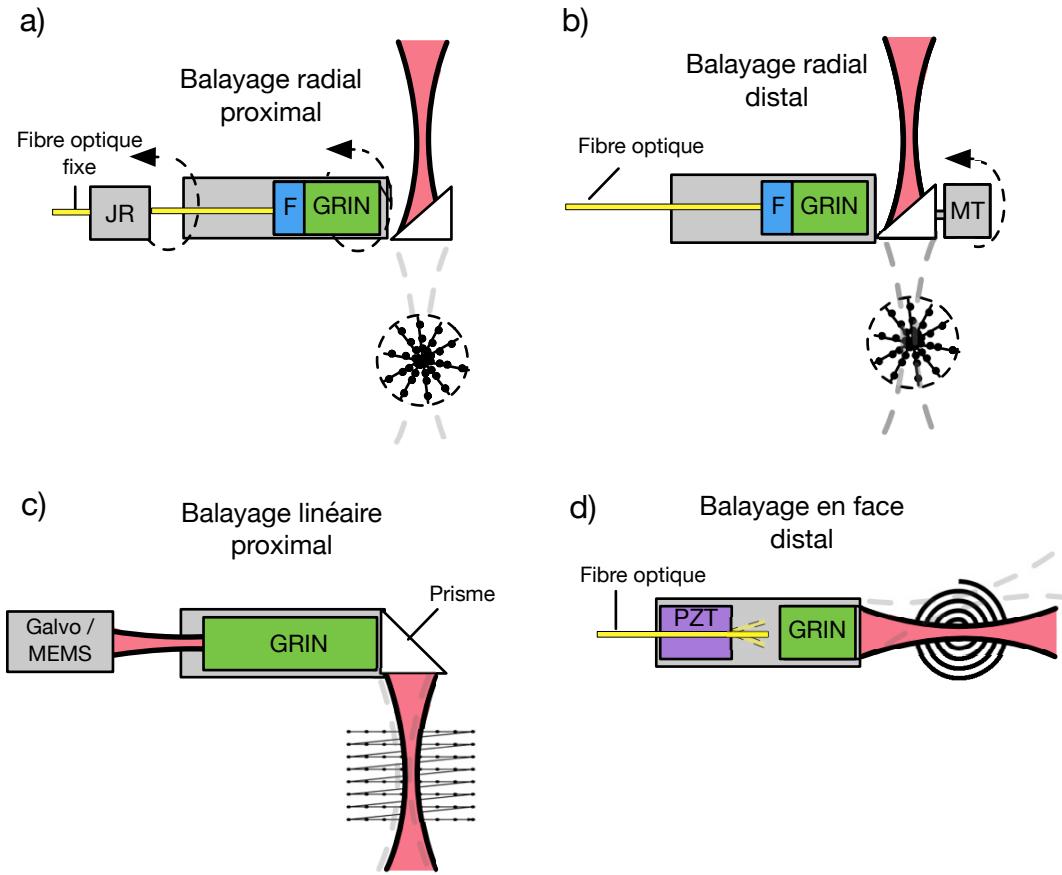


Figure 3.7 Représentation schématique des méthodes de balayage les plus utilisées sur les sondes endoscopique en OCT. Un balayage radial peut être réalisé avec une jonction rotative (a) installée de façon proximale ou avec un micromoteur (b) installé de façon distale. Les galvanomètres ou des miroir MEMS (de l'anglais « Microelectromechanical systems ») peuvent servir dans un contexte d'un balayage linéaire (c). Le mécanisme utilisé pour une visualisation en face est le balayage en spiral (d) exécuté avec un piézoélectrique. Galvo : galvanomètres ; MEMS : microsystèmes électromécaniques ; GRIN : lentille à gradient d'indice ; F : férule de verre ; MT : micromoteur ; PZT : piézoélectrique.

### 3.6.1 Balayage radial

Le mode à balayage radial installé de façon proximale [Fig.3.7a] est à la base de la première sonde endoscopique OCT. Introduite par Tearney et coll. [Tearney *et al.* (1996a)], elle permet la détection de tumeurs précoces dans la région gastro-intestinale de lapins. La sonde consiste en un cathéter avec une fibre optique d'un millimètre de diamètre couplé à un miroir à l'extrémité [Tearney *et al.* (1997)]. Depuis, ce mécanisme de balayage est entre autres exploité sur

plusieurs sondes endoscopiques pour imager les structures circulaires : les vaisseaux sanguins en athérosclérose [Jang *et al.* (2005)], les bronches asthmatiques [McLaughlin *et al.* (2008)] et l'oesophage pour le syndrome de Barret [Vakoc *et al.* (2007)]. En laryngologie, ce mode a été utilisé tout récemment pour évaluer les sténoses trachéales chez les nouveau-nés [Volgger *et al.* (2015)].

La réalisation du mode radial est possible, entre autres, avec l'utilisation d'une jonction rotative fibrée qui permet de faire tourner la fibre optique continuellement sur elle-même dans la partie distale de la sonde. L'ensemble des éléments optiques est inséré dans un câble de torsion permettant un balayage sur 360 degrés. Le design optique est relativement simple. Il permet d'obtenir des sondes avec un diamètre extrêmement petit, en dessous du millimètre. Cet avantage est considérable étant donné qu'il permet l'intégration de ce cathéter directement dans les canaux auxiliaires des endoscopes commercialement disponibles.

Toutefois, malgré les nombreuses itérations et progrès techniques réalisés depuis le premier prototype [Tearney *et al.* (1996b)], cette technique de balayage souffre encore d'artéfacts issus de la torsion de la fibre optique et des irrégularités dans le mécanisme de rotation [Tsai *et al.* (2013)]. La position angulaire de la pointe de la sonde peut varier par rapport à l'axe de rotation ce qui peut provoquer des distorsions dans les volumes acquis. L'utilisation d'une jonction rotative est également très sensible à l'alignement [Tsai *et al.* (2013)]. L'efficacité du couplage de la lumière à la jonction entre la partie fixe et mobile de la fibre optique peut varier et induire des changements de puissance à l'échantillon [Jang (2014)]. De plus, l'acquisition des images doit être couplée à la vitesse de rotation de la sonde. Cependant, avec les bons mécanismes en place, plusieurs de ces difficultés peuvent être contrôlées et permettre une acquisition en clinique. Il existe en cardiologie des systèmes commercialement disponibles (Saint-Jude Medical, USA) et approuvés par les autorités de réglementation (Santé Canada et la FDA, pour *Food and Drug Administration*) qui offrent des vitesses de rotation de l'ordre de 150 révolutions par seconde avec des images de 1000 lignes-A. Les sondes développées peuvent, avec un mécanisme de « pullback », couvrir un champ de vue de plus de 150 mm.

Pour s'affranchir de certains artéfacts de la jonction rotative, il est possible de jumeler un micromoteur et un prisme à la pointe de la sonde [Fig.3.7b]. Ce mécanisme de balayage distal permet de faire tourner simplement le miroir installé à l'extrémité. Ce design permet d'augmenter considérablement la partie flexible de la sonde [Tran *et al.* (2004)]. Cependant, l'introduction de câbles électriques pour alimenter le moteur au sein de la partie distale de la sonde endoscopique pose des enjeux de sécurité pour le patient. De plus, les câbles réduisent le champ de vue [Herz *et al.* (2004)]. Tout comme la jonction rotative, l'échantillonnage est

non linéaire et peut introduire des distorsions dans les volumes acquis.

### 3.6.2 Balayage linéaire

Le mécanisme de balayage linéaire [Fig.3.7c], utilisé dans le présent projet, figure comme l'un des mécanismes les plus répandus en microscopie. Une combinaison de galvanomètres et un assemblage d'optiques (lentille et GRIN) permettent de balayer le faisceau laser de façon cartésienne, point par point à l'échantillon. Les sondes qui exploitent ce mécanisme ont l'avantage d'être robustes et faciles à manipuler. De plus, les images sont plus faciles à interpréter et ne demandent pratiquement aucun post-traitement des données. La Figure 3.8 illustre une image OCT d'un doigt avec un balayage radial et latéral. Bien que l'on perçoive les structures internes du doigt (épiderme et derme) dans les deux modes de balayage, l'image linéaire semble plus adaptée à cette partie de l'anatomie.

Cependant, l'utilisation des éléments optiques nécessite que la sonde soit rigide sur toute la longueur entre le mécanisme de balayage et l'échantillon. Selon l'application, cette exigence peut être difficile à respecter. De plus, le design optique peut se complexifier en fonction de la longueur de la sonde. Ce type de sonde reste encore difficile à miniaturiser étant donné la taille des GRIN (l'ordre du millimètre) et des galvanomètres commercialement disponibles (l'ordre du cm). Récemment, des progrès sur la taille et la vitesse des miroirs basé sur des MEMS ont permis l'introduction de quelques prototypes de sondes linéaires de l'ordre de quelques millimètres de diamètre [Wang *et al.* (2013)].

### 3.6.3 Balayage en face

En visualisation frontale, l'illumination de l'échantillon et la collection des photons réfléchis sont exécutées dans l'axe de la sonde. Ce mode est très intéressant pour assister la prise de biopsie ou permettre d'ajouter une seconde modalité collocalisée, par exemple l'imagerie confocale par fluorescence. Dans ce mode de visualisation, le balayage du faisceau OCT est accompli par l'utilisation des éléments électromécaniques miniaturisés, piézoélectriques [Boppart *et al.* (1997)] ou des miroirs actionnés par des MEMS [Pan *et al.* (2001); Xie *et al.* (2003)].

Le mécanisme de balayage avec piézoélectrique, consiste à faire vibrer la pointe de la fibre optique de façon sinusoïdale dans la partie distale de la sonde. Ce type de configuration

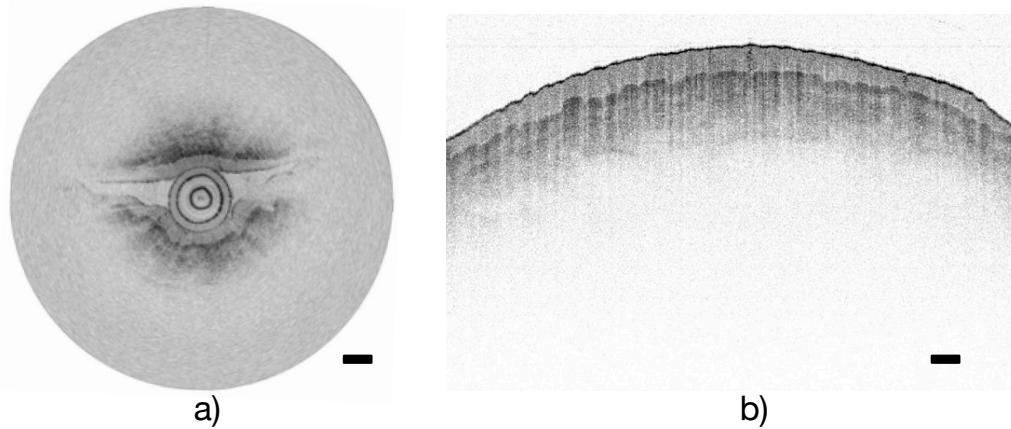


Figure 3.8 Image OCT d'un doigt avec une jonction rotative (a) tiré de [Cho *et al.* (2014)] et un balayage linéaire (b). L'interprétation des structures anatomiques est favorisée selon le mode balayage utilisé. Un mode radial est préconisé pour des structures anatomiques circulaires comme les vaisseaux sanguins. Échelle : 1mm

permet de balayer l'échantillon très rapidement. Bien que ce mécanisme permet de réduire considérablement la taille de la sonde, il est fortement non linéaire. La trajectoire du balayage a la forme d'une spirale [Fig.3.7d]. Une calibration préalable est nécessaire et des opérations de post-traitements sont essentielles pour reconstruire l'image ou le volume d'acquisition. De plus, les piézoélectriques, installés à la pointe de la sonde, requièrent une isolation électrique robuste.

Enfin, le tableau suivant en résume quelques avantages et difficultés spécifiques à chaque mécanisme de balayage.

Tableau 3.1 Comparaison des mécanisme de balayage en OCT

Mécanisme de balayage	Avantages	Inconvénients
Galvo/MEMS	Rapide Image uniforme	Difficile à miniaturiser Rigide
Jonction rotative	Petite taille Grand champ de vue Design simple	Déforme le tissu Centre de rotation non uniforme Jonction fragile
Micromoteur	Rapide	Alimentation électrique à la partie distale
Piézoélectrique	Petite taille Balayage très rapide	Post-traitement des images Conception difficile

### 3.7 Traitement des images OCT

Le traitement d'image est un procédé qui permet d'améliorer la qualité des images ou de révéler des propriétés propres à l'échantillon étudié. Ces caractéristiques clés peuvent être analysées sous une perspective d'intensité des pixels, de forme ou de variation locale. La littérature sur le traitement des images OCT en laryngologie est pratiquement absente. L'utilisation de l'OCT en laryngologie est relativement immature en comparaison avec ophtalmologie où des appareils commerciaux de troisième génération sont déjà opérationnels. Cette sous-section présente, une brève revue de la littérature sur les techniques de traitement d'images OCT appliquée à l'ophtalmologie et, d'autre part, des techniques d'extraction du signal d'atténuation et de texture.

Depuis les deux dernières décennies, les techniques de traitement d'images endoscopiques se sont grandement développées pour contribuer à aider le diagnostic médical [Uloza *et al.* (2005); Shu *et al.* (2005); Saint-Pierre *et al.* (2007)]. Cependant, les images de la tomographie par cohérence optique sont beaucoup plus bruitées comparativement aux images endoscopiques standard.

Minimiser le bruit dans les images OCT est souvent l'étape préliminaire qui permet d'améliorer l'interprétation des structures observées [Costa *et al.* (2006)]. Une source de bruit, inhérente à l'OCT, ou toute forme d'imagerie cohérente, est le bruit de tavelure, aussi nommé « speckle ». Son origine provient des interférences constructives et destructives des fronts d'onde issues des diffuseurs distribués au hasard et dont la taille est sous la résolution du

système [Goodman (2007)]. Une technique simple et intuitive pour s'en affranchir consiste à prendre plusieurs images et effectuer un moyennage du signal. En ophtalmologie Sakamoto et coll. ont démontré que le moyennage d'au moins 4 images « B-scan » consécutives améliore significativement la définition des couches de la rétine [Sakamoto *et al.* (2008)]. Il est raisonnable d'envisager que cette technique pourrait donner des résultats similaires sur des acquisitions OCT des cordes vocales. Toujours dans l'objectif de réduire l'impact du bruit de tavelure dans les images, l'algorithme basé sur une estimation bayésienne des moindres carrés, proposé par Wong et coll., permet d'évaluer et minimiser le bruit à partir d'un échantillonnage conditionnel a posteriori [Wong *et al.* (2010)]. Une fois le bruit minimisé, plusieurs options de segmentation OCT peuvent être ensuite envisagées (manuelle, semi-automatisée ou complètement automatisée).

Les techniques de segmentation les plus utilisées sont basées sur l'intensité des pixels. Dans un premier temps, les techniques de segmentation à la base de seuillage ont été implémentées pour la détection des couches de la rétine [Chiu *et al.* (2010)]. Ces techniques simples visent à évaluer si l'intensité d'un pixel est supérieure ou inférieure à un seuil imposé. Afin d'ajouter de la robustesse aux variations d'illumination, la segmentation basée sur la partition d'histogramme, la méthode d'Otsu, [Otsu (1979)] a été également proposée [Chiu *et al.* (2010)]. L'algorithme suppose que les images contiennent deux classes de pixels et le seuil optimal est choisi de sorte que la variance de chaque classe soit minimisée.

Wojtkowski et coll. ont utilisé un algorithme de seuillage multiple sur l'intensité pour diagnostiquer les maladies de la rétine [Wojtkowski *et al.* (2009)]. Toujours sur la rétine, une approche basée sur des modèles déformables paramétriques a été utilisée pour quantifier la progression tumorale [Ruggeri *et al.* (2009)]. Les techniques paramétriques tel les contours actifs [Kass *et al.* (1988)] permettent, au moyen d'un modèle basé sur la minimisation d'une fonction d'énergie, d'incorporer de l'information a priori sur la forme du contour. Cependant, l'initialisation est souvent le problème principal de cette technique [Marendic *et al.* (2001)].

Eichel et coll. [Eichel *et al.* (2010)] ont introduit une nouvelle technique de segmentation 2D, suivi d'une reconstruction 3D, sur des images à haute résolution. Cette technique permet de segmenter précisément la cornée. La technique fait appel à une série de prétraitements : normalisation, opérateur morphologique, filtrage gaussien suivi de l'opérateur d'extraction de contours de Prewitt. Ensuite, sur les frontières résultantes, un ajustement d'une courbe polynomiale est appliqué. La méthode segmente et évalue l'épaisseur des couches de la rétine adéquatement. Cependant, selon les auteurs, la segmentation d'un volume de 442 images OCT, sous Matlab, peut prendre plus de huit heures.

Tandis que la méthode de seuillage divise les régions, la méthode de fusion de régions regroupe plutôt les pixels voisins dont les intensités sont similaires. Cette approche figure également comme une méthode alternative proposée pour segmenter les couches de la rétine [Fabritius *et al.* (2009)]. Les techniques d'analyse de contours sont très utilisées en traitement d'images. Elles figurent souvent comme une étape intermédiaire aux algorithmes de segmentation. Les opérateurs Prewitt, Sobel et Canny [Canny (1986)] sont convolués à l'image afin d'extraire les contours des couches de la rétine selon une direction ou une orientation [Yazdanpanah *et al.* (2011)].

Il est bien connu que les techniques classiques d'intensité souffrent malheureusement d'un manque de robustesse à cause, d'une part de la variation dans l'éclairage qui dépend grandement de l'équipement utilisé, et d'autre part des variations d'apparence externe qui peuvent subsister selon les individus et selon la pathologie.

Pour pallier les variations de l'apparence externe, les techniques de quantification sur l'atténuation relative et l'information de texture sont également exploités.

### 3.7.1 Atténuation du signal OCT

L'atténuation du signal OCT peut être modéliser par une exponentielle inverse, selon la loi de Beer Lambert :

$$I(z) = I_0 e^{-(2\mu_t z)} \quad (3.11)$$

où  $I(z)$  correspond au signal d'intensité à une profondeur  $z$ ,  $I_0$  à l'intensité émise initialement et  $\mu_t$  au coefficient d'atténuation. Le facteur 2 provient du parcours aller-retour entre éclairage et le retour des photons au détecteur. Tel que mentionné à la section 3.5, le coefficient d'atténuation  $\mu_t$  est représentatif des changements dans la diffusion et l'absorption de l'échantillon. Par exemple, la densité des fibres de collagène, d'élastine et les membranes cellulaires peuvent influencer la valeur de  $\mu_t$ . Extraire  $\mu_t$  à différentes profondeurs  $z$  peut devenir un outil de quantification intéressant. La pente qui représente le mieux la ligne-A, sous forme logarithmique, permet d'exposer  $\mu_t$ . Bien que cette technique n'ait jamais été adaptée aux cordes vocales, elle a été considérée pour l'identification des tissus pathologiques dans les noeuds lymphatiques [McLaughlin *et al.* (2009)] ou dans la différenciation des plaques athéroscléroses [Soest van *et al.* (2010)]. Cette caractérisation du signal est à une dimension.

Il est également possible d'évaluer une approche à deux dimensions avec la texture dans les images OCT.

### 3.7.2 Analyse de texture

Généralement, les travaux sur la segmentation reposent sur les caractéristiques d'intensité ou de forme. La variation locale, connue sous le nom de texture, peut également servir à la segmentation en classifiant les pixels qui possèdent des propriétés statistiques ou fréquentielles communes. Dans le domaine du traitement d'images médicales, l'analyse de texture est surtout utilisée pour la radiographie [Egmont-Petersen et Pelikan (1999)] et la tomodensitométrie [McNitt-Gray *et al.* (1999)], plus précisément pour la détection de microcalcification dans les mammographies numériques [Wang et Karayiannis (1998)] et la caractérisation des tissus hépatiques [Mojsilović *et al.* (1998)]. Selon l'application, l'extraction de caractéristiques de texture peut être exécutée principalement dans une perspective stochastique avec des outils comme les matrices de cooccurrence ou covariance [Chen et Pavlidis (1983)] ou bien dans le domaine fréquentiel avec l'utilisation d'ondelettes [Unser (1995)] et de filtres de Gabor [Bovik *et al.* (1990)]. Le domaine fréquentiel offre un atout supplémentaire avec la possibilité de discriminer plusieurs fréquences et de préserver les détails du signal à différentes résolutions. La matrice de cooccurrence a été introduite par Haralick et coll. dans le début des années 1970 [Haralick *et al.* (1973)]. Elle représente essentiellement la probabilité d'occurrence d'une paire de niveaux de gris  $s(i, j)$  pour un déplacement  $d$  et une orientation  $\theta$  donnée. Les éléments  $s_\theta(i, j | d)$  de la matrice permettent de définir 14 métriques globales pour classifier une texture. Plusieurs de ces métriques sont mutuellement dépendantes. Les plus utilisées sont : l'énergie, l'entropie, le contraste, l'inertie, la corrélation et l'homogénéité locale. Si  $L$  représente le nombre de niveaux de gris dans l'image d'intérêt, et que la moyenne  $\mu$  et l'écart type  $\sigma$  sont respectivement exprimés selon 3.12 et 3.13, nous pouvons définir ces descripteurs comme suit :

$$\mu_x = \sum_{i=0}^{L-1} i \sum_{j=0}^{L-1} s_\theta(i, j | d) \quad , \quad \mu_y = \sum_{i=0}^{L-1} j \sum_{j=0}^{L-1} s_\theta(i, j | d), \quad (3.12)$$

$$\sigma_x = \sum_{i=0}^{L-1} (i - \mu_x)^2 \sum_{j=0}^{L-1} s_\theta(i, j | d) \quad , \quad \sigma_y = \sum_{i=0}^{L-1} (i - \mu_y)^2 \sum_{j=0}^{L-1} s_\theta(i, j | d). \quad (3.13)$$

L'énergie, formulée selon 3.14, consiste en une sommation au carré de chaque valeur de la matrice, elle permet de mettre en évidence les régions qui possèdent une distribution d'intensité commune.

$$\text{Énergie} = \sum_{i=0}^{L-1} \sum_{j=0}^{L-1} [s_\theta(i, j | d)]^2 \quad (3.14)$$

Le contraste est la variation locale des niveaux de gris de la matrice de cooccurrence. C'est une mesure de la dépendance de la valeur des niveaux de gris des pixels selon leur position. Le contraste sera faible si la valeur des pixels voisins est similaire et complètement nulle sur une image qui possède un ton uniforme.

$$\text{Contraste} = \sum_{i=0}^{L-1} \sum_{j=0}^{L-1} |i - j|^2 [s_\theta(i, j | d)] \quad (3.15)$$

L'entropie est donnée par 3.16 et représente la sommation de chaque multiplication de la probabilité d'occurrence  $s_\theta(i, j | d)$  avec son logarithme. Ce descripteur permet d'identifier les régions qui possèdent une distribution large de valeurs d'intensité. Une grande entropie est accordée aux régions inhomogènes.

$$\text{Entropie} = \sum_{i=0}^{L-1} \sum_{j=0}^{L-1} s_\theta(i, j | d) \log s_\theta(i, j | d) \quad (3.16)$$

La corrélation permet de quantifier la relation de dépendance qui existe entre les pixels. Les pixels appartenant à une région d'une même couche uniforme devraient manifester une corrélation élevée.

$$\text{Corrélation} = \frac{\sum_{i=0}^{L-1} \sum_{j=0}^{L-1} (i - \mu_x)(j - \mu_y) s_\theta(i, j | d)}{\sigma_x \sigma_y} \quad (3.17)$$

L'homogénéité locale et l'inertie sont complémentaires. Elles permettent de distinguer les régions à faible ou fort contraste.

$$\text{Homogénéité} = \frac{\sum_{i=0}^{L-1} \sum_{j=0}^{L-1} (i - \mu_x)(j - \mu_y) s_\theta(i, j | d)}{1 + (i - j)^2} \quad (3.18)$$

$$\text{Inertie} = \sum_{i=0}^{L-1} \sum_{j=0}^{L-1} (i-j)^2 s_\theta(i, j \mid d) \quad (3.19)$$

Malgré qu'il soit possible de caractériser les tissus à partir d'une analyse de texture en OCT [Gossage *et al.* (2003)], encore très peu d'ouvrages sont recensés dans ce domaine. Une approche très récente utilise cependant des données présegmentées manuellement pour reconstruire un modèle à partir d'une analyse de texture. Suite à l'apprentissage exécuté sur 2700 images, le modèle statistique arrive à fournir une segmentation robuste des couches rétiniennes [Kajić *et al.* (2010)]. Le traitement d'images demeure sensible aux bruits présents dans les images OCT. Le contraste en laryngologie entre un tissu sain et pathologique peut-être difficile à détecter.

### 3.8 Application de l'OCT en laryngologie

Le potentiel clinique de l'OCT en laryngologie est grandissant [Hawkshaw *et al.* (2013)]. Des études ont été réalisées pour analyser : la muqueuse [Lüerssen *et al.* (2006)], la partie supérieure des voies respiratoires [Colt *et al.* (2010)], l'oreille moyenne [Pitris *et al.* (2001)], la cochlée [Sepehr *et al.* (2008); Wong *et al.* (2000)] et la glande thyroïde [Montigny *et al.* (2016); Zhou *et al.* (2013)].

Les premières images OCT de la région laryngée ont été obtenues à l'aide d'un montage entièrement fibré [Sergeev *et al.* (1997)]. L'étude démontre sur 15 patients traités avec des rayons gamma qu'il est possible de suivre de façon non invasive l'évolution de la couche épithéliale au cours d'une séance de radiothérapie. Les images OCT illustrent clairement un épaississement de l'épithélium après les traitements de radiation. Cette conclusion, obtenue de façon non invasive avec l'OCT, est corroborée avec les données histologiques.

Depuis l'étude de Sergeev et coll. en 1997, environ une quarantaine d'articles décrivant l'usage de l'OCT pour les cordes vocales a été recensée. Le potentiel d'applications cliniques *in vivo* pour l'identification des marges des tumeurs laryngées est une approche très intéressante pour le diagnostic et le suivi durant des traitements par radiations ionisantes.

La première méthode d'identification des marges tumorales avec l'OCT a été proposée pour guider la chirurgie laser peropératoire [Shakhov *et al.* (2001)]. La méthode délimite les frontières de la tumeur lorsqu'un changement d'intensité dans les images OCT est observé. Les

résultats sont corroborés avec la récente étude prospective [Kaiser *et al.* (2009)], sur 46 échantillons, obtenus par chirurgie. Il est notamment démontré que la combinaison de l'OCT à la microlaryngoscopie améliore l'évaluation du type de dysplasie et le diagnostic d'un carcinome laryngé. L'OCT permet également une présélection des régions à évaluer par biopsie où autrement un nombre important de prélèvements d'échantillon serait nécessaire ce qui augmenterait considérablement le temps en chirurgie [Upile *et al.* (2007)].

Bien que l'OCT permette d'améliorer le processus décisionnel en milieu intraopératoire [Kraft *et al.* (2008)], la modalité permet également d'observer les traitements d'injection d'acide hyaluronique dans les cordes vocales [Burns *et al.* (2009)]. Cette injection supervisée pourrait améliorer la réhabilitation des cordes vocales après la chirurgie.

Avec la miniaturisation des outils optiques (lentilles, prisme et micromoteur), le développement des sondes optiques permet d'explorer de mieux en mieux le larynx dans différentes conditions. Une sonde flexible a permis de démontrer qu'il était possible d'observer les cordes vocales de patients adultes éveillés avec l'OCT [Sepehr *et al.* (2008)]. Sur une base plus exploratrice, les travaux de Wong et coll. ont examiné quelques lésions des voies aérodigestives supérieures chez 82 adultes [Wong *et al.* (2005)]. Les sites explorés et analysés sont les vraies et fausses cordes vocales, l'espace sous glottique et l'épiglotte. Les dimensions de l'épithélium rapportées varient énormément selon les individus. En moyenne, la dimension de l'épithélium de la corde vocale adulte pathologique observée est de  $128 \pm 58$  microns [Wong *et al.* (2005)].

Malgré les nombreuses études *in vivo* en OCT axées sur les pathologies laryngées [Armstrong *et al.* (2006)] très peu de travaux ont porté sur une clientèle pédiatrique. Pourtant, récemment l'OCT a été évalué comme une technique optique prometteuse pour l'évaluation de la microanatomie des cordes vocales chez une population pédiatrique [Boudoux *et al.* (2009a,b)].

Les travaux de Ridgway et coll. sont les rares travaux *in vivo* chez une clientèle pédiatrique. Dans cette étude, l'OCT a permis d'observer l'épaisseur de la muqueuse laryngée, le cartilage cricoïde et les anneaux trachéaux chez les nouveau-nés [Ridgway *et al.* (2007, 2008)]. Toutefois, la vitesse d'acquisition (quelques images secondes) et la sensibilité des systèmes TD-OCT utilisés limitent l'étude à une acquisition à deux dimensions. Il est probable qu'un système tridimensionnel puisse révéler davantage sur la complexité anatomique de cette structure et sur les pathologies vocales. Toutefois, des études récentes utilisant des systèmes dans le domaine de Fourier ont permis de détecter des sténoses sous-glottiques chez les nouveau-nés [Volgger *et al.* (2015); Sharma *et al.* (2015)].

### 3.9 Discussion

Depuis les dernières décennies, plusieurs développements technologiques ont permis d'examiner et de traiter avec plus de précision les pathologies laryngées. Les outils chirurgicaux adaptés : endoscope flexible, l'utilisation de laser d'ablation et la microlaryngoscopie, figurent comme les contributions technologiques majeures à cette spécialité. Plus récemment, l'OCT a suscité à son tour un intérêt particulier de la part de la communauté scientifique. Cette modalité d'imagerie optique possède une grande résolution spatiale et la possibilité de faire des images en coupe en temps réel de façon non invasive. Évaluer la muqueuse laryngée demeure un besoin essentiel, encore jusqu'ici non comblé par les méthodes d'imagerie traditionnelles.

Cependant, le peu d'informations structurelle disponible sur la corde vocale complique l'interprétation des images OCT. À ce jour, il existe peu d'ouvrages décrivant ou caractérisant le contraste obtenu à l'OCT sur des cordes vocales saines ou pathologiques. Tout comme l'affinité chimique de certaines molécules avec des teintures spécifiques en histologie, les propriétés des tissus comme l'absorption et la diffusion caractérisent les tissus. Un atlas avec différente acquisition des cordes vocales pourrait établir les bases de ce que représente une corde vocale sous un angle optique. D'autant que l'OCT ne présente pas les artéfacts typiquement associés avec l'histologie comme la distorsion des tissus lors du sectionnement.

Dans le cas des cordes vocales, la lamina propria possède un bon nombre de diffuseurs (noyaux, fibres d'élastine et de collagène), il est donc raisonnable de prévoir que le signal provenant de cette région sera caractéristique d'un tissu riche en eau et en petits diffuseurs. La source et les composants optiques pour observer cette structure devront être sélectionnés avec soin. Les propriétés de la source sont directement liées au rapport signal sur bruit. Les systèmes dans le domaine spectral permettent une excellente sensibilité ( $\geq 100\text{dB}$ ) ce qui est essentiel à la détection des photons balistiques dans les cordes vocales où la majorité des photons seront diffusés ou encore absorbés. Le choix de la longueur d'onde selon la fenêtre thérapeutique est primordial pour imager adéquatement cette structure anatomique. De plus, un spectre très large en longueur d'onde de la source permettra d'obtenir une bonne résolution axiale. Enfin, pour détecter les structures en couche de la corde vocale, la cohérence instantanée de la source accordable devra être très grande pour prévenir la dégradation du signal en profondeur.

Il existe un intérêt grandissant pour une paramétrisation quantitative des cordes vocales. Quelques pistes sont disponibles, tel qu'illustrées dans la section 3.7 sur le traitement d'images.

Cependant, il n'existe aucune méthode à ce jour qui permet de segmenter ou paramétriser correctement tout type d'image. Les images biomédicales sont particulières, elles requièrent souvent un ajustement selon la modalité et le contexte utilisé. Les images OCT sont uniques et souvent affectées par le bruit de tavelure ce qui ajoute de la difficulté à interpréter et traiter les donnés.

Le grand bémol qui persiste à ce jour est la presque inexistence de travaux impliquant une clientèle pédiatrique. Cette situation est principalement tributaire d'une incompatibilité avec l'appareillage endoscopique existant et le manque de spécimens cadavériques pédiatriques. Il semble que l'OCT serait tout à fait indiqué pour répondre à plusieurs questions fondamentales en ce qui a trait au développement des cordes vocales et des pathologies pédiatriques. Quels sont les changements structurels des lésions et du développement vocal ? La réponse à ces questions pourrait améliorer le traitement des pathologies vocales chez une population pédiatrique. L'étude ex vivo décrite au prochain chapitre tente d'apporter les premières pistes possibles à ces interrogations.

## CHAPITRE 4 ANALYSE DES COUCHES VOCALES AVEC LA TOMOGRAPHIE PAR COHERENCE OPTIQUE

Bien qu’Hirano et coll. [Hirano (1975)] ait démontré durant les années 80, la structure lamineuse des cordes vocales humaines à partir de l’histopathologie, à ce jour il n’existe aucun outil non invasif pour étudier leurs développements ou observer des lésions vocales pédiatriques. Proposer un nouvel outil clinique comporte nécessairement plusieurs étapes préalables. L’une d’entre elles consiste à valider l’instrumentation avec une approche progressive dans un milieu supervisé. Cette validation est souvent accomplie dans un environnement ex vivo. Elle permet également d’élaborer un protocole et d’identifier un modèle d’expérimentation. Ce chapitre permet d’énoncer le parcours suivi pour valider l’utilisation de la tomographie par cohérence optique pour l’observation et la caractérisation des cordes vocales pédiatriques.

### **4.1 Introduction**

Les études antérieures décrivent la corde vocale comme une structure anatomique dynamique, en constante évolution de la naissance à l’âge adulte [Hartnick *et al.* (2005)]. Monocouche à la naissance, la lamina propria se complexifie à l’enfance avec une structure bilaminaire pour enfin compléter sa transition vers une structure trilaminaire à l’âge adulte [Hirano (1975)]. Étant donné le nombre limité d’échantillons cadavériques en pédiatrie, les changements de cette microstructure sont encore très peu connus. Seuls quelques échantillons ponctuels permettent de dresser les grandes lignes du développement vocal [Hartnick *et al.* (2005)] [Boseley et Hartnick (2006)].

Le processus de maturation vocal constitue pourtant une information fondamentale pour les cliniciens. Cette information peut permettre la prévention et le traitement de pathologies vocales, en plus, d’établir les moments opportuns pour intervenir chirurgicalement.

Malgré les risques, la seule option pour caractériser le type et le degré de sévérité de la pathologie s’avère être la biopsie : le prélèvement d’un échantillon. Bien qu’une biopsie suivie d’un examen histologique soit l’outil de diagnostic de référence, le « gold standard » clinique, il n’en demeure pas moins qu’elles sont responsables d’un fort taux de faux négatif. De plus, elles sont souvent ponctuelles et ne permettent pas d’évaluer de grandes surfaces. Certaines procédures de prélèvements peuvent être risquées pour les patients, car elles peuvent générer

des complications et des infections.

En pédiatrie, la décision de prélever un échantillon de cordes vocales est difficile à prendre pour le chirurgien traitant. Perturber l'intégrité de la lamina propria peut avoir des conséquences irréversibles sur la voix du patient. Un outil de diagnostic non invasif des cordes vocales apparaît alors comme essentiel. Dans ce contexte, plusieurs techniques optiques ont été évaluées pour visualiser cette microstructure anatomique [Boudoux *et al.* (2009b)]. L'une de ces techniques optiques, la tomographie par cohérence optique (OCT de l'anglais « Optical Coherence Tomography »), semble particulièrement prometteuse.

Ce chapitre expose en deux temps les réalisations précliniques pour la validation de l'outil proposée. Dans un premier, une étude sur la caractérisation optique de la structure vocale est montrée. Il est primordial d'enrichir nos connaissances avec un maximum d'observation et de validation précliniques. Toutefois, cette nouvelle méthode de visualisation comporte son lot de défis lié à l'interprétation des images. Étant donné que la source de contraste des images OCT des cordes vocales est encore sujette à interprétation, la seconde partie de ce chapitre est consacrée à l'analyse du collagène dans les images OCT.

## 4.2 Expérimentations précliniques

Afin de comprendre la maturation de la corde vocale, la méthode proposée consiste à étudier les changements de la lamina propria avec la tomographie par cohérence optique. Les étapes de développement de la lamina propria, identifiées dans la littérature à partir d'images histologiques, passent d'une structure monocouche à une structure bilaminaire puis trilaminaire. L'expérience développée consiste à étudier et distinguer en OCT des caractéristiques clés dans la lamina propria de différents spécimens représentant les étapes de maturation.

La validation par corrélation des structures morphologiques est l'approche préconisée pour se familiariser avec la réponse optique des tissus vocaux. Les images OCT des cordes vocales ex vivo sont systématiquement comparées avec la modalité de référence, l'histologie.

### 4.2.1 Modèle expérimental

L'expérience est réalisée d'une part sur des échantillons humains disponibles et d'autre part à l'aide d'échantillons d'animaux. En effet, les larynx d'animaux sont souvent utilisés pour

évaluer l'efficacité des traitements ou des procédures chirurgicales [Dedmon *et al.* (2015); Garrett *et al.* (2000)]. Les différents spécimens sont sélectionnés selon leurs disponibilités et leurs caractéristiques propres. La structure monocouche est représentée dans cette étude par des échantillons foetaux pour lesquels la lamina propria n'est pas encore différenciée. Ces échantillons sont plus accessibles que les spécimens cadavériques pédiatriques. À 34 semaines, le larynx est suffisamment développé et les tissus vocaux du foetus sont représentatifs de ceux d'un nouveau-né [Nita *et al.* (2009)].

Le modèle porcin est considéré comme un modèle viable pour représenter une structure bilaminare de la lamina propria [Woodson (2012); Hahn *et al.* (2006, 2005)]. De plus, étant donné le nombre restreint d'échantillons pédiatriques, les larynx porcins permettront d'accumuler assez d'images pour rendre les observations statistiquement significatives. La matrice extracellulaire du modèle porcin est similaire à celle retrouvée chez l'humain en ce qui concerne la distribution d'élastine et de collagène [Hahn *et al.* (2006)]. De plus, ce spécimen, fortement étudié dans la littérature est assez abondant pour permettre d'optimiser les évaluations préliminaires. Il permet, en l'occurrence, la mise en place des protocoles et le développement d'algorithmes. Les échantillons porcins préservent ainsi la banque d'échantillons humains pour la validation ou pour les études comparatives. Enfin, la structure trilaminaire est étudiée à partir d'échantillons adultes cadavériques ou à la suite d'une laryngectomie (extraction du larynx) dans les cas de cancer à stade précoce.

#### **4.2.2 Protocole**

Le protocole est développé dans l'objectif de caractériser les états de maturation la lamina propria. Cette section décrit la méthodologie utilisée pour visualiser et caractériser les différences optiques entre le modèle foetal (une seule couche), le modèle porcin (deux couches) et finalement l'adulte (trois couches à maturité).

#### **Spécimens de cordes vocales**

Le potentiel de l'OCT pour l'imagerie des structures vocales est évalué à partir de plusieurs échantillons. Le consentement pour l'utilisation des échantillons a été accordé par le comité de l'*École Polytechnique de Montréal* et celui du *Massachusetts Eye and Ear Infirmary* (MEEI, Boston, Massachusetts). Enfin, l'analyse des spécimens et la validation histologique sont exécutées par les experts pathologistes du département de MEEI.

Nous avons imaginé plus d'une centaine d'échantillons porcins provenant de la ferme Groton (Boston, Massasuchetts) et de la ferme Ménard, sur la Rive-Sud de Montréal. Les spécimens porcins ont été congelés immédiatement après le sacrifice et maintenus dans un congélateur à la température de -18° Celsius jusqu'au moment de l'analyse.

Une dizaine d'échantillons foetaux ont été analysés, à Boston ainsi qu'une cinquantaine d'échantillons humains provenant exclusivement de l'hôpital MEEI. Ces échantillons sont imaginés sur place quelques heures après le prélèvement des donneurs d'organes ou quelques heures après le décès. Les tissus sont ensuite analysés par un pathologiste afin d'exclure de l'étude toutes cordes vocales avec cancer ou maladie grave.

### Sélection de la région d'intérêt

Tous les spécimens de larynx sont préparés selon la méthode de [Jiang et Titze (1993)] qui consiste à sectionner le larynx en deux hémisphères. La Figure 4.1a illustre l'axe d'excision, à l'apex du cartilage thyroïdien. La Figure 4.1b, illustre la corde vocale gauche sur le plan sagittal. Cet axe de coupe préserve la forme des muqueuses vocales et permet une étude plus réaliste de la physiologie naturelle des cordes vocales étant donné que la tension sur la muqueuse, les muscles et les ligaments demeure intact. En plus, cette approche offre une excellente vue de la région d'intérêt : la muqueuse.

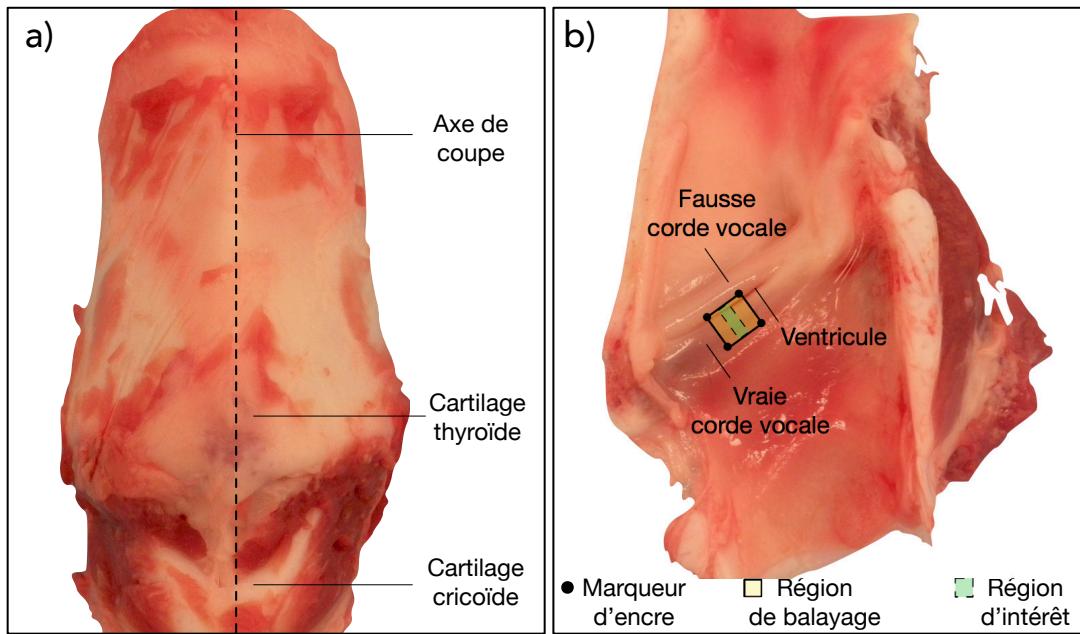


Figure 4.1 Larynx porcin. Vue frontale qui illustre l'axe de coupe pour préserver la muqueuse (a). Vue sagittale de l'hémisphère gauche du larynx porcin (b) avec la localisation de la région de balayage, délimitée par l'insertion d'encre de Chine au moyen d'une aiguille. Dans cette zone s'inscrit la région d'intérêt qui comprend la partie centrale de la corde vocale ainsi que le ventricule.

La Figure 4.1b, illustre la méthode utilisée pour comparer l'histologie aux images OCT. Après excision, de l'encre de Chine est injectée à l'aide d'une aiguille chirurgicale (jauge 24) dans la corde vocale. Ce marquage permet de colocaliser les structures anatomiques sur les deux modalités (à l'OCT et à l'histologie). L'encre est injectée au niveau du ventricule ainsi que dans la région inférieure de la vraie corde vocale. Le processus est répété à l'autre extrémité. Cette délimitation indique la zone de balayage à l'OCT et inclut la région d'intérêt : la partie centrale de la vraie corde vocale.

Cependant la zone d'analyse est un sous segment de la zone balayée. La région d'intérêt correspond à l'apex de la vraie corde vocale, considéré comme la région la plus impliquée dans la phonation [Jiang et Titze (1994)]. Une attention particulière est dévouée à sélectionner cette région le plus fidèlement possible afin de permettre une comparaison uniforme entre spécimens. Cette sélection est principalement basée sur les repères anatomiques de la vraie corde vocale, à environ quelques centaines de microns du ventricule.

## Protocole d'imagerie ex vivo

Une fois la zone délimitée, l'échantillon est placé sous un microscope OCT commercial (OCS13010V1, Thorlabs, New Jersey). Ce système utilise une source laser infrarouge à balayage (SS-OCT), cadencée à 100 kHz (100 000 lignes-A/seconde) avec une longueur d'onde centrale de 1310 nm. La résolution spatiale est de 12  $\mu\text{m}$  en profondeur et de 25  $\mu\text{m}$  latérale. Les échantillons sont orientés de sorte à permettre une acquisition à travers les points d'encre, sur l'axe antéro-postérieur. La dimension de la zone capturée est de 10 mm x 10 mm x 7 mm (1024 x 1024 x 1024 pixels)<sup>1</sup>. Cette dimension permet d'imager la vraie corde vocale et une partie du ventricule, nécessaire comme point de référence. Le temps total d'acquisition pour capturer ce volume est d'environ 30 secondes. La Figure 4.2 illustre la plateforme d'acquisition ex vivo ainsi que le positionnement de l'échantillon sous l'objectif OCT (Thorlabs, LSM03 5X). Le laser de positionnement permet de localiser en temps réel la coupe d'acquisition.

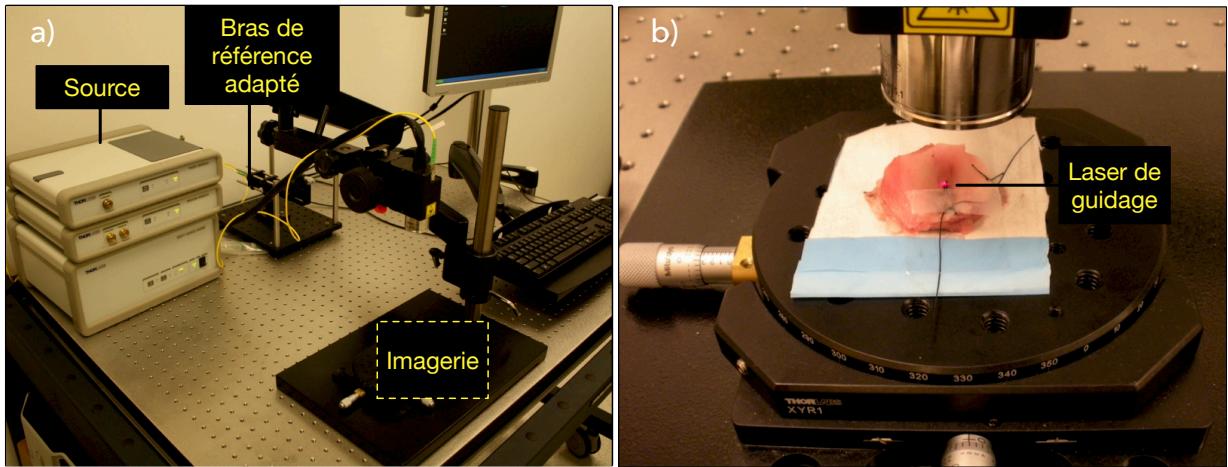


Figure 4.2 Environnement d'acquisition OCT ex vivo. Table optique munie d'une source infrarouge à 1310 nm de longueur d'onde centrale (a) ainsi qu'un bras de référence externe adapté pour une utilisation avec des sondes endoscopiques. Acquisition tridimensionnelle d'un spécimen porcin (b). Le laser de guidage à 632 nm assure que la région de balayage couvre bien la zone délimitée à l'encre de Chine.

1. Dimension donnée selon les axes x,y,z.

#### 4.2.3 Comparaison avec l'histopathologie

Après l'acquisition d'un volume en OCT, l'échantillon est placé dans une solution de formaldéhyde pour être éventuellement sectionné et coloré à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) et au Trichrome de Masson. Ces colorants ont été retenus pour leur efficacité à détecter la présence de collagène et d'élastine dans la corde vocale [Suvarna *et al.* (2013)]. La Figure 4.3 est une illustration comparative entre l'OCT et l'histologie d'une corde vocale d'un échantillon porcin. La section transverse obtenue avec l'OCT est représentée avec un code de couleur (Heart - 82 dB) représentant l'intensité du signal exprimée en échelle logarithmique [Fig.4.3a]. La coupe histologique correspondante est obtenue à partir d'un microscope à champ large avec un objectif de 100X (Nikon Eclipse, Melville, NY) [Fig.4.3b].

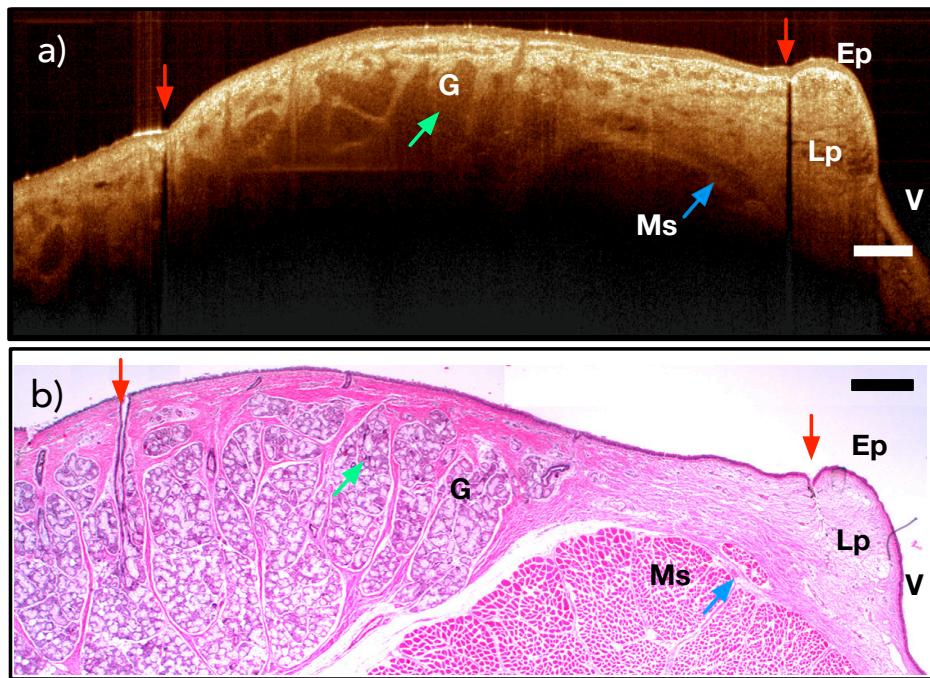


Figure 4.3 Corde vocale d'un échantillon porcin imagée à l'OCT (a) et coupe histologique correspondante (100x coloration H&E). Les flèches indiquent la délimitation à l'encre de Chine (en rouge), la délimitation avec le muscle vocal (en bleu) et la présence de structures glandulaires (en vert). Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; G : structure glandulaire ; Ms : muscle vocal ; V : ventricule ; - Échelle : 200 µm en (a) et (b).

