

Titre: Imagerie optique pour le diagnostic du cancer de l'ovaire
Title:

Auteur: Wendy Julie Madore
Author:

Date: 2016

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Madore, W. J. (2016). Imagerie optique pour le diagnostic du cancer de l'ovaire
Citation: [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/2368/>

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/2368/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Caroline Boudoux, & Nicolas Godbout
Advisors:

Programme: Génie physique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

IMAGERIE OPTIQUE POUR LE DIAGNOSTIC DU CANCER DE L'OVAIRE

WENDY JULIE MADORE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

IMAGERIE OPTIQUE POUR LE DIAGNOSTIC DU CANCER DE L'OVAIRE

présentée par : MADORE Wendy Julie

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiæ Doctor

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

M. MEUNIER Michel, Ph. D., président

Mme BOUDOUX Caroline, Ph. D., membre et directrice de recherche

M. GODBOUT Nicolas, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. COSTANTINO Santiago, Ph. D., membre

M. LAMOUCHE Guy, Ph. D., membre externe

DÉDICACE

*« L'homme a soif de vérité,
mais est-ce la source qu'il cherche
- ou l'abreuvoir ? »
Gustave Thibbon*

*À mon époux,
qui chaque jour me pousse
à privilégier la source plutôt que l'abreuvoir*

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mes directeurs de recherche, Prof. Nicolas Godbout et Prof. Caroline Boudoux. Nicolas, voilà bientôt près de 10 ans que tu agis à titre de mentor, pour mes stages de recherche au début, puis comme directeur de recherche pour la maîtrise et le doctorat. Merci pour ta confiance, ta patience, ton souci du détail et pour un accès privilégié à tes vastes connaissances et ta vision de l'optique et des fibres. Caroline, nous avons interagis sur un délai plus court, mais qui n'en fut pas moins intense. Merci pour ta vision très multidisciplinaire de la recherche et ta passion pour la résolution de problèmes d'envergure. Grâce à vous, j'ai beaucoup évolué comme chercheuse, mais également comme personne.

Je souhaite également remercier toute l'équipe du CHUM pour la collaboration très fructueuse entretenue dans le cadre de cette thèse. Un grand merci particulièrement à Dre Diane Provencher, Dre Anne-Marie Mes-Masson et Dr Kurosh Rahimi pour avoir cru en mes idées nouvelles et m'avoir accordé leur confiance tout au long du projet. Travailler à vos côtés a été très inspirant. Merci également à toute l'équipe médicale du CHUM autant en chirurgie qu'en pathologie. Merci aux membres des laboratoires de l'axe cancer du centre de recherche du CHUM, de même que les membres de la plateforme de pathologie moléculaire. Liliane, Christine et Manon, merci pour vos réponses rapides à mes mille et une questions. Un grand merci également à l'équipe de l'animalerie du CRCHUM pour m'avoir accompagnée dans mes prélèvements sur les animaux, en particulier Dre Hélène Héon et Mélissa Marcoux.

Je ne peux passer sous silence Mikaël Leduc, notre dévoué technicien du Laboratoire des fibres... Toutes ces aventures de montages d'étirage, de sondes, de coupleurs pour repousser les limites de ce que l'on croyait possible de faire. Un très gros merci pour tes solutions créatives, ta patience et ton écoute, je n'aurais jamais pu en réaliser autant sans ton apport.

Mille mercis à mes collègues de laboratoire/bureau/compagnons d'études supérieures, passés et présents. Vous avez su rendre ce passage à Polytechnique très enrichissant et agréable, en plus d'offrir la possibilité de ventiler en temps opportuns. Merci aux gens du LFO, du LODI, du LRO, les gens de chez Prof. Thomas Gervais, Prof. Sébastien Francoeur et Prof. Raman Kashyap. Je tiens à vous remercier tout un chacun !

Pour terminer ces remerciements, merci à mon époux Etienne, à ma famille et à mes amis pour votre support indéfectible tout au long de cette aventure. Je ne vous nommerai pas tous : vous saurez vous reconnaître, car vous avez tous votre place privilégiée dans ma vie.

RÉSUMÉ

Le cancer de l’ovaire est l’un des cancers les plus mortels en raison de sa progression excessivement rapide. Il s’agit également d’une pathologie très hétérogène, prenant plusieurs formes et débutant souvent hors de l’ovaire. Une fraction importante des tumeurs et lésions prennent origine dans la trompe de Fallope, anatomiquement difficile d’accès. Actuellement, le diagnostic du cancer de l’ovaire se fait via une chirurgie exploratoire au cours de laquelle les organes touchés sont retirés pour examen pathologique. Le pathologiste effectue une inspection visuelle, puis quelques coupes histologiques pour établir s’il existe ou non une (des) lésion(s) et de quel type, ce qui permet d’établir le diagnostic de la patiente, puis le plan de traitement. Il est possible que des lésions et petites tumeurs (quelques centaines de micromètres) ne soient pas relevées à l’examen pathologique. Cette information manquante ne peut être employée pour établir le type et le stade de cancer, résultant parfois en un faux négatif (la patiente est déclarée saine alors qu’elle a un cancer), ce qui retarde le traitement et entraîne de sérieuses complications, souvent la mort, dans les 12 à 24 mois suivants l’intervention.

Cette thèse de doctorat propose un nouvel instrument d’analyse exhaustive des trompes de Fallope afin d’assister le pathologiste dans sa tâche en faisant un lien entre l’inspection visuelle et l’analyse microscopique. L’instrument proposé est un système d’imagerie optique combinant la tomographie par cohérence optique (OCT) à la spectroscopie en fluorescence. Ainsi, la totalité de la trompe pourrait être imagée en quête de lésions potentiellement malignes. Les lésions détectées pourront être indexées et ensuite analysées de façon traditionnelle en pathologie.

La thèse présente d’abord une revue critique des éléments clés de la littérature concernant le cancer de l’ovaire et l’importance des trompes de Fallope dans le dépistage et le diagnostic. Plusieurs nouvelles hypothèses médicales réorientent la recherche sur le cancer de l’ovaire et la thèse cherche à intégrer ces nouvelles idées. Dans l’effort d’acheminer un instrument d’imagerie optique en clinique pour le diagnostic, un travail en instrumentation a d’abord été réalisé. Ce travail passe par la réalisation de composants en fibre à double gaine, permettant de combiner plus d’une modalité d’imagerie par la même fibre en minimisant la dégradation des performances pour chacune des modalités. La première version du coupleur est un composant asymétrique en fibre à grande gaine interne. Ses performances sont en accord avec le modèle de prédiction théorique des performances développé dans la thèse. La seconde version du coupleur présente une amélioration des performances multimodes près des limites maximales théoriques. La conception et la fabrication de ce composant ont été possibles grâce à

trois nouveaux principes de conception. Ces coupleurs ont ensuite été intégrés à des montages d'imagerie multimodale combinant par exemple l'OCT et la fluorescence. De nouveaux coupleurs ont également été produits pour certaines applications spécifiques. Des coupleurs à petite gaine interne ont été intégrés à des montages de microscopie confocale avec contraste de fluorescence et de réflectance, de même que dans un montage à trois modalités (OCT, confocal et fluorescence). Enfin, un coupleur d'injection multimode a aussi été développé à partir des avancées des deux précédents composants et a été appliqué à la coagulation laser assistée par OCT. Ces preuves de principes sont encourageantes pour la fabrication d'instruments efficaces combinant plusieurs modalités dédiés à des problématiques cliniques spécifiques.

Un travail préclinique est ensuite amorcé pour identifier les structures visibles à l'OCT dans les ovaires et les trompes de Fallope. Des échantillons de trompes et d'ovaires humains en paraffine sains et pathologiques ont été étudiés, de même que trois modèles animaux sains. Deux prototypes de sondes endoscopiques sont ensuite développés pour accéder à l'intérieur des trompes de Fallope humaines et leurs performances sont comparées avec celles d'un système d'imagerie commercial pris à titre d'état de l'art. Une sonde de spectroscopie de fluorescence a également été fabriquée. Avec ces prototypes, une étude clinique préliminaire sur 5 patientes est réalisée en collaboration avec le CHUM Notre-Dame. L'imagerie de spécimens frais est réalisée dans l'antichambre de la salle de chirurgie. Une étude clinique sur 25 patientes est ensuite réalisée pour constituer un atlas de structures saines et bénignes visibles dans les trompes de Fallope. Des spectres d'autofluorescence sont également acquis en différents segments de la trompe afin de valider la valeur ajoutée de telles acquisitions par rapport à une valeur de puissance.

Une réflexion sur la portée des résultats et de nouvelles applications est présentée. Les étapes futures de ce projet incluent entre autres l'augmentation du nombre de patientes afin de confronter le système à des cas de carcinomes tubaires séreux intraépithéliaux (STICs), qui représentent les lésions de petit volume à cibler lors du diagnostic. Une quantification de la spécificité et de la sensibilité de cet instrument sera également possible avec un nombre plus élevé de patientes. Ainsi, il sera possible d'évaluer l'impact d'un tel instrument comme outil pour les pathologistes afin de réaliser une inspection exhaustive et rapide des tissus de trompe, avec une résolution située entre celle de l'examen macroscopique et l'analyse histologique. Un instrument similaire sera peut-être un jour ajouté aux protocoles d'analyse diagnostique en cancer de l'ovaire.

ABSTRACT

Ovarian cancer is one of the deadliest cancers for women. The progression of this disease is very fast and spreads to the whole body through the abdominal cavity. This pathology is highly heterogeneous and is now believed to originate away from the ovary in the majority of cases. In fact, the majority of the lesions and tumours spreads from the fallopian tube. Since direct access to these organs is difficult, diagnosis is performed after exploratory surgery, during which fallopian tubes, ovaries and uterus are removed for pathological examination. A pathologist then carefully inspects and dissects the tubes and ovaries looking for small lesions and tumours (a few hundreds of micrometers) to establish a diagnosis. It is possible that some of these lesions may be overlooked. If these lesions are missed during pathological evaluation, treatment can be delayed (in case of false negative, the patient is declared healthy but has a cancer), resulting in heavy complications, including death, in the following 12 to 24 months following the intervention.

This Thesis investigates a new instrument for extensive analysis of the fallopian tubes to assist the pathologist during his or her diagnostic process. This instrument is an imaging system combining optical coherence tomography (OCT) and autofluorescence spectroscopy that can be inserted directly into the tubes. Such instrument could enable complete imaging of the tubes in order to locate potentially harmful lesions. These lesions can then be identified on the tube for further histological analysis.

The Thesis first presents a critical literature review about ovarian cancer and the role of fallopian tubes in screening and diagnosis of this condition. New medical hypothesis are now reorienting research and this Thesis leverages from these ideas. Working towards clinical use of the device, new instrumentation components have been developed. This work is based on optical fiber components enabling multimodal imaging through a double-clad fiber. The first version of the coupler developed is an asymmetric double-clad fiber coupler, along with a theoretical model predicting the performances of such device. In the second version, three new design concepts were used to design and fabricate the component. This coupler has performances close to the maximum theoretical limits. These couplers are then demonstrated in multimodal imaging schemes, such as OCT combined with fluorescence imaging. The three new design concepts were applied to small inner cladding double clad fiber couplers. Such devices were then integrated in a confocal imaging system with both fluorescence and reflectance contrasts as well as a tri-modal benchtop microscope (OCT, confocal and fluorescence imaging). A coupler for efficient multimode injection has also been developed

leveraging from the advances made in the two previous devices. That coupler has been used for laser marking assisted by OCT on biological samples. Proofs of concept offer encouraging evidences that efficient instruments combining multiple imaging modalities can be tailored to specific clinical applications.

Pre-clinical studies are then undertaken to identify the visible structures in gynaecological samples. Fixed specimens of ovaries and fallopian tubes, healthy and pathologic, are imaged using OCT and compared to histology. Fresh healthy specimens from three animal models are also studied. Two prototypes of OCT probes are designed and built to access the inner part of the fallopian tubes. They are characterized and compared to a commercial benchtop system as state-of-the-art reference. A point probe for fluorescence spectroscopy is also fabricated. With these imaging systems, a clinical pilot study on 5 patients is performed in collaboration with CHUM Notre-Dame. Imaging of fresh human specimens is done right next to the surgery room. A clinical study on 25 patients is then performed to build an atlas of images for healthy and benign conditions. Autofluorescence spectra are also acquired at various anatomic locations within the fallopian tube to assess the need for whole spectra acquisition compared to integrated fluorescence power measurements.

Considerations on the applicability of the results and other applications of the instrument are discussed. Future steps for the project include increasing the number of patients in the study in order to image malignant cases (with serous tubal intra-epithelial carcinomas, or STICs). Those lesions are the ones of interest for diagnosis. With the higher number of patients, a statistically significant quantification of specificity and sensitivity can be assessed. The relevance of this kind of imaging instrument during diagnosis of ovarian cancer could then be asserted. That instrument would allow for an extensive examination of the internal fallopian tube with a resolution comprised between the one of the human eye and micron-scale histology. Maybe one day such instrument will be included as part of the routine protocol for ovarian cancer diagnosis.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iii
REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xvi
LISTE DES ANNEXES	xviii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Introduction et contexte général	1
1.2 Anatomie du système reproducteur féminin	2
1.3 Cancer de l’ovaire	3
1.4 Évaluation clinique	4
1.5 Cahier de charges	7
1.6 Objectifs de recherche	8
1.7 Plan de la thèse	8
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	10
2.1 Impact des facteurs génétiques	10
2.2 Carcinogenèse	11
2.3 Lésions et tumeurs de petit volume	13
2.4 Imagerie des organes gynécologiques	16
2.5 Sondes et imagerie multimodale	21
2.6 Tomographie par cohérence optique	22
2.7 Fenêtre optique	27
2.8 Fibres optiques	29

2.9 Composants en fibres optiques	32
CHAPITRE 3 ARTICLE 1 : ASYMMETRIC DOUBLE-CLAD FIBER COUPLERS FOR ENDOSCOPY	
3.1 Abstract	37
3.2 Introduction	37
3.3 Methodology	38
3.4 Results and discussion	40
3.5 Conclusion	44
CHAPITRE 4 IMAGERIE MULTIMODALE - PREUVE DE PRINCIPE	
4.1 Système d'imagerie multimodale combinant l'OCT et la fluorescence	46
4.2 Imagerie confocale en réflectance et en fluorescence	57
4.3 Problématique d'injection multimode	62
4.4 Discussion et conclusion	65
CHAPITRE 5 IMAGERIE PRÉ-CLINIQUE DES TROMPES DE FALLOPE	
5.1 Modèles animaux	68
5.2 Tissus humains en paraffine	79
5.3 Conclusion	92
CHAPITRE 6 SONDES ENDOSCOPIQUES À FIBRE UNIQUE POUR L'IMAGERIE DES TROMPES DE FALLOPE	
6.1 Méthodologie	95
6.2 Sondes à canule fixe	97
6.3 Sondes à micro-moteur rotatif	104
6.4 Comparaison des trois têtes d'imagerie	110
6.5 Validation préclinique des sondes	114
6.6 Discussion et conclusion	115
CHAPITRE 7 ÉTUDE CLINIQUE PRÉLIMINAIRE	
7.1 Protocole et méthodologie	118
7.2 Protocole de pathologie	119
7.3 Résultats OCT	121
7.4 Spectres d'autofluorescence	124
7.5 Validation clinique de la sonde	126
7.6 Conclusion	128