La zone délimitée par les points d'encre, indiquées par les flèches rouges, est belle et bien visible dans les deux modalités. À l'histologie, l'encre résiste au processus de fixation et de coloration. À l'OCT, l'encre absorbe la lumière et apparaît comme une région sombre

(absence de signal). La Figure 4.3a illustre la fine couche épithéliale (Ep) du spécimen suivi par la lamina propria (Lp), plus intense et hétérogène. Des correspondances morphologiques sont également apparentes dans les deux modes de contraste. Des structures glandulaires (G) sont plus nombreuses dans la partie inférieure de la corde vocale, indiquées par la flèche verte. La flèche bleue illustre la transition entre la lamina propria et le muscle vocal (Ms).

L’interprétation des images OCT peut parfois être difficile à réaliser. De plus, les coupes histologiques sont parfois impossibles à obtenir, surtout dans un contexte intraopératoire. Dans de tels cas, il peut s’avérer intéressant d’utiliser des informations quantitatives strictement issues d’images OCT.

### 4.3 Analyse quantitative

L’objectif consiste à extraire et sélectionner des descripteurs à partir d’images OCT afin d’établir une relation directe ou indirecte entre l’intensité du signal retrodiffusé et les structures macroscopiques et microscopiques de la lamina propria. En effet, tel que démontré dans la section 3.5 sur la propriété des tissus au chapitre 3, la lumière interagit à la densité et à la distribution des diffuseurs (fibres, cellules, noyaux). Cette source d’information consiste en une piste intéressante pour la différenciation des couches de la corde vocale ou à l’identification de lésions vocales. Cependant, avant l’extraction de ces descripteurs, il est essentiel de conditionner les images OCT pour une analyse quantitative.

#### 4.3.1 Prétraitements des données brutes

Avant de procéder à l’analyse des données, une étape essentielle consiste à normaliser les données entre elles. Dans un premier temps, les volumes sont recalibrés pour profiter de la plage dynamique disponible. La plage dynamique utile est centrée sur le signal moyen,  $\mu$ , et s’étend sur une gamme  $\pm 3\sigma$ , où  $\sigma$  représente l’écart type des valeurs d’intensité. Le bruit de tavelure (« speckle »), inhérent à l’imagerie cohérente, combiné au bruit présent dans les sources OCT, dégrade la qualité des images. Dans le but d’améliorer le rapport signal sur bruit (SNR, de l’anglais « signal-to-noise ratio ») quelques images ont été moyennées pour la visualisation. Considérant la justesse des frontières, un moyennage de 7 images consécutives rehausse le contraste et permet une comparaison adéquate des structures morphologiques entre l’OCT et l’histologie. La Figure 4.4 illustre une coupe OCT d’une corde vocale d’un spécimen humain adulte avec et sans traitement d’image. Le contraste entre l’épithélium et la

lamina propria est accentué. Les structures dans la lamina propria sont davantage perceptibles dans la Figure 4.4b, tel qu'indiqué par les flèches vertes. L'arrière-plan est également beaucoup plus uniforme. En contre coup, des artefacts inhérents au système (interface interne parasite) sont aussi plus visibles (A).

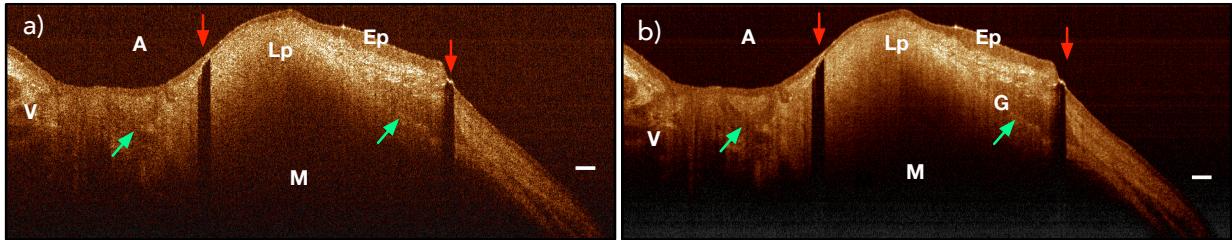


Figure 4.4 Rehaussement du contraste à l'OCT d'une corde vocale humaine. Image brute avec bruit de tavelure (a) présent en arrière-plan. Traitements préliminaires de normalisation et moyenne de 7 images consécutives (b) pour la visualisation. Les flèches en rouge indiquent les marqueurs, en vert la présence de structures visibles après traitements. Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; G : structure glandulaire ; M : muscle ; A : arrière-plan ; V : ventricule ; - Échelle : 200 µm en (a) et (b).

### 4.3.2 Atténuation relative du signal des cordes vocales

Une approche quantitative basée sur l'atténuation du signal interférométrique est réalisée sur chacun des spécimens. Cette technique paramétrique du premier ordre, décrite à la section 3.7.1, permet de caractériser la propagation du signal retrodiffusé dans le tissu. L'hypothèse soutenue est qu'il existe une atténuation (diffusion et absorption) suffisamment différente entre les couches vocales pour être observé.

Le profil d'atténuation des spécimens est analysé et comparé avec chaque groupe de population. Les coefficients d'atténuation relatifs sont divisés par un facteur deux pour tenir compte du parcours à l'aller et au retour des photons dans le tissu.

La Figure 4.5 illustre l'ensemble des étapes accomplies pour extraire les coefficients d'atténuation relatifs des cordes vocales de chaque spécimen. Dans un premier temps, un algorithme automatisé permet d'uniformiser les différentes topologies des cordes vocales. L'algorithme identifie tous les pixels au-dessus de l'épithélium comme nuls. Cette opération est accomplie à l'aide d'un opérateur de gradient : filtre de Sobel dont l'orientation verticale permet de rehausser l'interface air-épithélium.

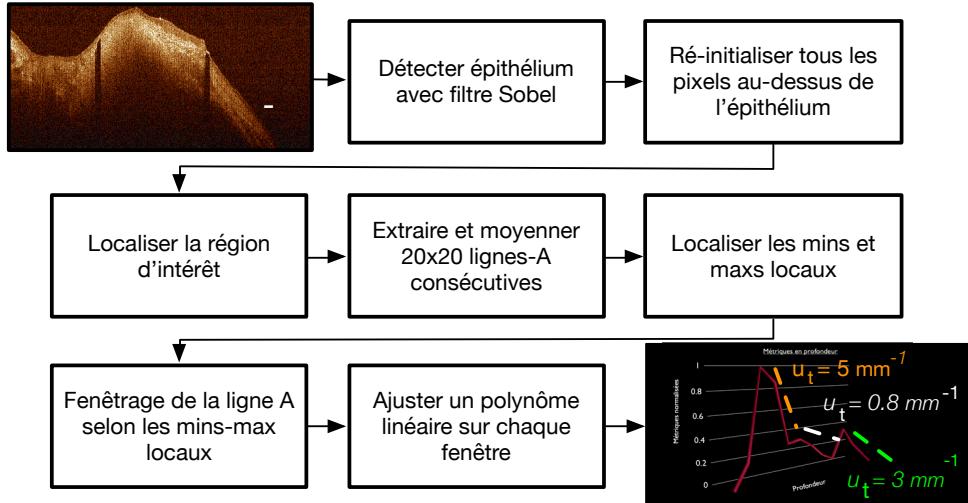


Figure 4.5 Diagramme de flux pour l'extraction des coefficients d'atténuation des cordes vocales.

Ensuite, à partir d'une zone localisée dans la partie centrale de la vraie corde vocale, des lignes-A (20x20 signaux 1D) sont moyennées sur  $125 \mu\text{m} \times 125 \mu\text{m}$  afin d'obtenir une ligne-A avec un meilleur rapport signal sur bruit. Cette ligne-A est considérée comme étant représentative du profil d'atténuation du milieu d'intérêt. Celle-ci est ensuite traitée pour localiser les changements brusques d'atténuation selon les maximums et minimums locaux. Des polynômes linéaires sont ajustés à partir des points retrouvés sur le signal 1D. Les coefficients des polynômes sont ainsi recueillis pour caractériser le profil d'atténuation de la corde vocale.

### 4.3.3 Plateforme logicielle

Bien qu'il existe une application d'acquisition des données, l'application « Vocal fold Analyzer », dédiée au traitement des données brutes, a été développée. Elle est réalisée en *C++* sous l'environnement Qt (Qt Development Framework). Elle a une interface simple et logique pour contrôler les paramètres de visualisation et de traitement d'images. Elle est essentielle à l'analyse des données brutes (normalisation, transformation de Fourier). Les prétraitements et l'évaluation des descripteurs quantitatifs y sont comptabilisés (atténuation, texture). Les données sont représentées sous une plage dynamique de 8 bits en format logarithmique ce qui permet d'identifier l'ensemble des interfaces. Au besoin, les images B mode peuvent être également tronquées pour afficher l'essentiel de la vraie corde vocale.

De plus, la plateforme est flexible et permet l'intégration rapide de fonctionnalités additionnelles demandées par l'équipe de chirurgiens, telle qu'un module des métadonnées qui permet d'associer les détails du contexte : sujet étudié, l'âge et les paramètres d'acquisition dans une base de données. La plateforme permet également de segmenter et visualiser la corde vocale sur différents plans (antérieur-postérieur, supérieur-inférieur). La Figure 4.6 illustre l'interface graphique développée. À la gauche, les paramètres de visualisation et de traitement d'images sont disponibles pour l'usager. Au centre, on retrouve le volume d'acquisition et les descripteurs quantitatifs. Les résultats peuvent être exportés sous plusieurs formats images, vidéo, Excel et texte.

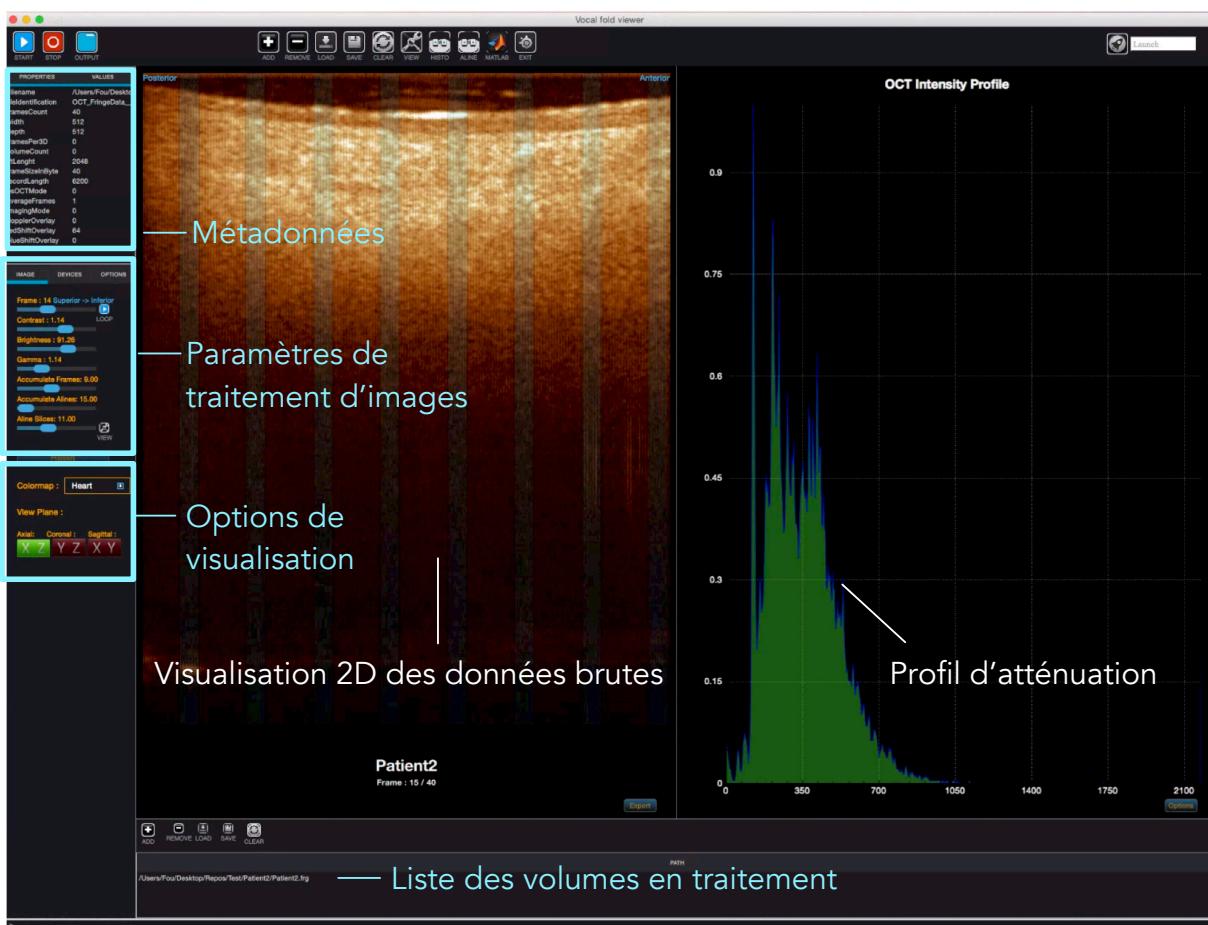


Figure 4.6 Plateforme de traitement d'images et d'analyse quantitative développée pour ce projet.

## 4.4 Résultats

Nous avons recueilli jusqu'ici une centaine de spécimens porcins, 50 spécimens humains adultes et 10 spécimens foetaux. Les nombreux volumes de données acquis permettent d'exposer les similarités et distinctions qualitatives et quantitatives entre chacune des populations étudiées. Les résultats présentés dans cette section sont disposés par groupe de spécimens étudiés. Une analyse qualitative est d'abord présentée, puis suivie d'une analyse quantitative. Deux échantillons représentatifs par groupe sont illustrés. Les coupes OCT sont pairées avec les coupes histologiques correspondantes. L'orientation des images est constante : elles sont présentées avec la zone inférieure (vers les poumons) à gauche et la zone supérieure à droite (vers la cavité buccale) de l'image. Le ventricule se situe toujours à droite de la vraie corde vocale.

### 4.4.1 Analyse qualitative des structures morphologiques

La validation qualitative ex vivo consiste en une appréciation des structures morphologiques des images OCT. L'histologie est l'outil de référence pour une comparaison adéquate des structures anatomiques observées. Le contraste optique de l'épithélium, de la lamina propria, des vaisseaux sanguins et des glandes salivaires est caractérisé. Le contexte ex vivo permet de capturer un large champs de vue étant donné que les contraintes cliniques sont absentes (contraintes temporelles et les manipulations additionnelles). Le balayage s'étend de la partie infraglottique (vers les poumons) à la fausse corde vocale (vers la cavité buccale). Ce balayage contextualise la vraie corde vocale au sein des structures anatomiques avoisinantes. Il permet d'identifier les caractéristiques optiques de la voie aérodigestive. Autrement dit, l'acquisition dresse une carte de géolocalisation optique du larynx.

#### Spécimens foetaux

La Figure 4.7 illustre une section OCT ainsi que l'histologie d'une voie aérodigestive d'un foetus de 34 semaines. Les marques d'encre de Chine (M1-M2) sont visibles sur les deux modalités et délimitent deux bosses prédominantes, soit respectivement la région de la vraie corde vocale et celle de la fausse corde vocale. Le ventricule sépare ces deux régions. La région de la vraie corde vocale s'étend de la première marque d'encre (M1) au ventricule (V). Cette petite section de la voie aérodigestive mesure 900 µm. En effet, la taille de la vraie corde vocale mesurée chez les spécimens foetaux est de l'ordre du millimètre. La couche épithéliale

(Ep) est extrêmement fine et pratiquement invisible à l'OCT [Fig.4.7a]. Cependant, il est possible d'apprécier l'étendue du contraste existant dans la lamina propria le long de la voie aérodigestive. La fausse corde vocale est la région possédant le plus de variation d'intensité en fonction de la profondeur. Cette région est riche structurellement (plusieurs changements d'indice de réfraction dans le volume). La région de la vraie corde vocale est plutôt uniforme en fonction de la profondeur. Cette région homogène observée en OCT est composée d'un bon nombre de petits noyaux, uniformément distribués, tels qu'illustrés sur la coupe histologique colorée au trichrome [Fig.4.7b]. De plus, l'intensité du bleu à l'histologie semble moins prononcée dans la vraie corde vocale que les régions avoisinantes. Cette observation pourrait s'expliquer par une densité beaucoup moins élevée en collagène chez cette structure encore immature [Sato *et al.* (2001)].

Enfin, la lamina prorpia semble posséder différentes épaisseurs le long de la voie aérodigestive. Moins profonde dans la région infraglottique, celle-ci semble prendre de l'expansion dans la direction supérieure jusqu'à la fausse corde vocale. Les fibres musculaires, visibles en rouge à l'histologie, semblent correspondre à la limite de la profondeur de pénétration des images OCT. Les photons semblent être fortement absorbés dans cette région étant donné la richesse en vaisseaux sanguins dans les muscles.

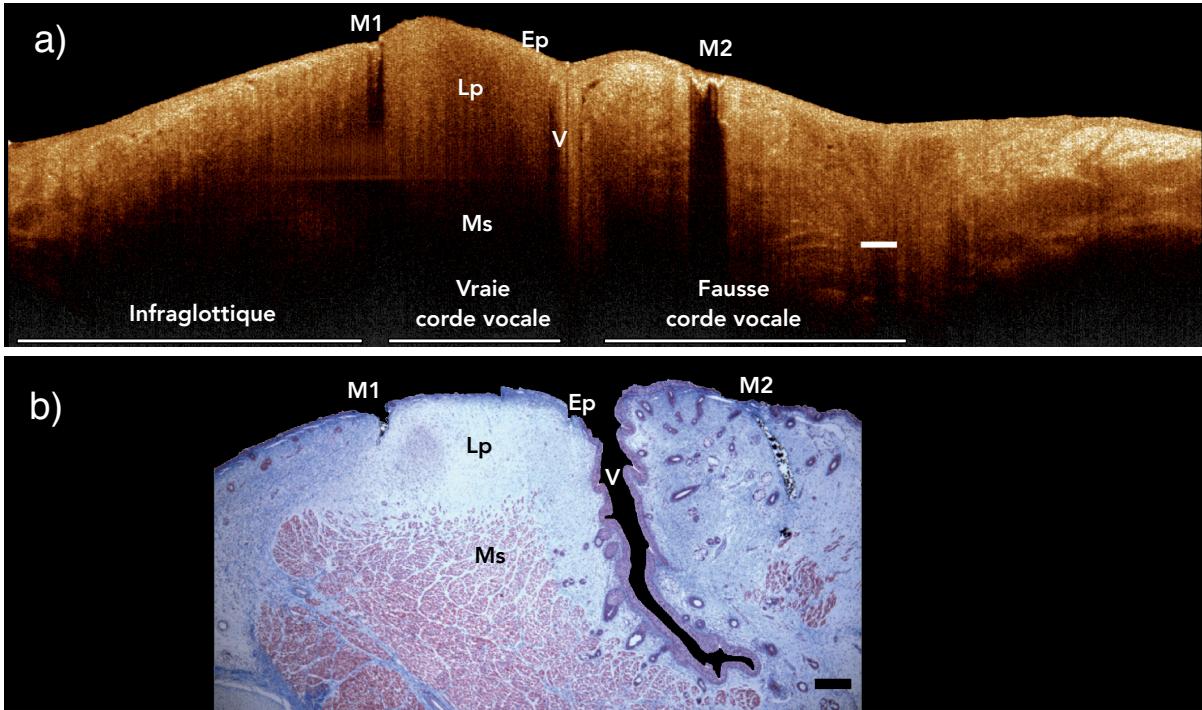


Figure 4.7 Section transverse OCT d'une voie aérodigestive normale (a) et la coupe histologique correspondante (100x coloration trichrome) (b) d'un échantillon foetal. En OCT la région de la vraie corde vocale semble homogène ce qui pourrait s'expliquer par la présence de petits noyaux uniformément distribués dans cette région, visibles à l'histologie. Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; Ms : muscle ; Ms : Muscle vocal ; V : ventricule ; M1-M2 : marqueur ; - Échelle : 200 µm en (a) et (b).

### Spécimens porcins

La Figure 4.8 illustre une section OCT de la voie aérodigestive d'un modèle porcin ainsi que la coupe histologique correspondante. À partir de l'image OCT, la délinéation entre la couche épithéliale et la lamina propria (Lp) est évidente. La fine couche épithéliale (Ep), visible sur l'ensemble de la voie aérodigestive, est évaluée à  $45 \mu\text{m} \pm 18 \mu\text{m}$  d'épaisseur. Elle est d'épaisseur minimum dans la région de la vraie corde vocale, plus spécifiquement entre la tâche d'encre (M) et le ventricule (V). Cette région d'intérêt représente la zone de contact avec l'autre corde vocale durant la phonation. Sous la membrane basale (Mb), l'intensité est visiblement accentuée comparativement à la lamina propria des structures voisines (région infraglottique et le ventricule). De plus, le signal issu de la vraie corde vocale est structuellement plus riche, avec des variations d'intensité qui pourraient être une indication de

la complexification des structures de la matrice extracellulaire. D'ailleurs, une région hypodiffusante (H) apparaît chez un bon nombre de spécimens porcin dans la partie supérieure de la lamina propria, tout près du ventricule. Toutefois, la raison de cette manifestation physiologique demeure inexpliquée. Inférieurement à la vraie corde vocale, dans la région sous-glottique, un bon nombre de canaux (C) et de glandes salivaires (G) sont visibles, utiles pour la lubrification de la voie aérodigestive [Jeffery (1983)]. Contrairement, aux deux autres groupes étudiés (foetus et humain) la pénétration des photons chez les spécimens porcins peut parfois s'étendre au-delà de la lamina propria. Elle arrive dans certains cas à imager une bonne partie du muscle vocal (Ms), comme illustré ici sur l'image OCT [Fig.4.8a]. L'histologie [Fig.4.8b] illustre les petites fibres du muscle vocal, largement espacées chez le modèle porcin, ce qui pourrait expliquer le taux de pénétration accentué dans cette région.

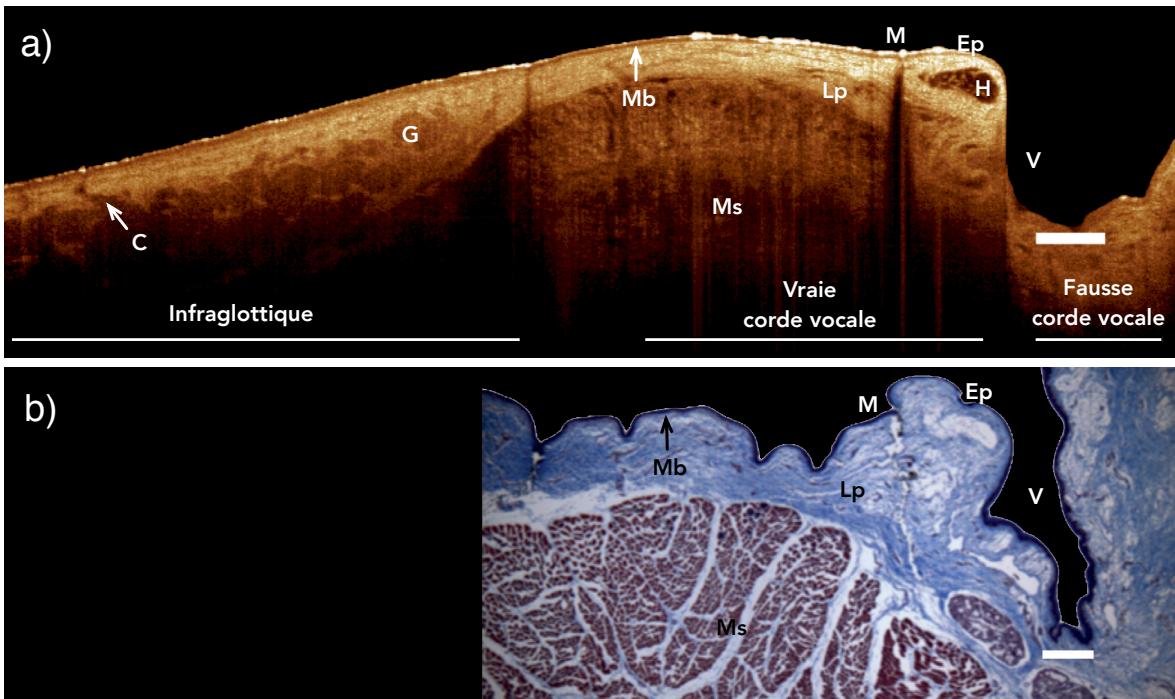


Figure 4.8 Section transverse OCT d'une voie aérodigestive normale (a) et la coupe histologique correspondante (100x coloration trichrome) (b) d'un échantillon porcin. L'intensité dans la lamina propria est accentuée dans la région de la vraie corde vocale. La région infraglottique est riche en canaux et glandes salivaires pour la lubrification du larynx. Ep : épithélium ; C : canal ; H : région hypodiffusante ; Lp : lamina propria ; G : structure glandulaire ; M : marqueur ; Mb : membrane basale ; Ms : muscle vocal ; V : ventricule ; - Échelle : 200 µm en (a) et (b).

## Spécimens adultes

La Figure 4.9 montre une représentation typique d'une voie aérodigestive normale d'un adulte cadavérique. La coupe prise le long de la partie centrale de la corde vocale s'étend de la partie infraglottique à la région de la fausse corde vocale. La première couche est représentée par l'épithélium (Ep) clairement différenciable de la lamina propria (Lp). L'épaisseur de la couche épithéliale le long de la voie aérodigestive n'est pas uniforme. Une couche épithéliale de l'ordre de 75 à 120 microns est visible dans la région infraglottique. Graduellement, la couche épithéliale devient plus fine, de l'ordre de 40 à 75 microns, sous la vraie corde vocale. Cette transition graduelle pourrait être attribuée aux types de cellules épithéliales qui tapissent la voie aérodigestive. Quelques études [Gray (2000); Lungova *et al.* (2015)] mentionnent la présence d'une fine couche épithéliale de cellules stratifiées (Ss) recouvrant la vraie corde vocale afin de répondre de façon optimale au stress mécanique encouru lors de la phonation. Inférieurement et supérieurement à la vraie corde vocale, des cellules ciliées pseudostratifiées (Ps) recouvrent la voie aérodigestive. Ce changement d'épaisseur est visible aussi bien sur l'image OCT [Fig.4.9a] qu'à l'histologie [Fig.4.9b].

La lamina propria superficielle, tout juste sous l'épithélium, est toujours diffusante (brillante), peu importe sa localisation sur voie aérodigestive. Cette région est caractérisée par une composition riche en eau, glycoprotéines, mucopolysaccharides ainsi que de fibres de collagène très espacées. Le niveau d'intensité observé dans cette région pourrait s'expliquer par ces nombreux diffuseurs relativement dispersés [Hammond *et al.* (1997)].

Dans la région infraglottique, la lamina propria possède un grand nombre de glandes séromuqueuses (glandes salivaires). Ces glandes sont très peu diffusantes et sont réparties à différents endroits dans la région infraglottique. Quelques glandes sont également visibles dans la fausse corde vocale. Le rôle de ces glandes est principalement de lubrifier les vraies cordes et de permettre une vibration optimale [Kutta *et al.* (2002)]. Elles ont également le rôle de protéger la surface d'invasion pathogène [Kutta *et al.* (2002)]. La région de la vraie corde vocale est dépourvue de toutes structures glandulaires. Le signal OCT est relativement homogène et décroît jusqu'au muscle vocal (Ms). Bien que l'intensité décroît constamment sous la région de la vraie corde vocale, il est possible de distinguer des niveaux d'intensité entre la partie supérieure et inférieure de la lamina propria. Cette variation d'intensité graduelle pourrait être un indicateur de la composition de la matrice extracellulaire. Les travaux antérieurs [Hirano (1981); Hirano K.S. (1983)] soulignent l'accroissement de la densité du collagène dans les zones plus profondes de la lamina propria. Cependant, tout comme dans le cas des spécimens

foetaux, la structure du muscle vocal n'est pas visible à l'OCT. La position du muscle vocal semble correspondre à la limite du signal utile en profondeur de la section transversale en OCT.

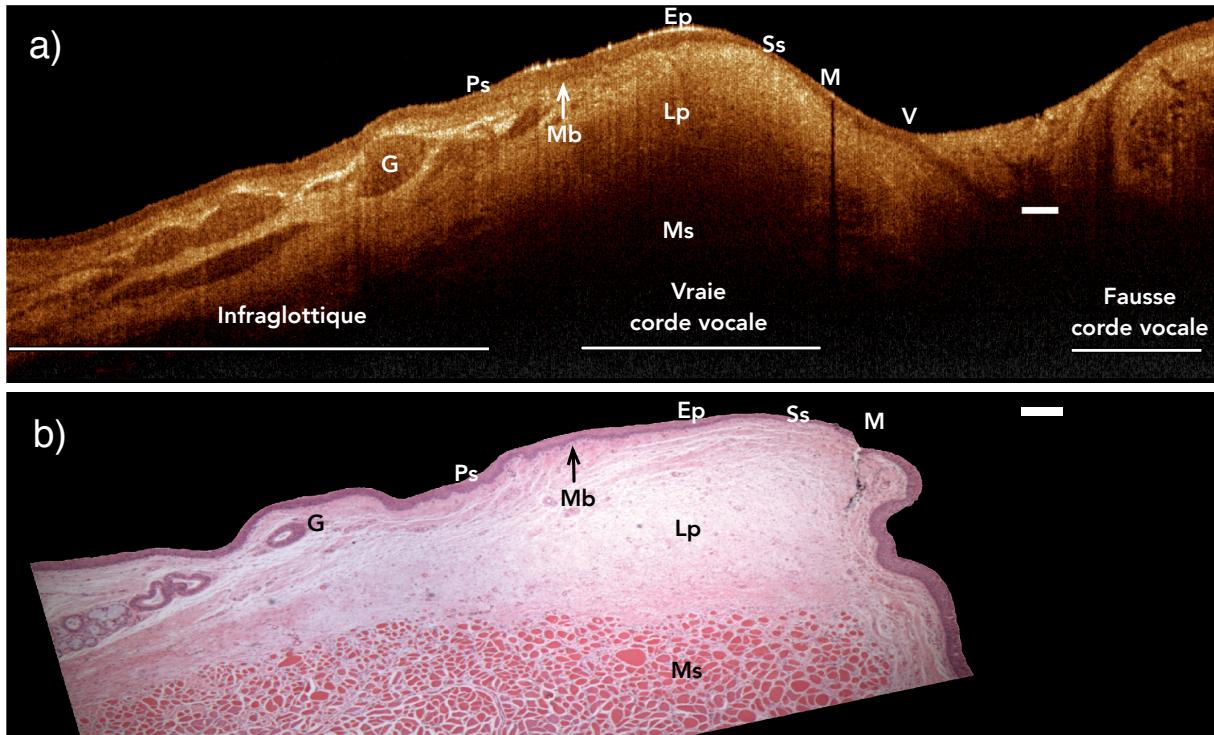


Figure 4.9 Section OCT d'une voie aérodigestive normale (a) et coupe histologique correspondante (b - 100x, coloration H&E) d'un échantillon cadavérique adulte. Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; Ms : muscle ; G : structure glandulaire ; Mb : membrane basale ; Ps : épithélium pseudostratifié ; Ss : épithélium stratifié ; Ms : Muscle vocal ; V : ventricule ; M : marqueur ; - Échelle : 200 µm en (a) et (b).

### Analyse comparative morphologique

Une segmentation manuelle sert d'approche initiale pour quantifier les épaisseurs des couches vocales observées à l'OCT. L'épaisseur moyenne et l'écart type de chaque couche des spécimens étudiés sont comptabilisés à la Figure 4.10. Les calculs des dimensions sont basés selon un indice de réfraction ajusté [Ding *et al.* (2006)].

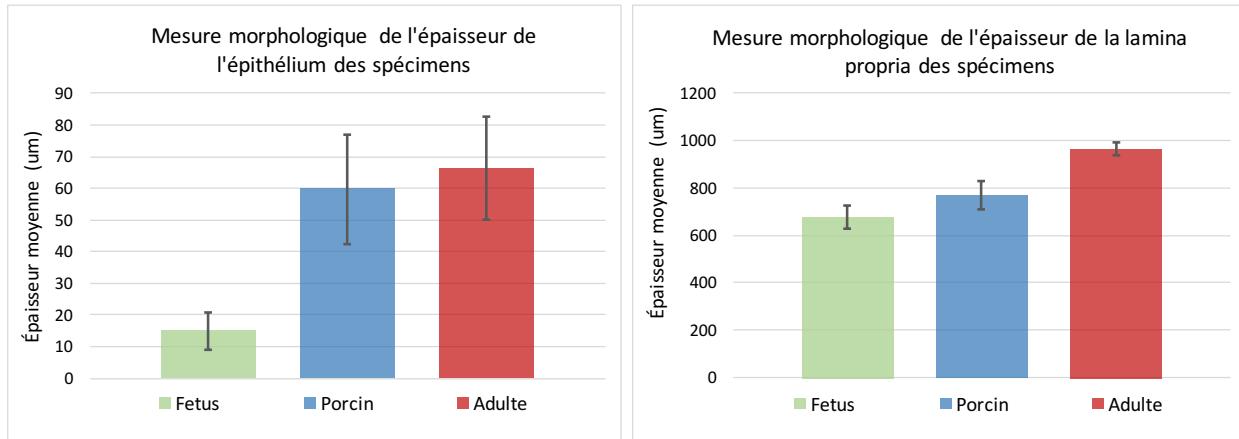


Figure 4.10 Mesure morphologique de l'épaisseur de l'épithélium et de la lamina propria selon les spécimens analysés en OCT.

L'épithélium joue un rôle protecteur pour les organes. Il consiste en un revêtement face au milieu externe. L'épaisseur moyenne de l'épithélium et l'écart type de la distribution sont minimums chez les spécimens foetaux, ce qui peut sembler normal étant donné que la structure n'a pas encore subi de stress phonatoire. La couche épithéliale chez les spécimens porcins et adultes fait en moyenne 59.8 microns et 66,5 microns respectivement. Tous deux possèdent un écart type plus élevé que chez le foetus. Bien que cette moyenne est pratiquement équivalente pour cette région, à l'extérieur de la vraie corde vocale (région infraglottique et la fausse corde vocale) l'épaisseur de l'épithélium est beaucoup plus élevée chez les spécimens humains adultes.

Les spécimens foetaux, porcins et adultes ont respectivement une épaisseur moyenne pour la lamina propria de 678, 769 et 964 microns. Les spécimens adultes ont l'écart type le plus faible. La maturité complète de la lamina propria à l'âge adulte pourrait expliquer ces différences morphométriques.

Cependant, dans la présente étude, les spécimens ne sont pas séparés en fonction du sexe (homme, femme) et l'âge. Ces facteurs peuvent contribuer à augmenter la variabilité intra spécimen. D'autant plus, plusieurs études corroborent un changement anatomique dans les cordes vocales en fonction de l'âge [Gray *et al.* (1994); Sato et Hirano (1997)].

#### 4.4.2 Différenciation quantitative des couches vocales

L'imagerie OCT permet d'imager suffisamment profondément dans la corde vocale pour visualiser la lamina propria. Il est évident, à partir de ces images OCT, que les structures infraglottiques et supraglottiques sont structurellement différentes de celles de la région de la vraie corde vocale. Ces différences apparaissent d'un point de morphologique et au niveau du contraste dans les images. Bien que la lamina propria de la vraie corde vocale soit plus homogène que les structures avoisinantes pour l'ensemble des spécimens, elle présente tout de même un niveau d'intensité différent par groupe de population. L'identification et la quantification de ces changements est une avenue intéressante pour sa caractérisation. Dans les sections ci-dessous, les coefficients relatifs d'atténuation sont analysés pour chaque groupe de spécimens.

#### Échantillons foetaux

La Figure 4.11 illustre une coupe OCT et l'histologie correspondante d'un foetus de 36 semaines. L'image OCT permet d'identifier, sur la vraie corde vocale, entre la tache d'encre (M1) et le ventricule (V), une sélection typique de la région d'intérêt où l'analyse des coefficients relatifs d'atténuation est effectuée. Cette région est comprise entre les flèches bleues [Fig.4.11a]. Elle est débute à 100 microns à partir du ventricule pour l'ensemble des spécimens foetaux. La coupe histologique correspondante [Fig.4.11b], colorée au Trichrome de Masson, démontre, sous la région sélectionnée, une zone bleutée uniforme avec de nombreux noyaux. Tout comme le spécimen foetal présenté précédemment, la lamina propria (Lp) de cette vraie corde vocale présente une structure monocouche.

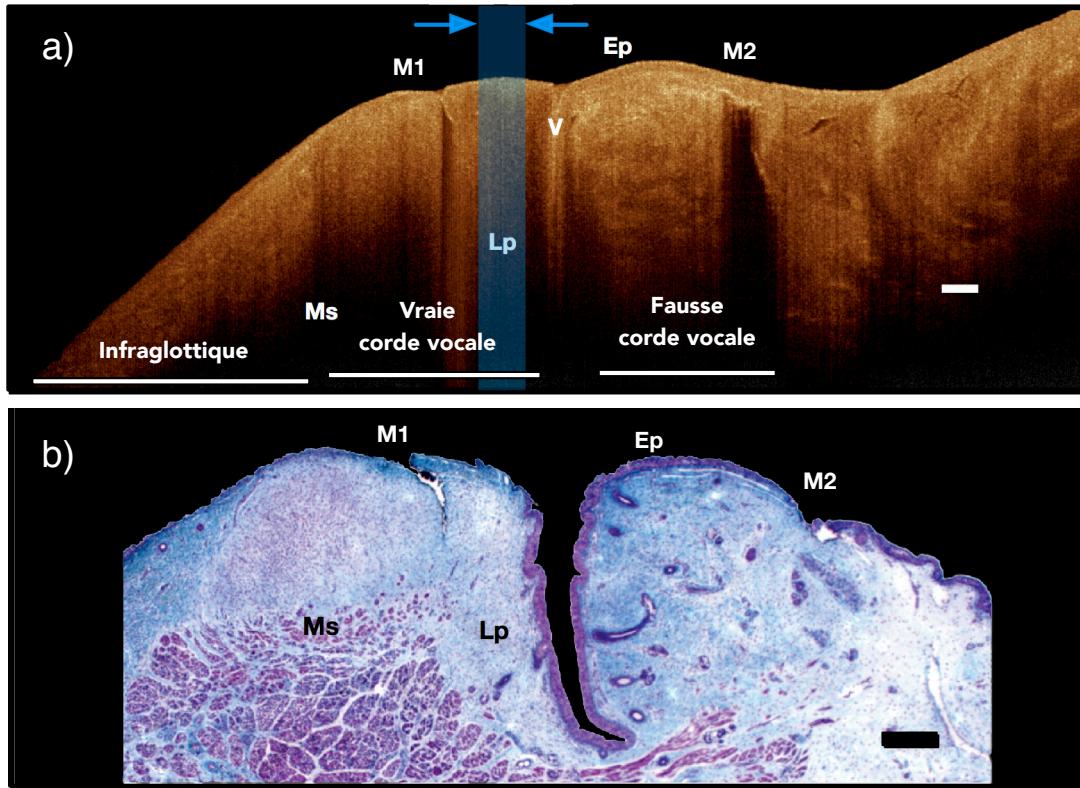


Figure 4.11 Région d'intérêt de la vraie corde vocale des spécimens foetaux. Coupe OCT d'un foetus (a) et la coupe histologique correspondante (100x coloration trichrome). Les flèches bleues indiquent une sélection typique de la région d'intérêt où une analyse des coefficients relatifs d'atténuation est effectuée. Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; Ms : muscle vocal ; V : ventricule ; M1-M2 : marqueur ; - Échelle : 200  $\mu\text{m}$  en (a) et (b).

L'analyse des profils d'intensité normalisés recueillis sur les spécimens foetaux est illustrée à la Figure 4.12. L'intensité est normalisée pour permettre une comparaison adéquate. Les courbes des spécimens foetaux sont très similaires entre elles. Elles n'indiquent aucun changement brusque d'intensité en profondeur dans la lamina propria. À partir du point maximum qui correspond à l'interface air-épithélium, les courbes ont une décroissance monotone [Fig. 4.12a]. Cette décroissance peut être exprimée par une droite à l'intérieur d'un segment S1 (encadré mauve), tel qu'illustré sur la Figure 4.12b. La pente négative de cette droite correspond au coefficient relatif d'atténuation (divisé par deux selon la loi de Beer Lambert pour le trajet aller-retour de la lumière). À partir de cette analyse paramétrique, le coefficient d'atténuation de la lamina propria, des spécimens foetaux pour  $\lambda = 1300 \mu\text{m}$ , est en moyenne de  $0.4 \text{ mm}^{-1}$  avec un écart type de 0.08. Le coefficient d'atténuation est très similaire pour l'ensemble des spécimens foetaux analysés.

À partir de 800 microns de profondeur c'est la diffusion multiple qui devient dominante. L'en-cadré vert indique sur le graphique de l'extraction du coefficients d'atténuation [Fig.4.12b], cette région qui est exclue de l'analyse paramétrique. À cet endroit, le signal OCT est considéré comme essentiellement du bruit.

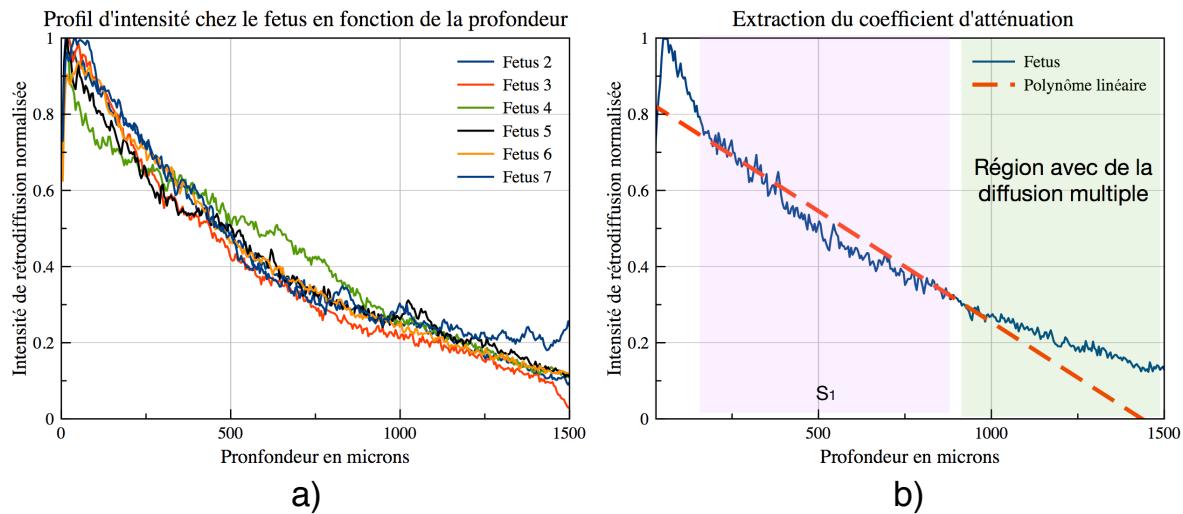


Figure 4.12 Profil d'intensité normalisée en fonction de la profondeur pour les échantillons foetaux (a) et calcul du coefficient de régression linéaire associé au coefficient relatif d'atténuation (b).

### Échantillons porcins

Chez les spécimens porcins, la région d'analyse des images OCT est illustrée à la Figure 4.13a entre les flèches bleues, tout juste à la droite de la tache d'encre (M). Encore une fois, cette région se situe à l'apex de la vraie corde vocale, à plus d'une centaine de microns du ventricule (V). Cette coupe OCT, illustre la présence de grosses glandes salivaires (G) dans la lamina propria de la région infraglottique. La frontière musculaire, indiqué par la flèche rouge, est visible à l'OCT. Contrairement au spécimen porcin illustré précédemment, ici quelques centaines de microns dans le muscle suffisent pour atténuer complètement la lumière. La coupe histologique de ce spécimen [Fig.4.13b] permet d'apprécier les fibres musculaires densément regroupées qui pourraient contribuer à expliquer l'absence de signal dans cette région. De plus, l'histologie permet d'identifier, à partir d'une coloration au Trichrome de Masson, une région plus dense dans la lamina propria profonde, une indication d'une structure bilaminaire.

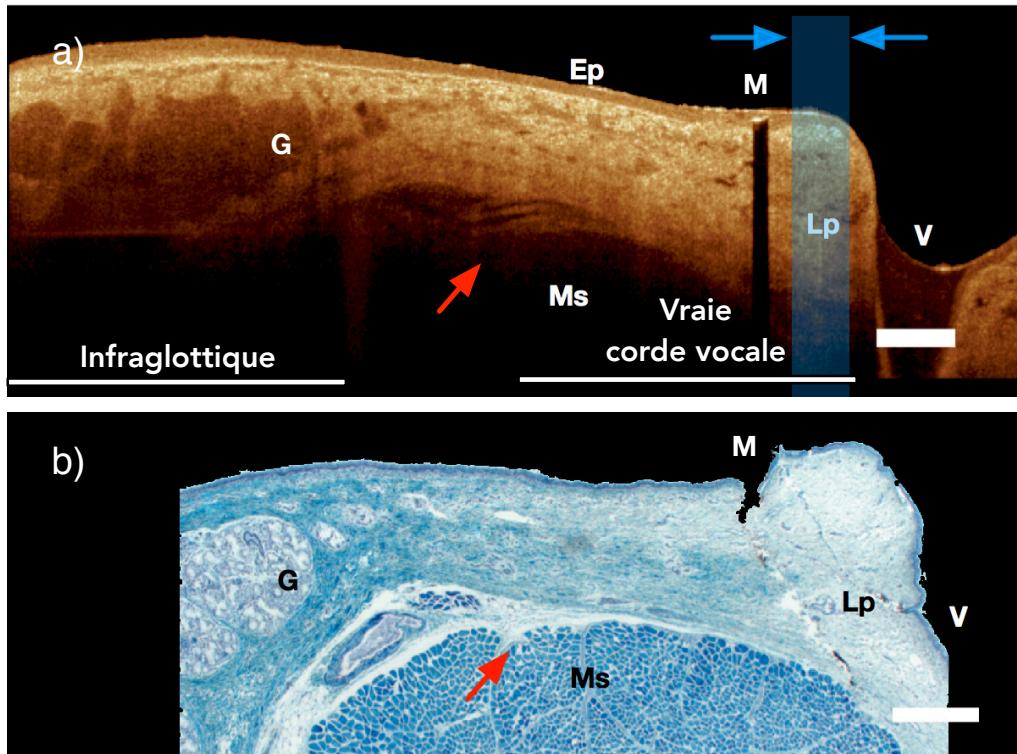


Figure 4.13 Région d'intérêt de la vraie corde vocale des spécimens porcins. Coupe OCT d'un modèle porcin (a) et coupe histologique correspondante (100x coloration trichrome). Les flèches bleues indiquent la région d'analyse paramétrique et la flèche rouge la région musculaire. Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; Ms : muscle vocal ; V : ventricule ; M : marqueur ; - Échelle : 200  $\mu\text{m}$  en (a) et (b).

Les profils d'atténuation pour ce groupe sont illustrés à la Figure 4.14a. Les courbes possèdent plus de variations d'intensité dans la lamina propria que les spécimens foetaux. Le signal fluctue surtout autour d'une intensité moyenne normalisée de 0.8 dans les 250 premiers microns. Deux chutes significatives (points d'inflection) d'intensité forment respectivement les segments S1 et S2, tel qu'illustre sur une représentation typique des spécimens porcins à la Figure 4.14b. La première plage se situe sur le segment S1 de 20 à 400 microns de profondeur et la deuxième plage sur le segment S2 entre 400  $\mu\text{m}$  et 900  $\mu\text{m}$  de profondeur dans la lamina propria. Encore une fois, au-delà de 950 microns apparaît la diffusion multiple qui ne figure pas dans l'extraction des coefficients d'atténuation.

Le coefficient relatif d'atténuation extrait de chacun des segments est en moyenne de  $0.51 \text{ mm}^{-1}$  avec un écart type de 0.25 pour le premier segment, et de  $0.59 \text{ mm}^{-1}$  avec un écart type de 0.13 pour le second segment. L'écart type du premier segment corrobore les observations

visuelles en ce qui a trait à la variabilité intra-spécimen à cette profondeur. Ces coefficients relatifs d'atténuation pourraient être une indication des zones de transition entre la lamina propria superficielle (SLP) et la lamina propria profonde (LPP).