CHAPITRE 8	IMAGERIE CLINIQUE EX SITU PER-OPÉRATOIRE	129
8.1	Méthodologie	130
8.2	Résultats de l'étude pilote : imagerie OCT	131
8.3	Résultats de l'étude pilote : spectroscopie d'autofluorescence	138
8.4	Discussion	139
8.5	Conclusion	141
CHAPITRE 9	DISCUSSION GÉNÉRALE	143
9.1	Composants en fibre optique à double gaine	143
9.2	Sondes de plus petit diamètre	144
9.3	Autres applications cliniques d'un salpingoscope	145
9.4	Dépistage in vivo dans les trompes	147
CHAPITRE 10	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	148
10.1	Synthèse des travaux	148
10.2	Limitations de la solution proposée	151
10.3	Améliorations futures	152
RÉFÉRENCES	154
ANNEXES	165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Constituants employés dans le modèle optique des trompes de Fallope	29
Tableau 4.1	Performances du système de table multimodal OCT et fluorescence .	50
Tableau 4.2	Validation de l'atteinte des critères quantitatifs pour la sonde multimodale	53
Tableau 6.1	Validation de l'atteinte des critères quantitatifs pour la sonde fixe . .	102
Tableau 6.2	Validation de l'atteinte des critères quantitatifs pour la sonde rotative.	109
Tableau 6.3	Comparaison des performances selon la tête d'imagerie avec le système VCSEL-OCT.	111
Tableau B.1	Inventaire des spécimens tubo-ovariens pour l'étude d'échantillons en paraffine	170
Tableau B.2	Inventaire des spécimens tubo-ovariens pour l'étude d'échantillons en paraffine, continué	171

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Schéma anatomique du système reproducteur féminin.	3
Figure 2.1	Carcinogenèse ovarienne selon les deux mécanismes les plus probables, via l'ovaire ou via la trompe de Fallope. Modifié de [1].	12
Figure 2.2	Mécanisme suggéré d'implantation des cellules de trompe en inclusion dans l'ovaire. Tiré de [2].	13
Figure 2.3	Comparaison de teintures immunohistochimiques pour trois cas : l'épithélium ovarien, l'épithélium des trompes de Fallope et un carcinome séreux ovarien. Tiré de [2].	14
Figure 2.4	Schéma d'un filtre passe-haut pour la détection en couplage alternatif. La tension est lue aux bornes d'un condensateur de faible capacitance C au lieu d'être prise sur une résistance de charge R	26
Figure 2.5	Absorption et diffusion de différents composés de la trompe de Fallope.	30
Figure 2.6	Longueur de pénétration optique selon la longueur d'onde pour le modèle de trompe de Fallope développé.	31
Figure 2.7	Spectre d'un multiplexeur OCT-fluorescence dans la plage infrarouge.	34
Figure 3.1	Schéma de principe d'un coupleur asymétrique.	39
Figure 3.2	Performances optiques multimode et monomode du coupleur asymétrique.	42
Figure 3.3	Preuve de principe d'utilisation du coupleur asymétrique dans un montage d'imagerie par encodage spectral.	43
Figure 3.4	Prédiction théorique et vérification expérimentale des performances multimode du coupleur asymétrique avec le modèle de l'étendue.	45
Figure 4.1	Schéma du système multimodal OCT et fluorescence, système de table	49
Figure 4.2	Sensibilité du système de fluorescence mesurée avec une série de concentrations de rhodamine 6g.	51
Figure 4.3	Imagerie multimodale d'échantillons de porc avec le système de table. Le volume OCT est présenté dans un rendu 3D en échelle de gris alors que l'acquisition de fluorescence est présentée en échelle de rouge. Une image transverse issue du volume OCT permet de voir l'impact des fantômes induits par l'utilisation de fibre DCF.	52
Figure 4.4	Sensibilité du système de fluorescence mesurée avec une série de concentrations de rhodamine 6g.	54
Figure 4.5	Imagerie multimodale d'un fantôme en géométrie cylindrique.	56

Figure 4.6	Imagerie multimodale de coupes de spécimens de foie humain et d'un foie entier de souris réalisé avec la sonde aiguille.	58
Figure 4.7	Images d'un échantillon de thyroïde de porc en régime cohérent (gauche) et partiellement cohérent (droite). Des agrandissements de deux régions d'intérêt sont également présentés.	60
Figure 4.8	Images de cellules fibroblastes en microscopie confocale à l'aide du sDCFC.	61
Figure 4.9	Caractérisation du système d'imagerie trimodale OCT, confocal et fluorescence.	63
Figure 4.10	Coagulation laser assistée par OCT sur un échantillon de larynx de porc.	64
Figure 5.1	Macroscopie d'un spécimen d'hystérectomie d'un modèle murin.	71
Figure 5.2	Coupes et rendu 3D par OCT de l'adnexe droit d'une souris.	72
Figure 5.3	Vue en coupe d'un utérus murin imagé à l'OCT.	73
Figure 5.4	Macroscopie d'une hystérectomie d'un modèle canin.	74
Figure 5.5	Image OCT de l'adnexe gauche d'un modèle canin.	75
Figure 5.6	Image OCT et histologie de l'utérus d'un modèle canin.	76
Figure 5.7	Macroscopie d'une spécimen d'hystérectomie d'un modèle porcin.	77
Figure 5.8	Image OCT de l'adnexe gauche d'un modèle de porc.	78
Figure 5.9	Image OCT et histologie d'un utérus de modèle porcin.	79
Figure 5.10	Structure transverse d'une trompe de Fallope saine à l'OCT et à l'histologie.	81
Figure 5.11	Changement morphologique longitudinal de la trompe de Fallope à l'OCT et à l'histologie.	82
Figure 5.12	Variabilité en âge et en densité des trompes.	84
Figure 5.13	Évolution d'un épithélium sain de trompe à une lésion intraépithéliale tubaire, puis à un carcinome intraépithélial tubaire séreux.	87
Figure 5.14	Carcinome intraépithélial tubaire séreux (STIC).	88
Figure 5.15	Carcinome intraépithélial tubaire séreux (STIC) de petite taille.	89
Figure 5.16	Tumeurs de type séreux vues à l'OCT et à l'histologie.	90
Figure 5.17	Tumeur de type endométrioïde vues à l'OCT et à l'histologie.	91
Figure 5.18	Tumeur de type mucineux vues à l'OCT et à l'histologie.	92
Figure 5.19	Tumeur de type cellules claires vues à l'OCT et à l'histologie.	93
Figure 6.1	Schéma et photographie de la sonde à canule fixe pour l'imagerie des trompes de Fallope.	99
Figure 6.2	Simulations des performances optiques de la sonde à canule fixe.	100
Figure 6.3	Image d'un doigt à l'OCT avec la sonde à canule fixe.	103

Figure 6.4	Plan et schéma du micro-moteur choisi.	105
Figure 6.5	Photographie et agrandissement du micro-miroir.	106
Figure 6.6	Sonde à micro-moteur rotatif assemblée et agrandissements	107
Figure 6.7	Image de la rondelle de calibration avec le système de table.	111
Figure 6.8	Comparaison entre les performances d'imagerie en profondeur des trois systèmes à l'étude.	112
Figure 6.9	Comparaison des valeurs de réflectivité des miroirs de la rondelle de calibration selon les trois systèmes à l'étude.	113
Figure 6.10	Comparaison des lignes-A issues d'images de la rondelle de calibration selon le mode de détection AC ou DC.	114
Figure 7.1	Photographie d'un échantillon d'hystérectomie humaine lors de l'analyse macroscopique et après la pose d'agrafes chirurgicale pour la correspondance avec la pathologie.	119
Figure 7.2	Schéma de placement des agrafes et convention de numérotation des échantillons traités en pathologie.	120
Figure 7.3	Images issues d'acquisitions 3D OCT avec le système de table pour un segment de l'ampoule et un segment de pavillon.	122
Figure 7.4	Impact de l'embout de la sonde sur l'intégrité des villosités de la trompe.	123
Figure 7.5	Images issues d'acquisition avec la sonde statique suivant l'axe longitudinal de la trompe.	124
Figure 7.6	Spectres de la source Lumencor mesurés en sortie de la sonde de fluorescence et photographie de la sonde employée.	125
Figure 7.7	Spectres d'autofluorescence du pavillon et de l'ampoule de la trompe de Fallope pour deux longueurs d'onde d'excitation.	126
Figure 8.1	Analyse OCT d'un cas de prophylaxie réalisée avec les deux prototypes de sonde.	132
Figure 8.2	Pavillon sain imagé par OCT et projection tridimensionnelle.	134
Figure 8.3	Trompe saine issue d'une prophylaxie imagée par OCT.	135
Figure 8.4	Hydatide de Morgagni et corps de Walthard imagés sur une trompe de Fallope à l'OCT.	137
Figure 8.5	Spectres d'autofluorescence de trois différents segments de la trompe de Fallope.	138
Figure 8.6	Spectres d'autofluorescence des tissus gynécologiques incluant le pavillon de la trompe de Fallope, l'ovaire, le col de l'utérus et l'endomètre.	139
Figure C.1	Schéma de la sonde aiguille et photographie de son utilisation avec un balayage mécanique cartésien.	173

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A-DCFC	Asymmetric Double-Clad Fiber Coupler
AC	Couplage alternatif
BBS	Source à large bande, de l'anglais <i>BroadBand Source</i>
BRAF	Gène proto-oncogène B-Raf, ou <i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BRCA	de l'anglais <i>BReast CAncer susceptibility Gene</i>
CA-125	Antigène Carcinoembryonique 125
CD	Détection cohérente, de l'anglais <i>Coherent Detection</i>
CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CM	Microscopie confocale, de l'anglais <i>Confocal Microscopy</i>
COPL	Centre d'optique, photonique et laser
CS	Section de dimension transverse constante, de l'anglais <i>Constant Section</i>
CT	Tomographie calculée, de l'anglais <i>Computed Tomography</i>
DC	Couplage Direct
DCF	Fibre à double gaine, de l'anglais <i>Double Clad Fibre</i>
DCFC	Coupleur en fibre à double gaine, de l'anglais <i>Double Clad Fibre Coupler</i>
FDA	Food and Drug Administration
FIGO-IGCS	International Federation of Gynecology and Obstetric - International Gynecologic Cancer Society
GRIN	Fibre à Gradient d'indice de réfraction, de l'anglais <i>Graded-Index fibre</i>
HE4	Hormone épидидymaire humaine de type 4
IRM	Imagerie par résonance magnétique nucléaire
ITR	Inverse du taux de réduction
KRAS	Gène <i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MEMS	de l'anglais <i>Micro Electro-Mechanical System</i>
MFD	Diamètre modal, de l'anglais <i>Mode-Field Diameter</i>
MM	Multimode
MMF	Fibre Multimode
NA	Ouverture numérique, de l'anglais <i>Numerical Aperture</i>
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide sous forme réduite
NSERC	Conseil de recherche en sciences naturelles et génie du Canada, de l'anglais <i>National Sciences and Engineering Research Council of Canada</i>

NCF	Fibre sans cœur, de l'anglais <i>No Core Fiber</i>
OCT	Tomographie par cohérence optique, de l'anglais <i>Optical Coherence Tomography</i>
OM	Organisation Mondiale de la Santé
OSA	Analyseur de spectre optique, de l'anglais <i>Optical Spectrum Analyzer</i>
PCD	Détection partiellement cohérente, de l'anglais <i>Partially Coherent Detection</i>
RING	Domaine d'extrémité du gène <i>BRCA1</i>
rpm	Rotation Par Minute
SCOUT	de l'anglais <i>Secretory Cell OUTgrowth</i>
sDCFC	Coupleur en fibre à double gaine de petit ratio, de l'anglais <i>Small-ratio Double Clad Fibre Coupler</i>
SE	Encodage spectral, de l'anglais <i>Spectrally Encoded</i>
SEE-FIM	de l'anglais <i>Sectioning and Extensively Examining the FIMbriated end</i>
SMF	Fibre monomode, de l'anglais <i>Single-Mode Fiber</i>
STIC	Carcinome intraépithélial tubaire séreux, de l'anglais <i>Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma</i>
STIL	Lésion intraépithéliale tubaire séreuse, de l'anglais <i>Serous Tubal Intraepithelial Lesion</i>
SECM	Microscopie confocale encodée spectralement, de l'anglais <i>Spectrally-Encoded Confocal Microscopy</i>
SEFI	Imagerie par fluorescence encodée spectralement, de l'anglais <i>Spectrally-Encoded Fluorescence Imaging</i>
TEP	Tomographie par émission de positrons
TS	de l'anglais <i>Transition Section</i>
TVUS	Échographie endovaginale, de l'anglais <i>Transvaginal Ultrasound</i>
UKCTOCS	de l'anglais, <i>United Kingdom Collaborative Trial on Ovarian Cancer Screening</i>
USAF	de l'anglais <i>United States Air Force</i>
US	Ultrason
UV	Ultra-violet
VCSEL	de l'anglais <i>Vertical Cavity Side-Emitting Laser</i>

LISTE DES ANNEXES

Annexe A	Liste des contributions	165
Annexe B	Liste des spécimens étudiés et leurs caractéristiques	170
Annexe C	Protocoles de teinture des spécimens de cancer du foie et protocole d'imagerie	172

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Introduction et contexte général

Le cancer de l’ovaire arrive au cinquième rang lorsque l’on compte le taux de mortalité pour les cancers féminins dans les pays développés [3]. Une femme sans antécédents familiaux a une chance sur 65 de contracter un cancer de l’ovaire dans sa vie et ses chances d’en survivre après 5 ans sont de 20 %. Pour les femmes présentant un historique familial et/ou des prédispositions génétiques, les risques de contracter un cancer de l’ovaire peuvent grimper jusqu’à une chance sur 4. Malgré les recherches intensives des 50 dernières années, on observe très peu d’amélioration du taux de survie et des pronostics. Ceci est en partie expliqué par notre connaissance limitée de la carcinogenèse. Le processus de développement du cancer est mal connu des intervenants et des chercheurs. Ceci est, entre autres, causé par la grande diversité des pathologies classifiées comme « cancer de l’ovaire ». Il s’agit d’une collection de 30 sous-types de cancers différents, prenant origine en divers tissus, mais tous impliquant immédiatement ou éventuellement l’ovaire.

Même à un stade avancé, ce cancer ne génère aucun symptôme spécifique chez les patientes, ce qui lui a valu le surnom de « tueur silencieux ». Couplés à la grande disparité des pathologies de l’ovaire et des organes gynécologiques, le dépistage et le diagnostic sont des tâches ardues. En effet, il n’existe que peu de marqueurs communs à toutes ces déclinaisons de cancer, rendant la détection non invasive peu efficace. Lorsque les symptômes apparaissent, ceux-ci sont souvent vagues ou hautement similaires à des troubles beaucoup plus fréquents. Ces symptômes comptent, entre autres, la constipation, la fatigue, une augmentation de la fréquence urinaire, des ballonnements, des douleurs abdominales ou au dos, ainsi qu’un sentiment de satiété précoce [4]. Ceci explique pourquoi la majorité des cancers ovariens (70 %) sont détectés en stades avancés (stades III et IV) [5].

La progression de ce type de cancer est particulièrement rapide, étant donné que l’utérus, les trompes de Fallope et les ovaires sont reliés entre eux afin de permettre l’échange de tissus pour la reproduction. La jonction entre les ovaires et les fibrines (fin des trompes de Fallope qui assurent que les ovules aillent bien vers la trompe à l’ovulation) est ouverte et la cavité abdominale est donc reliée à ces structures. Des fragments de tissus ou de tumeurs peuvent librement circuler autant dans le sens normal des ovaires à l’utérus que de façon rétrograde, de l’utérus vers les ovaires puis à l’abdomen. Ceci permet aux métastases de s’implanter aisément dans cette région anatomique. De plus, les tissus du système reproducteur féminin sont des tissus qui se renouvellent à chaque cycle menstruel. Ces tissus sont donc dotés

d'un épithélium qui desquame facilement (la couche superficielle de tissus se détache de la structure), ce qui ajoute à la mobilité des cellules cancéreuses ou précancéreuses.

En plus de toutes ces considérations sur la diversité des pathologies et la carcinogenèse, il est important de noter que le traitement du cancer de l'ovaire est très invasif pour la patiente. Le traitement préconisé à l'heure actuelle est une chirurgie cytoréductive (ie. ménopause chirurgicale) en plus d'enlever le plus grand volume possible de tumeur. La chirurgie est souvent accompagnée d'une chimiothérapie. Il est estimé qu'environ 25% des patientes sont chimio-résistantes et ne répondent pas aux chimiothérapies réputées efficaces. De plus, les chances de survie dépendent fortement de la quantité de tissus cancéreux laissés dans l'abdomen. Même aujourd'hui, bien qu'il existe de plus en plus de traitements alternatifs, étant donné que la thérapie commence à un stade avancé de la maladie, les chances de survie restent bien minces (80% des femmes en mourront dans les 5 ans suivant le diagnostic). Ce cancer mortel, lorsque dépisté au premier stade de la maladie, a un taux de guérison de plus de 90% [5]. Une détection la plus rapide et la plus précise possible est donc capitale pour la survie de la patiente.

1.2 Anatomie du système reproducteur féminin

Le cancer de l'ovaire possède une situation anatomique particulière. Il s'agit d'un système ouvert en lien direct avec la cavité abdominale. Cette section présente les éléments anatomiques importants et les dimensions caractéristiques des organes à l'étude, en plus de la nomenclature propre au cancer de l'ovaire.

La figure 1.1 présente l'anatomie normale du système reproducteur féminin. Il est constitué de plusieurs organes reliés entre eux afin de permettre la tenue du cycle menstruel chaque mois. Sans entrer dans les détails du fonctionnement de tous les organes, précisons seulement que pour chaque ovulation, la surface de l'ovaire se rupture afin de libérer l'ovule. Ce dernier chemine vers l'utérus par l'intermédiaire des trompes de Fallope. Une fois l'ovule libéré, le follicule ovarien doit se refermer et cicatriser afin de former le corpus luteum. Ce dernier sécrète des hormones pendant un certain temps puis s'inactive en s'enfonçant graduellement dans l'ovaire.

La trompe de Fallope est un organe tubulaire de 7 cm à 10 cm de longueur [6] reliant l'ovaire à l'utérus, tel qu'illustré à la figure 1.1. Chaque trompe est formée de quatre segments : l'isthme, l'ampoule, l'infundibulum et le pavillon. Les deux trompes, fixées au haut de l'utérus par la jonction utéro-tubale, s'étendent pour rejoindre les ovaires. Les deux trompes possèdent un lumen (ouverture à l'intérieur du tube) allant d'un diamètre de 1 mm à la jonction utéro-

tubale jusqu'à 4 mm avant l'infundibulum, puis jusqu'à 1 cm [7] au début du pavillon. La fin de l'ampoule, l'infundibulum et le pavillon forment le tiers distal de la trompe de Fallope. Le pavillon enveloppe en partie l'ovaire avec 25 terminaisons irrégulières en forme de doigts. Chaque ovaire fait environ 1.5 cm par 1 cm par 1 cm, soit la taille d'une amande. Les ovaires sont abondamment irrigués par les systèmes sanguins et lymphatiques. L'utérus, les trompes et les ovaires sont maintenus en place par une couche de tissus conjonctifs appelée péritoine. L'ovaire est fixé à l'utérus au moyen du ligament rond, attaché à la partie postérieure de l'utérus.

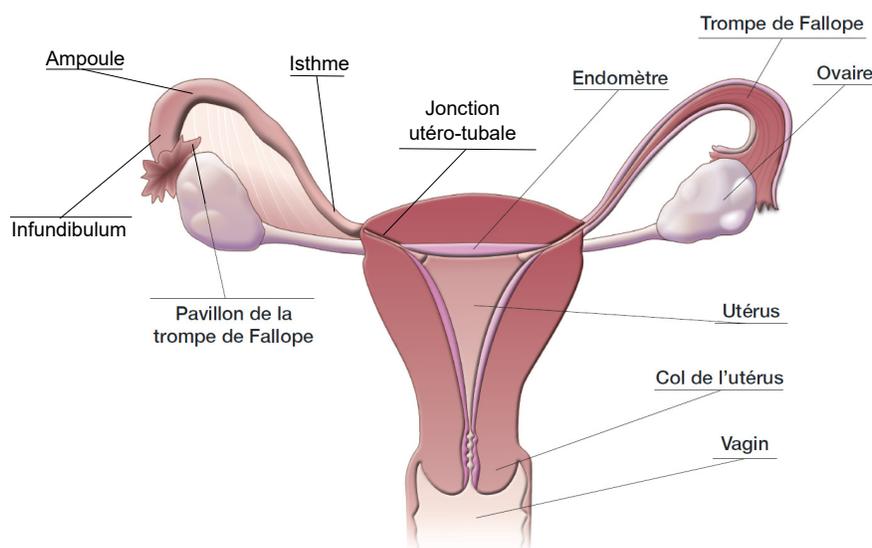


Figure 1.1 Schéma anatomique du système reproducteur féminin. Les trompes de Fallope relient l'utérus aux ovaires et sont généralement divisées en quatre segments. Modifié de [8].

1.3 Cancer de l'ovaire

Selon la classification FIGO-IGCS (International Federation of Gynecology and Obstetric - International Gynecologic Cancer Society), les cancers de l'ovaire sont catégorisés selon quatre stades et deux types [9]. De façon simplifiée, le stade I regroupe les troubles confinés à l'ovaire. Le stade II regroupe les métastases limitées au pelvis et au péritoine (trompes de Fallope, péritoine pelvien). Le stade III caractérise les métastases répandues dans l'abdomen et le péritoine. Enfin, le stade IV regroupe les métastases répandues au-delà de la cavité abdominale.

Les différentes formes de cancer de l'ovaire sont ensuite regroupées selon deux types en fonction de leurs caractéristiques génétiques : les types I et les types II. Les tumeurs dites de

type I regroupent des formes de cancer qui progressent lentement et sont en général génétiquement stables. C'est pour ces raisons qu'elles sont retrouvées à des stades plus précoces de lésions peu malignes. Les carcinomes séreux de bas grade, endométrioides, à cellules claires ou mucineux comptent parmi les tumeurs classifiées dans cette catégorie. Les tumeurs de type II sont plus homogènes sur le plan morphologique et moléculaire, mais présentent une plus grande instabilité génétique. Elles font partie des tumeurs agressives et à progression rapide. Les tumeurs de type II regroupent les carcinomes séreux de haut grade et comptent pour plus de 70 % des cas observés en clinique. L'hypothèse de travail des recherches récentes en médecine postule que les cancers séreux de haut grade sont originaires de la trompe de Fallope. Cet organe doit donc devenir une priorité dans l'analyse pathologique, en plus de l'ovaire [1].

1.4 Évaluation clinique

Le dépistage et le diagnostic du cancer de l'ovaire sont deux étapes cruciales influençant grandement le pronostic des patientes. Comme ce type de cancer présente une faible prévalence dans la population générale, le dépistage systématique n'est pas recommandé par l'OMS. Cette section aborde les diverses méthodes de dépistage, puis les méthodes de diagnostic dans le cas de la population générale. L'impact de l'historique familial et de la condition génétique sur la prise en charge des patientes est ensuite abordé.

1.4.1 Dépistage

Les techniques de dépistage actuelles sont peu efficaces [10–12]. Les trois techniques employées sont l'examen pelvien, la présence du marqueur sanguin CA-125 (antigène carcinoembryonique 125) et l'examen ultrason endovaginal. Quatre raisons peuvent expliquer ce manque d'efficacité sont [1] :

1. l'absence de symptômes spécifiques chez les patientes ;
2. le positionnement anatomique des ovaires difficile à accéder ;
3. l'ignorance du processus de formation du cancer de l'ovaire et de la croissance des tumeurs ;
4. la faible fréquence d'occurrence dans la population générale.

Les symptômes du cancer de l'ovaire ont longtemps été considérés comme inexistantes ou non spécifiques, étant donné les différentes études aux résultats contradictoires [13]. En effet, la majorité des symptômes ne sont pas de nature gynécologique, tels que des douleurs à

l'abdomen, problèmes de digestion, manque d'appétit et problèmes urinaires. Cependant, dans le cas des femmes atteintes d'un cancer, ces symptômes sont en général présents de 3 à 30 mois avant le diagnostic. Ce qui distingue ces cas de cancers des autres pathologies, ce sont la fréquence et la durée des symptômes. En général, les femmes atteintes d'un cancer de l'ovaire expérimentent des symptômes de 20 à 30 fois par mois depuis 3 à 6 mois, contrairement à 2 à 3 fois par mois depuis plus de 12 mois pour les patientes cliniques [14]. Ceci est d'autant plus flagrant chez les jeunes femmes (20 à 35 ans), chez qui les symptômes sont présents jusqu'à 2 ans avant le diagnostic [15].

La première technique de dépistage employée par le médecin est l'examen pelvien standard. Il permet une évaluation grossière des masses dans l'abdomen. Si des masses suspectes ou des symptômes aigus sont présents, une analyse sanguine est réalisée. La mesure de CA-125 dans le sérum sanguin comporte ses contreparties : ce marqueur n'est pas spécifique au cancer de l'ovaire. De plus, plusieurs cas de cancers en stade I ne révèlent pas d'augmentation au-dessus du seuil de normalité [16]. Une grossesse, l'endométriose, le cancer du pancréas et d'autres pathologies peuvent également se manifester en une hausse des concentrations de CA-125 sanguin sans la présence d'un cancer de l'ovaire. Le seuil normal communément admis est de 35 U/mL, mais descend sous les 20 U/mL après la ménopause. Plusieurs marqueurs sont à l'essai en ce moment, le plus répandu étant la protéine épидидymaire humaine de type 4 (HE4) [17, 18]. Cependant, aucun des marqueurs ou des combinaisons de marqueurs testés ne démontrent d'amélioration consistante et notable de la spécificité et de la sensibilité aux cancers ovariens [10].

Suite aux tests sanguins, une échographie endovaginale (TVUS pour « TransVaginal Ultra-Sound ») est ensuite pratiquée comme premier examen à la recherche de masses anormales. Cette technique est sensible, mais peu spécifique. De plus, l'examen TVUS ne permet pas de voir des lésions de faible volume (moins de 1 cm³) ou précancéreuses. Si les examens ne sont pas concluants, la patiente est placée en suivi, sinon, elle est référée à un gynécologue pour des examens de diagnostic.

1.4.2 Diagnostic

Lorsque des taux anormaux de CA-125 sont détectés et que des masses sont identifiées aux ultrasons, une chirurgie diagnostique est pratiquée. La planification de cette chirurgie est réalisée par imagerie par résonance magnétique (IRM) ou tomographie assistée par ordinateur (CT). Cette chirurgie prend la forme d'une laparotomie (ouverture au niveau de l'abdomen) permettant une inspection minutieuse de la cavité abdominale et des organes reproducteurs. Ainsi, toute masse ou lésion d'apparence suspecte (inspection visuelle et palpation) est exci-

sée pour une analyse en pathologie. Malheureusement, les lésions ont souvent des apparences très variables et il en résulte que certaines lésions ne seront pas biopsiées [19]. Une castration chirurgicale complète est souvent réalisée, spécialement si des masses importantes sont présentes sur les ovaires et/ou les trompes. Les trompes de Fallope et les ovaires sont ensuite analysés en pathologie pour établir le stade et le type de cancer s'il y a lieu. Avec ces informations, le médecin traitant peut établir le traitement approprié.

1.4.3 Population à risque

Le dépistage et le diagnostic du cancer de l'ovaire sont des étapes qui prennent une tournure différente selon l'historique familial de cancers du sein et de l'ovaire. En effet, les femmes ayant des mutations des gènes BRCAI et BRCAII sont en général suivies de façon plus serrée et sont encouragées à prendre part à une chirurgie prophylactique (ménopause préventive) entre 30 et 40 ans. Cette pratique drastique est recommandée comme mesure préventive lorsque les risques de cancers ovariens sont jugés trop importants (plus de 10%). Même avec cette méthode préventive, les risques résiduels de cancer sont tout de même présents (4.3% sur 20 ans) après chirurgie [20]. Cette mesure préventive est remise en cause, car elle augmente les facteurs de risques pour plusieurs autres conditions comme les troubles cardiovasculaires, pulmonaires, nerveux et osseux, en plus d'exiger des traitements hormonaux de substitution jusqu'à la ménopause.