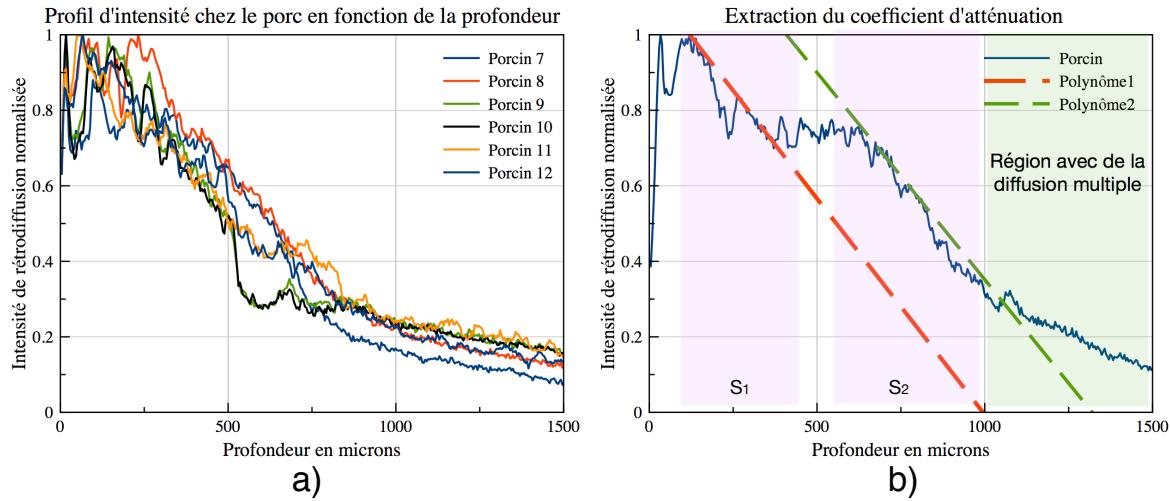


Figure 4.14 Profil d'intensité normalisée en fonction de la profondeur pour les échantillons porcins (a) et ajustement d'un ensemble de droites pour l'extraction des coefficients relatifs d'atténuation (b).

## Adulte

Une section OCT typique d'une corde vocale adulte est illustrée à la Figure 4.15a. La région comprise entre les flèches indique la section d'analyse de ce spécimen. La région débute à quelques centaines de microns ( $\approx 300 \mu\text{m}$ ) du ventricule. Cette zone d'intérêt représente la section en contact des cordes vocales lors de la phonation. À partir de l'image OCT, la délinéation entre la couche épithéliale (Ep) et la lamina propria (Lp) est bien visible, contrairement à l'interface entre la lamina propria et le muscle vocal (Ms). De plus, à l'intérieur de la lamina propria des niveaux d'intensité distinctifs sont perceptibles au sein de la vraie corde vocale. L'évaluation de la coupe histologique permet de distinguer trois couches dans la lamina propria, indiqué par trois niveaux de bleu distinctifs dans la Figure 4.15b.

L'analyse paramétrique des spécimens humains diffère de celle des spécimens foetaux et porcins. Les variations d'intensité sont plus importantes en profondeur dans la corde vocale. Les chutes d'intensité sont visibles sur trois segments en profondeur. Les profils d'atténuation des régions observées et analysées à l'OCT sont illustrés à la Figure 4.16a. Contrairement aux autres spécimens, la corde vocale adulte présente des coefficients relatifs d'atténuation

beaucoup plus prononcés sur les deux premiers segments. Tel qu'illustré à la Figure 4.16b, sur la représentation typique du profil d'atténuation des spécimens humains, trois segments sont localisés dans les plages suivantes : 20-250 µm , 250-400 µm et 500-800 µm de profondeur. De plus, dans cette population, le profil d'atténuation connaît un accroissement en intensité, localisé en profondeur, entre 300 et 500 µm. Les valeurs des coefficients d'atténuation relatifs et leur écart-types respectifs des trois segments sont de  $0.95 \text{ mm}^{-1}$  (écart type de 0.77),  $0.94 \text{ mm}^{-1}$  (écart type de .045) et enfin  $0.53 \text{ mm}^{-1}$  (écart type de 0.08). Bien que les valeurs d'atténuation diffèrent entre spécimens humains, les trois segments sont toujours visibles.

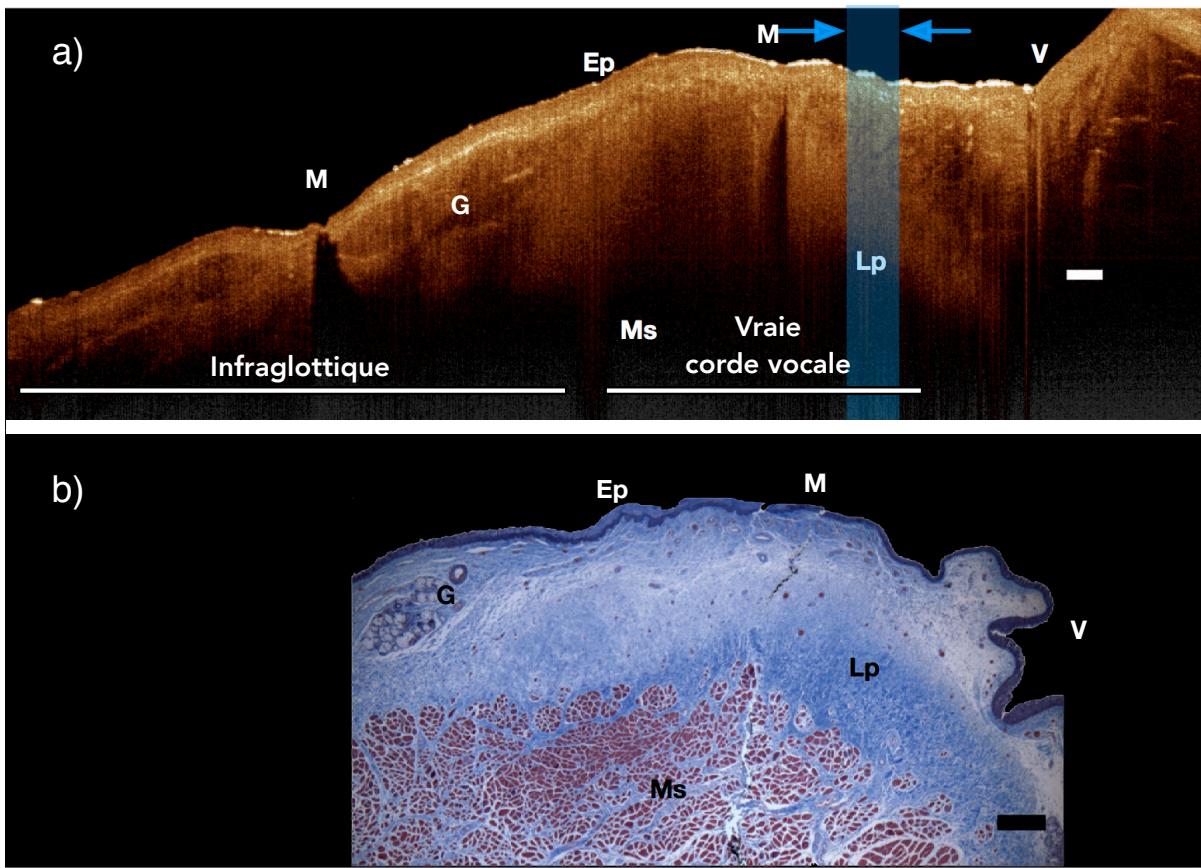


Figure 4.15 Région d'intérêt de la vraie corde vocale d'un spécimen cadavérique adulte. Coupe OCT (a) et coupe histologique correspondante (b - 100x coloration trichrome). Les flèches bleues indiquent la région d'analyse paramétrique. Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; Ms : muscle vocal ; V : ventricule ; M : marqueur ; - Échelle : 200 µm en (a) et (b).

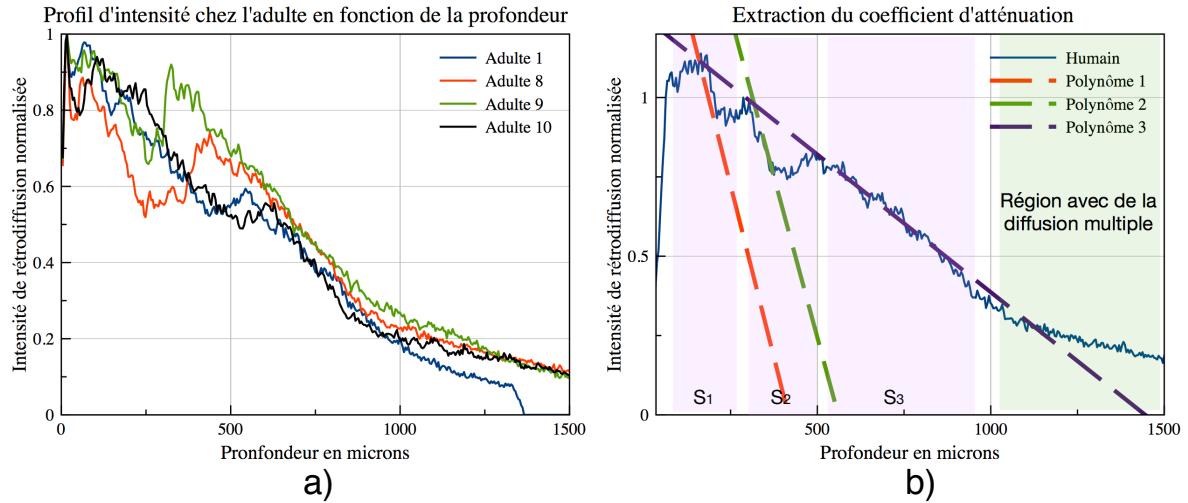


Figure 4.16 Profil d'intensité normalisée en fonction de la profondeur pour les échantillons porcins (a) et ajustement des droites de régression pour l'extraction des coefficients relatifs d'atténuation (b).

Il est intéressant de constater la différente distribution de la rétrodiffusion dans la lamina propria de chacun des spécimens. La plage dynamique occupée et la variation de l'intensité en fonction de la profondeur semblent être spécifiques au groupe de spécimen étudié. Les spécimens foetaux représentent le groupe avec le moins de variabilité intra spécimen.

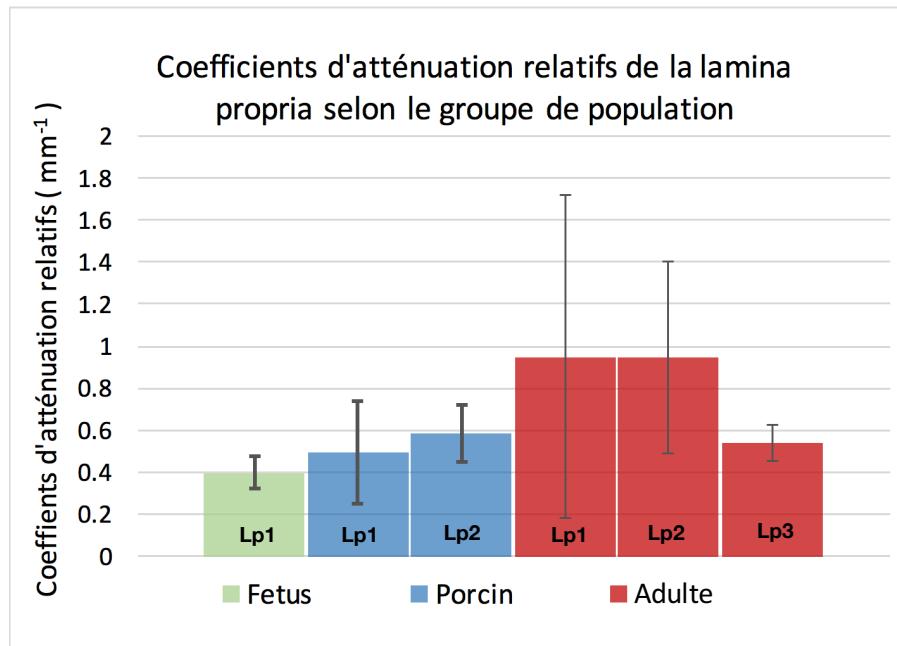


Figure 4.17 Coefficients d'atténuation relatifs pour la lamina propria des spécimens foetaux, porcin et humain. Lp1-3 : Couches de la lamina propria.

La Figure 4.17 illustre les différents coefficients d'atténuations obtenus pour chaque spécimen avec leur écart type respectif. La valeur des coefficients d'atténuation semble augmenter avec la densité de la corde vocale, celle-ci, étant maximale chez les adultes.

De plus, l'écart type des premières couches de la lamina propria (Lp1) chez les porcs et les adultes est toujours plus élevé que pour les couches subséquentes (Lp2-Lp3). Ce phénomène pourrait être s'expliquer par la complexité de la matrice extracellulaire en fonction de la profondeur. L'hypothèse avancée suppose que les couches superficielles de la lamina propria sont composées d'une plus grande hétérogénéité de diffuseurs comparativement aux couches profondes. Par conséquent, les images OCT illustrent une région plus diffusante (brillante) à cette profondeur. Les changements fréquents d'indice de réfraction dans la région supérieure de la lamina propria peuvent contribuer à accentuer le signal en OCT. Ce phénomène n'est pas visible chez le foetus étant donné que la structure est très homogène et encore non différenciée.

Bien que ce mode d'analyse puisse révéler une distinction quantitative entre des couches vocales des spécimens, les coefficients d'atténuation révèlent peu d'information sur la nature moléculaire du changement (densité des fibres de collagène, d'élastine). La prochaine section

tente d'expliquer l'interaction entre la méthode le contraste des images OCT et la densité de collagène dans la corde vocale.

### **Quantification du collagène à partir des images OCT**

Cette expérimentation vise à identifier la relation existante entre les images OCT et la densité des fibres de collagène. Dix larynx de porc, dont l'âge varie de 6 à 8 mois, ont été recueillis à cet effet. Le contenu en collagène de neuf cordes vocales a été altéré avec des injections de collagénase, une enzyme qui dégrade le collagène. Les injections sont réalisées directement dans la lamina propria sur chacune des cordes vocales avec une seringue de 10 µL (jauge 31, Hamilton 7659-01). L'injection consiste en une solution de 5 µL de collagénase à 2mg/ml (Sigma C0130) et de chlorure de calcium ( $CaCl_2$ , Sigma C1016) à 5mmol dans une solution de tampon phosphate salin (PBS, non toxique aux cellules, Lonza 17-516F). Le chlorure de calcium ( $CaCl_2$ ) sert de catalyseur à la collagénase. La validation est réalisée avec sept spécimens contrôles, injectés à leur tour, avec 5 µL de chlorure de calcium à la même concentration (5mmol) dans une solution tapon de phosphate saline, cette fois sans collagénase. La Figure 4.18a illustre un exemple d'une injection exécutée au centre de la corde vocale entre les deux points d'encre. Comparativement au contrôle [Fig.4.18b], celle-ci apparaît plus translucide suite à la dégradation du collagène.

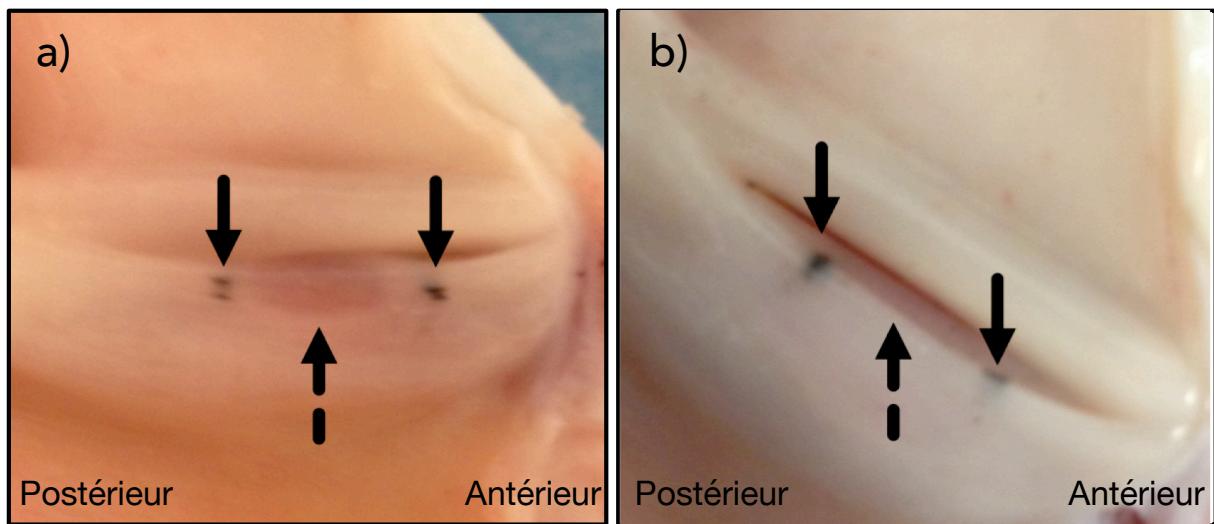


Figure 4.18 Spécimen porcin injecté avec une solution de collagénase dans le centre de la corde vocale (a) et spécimen contrôle injecté avec une solution saline (b). Une région translucide (donc moins diffusante) est visible près de la région injectée à la collagénase entre les deux points d'encre comparativement au contrôle.

Après injection, les spécimens ont été imités à l'OCT à différent laps de temps : immédiatement après l'injection, à 45 min, 90 min et 180 min après injection. Le système utilisé est identique à celui décrit à la section 4.2.2.

Entre les séances d'imagerie, les spécimens ont été enveloppés dans une lingette humide pour éviter la déshydratation des tissus et ont été insérés dans un incubateur à 37 degrés pour activer la dégradation du collagène. Immédiatement après l'acquisition OCT à 180 minutes, les spécimens ont été fixés à la formaline pour 24 heures et enrobés dans la paraffine avant d'être sectionnés à 5 µm d'épaisseur sur un plan axial. Une coloration au Picros Sirius Red est utilisée afin d'identifier et visualiser le contenu en collagène. Un microscope en lumière polarisée (Zeiss-AxioPhot) avec un objectif 5X et une caméra CCD (Optronics MicroFire) a été utilisé pour générer une image en champ large et une image avec une lumière polarisée circulaire. Les images obtenues sont ensuite assemblées avec le logiciel Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Afin de quantifier les effets de la collagénase sur les images OCT, l'intensité en fonction de la profondeur a été analysée avec le logiciel ImageJ [Schneider *et al.* (2012)]. Une région d'intérêt au site d'injection et à l'extérieur du site a été analysée pour les spécimens traités

à la collagénase et pour les spécimens contrôles. Ces régions ont une dimension de 500 µm x 300 µm x 3 mm. Les marques d'encre servent de référence et permettent d'assurer que les mêmes régions sont analysées à différents moments d'acquisition (0 min, 45 min, 90 min 180 min). Une analyse statistique comparative ANOVA a ensuite été réalisée pour illustrer les résultats sur l'ensemble des 180 min.

Une coupe typique histologique le long de la corde vocale d'un spécimen contrôle, visualisée dans le plan axial, est représentée à la Figure 4.19. La commissure (C) de la corde vocale se situe complètement à gauche des images (partie antérieure). La partie postérieure est occupée par le cartilage arytenoïdien (Ca). Les points d'encre sont visibles sur la coupe axiale et délimitent la région centrale de la corde vocale. Cette région d'intérêt, indiqué par l'encadré en pointillé, est illustrée à la Figure 4.19b. La coloration au Picro Sirius Red permet de révéler au microscope en champ large [4.19b] de longs filaments de collagène (en rouge) orientés le long de l'axe antérieur-postérieur. Tout juste sous la couche épithéliale (Ep), indiquée en jaune [Fig.4.19b], on retrouve une région dense en collagène d'environ 50 µm d'épaisseur. Ensuite, sur une profondeur de 350 µm, les fibres de collagène sont plus espacées avant d'être à nouveau densément colocalisées dans la région inférieure de la lamina propria (Lp), près du muscle vocal (Ms). Sous la lumière polarisée, le contraste des régions riches en collagène est marqué par les régions fortement teintées de jaune. On remarque plus clairement dans la partie centrale [Fig.4.19d] deux densités de collagène distinctes, indiquées ici par les régions R1 et R2.

La Figure 4.20 représente une coupe histologique typique d'un spécimen après injection de la collagénase (après incubation de 180 minutes). La région centrale encadrée de la coupe [Fig.4.21b] montre l'épithélium, la lamina propria et le muscle dans le plan axial (antérieur-postérieur) de la corde vocale. Contrairement aux spécimens contrôles, la région immédiatement inférieure à l'épithélium est beaucoup moins dense. La lamina propria semble plus uniforme. Les spécimens injectés à la collagénase ne présentent plus une distinction entre la partie supérieure et inférieure de la lamina propria. Les structures filamenteuses de collagène sont plus dispersées. L'acquisition sous la lumière polarisée [Fig.4.21b] indique pratiquement une absence de contraste dans la région centrale de la corde vocale, ce qui suggère une perte significative de collagène dans le milieu. Une seule région à intensité uniforme est visible : R1.

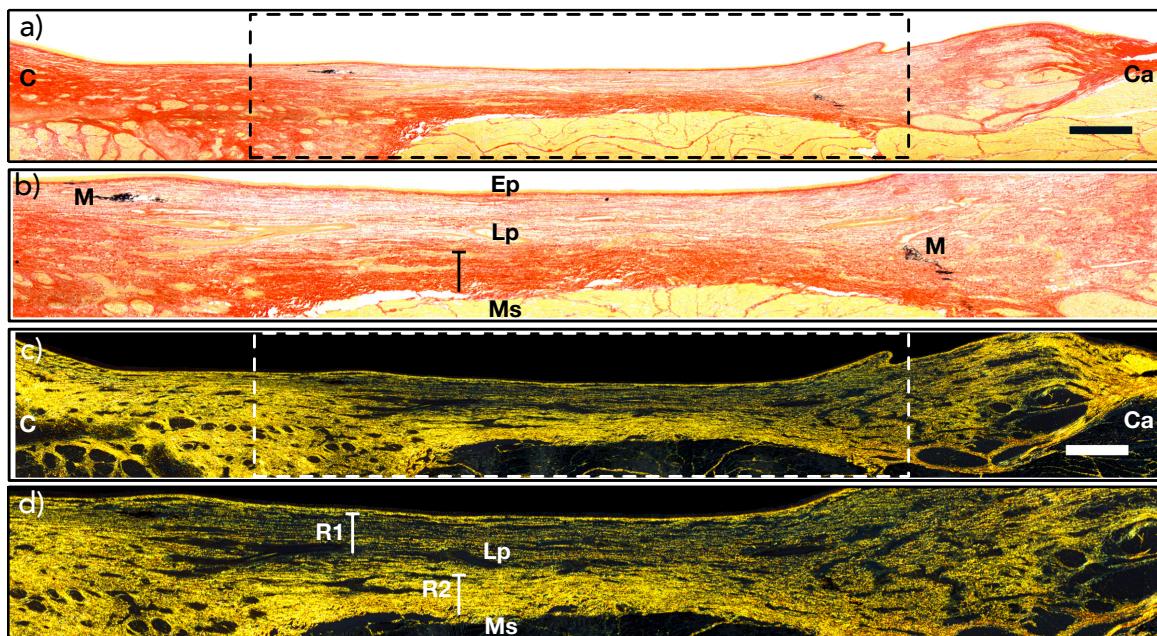


Figure 4.19 Coupe histologique colorée au Picro Sirus Red d'un spécimen porcin contrôle (a) et la région centrale correspondante (b) capturée en champ large et en lumière polarisée au microscope (c-d) (Zeiss-AxioPhot, 5X) afin de rehausser le contraste du collagène présent dans cette région. C : commissure antérieure ; Ca : cartilage arythioïde ; Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; Ms : muscle vocal ; M : marqueur ; - Échelle : 500 µm en (a) et (c).

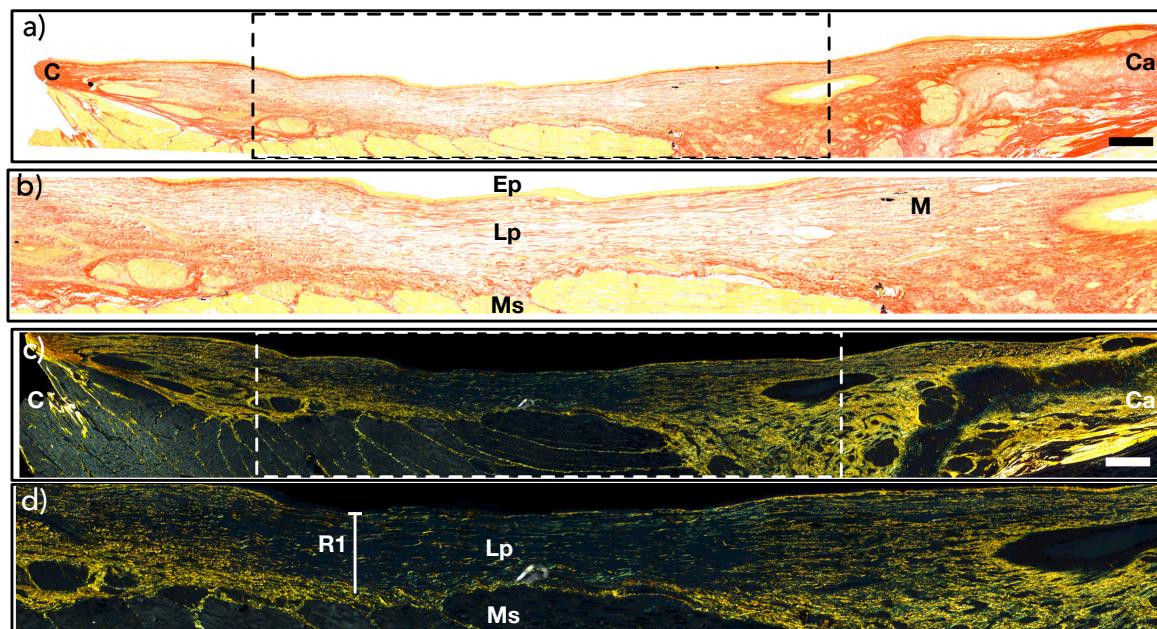


Figure 4.20 Coupe histologique colorée au Picro Sirus Red d'un spécimen porcin injecté à la collagénase (a) et la région centrale correspondante (b) capturée en champ large et en lumière polarisée au microscope (c-d) (Zeiss-AxioPhot, 5X) afin de rehausser le contraste du collagène présent dans cette région. C : commissure antérieure ; Ca : cartilage arythioïde ; Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; Ms : muscle vocal ; M : marqueur ; - Échelle : 500 µm en (a) et (c).

Les images OCT à la Figure 4.21 indiquent côté à côté, un spécimen injecté avec de la collagénase et un spécimen contrôle typique. Les changements subis par la corde vocale, suite à l'injection de la collagénase (colonne de gauche) à différents intervalles de temps sont présentées. Sur les deux spécimens, après l'injection, un renflement est visible comparativement à l'acquisition pré-injection dans la lamina propria. Les marques d'encre visibles sur les deux spécimens assurent que les données sont acquises et analysées dans la même région. À 180 minutes après l'injection de collagénase, il est possible d'identifier une information structurelle additionnelle dans les images OCT. Le spécimen injecté à la collagénase présente graduellement un niveau d'intensité plus élevé dans le muscle vocal (partie inférieure) jusqu'à 180 min après injection. L'injection saline ne semble pas modifier l'intensité en profondeur dans les images OCT du spécimen contrôle.

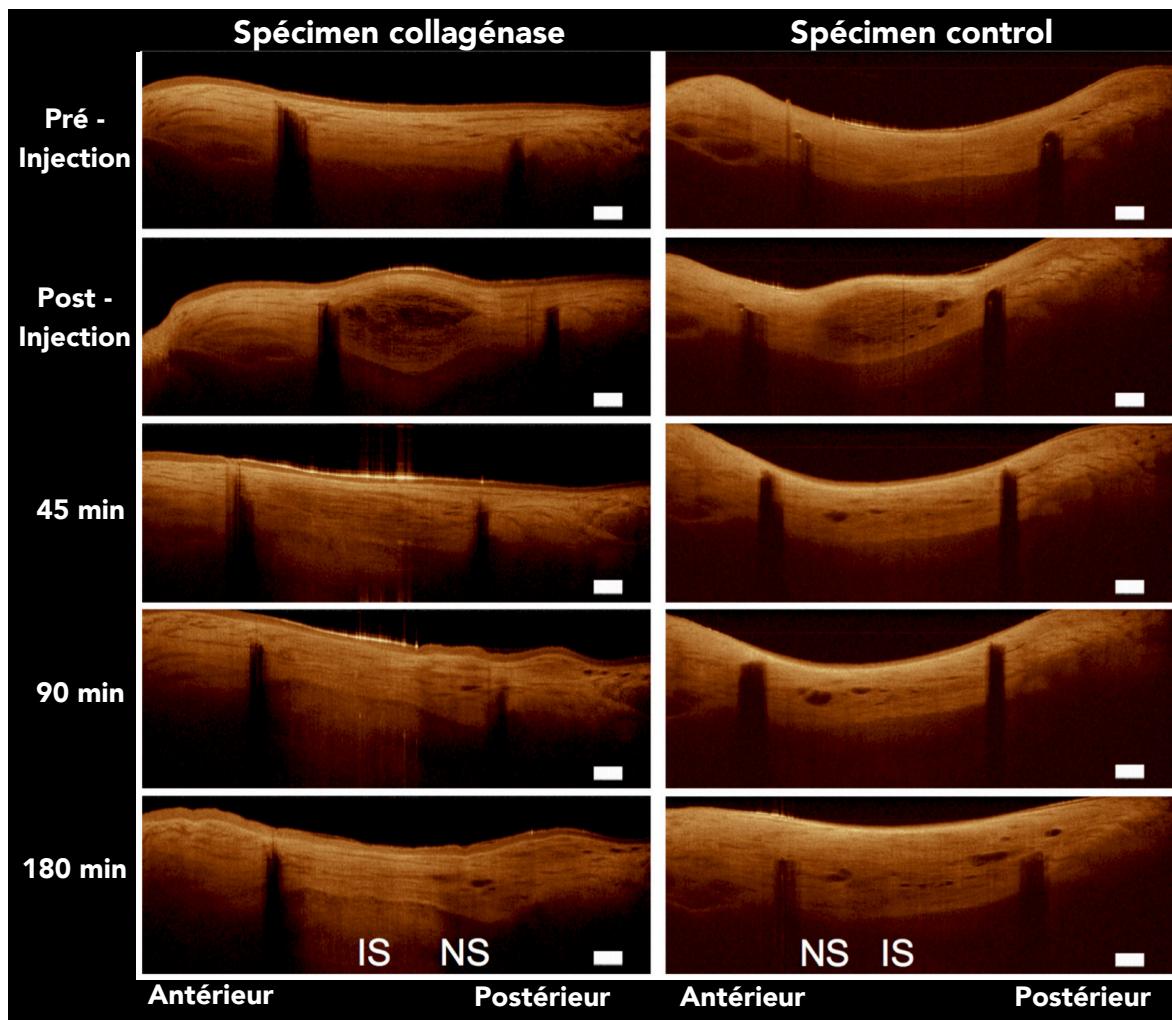


Figure 4.21 Images OCT en fonction du temps pour les spécimens traités à la collagénase (colonne de gauche) et les spécimens contrôles injectés avec une injection saline (colonne de droite).

La Figure 4.22a illustre que tous les spécimens injectés à la collagénase présente une augmentation du signal en fonction de la profondeur, contrairement aux spécimens contrôles. L’analyse statistique illustrée la Figure 4.22b révèle, chez les spécimens traités à la collagénase, que l’intensité est significativement augmentée à l’endroit de l’injection (IS) comparativement à la zone sans injection (NS) avec une valeur  $p < 0.0001$ . Cette observation n’est pas présente dans les images OCT du contrôle. L’augmentation du niveau d’intensité en fonction du temps

n'est pas significative ( $p = 0.3852$ ) dans la région d'intérêt des contrôles et aucune différence n'est remarquée entre le site d'injection de la solution saline et la région non injectée du contrôle ( $p=0.7644$ ).

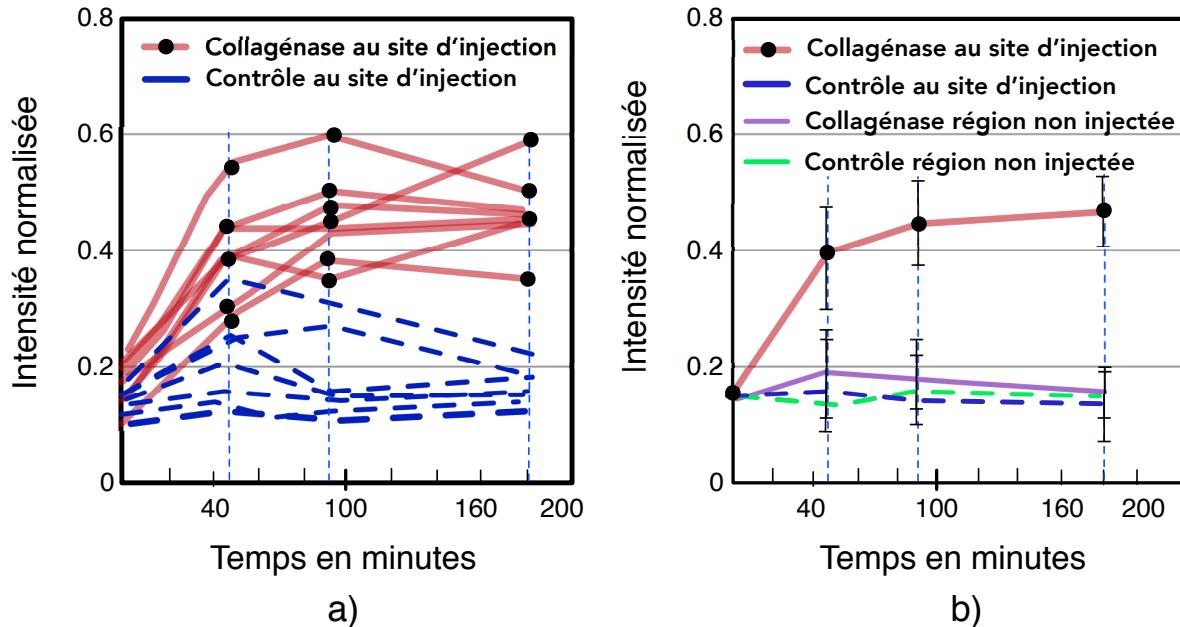


Figure 4.22 Intensité normalisée en fonction du temps pour les spécimens traités à la collagénase et les spécimens contrôles injectés avec une injection saline. L'intensité dans la lamina propria est significativement plus élevée chez les spécimens injectés à la collagénase (a). Les sites d'injection avec la collagénase sont significativement différents des sites sans injection (b) contrairement au contrôle.

L'expérience permet d'élucider en partie l'effet du collagène sur le contraste des images OCT. Lorsque la densité de celle-ci change, les images OCT sont également affectées. Ayant moins de diffuseurs sur son passage, la lumière peut potentiellement atteindre des structures anatomiques localisées plus profondément.

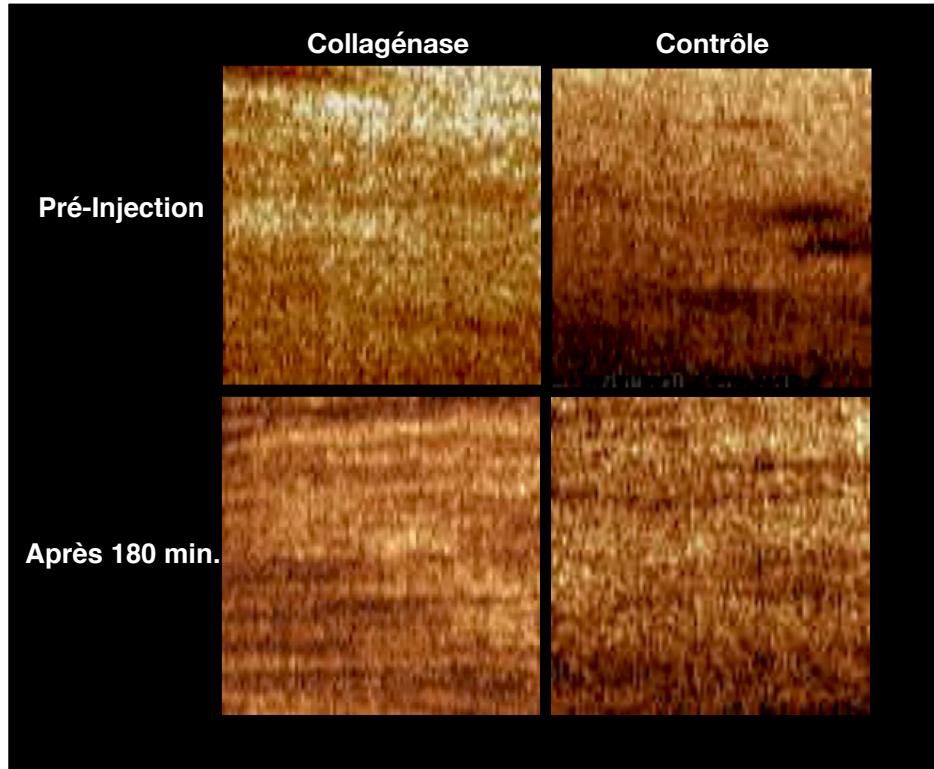


Figure 4.23 Coupe transverse OCT de la lamina propria de spécimen pré-injection et post-injection après 180 minutes d’incubation d’un spécimen traité à la collagénase et d’un spécimen contrôle. Des structures horizontales dans la lamina propria apparaissent sur les spécimens traités avec la collagénase.

La Figure 4.23 illustre une coupe transverse OCT de la lamina propria pré et post-injection (180 minutes) d’un spécimen avec et sans collagénase (contrôle). Des structures horizontales apparaissent après 180 d’incubation sur les spécimens injectés à la collagénase.

Afin de confirmer l’apparition de structures orientées horizontalement, une analyse de la texture a été réalisée sur l’ensemble des spécimens. Le contraste dans les images OCT a été évalué dans une direction perpendiculaire à l’orientation des fibres de collagène dans la corde vocale. Tel que décrit plus tôt, le contraste représente une valeur métrique de la variation locale des niveaux de gris et peut être comptabilisé dans la lamina propria selon

$$\text{Contraste} = \sum_{i=0}^{L-1} \sum_{j=0}^{L-1} |i - j|^2 [s_\theta(i, j | d)]. \quad (4.1)$$

La Figure 4.24 illustre les résultats de l'analyse de texture obtenus pour le contraste. La valeur du contraste de tous les spécimens injectés à la collagénase est supérieure après 180 minutes suivant l'injection, ce qui n'est pas le cas pour les contrôles. Le changement relatif du contraste par rapport au contrôle peut pratiquement doubler. [Fig.4.24b].

L'apparition de ces lignes horizontales pourrait symboliser la présence de grosses fibres de collagènes encore non dégradées par la collagénase. Une concentration moins élevée en collagène affecte le passage de la lumière en homogénéisant l'indice de refraction, ce qui diminue le coefficient de diffusion, et, en une moins grande mesure, le coefficient d'absorption.

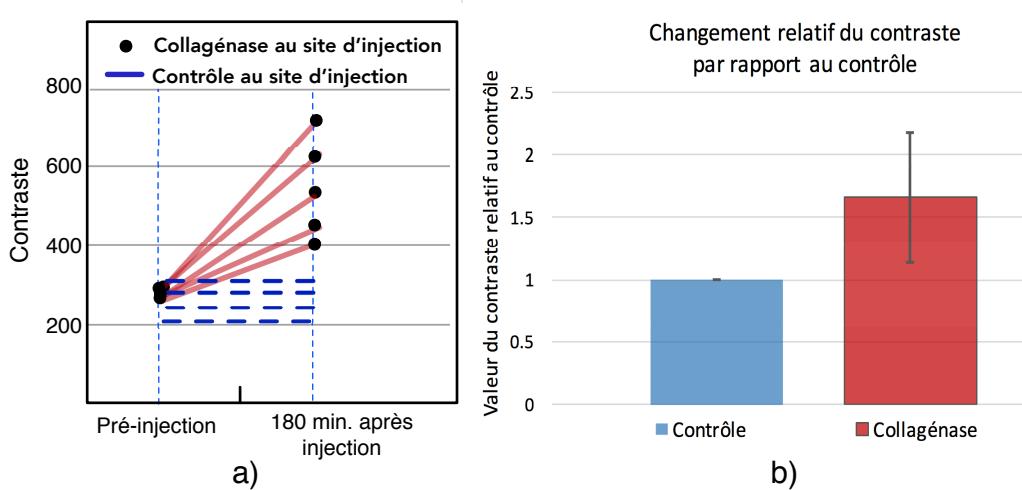


Figure 4.24 Évaluation du contraste dans la direction perpendiculaire aux fibres de collagène. Le contraste dans les images OCT augmente après l'injection de la collagénase (a). La valeur peut pratiquement doubler par rapport aux spécimens contrôle (b).

Bien que les images histologiques Picro Sirus Red permettent d'apprécier la présence de collagène, elles ne permettent pas différencier le type de collagène impliqué. Une analyse immunoohistochimique permettrait d'identifier plus finement la relation entre le contraste des images OCT et le type de collagène dans la corde vocale. Le collagène de type I est principalement retrouvé dans la lamina propria supérieure et inférieure tandis que le collagène de type III est exclusivement dans la partie inférieure de la lamina propria [Tateya *et al.* (2006)]. De plus, après 180 minutes, il semble que la dégradation du collagène n'ait pas été complétée. Il aurait été intéressant de visualiser une corde vocale sans la présence de collagène. D'autres molécules, présentes dans la matrice extracellulaire, produisent du signal en OCT. Il serait intéressant d'établir une étude similaire pour la présence d'élastine et d'acide hyaluronique.

#### 4.5 Discussion

Bien que l'histologie soit la norme pour évaluer les structures de la corde vocale, en pédiatrie les spécimens sont rares et ceux disponibles peuvent souffrir d'artéfacts liés à une intubation ou une fixation prolongée. La conception d'une solution alternative pour imager les cordes vocales pédiatriques est essentielle pour contribuer à améliorer les traitements de cette population. Dans le cadre de ce chapitre, nous avons évalué le potentiel de la tomographie par cohérence optique pour imager les cordes vocales. L'objectif consistait à caractériser les changements dans le statut de la lamina propria. Trois spécimens représentant chacun un état discret de l'évolution de la corde vocale ont été analysés. Le foetus pour une représentation monocouche, le modèle porcin pour une représentation bilaminaire et enfin une corde vocale adulte pour représenter la lamina propria à maturité avec trois couches distinctes.

Durant l'étude ex vivo, il a été relativement facile de délimiter sur les échantillons la zone d'intérêt avant le balayage OCT étant donné que la vraie corde vocale apparaît plus rosée que les structures avoisinantes. Le muscle vocal est situé à environ 1 à 2 mm de profondeur par rapport à la surface de la corde vocale. L'imagerie OCT des cordes vocales révèle que la résolution offerte par la tomographie par cohérence optique permet d'observer finement la lamina propria et les structures avoisinantes. Selon les comparaisons effectuées, il semble que la lamina propria soit différente en fonction de la région anatomique du larynx, et ce sur l'ensemble des spécimens. La lamina propria de la région de vraie corde vocale est beaucoup plus homogène que les régions environnantes. Ce résultat est important puisqu'il permet de cartographier le larynx. La compréhension de la réponse optique de la lamina propria selon la position anatomique dans le larynx pourrait permettre un repérage de la zone d'intérêt plus facilement en clinique où le temps et les manipulations en chirurgies sont impérativement minimisés.

La résolution latérale du système OCT utilisé est de 25 microns tandis que les coupes histologiques utilisées ont 5 microns d'épaisseur. Bien que la correspondance parfaite entre les deux modalités est pratiquement impossible, les coupes utilisées sont bien colocalisées et permettent de valider nos observations. Les structures imagées sont relativement du même ordre de grandeur et dans la même orientation.

L'information qualitative est d'une grande utilité, cependant il est essentiel de matérialiser ces observations avec des valeurs quantitatives. L'information quantitative permet de caractériser le degré des changements perçus. Une analyse de l'atténuation des cordes vocales chez

les différents spécimens révèle que les coefficients d'atténuation sont différents pour chaque groupe de population. De plus, la lamina propria superficielle possède une plus grande variabilité au sein d'une même population. Cette variabilité est maximale chez les spécimens adultes. Cette variabilité peut être influencée par l'âge des spécimens utilisés, les traumas antérieurs et l'inflammation causée par l'intubation répétée.

Lier les changements d'intensité aux propriétés physiques du tissu implique une connaissance a priori sur la relation qui les unit. Une expérience a été réalisée avec des injections de collagénase sur quelques spécimens porcins. L'objectif principal consistait à faire graduellement diminuer la concentration du collagène dans la corde vocale et à en analyser l'impact sur les images OCT. L'analyse révèle qu'en effet il existe une relation entre le collagène et le contraste dans les images OCT. D'une part, il est possible d'imager plus profondément dans la corde vocale, d'autre part des structures horizontales apparaissent sur les images OCT. Ces structures pourraient représenter une densité de fibres de collagène. Toutefois, d'autres expériences similaires avec d'autres enzymes seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

#### 4.6 Conclusion

L'interprétation des images OCT demeure un défi de taille. Les expériences ex vivo réalisées avec l'analyse de différent type d'échantillon de corde vocale (foetal, porcin, humain) permettent d'illustrer l'éventail des configurations possibles pour la lamina propria. Chaque tissu possède ses caractéristiques propres. Les expériences sur la collagénase permettent de confirmer que le collagène est un outil de contraste dans les images OCT. La concentration et sa disposition influencent la diffusion des photons et ainsi les images OCT. Bien que ces expériences ex vivo soient essentielles à la compréhension du mécanisme de contraste dans les cordes vocales, il demeure que la visualisation in vivo offre une série de possibilité et d'autre variabilité à observer. Les résultats encourageant, obtenus dans ce chapitre permettent d'entrevoir une exploration chez des patients en mode intraopératoire. Toutefois, avant d'y parvenir une série de défis touchant l'instrumentation intraopératoire devront être résolus.

## CHAPITRE 5 DESIGN ET CONCEPTION D'UN SYSTÈME D'IMAGERIE CLINIQUE

La visualisation de la voie aérodigestive avec la tomographie par cohérence optique (OCT), décrite dans le chapitre précédent, justifie une validation du contraste sur des tissus *in vivo*, n'ayant subi aucune altération post-mortem. Cependant, une visualisation optimale des cordes vocales pédiatriques lors d'un examen laryngoscopique impose des contraintes sévères sur le système d'imagerie OCT. Pour en citer quelques-unes, on retrouve des contraintes liées à la dimension de la sonde endoscopique, à la durée de la procédure sous anesthésie, à la stérilisation et à la sécurité laser. Dans ce chapitre, nous exposons nos choix de design et de conception du système OCT proposé pour l'imagerie intraopératoire des cordes vocales, spécifiquement adapté pour la population pédiatrique. Le chapitre décrit les réalisations complétées, notamment ce qui a trait à la partie matérielle et logicielle du projet. Nous présentons également les résultats de la caractérisation du système et les limites du design sélectionné. Les performances du système en imagerie intraopératoire seront abordées au chapitre suivant.

### 5.1 Architecture du système clinique

Chaque projet d'ingénierie répond à des points principaux d'un cahier de charges. Une intégration adéquate en milieu hospitalier nécessite souvent que les projets cliniques soient conçus et validés étape par étape. Cette stratégie favorise les interactions, améliore la compréhension et fragmente la complexité. Ce projet suit cette démarche. Il est segmenté sous la forme de plusieurs petites réalisations. Chacune des sections, présentées dans l'ordre de leur réalisation, expose les enjeux et les solutions proposées pour l'élaboration d'un prototype fonctionnel. Toutefois, une description générale du système clinique envisagé est d'abord présentée.

La Figure 5.1 illustre le flux des données. Cette approche permet de dresser une esquisse de l'architecture du système clinique proposé. On y retrouve les interactions entre chaque module clé, que ce soit la partie matérielle, la partie logicielle ou bien le traitement des données. Bien que le système OCT demeure la pierre angulaire du projet, l'élaboration d'une stratégie pour cibler adéquatement la région d'intérêt dans le larynx est essentielle. Une méthodologie pour assurer le positionnement adéquat de la sonde sur la région d'intérêt doit être considérée avant l'acquisition des données. De plus, ces dernières devront être enregistrées sur un système de stockage pour permettre des analyses quantitatives postérieures.

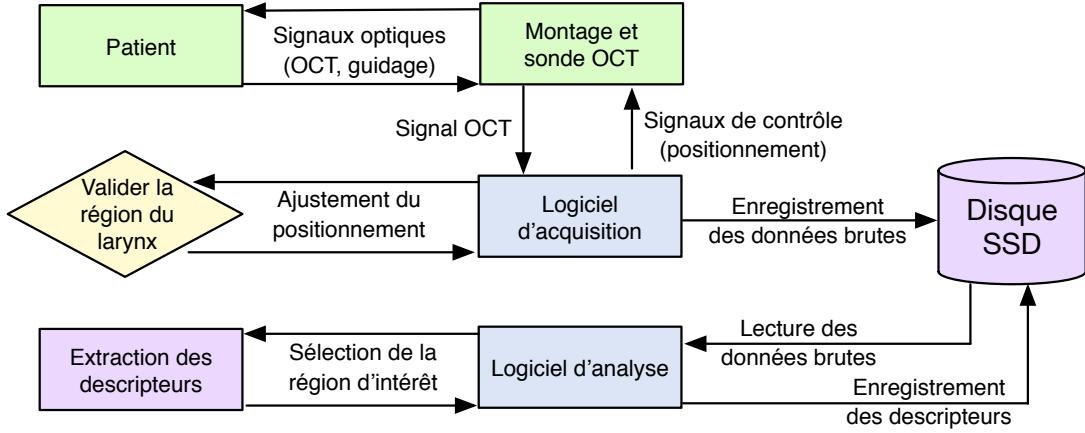


Figure 5.1 Diagramme de flux des données du système OCT clinique. Les flèches indiquent la nature des interactions entre chaque module.

La première itération réalisée sur table optique, sans aucune contrainte propre à l'approche clinique, est illustrée à la Figure 5.2. Les composantes matérielles clés du montage sont la source optique centrée à 1310 nm, le module de balayage, la sonde endoscopique, le bras de référence et le système interférométrique [Fig.5.2a].

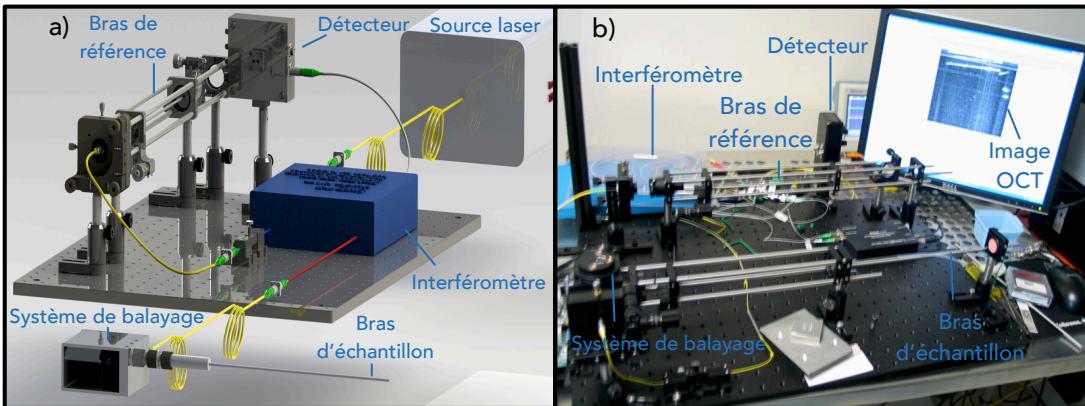


Figure 5.2 Les composants matériels clés d'un système OCT. Rendu 3D d'un système OCT réalisé sur SolidWorks (a) et le montage expérimental sur table optique (b).