1.4.4 Un constat alarmant

Il est devenu évident au cours des dernières années que le dépistage, spécialement dans la population générale, crée davantage de problèmes qu'il n'en résout. En effet, la combinaison de CA-125 et TVUS n'a que peu d'impact sur le taux de mortalité et accroît les risques de chirurgies inutiles en cas de faux positif [11, 21]. La très faible prévalence (1.4%) rend très difficile l'atteinte d'une valeur prédictive positive acceptable (probabilité que la condition soit présente lorsque le test est positif, établie à 20% dans le cas du cancer de l'ovaire), même en cas de sensibilité et spécificité hypothétiques près de 100%. Dans les larges essais cliniques des dernières années, les tests au CA-125 et au TVUS n'ont pas clairement démontré de réduction de la mortalité et de la morbidité, car la majorité des cas de cancers détectés étaient tout de même de stades III et IV, donnant près de 5200 scans TVUS nécessaires pour diagnostiquer un cancer invasif [22]. À cause de la faible incidence des cancers ovariens, une grande quantité de faux positifs sont générés par le dépistage systématique et ceci génère des coûts élevés au système de santé. On estime que plusieurs femmes subissent des chirurgies inutilement : 33 chirurgies sont nécessaires pour détecter un cas de cancer. S'ajoute à ces données que 15%

des chirurgies donnent des complications postopératoires sévères, telles que des infections, problèmes cardiovasculaires ou pulmonaires [23].

La plus récente étude clinique est le UKCTOCS (*United Kingdom Collaborative Trial on Ovarian Cancer Screening*), terminée en décembre 2015. Cette étude a tenté d'établir les bienfaits d'un dépistage systématique selon plusieurs scénarios, regroupant les meilleures techniques connues. Après les 11 ans de durée de l'étude, il n'y a aucune différence statistiquement significative entre le taux de mortalité pour les cohortes avec suivi systématique par rapport à la cohorte contrôle sans suivi [12]. Les réactions de la communauté scientifique ont été très marquées : un appel à l'aide est clairement lancé dans les correspondances de janvier 2016. Un exemple est donné ici par MacIntosh et Drescher, respectivement statisticien et gynécologue oncologue au Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle : « *Ovarian cancer early detection needs better imaging, not better algorithms or biomarkers. [...] too much emphasis has been placed on finding new biomarkers and not enough has been placed on developing new molecular imaging techniques* » [24].

1.5 Cahier de charges

Le point commun aux techniques de dépistage actuelles réside dans leur accès indirect aux lésions des trompes de Fallope. Pour qu'un nouvel instrument soit efficace, il doit permettre d'obtenir de l'information sur le contenu des trompes de Fallope. Ce projet de recherche veut apporter une solution à l'analyse extensive des trompes de Fallope afin d'assister et guider le pathologiste au cours du diagnostic du cancer de l'ovaire. Ce type d'instrument pourrait ensuite être employé comme outil de dépistage.

L'instrument développé doit pouvoir guider le diagnostic du cancer de l'ovaire. Pour ce faire, il doit pouvoir s'employer dans une fenêtre de temps entre la chirurgie et l'examen pathologique. Cette fenêtre de temps doit demeurer sous les 30 minutes pour assurer des tissus sans dégradation pour l'examen pathologique. Un accès direct au lumen de la trompe par endoscopie maximise les chances d'identifier les lésions de petit volume. L'endoscope doit être suffisamment petit pour inspecter le tiers distal de la trompe de Fallope et préféablement la totalité de la trompe. Après discussion avec l'équipe médicale, aucun agent de contraste exogène ne peut être employé, sous peine de fausser certaines analyses et/ou compromettre les analyses pathologiques. L'instrument doit également préserver l'intégrité des tissus de la trompe. L'épithélium et les microvillosités sont très fragiles et tendent à se détacher facilement des parois de la trompe. Enfin, l'instrument doit permettre une rétroaction rapide et la procédure d'utilisation doit fournir des sites d'analyse pertinents pour le pathologiste.

1.6 Objectifs de recherche

L'objectif principal de ce projet de recherche est de développer un instrument permettant de guider le pathologiste dans l'identification des sites d'analyse pathologique dans les trompes de Fallope humaines pour le diagnostic du cancer de l'ovaire. Les modalités d'imagerie optiques retenues pour cette étude sont la tomographie par cohérence optique et l'imagerie spectroscopique par autofluorescence. Ces deux modalités d'imagerie seront combinées dans une sonde à fibre unique. Une preuve de principe de l'utilisation clinique est réalisée avec une étude pilote sur sujets humains.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

1. Déterminer les modalités d'imagerie optique permettant d'imager les lésions dans les trompes de Fallope.
2. Développer les composants optiques nécessaires à l'imagerie multimodale avec les modalités identifiées précédemment.
3. Développer un système d'imagerie pour imager des tissus gynécologiques frais ex vivo.
4. Établir des critères qualitatifs permettant de discerner les tissus sains des tissus pathologiques.
5. Développer un système d'imagerie endoscopique pour imager de façon peropératoire les tissus gynécologiques humains ex vivo.
6. Développer un atlas des différentes conditions rencontrées lors d'une étude pilote en comparant l'instrument développé aux standards médicaux actuels.

1.7 Plan de la thèse

La thèse présente les développements technologiques et cliniques nécessaires à l'utilisation d'un nouvel instrument pour assister le diagnostic des lésions dans les trompes de Fallope. Pour établir les requis techniques et les modalités d'imagerie les plus prometteuses pour ce nouvel instrument, une revue critique de la littérature est proposée au chapitre 2. Ce chapitre présente également les éléments-clés du contexte clinique qui permettent d'orienter la suite du travail. Ce chapitre explicite le lien entre l'article du chapitre 3, l'article [25] ainsi que les résultats additionnels présentés dans le chapitre 4. Le manuscrit d'un article constitue le chapitre 3 et traite de coupleurs en fibres à double gaine à grande gaine interne pour l'endoscopie. Une série de preuves de principe employant ces nouveaux composants pour l'imagerie multimodale est détaillée au chapitre 4.

Le chapitre 5 présente les travaux précliniques d'imagerie des trompes de Fallope. Des échantillons frais de modèles animaux sont à l'étude avec l'imagerie OCT, de même que des tissus gynécologiques humains en paraffine. Le chapitre 6 porte sur la fabrication de sondes endoscopiques à fibre unique pour l'imagerie des trompes de Fallope humaines. Deux modèles de sonde sont conçus, fabriqués et caractérisés. Le chapitre 7 présente une étude clinique préliminaire sur 5 patientes au cours de laquelle l'OCT et l'autofluorescence de trompes humaines fraîches sont à l'étude à l'aide de deux systèmes d'imagerie séparés. Le dernier chapitre de résultats, le chapitre 8, présente l'étude pilote sur 25 patientes avec les sondes endoscopiques développées dans le cadre de la thèse et poursuit l'analyse par spectroscopie en autofluorescence dans les trompes, l'ovaire et l'utérus. Le chapitre 9 présente une discussion générale portant sur les travaux de la thèse en regard avec le contexte clinique et la revue de la littérature. Ce chapitre présente également des avenues pour la suite des travaux. Enfin, le chapitre 10 conclut la thèse.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

« The UKCTOCS trial, for which planning and execution spanned the rise of genomic and proteomic discovery technologies, shows us that state-of-the-art ovary cancer screening includes a 20-year-old algorithm, a 30-year-old marker, and imaging by transvaginal ultrasound. Better biomarkers and algorithms are unlikely to make meaningful improvements. »

Martin W. McIntosh *et al.* [24]

Ce chapitre présente une revue critique de l'état de l'art. La première partie du chapitre examine le contexte médical et certaines idées émergentes qui ont dicté l'élaboration de la thèse. La seconde partie du chapitre est dédiée aux notions d'ingénierie abordées dans la thèse, surtout dans la perspective d'une application au diagnostic du cancer de l'ovaire.

2.1 Impact des facteurs génétiques

La prise en charge clinique dépend du niveau de risque au cancer ovarien de la patiente considérée. L'historique familial et la condition génétique d'une patiente sont deux facteurs permettant d'établir le niveau de risque au cancer ovarien d'une personne donnée. Une série de gènes ont été identifiés avec les années et certaines mutations peuvent être dépistées. Les gènes BRCA1 et BRCA2 (BRCA pour *BReast CAncer susceptibility gene*) sont les deux gènes les plus fréquemment surveillés pour mutation. En effet, des mutations dans la région RING de ces gènes désactivent les voies de réparation homologues de l'ADN. Il s'agit de la voie sécuritaire de réparation du contenu génétique pour une cellule, minimisant les erreurs de retranscription. Sans cette voie de réparation, il ne reste que la voie de réparation non homologue, plus sujette aux erreurs. Les patientes mutées BRCA1 et/ou BRCA2 possèdent des cellules plus sujettes aux erreurs de transcription et de réparation de l'ADN. Ceci prédispose à des mutations subséquentes. D'autres gènes sont également surveillés, tels que BRAF et KRAS, mais les mutations à ces gènes sont moins répandues. Les mutations BRCA peuvent se passer d'une génération à l'autre, rendant la généalogie familiale à plus haut risque de développer des cancers. Chez les femmes porteuses, ce type de mutation augmente les risques de cancer du sein, cancer de l'ovaire et cancer du pancréas. Chez les hommes porteurs, ce sont des prédispositions plus sérieuses au cancer de la prostate, cancer du pancréas et cancer du côlon. L'augmentation des risques est significative au point de procéder à des interventions préventives drastiques comme des chirurgies prophylactiques (hystérectomies et mastecto-

mies). Par exemple, une femme mutée BRCA1 a 20 % de chances de développer un cancer de l’ovaire au cours de sa vie et 40 % de développer un cancer du sein, par opposition à 1 % et 3 % respectivement chez une femme non porteuse.

Quelques populations (environ 15) sont reconnues pour être plus à risque d’avoir des mutations génétiques et des prédispositions au cancer de l’ovaire. Quatre populations plus à risque ont été identifiées. La lignée la plus à risque est la lignée juive Ashkenazi, suivi de près par la population nordique des pays scandinaves. Ces populations ont un risque 5 fois plus élevé que la population mondiale générale. Vient ensuite un groupe d’origine germanique installée dans l’ouest du Minnesota aux États-Unis. La dernière lignée à risque connue est la population d’origine canadienne-française, principalement située au Québec.

Pour les patientes qui ne présentent pas un risque élevé de cancer ovarien, il est recommandé de ne pas assurer de suivi ou de dépistage annuel. Lorsque des symptômes surviennent et que des examens montrent des lésions aux ovaires ou des taux élevés de marqueurs sanguins, la patiente est intégrée dans la division à risque. Une telle façon de procéder provient du fait que les mécanismes de formation et de propagation du cancer de l’ovaire sont encore mal compris.

2.2 Carcinogénèse

La littérature récente présente des séquences possibles de carcinogénèse impliquant des lésions dans les trompes de Fallope [1, 26–29]. Des exemples de ce type de séquences sont présentés à la figure 2.1. Dans un scénario possible, les lésions bénignes qui manquaient en début de chaîne ont été en partie trouvées dans les trompes de Fallope ou dans des fragments d’endométriose. Plusieurs types de lésions bénignes ont été relevées au cours des dernières années, entre autres les STIC (Carcinome Tubal Intraépithélial Séreux), les STIL (Lésion Tubale Intraépithéliale Séreuse) et les SCOUT (« Secretary Cell OUTgrowth »). Ces lésions et carcinomes de petit volume (de 10 à 30 cellules consécutives) sont introuvables sans analyse pathologique extensive. Étant donné leur potentiel métastatique élevé, il convient de retracer ces tumeurs lors de l’analyse des trompes et des ovaires. Il a été noté que les STICs et les STILs se retrouvent préférentiellement dans le pavillon, alors que les SCOUTs peuvent être retrouvés sur toute la longueur de la trompe. Un autre scénario possible, montré à la figure 2.1(a), présente une voie n’impliquant que l’ovaire. Une dysplasie ovarienne est une modification architecturale ou cytologique fine des tissus de l’ovaire, mais dont on ne connaît pas encore bien l’origine [1].

Une autre voie de formation de cancers ovariens est celle par implantation de tissus externes

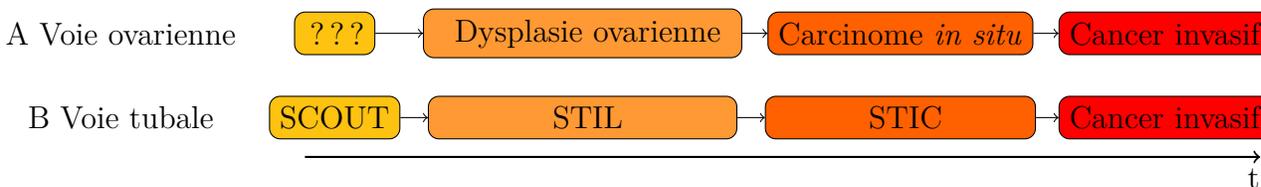


Figure 2.1 Carcinogénèse ovarienne selon les deux mécanismes les plus probables. La voie ovarienne est présentée en a) : l'origine des dysplasies ovariennes est encore inconnue. La voie tubale est présentée en b), avec ses lésions précurseurs qui mènent graduellement au cancer invasif provenant de la trompe de Fallope. Modifié de [1].

dans l'ovaire lors de l'ovulation. La figure 2.2 a) illustre le processus normal d'interaction entre l'ovaire et la trompe au cours du cycle de développement de l'ovule. Pendant les 48 à 72 heures entre l'ovulation (rupture de l'épithélium) et la cicatrisation, il est possible que des tissus viennent s'implanter (illustré à la figure 2.2 b)) dans le follicule ovarien. Cette masse de cellules sera par la suite profondément enfouie dans l'ovaire. Ces inclusions formeront des kystes, qui peuvent éventuellement se transformer en lésions cancéreuses. Dans le cas présenté ici, des cellules épithéliales du pavillon desquament et viennent s'implanter dans le follicule ovarien.

Plusieurs types de tissus peuvent contribuer à la formation de kystes. Des cellules endométriales provenant de l'utérus peuvent créer des cancers de type endométrioïde (ressemblant à des cellules d'endomètre) et à cellules claires (cellules à cytoplasme clair contenant du glycogène), des tissus épithéliaux des trompes forment plutôt des cancers de type séreux (tissus ressemblant à ceux de l'épithélium des trompes), alors que des cellules épithéliales du col utérin forment des cancers de type mucineux (ressemble aux tissus des voies gastro-intestinales ou endocervicales) et de type Brenner (dont les tissus ressemblent aux cellules épithéliales du système urinaire) [2, 26]. Ces divers types d'épithélium peuvent être différenciés grâce à leurs structures et à diverses teintures en histopathologie, comme le montre la figure 2.3. On peut y remarquer que dans le carcinome ovarien de type séreux présenté, il y a présence d'épithélium des trompes dans la tumeur, et non pas d'épithélium ovarien.

Pour qu'une tumeur accède au grade de métastase, le carcinome doit d'abord envahir suffisamment les tissus pour accéder aux réseaux sanguin et lymphatique. Ceci est facilement réalisé dans le pavillon des trompes, car le réseau angiolymphatique est très près de la membrane basale. Les tissus sont bien vascularisés et faciles d'accès, ce qui contribue à favoriser la croissance rapide de petites tumeurs. Une autre voie métastatique passe par un étalement des cellules épithéliales cancéreuses. Ces cellules se multiplient pour former un épithélium de quelques couches cellulaires d'épaisseur qui envahit graduellement l'épithélium en place, un

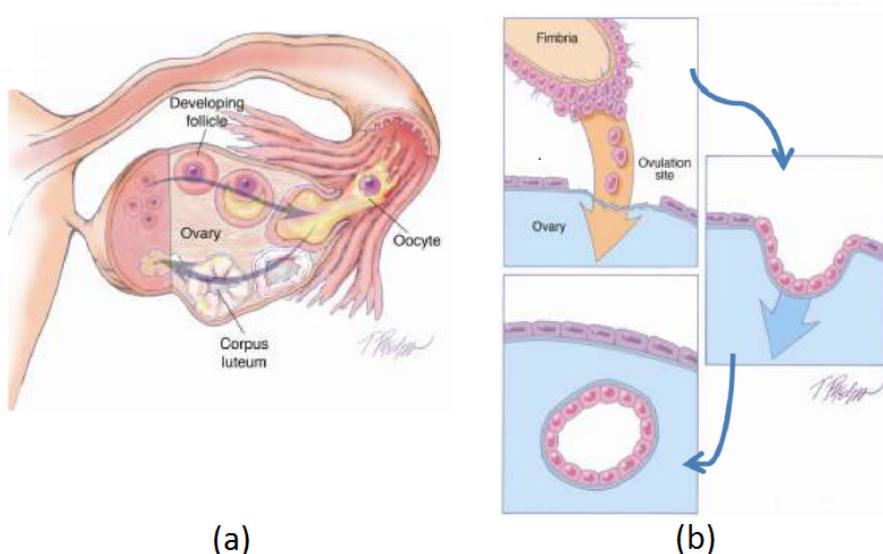


Figure 2.2 En a), cycle menstruel normal. On peut y voir qu'il y a rupture de l'ovaire pour libérer l'ovocyte, ce qui cause une plaie qui prend environ 48h pour cicatriser. En b) est illustré un mécanisme suggéré de formation de kyste, où des cellules, par exemple de fibrines, peuvent s'implanter avant que le follicule ne se referme. Tiré de [2].

peu comme un couvre-sol. Éventuellement, une portion ou une plaque de cellules desquame et s'implante dans la cavité abdominale ou péritonéale. Il a été démontré que les carcinomes ovariens adhèrent de façon préférentielle au collagène de type I et IV [30], ce qui facilite leur implantation hors de la trompe. Ceci permet de conclure que les tumeurs de petit volume présentent un potentiel métastatique élevée, car elles bénéficient de deux voies possibles pour se répandre hors de la trompe.

2.3 Lésions et tumeurs de petit volume

En analysant la littérature, on découvre qu'un changement de mentalité s'opère depuis 2005. En effet, les prémisses qui ont guidé la recherche et la pratique jusqu'alors ont été remises en question lorsqu'il a été constaté que l'emploi ou non du dépistage ne menait à aucune amélioration du taux de mortalité et que les cancers détectés étaient en majeure partie à des stades avancés (stades III et IV). Une sérieuse analyse des pratiques et des connaissances a été réalisée, permettant de mettre en évidence des biais scientifiques dans les études passées et générer un changement de paradigme.

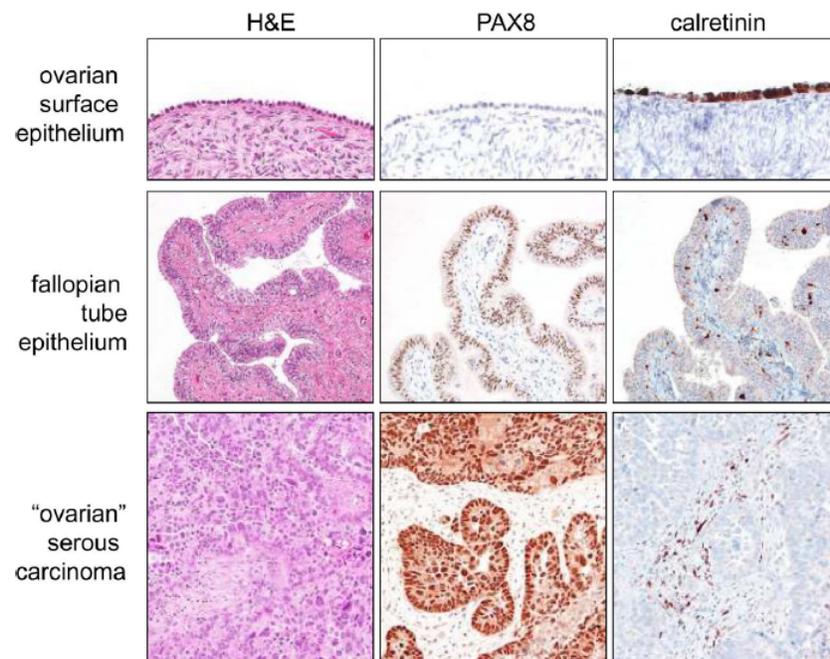


Figure 2.3 Comparaison de teintures immunohistochimiques pour trois cas : l'épithélium ovarien, l'épithélium des trompes de Fallope et un carcinome séreux ovarien. La teinture hématoxyline et éosine (H&E) marque le cytoplasme (rose) et les noyaux des cellules (mauve), le PAX8 est une teinture marquant l'épithélium de type mullerien tel que celui des trompes et la calretinine est un marqueur de l'épithélium ovarien. Tiré de [2].

2.3.1 Biais pathologique

Trois observations empiriques ont guidé la recherche jusqu'à présent [2] :

1. Malgré les différences structurelles marquées entre les sous-types de tumeurs, la majorité des cancer détectés prennent la forme de carcinomes séreux de haut grade de malignité (« high grade serous carcinomas »), cette majorité étant responsable de 90 % des décès reliés au cancer de l'ovaire [3] ;
2. Les cancers de l'ovaire prennent leur origine dans l'épithélium ovarien (mésothélium), qui s'invagine pour former un kyste. Ces kystes peuvent éventuellement muter pour se transformer en tumeurs ;
3. Les tumeurs ovariennes s'étendent communément au-delà de l'ovaire, dans le pelvis et les autres tissus abdominaux.

Ces observations ont été d'abord interprétées avec l'idée que toutes les tumeurs et lésions proviennent de l'ovaire, puis mutent spontanément en tumeurs malignes génétiquement très instables pour s'étendre ensuite à l'abdomen. Les diverses recherches des 50 dernières années ont été guidées par ces prémisses, qui ont influencé la façon de classer et d'interpréter les tumeurs. Il existe un biais sur le plan pathologique concernant la classification des tumeurs pelviennes. En effet, une tumeur est dite provenant de l'ovaire si au moins 5 mm de tumeur implique du tissu ovarien. Ce critère ne permet pas de discerner une tumeur dont l'origine se situe dans une autre structure pour envahir l'ovaire de façon secondaire. Un autre aspect affectant ce biais est la préservation difficile des tissus épithéliaux, car cette fragile couche de cellule peut se détériorer à la chirurgie (séchée, abrasée, desquamée) ou durant la manipulation avant l'histologie. Se faisant, l'analyse histologique se retrouve souvent incomplète, car les cellules épithéliales sont absentes, à moins d'être logées dans des crevasses ou sous des lésions fibreuses [31]. Finalement, les trompes de Fallope sont des organes très difficiles à analyser de façon extensive par histologie. Typiquement, entre une et 3 coupes de 5 μm par trompe sont prélevées et analysées, ce qui mène à des erreurs d'échantillonnage. Une nouvelle procédure d'analyse plus exhaustive est encouragée. Il s'agit du protocole SEE-FIM (*Sectioning and Extensively Examining the FIMbriated end*) dans lequel on suggère au pathologiste de sectionner la trompe à tous les 2 mm pour prendre une lame histologique de 5 μm , puis une lame immunohistologique consécutive de 5 μm . Ceci mène à plus de 50 histologies par patiente sur les trompes pour à peine 0.5 % de l'organe sondé. Ce protocole n'est cependant pas unanimement adopté sur le plan international.

En 2016, un certain consensus règne chez les chercheurs sur le fait que les tumeurs de type séreux ne sont pas originaires de l'ovaire, mais bien de la trompe et impliquent l'ovaire de

façon secondaire. Ce résultat est important dans un contexte de diagnostic et de dépistage, car **cibler uniquement l’ovaire se révèle inefficace** [2, 3]. L’Organisation Mondiale de la Santé a changé la méthode de classification des tumeurs ovariennes en 2014. Cette modification a créé un changement drastique du travail des pathologistes : plusieurs cas ont changé de diagnostic entre l’ancienne classification de 2008 et la nouvelle de 2014 (près de 50 %). La nouvelle méthode de classification a cependant eu pour effet d’uniformiser les diagnostics d’un pathologiste à un autre pour un même cas étudié (accord interobservateur de 98 %). La nouvelle classification inclut les origines tubales des cancers séreux et certains autres sous-types de cancer, par opposition au modèle précédent de carcinogenèse dans l’ovaire. Plusieurs sous-types de tumeurs ont été re-catégorisés selon le processus d’origine de formation de la tumeur.

2.3.2 Stade précoce vs petit volume

La détection de cancers à des stades précoces est une tâche difficile, car un cancer de l’ovaire stade I n’implique que l’ovaire. Empiriquement, lorsque l’ovaire est impliqué, les trompes de Fallope le sont souvent également, mais à plus petite échelle. La notion de stade précoce n’a plus de sens. Ainsi, il semble d’autant plus pertinent de rechercher des tumeurs et lésions de petit volume. Celles-ci, malgré leur petite taille, sont reconnues pour leur potentiel métastatique élevé. Dans la mesure où ces tumeurs et lésions sont trouvées lors du diagnostic, puis éventuellement lors du dépistage, il sera plus aisé pour les médecins de traiter adéquatement les patientes. En attendant de telles mesures, les instances gouvernementales en santé refusent le dépistage systématique des femmes pour le cancer de l’ovaire, allant même jusqu’à proscrire des examens de routine annuels pour le cancer ovarien, même chez les femmes avec des symptômes reconnus pour ce type de cancer [3].

2.4 Imagerie des organes gynécologiques

Les techniques d’imagerie actuellement employées en clinique ne sont malheureusement pas appropriées pour détecter les petites tumeurs ou lésions. Les diverses techniques d’imagerie employées pour le dépistage et le diagnostic sont brièvement décrites. Les techniques d’imagerie optique potentielles sont ensuite abordées avec leurs méthodes de contraste.

2.4.1 Imagerie actuelle en clinique

Les techniques employées pour le dépistage sont l’examen pelvien, la présence de CA-125 dans le sérum sanguin et l’ultrason (US). L’examen pelvien n’a que peu ou pas d’impact

dans le dépistage et le diagnostic des masses pelviennes, que ce soit des tumeurs ovariennes ou des masses bénignes [32]. L'ultrason transabdominal possède un grand champ de vue, mais une mauvaise résolution pour les petites lésions, alors que la version endovaginale permet une meilleure visualisation des structures et de la vasculature à cause de la fréquence plus élevée du transducteur [6]. L'emploi de mode Doppler en US permet d'avoir davantage de contraste [33]. Avant d'aller en chirurgie diagnostique, le CT, l'IRM et la tomographie par émission de positrons (TEP) peuvent être employés pour planifier la chirurgie et valider la présence de grosses masses (taille supérieure au cm) [34]. La technique la plus commune est le CT. Cependant, lorsque les masses sont inférieures au cm, la sensibilité de ces techniques chute rapidement. Des lésions de 5 mm malignes ont le potentiel d'être dangereuses, mais difficilement traçables avec ces modalités [35]. En dépit d'une résolution de l'ordre du mm, le contraste des petites tumeurs, est souvent faible sur les images IRM et CT. Le CA-125 est employé à toutes les étapes de gestion de la patiente, à la fois pour dépister des lésions cancéreuses, mais aussi pour assurer le suivi et l'évaluation des progrès générés par le traitement [36].

Quelques instruments ont été développés pour imager les trompes de Fallope sans recours à la laparoscopie. Un tel instrument, appelé falloposcope, permet d'accéder aux trompes de Fallope par le col cervical et peut éventuellement être employé sans anesthésie. Ce genre de technique a d'abord été rapportée en 1988 pour l'irrigation des trompes et le diagnostic ou le traitement de l'infertilité. Ce type de procédure se déroule sous supervision laparoscopique ou par ultrasons. Une itération intéressante de ce type d'instrument ne requiert pas d'anesthésie, ni de supervision par US ou laparoscopie [37]. Cette sonde flexible de 0.5 mm de diamètre permet la visualisation en face et en lumière blanche des trompes et a été testée sur 10 patientes sans anesthésie et sans autre mécanisme de guidage. Les critères de design d'une bonne sonde sont énoncés également. Il est aussi connu que des canules de 2 mm et plus sont douloureuses lorsqu'employées sans anesthésie ou analgésie. Deux types de falloposcope sont disponibles sur le marché : le cathéter coaxial et le cathéter à ballon réversible. Les faisceaux de fibres optiques (« fiber bundles ») typiquement employés ont des diamètres de 0.5 mm et des résolutions d'environ 3000 pixels. Plusieurs difficultés liées à l'utilisation clinique de cet instrument ont été rapportées [38], comme la difficulté à obtenir des images utilisables tout au long de la procédure. La complexité de la procédure explique sa faible utilisation comme examen de routine.

L'hystérosalpingographie est une technique d'imagerie dont l'emploi principal est de visualiser les anomalies dans les trompes de Fallope. Cette technique consiste à charger l'utérus et les trompes avec un agent radioopaque et à prendre une radiographie de la structure par la suite [39]. Cette technique comporte cependant des complications, telles que des infections,

des réactions allergiques à l'agent de contraste, des inconforts ainsi que des perforations de l'utérus et des trompes [40]. Enfin, la réalisation et l'interprétation des images demandent une certaine expérience du médecin, sinon elle peut mener à des erreurs d'analyse et de diagnostic. Cette technique permet de visualiser des lésions et d'adresser la morphologie comme « aucune autre technique » [6].