Le faisceau laser généré par la source OCT est couplé à une fibre optique et acheminé à l'interféromètre. Celui-ci redirige une partie du faisceau vers le bras de référence et l'autre partie vers la sonde endoscopique. Les signaux optiques réfléchis dans chacun des bras sont

couplées dans l'interféromètre et transmis sur le détecteur. Le signal électrique analogique du détecteur est ensuite numérisé par la carte d'acquisition et l'image est finalement reconstruite par une plateforme logicielle.

Le développement d'une sonde clinique adapté à la chirurgie intraopératoire contient des défis uniques et l'approche est bien différente d'un système sur table [Fig.5.2b]. La section suivante tente, dans un premier temps, d'adresser les contraintes cliniques d'une sonde dédiée à la pédiatrie. Par la suite, la section illustre les étapes de conception du design proposé et une caractérisation optique du système développé.

## 5.2 Design d'une sonde adaptée à la pédiatrie

Comme énoncé à la section 3.6, l'endoscopie peut se pratiquer avec un endoscope rigide ou flexible. Bien qu'une approche flexible et fibrée peut, à première vue, sembler être un choix naturel pour l'observation des cordes vocales chez les nouveau-nés, elle offre malheureusement un champ de vue relativement limité. Ce dernier peut être étendu en ayant recours à des mécanismes de balayage complexes tels qu'une jonction rotative ou des scanners piézoélectriques [Sec.3.6]. Étant donné le contexte intraopératoire et la taille des cordes vocales, l'approche retenue est un design basé sur un tube de lentilles rigides. En mode intraopératoire, le larynx est incliné ce qui permet une insertion rectiligne des instruments. La Figure 5.3 illustre le chemin emprunté par la sonde endoscopique pour visualiser les cordes vocales. Le laryngoscope retient l'épiglotte et facilite l'insertion des outils médicaux. Dans ce contexte, insérer un instrument médical de façon sécuritaire par la cavité orale, sans obstruer les voies aériennes, requiert un tube rigide d'une portée suffisante et d'un diamètre maximal de quelques millimètres. Ces contraintes sont imposées selon la géométrie anatomique du larynx. D'une part, la portée de la sonde doit être suffisante pour atteindre les cordes vocales chez les enfants et les adolescents. D'autre part, la sonde doit respecter un diamètre maximal imposé par la région la plus étroite du larynx : la filière laryngée.

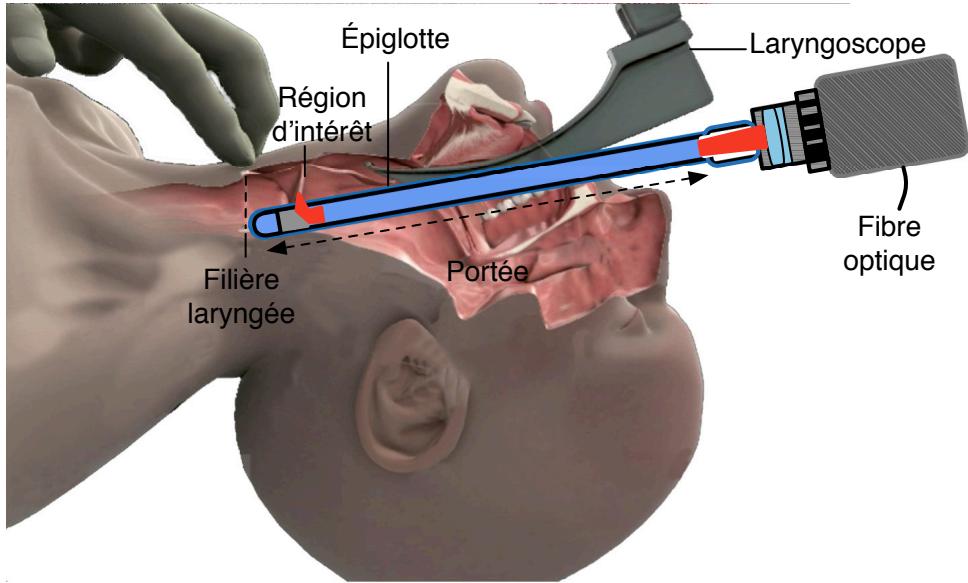


Figure 5.3 Géométrie du larynx en suspension.

Le tableau 5.1 illustre les caractéristiques à respecter par la sonde endoscopique en fonction du groupe d'âge respectif [Roberts et Thornington (2005)]. Un diamètre adéquat assure également un flux d'oxygène suffisant. Un diamètre légèrement plus élevé que celui indiqué peut compresser la paroi de la trachée et causer un oedème.

Tableau 5.1 Caractéristiques physiques de la sonde à respecter selon le groupe d'âge.

Age	Diamètre filière laryngée [mm]	Diamètre sonde [mm]	Portée [mm]
Naissance	4 - 5	3.0	80
6 mois	5 - 5.5	3.0	120
18 mois	5.5 - 7	3.5	150
4 ans	7 - 8	3.5	180
7 ans	8 - 9	4.0	200
14 ans	9 - 11	5.0	220
Adulte	12 - 14	5.0	280

Afin de répondre aux contraintes de stérilisation, des enveloppes protectrices commerciales ont été évaluées. Bien que cette stratégie impose des limites géométriques au design, elle permet de minimiser le temps requis entre deux sessions d'imagerie en salle opératoire. De plus, ces enveloppes protectrices à usage unique sont approuvées par la FDA (de l'anglais,

pour « Food and Drug Administration ») et évitent de surcroit les risques de contamination pour les patients et la dégradation des équipements optiques liées aux autres méthodes de stérilisation (chimique et à température élevée).

En ce qui concerne les contraintes optiques, elles sont ajustées afin de permettre l'analyse clinique de la partie centrale de la corde vocale (le bord libre), précisément la zone de contact entre les cordes vocales. Cette région d'intérêt subit un stress biomécanique très élevée lors de la phonation [Titze et Martin (1998)]. Un bon nombre de pathologies prennent forme à cet endroit [Jiang et Titze (1994)].

La Figure 5.4 permet d'illustrer le design retenu. Le schéma montre un système de balayage, une lentille objectif suivie de trois lentilles à gradient d'indice (GRIN). Les GRINs semblent un choix approprié dans ce contexte. Contrairement aux lentilles traditionnelles, les GRINs offrent la possibilité de satisfaire une variété de configurations optiques en terme de diamètre et de distance focale. Le nombre de lentilles peut être ajusté selon la portée de la sonde endoscopique souhaitée pour atteindre les cordes vocales. En plus, leurs rigidités facilitent l'assemblage et la manipulation intraopératoire. Elles maximisent le champ de vue et elles offrent la possibilité d'un revêtement anti-réflexions.

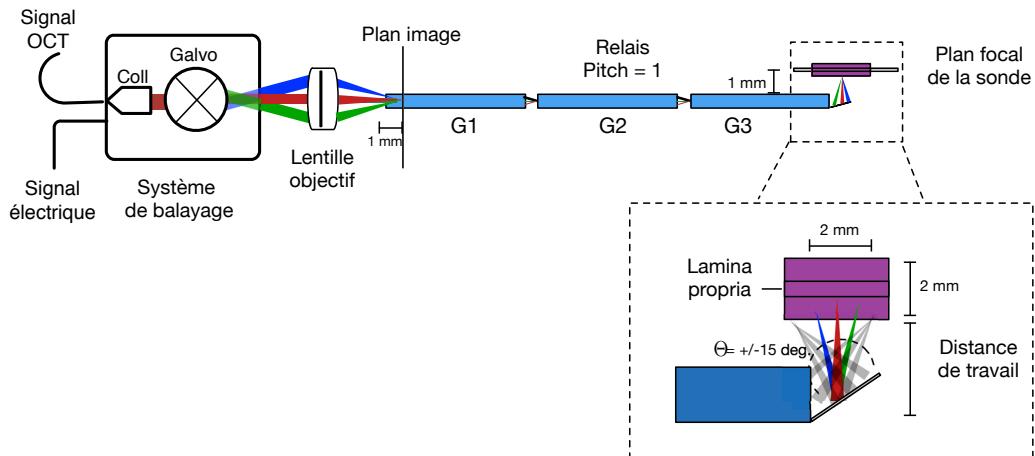


Figure 5.4 Représentation schématique du design retenu pour la sonde endoscopique. Insert démontrant le champ de vue.

Les formules qui régissent l'utilisation des GRINs sont énoncées par les relations 5.1 et 5.2. À partir du profil d'indice en fonction du rayon ( $r$ ), il est possible d'identifier la longueur nécessaire ( $Z$ ) pour atteindre le « pitch » ( $P$ ) envisagé. Le « pitch » de la lentille GRIN

correspond à la fraction d'une période sinusoïdale du parcours du rayon lumineux dans la lentille. Un pitch entier correspond à un cycle complet. Il permet un relais parfait des faisceaux lumineux (à l'exception des aberrations). La constante A correspond au gradient d'indice utilisé par le fabricant de lentilles.

$$n(r) = n_0 \left( 1 - \frac{A}{2} r^2 \right) \quad (5.1)$$

$$P = \frac{Z\sqrt{A}}{2\pi} \quad (5.2)$$

Un logiciel de simulation optique nous permet d'évaluer les différents pitchs disponibles. L'obtention d'une résolution optimale dans la lamina propria exige que la focale se situe tout juste à l'intérieur du tissu vocal. La configuration optique du design est flexible. Cette distance peut être ajustée au besoin avec un déplacement du plan image, c'est-à-dire la distance entre la lentille objectif par rapport à la première GRIN (voir Figure 5.4). Étant donné la faible distance de travail (sonde contact), un balayage de 15 degrés est souhaité pour acquérir un champ de vue suffisant de la zone d'intérêt. Une lentille doublet achromatique permet de minimiser les aberrations chromatiques à la longueur d'onde sélectionnée. Un miroir à 45 degrés, positionné à la pointe de la sonde, redirige le faisceau laser à 90 degrés par rapport à l'axe optique. La fabrication des micro-miroirs est discutée à la section 5.4.4.

	Surf:Type	Comment	Radius	Thickness	Material	Coating	Semi-Diameter
0	OBJECT	Standard ▾	Infinity	Infinity			Infinity
1	STOP	Standard ▾	Infinity	0.000			1.500
2	(aper)	Standard ▾	45783	7.340	4.000	N-LAK22	ZEC_NIRIIHIGH
3	(aper)	Standard ▾		-4.180	1.300	N-SF6	
4	(aper)	Standard ▾		-11.580	0.000		ZEC_NIRIIHIGH
5		Standard ▾	Infinity	3.480	V		1.291
6		Gradient 3 ▾	Infinity	317.540		ZEC_NIRIIHIGH	0.860
7		Standard ▾	Infinity	1.000		ZEC_NIRIIHIGH	1.177
8		Coordinate Break ▾		0.000	-		0.000
9		Standard ▾	Infinity	0.000	MIRROR		1.695
10		Coordinate Break ▾		-5.000	-		0.000
11	IMAGE	Standard ▾	Infinity	-			0.562

Figure 5.5 Configuration de la simulation sur Zemax.

La faisabilité du design optique, choix des lentilles, revêtement optique et la portée de la sonde est validée sur Zemax, un logiciel de tracé de rayons. Les lentilles GRIN sont sélectionnées pour relayer le faisceau laser jusqu’aux cordes vocales. Chaque composant optique est simulé avec un revêtement infrarouge afin diminuer les réflexions nuisibles. La configuration utilisée pour la simulation du design optique est illustrée à la Figure 5.5. Le respect des dimensions physiques, le poids de la sonde, l’ergonomie et l’intégration des pièces sous un prototype sont des facteurs évalués à l’aide d’un logiciel de conception assistée par ordinateur 3D (Solidworks, Dassault Systèmes, Waltham, Massachusetts).

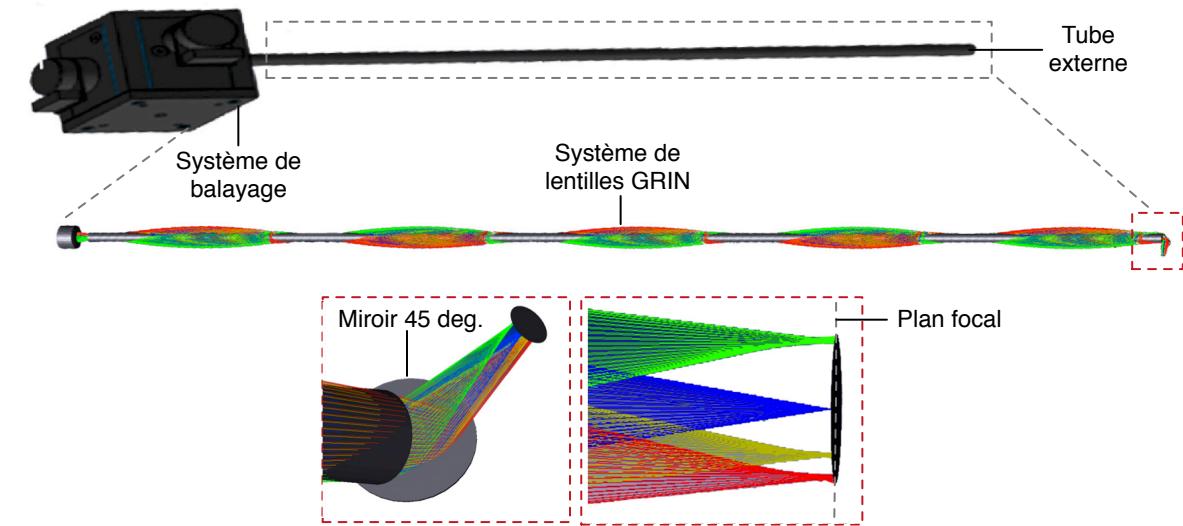


Figure 5.6 Prototype d'une sonde endoscopique pédiatrique et simulation des faisceaux optiques sur Zemax.

La simulation sous Zemax est exécutée avec une longueur d'onde centrale de  $1310 \mu\text{m}$  et sous six angles différents. Il s'agit de dévier le faisceau lumineux de quelques degrés selon l'axe y (composante y déviée de 0, -1, +2, -2, -3, +3). Cette simulation permet d'identifier l'impact du balayage sur les performances optiques du système. Chaque angle du faisceau simulé est représenté par une couleur différente. La Figure 5.6 illustre le résultat de la simulation. Les faisceaux dont l'angle est plus prononcé ont des points focaux plus étalés spatialement par rapport à ceux avec un angle de champ plus faible. Ceci est lié à la présence d'aberrations : la courbure de champ, l'astigmatisme et de coma. Toutefois, c'est l'aberration sphérique qui est prépondérante dans le système, principalement causé par l'utilisation de la lentille objectif, comme illustrée par le diagramme de Siedel [Fig.5.7] qui identifie la contribution de chaque élément optique aux aberrations du système.

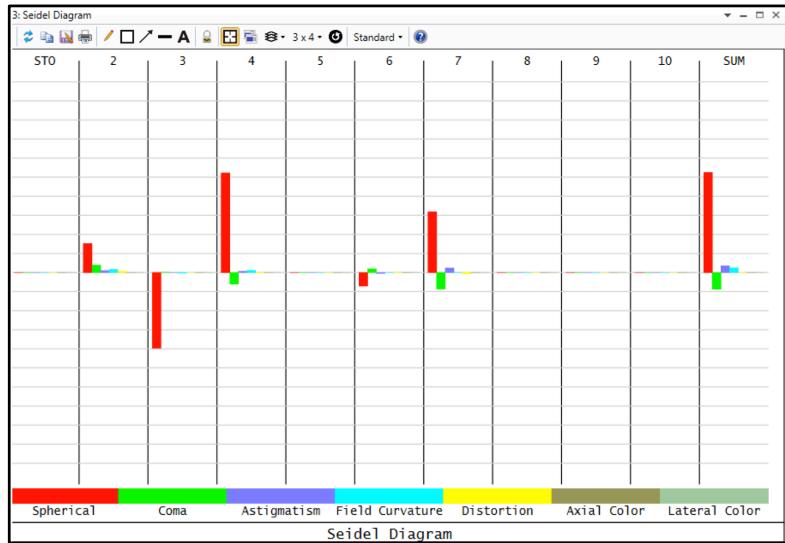


Figure 5.7 Diagramme de Siedel. Chaque aberration optique de la sonde endoscopique est représentée par une couleur. C'est l'aberration sphérique qui est la plus prépondérante dans le système, principalement à cause de lentille objectif.

La Figure 5.8 illustre des résultats additionnels de la simulation qui caractérisent le système optique.

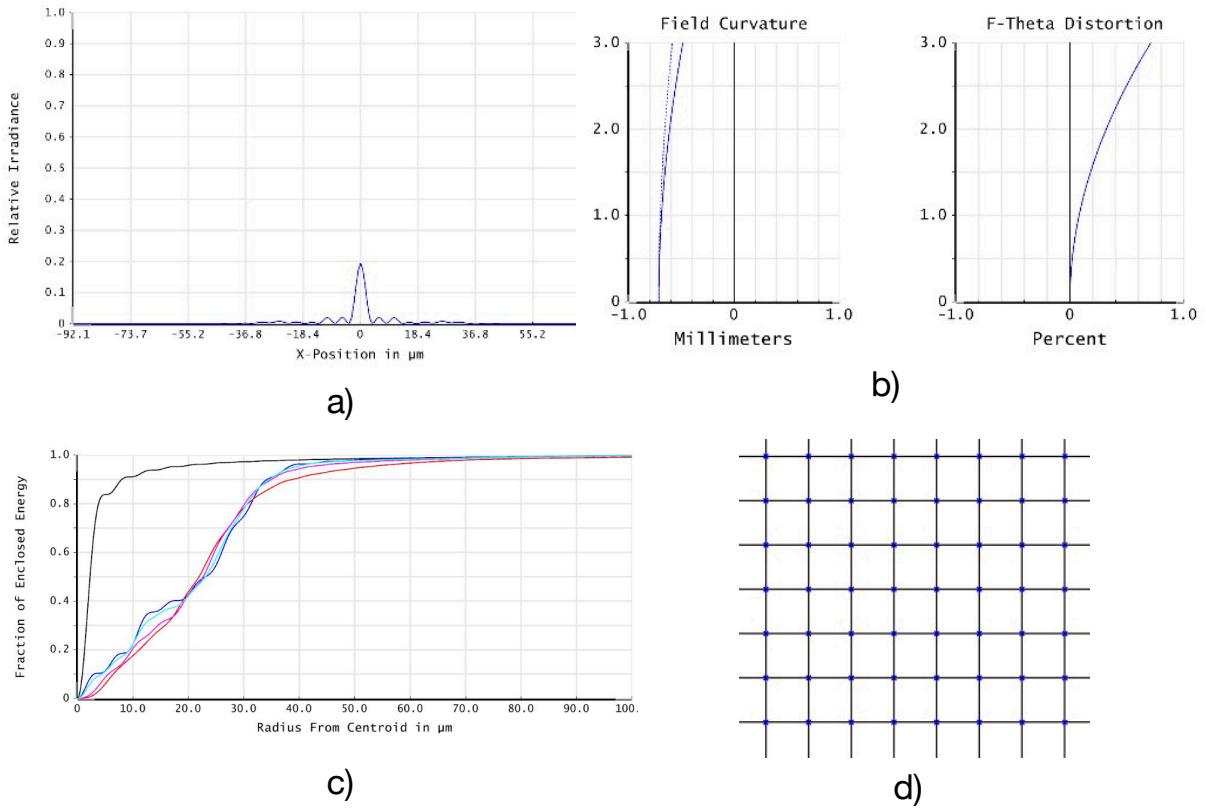


Figure 5.8 Résultats optiques obtenus sous Zemax. La fonction d'étalement (a), la courbure de champ (b), le diagramme de points (c) et la grille de distorsion (d) sont obtenus au focus de la sonde endoscopique.

Dans un premier temps, la fonction d'étalement du point [Fig.5.8a] montre que largeur du pic centrale est de 15  $\mu\text{m}$ . La hauteur du pic centrale (Strehl ratio = 0.2) indique que le système n'est pas limité par la diffraction (Strehl ratio  $> 0.8$ ). Le Strehl ratio correspond à l'intensité maximum du pic central par rapport à son intensité sans la présence d'aberration. Bien que l'énergie incluse dans le pic central ne représente que 10% de l'énergie du faisceau [Fig.5.8c], la faible hauteur relative des pics secondaires permet d'obtenir une résolution selon le critère de Rayleigh d'environ 15  $\mu\text{m}$ .

Une des autres aberrations présentes dans la sonde endoscopique est la courbure de champ, illustrée à la Figure 5.8b. Cette courbure de champ a pour effet de déplacer axialement la

position du focus par rapport à la position latérale du faisceau. Dans le présent système, ce déplacement est d'une centaine de microns ce qui est négligeable par rapport à la distance Rayleigh. Cet effet ne devrait pas être visible sur les volumes acquis. Enfin, sur la grille de distorsion [Fig.5.8d] on remarque que l'image est droite, sans distorsions majeures. Bien que le système souffre d'aberrations sphériques, il est adéquat pour imager les cordes vocales en OCT. Toutefois, les simulations ne représentent pas les défauts de fabrication et d'alignement. Une lentille objectif désignée spécifiquement pour cette sonde pourrait contribuer à diminuer les aberrations sphériques et par conséquent améliorer la résolution et l'efficacité de transmission et de collection.

### 5.3 Sécurité laser et matérielle

Les exigences en matière de sécurité laser et électriques en milieu hospitalier imposent des conditions d'utilisation strictes. Une évaluation rigoureuse des risques pour le patient, de l'équipe médicale et des autres équipements en fonction est requise. Tout d'abord, chaque laser est évalué pour respecter les exigences en termes de puissance optique. Bien que la sensibilité de l'OCT soit proportionnelle à la puissance optique, les tissus ne peuvent pas être exposés à des radiations au-delà des normes établies par ANSI (American National Standards Institute, 1993) [Barat (2014)]. À 1300 nm, l'exposition maximale permise (EPM) pour la peau est approximativement 40 mW, lorsque le faisceau possède une taille de 30  $\mu\text{m}$  et qu'il est balayé sur distance de 10 mm à 30 images par seconde. De façon équivalente, à partir des normes établies, à 5 mW à la pointe de la sonde endoscopique, les calculs indiquent que l'énergie déposée sur les cordes vocales est 20x inférieure à l'EPM. Cette puissance de sortie à la pointe de la sonde est fixée à 5 mW l'aide coupleur 90/10 situé à l'entrée de l'interféromètre (90% de l'énergie est envoyé dans le bras de l'échantillon). À cette puissance le rapport signal sur bruit demeure acceptable.

Quelques mécanismes sont en place pour assurer que l'équipement est utilisé de façon sécuritaire (liste complète disponible à l'Annexe A). Avant chaque opération, la puissance de sortie du laser est évaluée à l'aide d'un détecteur puissance (PM100 Thorlabs, Newton, New Jersey). De plus, par mesure de prévention, un assistant s'assure également d'activer le laser seulement lors des acquisitions. Cette directive est importante. Elle limite les risques d'exposition au laser lorsque la sonde est manipulée hors de la cavité buccale.

Des fibres commerciales sont utilisées (SMF28 - 9  $\mu\text{m}$  de cœur et 125  $\mu\text{m}$  de gaine) avec une ouverture numérique (NA) de 0.14. Une gaine protectrice additionnelle en métal (OM6,

Montréal, Québec) est ajoutée afin d'obtenir plus de robustesse et minimiser les risques d'endommager les fibres accidentellement : un atout essentiel lors des déplacements. Un support pour la sonde a été ajouté sur le chariot clinique (STORZ, Florida, USA). Il permet, d'une part, le maintien de la sortie laser face au sol et d'autre part, facilite l'insertion de la gaine stérile par l'assistant.

Les précautions électriques sont aussi essentielles. Une fuite de courant peut causer au patient une stimulation involontaire des muscles, des nerfs ou causer des brûlures aux tissus. Afin d'éviter les fuites de courant, la sonde possède des câbles électriques de qualité avec une gaine protectrice. Le chariot est muni d'un transformateur d'isolation qui permet d'alimenter tous les composants électriques (galvanomètres, détecteur OCT et ordinateur) à l'aide d'un seul interrupteur principal. Le transformateur dispose d'un indicateur de charge afin d'anticiper une surcharge électrique.

#### 5.4 Conception de la sonde endoscopique OCT

Après plusieurs itérations, nous avons convergé vers le système schématisé à la Figure 5.9. Le système OCT est composé d'une source à balayage (OCS1310V1 Thorlabs , Newton, New Jersey) modifié pour tenir compte d'un bras de référence externe [Fig. 5.9b] qui est à son tour ajusté à la sonde endoscopique [Fig. 5.9c].

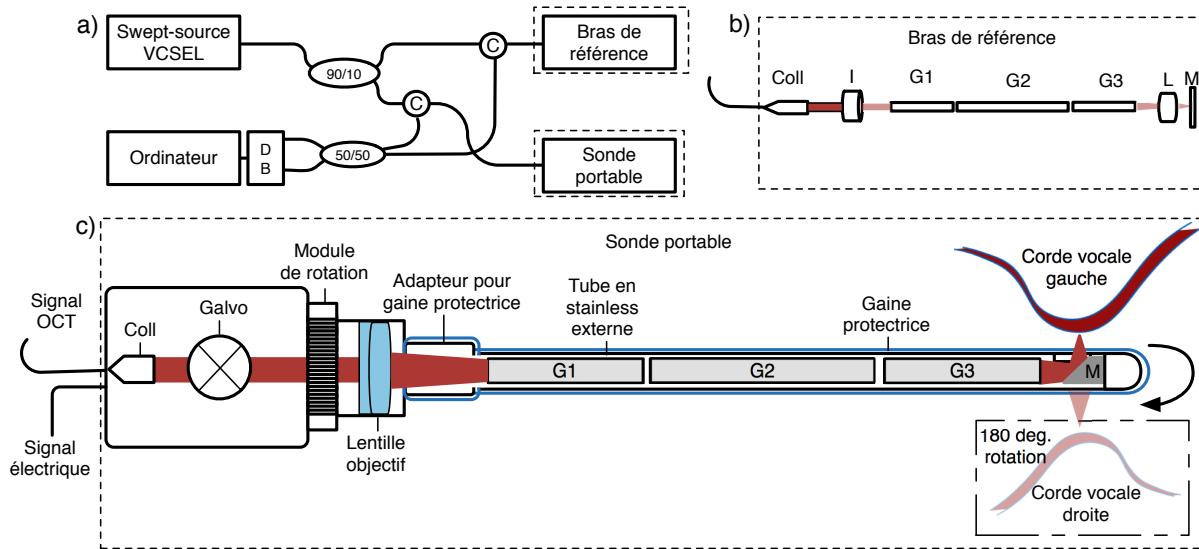


Figure 5.9 Schéma du système d'imagerie OCT (a) et les détails du bras de référence (b) et de la sonde endoscopique (c). DB : DéTECTEUR balancé ; C : circulateur ; Coll : collimateur ; I : iris ; G1 et G3 : lentille à gradient d'indice de 95 mm de long ; G2 : lentille à gradient d'indice de 127 mm de long ; L : lentille objectif de 19 mm de focale ; Galvo : galvanomètres ; M : miroir.

Tel qu'illustre plutôt [Fig.5.3], l'évaluation peropératoire du larynx justifie l'utilisation d'une sonde rigide. Le placement de la pointe de la sonde s'effectue précisément à la zone de contact des cordes vocales. Afin d'obtenir une résolution optimale sous la surface, dans la lamina propria, la lumière est focalisée à une distance de 1 mm à partir de la partie distale de la sonde. Le design permet de régler la profondeur optimale de la focale à l'intérieur du tissu en ajustant convenablement la distance de lentille d'objectif avec la première interface de la lentille GRIN. Cette configuration est réalisée au moyen d'une lentille de 19 mm de focale (Thorlabs, AC127-019-C) qui focalise le faisceau à l'intérieur d'un ensemble de lentilles GRIN. Cet ensemble est composé de trois lentilles GRIN (GradientLens Corporation, Rochester, New York) de 2.7 mm de diamètre et séparé par deux rondelles de 1 mm d'épaisseur. Dans cette configuration, les lentilles GRIN agissent comme un relais optique. Le tout est assemblé dans un tube de 3.5 mm de diamètre. Un miroir à 45 degrés est monté à l'extrémité de la sonde avec de la colle optique (Norland Optical Adhesive 84), ce qui permet de réfléchir le faisceau lumineux sur le bord libre de la corde vocale. La longueur du miroir a été polie jusqu'à 3.5 mm afin de limiter le décalage de la fenêtre d'imagerie, installée sur la pointe de la sonde pour faciliter le positionnement sur les structures anatomiques.

Chaque interface optique (collimateur, lentille d'objectif, lentille GRIN) est munie d'un revêtement anti-réflexion pour l'infrarouge. Les lentilles GRIN sont insérées dans un tube en acier inoxydable ( 2.9 mm de diamètre intérieur, épaisseur de 0.8 mm ) pour augmenter la rigidité de la sonde. L'assemblage final fait une longueur totale de 324 mm. Cette longueur est suffisante pour de nombreux patients (de 3 mois à 17 ans) [Tab.5.1]. La taille de la sonde est également compatible avec une gaine translucide stérile et jetable (Slide-ON Endosheath, Medtronic, Jacksonville, Floride), ce qui permet une transition rapide entre les patients. Le tube extérieur est gradué en millimètres [Fig. 5.10] pour faciliter l'orientation et le positionnement de la sonde ; et pour estimer les dimensions des lésions. Enfin, tel qu'illustré sur la Figure 5.11, le tube optique est muni d'un mécanisme à mandrin qui agit comme une pince et permet d'auto-centrer les lentilles.

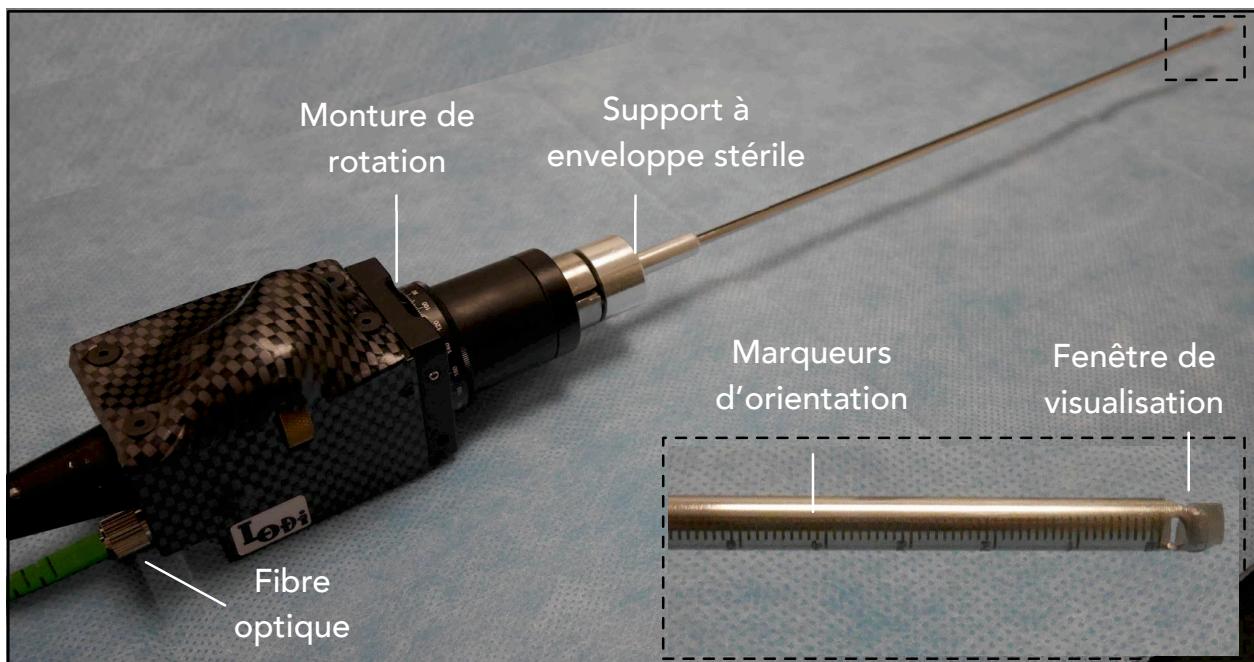


Figure 5.10 Sonde endoscopique OCT avec une insertion illustrant les marqueurs d'orientation et la fenêtre de visualisation à la partie distale de la sonde.

#### 5.4.1 Laser de guidage

Puisque la longueur d'onde centrale est située dans l'infrarouge, et donc invisible à l'œil, nous avons ajouté une source secondaire de lumière à 532 nm qui utilise le même chemin optique à travers l'endoscope. Ce faisceau de positionnement permet au chirurgien de localiser le site

d'intérêt. Le tableau 5.3 résume les spécifications techniques de la sonde.

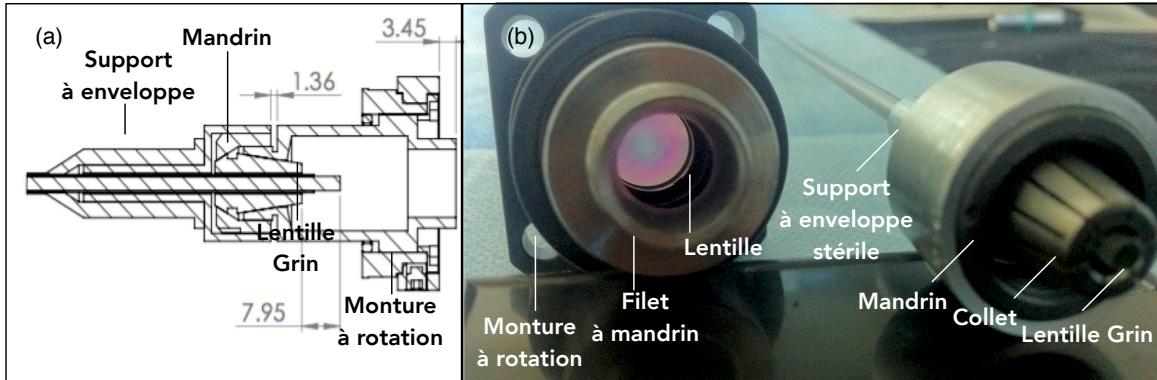


Figure 5.11 Design du mécanisme d'arrimage (a) et les composants (b) de la sonde endoscopique OCT.

Tableau 5.2 Spécifications techniques de la sonde OCT

Spécifications	Valeurs
Résolution latérale (FWHM)	25 $\mu\text{m}$
Résolution axiale ( $\frac{1}{e^2}$ )	12 $\mu\text{m}$
Champs de vue	2 mm
Taux de lignes-A	100 kHz
Puissance source	$\leq 5$ mW
Diamètre de la sonde	3.7 mm
Longueur de la sonde	324 mm

#### 5.4.2 Bras de référence

La Figure 5.9b montre un diagramme schématique du bras de référence externe utilisé. Le bras de référence a été conçu pour compenser la dispersion induite par les optiques de la sonde endoscopique afin d'éviter la dégradation de la résolution axiale. Dans le bras de référence, la lumière collimatée se propage à travers trois GRIN de 2.7 mm de diamètre. La longueur totale de la section optique de la sonde est de 317 mm. Cet assemblage agit comme un relais optique qui concentre la lumière sur un miroir. Un iris est utilisé pour optimiser le rapport signal sur bruit sur les images.

### 5.4.3 Source laser fibrée OCT

Tout comme les autres tissus, les cordes vocales diffusent et absorbent la lumière. La lumière proche infrarouge (1000 nm - 1450 nm), est une plage intéressante pour visualiser la microstructure des cordes vocales sur 2 mm de profondeur (telle qu'illustrée sur la fenêtre thérapeutique à la Figure 3.6). Dans notre configuration actuelle, nous utilisons une diode laser à cavité verticale émettant par la surface (VCSEL, de l'anglais pour « Vertical-Cavity Surface-Emitting Laser ») [Jayaraman *et al.* (2013)]. Cette source commerciale (OCS1310V1 Thorlabs, Newton, New Jersey) a été couplée un interféromètre et conceptualisée de sorte à permettre l'ajout d'une sonde sur mesure avec un bras de référence adapté. La source laser est centrée à 1310 nm et la largeur spectrale mesurée est de 117 nm (à -10 dB). La résolution axiale mesurée est de 16  $\mu\text{m}$  ( $\frac{1}{e^2}$ ) dans l'air et 12  $\mu\text{m}$  ( $\frac{1}{e^2}$ ) dans le tissu. Le spectre de la source et la sensibilité du système sont tracés à la Figure 5.12. Le bruit relatif d'intensité « RIN » est une source de bruit qui limite considérablement la sensibilité des systèmes OCT. Il représente l'instabilité de la puissance de la source en fonction du temps. Il s'élève à moins de 1% et est concentré principalement sur les extrémités du spectre. Il est à noter que cette partie du spectre n'est pas utilisée : cela a pour effet de réduire le cycle de service (« Duty cycle »).

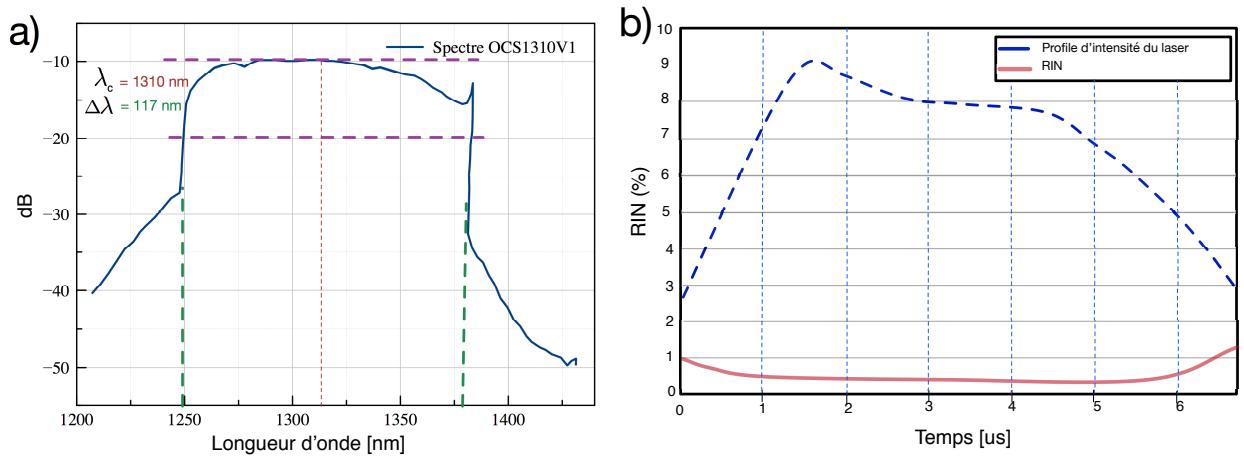


Figure 5.12 Spectre du laser utilisé (a) et la courbe de bruit RIN.

Une acquisition rapide évite les artefacts de mouvement et permet l'imagerie 3D. De plus, elle permet minimiser le temps requis pour la procédure sous anesthésie générale. Le système proposé a un taux d'acquisition de 100 000 lignes-A par seconde (100 kHz) ce qui permet

d'obtenir 60 images/seconde (pour 1040 lignes-A de 1040 pixels par image). La puissance moyenne en sortie du laser est de 30 mW. Enfin, cette source fournit une grande longueur de cohérence ( $> 100$  mm), ce qui permet d'imager sur une plage pouvant aller jusqu'à 10 mm de profondeur ; une caractéristique particulièrement utile pour l'imagerie de lésions présentant une déformation grave de l'épithélium. Le tableau 5.3 illustre les spécifications techniques de la source laser utilisée.

Tableau 5.3 Spécifications techniques de la source OCT utilisée

Spécifications	Valeurs
Résolution axiale ( $\frac{1}{e^2}$ )	12 $\mu\text{m}$
Taux de ligne-A	100 kHz
Puissance source	$\leq 30$ mW
« Duty cycle »	$\leq 65$ %
« Relative Intensity Noise (RIN) »	$\leq 1$ %
Classification laser (IEC 60825-1)	M
Longueur de cohérence	$> 100$ mm
Profondeur supportée	$\leq 11.5$ mm

#### 5.4.4 Fabrication des micro-miroirs

Les caractéristiques uniques et spécifiques de la sonde endoscopique justifient la fabrication sur mesure des micro-miroirs. Situé à la pointe de la sonde, le miroir à 45 degrés redirige le faisceau sur le bord libre de la corde vocale. Un miroir avec un diamètre de 2.4 mm permet de maximiser le champ de vue. Une longueur de moins de 3 mm limite l'écart entre la pointe de la sonde et la fenêtre de visualisation. Ce dernier point est important puisqu'il contribue à améliorer significativement le positionnement et évite d'atteindre des structures sous-glottiques où le diamètre du larynx est réduit.

La Figure 5.13 illustre le procédé de fabrication de la pièce en laiton qui possède 16 micro-miroirs. La conception des micro-miroirs est réalisée sur une machine-outil à commande numérique (CNC) (Moore Nanotechnology Systems, Swanzey, NH). Cette machine munie d'une pointe de diamant permet d'obtenir une qualité de surface suffisante pour fabriquer des pièces optiques. Initialement 16 tiges de 2.4 mm de diamètre sont insérées dans une pièce de 50.8 mm sur laquelle des trous à 45 degrés ont été préalablement machinés. Celle-ci est ensuite usinée à la CNC pour produire une matrice de micro-miroirs avec une surface très lisse, de qualité optique [Fig.5.13b]. Afin d'améliorer la réflectivité à la lumière infrarouge, un procédé de déposition est effectué au laboratoire de micro fabrication de l'École Polytechnique

de Montréal (LMF). Le revêtement consiste en une couche de chrome de 30  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, nécessaire à l'adhésion de la couche d'or de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. La couche d'or est essentielle pour améliorer les propriétés optique de la matrice de micro-miroirs. Enfin, une couche 30  $\mu\text{m}$  de silice est appliquée pour protéger la surface. Ensuite, chaque miroir est retiré avec une pince par l'extrémité et polie à une longueur d'environ 3 mm. Après ces étapes successives, les micro-miroirs sont enfin prêts à être installés sur la sonde avec un adhésif optique [Fig.5.13c].

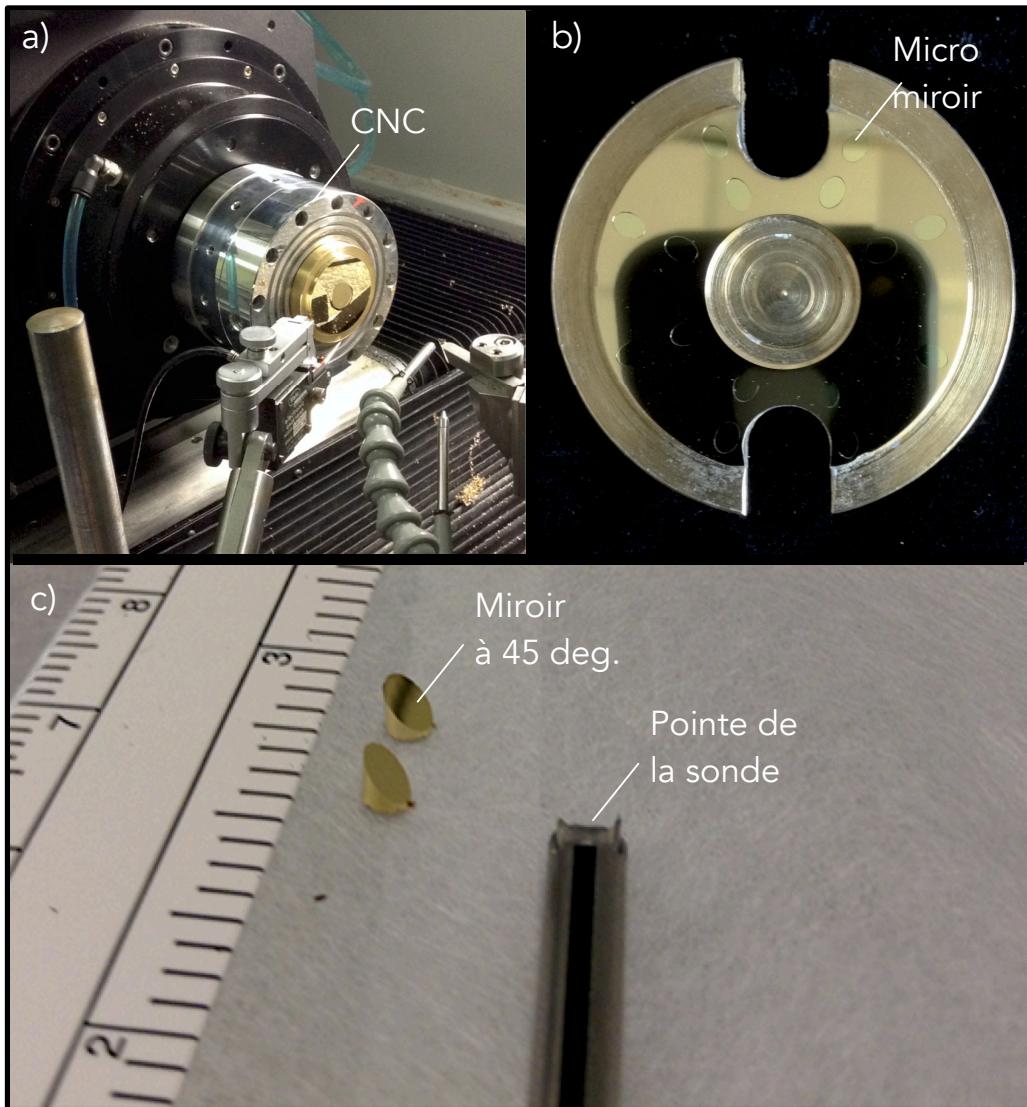


Figure 5.13 Fabrication des micro-miroirs à 45 degrés. Usinage d'une pièce de 50.8 mm en laiton sur une CNC (Moore Nanotechnology Systems) (a). Vue de face de la pièce en laiton une fois machinée (b). Miroir prêt à être assemblé sur la sonde avec un adhésif optique (c).

#### 5.4.5 Sensibilité et calibration de l'intensité

Malgré une utilisation de plus en plus répandue de l'imagerie OCT, il est encore très difficile de caractériser ou comparer des systèmes OCT. Bien qu'il existe plusieurs objets de calibration qui réalisent cette tâche dans les secteurs d'imagerie traditionnelle (IRM, ultrason, rayons X), il n'existe toujours pas de consensus sur une méthodologie de caractérisation ou de calibration pour les systèmes OCT [Tearney *et al.* (2012)]. Afin de permettre de caractériser les performances optiques des systèmes OCT (champ de vue, résolution axiale, courbure de champ), un objet de calibration en aluminium avec plusieurs segments en profondeur a été développé dans le cadre de ce projet sur une machine outil [Strupler *et al.* (2015)]. La précision des segments est inférieure à un micron. La Figure 5.14 illustre les dimensions de l'objet de calibration utilisé. Une couche de polyuréthane mélangé avec du dioxyde de titane ( $TiO_2$ ) est superposée sur la pièce afin d'imiter les propriétés des tissus biologiques [Fig.5.14b]. Ce procédé permet d'évaluer et caractériser les performances de la sonde dans plusieurs contextes. Par exemple, après l'installation d'un nouveau système OCT ou tout simplement après le réalignement optique de la sonde.

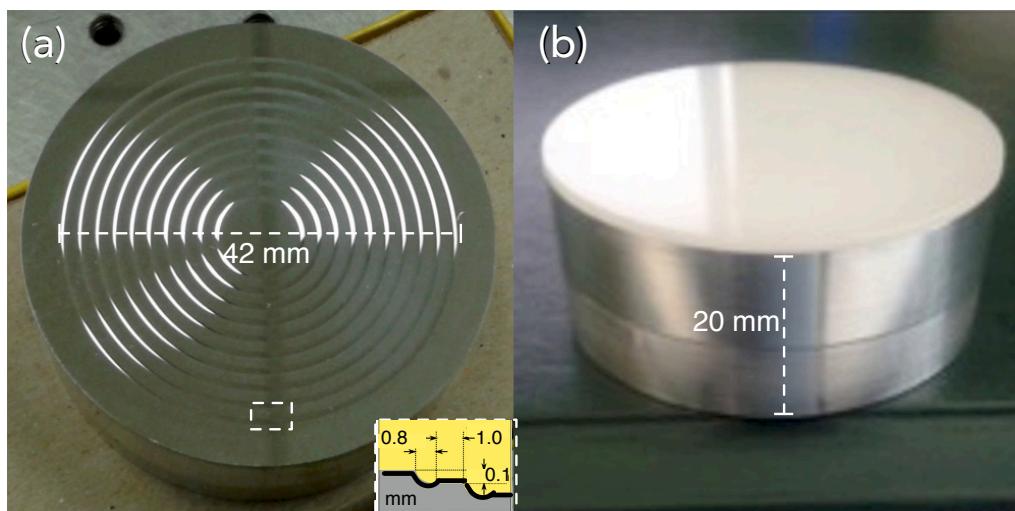


Figure 5.14 Objet de calibration réalisé à la CNC avec un insert représentant les dimensions des segments gravés (a). Objet après le dépôt d'une couche de dioxyde de polyuréthane de titane qui imite les propriétés des tissus biologiques (b).

#### 5.4.6 Méthode de balayage

Les données volumétriques sont obtenues avec un mécanisme de balayage 2D rapide, la troisième dimension étant inhérente à l'imagerie OCT. Le balayage latéral est mis en œuvre avec deux scanners : des miroirs de 3 mm montés sur l'axe rotatif de galvanomètres (6215H Cambridge Technology, MA, USA). L'axe rapide permet de balayer le faisceau sur une distance de 2 mm pour former une image en mode-B très rapidement (60Hz). Ce mode d'opération 2D est utilisé pour une rétroaction visuelle du positionnement de la sonde sur les structures anatomiques. Une fois la position d'intérêt trouvée, l'axe lent est balayé également sur 2 mm pour une acquisition tridimensionnelle de la région d'intérêt. L'espacement latéral entre ligne-A est évalué afin d'être sous la résolution latérale du système. Chaque axe de balayage comprend 1040 mesures ce qui correspond à un espacement de 3 µm entre les lignes A.