2.4.2 Imagerie optique appliquée au cancer de l'ovaire

Certaines techniques d'imagerie optique pourraient être de bonnes candidates pour repérer les lésions et tumeurs de petit volume dans les trompes. Ces techniques d'imagerie sont réputées pour avoir de meilleures résolutions que l'imagerie clinique conventionnelle, néanmoins avec de plus petits champs de vue. Elles peuvent également imager rapidement les différents tissus et sont compatibles avec des sondes de petits diamètres. Les modalités d'imagerie présentées ici sont la microscopie confocale, la tomographie par cohérence optique, les techniques de microscopie non linéaire et la microendoscopie grand champ. La variété des techniques optiques n'est cependant pas limitée à ces quatre modalités.

La microscopie confocale est une technique d'imagerie optique similaire à la microscopie conventionnelle. Elle permet de voir des éléments morphologiques à l'échelle cellulaire et sous-cellulaire (noyaux, architecture cellulaire) soit en réflectance (le contraste se base sur la différence d'indice de réfraction entre les composites) ou en fluorescence (le contraste se base sur un agent fluorescent présentant une affinité avec la structure ou le paramètre d'intérêt). La différence majeure entre un microscope confocal et son homologue conventionnel est l'ajout d'un filtre spatial avant le détecteur, ce qui permet de conjuguer optiquement un petit volume dans l'échantillon avec la détection. Ainsi, les photons ne provenant pas du volume d'intérêt dans l'échantillon sont filtrés et ne participent pas à la formation de l'image. Cet ajout d'un filtre spatial a comme répercussion de pouvoir sonder un échantillon épais sous la surface. Les résolutions typiques d'un microscope confocal sont de l'ordre de $1\ \mu\text{m}$ latéralement et de quelques microns axialement (dans l'axe de la profondeur). Il est possible d'imager jusqu'à quelques centaines de microns de profondeur selon les tissus et la longueur d'onde employée. Cette technologie est compatible avec l'endoscopie [41] et selon l'implémentation, ce type de système peut produire des images en temps réel. Quelques essais *ex vivo* et *in vivo* ont été réalisés au cours des 5 dernières années, surtout pour le col de l'utérus, rendant la technique intéressante pour pratiquer des « biopsies optiques » [26, 42] éventuellement directement durant la chirurgie. La microscopie confocale en fluorescence a été testée *ex vivo* et *in vivo* sur les ovaires il y a quelques années [43–45]. Une étude avec une sonde laparoscopique confocale a été menée sur les trompes de Fallope humaines et animales [46].

La tomographie par cohérence optique (OCT) est une technique interférométrique qui permet de sonder rapidement les tissus en profondeur [47]. Dans un régime de faible cohérence, il est possible d'atteindre des résolutions de l'ordre de la dizaine de microns axialement, tout en sondant à des profondeurs d'environ 2 mm. L'OCT permet de retrouver le profil de réflectivité de l'échantillon en profondeur et son mécanisme de contraste est le changement d'indice de réfraction. Cette technique d'imagerie produit des images en coupe d'un tissu et permet de sonder rapidement des volumes d'échantillon ou des images en coupe en temps réel. Les premières études OCT appliquées à l'ovaire remontent à 1999 [26]. Deux études ont imagé des trompes de Fallope à l'OCT *in vitro* [48] et en paraffine [49] pour des conditions de fertilité. Des sondes laparoscopiques ont été réalisées pour l'étude *in vivo* des ovaires et de l'isthme des trompes de Fallope chez l'humain en cours de chirurgie [50, 51]. Il est généralement admis dans les articles que bien que l'OCT puisse distinguer des lésions et des tumeurs, la résolution n'est pas suffisante pour poser un diagnostic dans un contexte gynécologique [52]. L'imagerie des organes reproducteurs de souris *ex vivo* et *in vivo* a donné lieu à quelques récentes publications [53, 54].

La microscopie non linéaire comporte plusieurs variantes d'un même principe. Ce genre de technique s'appuie sur les propriétés non linéaires d'un tissu, soit pour générer des harmoniques du laser employé, ou de la fluorescence par absorption multi-photons. Certains composés sont reconnus pour générer de façon abondante certaines interactions. Par exemple, le collagène ordonné est connu pour générer un important signal de second harmonique, alors que le NADH et l'élastine ont des sections efficaces d'absorption à deux photons suffisantes pour obtenir un signal de fluorescence pertinent. Étant donné la nature non linéaire de ces interactions, celles-ci se produiront exclusivement là où l'intensité du champ électrique du laser dans l'échantillon sera suffisamment importante, donc au volume focal. Ceci garantit en quelque sorte une résolution de l'ordre du micromètre autant axialement que latéralement. À moins d'imager des tissus faiblement absorbants et diffusants, la profondeur d'imagerie de ce type de technique est limitée à une centaine de microns. Il s'agit en général d'une technique d'imagerie relativement lente (1 à 4 images par seconde), mais qui peut être compatible avec l'endoscopie [55, 56]. Certaines implémentations peuvent imager plus rapidement [57]. L'imagerie par génération de second harmonique et la fluorescence par absorption 2 photons ont été appliquées à l'étude de l'ovaire [58–60] afin d'en retirer des métriques pertinentes (degré d'ordre des tissus, contenu de l'épithélium). Des études *in vivo* chez la souris ont été réalisées, de même qu'*ex vivo* sur des échantillons humains frais [56] afin d'évaluer la correspondance des critères diagnostics entre la teinture H&E et les images de second harmonique et de fluorescence à deux photons. Une étude a également été réalisée sur la distinction des cancers ovariens de type séreux et leurs variantes néoplastiques et bénignes avec un microscope non

linéaire incluant la fluorescence à deux photons, la génération de second harmonique et la génération de troisième harmonique [61]. Les spécimens étudiés étaient fixées et teints H&E sur lame de microscope. La microscopie non linéaire donne un contraste intéressant pour analyser l'organisation de la matrice cellulaire de façon locale. Une utilisation pour imager la surface d'un organe de taille imposante comme la trompe de Fallope est cependant peu prometteuse, à moins d'être employée de façon locale en complément d'une autre modalité d'imagerie.

Plusieurs autres techniques optiques à contraste moléculaire ont été testées sur des ovaires, par exemple des mesures de spectres de fluorescence. Avec des sondes laparoscopiques, une étude sur des souris a montré que les tumeurs ovariennes sont plus clairement définies lorsque regardées avec le marqueur fluorescent ProSense750 comparé à une inspection en lumière blanche [62]. Des approches en spectroscopie par autofluorescence [63] et en réflectance [64] ont également été conduites chez l'humain. En mode grand champ (sans sonde lors de la chirurgie), l'ajout d'un marqueur fluorescent semble prometteur pour discerner rapidement et efficacement la localisation et les limites des tumeurs [65, 66]. Une première étude chez 10 patientes a été réalisée avec un nouveau marqueur fluorescent (vitamine B9 avec une molécule de fluorescéine attachée à l'une de ses terminaisons) [67]. Ce nouveau marqueur est sensible à la surexpression des récepteurs de folate- α dans les lésions ovariennes cancéreuses [68] et se révèle efficace pour trouver des tumeurs de petit volume. Deux autres études ont également été publiées sur l'autofluorescence en imagerie grand champ sur les ovaires [69–71] et les trompes de Fallope [72, 73]. La spectroscopie Raman a également été appliquée aux ovaires ex vivo [74, 75]. Les spectres Raman de tissus frais ou fixés permettent de discerner les tissus ovariens sains et cancéreux.

Une autre technique s'appuyant sur un contraste morphologique est l'endoscopie par encodage spectral. Cette technique permet d'établir rapidement le profil de surface d'un échantillon. L'encodage spectral consiste en l'emploi d'une source large bande, qui est étalée spectralement de telle sorte que chaque longueur d'onde résolvable arrive en un point différent de l'échantillon [76]. Ainsi, chaque longueur d'onde transmet l'information de réflectivité d'une position sur l'échantillon. Étant donné les grandes fréquences de balayage des sources laser, il s'agit d'une technique d'imagerie grand champ facilement implémentable en temps réel [77]. La collection de la lumière rétrodiffusée par l'échantillon peut être avantageusement effectuée par une large gaine interne d'une fibre à double gaine [78]. De plus, l'aspect tridimensionnel de l'échantillon est rendu sur l'image [79, 80]. Ce type de système peut produire des images avec des champs de vue de l'ordre de plusieurs millimètres avec des résolutions de l'ordre de la dizaine de microns. Il s'agit également d'une technologie compatible avec des sondes de petit diamètre [81].

2.5 Sondes et imagerie multimodale

Un instrument de taille suffisamment petite pour être inséré dans la trompe de Fallope peut être réalisé avec une sonde à fibre unique. Des sondes de taille inférieure ou comparable à 1 mm ont été démontrées pour l'OCT [82, 83], l'endoscopie par encodage spectral [81, 84–86], la microscopie confocale [46, 87–90] et la microscopie non linéaire [91–95]. Il est également possible de réaliser ces sondes en accommodant les requis de plusieurs modalités d'imagerie à la fois, comme l'OCT et la fluorescence par exemple [96–104] ou l'OCT et la spectroscopie [105, 106]. L'emploi de fibre à double gaine permet de combiner les modalités d'imagerie avec une certaine flexibilité selon les besoins de l'application. La difficulté réside dans la vitesse d'imagerie : plus la sonde est petite, plus difficile est l'intégration d'un mécanisme de balayage du faisceau. Hormis le balayage manuel simple, des moteurs de petit diamètre peuvent se trouver sur le marché (1 mm à 2 mm) pour intégrer directement dans la tête de la sonde [107]. Des céramiques piézo-électriques peuvent également être employées pour balayer la fibre optique sur le champ de vue en face en exploitant la résonance mécanique [108, 109]. Une autre approche consiste à employer une jonction rotative pour faire tourner la fibre sur elle-même directement dans la sonde [97, 100, 101, 104]. Ces sondes ont été démontrées dans des contextes d'imagerie d'artères coronariennes et de bronchoscopie. La géométrie cylindrique inhérente à ces mécanismes est tout à fait appropriée pour imager les trompes de Fallope.

Des sondes multimodales de plus gros diamètre ont été appliquées à l'imagerie des ovaires. Notons une sonde OCT tomographie par émission de positron [110] employée dans une étude pilote chez 10 femmes et une sonde tri-modale OCT, ultrason et photoacoustique [111] de 5 mm employée sur des tissus ovariens ex vivo porcins et humains. Une sonde OCT et fluorescence a été employée avec succès sur un modèle de rat [50].

Une façon efficace d'exploiter les sondes à fibre unique est d'employer divers types de fibres optiques pour remplacer les pièces de micro-optique. Ces sondes emploient simplement des combinaisons de fibres optiques différentes afin de conditionner les rayons lumineux et obtenir la résolution et la profondeur d'imagerie désirées. La géométrie de base permet d'imager en face de la sonde [112, 113], ou par le côté à l'aide d'un petit miroir ou d'un prisme qui dévie le faisceau lumineux [83, 82, 114]. Les paramètres d'imagerie peuvent être améliorés en ajoutant des segments de différentes fibres multimodes ou à gradient d'indice [115]. Un aspect intéressant également du point de vue clinique et la possibilité d'employer ces sondes en interférométrie en trajet commun [116].

2.6 Tomographie par cohérence optique

La tomographie par cohérence optique est une technique d'imagerie prometteuse dans le cas du diagnostic du cancer de l'ovaire. Elle permet d'obtenir des images morphologiques présentant une résolution entre l'oeil humain et l'histologie. Cette modalité d'imagerie a été sélectionnée pour la suite des travaux pour sa compatibilité avec l'environnement clinique, le potentiel de miniaturisation des sondes et sa rapidité d'imagerie. Les sections suivantes passent en revue les éléments-clés de l'intégration de l'OCT au contexte du diagnostic du cancer de l'ovaire. Le premier élément concerne la configuration de l'interféromètre utilisé. Les interféromètres OCT conventionnels emploient des interféromètres de type Michelson ou Mack-Zehnder possédant un bras de référence distinct du bras d'échantillon. La configuration retenue pour la suite des travaux est une configuration d'interféromètre en trajet commun, se distinguant par l'inclusion du bras de référence directement dans le bras d'échantillon à l'aide d'un réflecteur partiel. Les deux premières sections s'attardent à l'analyse du signal OCT dans ces deux configurations, puis à la détection en trajet commun en couplage AC (couplage alternatif) au détecteur. Ce couplage alternatif permet d'améliorer la réjection de la composante continue du signal tout en préservant le signal OCT. La section suivante propose un modèle de fenêtre optique appliqué aux trompes de Fallope selon la composition communément admise d'une trompe de Fallope humaine saine. Les deux dernières sections du chapitre abordent la question des fibres optiques et de composants tout-fibre disponibles pour réaliser des implémentations tout-fibre d'interféromètres OCT. Ces composants permettent d'ajouter des modalités d'imagerie additionnelles à un système OCT.

2.6.1 Interférométrie conventionnelle

Soit un système OCT avec un matériau diffusant quelconque dans le bras d'échantillon et un miroir dans le bras de référence. En sortie de l'interféromètre, l'interférogramme (I) peut s'exprimer comme une somme de sinusoides.

$$I = \nu(z) \sum_{k=k_{min}}^{k_{max}} \cos(kz - \omega t) \quad (2.1)$$

avec $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ le nombre d'onde, z la différence de chemin optique entre le bras d'échantillon et le bras de référence et ω la fréquence angulaire de l'onde. La quantité $\nu(z)$ représente la visibilité de l'interférogramme. Ici la somme s'effectue sur la discrétisation des nombres d'ondes lors du balayage de la source laser. Les bornes de sommation correspondent aux nombres d'onde des limites de la largeur de spectrale du laser (typiquement plus de 100 nm

de largeur spectrale avec un laser centré à 1300 nm).