Un mécanisme de rotation a également été ajouté à la sonde [Fig. 5.10] afin de permettre une analyse symétrique des cordes vocales permettant d'imager la corde vocale droite et gauche à la même position antéro-postérieure. Cet ajout permet à la main du chirurgien de rester toujours dans une position neutre et de faire une rotation de la fenêtre de visualisation. À 0 degré le faisceau OCT est aligné de sorte qu'un balayage de la corde vocale droite peut être fait perpendiculairement à la zone d'intérêt (c'est-à-dire le plan coronal), alors qu'à 180 degrés la région identique appartenant à la corde vocale gauche peut être à son tour balayée.

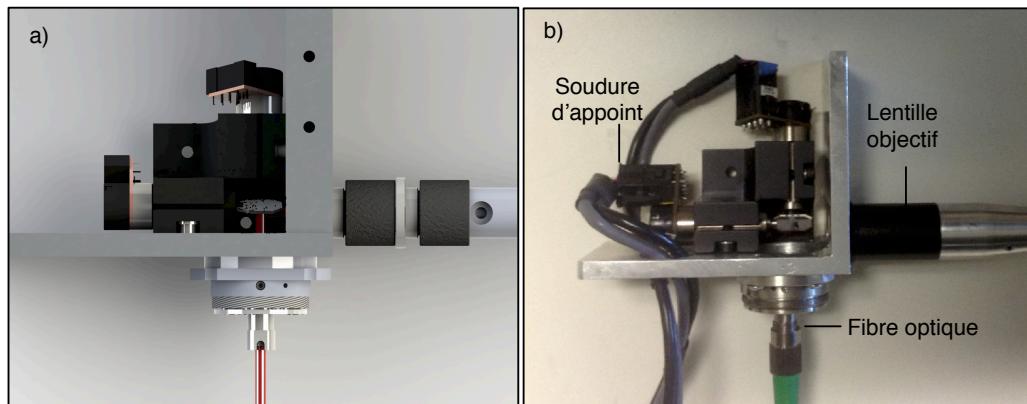


Figure 5.15 Mécanisme de balayage 2D par galvanomètres. Le design est exécuté sur Solid-works et la réalisation est effectuée par l'usinage des pièces avec des soudures d'appoint.

La synchronisation des galvanomètres est également assurée par la carte d'acquisition, étape essentielle pour le traitement des images à haut débit. Une impulsion de la source laser

(« trigger ») est acheminée à la carte d’acquisition qui permet d’accumuler les échantillons pour chaque déplacement angulaire du miroir.

#### 5.4.7 Plateforme logicielle

L’ordinateur utilisé est équipé d’une carte d’acquisition à grande vitesse (ATS9350 Alazar Technologies, Pointe-Claire, Québec). Le signal électrique provenant du détecteur balancé est échantillonné à 500 MHz avec une résolution de 12 bits. Les images acquises sont visualisées et enregistrées sur le disque dur simultanément par le logiciel ThorImage (Version 4.2, Newton, NJ). Cette plateforme est utilisée d’une part pour configurer le champ de vue, la taille de l’image en pixel, l’angle de balayage et d’autre part pour l’enregistrement des données brutes du signal OCT. La Figure 5.16 illustre la plateforme logicielle utilisée : à droite figure les paramètres de configuration et au centre la visualisation des données.

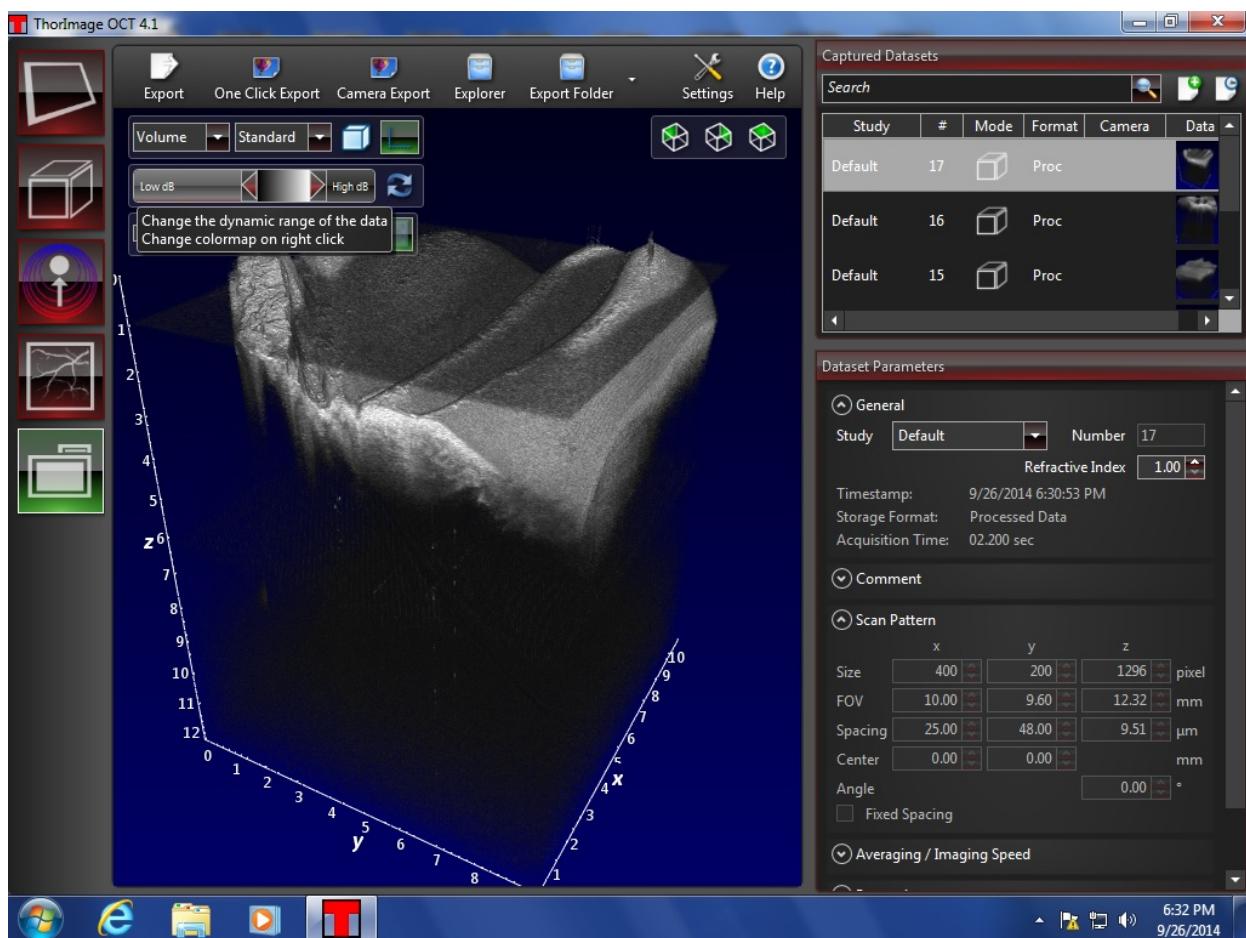


Figure 5.16 Plateforme logicielle ThorImageOCT.

#### 5.4.8 Système clinique

La sonde, la source et l'interféromètre sont installés sur un chariot mobile, ce qui permet une intégration efficace au flux clinique. Ce chariot (GoKart 9601A, Karl Storz Endoscopy, El Segundo, CA) est montré à la Figure 5.17. Étant donné l'espace restreint en salle de chirurgie, nous avons opté pour un chariot médical vertical à paliers multiples adapté à nos besoins (ajout de sections intérieures) [Fig.5.17b]. L'ensemble de l'électronique (source, PC) se situe au premier palier du chariot. La partie optique se trouve sur les deux autres paliers. Le système est robuste aux vibrations et peut facilement être déplacé du laboratoire à la salle chirurgicale.

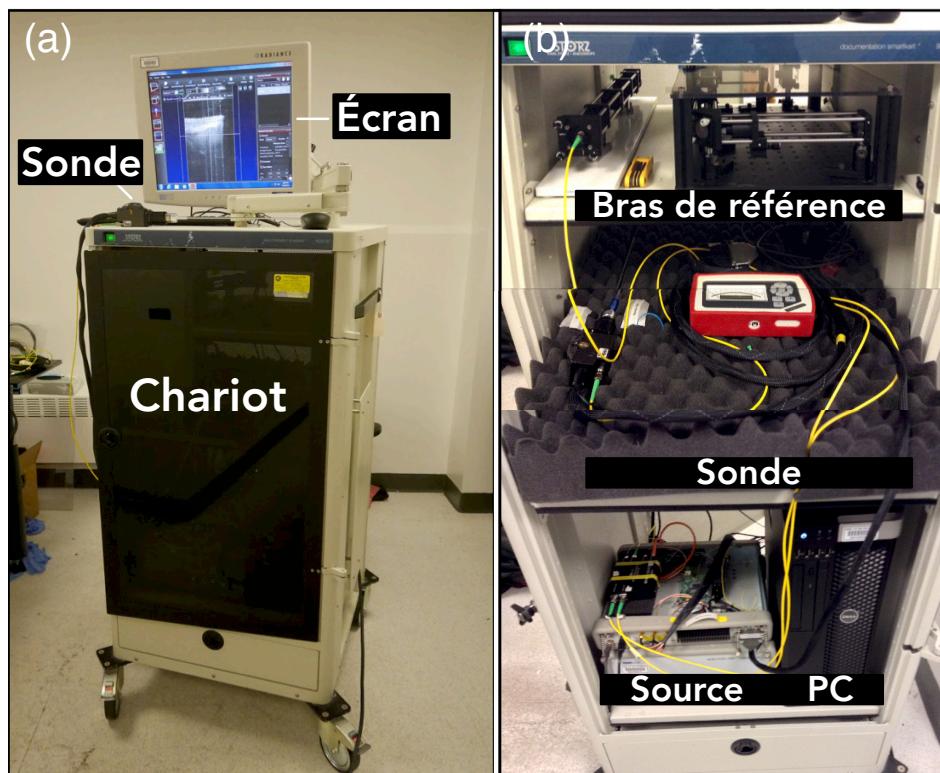


Figure 5.17 Système OCT développé pour l'analyse intraopératoire des cordes vocales. Le chariot OCT (a) permet de transporter tous les composants du système (c).

#### 5.5 Résultats

Plusieurs paramètres caractérisent un système optique. Cette section réunit les performances du système proposé. Dans un premier temps, une caractérisation des spécifications réelles est

comparée avec les valeurs théoriques projetées. Ensuite, les aberrations optiques du système sont abordées.

### 5.5.1 Intégration à l'environnement chirurgical

L'espace occupé par le chariot en salle d'opération est de moins de  $0.8 \text{ m}^2$ , ce qui est conforme à l'évaluation initiale. Le système OCT est installé tout près du moniteur de laryngoscopie. Le clinicien et l'équipe médicale peuvent suivre l'intervention sur les deux modalités d'imagerie simultanément. La Figure 5.18 illustre le positionnement du système en clinique. Le système permet une imagerie tridimensionnelle rapide. L'acquisition s'effectue en 18 secondes pour un volume de  $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$ .

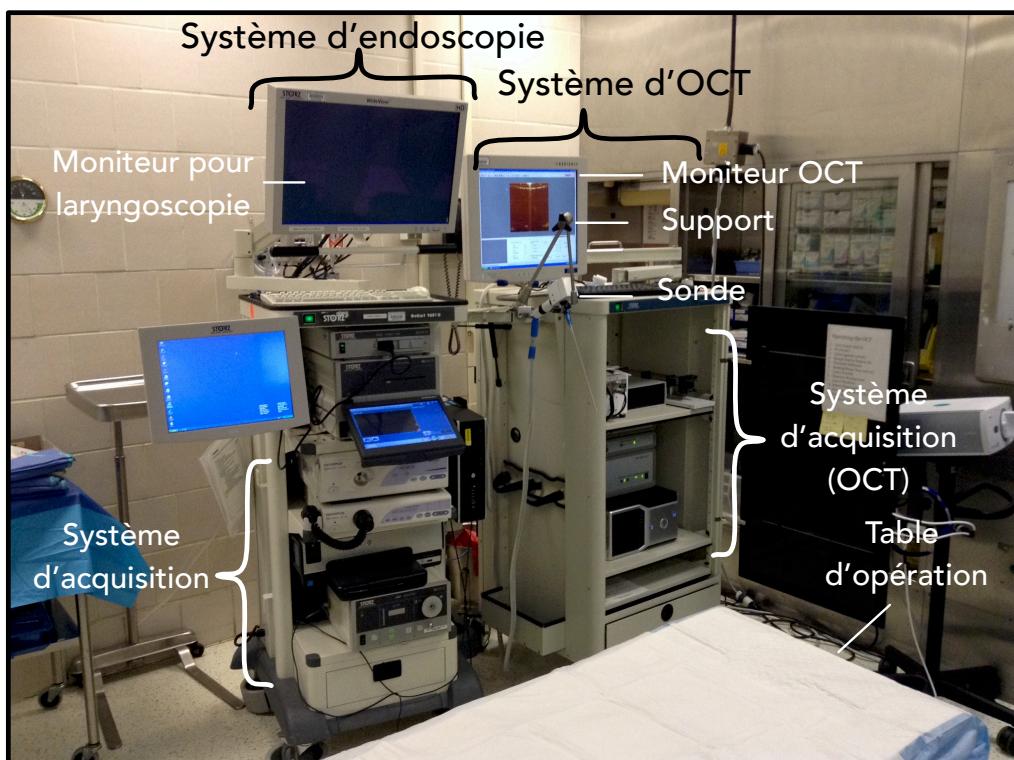


Figure 5.18 Positionnement du système dans la salle de chirurgie.

### 5.5.2 Caractérisation de la sonde

Cette section traite de la caractérisation du système OCT et de la sonde intraopératoire en ce qui a trait à la puissance du signal transmis, aux résolutions (axiales, latérales et temporelles).

#### Puissance transmise

Le système proposé offre une puissance à la sortie de l'interféromètre de 10 mW. Bien que la puissance à la pointe de la sonde soit suffisante, les pertes sont importantes. Chaque réflexion interne du système induit une perte en puissance et contribue à l'augmentation du bruit dans les images. La puissance finale, à la pointe de la sonde correspond à la puissance initiale moins les pertes aux interfaces. À partir de la somme des réflexions de Fresnel (relation 5.3), il est possible d'estimer la puissance à la pointe de la sonde comme :

$$P_{sonde} = P_0 - \sum_i^{n_{air}} \frac{\left(\frac{n_i}{n_{i-1}} - 1\right)^2}{\left(\frac{n_i}{n_{i-1}} + 1\right)^2}, \quad (5.3)$$

où  $P_0$  est la puissance à la sortie de la sonde de la fibre optique et  $n_i$  est l'indice de réfraction du milieu, la sommation se faisant sur toutes les interfaces air-milieu.

Celle-ci correspond à 4.9 mW. Malgré l'utilisation d'un revêtement antireflet (pour l'infrarouge proche) sur les lentilles GRIN, le parcours optique engendre une perte de 3 dB (50%). La Figure 5.19a illustre le profil d'intensité d'une région encadrée sur l'image acquise en salle de chirurgie. Les réflexions multiples issues des interfaces optiques sont visibles. Ces changements d'indice, présents dans le parcours ( $n_{air}$ ,  $n_{fibre}$ ,  $n_{lentille}$ ,  $n_{gaine}$ ), provoquent de fortes réflexions. La réflexion la plus prononcée dans le système provient de l'interface air-GRIN à l'extrémité distale de la sonde. On remarque également des artefacts se répétant le long de la zone sélectionnée. Ces artefacts sont des échos générés par la saturation de la gaine protectrice. L'amplitude des réflexions est normalement bien plus élevée que le signal issu de l'échantillon. Un déplacement adéquat du bras de référence permet d'ajuster la position de ces échos pour éviter qu'ils ne soient trop apparents dans nos images. L'utilisation d'une seule longue GRIN réduirait la complexité de l'assemblage et aurait pour effet d'éviter quatre interfaces (air-verre). Toutefois, ce changement aurait également pour effet de fragiliser la sonde. Des mécanismes additionnels seraient souhaités pour augmenter la rigidité de la sonde endoscopique comme par exemple des tubes en fibre de carbone.

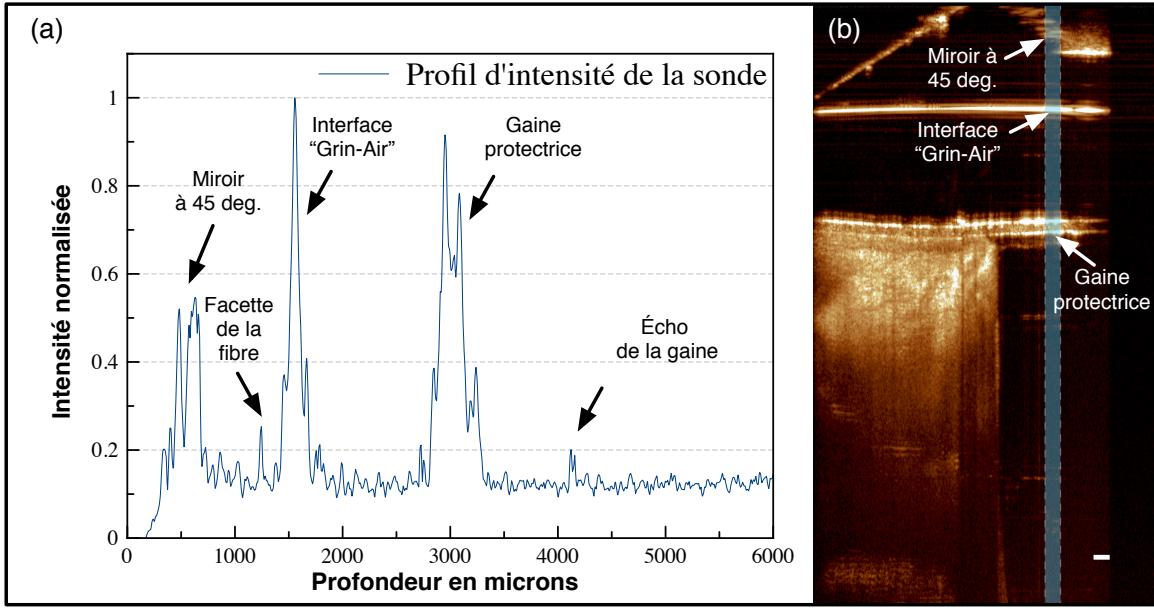


Figure 5.19 Artéfacts liés aux réflexions internes dans la sonde endoscopique. Profil d'intensité en fonction de la profondeur (a) provenant de la région encadrée dans l'image OCT (b).

## Calibration

La calibration d'instruments d'endoscopie se fait par l'entremise de mires standardisées. L'OCT étant relativement nouvellement établie cliniquement, aucun standard n'a encore été adopté [Tearney *et al.* (2012)]. L'objet de calibration permet d'une part, d'optimiser le signal à une profondeur souhaitée, avec un ajustement des optiques (lentilles, iris et miroir de référence), et d'autre part, d'évaluer le rapport signal sur bruit (RSB) du système. Tel qu'illustré à la Figure 5.20a, la sonde est déposée horizontalement sur l'objet de calibration. Ensuite, le balayage du faisceau permet de générer les images mode B montrées à la Figure 5.20b. La première interface, tout en haut de l'image OCT, correspond à la gaine de protection utilisée en salle opératoire. Elle est suivie par la couche diffusante de polyuréthane mélangé au dioxyde de titane ( $TiO_2$ ). Enfin, la dernière surface correspond à l'interface de référence. Plus on s'éloigne de la distance focale (fixée à 1 mm de la pointe de la sonde) plus on assiste à la dégradation de la résolution, visible par un élargissement des plateaux. C'est équivalent à l'élargissement de la réponse impulsionnelle (fonction d'étalement), dévoilé par les simulations effectuées sous Zemax à la section 5.2. L'objet de calibration a été légèrement incliné pour minimiser les réflexions spéculaires. Une deuxième version d'objet de calibration est en cours de réalisation avec une surface moins réfléchissante.

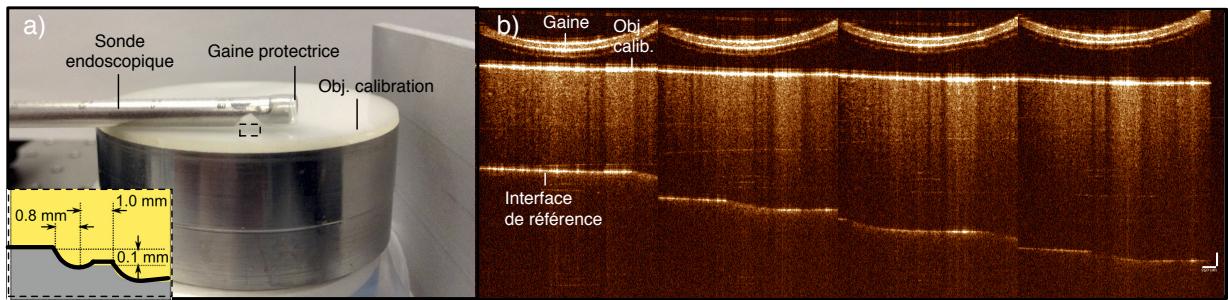


Figure 5.20 Calibration de la sonde endoscopique. Positionnement de la sonde sur l'objet de calibration (a) et image OCT de l'objet de calibration.

La Figure 5.21 illustre la dégradation du RSB en fonction de la distance qui sépare la sonde du tissu biologique (doigt). Le RSB représente l'intensité maximum de la surface par rapport à l'écart type du bruit de l'arrière-plan, énoncé à la relation 5.4. Les mesures obtenues sont calculées à partir d'une seule image acquise à la vitesse de 60 Hz.

$$\text{RSB} = 20 \log_{10} \left( \frac{\max_{\text{int}}}{\sigma_{\text{bruit}}} \right) \quad (5.4)$$

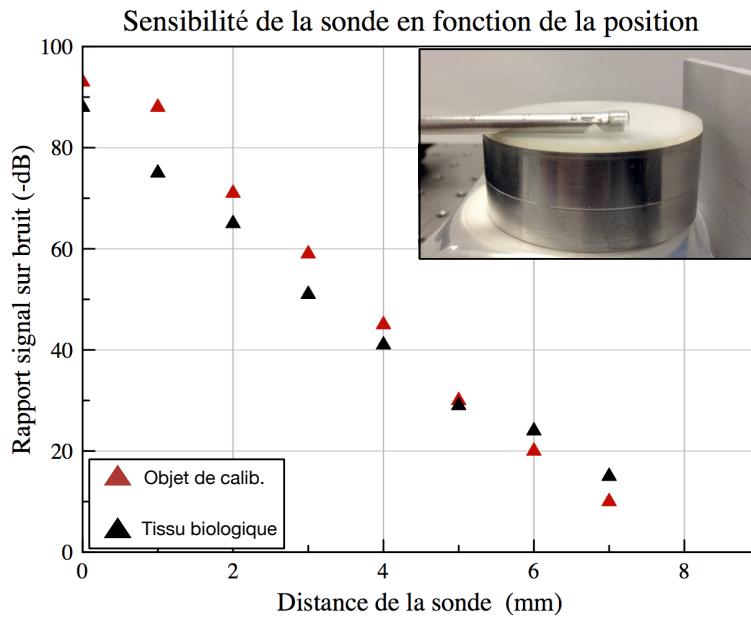


Figure 5.21 Mesure de sensibilité de la sonde évaluée à plusieurs distances à partir de la première interface d'un objet de calibration et d'un tissu biologique (doigt).

## 5.6 Discussion

Dans ce chapitre, nous avons décrit les enjeux et le contraintes associées au développement d'une sonde endoscopique pour la laryngologie pédiatrique. Le design proposé répond aux besoins cliniques identifiés a priori ainsi qu'à ceux découverts en cours de route. Le système OCT développé pour l'endoscopie peropératoire des cordes vocales pédiatriques permet d'imager de façon non invasive la corde vocale en particulier la région centrale d'une grande importance clinique. Le système a une résolution et une sensibilité adéquates, un champ de vision suffisant et une vitesse d'acquisition rapide.

Le diamètre externe de 3.7 mm permet d'imager une grande partie de la clientèle pédiatrique allant de 3 mois à 17 ans. Pour l'imagerie des nouveau-nés, la sonde doit être miniaturisée davantage (< 1,7 mm de diamètre) afin d'éviter d'obstruer les voies respiratoires. Cette tâche peut être réalisée en utilisant des lentilles GRIN plus petites à la fois en diamètre et en longueur. Le mécanisme mécanique à mandrin proposé dans le design actuel peut s'adapter à plusieurs diamètres de sonde, un ajustement du bras de référence serait toutefois nécessaire. Une sonde entièrement fibrée est également une alternative à l'imagerie des nouveau-nés.

Bien que dans les deux cas le champ de vision soit considérablement réduit, chez de très jeunes enfants, la taille de la corde vocale est également beaucoup plus petite. Un champ de vue de l'ordre du millimètre serait suffisant pour capturer la région d'intérêt.

Malgré sa petite taille, la sonde est ergonomique. Elle possède des marques gravées au laser pour le positionnement et d'un mécanisme d'alignement laser efficace. La monture de rotation permet une sélection de l'axe d'acquisition (antérieur-postérieur ou supérieur-inférieur) indépendamment de l'angle de balayage. Ce degré de liberté additionnel s'avère extrêmement utile pour imager les deux cordes vocales en évitant que le chirurgien n'ait à induire une rotation de ses mains. Cet ajout important à la sonde endoscopique permet un alignement rapide avec le tissu d'intérêt. Les données s'avère ainsi beaucoup plus reproductible entre des acquisitions successives.

La modification d'un système commercial et un design itératif a permis d'aboutir à un système d'imagerie compact, robuste et très stable. Trois prototypes de sonde endoscopique ont été réalisés : chacun d'entre eux permettant d'apporter des changements importants au concept incluant les suggestions de l'équipe médicale. Par exemple, la conception initiale de la sonde prévoyait un manche pour la manipulation. Toutefois, il s'est avéré que le manche limitait la dextérité et la possibilité d'appliquer des micros mouvements du chirurgien. De plus, le nettoyage constant de la sonde avec de l'alcool a eu pour effet de faire apparaître des débris de peinture. Le dernier prototype utilise un revêtement en polyéthylène pour répondre à cette problématique. La Figure 5.22 permet de visualiser les prototypes réalisés durant le projet.

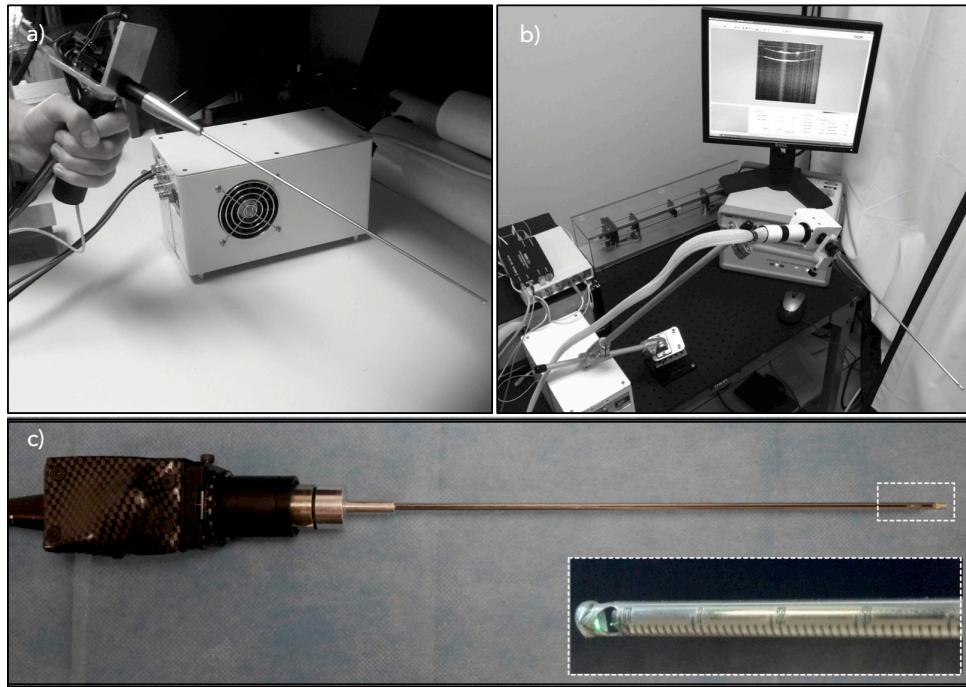


Figure 5.22 Itération des sondes OCT. (a) Prototype initial, (b) deuxième prototype avec manche et (c) troisième prototype avec graduation et sans manche doté d'un laser de positionnement visible.

Cependant, malgré l'atteinte des spécifications (résolution, contraste et vitesse d'acquisition), la sonde souffre d'artéfacts de saturation (c'est-à-dire lignes verticales qui chevauchent le signal venant de l'échantillon). Ces rétro-réflexions proviennent de la gaine protectrice. Cette gaine jetable augmente l'efficacité en salle d'opération (facilité de stérilisation), toutefois elle n'a pas été conçue pour l'imagerie dans l'infrarouge. La disponibilité des gaines éthylène-propylène fluorées (FEP), serait bénéfique pour l'imagerie OCT. Car elles permettent une transmission plus élevée de la lumière dans le proche infrarouge.

D'autres composants optiques pourraient également être améliorés. La focalisation sur le plan image n'est pas parfaite pour toutes les longueurs d'onde. L'utilisation d'une lentille triplet pour remplacer la lentille objectif de la sonde, avant le relai des GRIN, pourrait contribuer à diminuer les aberrations observées. De plus, le fini de surface optique est une tâche difficile à accomplir. Les micro-miroirs sont difficiles à machiner à la polisseuse. Des 16 micro-miroirs réalisés, 50% d'entre eux ont été écartés. La contamination de la surface durant le transport, avant la déposition, est principalement la cause du haut taux de rejet. Le LMF a récemment fait l'acquisition d'une polisseuse sur place ce qui permettrait d'éviter la manipulation des

pièces et réduirait les risques de contamination.

Malgré la portabilité du système, le déplacement entre la salle de laboratoire et la salle d'opération (ascenseur pour changer d'étage) implique de nombreuses vibrations durant le trajet et requiert parfois une optimisation du signal OCT avec l'alignement du faisceau dans le bras de référence. Il serait souhaitable d'automatiser le processus d'optimisation du signal OCT. Une boucle de rétroaction selon l'intensité du signal au plan focal pourrait être une solution envisageable.

Les GRIN de 2.7 mm diamètre demeure fragile, un tube externe de moins de 800 microns d'épaisseur ne permet pas d'avoir suffisamment de rigidité en flexion. Une tentative a été réalisée avec un tube externe de 3.2 mm, tel qu'illustré à la Figure 5.23, soit une épaisseur de 400 microns et les GRIN ne résistent pas à la courbure imposée par la légère pression du tube sur la corde vocale. Réduire le diamètre externe du tube pourrait être réalisé avec un tube plus résistant (acier inoxydable renforcé).

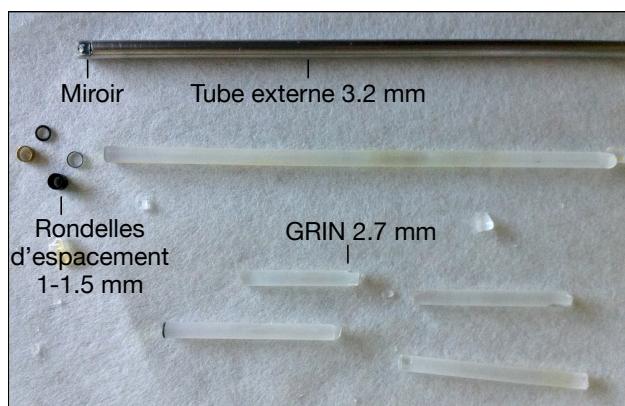


Figure 5.23 Lentilles GRIN exposées à une flexion avec un tube externe inférieur à 800 microns d'épaisseur.

La sonde compacte OCT offre un potentiel unique pour la visualisation des cordes vocales de façon non invasive. Bien que les spécifications techniques soient respectées, ultimement ce sont les expériences intraopératoires qui permettent d'évaluer adéquatement l'outil clinique proposé. Ces expériences sont décrites aux chapitres suivants.

## CHAPITRE 6 ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DES CORDES VOCALES À PARTIR DE L'IMAGERIE OCT INTRAOPERATOIRE

Le design du système et les techniques de fabrication et d’assemblage ont été justifiés au chapitre précédent. Ultimement, l’évaluation des performances de l’instrument prend son sens dans le cadre clinique. Au cours de ce projet, plusieurs expériences ont été réalisées en milieu hospitalier. Le présent chapitre décrit dans un premier temps une méthodologie pour acquérir systématiquement des volumes OCT de la région d’intérêt. Une fois cette méthodologie développée et maîtrisée, il est enfin possible d’entamer les premières études cliniques rigoureuses sur les cordes vocales pédiatriques. L’étude a pour objectif précis d’évaluer une stratégie permettant d’identifier et de quantifier le développement vocal à partir de données OCT intraopératoires. Est-ce que l’OCT permet de détecter des différences entre une corde vocale chez de jeunes enfants et celle chez des adolescents ? Est-ce que les descripteurs identifiés dans la phase *ex vivo* sont applicables en mode intraopératoire ? Ce chapitre tente de répondre à ces questions.

### 6.1 Introduction

Le nombre restreint d’échantillons cadavériques pédiatriques limite considérablement l’étendue des études possibles ainsi que notre compréhension de la microanatomie de la corde vocale. La capacité d’obtenir de l’information de façon totalement non invasive avec l’OCT permet de poser et d’explorer de nouvelles hypothèses sur le développement vocal. Pour ce faire, un outil pour caractériser le développement des cordes vocales en laryngologie pédiatrique serait un atout. Jusqu’ici, il est convenu que la muqueuse de la corde vocale adulte possède trois couches distinctives, principalement subdivisée selon la nature et la concentration en collagène et élastine : les couches superficielle, intermédiaire et profonde [Hirano (1975)]. La variété des voix humaines selon l’âge et entre l’individus serait tributaire d’une différence dans cette structure trilaminaire. Des études histologiques ont démontré que la lamina propria ne possède qu’une seule couche à la naissance et qu’à l’âge de dix ans celle-ci est bilaminaire. La transition vers une structure trilaminaire est complétée durant l’adolescence [Hartnick et Zeitels (2005)]. Le parcours de cette structure en développement pour arriver enfin à maturité est toujours incompris. Est-ce un développement linéaire ou bien passe-t-il par des sauts quantiques ? Les captures singulières de quelques échantillons ne permettent

malheureusement pas d'identifier le modèle de progression de cette couche anatomique. Il serait souhaitable qu'une technique puisse apporter une source d'informations additionnelles sur le développement de cette structure. Ces informations critiques pourraient contribuer à l'élaboration de stratégies de traitement adapté à la population pédiatrique.

## 6.2 Protocole intraopératoire

C'est dans ce contexte, que l'imagerie OCT intraopératoire a été réalisée sur de jeunes enfants et des adolescents. Tous les patients évalués dans le cadre de cette étude ( $n = 20$ ) ont reçu une description détaillée des expérimentations envisagées et des formulaires de consentement ont été remis aux parents et aux enfants avant la procédure. L'approbation de cette étude a été obtenue auprès du comité d'éthique de l'École Polytechnique de Montréal et du Massachusetts Eye and Ear Infirmary à Boston. Les candidats ont été recrutés parmi les patients subissant une bronchoscopie ou une chirurgie mineure et n'indiquaient aucun historique de pathologies laryngées. Les patients sont regroupés selon leur âge pour former deux groupes distincts. Le premier groupe ( $n = 10$ ) représente les jeunes enfants dont l'âge se situe de 7 mois à 2 ans et le second groupe ( $n = 10$ ) représente des adolescents dont l'âge varie de 11 à 16 ans.

Les premiers cas cliniques ont permis au chirurgien et à l'équipe de se familiariser avec la sonde endoscopique et de raffiner le protocole clinique. Il s'agit d'une dizaine d'étapes exécutées dans un ordre précis afin de faciliter et encadrer l'acquisition intraopératoire. Ces étapes sont exposées en Annexe B. On retrouve, entre autres, la procédure d'allumage du laser, de strétilisation et du transfert de la sonde au chirurgien. Le déroulement typique consiste à préparer et configurer le système quelques minutes avant le début de la séance intraopératoire. Le chariot est placé de façon à permettre au chirurgien de visualiser facilement le moniteur.

Les patients sont positionnés en suspension comme pour une intervention en laryngoscopie directe, telle qu'illustré à la Figure 6.1a. Un laryngoscope permet de relever la langue et l'épiglotte afin d'offrir un champ de vue complet du larynx. La tête du patient est alors légèrement suspendue et le chirurgien a la possibilité d'utiliser ses deux mains pour procéder à l'intervention. Celle-ci est réalisée sous anesthésie générale. Un suivi particulier est accordé à la console des signes vitaux, visible en tout temps à l'anesthésiste et le corps médical. La Figure 6.1b illustre le déroulement de l'insertion des instruments médicaux. Le bronchoscope est d'abord introduit par l'ouverture offerte par le laryngoscope. Il est placé tout juste à l'entrée du larynx et offre un champ de vue du larynx. Ensuite, la sonde est glissée dans la cavité orale jusqu'à la partie centrale des cordes vocales.

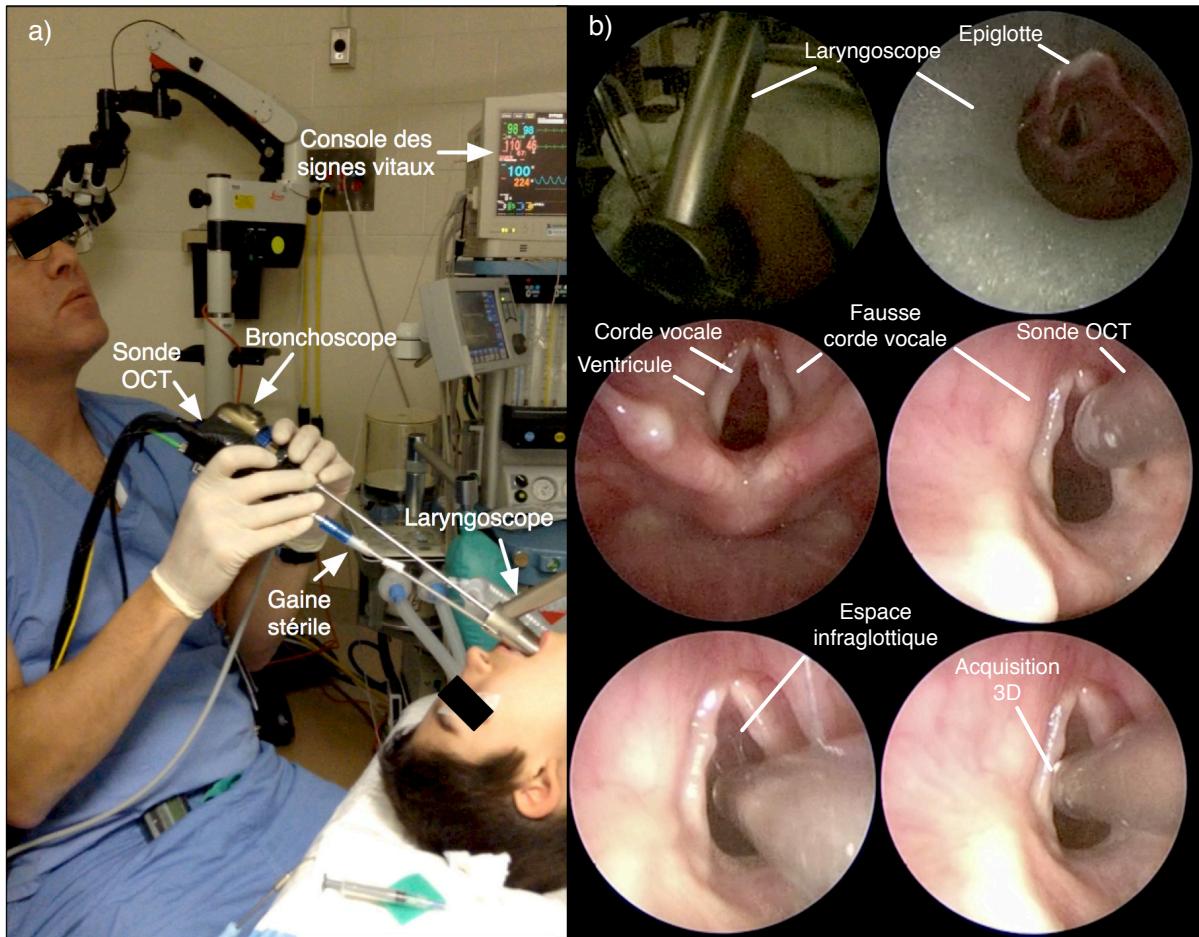


Figure 6.1 Séance d'imagerie OCT intraopératoire pendant une microlaryngoscopie en suspension. Disposition des instruments chirurgicaux pour l'acquisition d'un volume OCT de la vraie corde vocale gauche d'un patient masculin de 16 ans (a). Séquence d'imagerie peropératoire de la glotte (b) avec insertion des outils endoscopiques et le positionnement de la pointe de la sonde dans la zone infraglottique avant d'appuyer la pointe légèrement sur le tissu pour l'acquisition 3D.

La procédure de positionnement de la sonde endoscopique OCT sur la région d'intérêt est essentielle. Elle assure une stabilité et une répétabilité des données recueillies. La Figure 6.2 illustre la méthodologie développée dans le cadre du projet. La sonde OCT est initialement placée au centre antéropostérieur, tout juste sous la corde vocale, littéralement dans la région infraglottique. La fenêtre d'imagerie est légèrement en contact avec le tissu. Elle est placée perpendiculairement au bord libre de la partie du pli vocal. Sous visualisation directe ou sous l'assistance vidéo, la sonde est ensuite déplacée lentement dans la direction supérieure à la zone infraglottique, vers la cavité buccale. Le mouvement rectiligne du chirurgien permet de

traverser et visualiser entièrement la zone d'intérêt, jusqu'à l'apparition du ventricule dans les images OCT. C'est à ce moment précis que l'enregistrement 3D est déclenché.

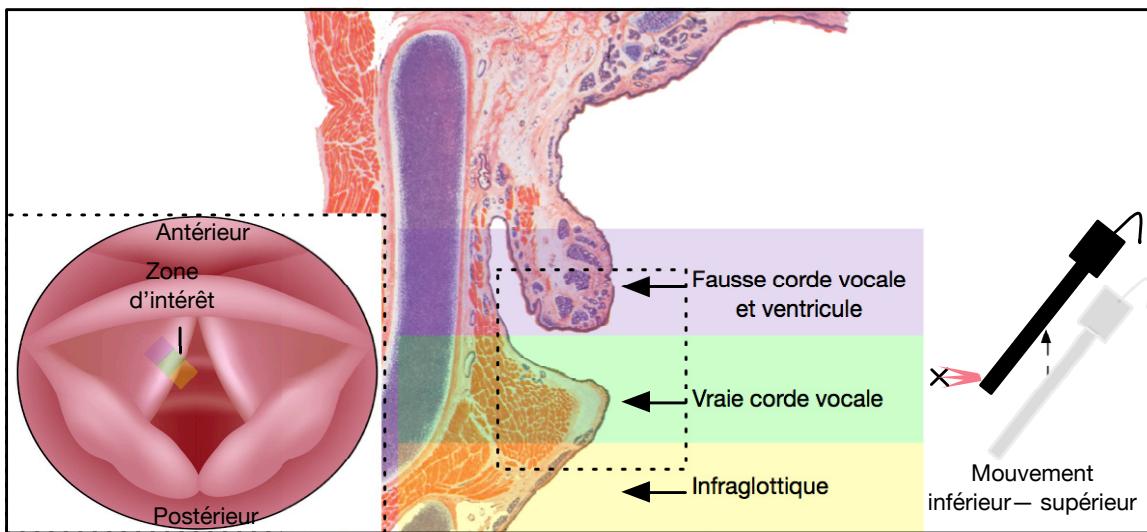


Figure 6.2 Schéma anatomique et positionnement de la sonde portable OCT pendant la procédure d'acquisition. La sonde est initialement positionnée au centre de la corde vocale sur l'axe antérieur postérieur dans la zone infraglottique. La sonde est ensuite déplacée supérieurement vers la vraie corde vocale où l'acquisition 3D est déclenchée. Image histologique tirée de Feldman (2015).

Les acquisitions OCT sont effectuées sur la corde vocale droite dans un premier temps, suivies de la corde vocale gauche. Chaque volume possède une dimension de 2 mm x 2 mm x 7 mm. Afin de s'assurer de capturer la zone d'intérêt, un champ de vue en profondeur de 7 mm est capturé. Ce balayage permet de récupérer un maximum de photons balistiques. Un fenêtrage des données est par la suite effectué, c'est-à-dire que les données sont rognées afin de ne conserver que la partie du champs de vue contenant la corde vocale. Bien que l'imagerie de chaque volume prenne 18 secondes à compléter, la procédure complète (positionnement et acquisition) prend environ 2 minutes. Immédiatement après l'imagerie OCT, le traitement initial prévu est réalisé.

Cette marche à suivre est exécutée sur l'ensemble des patients âgés de 7 mois à 16 ans.

### 6.2.1 Analyse des images

L'analyse des images OCT in vivo permet, d'une part, de valider les réalisations ex vivo en ce qui a trait au contraste des structures anatomiques observées de la voie aérodigestive et, d'autre part, elle permet d'établir des valeurs normatives pour les dimensions et la caractérisation de la microstructure des cordes vocales observé chez les deux groupes de population.

La caractérisation de la lamina propria de la vraie corde vocale, à partir des données OCT, est effectuée sous imageJ [Schneider *et al.* (2012)]. Un prétraitement est appliqué afin d'isoler la région d'intérêt tel qu'illustré à la Figure 6.3. Une région rectangulaire représentative de la lamina propria est extraite sur chaque échantillon, près du pli vocal. Chaque rectangle analysé est un ensemble de «lignes-A» qui représente le signal d'intensité de rétrodiffusion normalisé en fonction de la profondeur. La profondeur analysée identique pour les deux groupes et correspond à 2 mm. Les images de la gaine de protection et de la couche épithéliale, préalablement identifiées, sont retirées du signal original. Toutes les régions à forte saturation sont également exclues.

Étant donné que la longueur des cordes vocales est différente entre les deux groupes étudiés, la colocalisation des structures anatomiques entre les groupes d'âge est ajustée selon un facteur de proportionnalité. Ce facteur de proportionnalité est établi en fonction des études précédentes [Boseley et Hartnick (2006)]. La longueur de la corde vocale double entre l'enfance (7 mois à 2 ans) et l'adolescence (11 à 16 ans). Par conséquent, la taille de la région analysée et la distance où la zone est sélectionnée sont ajustées selon le groupe d'âge. Les dimensions latérales respectives de ces régions sont de 150 µm (64 lignes-A) et 300 µm (128 lignes-A). De plus, l'emplacement du début de la zone imagée à partir de la limite inférieure de la corde vocale est réglée à 300 µm pour les jeunes enfants et 600 µm pour les adolescents. La Figure 6.3 illustre l'emplacement des régions d'analyse pour le développement des cordes vocales. Les régions rectangulaires couvrent entièrement la lamina propria chez les deux groupes.

Finalement, afin de diminuer la présence du bruit dans les données, trois images consécutives ont été moyennées par patient avant d'être analysées.

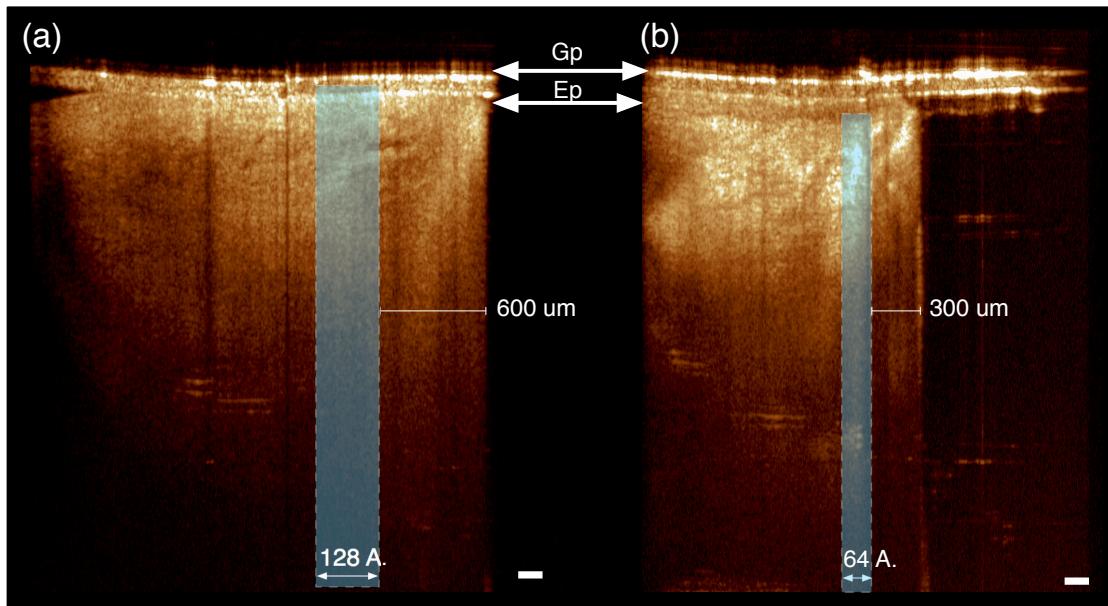


Figure 6.3 Zone d'analyse quantitative de la vraie corde vocale d'un adolescent (a) et d'un jeune enfant (b). Le rectangle représente la région analysée dans la lamina propria. Elle exclue la gaine protectrice et l'épithélium. Ep : épithélium ; Gp : gaine protectrice. Échelle : 200  $\mu\text{m}$  en (a) et (b).

### 6.2.2 Coefficients d'atténuation relatifs de la lamina propria

Les coefficients d'atténuation, représentant les propriétés intrinsèques de la lamina propria, sont extraits des lignes-A des images obtenues.

Afin de comparer adéquatement les deux groupes de patients, les profils d'atténuation ont été analysés selon trois sections en profondeur. L'emplacement des sections est obtenu à partir des pentes distinctives du groupe d'adolescents (11 -16 ans).

Les coefficients d'atténuation relatifs à chaque patient sont calculés à partir d'une régression linéaire sur chaque zone. Au-delà de la troisième zone, le signal est considéré comme du bruit provenant de diffusion multiple. Ces valeurs sont par la suite divisées par un facteur (-2), conformément au modèle de Beer-Lambert [Sec.3.7.1].

Une analyse statistique des coefficients d'atténuation relatifs est effectuée à l'intérieur de chaque groupe d'âge avec un modèle mixte. Cependant, pour analyser la relation entre les groupes d'âge une analyse statistique ANOVA [Fisher (1925)] a été réalisée et l'analyse des

zones entre elles est effectuée avec la méthode de Kramer.

### 6.3 Résultats

Dans un premier temps, les images sont analysées qualitativement afin de valider les observations obtenues ex vivo. Une cartographie in vivo du larynx pédiatrique est présentée. Ensuite, les résultats de l'analyse quantitative avec les coefficients d'atténuation relatifs des deux groupes (jeune enfant et d'adolescent) est révélée.

#### 6.3.1 Cartographie optique du larynx pédiatrique

Une cartographie de la voie aerodigestive est initialement obtenue avec un balayage des structures anatomiques du larynx (infraglottique, vraie corde vocale et la fausse corde vocale). Il s'agit du repérage OCT 2D standard, avant le déclenchement de l'acquisition tridimensionnelle. Une séquence 2D typique d'une acquisition OCT de la partie aérodigestive est illustrée à la Figure 6.5. Le parcours de la sonde est d'environ 10 mm, à partir de la région inférieure (infraglottique) et traverse la vraie corde vocale pour atteindre le ventricule et la fausse corde vocale (de gauche à droite de l'image de la Figure 6.5).

Les images OCT de ces zones et des transitions entre elles permettent de faciliter le repérage des structures anatomiques. Les vidéos des séquences endoscopiques peropératoires sont fortement utiles et permettent de bâtir cette carte de correspondances entre les deux modalités.

La Figure 6.4a illustre une vue intraopératoire du larynx chez un sujet masculin de 9 ans en bonne santé avec aucune pathologie apparente sur les cordes vocales. La sonde est en contact et positionnée à la mi-hauteur de la corde vocale droite [Fig.6.4b]. Malgré que la sonde ne fasse que quelques millimètres de diamètre, elle obstrue 50% des voies aériennes. Cette proportion devient plus grande chez de jeunes enfants. Étant donné que la partie d'intérêt est au centre de la corde vocale, et que la procédure se déroule rapidement, il est possible d'imager la structure sans trop de difficulté.

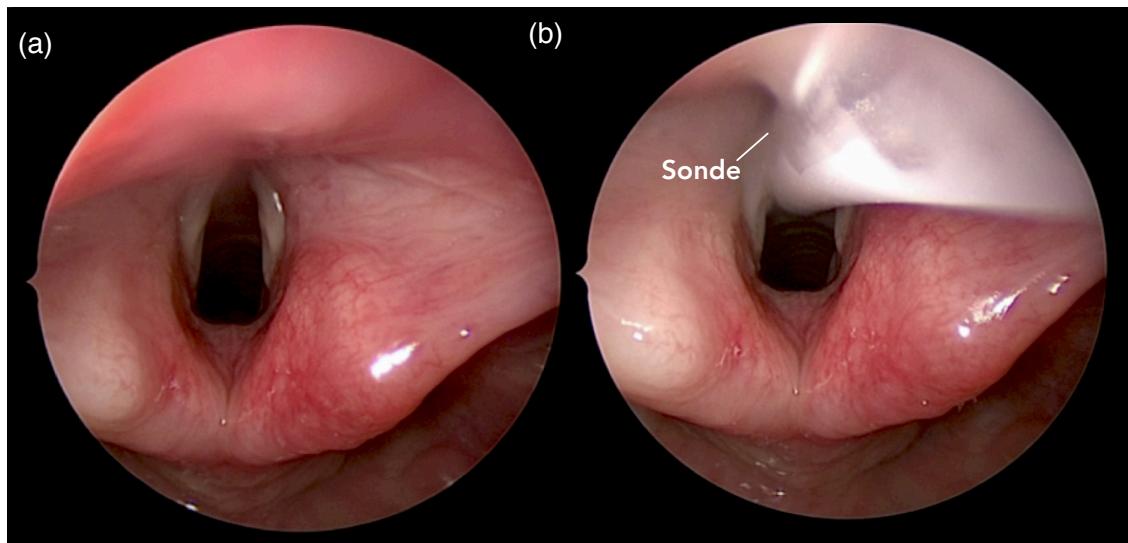


Figure 6.4 Vue endoscopique peropératoire de la glotte d'un sujet sain masculin de 9 ans sans (a) et avec (b) la sonde portable OCT.

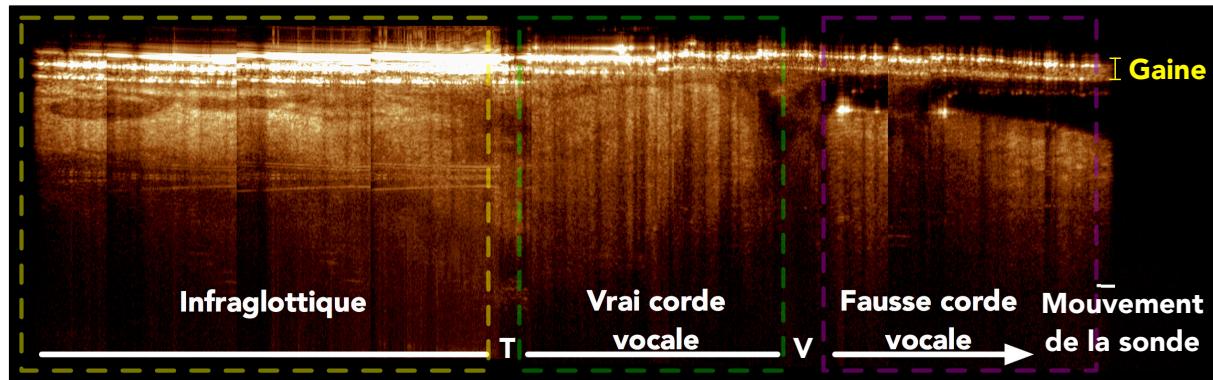


Figure 6.5 Collage d'une acquisition 2D. La sonde OCT est lentement déplacée supérieurement à partir de la région infraglottique des voies aériennes. La première interface indique la gaine stérile utilisée. T : transition infraglottique et vraie corde vocale ; V : ventricule ; Échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

L'interprétation sur la localisation de la sonde dans le larynx, strictement à partir des images OCT, est un atout essentiel. Les particularités de chacune des régions permettent de différencier la région d'intérêt et cibler plus précisément la vraie corde vocale. Les caractéristiques distinctives sont détaillées dans les sections suivantes.

## Région infraglottique

Le Figure 6.6 illustre une représentation typique d'une projection tridimensionnelle OCT obtenue à partir de la région infraglottique, tout juste inférieure à la vraie corde vocale. On remarque que l'épaisseur de la couche épithéliale (de l'ordre de 80 µm) est relativement constante le long de cette région. Elle est suivie par une couche hyper-refléchissante : la couche supérieure de la lamina propria. Cette couche comprend plusieurs variations d'intensité en fonction de la profondeur. On remarque des zones sombres et principalement distribuées dans le centre de la lamina propria. Celles-ci indiquent la présence potentielle de structures glandulaires. La lamina propria de la région infranglottique est reconnue pour une concentration élevée de glandes séreuses permettant une lubrification adéquate de la muqueuse. Les limites supérieures et inférieures de lamina propria sont visibles, ce qui permet d'identifier la transition vers le muscle thyro-aryténoïdien. Toutefois, à cette profondeur ( $>2$  mm), l'interprétation des images est plus difficile à accomplir étant donné le faible rapport signal sur bruit.

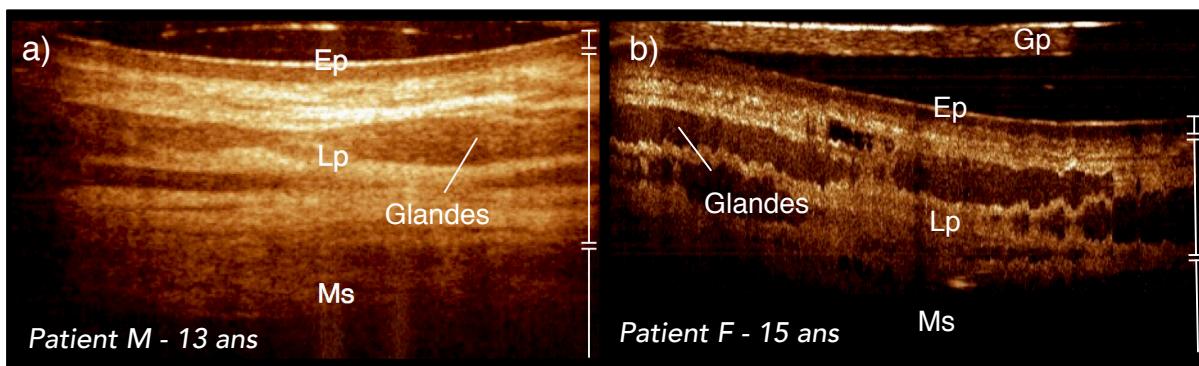


Figure 6.6 Représentation typique d'une projection OCT de la région infraglottique chez des patients sains de 13 ans (a) et 15 ans (b). Les glandes séreuses sont très présentes dans la lamina propria, ce qui se traduit par un changement brusque d'intensité dans cette région. Gp : gaine protectrice ; Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; Ms : muscle vocal.

Tous les patients observés affichent une transition nette entre l'espace infraglottique et la vraie corde vocale. Les images obtenues, ici sur d'autres sujets sains de 9 ans [Fig.6.7a] et 12 ans [Fig.6.7b], affichent clairement une différence structurelle entre la région infraglottique et la vraie corde vocale. Cette transition est marquée par la disparition de ces glandes séreuses. De plus, la lamina propria, à cet endroit précis, semble s'accroître en profondeur.

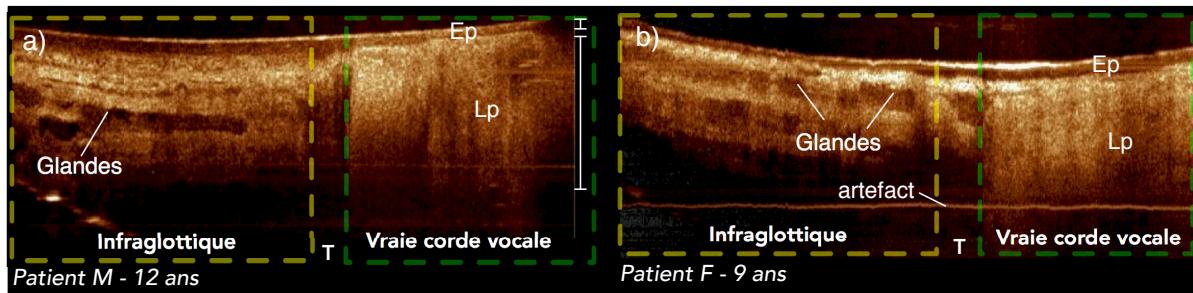


Figure 6.7 Représentation typique d'une projection OCT de la région de transition entre l'espace infraglottique et la vraie corde vocale chez des patients sains de 9 ans et 12 ans. Cette transition semble indiquer un changement de configuration dans la lamina propria. T : transition ; Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; Ms : muscle vocal.

### La vraie corde vocale

L'apex de la vraie corde vocale est identifié à l'aide du ventricule (V). Les images OCT obtenues à partir de la vraie corde vocale révèlent une couche épithéliale très fine, de l'ordre de 50 microns, comparativement aux structures environnantes. L'étude quantitative de la microstructure vocale, sujet de la prochaine section, semble généraliser cette observation à l'ensemble des sujets observés jusqu'à présent. La lamina propria de la vraie corde vocale est beaucoup plus homogène que celle de la région infraglottique, aucune glandes séreuses n'y est observée. De plus, la lamina propria est plus hyper-réfléchissante dans les premières centaines de microns de profondeur. Par la suite, l'intensité décroît graduellement. La région musculaire semble être à la limite d'un rapport signal sur bruit suffisant pour distinguer sa présence. Cette observation corrobore les résultats des expériences ex vivo réalisées et décrites au chapitre 3.

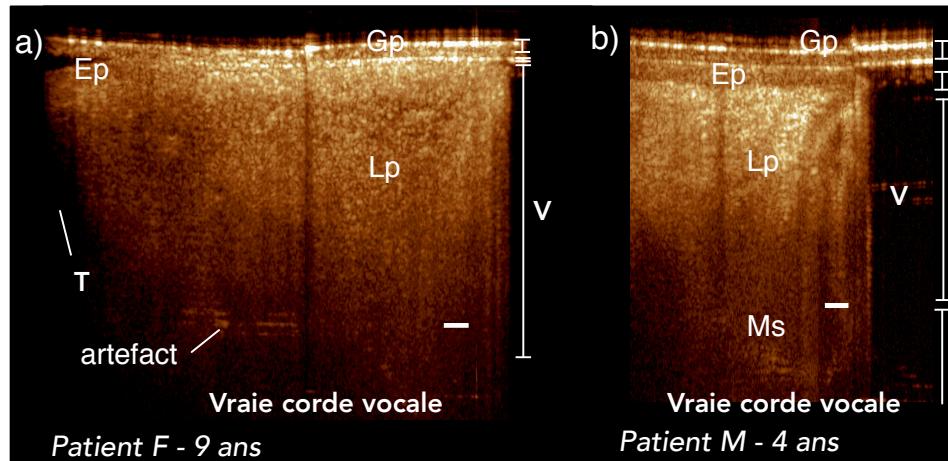


Figure 6.8 Représentation typique de la vraie corde vocale. Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; Ms : muscle vocal ; V : ventricule ; Gp : gaine protectrice. T : transition. - Échelle : 200 µm en (a) et (b).

### La fausse corde vocale

La région de la fausse corde vocale est caractérisée par une couche épithéliale qui s'épaissit vers la zone supérieure du larynx (vers la droite de la figure). De plus, la lamina propria semble peu réfléchissante contrairement à la vraie corde vocale. Enfin, la fausse corde vocale comprend quelques glandes superficiellement placées dans la lamina propria.

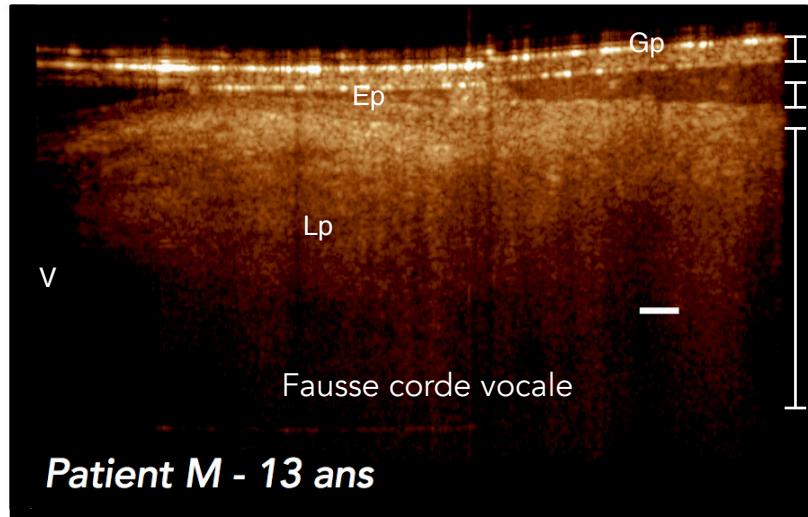


Figure 6.9 Représentation typique d'une fausse corde vocale. Ep : épithélium ; Lp : lamina propria ; V : ventricule ; Gp : gaine protectrice. Échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

#### 6.4 Dimensions des microstructures des cordes vocales

Les valeurs morphométriques des couches des cordes vocales sont extraites à partir des images OCT. Les dimensions de l'épithélium et de la lamina propria sont évaluées et comptabilisées pour chacun des patients à l'aide du logiciel VazQt. Les données sont ensuite regroupées selon le groupe d'âge : jeunes enfants (0 à 2 ans) et adolescents (11 à 16 ans).

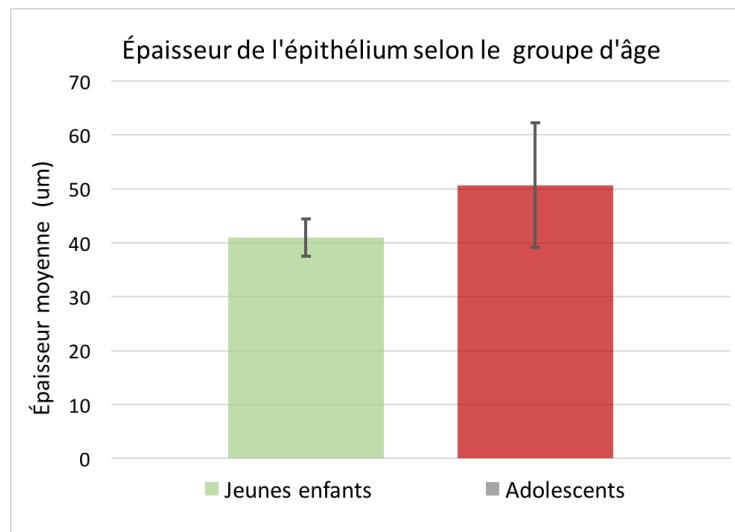


Figure 6.10 Épaisseur des couches vocales obtenue à partir des images intraopératoires OCT.

L'épaisseur moyenne de la couche épithéliale est légèrement plus grande chez les adolescents. L'écart type semble toutefois exprimer une variabilité plus accrue chez les adolescents (11 à 16 ans) que chez les jeunes enfants (0 à 2 ans). En ce qui concerne la lamina propria, il est plus difficile d'identifier le plateau inférieur (la fin de la lamina propria) avec certitude chez un bon nombre de patients (45%, n=20).

## 6.5 Analyse quantitative de la lamina propria entre jeunes enfants et adolescents

Les profils d'intensité de chaque population pédiatriques : jeunes enfants et adolescent sont illustrés à Figure 6.11. Afin de comparer adéquatement les deux groupes, les profils d'atténuation ont été segmentés en profondeur (zone 1,2,3). Ces zones sont obtenues à partir des pentes distinctives du groupe d'adolescent (11 -16 ans).

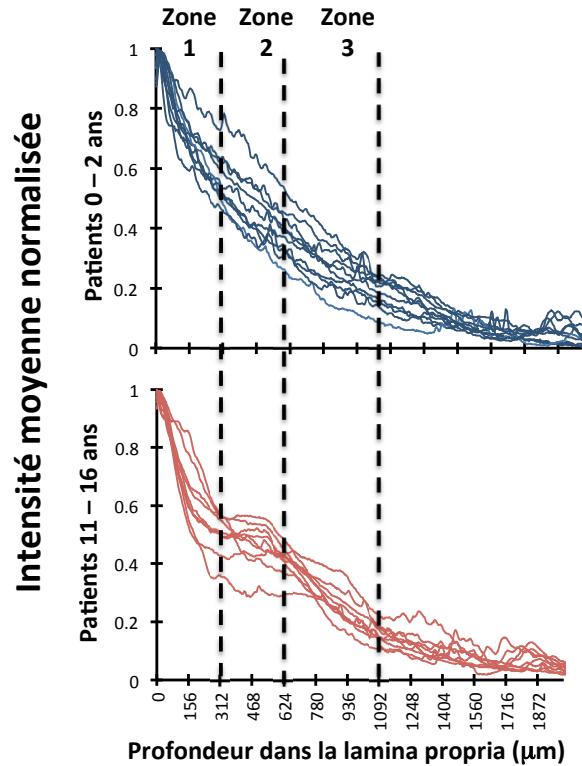


Figure 6.11 Profils d'atténuation de deux populations pédiatriques. Les courbes sont illustrées en fonction des zones (1,2,3) représentative des pentes distinctives du groupe d'adolescent.

Les coefficients d'atténuation relatifs sont ensuite comptabilisés et illustrés à la Figure ??.

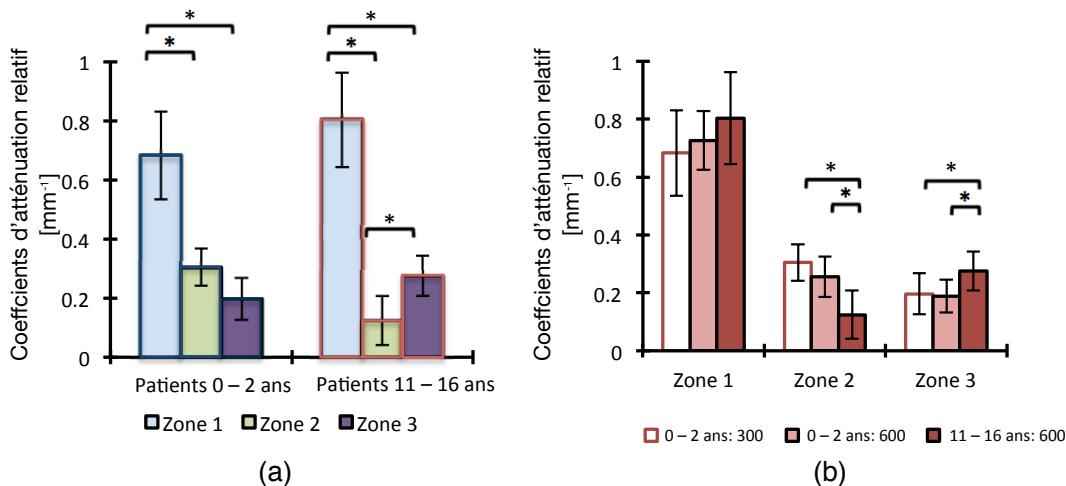


Figure 6.12 Coefficients d'atténuation relatif selon l'âge (a) et la zone (b). En (b) l'analyse sur le groupe 0 - 2 ans s'est faite à 300 μm et à 600 μm de distance à partir du ventricule.

Les coefficients d'atténuation relatifs de la zone 1 des jeunes patients sont statistiquement différents de ceux des zones 2 et 3 ( $p < 0.0001$ ) pour ce groupe d'âge. Toutefois, pour les zones 2 et 3 les coefficients d'atténuation ne sont pas statistiquement différents ( $p = 0.1129$ ).

En ce qui concerne le groupe d'adolescent, la zone 1 est également statistiquement différente de la zone deux et trois ( $p < 0.0001$ ). Toutefois, contrairement au premier groupe, la zone 2 est statistiquement différente de la zone 3 ( $p = 0.0370$ ).

Lorsque nous comparons les zones entre les deux populations, les coefficients d'atténuation relatifs sont statistiquement différents dans les zones deux et trois ( $p < 0.0001$ ,  $= 0.0315$ ), mais pas la zone 1 ( $p = 0.1438$ ).

Afin de s'assurer que la région d'analyse à partir du ventricule ne cause pas d'effet sur les profils des jeunes patients, une sélection de la région d'intérêt à 600 microns du ventricule a été analysée. Cette analyse des coefficients d'atténuation en fonction de la distance du ventricule n'a aucun effet sur les valeurs des coefficients d'atténuation relatifs ( $p = 0.7579$ ,  $0.2944$ , et  $0.9601$  pour les zones 1, 2, et 3 respectivement) [Fig.6.12b]. La zone 1 est toujours distincte de la région 2 et trois ( $p < 0.0001$ ) tandis que les zones 2 et 3 sont toujours statistiquement non distinctes ( $p = 0.1955$ ). Lorsque elle est comparée avec les patients plus âgés, la zone 1 reste statistiquement non distincte et les zones deux et trois restent statistiquement différentes ( $p = 0.0011$ ,  $p = 0.0168$ , respectivement).

## 6.6 Discussion

L'objectif principal consiste à quantifier le développement de la microstructure de la corde vocale. Jusqu'ici les cordes vocales pédiatriques ont été analysées sur une base histopathologique. Le nombre restreint d'échantillons pédiatriques cadavériques et la qualité des échantillons post-mortem rendent les études de cette microstructure très difficile à réaliser. Un système d'imagerie non invasif pour l'observation des cordes vocales offre la possibilité d'explorer cette structure sous une perspective nouvelle. Cependant, la transition en clinique d'une nouvelle modalité d'imagerie requiert un protocole et une stratégie efficace pour la collecte des données *in vivo*.

Une période d'apprentissage s'est avérée très utile pour raffiner le protocole clinique. Quelques cas ont été requis avant d'atteindre une certaine efficacité en salle opératoire. Par exemple, l'installation de la gaine protectrice demande un certain niveau de dextérité et de la minutie.

Celle-ci doit être installée rapidement, quelques secondes avant le début de la procédure afin de minimiser les risques de contamination.

L'utilisation d'une source rapide VSCEL facilite l'acquisition des données en chirurgie. La région d'intérêt est entièrement capturée, en 3D, dans un laps de temps cliniquement acceptable. Le temps requis pour le positionnement et l'acquisition des données correspond à une minute par corde vocale. Ces valeurs avaient été estimées au départ à 35 secondes, toutefois les précautions additionnelles pour assurer un bon déroulement augmentent légèrement les estimations prévues. Il est à noter qu'aucune difficulté technique ou complication clinique n'est survenue au cours de l'étude intraopératoire.

Étant donné le champ de vue restreint en salle opératoire, il s'est avéré rapidement très difficile, sans une méthodologie claire, d'obtenir systématiquement des images semblables sur des acquisitions successives. La surface d'intérêt est de l'ordre de 1 à 4 mm<sup>2</sup> sur une surface qui s'étend à plus de 50 mm<sup>2</sup>. La stratégie développée permet d'identifier la région de transition à partir d'un balayage 2D du larynx. Cette région représente une différence structurelle entre la zone infraglottique et la vraie corde vocale. La disparition des structures apparente à des glandes salivaires et le changement de l'épaisseur de la lamina propria sont des indices qui permettent de localiser la région d'intérêt.

Les expériences intraopératoires ont permis d'exposer les limites de l'épithélium et de la lamina propria. Tout comme chez les spécimens ex vivo, il existe au sein de chaque cas pédiatrique rencontré une section épithéliale beaucoup plus fine, précisément à la région de contact entre les cordes vocales. Cette région, visible à l'OCT, est caractérisée par un épithélium pavimenteux stratifié. L'épaisseur de la couche épithéliale de la vraie corde vocale, comptabilisée chez les adolescents (11 à 16 ans) est 20% supérieure à celle des jeunes enfants (0 à 2 ans). Dans les images obtenues, il est toutefois difficile d'interpréter la fin de la lamina propria et le début du muscle (thyroarytenoidien). Des études histologiques précédentes suggèrent que l'épaisseur de la muqueuse varie de 750 µm à 1 mm entre 7 mois et 16 ans [Hirano K.S. (1983)]. À partir de ces données, il semble que la transition entre la muqueuse et le muscle se situe pratiquement dans la région de diffusion multiple. Toutefois, il est à souligner que ceci ne prend pas en compte les artéfacts de coupes qui pourraient augmenter l'épaisseur réelle de la lamina propria.

De plus, les coefficients d'atténuation relatifs nous permettent d'établir qu'il existe également une différence dans la lamina propria entre les deux groupes. Ces coefficients pourraient être un indicateur de signe de maturation dans les cordes vocales. La zone 1 observée chez les

sujets pourrait coïncider avec la couche dense de collagène présente tout juste sous la couche épithéliale. Chez les jeunes enfants, les zones 2 et 3 sont semblables tandis qu'elles sont différentes chez les adolescents. Ces observations pourraient suggérer que les zones 2 et 3 sont l'indication d'une couche dans la lamina propria. Les zones 2 et 3 seraient alors une piste intéressante pour évaluer la progression des coefficients relatifs d'atténuations durant l'enfance à l'adolescence. Cependant, sans l'histologie, il demeure difficile de confirmer ces observations. Plusieurs autres investigations sont nécessaires afin d'élucider le moment ou la différenciation des zones 2 et 3 à lieu.

Malgré les observations très prometteuses, le présent échantillonnage est de petite taille et ne permet pas de dresser une courbe précise du développement selon l'âge et le sexe du patient. Un bassin de patient plus grand serait souhaitable et pourrait contribuer à temporellement identifier l'émergence des zones. Pour l'instant, seulement deux groupes ont été analysés, de 7 mois à 2 ans et des patients de 11 à 16 ans. Toutefois, il serait intéressant d'étendre l'analyse à partir de la naissance à la fin de l'adolescence, donnant ainsi une représentation complète de la population pédiatrique.

## 6.7 Conclusion

Cette cartographie optique du larynx, obtenue *in vivo* chez différents groupes d'âge, permet d'accumuler un atlas d'images des cordes vocales. Ces images permettent de renforcer la capacité d'interprétation des structures laryngées. Une cartographie adéquate du larynx avec la stratégie de repérage développée consiste sans aucun doute en un jalon important pour la visualisation de la région d'intérêt et la comptabilisation des données statistiques fiables.

Malgré le nombre limité de patients étudié, les observations obtenues à partir des coefficients d'atténuation relatifs sur la lamina propria démontrent une relation quantitative entre l'âge et cette microstructure. Il serait intéressant de poursuivre cette analyse avec un échantillonnage plus élevé à partir de la naissance jusqu'à la fin de l'adolescence. Notre compréhension sur cette microstructure pourrait ainsi permettre d'évaluer et traiter plus efficacement les interventions chirurgicales aux cordes vocales.

## CHAPITRE 7 IMAGERIE DES CORDES VOCALES PATHOLOGIQUES

Les premières expériences intraopératoires ont permis de cartographier le larynx et de développer une procédure d'analyse systématique des cordes vocales pédiatriques saines à partir des images OCT. L'atlas des images de patients constitue une référence qui permet d'identifier et caractériser les cordes vocales pathologiques. Ce chapitre présente une étude réalisée sur l'apport de la tomographie par cohérence optique (OCT) au sein des pathologies bénignes pédiatriques. Il illustre la méthodologie et les résultats obtenus en salle opératoire.

### 7.1 Introduction

Le bon fonctionnement des cordes vocales est essentiel à la phonation, la déglutition et à la protection des voies respiratoires. Un dérèglement de cette structure provoque rapidement des conséquences notoires. La consultation chez le clinicien pour l'enrouement de la voix comprend l'analyse des antécédents médicaux du patient, une analyse auditive et une inspection visuelle du larynx. L'inspection peut s'effectuer au moyen d'un nasolaryngoscope en clinique ou à l'aide d'un bronchoscope rigide dans la salle d'opération. Selon les mouvements de la muqueuse, la fermeture glottique et les vaisseaux sanguins superficiels, les otolaryngologistes fondent un diagnostic et une stratégie de traitement pour le patient.

Bien que la visualisation des cordes vocales par endoscopie soit essentielle aux cliniciens, les images sont difficiles à interpréter. L'aspect superficiel (la morphologie, la coloration, la vascularisation) des structures du larynx dépend des conditions d'éclairage et de l'angle de la caméra. En outre, la plupart des pathologies se développent sous la couche épithéliale et demeurent invisibles aux techniques d'imagerie superficielles. Il est encore difficile de différencier ces lésions sous épithéliales d'un point de vue clinique et histologique [Wallis *et al.* (2004); Oates et Winkworth (2008)]. Prenons par exemple la surface extérieure des nodules et des kystes, elles sont relativement similaires. Elles apparaissent de façon macroscopique comme un épaississement de la couche superficielle. Pourtant, la stratégie de traitement utilisée dans le cadre de ces lésions est bien différente [Rosen *et al.* (2012)]. L'évaluation des caractéristiques distinctives est déterminante dans l'élaboration et l'efficacité des traitements donnés aux patients.

Malgré de nombreuses études *in vivo* OCT sur les pathologies affectant le larynx [Wong

*et al.* (2005); Armstrong *et al.* (2006)], très peu ont exploré l'utilisation de l'OCT sur une population pédiatrique.

L'imagerie in vivo OCT a été utilisée pour examiner les voies aérodigestives supérieures en utilisant un système OCT dans le domaine temporel (TD-OCT) [Ridgway *et al.* (2007)]. Cependant, les études ne portent pas spécifiquement sur les lésions des cordes vocales. En outre, la vitesse d'acquisition (quelques images par seconde) et la sensibilité des systèmes 2D TD-OCT ne sont pas suffisantes pour saisir l'étendue spatiale de certaines pathologies des cordes vocales. Des études récentes, utilisant plutôt des systèmes dans le domaine de Fourier, ont permis d'investiguer plus profondément la détection des sténoses sous-glottique chez les nouveau-nés [Volgger *et al.* (2015); Sharma *et al.* (2015)].

Les prochaines sections tentent d'explorer l'utilisation de l'OCT dans l'évaluation des lésions pédiatriques. Le protocole, la démarche utilisée et les résultats obtenus avec la sonde endoscopique OCT sont présentés. Les atouts additionnels qu'offre l'imagerie OCT 3D pour la discrimination des frontières et l'extraction des dimensions des lésions sont également expliqués.

## 7.2 Protocole

Le système décrit au chapitre 4 a servi à acquérir des images OCT intraopératoires sur une cohorte de 10 patients pédiatriques, âgés de 3 mois à 16 ans, affligés d'une pathologie laryngée. Tout comme pour l'analyse des patients sains, une description du déroulement et un formulaire de consentement ont été donnés aux parents et aux enfants avant la procédure. La procédure d'acquisition et d'insertion de la sonde optique est similaire à celle décrite au chapitre précédent sur les patients sains. Préalablement à l'étude in vivo, 10 échantillons cadavériques d'adultes avec des pathologies vocales ont été analysés. Pour chaque échantillon ex vivo, un balayage complet de la partie antérieure au segment postérieur de la corde vocale est effectué.

Le protocole utilisé pour l'analyse ex vivo est semblable à celui décrit au chapitre 4. Le champ de vision comporte, en plus de la vraie corde vocale, les structures adjacentes telles qu'une partie du ventricule, qui sert de point de comparaison avec l'histologie.

## 7.3 Résultats

Les images obtenues de cordes vocales présentant une pathologie sont présentées en deux temps. Celles faites sur des échantillons ex vivo, puis celles issues d'images in vivo.

### 7.3.1 Imagerie des lésions vocales ex vivo

La Figure 7.1 montre des lésions imagées ex vivo avec le système OCT et les sections histologiques correspondantes. Les marqueurs de référence (M1-M2) utilisés pour la comparaison sont visibles à la fois dans les images OCT et à l'histologie. L'épithélium recouvrant la zone du nodule [Fig. 7.1a] est plus épais que celle de la région inférieure ou supérieure (à droite ou à gauche de l'image). Cet épaississement localisé n'est pas observé chez nos patients sains. La membrane basale (Mb) apparaît irrégulière, courbée avec quelques invaginations, ce qui pourrait ressembler à des signes d'hyperplasie épithéliale [Martins *et al.* (2010)]. Dans la région superficielle, on observe une augmentation du signal de rétrodiffusion dans la lamina propria par rapport aux tissus adjacents, qui peuvent être une indication d'un œdème ou d'une fibrose localisée, phénomène couramment observé dans les nodules [Martins *et al.* (2010)].

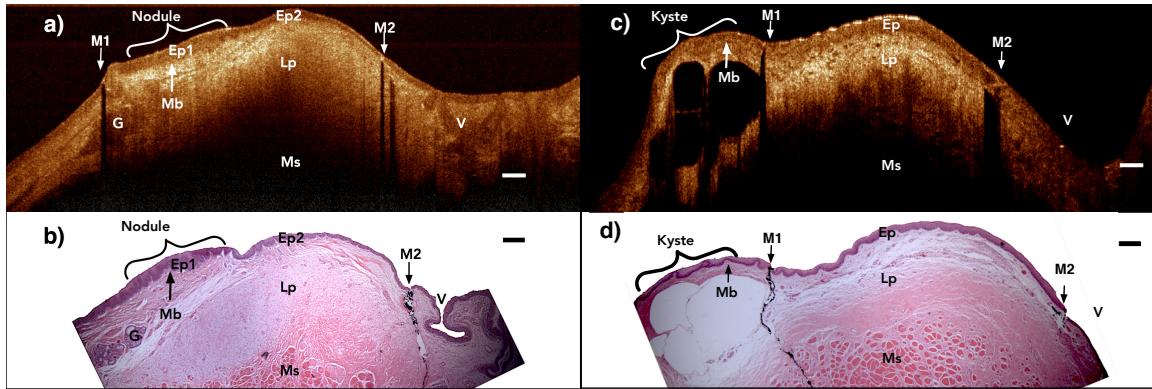


Figure 7.1 Section transversale OCT d'un nodule (a) (spécimen cadavérique) avec coupe histologique correspondante (b) (coloration H&E, 100X). Section transversale OCT d'un pseudo-kyste de rétention de mucus (c) (spécimen cadavérique) avec coupe histologique correspondante (d) coloration H&E, 100X. Ep : couche épithéliale ; Lp : lamina propria ; V : ventricule ; G : glande séreuse ; M1 et M2 : marqueurs de référence ; Mb : membrane basale ; Ms : muscle ; - Échelle 200  $\mu$ m en (a-d).

Les Figures 7.1c et 7.1d montrent un pseudokyste muqueux pluriloculaire (avec de multiples cavités), au-dessous de la couche épithéliale, qui occupe un espace significatif dans la lamina

propria . La structure et le type du kyste ont été confirmés par histopathologie [Fig.7.1d]. La zone de la lésion est presque circulaire, partitionnée et remplie d'une solution aqueuse. Par conséquent, l'image OCT affiche une région sombre très délimitée. Tel qu'illustré dans la section histologique [Fig.7.1d], le contour de kyste est dépourvu d'une couche épithéliale. Sa structure pluriloculaire est clairement visible à l'histologie et à l'OCT.

La visualisation de données volumétrique permet d'extraire des informations qualitatives et quantitatives essentielles comme la symétrie et la dimension des lésions. La figure 5 montre un rendu 3D (Amira, FEI Visualization Sciences Group, Burlington, MA) d'un nodule [Fig. 7.2a] et d'un kyste [Fig.7.2c] montré précédemment avec leur région respective agrandie [Fig. 7.2b-d].

Les lésions sont situées à quelques millimètres à partir du bord libre du pli vocal (c'est-à-dire à l'écart du ventricule). Les dimensions du nodule et du volume occupé par le pseudokyste sont évaluées après la segmentation des données 3D. Le nodule occupe 1.5 mm de l'axe antéro-postérieur et des axes supérieurs inférieurs. Le kyste n'est pas symétrique et s'étend sur 1.8 mm sur l'axe supérieur inférieur et sur 1.5 mm de l'axe antéro-postérieur et sur 1 mm en profondeur dans la lamina propria.

Les projections 3D illustrées à la Figure 7.2 permettent de mettre en évidence les régions d'intensités distinctes (LP1-LP2) au sein de la lamina propria.

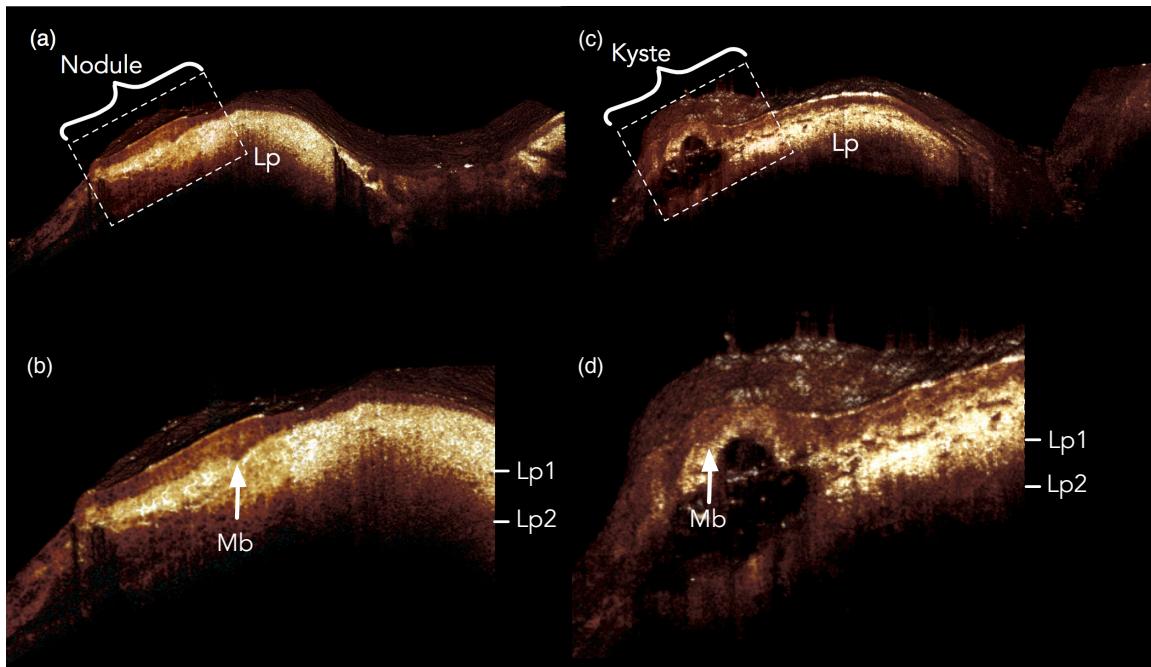


Figure 7.2 Rendu volumétrique de cordes vocales adultes avec une pathologie bénigne du larynx. Un nodule (a) et son insertion en (b) et un pseudo-kyste de rétention de mucus (c) et son insertion en (d). Mb : membrane basale ; Lp : lamina propria ; Lp1-Lp2 : lamina propria avec des zones de différentes intensités optiques.

### 7.3.2 Imagerie des lésions intraopératoires

Quelques pathologies laryngées pédiatriques ont été imagées en mode intraopératoire, entre autres des nodules, des kystes et une lésion causée par le virus du papillome humain. Ces lésions sont illustrées dans la présente section. Les acquisitions se sont déroulées telles que prévues par le protocole et aucune complication technique n'est survenue pour l'ensemble des patients imagé en salle de chirurgie.

#### Nodules

La Figure 7.3 montre des nodules bilatéraux obtenus sur une patiente de 11 ans. Ces nodules sont symétriquement situés sur le tiers antérieur de la vraie corde vocale. Ce gonflement épithelial est perceptible sur l'image endoscopique (souligné par les flèches noires [Fig. 7.3a]). L'image OCT [Fig. 7.3b] est capturée à la jonction de la région normale (Ep1) et l'emplacement du nodule (Ep2). Il existe une augmentation de l'ordre de 30% de l'épaisseur de la

couche épithéliale, ce qui peut indiquer la présence d'un épithélium pavimenteux hyperkératosé. La membrane basale dans cette région de transition subit également un épaississement important (voir flèche). Ces observations sont similaires pour tous les cas de nodules intraopératoires étudiés ( $n = 3$ ). Une région hétérogène peut être observée sous la paroi épithéliale (mise en évidence par l'astérisque des Figures 7.3b et 7.3c). Cette structure pourrait découler de la présence d'un dépôt de fibronectine superficielle à la lamina propria ou de la présence d'un œdème [Gray *et al.* (1994); Martins *et al.* (2010)]. On remarque que dans cette région particulière la transition entre l'épithélium et la membrane basale est plus diffuse [Fig. 7.3c]). La Figure 7.3d illustre la distribution tridimensionnelle du nodule.

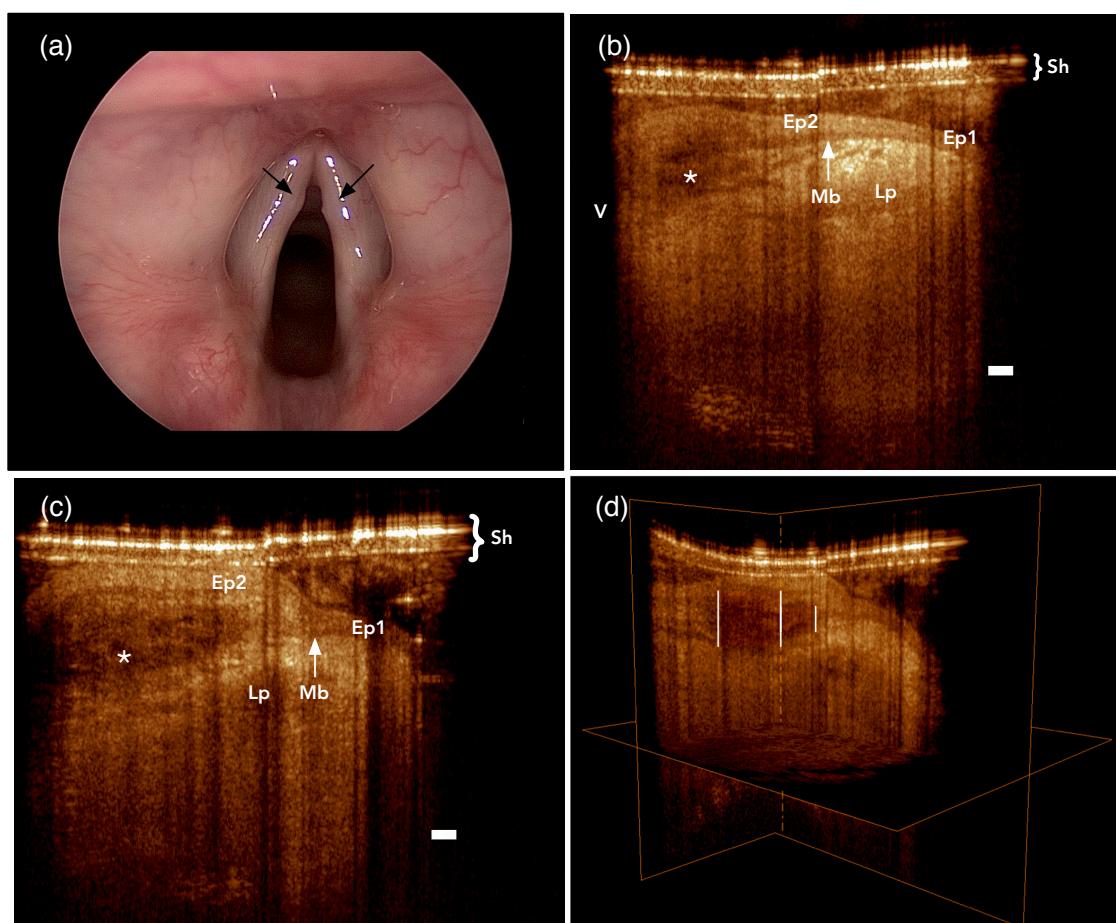


Figure 7.3 Nodules bilatéraux chez un patient de 11 ans de sexe féminin. Vue d'endoscopie peropératoire de la glotte (a) avec des flèches noires pointant vers le gonflement épithélial. Section transversale correspondante OCT (b) montrant l'épaississement de la membrane basale (flèche blanche) et l'apex du nodule (c). Visualisation tridimensionnelle du nodule (d). Sh : gaine de protection ; Ep1 : emplacement épithélium 1 ; Ep2 : emplacement épithélium 2 ; Mb : membrane basale ; Lp : lamina propria ; V : ventricule ; - Échelle : 200  $\mu\text{m}$  en (b) et (c).

## Kyste

La Figure 7.4 montre des images obtenues d'un patient de 12 ans de sexe masculin avec un kyste muqueux. La Figure 7.4a est une image endoscopique peropératoire qui illustre un renflement sur la corde vocale gauche (identifiée par une flèche). La coupe transversale OCT [Fig.7.4b] démontre la présence d'un kyste profondément ancré dans la lamina propria. Le kyste est caractérisé par une région de diffusion homogène entourée par une structure de 60  $\mu\text{m}$  d'épaisseur dont la diffusion est plus faible. La rétrodiffusion provenant de l'intérieur du kyste suggère un contenu non aqueux. La diffusion observée au cœur du kyste muqueux est typique d'un contenu riche en diffuseurs, tels que des protéines, de la mucine et débris cellulaires [Fig. 7.4b]. Par opposition, un kyste aqueux est une région complètement homogène et sombre sans diffuseur. La section histopathologique correspondante est illustrée à la Figure 7.4c. Elle confirme la présence d'un kyste muqueux et d'une couche épithéliale tout autour du kyste (Epl). Le volume OCT permet d'extraire la lésion kystique [Fig. 7.4d]. Elle a une forme complexe qui s'apparente en partie à une forme ovale. Comme dans le modèle ex vivo, ce kyste est non symétrique et s'étend sur 2 mm sur l'axe supérieur inférieur et 2 mm sur l'axe antéro-postérieur et s'étend à 1.5 mm de profondeur dans la lamina propria.

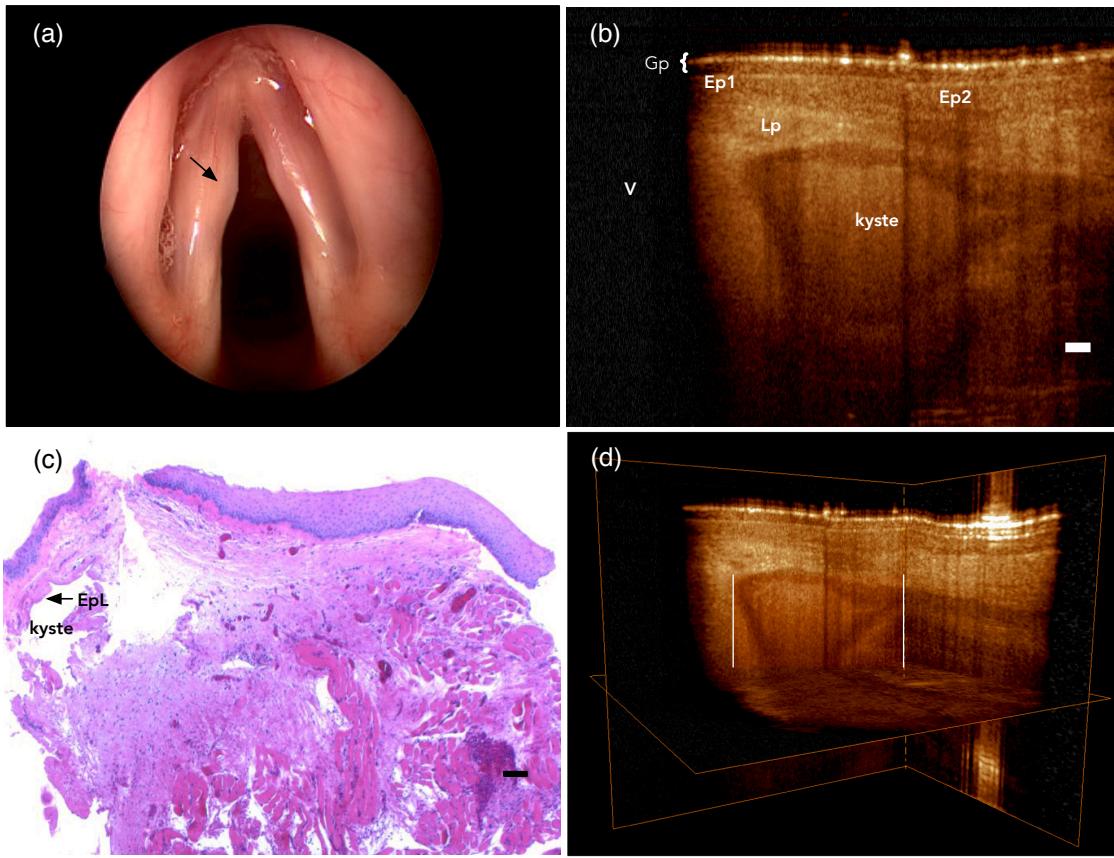


Figure 7.4 Kyste chez un enfant de 12 ans de sexe masculin. Vue d'endoscopie peropératoire de la glotte (a) avec une flèche noire pointant au gonflement épithélial. Section transversale correspondante OCT (b) montrant une structure de forme ovale au sein de la lamina propria. Coupe histologique correspondante (c) (coloration H&E 100x). Visualisation tridimensionnelle du kyste (d). Gp : gaine de protection ; Ep1 : emplacement épithélium 1 ; Ep2 : emplacement épithélium 2 ; Lp : lamina propria ; V : ventricule ; - Échelle : 200  $\mu\text{m}$  en (b) et (c).