De cette expression, on note que chaque fréquence représente la position d'un réflecteur dans l'échantillon (plus la fréquence est élevée, plus le réflecteur est situé en profondeur) et que l'amplitude de chaque sinusoïde quantifie la réflectivité du réflecteur (plus l'amplitude est grande, plus le réflecteur renvoie de signal et plus il apparaîtra au-dessus du niveau de bruit sur l'image finale). Afin de reconstruire l'image OCT dans le domaine de Fourier, il suffit de prendre la transformée de Fourier de l'interférogramme bien conditionné. Cette transformée de Fourier donne, pour chaque ligne-A, les pics de réflectivité des réflecteurs de l'échantillon. La transformée de Fourier d'un cosinus donne une paire de delta de Dirac centrés en plus et moins la fréquence de la sinusoïde, avec comme amplitude la demie de l'amplitude de la sinusoïde de départ, comme présenté à l'équation suivante.

$$\mathcal{F} [\cos(2\pi k_0 x)] (k) = \frac{1}{2} [\delta(k - k_0) + \delta(k + k_0)] \quad (2.2)$$

Avec la superposition de toutes les sinusoïdes provenant de tous les réflecteurs de l'échantillon, on crée l'image en profondeur. Pour être rigoureux, il faut passer dans le plan complexe pour représenter la composante imaginaire représentant la phase du réflecteur en substituant le cosinus par l'exponentielle complexe. Les signaux retournant du bras d'échantillon et du bras de référence s'écrivent respectivement

$$\begin{aligned} E_{Ech} &= \frac{E_I}{\sqrt{p}} \sum_{n=1}^N r_n e^{ikz_n}, \\ E_{Ref} &= \frac{E_I}{\sqrt{q}} r_{Ref} e^{ikz_{Ref}} \end{aligned} \quad (2.3)$$

avec E le champ électrique (l'indice I dénote le champ à l'entrée de l'interféromètre), p et q sont les fractions de l'onde incidente allant respectivement dans les bras échantillon et référence avec $p + q = 1$, r représente la réflectivité en amplitude du réflecteur considéré, k le nombre d'onde et z la différence de chemin optique. Il est à noter pour calculer z_n et z_{Ref} qu'il faut prendre en compte l'aller-retour dans chaque bras de l'interféromètre et pondérer par l'indice de réfraction de chaque partie du trajet.

Lorsque la détection est en mode continu (avec ou sans détection balancée), le signal au détecteur devient donc de la forme

$$i_D(k, w) = \frac{\rho}{2} \langle |E_{Ref} + E_{Ech}|^2 \rangle \quad (2.4)$$

Ici ρ représente la responsivité du détecteur ($A W^{-1}$), le facteur $\frac{1}{2}$ provient de la séparation des signaux dans le coupleur de sortie (50 : 50) de l'interféromètre et comme les oscillations de la porteuse sont beaucoup plus rapides que la bande passante du détecteur, une moyenne temporelle des champs donne le courant au détecteur. Une fois la moyenne temporelle calculée et les termes regroupés, le signal au détecteur peut s'écrire

$$\begin{aligned}
i_D(k) = & \frac{\rho}{4} \left[S(k)(R_{Ref} + R_{Ech1} + R_{Ech2} + \dots) \right] \\
& + \frac{\rho}{2} \left[S(k) \sum_{n=1}^N \sqrt{R_{Ref} + R_{Ech-n}} \cos(k(z_{Ref} - z_{Ech-n})) \right] \\
& + \frac{\rho}{2} \left[S(k) \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{Ech-n} + R_{Ech-m}} \cos(k(z_{Ech-n} - z_{Ech-m})) \right]
\end{aligned} \tag{2.5}$$

avec $S(k)$ la densité spectrale de puissance. Le premier terme représente la contribution continue au signal de détection. Le deuxième terme est un terme d'interférence croisée entre les divers réflecteurs de l'échantillon et le signal de référence. Il s'agit du signal OCT désiré. Le troisième terme est un terme d'auto-interférence entre les différents réflecteurs du bras échantillon. Ce terme explique la source des artefacts dans les images OCT. L'ajustement de la réflectivité du bras de référence joue un rôle de premier plan dans la différence relative entre ces différents signaux. Une puissance trop élevée dans le bras de référence par rapport à la puissance au bras échantillon aura pour conséquence d'augmenter le terme continu (premier terme). Une puissance appropriée dans le bras de référence fait également en sorte que les termes d'auto-interférence peuvent devenir négligeables devant le terme continu et le terme d'interférence croisée. Dans les échantillons biologiques, les réflectivités R_n ont des valeurs de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} , ce qui rend les termes d'auto-interférence très faibles devant les termes DC et le terme d'interférence croisée. Il est également à noter que comme les réflecteurs d'un échantillon sont en général très près les uns des autres, les termes d'auto-interférence dépendant du trajet optique entre les réflecteurs résultent en des fréquences proches de zéro et sont souvent confinés sur un bord de l'image OCT (près de la fréquence nulle).

La détection balancée vient jouer sur l'amplitude du terme continu (ou terme DC) dans l'équation de l'interférogramme et n'affecte en rien le traitement ultérieur. Dans le cas d'un interféromètre en trajet commun, le terme de corrélation croisée n'est plus présent et le terme d'autocorrélation devient le signal d'intérêt. Il est également à dissocier de la composante continue.

Lorsqu'on utilise une sonde en milieu clinique, on cherche à minimiser le temps de préparation

du système et d'installation de la ou des sondes. Dans l'éventualité d'une défaillance, il faut pouvoir changer le système rapidement. Les montages OCT traditionnels emploient un bras d'échantillon (ici la sonde) et un bras de référence. Pour chaque bras échantillon, le bras de référence doit être réajusté pour optimiser le contraste d'interférence. Les signaux des bras échantillons et référence doivent interférer entre eux avant la détection. Le laser VCSEL employé possède une longueur de cohérence instantanée de plus de 100 mm, qui permet d'obtenir de l'interférence entre les deux bras même avec une grande différence de parcours optique, mais l'ajustement optimal se révèle plus subtil. Plusieurs facteurs détériorent le contraste des franges : différence de trajet optique entre les deux bras, différence de dispersion, différence d'intensité, différence de polarisation pour ne nommer que ceux-là. Ainsi, pour chaque sonde à tester dans l'implémentation conventionnelle, il faut au minimum réajuster la longueur du bras de référence et l'intensité transmise dans cette portion de l'interféromètre ainsi que compenser la dispersion. Une différence de longueur de fibre optique de quelques millimètres entre les deux bras de l'interféromètre est suffisante pour dégrader la résolution axiale et, avec certains lasers à faible cohérence instantanée, complètement détruire la visibilité de l'interférogramme. Comme les sondes auront toutes des longueurs de fibres légèrement différentes et des composants optiques différents, la tâche de test et d'utilisation « facile et rapide » représente un défi d'envergure. Cette problématique sera discutée dans la prochaine section.

2.6.2 Interférométrie en trajet commun

Une approche pour adresser cette problématique est d'employer la sonde dans une configuration dite en trajet commun (*common-path* en anglais). Dans cette implémentation, une réflexion sur l'une des surfaces optiques de la partie distale de la sonde est utilisée comme signal de référence. Ainsi, les deux bras de l'interféromètre sont contenus dans la sonde, et passent par les mêmes composants (à une ou deux interfaces près). Les longueurs et la dispersion sont donc intrinsèquement balancées. Pour changer de sonde, il n'y a pas d'étape supplémentaire d'ajustement. Une problématique fait surface pour la détection du signal et est discutée dans la sous-section suivante. Dans le cadre de cette thèse, nous allons travailler avec des implémentations d'OCT avec des sources à balayage en longueur d'onde.

La fraction de photons balistiques rétrodiffusés par un échantillon biologique est très faible, particulièrement à grande profondeur. La nature interférométrique de la technique de tomographie permet d'amplifier le signal à détecter grâce à la détection homodyne. Cependant, le signal envoyé au détecteur est constitué d'une forte composante continue et d'une composante en fréquences avec oscillations de faible amplitude (constituant le signal d'intérêt). La forte composante continue limite le gain à la détection au détriment du signal d'intérêt, ce

qui résulte en un faible rapport signal sur bruit. Une stratégie employée pour diminuer cet inconvénient est l'utilisation d'une détection balancée, dans laquelle deux signaux sont soustraits entre eux avant l'amplification. Cette technique peut s'appliquer, car les sorties d'un interféromètre de type Mack-Zehnder sont complémentaires (avec la détection en intensité, ces signaux sont équivalents). Malheureusement, lors d'une détection en trajet commun, une telle soustraction de signaux n'est pas possible ; il faut employer une autre stratégie. Certains groupes ont utilisé des détecteurs ou des spectromètres conventionnels [116–118]. Quelques idées ont été employées dans la littérature pour améliorer la détection des sondes en trajet commun. Parmi celles-ci, relevons l'emploi d'un détecteur balancé en couplage DC où le second signal est composé d'une fraction du signal de la source [119]. D'autres publications préféreraient l'emploi d'un bras de référence à l'utilisation en trajet commun.

Une autre stratégie de suppression de la composante continue applicable dans le cadre d'un interféromètre en trajet commun est l'utilisation d'une détection en couplage alternatif (AC). Le principe de la détection AC est d'ajouter un filtre passe-haut avant l'échantillonnage du signal électrique. Ce filtre permet d'éliminer le contenu inférieur à sa fréquence de coupure, incluant la composante continue. Le principe d'une détection AC est illustré à la figure 2.4. La détection en couplage AC s'effectue aux bornes du condensateur ($V_s - V_e$). Ce filtrage s'avère plus efficace que la simple soustraction de signaux de la détection balancée. Il existe également des solutions combinant la détection alternative et balancée, où chaque signal est détecté en couplage AC avant d'être soustrait. Un filtre passe-haut de faible fréquence de coupure (typiquement moins de 100 Hz) est appliqué au signal.

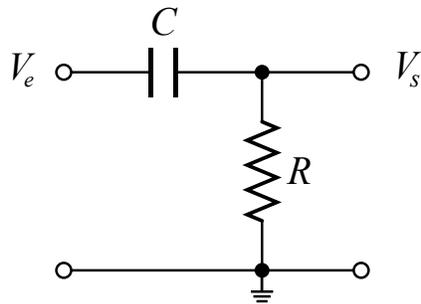


Figure 2.4 Schéma d'un filtre pour la détection en couplage alternatif. La tension est lue aux bornes d'un condensateur de faible capacitance C au lieu d'être prise sur une résistance de charge R . Un courant de détecteur i_D passant par une résistance de charge (typiquement $50\ \Omega$) devient respectivement la tension de sortie, notée V_s et la tension d'entrée, noté V_e . La mise à la terre peut être flottante.

Ce type de filtre a comme effet de prendre la dérivée du signal. La démonstration qui suit

illustre que, dans le cas d'un signal OCT, mesurer l'interférogramme ou sa dérivée n'affecte pas le contenu de l'image.

Supposons pour un instant que nous voulons refaire ce même traitement avec la dérivée de l'interférogramme, afin de voir la forme d'un signal en détection AC. Le nouvel interférogramme détecté, I' s'écrit comme la dérivée de l'équation 2.1, avec $\frac{d}{dt} \cos(t) = -\sin(t)$.

$$\begin{aligned} I' &= \frac{dI}{dt} = \frac{d}{dt} \nu(z) \sum_{k=k_{min}}^{k_{max}} \cos(kz - \omega t) \\ &= \omega \nu(z) \sum_{k=k_{min}}^{k_{max}} \sin(kz - \omega t) \end{aligned} \quad (2.6)$$

Avec la propriété de périodicité des fonctions sinus et cosinus, la substitution suivante peut être réalisée : $\sin(\theta) = \cos(\theta - \frac{\pi}{2})$. Ainsi, après avoir appliqué la transformée de Fourier, on obtient la forme suivante, qui correspond à celle précédente avec un facteur de phase en plus.

$$\mathcal{F} \left[\cos \left(2\pi k_0 x - \frac{\pi}{2} \right) \right] (k) = \frac{1}{2} [\delta(k - k_0) + \delta(k + k_0)] e^{i\frac{\pi}{2}} \quad (2.7)$$

Les préfacteurs de phase peuvent être mis en commun, et l'on retrouve à un facteur près l'équation 2.1.

$$i_D(k, w) = \frac{\rho}{2} \langle |E_{Ref} e^{i\frac{\pi}{2}} + E_{Ech} e^{i\frac{\pi}{2}}|^2 \rangle \quad (2.8)$$

À la détection les facteurs de phase s'annulent et on retrouve l'équation 2.5

Les détections DC et AC sont donc équivalentes du point de vue du signal mesuré de l'interférogramme. La section 6.4.2 du chapitre 6 fournit une validation expérimentale du gain obtenu par le passage au mode de détection AC. Cette approche pourrait être appliquée à des implémentations avec des spectromètres, pourvu que ces derniers aient un mode de couplage AC pour la détection.

2.7 Fenêtre optique

L'imagerie des tissus biologiques requiert le choix avisé de la longueur d'onde de base du système d'imagerie. Cette dernière doit tenir compte de plusieurs facteurs : processus de propagation de la lumière dans l'organe visé, la compatibilité avec la ou les modalités d'imagerie choisies, disponibilité des sources lasers spécialisées, disponibilité des composants optiques

nécessaires, etc. Cette section s'intéresse d'abord à la réponse en longueur d'onde des tissus de trompes humaines pour identifier les différentes plages de longueurs d'onde optimales pour imager. La section poursuit ensuite sur les types de fibres disponibles pour réaliser des systèmes dans ces plages de longueurs d'onde.

L'imagerie des tissus biologiques comporte un défi quant au choix de la longueur d'onde à employer pour obtenir de l'information en profondeur. Deux processus gouvernent la profondeur de pénétration maximale de la lumière dans les spécimens biologiques : l'absorption et la diffusion. Comme les tissus sont constitués de plusieurs composés, élaborer un modèle d'absorption et de diffusion dans le corps humain se révèle laborieux et bien souvent imprécis. Il faut donc se fier à une version simplifiée de la composition et à des valeurs mesurées d'absorption et de diffusion pour obtenir une approximation de la réponse d'un organe donné. Malheureusement, la littérature ne converge que rarement sur des valeurs d'absorption et de diffusion (les méthodes de mesure et de préparation des échantillons semblent être les deux principales causes de ces grandes différences). Il est aussi à noter que peu d'échantillons ont été mesurés, souvent constitués de peau, d'artères ou de cerveau.