### Virus du papillome humain

La Figure 7.5a montre une image endoscopique peropératoire d'un patient de trois ans de sexe masculin, avec de multiples excroissances (papillomes) dans la commissure antérieure. Tel qu'illustré sur l'image OCT [Fig.7.5b], cette lésion est associée à une augmentation significative de l'épaisseur de l'épithélium. La couche épithéliale est de forme irrégulière (Ep1, Ep2) et des invaginations sont visibles à l'intérieur de la lamina propria. Ces observations sont conformes à l'hyperplasie épithéliale typiquement vue dans les lésions du papillome humain. La Figure 7.5b montre également une région sombre de forme ovale dans la couche épithéliale

(indiqué par les flèches), qui pourrait correspondre à un vaisseau sanguin.

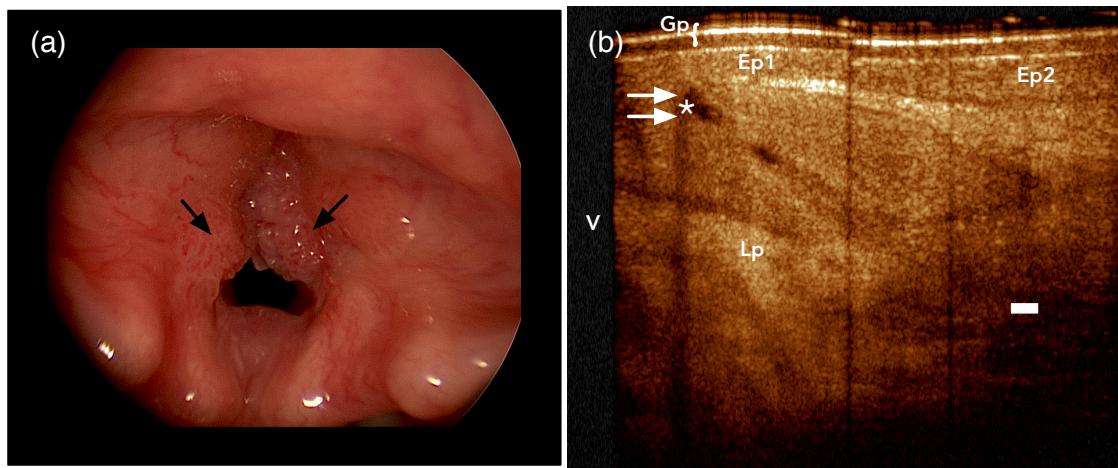


Figure 7.5 Papillomatose laryngée chez un enfant de 3 ans de sexe masculin. Vue d'endoscopie peropératoire de la glotte (a) avec des flèches noires pointant à l'hyperplasie épithéliale. Section transversale correspondante OCT (b) montrant les invaginations de la couche épithéliale au sein de la lamina propria. L'astérisque indique la position de ce qui pourrait être un gros vaisseau sanguin. Gp : gaine de protection ; Ep1 : emplacement épithélium 1 ; Ep2 : emplacement épithélium 2 ; Lp : lamina propria ; V : ventricule ; - Échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

### Segmentation des lésions bénignes

L'étendue de la pathologie peut s'avérer bien différente que celle estimée par la vue endoscopique traditionnelle. Une sonde avec la capacité d'obtenir des images 3D permet de délimiter les frontières des pathologies. Ces frontières peuvent être segmentées pour extraire la forme et la complexité de la pathologie. Par exemple, bien que les nodules et les kystes apparaissent superficiellement similaires, sous la couche épithéliale, ils se manifestent bien différemment. La segmentation des lésions, réalisée sur Amira (FEI Visualization Sciences Group, Burlington, MA), et montrée à la Figure 7.6, montre la spécificité des formes totalement asymétrique de ces pathologies, contrairement à ce que laisse présager la vue endoscopique. À partir de ce nombre limité d'échantillons, on remarque que les nodules ont une représentation très allongée tandis que les kystes sont plutôt représentés par une forme ovale. Une segmentation de la forme et des mesures quantitatives pourraient permettre le suivi des pathologies laryngées.

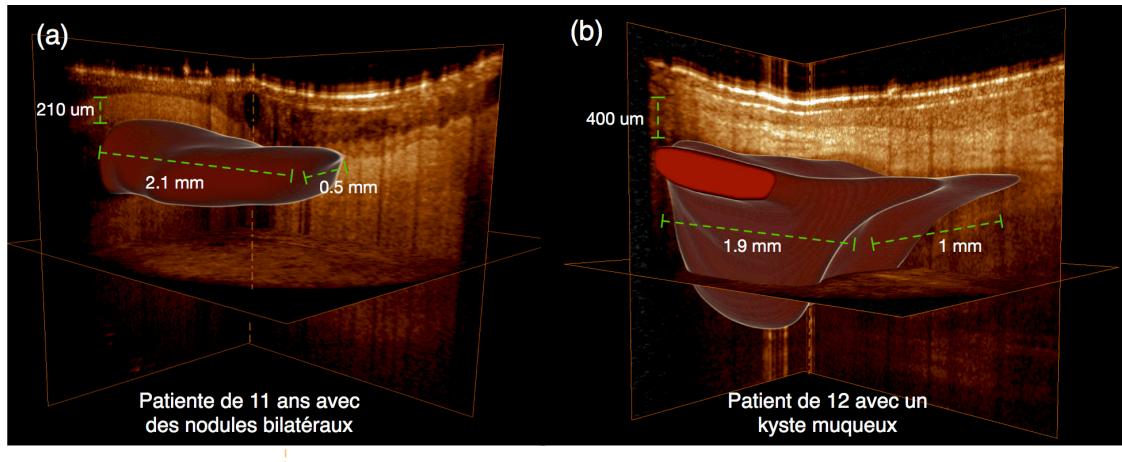


Figure 7.6 Caractéristiques morphométriques des lésions bénignes. Segmentation d'un nodule chez une patiente de 11 ans (a) avec d'un kyste muqueux chez un patient de 12 ans (b).

## 7.4 Discussion

Les cordes vocales représentent l'endroit le plus propice du larynx pour le développement de pathologies. C'est précisément à la jonction où se réunissent les plis vocaux que le stress mécanique est le plus élevé. L'occasion d'observer les cordes vocales sous la surface de l'épithélium permet de détecter les structures anormales à un stade précoce où des alternatives à la chirurgie peuvent encore être appliquées. La distinction entre lésions n'est pas toujours évidente avec l'endoscopie traditionnelle. En effet, plusieurs pathologies présentent des caractéristiques d'inflammation similaires. De plus, certaines lésions peuvent être profondément ancrées dans la muqueuse et demeurer invisibles aux cliniciens. L'OCT adapté à la laryngologie pédiatrique est une approche non invasive prometteuse pour visualiser et caractériser les pathologies de la microstructure de la corde vocale.

L'imagerie ex vivo des échantillons cadavériques a révélé un contraste OCT élevé entre les structures saines et pathologiques. Les pathologies provoquent des changements structurels importants dans la corde vocale. Ces lésions sont souvent irrégulières et possèdent des formes complexes. L'imagerie in vivo des pathologies a révélé que, malgré leur apparence externe similaire à l'endoscopie vidéo, la tomographie par cohérence optique révèle d'importantes distinctions. Dans le cas des nodules, la couche épithéliale est légèrement plus épaisse, ce qui peut s'apparenter à une hyperplasie ou dans certains cas à de l'hyperkératinisation. Les nodules affichent également un changement structurel et la membrane basale s'épaissit. Par

opposition au nodule, les kystes sont situés plus profondément dans la lamina propria et possèdent une forme complexe et asymétrique. Les kystes muqueux démontrent une région turbide avec un contour épithérial dans la lamina propria, tandis que les pseudokystes présentent plutôt une région sombre à l'OCT suggérant une solution plutôt aqueuse.

Toutefois, les papillomatoses laryngées sont rapidement visibles en imagerie intraopéatoire avec l'endoscopie traditionnelle. Cependant, dans ces cas cliniques, l'OCT apporte une information complémentaire : la localisation des régions les plus affectées (épithélium très épais) par une cicatrisation. Elle indique également les endroits d'invagination dans la lamina propria. L'utilisation de l'OCT conjointement avec les lasers à impulsions pourrait permettre de contrôler plus finement l'énergie déposée sur la corde vocale, causant ainsi une préservation de cette structure sensible à la cicatrisation et à la formation de fibrose. Une sonde avec un diamètre réduit ( $< 1.7$  mm) permettrait d'explorer davantage cette pathologie ou souvent la dimension de la glotte est terriblement réduite par la présence des papillomes. De plus, une sonde plus petite permettrait aussi d'inclure les nouveau-nés (moins 3 mois).

L'OCT permet d'identifier les frontières de ces lésions, autrement impossible à obtenir avec des modalités d'imagerie 2D. Elle souffre encore d'une incapacité à détecter les changements moléculaires engendrés par les pathologies. Il serait intéressant de joindre à l'OCT, une modalité moléculaire comme la fluorescence, l'imagerie non linéaire ou la spectroscopie pour permettre d'ajouter une information fonctionnelle à l'imagerie structurelle.

Bien que la capacité de la sonde à imager des lésions est démontrée, une étude avec un bassin beaucoup plus grand permettrait d'élargir les représentations des pathologies bénignes et tumorales. D'autres questions sont envisageables. Par exemple, quand et comment ces pathologies se forment-elles ? Cette évaluation non invasive du type et de la sévérité des lésions pourrait contribuer à améliorer l'efficacité des interventions chirurgicales.

## 7.5 Conclusion

La sonde endoscopique développée permet de visualiser et localiser les lésions pédiatriques avec suffisamment de contraste, de résolution et de champ de pénétration pour en tirer des informations quantitatives d'intérêt pour l'évaluation des pathologies laryngées. Malgré le nombre limité de cas étudiés, la géométrie et la position semblent être reliées au type de lésion observé. Ces caractéristiques distinctes pourraient contribuer à enlever l'ambiguité associée à l'identification de certaines lésions bénignes, tels les nodules, les kystes et polypes.

D'autant plus, sachant que ces lésions affectent la voix, il serait intéressant d'associer ces caractéristiques aux impacts acoustiques ou biomécaniques des cordes vocales. Cette combinaison d'approches pourrait permettre d'approfondir nos connaissances sur la dynamique des couches de la lamina propria. Enfin, la sonde OCT tridimensionnelle développée offre une opportunité pour guider et améliorer l'efficacité des traitements chez les jeunes enfants où, souvent, le choix d'une intervention chirurgicale est le dernier recours.

## CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

La microarchitecture des cordes vocales pédiatriques n'a pas encore été complètement élucidée, du moins, pas à partir d'un modèle permettant une évaluation clinique. Le caractère invasif des techniques d'imagerie actuelles et la rareté des spécimens cadavériques pédiatriques ont grandement limité l'avancement des connaissances de cette structure anatomique unique. Bien que nous connaissons l'impact qu'a cette structure sur le développement de l'individu et de sa personnalité, il existe très peu d'étude sur son développement.

### 8.1 Synthèse des travaux

Au sein des technologies optiques, l'imagerie OCT semble particulièrement prometteuse pour l'observation des cordes vocales. Elle permet d'obtenir une résolution de l'ordre de quelques microns (voire quelques  $10 \mu\text{m}$ ), proche de celles obtenues par l'histopathologie, et elle est d'un à deux ordres de grandeur supérieure à l'imagerie conventionnelle par ultrason. À la différence de l'ultrason, l'OCT peut imager directement à travers l'air sans contact avec le tissu et ne nécessite aucune modification aux tissus, contrairement à l'histologie. De plus, les progrès réalisés ces dernières années permettent d'obtenir des images, voire des volumes, en temps réel, ce qui facilite l'intégration en salle opératoire pour le diagnostic et le suivi des pathologies. Enfin, les systèmes OCT peuvent aussi être compacts et portables.

Ce projet consistait à développer un système d'imagerie optique non invasif pour l'observation des cordes vocales. Cet objectif a été réalisé en étapes afin de peaufiner le cahier des charges. Premièrement une validation ex vivo a été réalisée avant d'entreprendre la construction d'un système adapté à l'imagerie intraopératoire des cordes vocales saines et pathologiques. Les sous-sections suivantes synthétisent les travaux exécutés.

#### 8.1.1 Expériences ex vivo

Dans un premier temps, l'évaluation du contraste optique des cordes vocales avec l'imagerie OCT a été réalisée avec une étude ex vivo. Les études en histopathologie sur des spécimens cadavériques adultes ont révélé que la corde vocale est composée d'un épithélium, d'une couche trilaminaire appelée lamina propria et d'un muscle vocal. Sachant qu'il s'agit de l'étape ul-

time de maturation, nous avons aussi validé l'OCT sur des modèles de développement à des stades intermédiaires : les structures monocouche et bilaminaire sont représenté par des spécimens foetaux et porcins respectivement. Ce choix est justifié par la quasi-non-disponibilité des spécimens pédiatriques. L'ensemble des échantillons a été visualisé et analysé à l'OCT pour identifier des caractères distinctifs lié au développement de cette microstructure. Les comparaisons qualitatives entre l'OCT et l'histologie ont permis la construction d'un atlas représentatif de chaque région du larynx, pour chaque type de spécimen. La variabilité des spécimens foetaux est très faible. Dans tous les cas, on remarque une lamina propria homogène et dans quelques cas, une transition franche avec la couche musculaire. Dans le modèle porcin, l'épithélium uniforme est suivi d'une couche bilaminaire qui possède une variation de l'intensité dans la couche superficielle de la lamina propria. Complètement à l'autre bout du spectre, les spécimens adultes possèdent une couche épithéliale plus épaisse et la région superficielle de la lamina propria possède une variation notoire du signal d'intensité. Cette région pourrait être caractéristique des changements encourus par les cordes vocales durant le développement.

Une analyse quantitative des cordes vocales de chaque population a été réalisée à partir du signal d'atténuation. L'analyse de l'atténuation du signal OCT peut être révélatrice de l'arrangement structurel et de la composition moléculaire. Chez les fœtus, ce signal d'atténuation suit une courbe exponentielle décroissante monotone. Par contre, chez les porcs, où une structure bilaminaire est révélé par l'histologie, on remarque deux régions distinctes, mais dont l'épaisseur peut varier entre spécimens. Les adultes ont par ailleurs trois régions distinctes dont les transitions peuvent être difficiles à identifier sur certains spécimen aussi bien à l'OCT qu'à l'histologie. Bien que les coefficients d'atténuation peuvent révéler les différences entre ces spécimens, ils ne permettent pas d'indiquer l'origine moléculaire de ces changements.

Pour arriver à comprendre plus intimement la relation entre le contraste des images OCT et la structure des cordes vocales, le contenu en collagène dans la corde vocale a été altéré. Des cordes vocales de porc ont été injectées avec une enzyme qui détruit les fibres de collagène : la collagénase. Les spécimens traités à la collagénase ont été comparés à différent moment avec des spécimens contrôles. L'étude démontre clairement que le collagène contribue significativement à l'atténuation du signal OCT. Des structures horizontales apparaissent après 180 minutes d'exposition à la collagénase ce qui pourrait être une indication des structures fibrillaires de collagène espacées dans la lamina propria.

Bien que la méthode de contraste soit très différente entre l'histologie et l'OCT, une grande correspondance structurelle est observée entre ces deux modalités. Ces résultats intéressants

ont contribué à envisager des acquisitions *in vivo*. Bien que ce contexte soit plus contraignant, il offre une analyse beaucoup plus réaliste puisque la déshydratation des spécimens peut influer le contraste optique.

### 8.1.2 Système d'imagerie OCT intraopératoire

Dans le cadre de ce projet, nous avons conçu un système d'imagerie OCT adapté à la clientèle pédiatrique. L'outil développé a une résolution, un champ de vue et une vitesse adéquate pour répondre aux besoins cliniques. La longue cohérence et la grande vitesse du système OCT permettent des acquisitions volumétriques de la corde vocale gauche et droite en moins de deux minutes en salle d'opération. Le concept modulaire de la sonde permet d'interchanger l'optique facilement pour un alignement optimal avec un effort minimal : un aspect essentiel en clinique où chaque seconde est coûteuse. Les marques laser sur la sonde permettent au chirurgien, de s'orienter plus facilement. La monture de rotation ajoute un degré de liberté additionnel à la sonde. Elle permet d'ajuster le champ de vue à la région d'intérêt de façon rapide et répétitive. Ce design permet, entre autres, de modifier la section transverse OCT, sans, changer l'angle de balayage. Cette réalisation est importante et s'est avérée très utile pour naviguer à travers les structures du larynx. Enfin, le diamètre de la sonde permet d'imager la clientèle pédiatrique à l'exception des nouveau-nés. Le système repose sur un chariot médical stable et robuste aux vibrations.

L'approche itérative a été préconisée au cours de la conception du projet. Plusieurs prototypes ont été construits et évalués. Malgré les simulations en laboratoire et les anticipations des problèmes techniques, les premières expériences cliniques peuvent être surprenantes et révèlent rapidement les faiblesses du design proposé. Par exemple, bien qu'une solution de stérilisation (autoclave) ait été proposée pour permettre une transmission maximum de la lumière, celle-ci a été rejetée par les équipes responsables de la stérilisation des instruments. L'introduction de nouveaux instruments doit s'accompagner d'une procédure de nettoyage et d'une formation solide avant leur utilisation en clinique. L'utilisation d'une gaine protectrice à usage unique s'est avérée une solution de stérilisation simple et flexible pour la réalisation des expériences *in vivo*.

### 8.1.3 Expériences in vivo

Tout comme dans les expériences ex vivo, plusieurs acquisitions in vivo ont été effectuées à divers endroits dans le larynx afin de cartographier adéquatement les structures environnantes à l'OCT. Les trois grands segments du larynx initialement imaginés sont : la région infraglottique, la vraie corde vocale et la fausse corde vocale.

Un protocole d'acquisition a été développé afin d'identifier systématiquement la même région anatomique entre différents patients. Il s'est avéré que les connaissances acquises à partir des images ex vivo et de l'imagerie intraopératoire OCT ont facilité le repérage de la région d'intérêt.

Cette procédure d'acquisition a permis d'analyser les différences entre les cordes vocales de deux groupes de population, soit une population de moins de 2 ans ( $n=10$ ) et une population dont l'âge varie de 11 à 16 ans ( $n=10$ ). L'imagerie intraopératoire de ces deux groupes a révélé qu'il existe une différence significative dans la microstructure des cordes vocales. Cette différence se situe surtout dans la partie supérieure de la lamina propria, une indication probable de la région où des changements structurels surviennent lors du développement.

À l'aide de l'ensemble des cordes vocales saines observées, il est possible d'identifier et caractériser plus facilement les cordes vocales pathologiques. Une étude sur l'imagerie OCT des lésions laryngées bénignes a été réalisée. L'étude initiale regroupe 10 patients pédiatriques avec des pathologies multiples : nodule bilatéral, kystes et une lésion causée par le virus du papillome humain. Il a été démontré au cours de cette étude que l'information tridimensionnelle permet d'identifier la forme et les frontières des pathologies. De plus, elles exposent des caractéristiques distinctives entre les pathologies bénignes qui pourraient superficiellement être similaires. Ces informations précises sur l'état sous-épithéial de la microstructure anatomique pourraient influencer le diagnostics et permettre de minimiser la morbidité lors des traitements.

## 8.2 Limites des études cliniques et améliorations futures

Les expériences in vivo ont permis d'observer des similitudes structurelles entre l'OCT et l'histologie. Toutefois, une étude récente de notre groupe [Infusino *et al.* (2015)] expose la difficulté des pathologistes expérimentés à évaluer, à l'aveugle, des coupes histologiques avec une, deux ou trois couches dans la lamina propria. Les pathologistes exposés à des coupes

histologiques fœtales, porcines et adultes ont identifié avec une précision d'environ 50% l'appartenance des spécimens au bon groupe. Quoique cette disparité puisse être occasionnée par les artéfacts liés à l'histologie et au manque d'information sur la source des spécimens, ces résultats soulignent que cette distinction n'est toujours triviale. Ces conclusions poussent à chercher des alternatives pour caractériser la maturité de la lamina propria.

Bien que l'approche proposée permette d'éviter la biopsie et les artéfacts liés aux coupes histologiques, une analyse seulement avec les coefficients d'atténuation relative n'est pas suffisante pour décrire la distribution du collagène et d'élastine dans la corde vocale. D'autres méthodes de contraste optique pourraient permettre de révéler des informations sur la composition de la matrice extracellulaire de la lamina propria. Entre autres, la tomographie par cohérence optique en polarisation pourrait permettre de détecter un changement dans l'organisation dans les fibres de collagène en exploitant la biréfringence de ces fibres. L'OCT combiné avec la microscopie par fluorescence pourrait être aussi une piste intéressante pour la détection de macromolécules autofluorescentes, telles que l'élastine, le collagène et le NAD(P)H.

Malheureusement, le nombre de cas accumulé limite les conclusions des études réalisées. Le nombre de cas est insuffisant pour permettre d'obtenir une valeur significative sur la spécificité et la sensibilité de l'outil proposée pour détecter les pathologies. De plus, bien qu'il existe une différence morphologique selon le sexe du patient, le nombre limité de cas cliniques ne permet pas de distinguer le sexe du patient dans les études. Un projet est en cours pour augmenter à une centaine le nombre de patients pathologiques et sains.

Les expériences en salle opératoire permettent une véritable évaluation du système. C'est à ce moment que les moindres petits défauts de conceptions sont amplifiés, comme des fibres optiques encombrantes, l'intensité du laser de guidage trop faible et la robustesse en flexion des lentilles GRIN. D'autres surprises imprévisibles imposent aussi une réévaluation du design comme : l'ergonomie de la sonde, le nettoyage brusque de la sonde et les difficultés de positionnement. Ces difficultés ont été surmontées avec la révision des prototypes. Cependant, d'autres améliorations seraient souhaitables.

Bien que la sonde intraopératoire réponde aux normes et permette de récolter des données cliniques, elle pourrait bénéficier d'améliorations. Les jeunes patients requièrent souvent une approche plus délicate pour atteindre la partie centrale des cordes vocales. Une miniaturisation de la sonde serait un atout pour évaluer les patients de moins de 2 ans. Une sonde rigide avec un diamètre externe de moins de 1.7 mm serait suggérée pour atteindre ces structures. Il serait possible d'envisager une seconde sonde, cette fois flexible pour un accès par les

voies nasales. Cette sonde pourrait être utilisée en salle clinique et donner accès à une nouvelle clientèle. Pour y arriver, la sonde devra être entièrement fibrée et posséder un diamètre externe de l'ordre du millimètre.

Le contraste des marques de positionnement gravées sur la sonde devient moins visible une fois la gaine protectrice appliquée. Une gaine complètement translucide pourrait permettre d'améliorer la visibilité des marques. Cependant, après quelques cas cliniques, la familiarisation avec l'outil rend ces marques beaucoup moins essentielles au repérage. Le chirurgien traitant, très conscient des micros mouvements appliqués et la longueur de l'outil, se base davantage sur les repères anatomiques visibles. Toutefois, elles demeurent utiles à la calibration ou lors de l'alignement optique.

Le temps d'acquisition est présentement acceptable pour un balayage de la région centrale de la corde vocale. Cependant, un balayage rotatif pourrait permettre d'acquérir les deux cordes vocales simultanément et certaine structure sous glottique pour l'identification des sténoses sous glottique. Ce mécanisme de balayage permettrait de réduire de moitié le temps d'acquisition. Des micromoteurs ont été achetés à cette fin et des étapes préliminaires ont été amorcées pour permettre de caractériser et valider leur utilisation en clinique.

La vitesse des sources OCT est en constante croissance. Une source de l'ordre du MHz permettrait non seulement de raccourcir le temps d'acquisition, mais permettrait également d'obtenir en salle d'opération un rendu 3D en temps réel. Cette possibilité ouvre la porte à une panoplie d'applications potentielles pour l'assistance chirurgicale des cordes vocales. Ce changement implique toutefois de faire approuver à nouveau le système par le département de génie biomédical de l'hôpital.

Le transport du chariot entre le laboratoire et les salles de chirurgie peut provoquer des vibrations majeures sur le montage opto-mécanique. Ces vibrations à long terme peuvent provoquer une instabilité de la source et du bras de référence. Pour y remédier, une plaque d'aluminium d'un centimètre a été combinée avec des pièces de caoutchouc pour absorber les vibrations sur le bras de référence. La source est quant à elle réajustée au besoin. Pour l'instant, cet ajustement est exécuté lorsque la qualité des images décroît. Il serait intéressant d'ajouter des périodes de maintenance prévues au calendrier pour garder le montage optimal.

Le design a été réalisé pour permettre une utilisation du système aussi bien dans un environnement *in vivo* qu'*ex vivo*. La conception de deux bras de référence et des fibres attitrées à chacune des configurations permet ainsi de minimiser les opérations entre les deux modes

d'acquisition. Malgré tout, le passage d'une configuration à une autre peut causer des fluctuations dans la puissance de la source, principalement occasionné par la fragilité des connexions fibrées. D'autant plus que le laser utilisé pour l'imagerie OCT ne possède pas de mécanisme de rétroaction pour identifier la puissance envoyée à l'échantillon.

La manipulation de l'instrument est exécutées manuellement. Il se peut que quelques centaines de microns séparent la région d'intérêt sur deux acquisitions successives. Une méthode de repérage tridimensionnelle de l'instrument serait un atout pour valider la précision à laquelle l'outil est en mesure d'être placé sur la même région d'intérêt. Par exemple, des marqueurs réfléctifs actifs ou passifs pourraient être utilisés dans ce contexte.

La qualité de l'image pourrait être également améliorée avec quelques modifications au design. L'utilisation d'une gaine de protection stérile FEP, transparente à l'infrarouge, est une option intéressante, mais celle-ci doit encore être approuvée par des organismes réglementaires qui régissent l'emploi des matériaux dans les institutions de santé (Food and Drug Administration, Santé Canada). De plus, submerger la pointe de la sonde avec une huile biocompatible pourrait significativement réduire les artéfacts produits par l'interface air-miroir. Cette modification aurait pour effet de permettre une plus grande transmission dans les tissus.

Bien que la plateforme réalisée soit opérationnelle, comme tout logiciel, des fonctionnalités pourraient être ajoutées. Pour l'instant, deux plateformes logicielles sont utilisées dans le cadre de l'acquisition et l'analyse des données. Un regroupement des plateformes permettrait une rétroaction immédiate en salle d'opération. L'ajout d'outils pour une segmentation automatique des structures et la caractérisation des coefficients d'atténuation en temps réel pourrait contribuer à améliorer le diagnostic. La gestion des données tridimensionnelle reste un défi logistique à surmonter. Plusieurs giga-octets sont nécessaires pour une seule acquisition. Ces données doivent être manipulées, transférées et sauvegardées pour référence future, ce qui impose d'optimiser la structure de stockage. Enfin, pour l'instant, les données spécifiques liées au patient, longueur des cordes vocales, âge, sexe et photos endoscopiques sont manuellement transférés du PACS (de l'anglais, pour « Picture Archiving and Communication System ») vers une plateforme logicielle locale. Il serait intéressant d'automatiser un transfert des données anonymisées entre les deux bases de données.

Le contraste des images OCT est le résultat des variations de l'index de réfraction dans le tissu, ce qui est complètement différent de l'histologie, où un colorant est appliqué pour un rehaussement de certaines structures spécifiques. Par conséquent, l'interprétation des images

peut être difficile à réaliser. Par exemple, la présence du bruit tavelure peut être confondu avec l'apparition de microstructure et l'orientation des fibres de collagène peut générer des artefacts dans les images OCT liés aux effets de polarisation. Ces défis pourront être surmontés avec l'expérience et le nombre de cas évalués.

Bien que la sonde soit légèrement en contact avec la corde vocale lors des acquisitions, il se peut que celle-ci provoque un changement non seulement dans l'épaisseur des tissus imaginés, mais également sur le contraste des images OCT. Il serait intéressant d'une part de quantifier cet impact, à l'aide d'étude biomécaniques, et d'autre part de relier les changements biomécaniques au changement d'intensité ou du patron de bruit de tavelure dans les images OCT.

Le système clinique OCT développé permet d'obtenir, à partir d'acquisitions tridimensionnelles, des informations supplémentaires sur l'état des cordes vocales. Cependant, la réalisation d'études sur un plus grand bassin de population pédiatrique pourrait permettre d'établir un modèle plus complet du développement des couches vocales.

À la lumière des résultats obtenus, un système d'imagerie OCT clinique révèle un potentiel énorme pour le diagnostic des pathologies pédiatriques ou pour le suivi de la maturité de la lamina propria. Bien qu'il soit possible avec l'imagerie OCT de visualiser l'entièvre profondeur de la lamina propria, il demeure impossible, avec ce mode d'imagerie, d'obtenir un contraste moléculaire. Une distinction moléculaire des structures superficielles de la lamina propria pourrait s'avérer très utile pour le diagnostic de plusieurs pathologies étant donné que celles-ci prennent naissance sous la membrane basale à moins d'une centaine de microns de profondeur dans la corde vocale. La combinaison de l'imagerie hyperspectrale et l'OCT en un seul endoscope pourrait permettre de capturer en trois dimensions le contraste structurel et moléculaire en temps réel. L'addition de la modalité hyperspectrale permettrait de différencier plus précisément le contenu moléculaire des pathologies laryngées et l'état superficiel de la lamina propria. La microendoscopie non linéaire pourrait également s'avérer une option intéressante. Une piste pour son intégration clinique est fournie en annexe (A). Enfin, un endoscope multimodal consiste en une perspective intéressante pour la suite du projet. Il permettrait d'approfondir les connaissances acquises sur la relation biomécanique de la corde vocale et l'état de la lamina propria.

## RÉFÉRENCES

- Alberti, P W (1996). The history of laryngology : a centennial celebration. *Otolaryngology-head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 114(3), 345–354.
- Armstrong, William B and Ridgway, James M and Vokes, David E and Guo, Shuguang and Perez, Jorge and Jackson, Ryan P and Gu, Mai and Su, Jianping and Crumley, Roger L and Shibuya, Terry Y and Mahmood, Usama and Chen, Zhongping and Wong, Brian J F (2006). Optical Coherence Tomography of Laryngeal Cancer. *The Laryngoscope*, 116(7), 1107–1113.
- Awd Allah, R S and Dkhil, M a and Farhoud, E (2009). Fibroblasts in the human vocal fold mucosa : an ultrastructural study of different age groups. *Singapore medical journal*, 50(2), 201–7.
- Barat, K (2014). *Laser Safety : Tools and Training, Second Edition*. Optical Science and Engineering. Taylor & Francis.
- Barriga, Eduardo S. and Pattichis, Marios and Abramoff, Michael and T'so, Dan and Kwon, Young and Kardon, Randy and Soliz, Peter (2007). Independent component analysis for the detection of in-vivo intrinsic signals from an optical imager of retinal function. *Proceedings of SPIE*, 6426, 64261K–64261K–12.
- Bartlett, Rebecca S and Thibeault, Susan L and Prestwich, Glenn D (2012). Therapeutic potential of gel-based injectables for vocal fold regeneration. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 7(2), 024103.
- Betz, Christian Stephan and Stepp, Herbert and Havel, Miriam and Jerjes, Waseem and Upile, Tahwinder and Hopper, Colin and Sroka, Ronald and Leunig, Andreas (2008). A set of optical techniques for improving the diagnosis of early upper aerodigestive tract cancer. *Medical Laser Application*, 23, 175–185.
- Bisetti, M Spadola and Segala, F and Zappia, F and Albera, R and Ottaviani, F and Schindler, a (2009). Non-invasive assessment of benign vocal folds lesions in children by means of ultrasonography. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 73(8), 1160–2.
- Bless, D M and Abbs, J H (1983). *Vocal Fold Physiology : Contemporary Research and Clinical Issues*. PRO-ED, Incorporated.

- Boppart, S A and Bouma, B E and Pitriss, C and Tearney, G J and Fujimoto, J G and Brezinski, M E (1997). Forward-imaging instruments for optical coherence tomography. *Opt. Lett.*, 22(21), 1618–1620.
- Boseley, Mark E and Hartnick, Christopher J (2006). Development of the human true vocal fold : depth of cell layers and quantifying cell types within the lamina propria. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 115(10), 784–8.
- Boudoux, Caroline and Benboujja, Fouzi and Deterre, Romain and Strupler, Mathias and Maturo, Steven and Hartnick, Christopher J (2015). Emerging microscopy techniques for pediatric vocal fold evaluation. K. Izdebski, Y. Yan, R. Ward et B. J. F. Wong, éditeurs, *Normal & Abnormal Vocal Folds Kinematics : High-Speed Digital Phonoscopy (HSDP), Optical Coherence Tomography (OCT) & Narrow Band Imaging (NBI)*, chapitre 37.
- Boudoux, C. and Leuin, S.C. and Oh, W.Y. and Suter, M.J. and Desjardins, A.E. and Vakoc, B.J. and Bouma, B.E. and Hartnick, C.J. and Tearney, G.J. (2007). Preliminary Evaluation of Noninvasive Microscopic Imaging Techniques for the Study of Vocal Fold Development. *Journal of Voice*, 23(3), 269–276.
- Boudoux, Caroline and Leuin, Shelby C and Oh, Wang Yuhl and Suter, Melissa J and Desjardins, Adrien E and Vakoc, Benjamin J and Bouma, Brett E and Hartnick, Christopher J and Tearney, Guillermo J (2009a). Optical microscopy of the pediatric vocal fold. *Archives of otolaryngology-head & neck surgery*, 135(1), 53–64.
- Boudoux, C and Leuin, S C and Oh, W Y and Suter, M J and Desjardins, A E and Vakoc, B J and Bouma, B E and Hartnick, C J and Tearney, G J (2009b). Preliminary evaluation of noninvasive microscopic imaging techniques for the study of vocal fold development. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 23(3), 269–276.
- Bouma, B (2001). *Handbook of Optical Coherence Tomography*. Taylor & Francis.
- Bovik, A.C. and Clark, Marianna and Geisler, W.S. (1990). Multichannel texture analysis using localized spatial filters. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 12(1), 55–73.
- Branski, Ryan C and Verdolini, Katherine and Sandulache, Vlad and Rosen, Clark a and Hebda, Patricia a (2006). Vocal fold wound healing : a review for clinicians. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 20(3), 432–42.
- Burns, James A and Kim, Ki Hean and Kobler, James B and DeBoer, Johannes F and Lopez-Guerra, Gerardo and Zeitels, Steven M (2009). Real-time tracking of vocal fold injections with optical coherence tomography. *The Laryngoscope*, 119(11), 2182–2186.
- Canny, J (1986). A computational approach to edge detection. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 8(6), 679–98.

- Chen, P C and Pavlidis, T (1983). Segmentation by texture using correlation. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 5(1), 64–69.
- Chinn, S R and Swanson, E a and Fujimoto, J G (1997). Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source. *Optics letters*, 22(5), 340–342.
- Chiu, Stephanie J and Li, Xiao T and Nicholas, Peter and Toth, Cynthia a and Izatt, Joseph a and Farsiu, Sina (2010). Automatic segmentation of seven retinal layers in SDOCT images congruent with expert manual segmentation. *Optics express*, 18(18), 19413–28.
- Cho, Han Saem and Jang, Sun-Joo and Kim, Kyunghun and Dan-Chin-Yu, Alexey V. and Shishkov, Milen and Bouma, Brett E. and Oh, Wang-Yuh (2014). High frame-rate intravascular optical frequency-domain imaging in vivo. *Biomedical Optics Express*, 5(1), 223.
- Choma, Michael and Sarunic, Marinko and Yang, Changhuei and Izatt, Joseph (2003). Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography. *Optics express*, 11(18), 2183–9.
- Chong, Shau Poh and Merkle, Conrad W and Leahy, Conor and Radhakrishnan, Harsha and Srinivasan, Vivek J (2015). Quantitative microvascular hemoglobin mapping using visible light spectroscopic Optical Coherence Tomography. *Biomedical Optics Express*, 6(4), 1429–1450.
- Colt, Henri G. and Murgu, Septimiu D. and Jung, Bockhyun and Ahn, Yeh Chan and Brenner, Matt (2010). Multimodality bronchoscopic imaging of recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*, 120(3), 468–472.
- Costa, Rogerio A and Skaf, Mirian and Melo, Luiz A S Jr and Calucci, Daniela and Cardillo, Jose A and Castro, Jarbas C and Huang, David and Wojtkowski, Maciej (2006). Retinal assessment using optical coherence tomography. *Progress in retinal and eye research*, 25(3), 325–353.
- Dailey, Seth H and Tateya, Ichiro and Montequin, Douglas and Welham, Nathan V and Goodyer, Eric (2009). Viscoelastic measurements of vocal folds using the linear skin rheometer. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 23(2), 143–50.
- Danielson, B L and Whittenberg, C D (1987). Guided-wave reflectometry with micrometer resolution. *Appl. Opt.*, 26(14), 2836–2842.
- de Boer, Johannes F and Cense, Barry and Park, B Hyle and Pierce, Mark C and Tearney, Guillermo J and Bouma, Brett E (2003). Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time-domain optical coherence tomography. *Optics letters*, 28(21), 2067–2069.

de Boer, Johannes F. and Milner, Thomas E. and van Gemert, Martin J. C. and Nelson, J. Stuart (1997). Two-dimensional birefringence imaging in biological tissue by polarization-sensitive optical coherence tomography. *Optics Letters*, 22(12), 934.

De Montigny, Etienne and Madore, Wendy-Julie and Strupler, Mathias and Beckley, Amber and Leblond, Frederic and Godbout, Nicolas and Boudoux, Caroline (2014). Multimodal confocal microscopy based on a double-clad fiber coupler. *SPIE Photonics West*.

Dedmon, Matthew M and Paddle, Paul M and Phillips, Jeananne and Kobayashi, Leo and Franco, Ramon A and Song, Phillip C (2015). Development and Validation of a High-Fidelity Porcine Laryngeal Surgical Simulator. *Otolaryngology—head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 153(3), 420–426.

Ding, Huafeng and Lu, Jun Q and Wooden, William A and Kragel, Peter J and Hu, Xin-Hua (2006). Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm. *Phys. Med. Biol.*, 51, 1479–1489.

Drexler, W and Fujimoto, J G (2008). *Optical Coherence Tomography : Technology and Applications*. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Springer Berlin Heidelberg.

Egmont-Petersen, M. and Pelikan, E (1999). Detection of Bone Tumours in Radiographic Images using Neural Networks. *Pattern Analysis & Applications*, 2(2), 172–183.

Eichel, Justin A and Bizheva, Kostadinka K and Clausi, David A and Fieguth, Paul W (2010). Automated 3D Reconstruction and Segmentation from Optical Coherence Tomography. 44–57.

Fabritius, Tatio and Makita, Shuichi and Miura, Masahiro and Myllylä, Risto and Yasuno, Yoshiaki (2009). Automated segmentation of the macula by optical coherence tomography. *Optics express*, 17(18), 15659–69.

Feldman, Michael (2015). Larynx Squamous Cell Carcinoma.

Fercher, Adolf F and Hitzenberger, Christoph K and Drexler, Wolfgang and Kamp, Gerhard and Sattmann, Harald (1993). In Vivo Optical Coherence Tomography. *American Journal of Ophthalmology*, 116(1), 113–114.

F. Fercher and Hitzenberger, C.K. and Kamp, G. and El-Zaiat, S.Y. (1995). Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry. *Optics Communications*, 117(May), 43–48.

Finck, C (2005). [Vocal fold structure and speech pathologies]. *Revue de laryngologie - otologie - rhinologie*, 126(5), 295–300.

- Fink, B R (1974). Acta Otolaryng 78 : 124-128, 1974 FOLDING MECHANISM O F THE HUMAN LARYNX B. R. Fink, 124–128.
- Fisher, Ra (1925). *Statistical methods for research workers*. No. V. Oliver and Boyd.
- Fried, M P (1988). *The Larynx : A Multidisciplinary Approach*. Little, Brown.
- Fujimura, O (1981). Temporal organization of articulatory movements as a multidimensional phrasal structure. *Phonetica*, 38(1-3), 66–83.
- Gallivan, K Holly and Gallivan, Gregory J (2002). Bilateral mixed laryngoceles : simultaneous strobovidovideolaryngoscopy and external video examination. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 16(2), 258–66.
- Garrett, C G and Coleman, J R and Reinisch, L (2000). Comparative histology and vibration of the vocal folds : implications for experimental studies in microlaryngeal surgery. *The Laryngoscope*, 110(5 Pt 1), 814–24.
- Goodman, J W (2007). *Speckle Phenomena in Optics : Theory and Applications*. Roberts & Company.
- Goodyer, Eric and Muller, Frank and Bramer, Brian and Chauhan, Dilip and Hess, Markus (2006). In vivo measurement of the elastic properties of the human vocal fold. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 263(5), 455–62.
- Goodyer, Eric and Welham, Nathan V and Choi, Seong Hee and Yamashita, Masaru and Dailey, Seth H (2009). The shear modulus of the human vocal fold in a transverse direction. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 23(2), 151–5.
- Gossage, Kirk W. and Tkaczyk, Tomasz S. and Rodriguez, Jeffrey J. and Barton, Jennifer K. (2003). Texture analysis of optical coherence tomography images : feasibility for tissue classification. *Journal of Biomedical Optics*, 8(3), 570.
- Gray, Steven D (2000). CELLULAR PHYSIOLOGY OF THE VOCAL FOLDS. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 33(4), 679–697.
- Gray, S D and Pignatari, S S and Harding, P (1994). Morphologic ultrastructure of anchoring fibers in normal vocal fold basement membrane zone. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 8(1), 48–52.
- Gu, M (1996). *Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes*.
- Gusachenko, Ivan and Latour, Gaël and Schanne-Klein, Marie-Claire (2010). Polarization-resolved Second Harmonic microscopy in anisotropic thick tissues. *Optics express*, 18(18), 19339–52.

- Hahn, Mariah S and Kobler, James B and Starcher, Barry C and Zeitels, Steven M and Langer, Robert (2006). Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix. I : Elastic fibers and hyaluronic acid. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 115(2), 156–164.
- Hahn, Mariah S and Kobler, James B and Zeitels, Steven M and Langer, Robert (2005). Midmembranous vocal fold lamina propria proteoglycans across selected species. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 114(6), 451–462.
- Hammond, T H and Gray, S D and Butler, J E (2000). Age- and gender-related collagen distribution in human vocal folds. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 109(10 Pt 1), 913–20.
- Hammond, T H and Zhou, R and Hammond, E H and Pawlak, a and Gray, S D (1997). The intermediate layer : a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 11(1), 59–66.
- Haralick, Robert M. and Shanmugam, K. and Dinstein, Its'Hak (1973). Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 3(6), 610–621.
- Hartnick, C J and Boseley, M E (2008). *Pediatric Voice Disorders* .: Plural Publishing, Incorporated.
- Hartnick, Christopher J and Rehbar, Reza and Prasad, Vinay (2005). Development and Maturation of the Pediatric Human Vocal Fold Lamina Propria. *The Laryngoscope*, 115(1), 4–15.
- Hartnick, Christopher J and Zeitels, Steven M (2005). Pediatric video laryngo-stroboscopy. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 69(2), 215–9.
- Hawkshaw, Mary J. and Sataloff, Johnathan B. and Sataloff, Robert T. (2013). New concepts in vocal fold imaging : A review. *Journal of Voice*, 27, 738–743.
- Helmchen, Fritjof and Denk, Winfried (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Meth*, 2(12), 932–940.
- Heris, Hossein K and Miri, Amir K and Ghattamaneni, Nageswara R and Li, Nicole Y K and Thibeault, Susan L and Wiseman, Paul W and Mongeau, Luc (2016). Microstructural and mechanical characterization of scarred vocal folds. *Journal of Biomechanics*, 48(4), 708–711.
- Hermans, R (2012). *Head and Neck Cancer Imaging*. Medical Radiology. Springer Berlin Heidelberg.

- Hertegard, S and Hakansson, Alf and Thorstensen, Ö (1993). Vocal fold length measurements with computed tomography. *Scand.J.Log.Phon.*, 18, 57–63.
- Herz, P R and Chen, Y and Aguirre, A D and Schneider, K and Hsiung, P and Fujimoto, J G and Madden, K and Schmitt, J and Goodnow, J and Petersen, C (2004). Micromotor endoscope catheter for in vivo, ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Opt. Lett.*, 29(19), 2261–2263.
- Hirano, M (1974). Morphological Structure of the Vocal Cord as a Vibrator and its Variations. *Folia Phoniatrica et Logopaedica*, 26(2), 89–94.
- Hirano, M (1975). Phonosurgery; Basic & Clinical investigations. *Otologia, Suppl 1*(21), 239–442.
- Hirano, MINORU (1981). Structure of the vocal fold in normal and disease states : anatomical and physical studies. *ASHA Rep*, 11(11).
- Hirano, M and Kurita, S and Sakaguchi, S (1989). Ageing of the vibratory tissue of human vocal folds. *Acta oto-laryngologica*, 107(5-6), 428–33.
- Hirano, Shigeru and Minamiguchi, Sachiko and Yamashita, Masaru and Ohno, Tsunehisa and Kanemaru, Shin-ichi and Kitamura, Morimasa (2009). Histologic Characterization of Human Scarred Vocal Folds. *Journal of Voice*, 23(4), 399–407.
- Hirano K.S. (1983). *Growth, development, and aging of human vocal folds*. College Hill Press.
- Hoy, Christopher L and Everett, W Neil and Yildirim, Murat and Kobler, James and Zeitels, Steven M and Ben-Yakar, Adela (2012). Towards endoscopic ultrafast laser microsurgery of vocal folds. *Journal of biomedical optics*, 17(3), 038002.
- Huang, D and Swanson, EA A and Lin, CP P and Schuman, J. S and Stinson, W. G and Chang, W and Hee, M. R and Flotte, T and Gregory, K and Puliafito, C. A and Et, Al. and Et al. (1991). Optical coherence tomography. *Science*, 254(5035), 1178–81.
- Hudgins, P a and Siegel, J and Jacobs, I and Abramowsky, C R (1997). The normal pediatric larynx on CT and MR. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 18(2), 239–45.
- Infusino, Scott A and Ojha, Shilpa and Maurer, Rie and Sadow, Peter M and Faquin, William C and Hartnick, Christopher J (2015). The utility of histopathology in identifying structural differences among layers of the lamina propria. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 77(10), 1651–1654.
- Ishii, K and Yamashita, K and Akita, M and Hirose, H (2000). Age-related development of the arrangement of connective tissue fibers in the lamina propria of the human vocal fold. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 109(11), 1055–1064.

- Jang, I K (2014). *Cardiovascular OCT Imaging*. Springer International Publishing.
- Jang, Il-Kyung and Tearney, Guillermo J and MacNeill, Briain and Takano, Masamichi and Moselewski, Fabian and Iftima, Nicusor and Shishkov, Milen and Houser, Stuart and Aretz, H Thomas and Halpern, Elkan F and Bouma, Brett E (2005). In vivo characterization of coronary atherosclerotic plaque by use of optical coherence tomography. *Circulation*, 111(12), 1551–5.
- Jayaraman, V. and Potsaid, B. and Jiang, J. and Cole, G. D. and Robertson, M. E. and Burgner, C. B. and John, D. D. and Grulkowski, I. and Choi, W. and Tsai, T. H. and Liu, J. and Stein, B. A. and Sanders, S. T. and Fujimoto, J. G. and Cable, A. E. (2013). High-speed ultra-broad tuning MEMS-VCSELs for imaging and spectroscopy. *SPIE Microtechnologies*, 8763, 87630H.
- Jeffery, Peter K (1983). Morphologic Features of Airway Surface Epithelial Cells and Glands. *American Review of Respiratory Disease*, 128(2P2), S14–S20.
- Jiang, Jack Jiaqi and Titze, Ingo R (1993). A methodological study of hemilaryngeal phonation. *The Laryngoscope*, 103(8), 872–882.
- Jiang, Jack Jiaqi and Titze, Ingo R. (1994). Measurement of vocal fold intraglottal pressure and impact stress. *Journal of Voice*, 8(2), 132–144.
- Kahane, J C (1982). Growth of the human prepubertal and pubertal larynx. *Journal of speech and hearing research*, 25(3), 446–455.
- Kaiser, M L and Rubinstein, M and Vokes, D E and Ridgway, J M and Guo, S and Gu, M and Crumley, R L and Armstrong, W B and Chen, Z and Wong, B J F (2009). Laryngeal epithelial thickness : a comparison between optical coherence tomography and histology. *Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery*, 34(5), 460–6.
- Kajić, Vedran and Povazay, Boris and Hermann, Boris and Hofer, Bernd and Marshall, David and Rosin, Paul L and Drexler, Wolfgang (2010). Robust segmentation of intraretinal layers in the normal human fovea using a novel statistical model based on texture and shape analysis. *Optics express*, 18(14), 14730–44.
- Kakita, Y and Hirano, M and Kawasaki, H and Matsushita, H (1976). [Schematical presentation of vibration of pathological vocal cords (author's transl)]. *Nihon Jibiinkoka Gakkai kaiho*, 79(12), 1548–1553.
- Kass, Michael and Witkin, Andrew and Terzopoulos, Demetri (1988). Snakes : Active contour models. *International Journal of Computer Vision*, 1(4), 321–331.
- Khintchine, A (1934). Korrelationstheorie der stationären stochastischen Prozesse. *Mathematische Annalen*, 109(1), 604–615.

- Klein, Adam M and Pierce, Mark C and Zeitels, Steven M and Anderson, R Rox and Kobler, James B and Shishkov, Milen and de Boer, Johannes F (2006). Imaging the human vocal folds in vivo with optical coherence tomography : a preliminary experience. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 115(4), 277–284.
- Kraft, M and Lüerssen, K and Lubatschowski, H and Woenckhaus, J and Schöberlein, S and Glanz, H and Arens, C (2008). Mucosal lesions in the larynx : predictive value of new imaging modalities for a histological diagnosis. *Hno*, 56, 609–613.
- Kutta, Hannes and Steven, Philipp and Kohla, Guido and Tillmann, Bernhard and Paulsen, Friedrich (2002). The human false vocal folds – an analysis of antimicrobial defense mechanisms. *Anatomy and Embryology*, 205(4), 315–323.
- Kutty, JK (2009). Tissue engineering therapies for the vocal fold lamina propria. *Tissue Engineering Part B : Reviews*, 15(3).
- Lalwani, A (2011). *CURRENT Diagnosis & Treatment Otolaryngology–Head and Neck Surgery, Third Edition*. LANGE CURRENT Series. McGraw-hill.
- Leitgeb, R and Hitzenberger, C and Fercher, Adolf (2003). Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography. *Optics express*, 11(8), 889–94.
- Leitgeb, Rainer A and Schmetterer, Leopold and Hitzenberger, Christoph K and Fercher, Adolf F and Berisha, Fatma and Wojtkowski, Maciej and Bajraszewski, Tomasz (2004). Real-time measurement of in vitro flow by Fourier-domain color Doppler optical coherence tomography. *Opt. Lett.*, 29(2), 171–173.
- Lemire-Renaud, Simon and Strupler, Mathias and Benboujja, Fouzi and Godbout, Nicolas and Boudoux, Caroline (2011). Double-clad fiber with a tapered end for confocal endomicroscopy. *Biomedical Optics Express*, 2(11), 2961.
- Li, Nicole Y K and Heris, Hossein K and Mongeau, Luc (2013). Current Understanding and Future Directions for Vocal Fold Mechanobiology. *Journal of cytology & molecular biology*, 1(1), 1.
- Lüerssen, K and Lubatschowski, H and Ursinus, K and Gasse, H and Koch, R and Ptok, M (2006). [Optical coherence tomography in the diagnosis of vocal folds]. *Hno*, 54(8), 611–5.
- Lungova, Vlasta and Verheyden, Jamie M. and Herriges, John and Sun, Xin and Thibeault, Susan L. (2015). Ontogeny of the mouse vocal fold epithelium. *Developmental Biology*, 399(2), 263–282.
- Madore, Wendy-Julie and De Montigny, Etienne and Ouellette, Olivier and Bernard, Gabriel and Leduc, Mikael and Godbout, Nicolas and Boudoux, Caroline (2014). Double-clad fiber coupler for confocal endomicroscopy at 800 nm. *SPIE Photonics West*.

Marendic, B and Galatsanos, N and Bless, D (2001). New active contour algorithm for tracking vibrating vocal folds.

Martins, Regina Helena Garcia and Benito Pessin, Adriana Bueno and Nassib, Douglas Jorge and Branco, Anete and Rodrigues, Sergio Augusto and Matheus, Selma Maria Michelim (2015). Aging voice and the laryngeal muscle atrophy. *The Laryngoscope*, 125(11), 2518–2521.

Martins, Regina Helena Garcia and Defaveri, Julio and Custódio Domingues, Maria Aparecida and de Albuquerque E Silva, Rafael and Fabro, Alexandre (2010). Vocal fold nodules : morphological and immunohistochemical investigations. *Journal of Voice*, 24(5), 531–5399.

McLaughlin, Robert a and Scolaro, Loretta and Robbins, Peter and Saunders, Christobel and Jacques, Steven L and Sampson, David D (2009). Mapping tissue optical attenuation to identify cancer using optical coherence tomography. *Medical image computing and computer-assisted intervention : MICCAI ... International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, 12(Pt 2), 657–64.

McLaughlin, Robert a and Williamson, Jonathan P and Phillips, Martin J and Armstrong, Julian J and Becker, Sven and Hillman, David R and Eastwood, Peter R and Sampson, David D (2008). Applying anatomical optical coherence tomography to quantitative 3D imaging of the lower airway. *Optics express*, 16(22), 17521–9.

McNitt-Gray, M F and Wyckoff, N and Sayre, J W and Goldin, J G and Aberle, D R (1999). The effects of co-occurrence matrix based texture parameters on the classification of solitary pulmonary nodules imaged on computed tomography. *Computerized medical imaging and graphics : the official journal of the Computerized Medical Imaging Society*, 23(6), 339–48.

Mehta, Daryush D and Hillman, Robert E (2008). Voice assessment : updates on perceptual, acoustic, aerodynamic, and endoscopic imaging methods. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 16(3), 211–215.

Miri, Amir K. and Heris, Hossein K. and Tripathy, Umakanta and Wiseman, Paul W. and Mongeau, Luc (2013). Microstructural characterization of vocal folds toward a strain-energy model of collagen remodeling. *Acta Biomaterialia*, 9(8), 7957–7967.

Miri, Amir K and Li, Nicole Y K and Avazmohammadi, Reza and Thibeault, Susan L and Mongrain, Rosaire and Mongeau, Luc (2014). Study of extracellular matrix in vocal fold biomechanics using a two-phase model. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 14(1), 49–57.

Miri, Amir K and Tripathy, Umakanta and Mongeau, Luc and Wiseman, Paul W (2012). Nonlinear laser scanning microscopy of human vocal folds. *The Laryngoscope*, 122(2), 356–363.

- Mojsilović, a and Popović, M and Marković, S and Krstić, M (1998). Characterization of visually similar diffuse diseases from B-scan liver images using nonseparable wavelet transform. *IEEE transactions on medical imaging*, 17(4), 541–9.
- Montigny, Etienne De and Goulamhoussen, Nadir and Madore, Wendy-julie and Strupler, Mathias and Gologan, Olguta Ecaterina and Ayad, Tareck and Boudoux, Caroline (2016). Tri-modal microscope for head and neck tissue identification. 7(3), 6–15.
- Morgner, U and Drexler, W and Kärtner, F X and Li, X D and Pitrish, C and Ippen, E P and Fujimoto, J G (2000). Spectroscopic optical coherence tomography. *Opt. Lett.*, 25(2), 111–113.
- Netter, F H (2010). *Atlas of Human Anatomy*. Netter Basic Science. Elsevier Health Sciences.
- Newman, S R and Butler, J and Hammond, E H and Gray, S D (2000). Preliminary report on hormone receptors in the human vocal fold. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 14(1), 72–81.
- Nita, Luciana M and Battlehner, Claudia N and Ferreira, Marcelo a and Imamura, Rui and Sennes, Luiz U and Caldini, Elia G and Tsuji, Domingos H (2009). The presence of a vocal ligament in fetuses : a histochemical and ultrastructural study. *Journal of anatomy*, 215(6), 692–7.
- Noordzij, J Pieter and Ossoff, Robert H (2006). Anatomy and physiology of the larynx. *Otolaryngologic clinics of North America*, 39(1), 1–10.
- Oates, Jennifer and Winkworth, Alison (2008). Current knowledge, controversies and future directions in hyperfunctional voice disorders. *International journal of speech-language pathology*, 10(4), 267–277.
- Otsu, Nobuyuki (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9(1), 62–66.
- Pan, Yingtian and Xie, Huikai and Fedder, Gary K (2001). Endoscopic optical coherence tomography based on a microelectromechanical mirror. *Opt. Lett.*, 26(24), 1966–1968.
- Pelucchi, Claudio and Gallus, Silvano and Garavello, Werner and Bosetti, Cristina and La Vecchia, Carlo (2006). Cancer risk associated with alcohol and tobacco use : focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 29(3), 193–198.
- Pitrish, C and KT, Saunders and JG, Fujimoto and ME, Brezinski (2001). High-resolution imaging of the middle ear with optical coherence tomography : A feasibility study. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 127(6), 637–642.

- Prades, Jean-Michel and Dumollard, Jean Marc and Duband, Sébastien and Timoshenko, Andrei and Richard, Céline and Dubois, Marie Dominique and Martin, Christian and Peoc'h, Michel (2010). Lamina propria of the human vocal fold : histomorphometric study of collagen fibers. *Surgical and radiologic anatomy : SRA*, 32(4), 377–82.
- Ridgway, James Matthew and Ahuja, Gurpreet and Guo, Shuguang and Su, Jianping and Mahmood, Usama and Chen, Zhongping and Wong, Brian (2007). Imaging of the pediatric airway using optical coherence tomography. *The Laryngoscope*, 117(12), 2206–12.
- Ridgway, James M and Su, Jianping and Wright, Ryan and Guo, Shuguang and Kim, David C and Barretto, Roberto and Ahuja, Gurpreet and Sepehr, Ali and Perez, Jorge and Sills, Jack H and Chen, Zhongping and Wong, Brian J F (2008). Optical coherence tomography of the newborn airway. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 117(5), 327–34.
- Robb, M P and Goberman, A M and Cacace, A T (1997). An acoustic template of newborn infant crying. *Folia phoniatrica et logopaedica : official organ of the International Association of Logopedics and Phoniatrics (IALP)*, 49(1), 35–41.
- Roberts, Steve and Thornington, Roger E (2005). Paediatric bronchoscopy. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 5(2), 41–44.
- Rosen, Clark A and Gartner-Schmidt, Jackie and Hathaway, Bridget and Simpson, C Blake and Postma, Gregory N and Courey, Mark and Sataloff, Robert T (2012). A nomenclature paradigm for benign midmembranous vocal fold lesions. *The Laryngoscope*, 122(6), 1335–1341.
- Rosenberg, Tara L and Schweinfurth, John M (2009). Cell density of the lamina propria of neonatal vocal folds. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 118(2), 87–90.
- Ruffing, S and Struffert, T and Grgic, a and Reith, W (2005). Imaging diagnostics of the pharynx and larynx. *Der Radiologe*, 45, 828–836.
- Ruggeri, Marco and Tsechpenakis, Gavriil and Jiao, Shuliang and Jockovich, Maria Elena and Cebulla, Colleen and Hernandez, Eleut and Murray, Timothy G and Puliafito, Carmen A (2009). Retinal tumor imaging and volume quantification in mouse model using spectral-domain optical coherence tomography. *Optics express*, 17(5), 4074–4083.
- Rumboldt, Zoran and Gordon, Leonie and Bonsall, Rick and Ackermann, Susan (2006). Imaging in head and neck cancer. *Current treatment options in oncology*, 7(1), 23–34.
- Saint-Pierre, Charles-Auguste and Boisvert, Jonathan and Grimard, Guy and Cheriet, Farida (2007). Detection and correction of specular reflections for automatic surgical tool segmentation in thoracoscopic images. *Machine Vision and Applications*, 22(1), 171–180.

- Sakamoto, Atsushi and Hangai, Masanori and Yoshimura, Nagahisa (2008). Spectral-domain optical coherence tomography with multiple B-scan averaging for enhanced imaging of retinal diseases. *Ophthalmology*, 115(6), 1071–1078.e7.
- Sapienza, Christine M and Ruddy, Bari Hoffman and Baker, Susan (2004). Laryngeal structure and function in the pediatric larynx : clinical applications. *Language, speech, and hearing services in schools*, 35(4), 299–307.
- Sato, Kiminori and Hirano, Minoru (1997). Age-related changes of elastic fibers in the superficial layer of the lamina propria of vocal folds. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 106(1), 44–48.
- Sato, K and Hirano, M and Nakashima, T (2001). Fine structure of the human newborn and infant vocal fold mucosae. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 110(5 Pt 1), 417–24.
- Schmitt, Joseph M (1998). OCT elastography : imaging microscopic deformation and strain of tissue. *Opt. Express*, 3(6), 199–211.
- Schmitt, J M and Knüttel, a and Yadlowsky, M and Eckhaus, M a (1994). Optical-coherence tomography of a dense tissue : statistics of attenuation and backscattering. *Physics in medicine and biology*, 39(10), 1705–1720.
- Schneider, Caroline a and Rasband, Wayne S and Eliceiri, Kevin W (2012). NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Schweinfurth, John M and Thibeault, Susan L (2008). Does hyaluronic acid distribution in the larynx relate to the newborn's capacity for crying ? *The Laryngoscope*, 118(9), 1692–1699.
- Sepehr, Ali and Armstrong, William B and Guo, Shuguang and Su, Jianping and Perez, Jorge and Chen, Zhenping and Wong, Brian J F (2008). Optical coherence tomography of the larynx in the awake patient. *Otolaryngology-head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 138(4), 425–9.
- Sergeev, a and Gelikonov, V and Gelikonov, G and Feldchtein, F and Kuranov, R and Gladkova, N and Shakhova, N and Snopova, L and Shakhov, a and Kuznetzova, I and Denisenko, a and Pochinko, V and Chumakov, Y and Streltzova, O (1997). In vivo endoscopic OCT imaging of precancer and cancer states of human mucosa. *Optics express*, 1(13), 432–40.
- Shakhov, a V and Terentjeva, a B and Kamensky, V a and Snopova, L B and Gelikonov, V M and Feldchtein, F I and Sergeev, a M (2001). Optical coherence tomography monitoring for laser surgery of laryngeal carcinoma. *Journal of surgical oncology*, 77(4), 253–8.
- Sharma, Giriraj K and Ahuja, Gurpreet S and Wiedmann, Maximilian and Osann, Kathryn E and Su, Erica and Heidari, Andrew E and Jing, Joseph C and Qu, Yueqiao and Lazarow,

- Frances and Wang, Alex and Chou, Lidek and Uy, Cherry C and Dhar, Vijay and Cleary, John P and Pham, Nguyen and Huoh, Kevin and Chen, Zhongping and Wong, Brian J-F (2015). Long Range Optical Coherence Tomography of the Neonatal Upper Airway for Early Diagnosis of Intubation-related Subglottic Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.
- Shu, Yueyun and Bilodeau, G A and Cheriet, F (2005). Segmentation of laparoscopic images : integrating graph-based segmentation and multistage region merging.
- Šidlof, Petr and Švec, Jan G. and Horáček, Jaromír and Veselý, Jan and Klepáček, Ivo and Havlík, Radan (2008). Geometry of human vocal folds and glottal channel for mathematical and biomechanical modeling of voice production. *Journal of Biomechanics*, 41(5), 985–995.
- Soest van, Gijs and Goderie, Thadé and Regar, Evelyn and Koljenović, Senada and van Leenders, Geert L J H and Gonzalo, Nieves and van Noorden, Sander and Okamura, Takayuki and Bouma, Brett E and Tearney, Guillermo J and Oosterhuis, J Wolter and Serruys, Patrick W and van der Steen, Anton F W (2010). Atherosclerotic tissue characterization in vivo by optical coherence tomography attenuation imaging. *Journal of biomedical optics*, 15(1), 011105.
- Strupler, Mathias and Beckley, Amber M and Benboujja, Fouzi and Dubois, Sylvain and Noiseux, Isabelle and Mermut, Ozzy and Bouchard, Jean-Pierre and Boudoux, Caroline (2015). Toward an automated method for optical coherence tomography characterization. *Journal of Biomedical Optics*, 20(12), 126007.
- Strupler, Mathias and Deterre, Romain and Goulamhoussen, Nadir and Benboujja, Fouzi and Hartnick, Christopher J. and Boudoux, Caroline (2016). Biomedical Optics in Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Principles and Practice. B. Wong et J. Ilgner, éditeurs, *Nonlinear microscopy of the vocal folds*.
- Suvarna, S Kim. and Layton, Christopher and Bancroft, John D (2013). *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone Elsevier, [Oxford].
- Swanson, E a and Izatt, J a and Hee, M R and Huang, D and Lin, C P and Schuman, J S and Puliafito, C a and Fujimoto, J G (1993). In vivo retinal imaging by optical coherence tomography. *Optics letters*, 18(21), 1864–6.
- Takada, K and Yokohama, I and Chida, K and Noda, J (1987). New measurement system for fault location in optical waveguide devices based on an interferometric technique. *Applied optics*, 26(9), 1603–6.
- Tateya, Tomoko and Tateya, Ichiro and Bless, Diane M (2006). Collagen subtypes in human vocal folds. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 115(6), 469–476.

- Tearney, G J and Boppart, S a and Bouma, B E and Brezinski, M E and Weissman, N J and Southern, J F and Fujimoto, J G (1996a). Scanning single-mode fiber optic catheter-endoscope for optical coherence tomography : erratum. *Optics letters*, 21(12), 912.
- Tearney, G J and Brezinski, M E and Bouma, B E and Boppart, S A and Pitriss, C and Southern, J F and Fujimoto, J G (1997). In vivo endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5321), 2037–2039.
- Tearney, G J and Brezinski, M E and Fujimoto, J G and Weissman, N J and Boppart, S A and Bouma, B E and Southern, J F (1996b). Scanning single-mode fiber optic catheter–endoscope for optical coherence tomography. *Opt. Lett.*, 21(7), 543–545.
- Tearney, G J and Regar, E and Akasaka, T and Adriaenssens, T and Barlis, et al. (2012). Consensus standards for acquisition, measurement, and reporting of intravascular optical coherence tomography studies : a report from the International Working Group for Intravascular Optical Coherence Tomography Standardization and Validation. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(12), 1058–1072.
- Titze, Ingo R. and Martin, Daniel W. (1998). *Principles of Voice Production*, vol. 104. Prentice Hall.
- Tran, Peter H and Mukai, David S and Brenner, Matthew and Chen, Zhongping (2004). In vivo endoscopic optical coherence tomography by use of a rotational microelectromechanical system probe. *Optics letters*, 29(11), 1236–8.
- Tsai, Tsung-Han and Potsaid, Benjamin and Tao, Yuankai K and Jayaraman, Vijaysekhar and Jiang, James and Heim, Peter J S and Kraus, Martin F and Zhou, Chao and Hornegger, Joachim and Mashimo, Hiroshi and Cable, Alex E and Fujimoto, James G (2013). Ultrahigh speed endoscopic optical coherence tomography using micromotor imaging catheter and VCSEL technology. *Biomedical optics express*, 4(7), 1119–32.
- Uloza, Virgilijus and Saferis, Viktoras and Uloziene, Ingrida (2005). Perceptual and acoustic assessment of voice pathology and the efficacy of endolaryngeal phonemicrosurgery. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 19(1), 138–45.
- Unser, Michael (1995). Texture classification and segmentation using wavelet frames. *IEEE Transactions on Image Processing*, 4(11), 1549–1560.
- Upile, T. and Fisher, C. and Jerjes, W. and El Maaytah, M. and Searle, a. and Archer, D. and Michaels, L. and Rhys-Evans, P. and Hopper, C. and Howard, D. and Wright, a. (2007). The uncertainty of the surgical margin in the treatment of head and neck cancer. *Oral Oncology*, 43(4), 321–326.

- Vakoc, Benjamin J and Fukumura, Dai and Jain, Rakesh K and Bouma, Brett E (2012). Cancer imaging by optical coherence tomography : preclinical progress and clinical potential. *Nat Rev Cancer*, 12(5), 363–368.
- Vakoc, Benjamin J and Shishko, Milen and Yun, Seok H and Oh, Wang-Yuhl and Suter, Melissa J and Desjardins, Adrien E and Evans, John a and Nishioka, Norman S and Tearney, Guillermo J and Bouma, Brett E (2007). Comprehensive esophageal microscopy by using optical frequency-domain imaging (with video). *Gastrointestinal endoscopy*, 65(6), 898–905.
- Valter, Hugo and Ramos, Lisboa and Jesus, Manuel De (2005). Immunohistochemistry as a method to study elastic fibers of human vocal fold. *71(4)*, 486–491.
- Volgger, Veronika and Sharma, Giriraj K. and Jing, Joseph C. and Peaks, Ya-Sin A. and Loy, Anthony Chin and Lazarow, Frances and Wang, Alex and Qu, Yueqiao and Su, Erica and Chen, Zhongping and Ahuja, Gurpreet S. and Wong, Brian J.-F. (2015). Long-range Fourier domain optical coherence tomography of the pediatric subglottis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 79(2), 119–126.
- Wallis, Lesly and Jackson-Menaldi, Cristina and Holland, Wayne and Giraldo, Alvaro (2004). Vocal fold nodule vs. vocal fold polyp : answer from surgical pathologist and voice pathologist point of view. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 18(1), 125–9.
- Wang, Donglin and Fu, Linlai and Wang, Xin and Gong, Zhongjian and Samuelson, Sean and Duan, Can and Jia, Hongzhi and Ma, Jun Shan and Xie, Huikai (2013). Endoscopic swept-source optical coherence tomography based on a two-axis microelectromechanical system mirror. *Journal of Biomedical Optics*, 18(8), 086005.
- Wang, T C and Karayiannis, N B (1998). Detection of microcalcifications in digital mammograms using wavelets. *IEEE transactions on medical imaging*, 17(4), 498–509.
- Webb, Robert H (1999). Confocal optical microscopy. *Reports on Progress in Physics*, 59(3), 427–471.
- Wieser, Wolfgang and Klein, Thomas and Draxinger, Wolfgang and Huber, Robert (2015). Fully automated 1.5 MHz FDML laser with 100 mW output power at 1310 nm. *Optical Coherence Imaging Techniques and Imaging in Scattering Media*. Optical Society of America, 954116.
- Wilson, B.C. and Jacques, S.L. (1990). Optical reflectance and transmittance of tissues : principles and applications. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 26(12), 2186–2199.
- Wilson, T (1990). *Confocal Microscopy*. Acad. Press.

- Wojtkowski, Maciej and Bajraszewski, Tomasz and Targowski, Piotr and Kowalczyk, Andrzej (2003). Real-time in vivo imaging by high-speed spectral optical coherence tomography. *Optics letters*, 28(19), 1745–7.
- Wojtkowski, Maciej and Sikorski, Bartosz L and Gorczynska, Iwona and Gora, Michalina and Szkulmowski, Maciej and Bukowska, Danuta and Kaluzny, Jakub and Fujimoto, James G and Kowalczyk, Andrzej (2009). Comparison of reflectivity maps and outer retinal topography in retinal disease by 3-D Fourier domain optical coherence tomography. *Optics express*, 17(5), 4189–207.
- Wolf, Michael and Primov-Fever, Adi and Amir, Ofer and Jedwab, Dana (2005). The feasibility of rigid stroboscopy in children. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 69(8), 1077–9.
- Wong, Alexander and Mishra, Akshaya and Bizheva, Kostadinka and Clausi, David A (2010). General Bayesian estimation for speckle noise reduction in optical coherence tomography retinal imagery. *Optics express*, 18(8), 8338–8352.
- Wong, B J and de Boer, J F and Park, B H and Chen, Z and Nelson, J S (2000). Optical coherence tomography of the rat cochlea. *Journal of biomedical optics*, 5(4), 367–70.
- Wong, Brian J F and Jackson, Ryan P and Guo, Shuguang and Ridgway, James M and Mahmood, Usama and Su, Jianping and Shibuya, Terry Y and Crumley, Roger L and Gu, Mai and Armstrong, William B and Chen, Zhongping (2005). In vivo optical coherence tomography of the human larynx : normative and benign pathology in 82 patients. *The Laryngoscope*, 115(11), 1904–11.
- Woodson, Gayle (2012). Developing a porcine model for study of vocal fold scar. *Journal of Voice*, 26(6), 706–710.
- Xie, Tuqiang and Xie, Huikai and Fedder, Gary K and Pan, Yingtian (2003). Endoscopic optical coherence tomography with a modified microelectromechanical systems mirror for detection of bladder cancers. *Appl. Opt.*, 42(31), 6422–6426.
- Yazdanpanah, Azadeh and Hamarneh, Ghassan and Smith, Benjamin R and Sarunic, Marinko V (2011). Segmentation of intra-retinal layers from optical coherence tomography images using an active contour approach. *IEEE transactions on medical imaging*, 30(2), 484–96.
- Yellon, Robert F and Borland, Lawrence M and Kay, David J (2007). Flexible fiberoptic laryngoscopy in children : effect of sitting versus supine position. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 71(8), 1293–7.

Yun, S H and Boudoux, C and Tearney, G J and Bouma, B E (2003). High-speed wavelength-swept semiconductor laser with a polygon-scanner-based wavelength filter. *Optics letters*, 28(20), 1981–3.

Zeitels, Steven M and Hillman, Robert E and Desloge, Rosemary and Mauri, Marcello and Doyle, Patricia B (2002). Phonosurgery in singers and performing artists : treatment outcomes, management theories, and future directions. *The Annals of otology, rhinology & laryngology. Supplement*, 190, 21–40.

Zhou, Yifeng and Chan, Kenny K H and Lai, Tom and Tang, Shuo (2013). Characterizing refractive index and thickness of biological tissues using combined multiphoton microscopy and optical coherence tomography. *Biomedical optics express*, 4(1), 38–50.

## ANNEXE A MICROENDOSCOPIE NON LINÉAIRE DES CORDES VOCALES

La microscopie non linéaire permet d'obtenir un contraste intrinsèque du collagène et de l'élastine sans l'ajout de fluorophore exogènes [Miri *et al.* (2012)]. Ces macromolécules présentent dans la matrice extracellulaire sont un indicateur de l'état de maturité de la corde vocale [Hirano (1975)]. Bien que les microscopes de table soient présents depuis quelques années dans les laboratoires de biologie, de neurologie et d'oncologie, cette technique d'imagerie est encore limitée au contexte *ex vivo*. De récents développements en fibres optiques [Lemire-Renaud *et al.* (2011); Madore *et al.* (2014); De Montigny *et al.* (2014)] permettent d'envisager une intégration de la microscopie non linéaire en milieu clinique. Notamment, de nouveaux coupleurs en fibre optique à double gaine (DCFC, de l'anglais pour « Double Clad Fiber Coupler ») permettent une efficacité d'excitation et de collection inégalée. Les sections suivantes décrivent, d'une part, un montage non linéaire pour l'observation des cordes vocales, et, d'autre part, une proposition visant à jumeler la microscopie non linéaire et l'OCT dans une même sonde endoscopique.

### Imagerie non linéaire des cordes vocales

Un microscope de table non linéaire a été développé et assemblé au laboratoire d'optique et diagnostique de l'École Polytechnique. Il permet d'extraire la fluorescence à deux photons et la génération de seconde harmonique simultanément. Le montage est représenté à la Figure A.1.

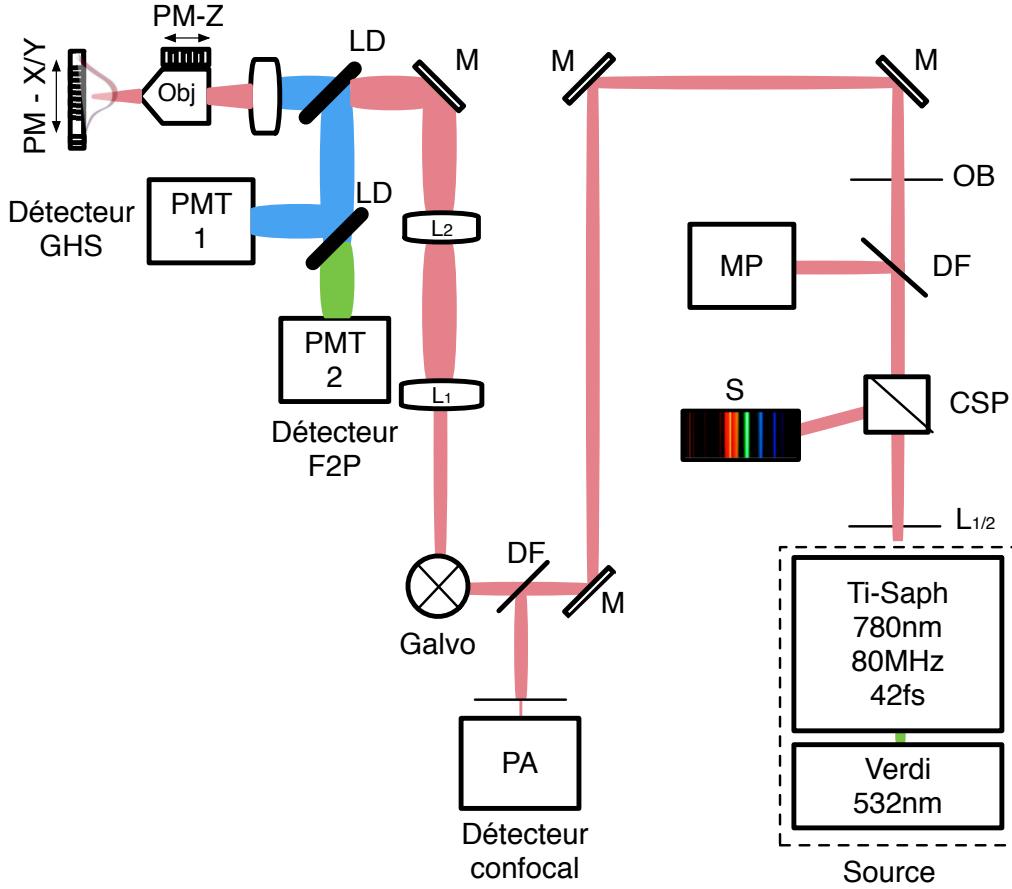


Figure A.1 Schéma d'un microscope optique non linéaire développé pour la visualisation des cordes vocales. S : spectromètre ; CSP : cube séparateur de polarisation ; Galvo : galvanomètres ; DF : diviseur de faisceau ; M : miroir ; OB : obturateur ; MP : moniteur de puissance ; LD : lame dichroïque ; PMT : photomultiplicateur ; PM : platine motorisée ; PA : photodiode avalanche ; L<sub>1</sub>-L<sub>2</sub> : Lentilles d'un système afocal.

Un laser femtoseconde Titane :Saphire (FemtoRose 10, Hongrie, Budapest) d'une longueur d'onde centrale  $\lambda_c = 800 \mu\text{m}$  et de largeur spectrale  $\delta\lambda = 80 \mu\text{m}$  avec une puissance de sortie de 300 mW est utilisé pour imager les cordes vocales ex vivo. Une lame demi-onde permet de contrôler la puissance envoyée à l'échantillon. Cette puissance est calibrée à la sortie de l'objectif à 10 mW. Le déplacement de l'objectif (UMPLFLN 20XW, 0.5 NA, immersion à l'eau, Olympus, Japon) permet d'ajuster la distance focale à l'échantillon, une platine de translation motorisée est utilisée à cette fin (M-111, Physik instrumente, Allemagne). Deux galvanomètres (6215H, Cambridge Technology, États-Unis) sont utilisés pour permettre de balayer l'échantillon spatialement en X et Y pour former une image (512 x 512 pixels). Chaque

image correspond à une superficie de 250 µm par 250 µm. Un espace de recouvrement entre deux images successives permet d'assurer une continuée et un recalage adéquat. La vitesse de pointe des galvanomètres est de 2 kHz, ce qui permet d'acquérir 4 images par seconde. Une platine de translation motorisée (MAX202, Thorlabs, New Jersey, États-Unis) permet de déplacer l'échantillon dans les axes X et Y permettant ainsi d'atteindre une grande surface, de l'ordre quelques centimètres. Le système d'imagerie non linéaire est assemblé en mode d'épi-illumination, c'est-à-dire qu'un seul objectif est utilisé pour l'illumination et la détection des photons. Les photons détectés sont redirrigés par des lames dichroïques (filtres en longueur d'onde) pour séparer adéquatement les signaux d'auto fluorescence (F2P) et de diffusion (SHG). Le signal confocal est également recueilli, cependant en amont des galvanomètres pour maintenir la colocalisation des faisceaux (illumination-détection). Chacune des modalités possède son détecteur respectif (PMT, Hamamatsu Photonics, Japon). La numérisation des signaux provenant des détecteurs est réalisée par une carte d'acquisition (PCI-6115, National Instrument, États-Unis) intégrée à un ordinateur. Un logiciel réalisé pour les besoins de l'imagerie des cordes vocales permet de contrôler les paramètres d'acquisition (exposition laser, puissance, déplacement des platines de translation...etc.). Quelques lamelles histologiques de cordes vocales ont été analysées avec le microscope non linéaire. Une acquisition complète de l'échantillon de la corde vocale prend 40 minutes à compléter.

L'imagerie confocale, l'autofluorescence à deux photons et la génération de seconde harmonique sont utilisées pour caractériser la microstructure de la corde vocale. La représentation typique d'une corde vocale d'un spécimen porcin est illustrée à la Figure A.2. La couche épithéliale (E) est clairement différenciable de la lamina propria (LP). Tel qu'indiqué par les flèches, l'épithélium est visible en confocal et fluorescence à deux photons (F2P), mais invisible en génération de seconde harmonique (GSH) étant donné l'absence de collagène et de structures fibrillaires. Le grossissement de la région d'intérêt, illustré à la Figure A.3 permet d'identifier une fine couche de collagène, tout juste après la couche épithéliale. Elle est particulièrement visible en F2P. Le contraste afficher en confocal et en F2P, est cependant différent tel qu'indiqué par les flèches (A). La réponse optique des noyaux est sombre en deux photons contrairement à l'imagerie confocale.

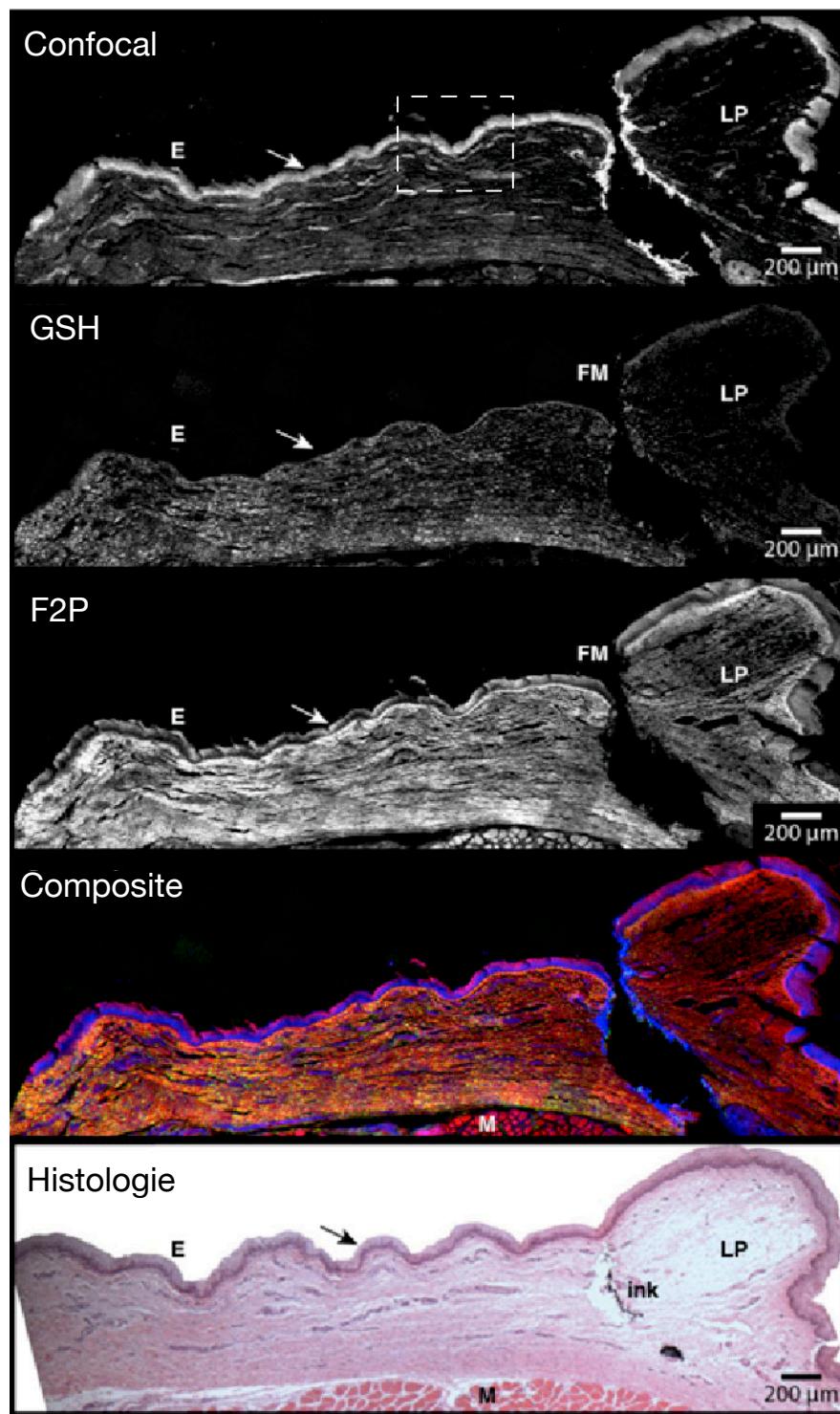


Figure A.2 Section d'une corde vocale d'un spécimen porcin imagé avec le microscope non linéaire. Des images confocale, GSH, et F2P sont acquises simultanément pour former une image composite. Le bleu, le rouge et le vert représente, respectivement, les signaux confocaux, GSH et F2P. Les flèches indiquent sur chacune des modalités la couche épithéliale. La coupe histologique correspondante illustre la différence de contraste entre les modalités optiques et la coloration H&E. Adapté et tirée de [Strupler *et al.* (2016)]

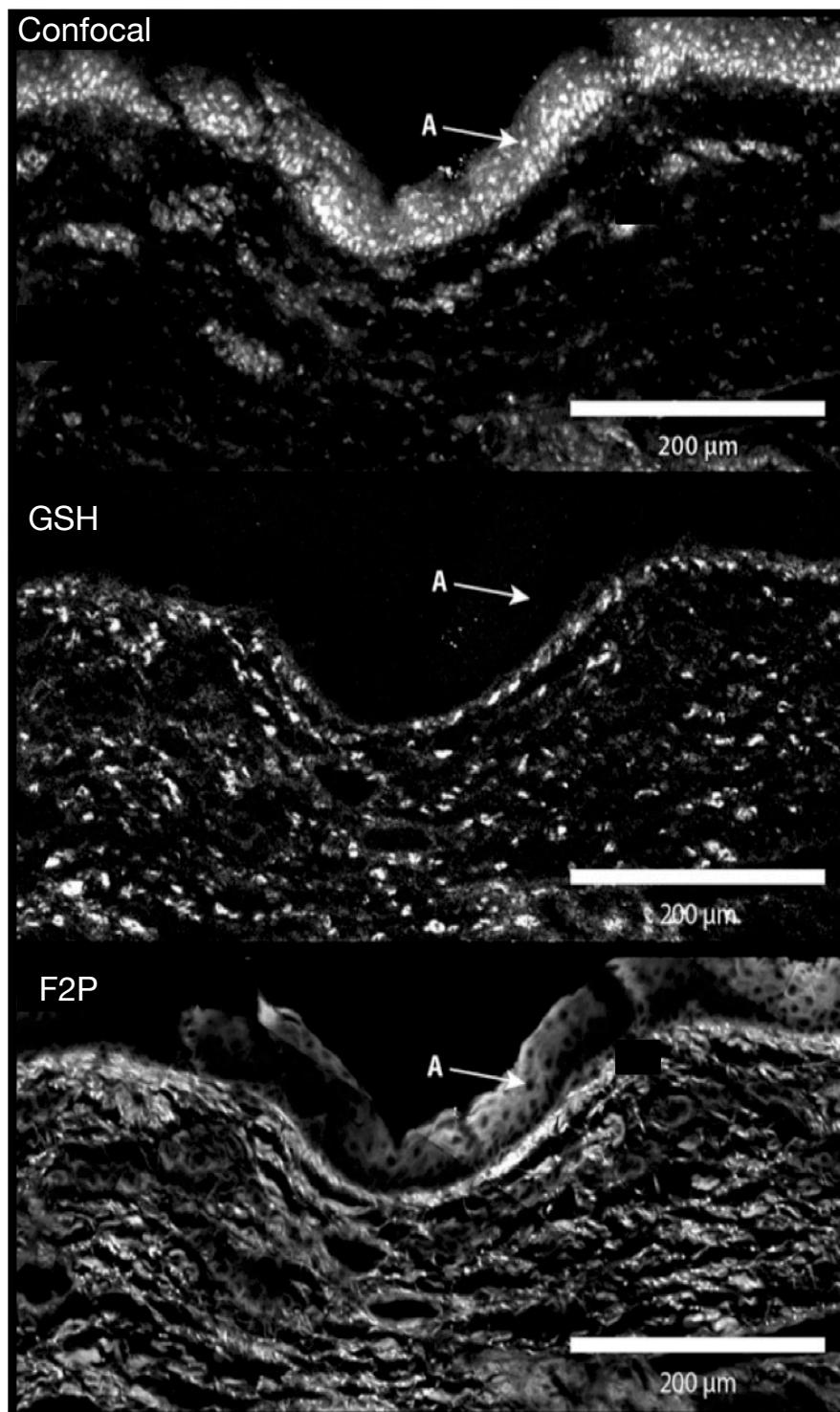


Figure A.3 Grossissement de la section d'une corde vocale d'un spécimen porcin représenté à la Figure A.2. Les flèches A indiquent la différente réponse optique de la couche épithéliale selon la modalité optique utilisée. Tirée et adaptée de [Strupler *et al.* (2016)]

Cette technique d'imagerie a l'avantage de fournir une information moléculaire de façon intrinsèque, une information manquante en OCT. Toutefois, la profondeur de pénétration limitée de ce type d'imagerie balistique ne permet pas d'imager toute la lamina propria. Une imagerie combinée permettrait de joindre les deux forces de ces techniques. La section suivante propose une piste pour la conception d'un tel instrument intraopératoire.

### **Endomicroscopie multimodale**

Il s'agit ici d'adapter le système décrit à la section précédente à un environnement clinique. La Figure A.4 représente un montage qui permettrait d'acquérir simultanément les signaux d'imagerie non linéaire et de tomographie par cohérence optique. La source du système non linéaire et du système OCT sont jumelés à la sonde endoscopique par le biais d'une lame dichroïque (LD). L'émission et la collection des signaux non linéaire est réalisé avec un coupleur DCFC. Le signal d'excitation est acheminé par le cœur de la fibre à partir du port 3 au port 1 du coupleur DCFC. Le signal de fluorescence est collecté par la gaine interne du port 1 et est acheminé efficacement au détecteur par le biais du port 2 du coupleur. Le signal OCT de retour demeure dans le cœur de la fibre et est récupéré par un circulateur. Une sonde à balayage rotatif distal avec un micromoteur est suggérée pour acquérir des images radiales rapidement du larynx.

Dans cette première version, seule la fluorescence à deux photons serait collectée. Toutefois, ultimement un deuxième photomultiplicateur pourrait être ajouté pour permettre de collecter la génération de seconde harmonique.

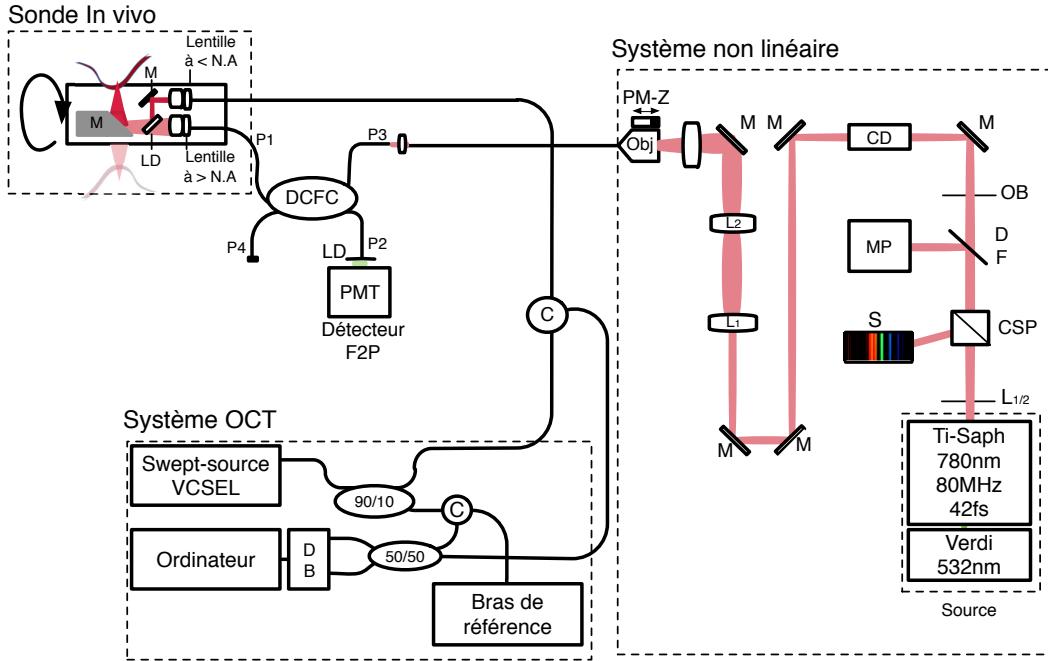


Figure A.4 Schéma d'un microscope multimodal non linéaire et OCT développé pour la visualisation des cordes vocales in vivo. Un coupleur à double gaine et une sonde rotative à micromoteur sont utilisés pour acheminer le faisceau aux cordes vocales. S : spectromètre ; CSP : cube séparateur de polarisation ; CD : compensateur à dispersion ; DF : diviseur de faisceau ; M : miroir ; OB : obturateur ; MP : moniteur de puissance ; LD : lame dichroïque ; PMT : photomultiplicateur ; PM : platine motorisée ; PA : photodiode avalanche ; L1-L2 : Lentilles d'un système afocale ; DCFC : « Double Clad Fiber Coupler » ; P1-P4 : Port de sortie du coupleur à double gaine.

## Discussion

La microscopie non linéaire est un outil très puissant pour explorer la corde vocale. Elle permet d'identifier les macromolécules (collagène et élastine) avec une excellente résolution sans aucune modification au tissu. Toutefois, elle possède un taux de pénétration plus faible que l'OCT. La microscopie non linéaire peut imager jusqu'à 350 µm de profondeur, ce qui est insuffisant pour observer l'entièvre lamina propria. Toutefois, elle peut s'avérer être un complément intéressant à l'imagerie OCT pour l'observation de l'épithélium et la région superficielle de la lamina propria à haute résolution. Le montage multimodal proposé pourrait permettre d'intégrer ces deux modalités au sein d'un seul instrument clinique.

## ANNEXE B PROTOCOLE

Cette section décrit le protocole clinique et les étapes à suivre pour l'évaluation adéquate des cordes vocales avec le système OCT.

### Protocole clinique

Les patients sont maintenus en suspension pendant l'intervention. Cette configuration permet à la sonde d'imagerie d'être introduit par le biais d'un laryngoscope pour assurer une stabilité. La sonde est insérée et placée légèrement en contact avec la partie inférieure de la corde vocale. Des images OCT en temps réel sont acquises pendant que la sonde est déplacée supérieurement vers le pli de la corde vocale : région d'intérêt. Une fois la région d'intérêt identifiée, une acquisition 3D est effectuée et la sonde est retirée de la cavité buccale. Les images obtenues sont stockées numériquement pour consultation ultérieure.

### Critère d'inclusion

Enfant âgé de 1 mois à 18 ans subissant une laryngoscopie ou bronchoscopie pour l'évaluation des voies aériennes avec anesthésie générale.

### Critère d'exclusion

Des enfants qui ont déjà été intubés ou des enfants fumeurs. Les autres critères d'exclusions sont à la discrétion du chirurgien traitant.

### Protocole d'acquisition en salle opératoire

- 1. S'assurer que le consentement éclairé des parents et patients est obtenu daté et signé.
- 2. Alimenter le chariot OCT,
- 3. Démarrer le système OCT,
- 4. Allumer le laser de guidage,

- 5. Allumer la source,
- 6. Démarrer une acquisition 2D,
- 7. Tester et valider l'image sur son doigt,
- 8. Vérifier la puissance à la pointe de la sonde,
- 9. Fermer la source OCT,
- 10. Nettoyage de la sonde avec l'alcool,
- 11. Application de gaine de stérile sur la sonde,
- 12. Remettre la sonde au chirurgien,
- 13. Une fois la sonde dans la cavité buccale, allumer la source,
- 14. Suivre sur les images OCT la transition entre l'espace sous glottique et la glotte,
- 15. Une fois la région d'intérêt identifiée, démarrer l'acquisition 3D,
- 16. Répéter 13-14, pour corde vocale gauche.
- 17. Fermer la source,
- 18. Collecter les données complémentaires (âge, sexe, longueur des cordes vocales).

## ANNEXE C COMPLÉMENT OCT

### Les grands joueurs en OCT

La tomographie par cohérence optique connaît un essor important dans le domaine de l'imagerie médicale. Un bon nombre d'entreprises sont présentes. À ce jour plus d'une cinquante de compagnies sont recensé 2016). Voici la liste des entreprises (tiré de <http://opticalcoherencetomography.net>) :

Agfa Healthcare, Alazartech, Avinger, Axsun, Bausch+Lomb/Technolas Perfect Vision, Leica Bioptigen, Convai Medical/Colibri, Compact Imaging, Corning, CyLite Optics, DermaLumics, Diagnostic Photonics, Exalos, Gooch & Housego, Haag-Streit, Heidelberg Engineering, Imalux, Innoluce, Insight Photonics, LLTech, Mabri.Vision, MedLumics, Michelson Diagnostics, MicroTech, Shenzhen Moptim Imaging Technology, NinePoint Medical, NKT Photonics, Novacam, OCT Medical Imaging, OFS/Furukawa, OPMedT, Optores, Optos, Optovue, Perimeter Medical, PhotoniCare, Physical Sciences Incorporated, Praevium, Santec, Schwind Eye-Tech Solutions, Sensors Unlimited/United Technologies Corporation, St. Jude Medical, Superlum, Terumo, Thorlabs, Tomey, Tomophase, Topcon, Tornado Spectral Systems, Unnamed Company, Unnamed Company, Voxeleron, Wasatch Photonics, WiO Technology Limited, Carl Zeiss Meditec.