Les trompes de Fallope sont des tissus très irrigués en sang et en lymphe. Elles sont constituées d'une paroi musculaire et de tissus adipeux. Le modèle sera donc basé sur l'absorption du gras, de l'eau et de l'hémoglobine en proportions représentatives de celles des organes internes du corps humain. Le tableau 2.1 présente les constituants, proportions et provenance des données employées. Les valeurs de gras mesurées sont celles du gras de porc [120], à défaut d'autres valeurs disponibles dans la littérature. De plus, le pourcentage de gras chez l'humain est en moyenne situé autour de 10 % à 40 %, avec des valeurs un peu plus élevées chez la femme. Le sang a été modélisé par un ratio entre la saturation en oxygène des artères (98 %) et celle des veines (60 %), en prenant un ratio volumétrique artère/veine communément admis de $\frac{20}{80}$ [121]. La fraction de sang a été estimée à partir des valeurs mesurées d'hémoglobine dans les tests sanguins (12 g dL^{-1} à 16 g dL^{-1}) multiplié par la quantité de sang chez une femme de poids moyen dans les pays développés (77 mL kg^{-1} de sang, donnant entre 4.7 L à 5 L de sang pour l'individu) [122]. Les valeurs d'absorption des diverses formes d'hémoglobine a été prise de [123]. La quantité d'eau a été estimée à partir des liquides intracellulaires et extracellulaires (environ 50 % chez la femme d'âge moyen dans les pays développés). Les valeurs d'absorption de l'eau ont été comparées dans la littérature et les valeurs jugées représentatives ont été prises de [124]. Les coefficients de diffusion réduits sont tirés de mesures sur de parois musculaires d'aortes de porc [125].

La figure 2.5 présente les valeurs de coefficients d'absorption (μ_a) et de diffusions (μ'_s). À partir de ces valeurs, on peut calculer la longueur de pénétration optique δ [126], définie

Tableau 2.1 Constituants employés dans le modèle optique des trompes de Fallope

Constituant	Pourcentage de composition	Provenance
Gras	40 %	[120]
Sang	10 %	[121]
Oxy-hémoglobine (HbO ₂)	≈70 % du sang	[123]
Désoxy-hémoglobine (HbO)	≈30 % du sang	[123]
Eau	50 %	[124]
Diffusion (aorte)	100 %	[125]

comme

$$\delta = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}}. \quad (2.9)$$

Cette longueur caractéristique est définie comme la distance nécessaire pour que l'intensité lumineuse diminue d'un facteur $1/e$ ou 37 %. Il est à noter que le modèle de décroissance de l'intensité lumineuse retenu ici est la loi de Beer-Lambert, qui suit une décroissance exponentielle en profondeur.

La profondeur de pénétration optique varie en fonction de la longueur d'onde et est présentée à la figure 2.6. On remarque que le régime à courtes longueurs d'onde est gouverné par la diffusion et l'absorption du sang. Plus loin dans l'infrarouge, c'est plutôt l'absorption de l'eau qui limite la profondeur de pénétration. La fenêtre optique optimale pour accéder en profondeur dans les tissus est délimitée par les barres verticales.

Pour bâtir un système d'imagerie sondant le plus profondément possible, il faut choisir la plage de longueur d'onde dans la fenêtre optique. Dans cette région, la longueur caractéristique de pénétration optique δ atteint un plateau autour de 150 μm à 200 μm . Dans la plage du visible, pour des longueurs d'onde en deçà de 550 nm, l'absorption du sang contribue majoritairement à l'extinction du signal. Une modalité d'imagerie qui exploiterait ces longueurs d'onde sonderait principalement la surface des tissus ($\delta \approx 10 \mu\text{m}$ à 30 μm).

2.8 Fibres optiques

Maintenant que les longueurs d'onde privilégiées pour l'imagerie des trompes ont été établies, nous abordons maintenant à la réalisation d'un système d'imagerie entièrement fibré permettant la détection de faibles signaux. Avec les modalités d'imagerie cohérentes ou requérant un petit volume d'illumination (microscopie confocale par exemple), il est nécessaire

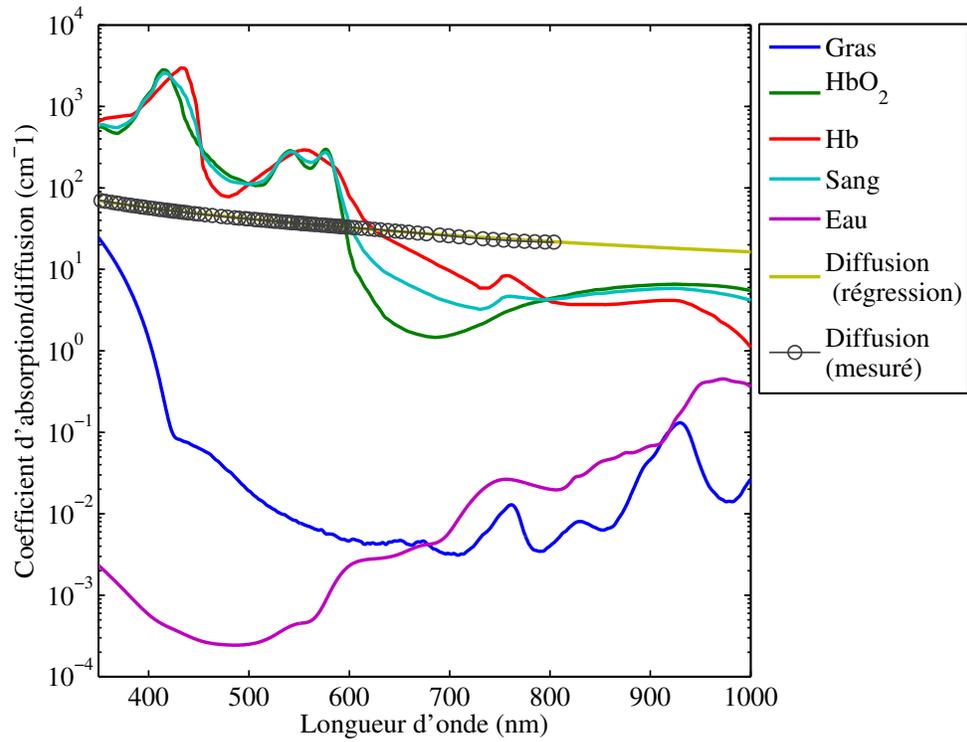


Figure 2.5 Absorption et diffusion de différents composés de la trompe de Fallope. Les valeurs sont tirées des références présentées dans le tableau 2.1.

d'employer des fibres dites monomode. Ces fibres ne supportent qu'un mode dans leur cœur. Le paramètre de guide V permet de caractériser la capacité d'un guide d'onde à guider un mode selon les caractéristiques de la fibre. Un guide sera monomode si son paramètre V est inférieur à 2.405.

$$V = 2\pi\rho\frac{\sqrt{n_c^2 - n_g^2}}{\lambda} \quad (2.10)$$

Avec ρ le diamètre du cœur de la fibre, l'ouverture numérique dictée par l'indice du cœur n_c et celui de la gaine n_g et λ la longueur d'onde. Une fibre opère dans ce régime typiquement sur une plage de 400 nm. Pour de plus grandes longueurs d'ondes, la fibre est faiblement guidante et la puissance guidée dans le mode a tendance à fuir lorsque la fibre est courbée, même légèrement. Dans le cas de longueurs d'onde plus courtes que la plage monomode, la fibre devient graduellement multimode et le nombre de modes guidés peut être estimé par l'asymptote

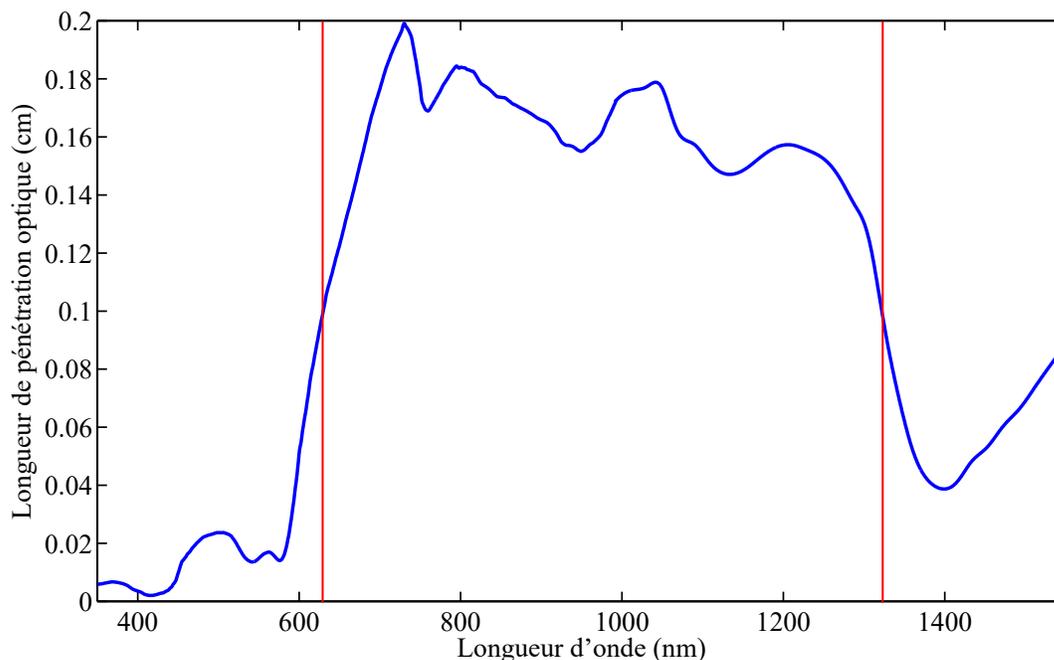


Figure 2.6 Longueur de pénétration optique selon la longueur d'onde pour le modèle de trompe de Fallope développé. La fenêtre de longueurs d'onde idéales pour aller sonder les trompes en profondeur est comprise entre 630 nm et 1330 nm (barres verticales).

$$N_{mode} = \frac{4V^2}{\pi^2}. \quad (2.11)$$

Des fibres monomodes pour toutes les plages de longueurs d'onde sont commercialement disponibles, certaines parfois sont disponibles avec plusieurs choix d'ouvertures numériques. La fibre standard des télécommunications (par exemple SMF-28 de Corning) possède de très faibles pertes de propagation (atténuation inférieure à 0.32 dB km^{-1} à 1310 nm), un zéro de dispersion à 1300 nm et une longueur d'onde de coupure inférieure à 1250 nm . Dans la région visible, cette fibre guide en régime multimode (quelques dizaines de modes selon la longueur d'onde) et son atténuation est de l'ordre de 10 dB km^{-1} .

Les fibres multimodes sont également disponibles avec différentes tailles de cœur et d'ouvertures numériques. Les profils d'indice peuvent être à gradient d'indice ou à saut d'indice. Les profils à gradient d'indice supportent en général deux fois moins de modes que les fibres équivalentes à saut d'indice, permettant de mieux résister aux courbures. Les profils à saut

d'indice peuvent avoir un large cœur et une gaine de silice dopée au fluor, ou tout simplement être constituée d'un cœur de silice pure avec un gel guidant à l'interface avec la gaine de protection en polyacrylate. Cette dernière configuration permet d'obtenir des ouvertures numériques très grandes (jusqu'à 0.5).

La fibre à double gaine est une variante intéressante de fibre qui présente deux régions guidantes : un cœur monomode et une gaine interne multimode. Comme ces fibres ont été développées pour l'industrie des laser à fibre, les cœurs disponibles sont monomodes dans le proche infrarouge (1200 nm à 1600 nm). Les gaines internes peuvent avoir des diamètres de l'ordre de 80 μm ou de 105 μm . Ce type de fibre permet de guider des signaux distincts dans chacune des régions guidantes. La plupart des fibres à double gaine commercialement disponibles ont un cœur compatible avec les fibres standard des télécommunications (type SMF-28 de Corning) et peuvent se présenter en version active ou passive selon si le cœur est dopé avec une terre rare (les plus communes sont l'erbium, l'ytterbium, le praséodyme, le thulium).

Nous avons choisi d'employer un système OCT centré à 1300 nm, grâce à la longueur caractéristique de pénétration optique avantageuse et à la disponibilité de composants optiques et de sources lasers performantes. La disponibilité de fibres à double gaine permet de développer des composants sur mesure pour combiner efficacement plusieurs modalités. La présence de plusieurs types de fibres multimodes pour collecter des signaux à grande ouverture numérique peut également se révéler un atout pour collecter un faible signal de fluorescence.

2.9 Composants en fibres optiques

Les configurations de systèmes d'imagerie sont grandement influencées par la disponibilité des composants en fibre optique. Cette section est dédiée au développement de nouveaux composants en fibres optiques nécessaires à l'implémentation d'un système d'imagerie multimodale efficace et tout-fibre. La première section présente les composants nécessaires à multiplexer efficacement des signaux de longueurs d'ondes différentes dans le cœur d'une seule et même fibre optique. La seconde section présente les coupleurs en fibres à double gaine. Une première version du coupleur permet de faire de l'OCT par le cœur et de récolter un signal de fluorescence ou de spectroscopie par la gaine interne. Une seconde version permet de faire de la détection partiellement cohérente de façon efficace.

2.9.1 Multiplexage monomode

Dans le but de faire de l'imagerie multimodale par la même fibre optique, il devient nécessaire de combiner et/ou séparer des signaux à différentes longueurs d'onde. Par exemple, dans le cas d'un système OCT et fluorescence, la combinaison des signaux d'illumination dans le cœur de la fibre permet une bonne résolution.

Un composant connu dans le domaine des composants à fibre optique monomode est le multiplexeur/démultiplexeur en longueur d'onde. Un tel dispositif est un coupleur fabriqué à partir de deux fibres unimodales aux longueurs d'onde convoitées. Ce dispositif est employé comme multiplexeur lorsque deux signaux distincts en longueur d'onde sont injectés de façon séparée, chacun dans leur fibre d'entrée et que les deux signaux ressortent du composant combinés dans la même fibre de sortie. Le composant est employé en mode démultiplexeur lorsque deux signaux distants en longueur d'onde sont couplés dans la même fibre d'entrée du composant et ressortent de ce dernier séparés, chaque groupe de longueur d'onde dans une fibre de sortie distincte. Pour des signaux séparés en longueur d'onde d'environ 20 nm ou plus, ce type de composant se révèle efficace. Cependant, pour des signaux plus rapprochés, il faut changer de type de technologie pour faire du multiplexage dense. Il est également possible de combiner plusieurs coupleurs pour injecter autant de sources que l'on désire.

On doit également, dans un contexte d'imagerie OCT multimodale, s'assurer de pouvoir combiner les signaux dans le cœur de la fibre. Dans le cadre de cette thèse, on cherche à combiner un signal OCT centré à 1300 nm avec 110 nm de largeur de bande avec un signal d'excitation en fluorescence situé dans le visible ou le proche infrarouge. Pour ce faire, on doit prendre un fibre guidante à 1300 nm (de type SMF28 de chez Corning), même si les signaux dans le visible et proche infrarouge seront légèrement multimodes (20 modes à 450 nm). On obtient ainsi un meilleur compromis sur le plan de la transmission plutôt que de favoriser une fibre monomode dans le visible, mais en régime de mode non guidé dans l'infrarouge. De plus, comme l'OCT est une technique interférométrique, le signal de cette plage de longueurs d'onde doit impérativement conserver son régime de guidage monomode.

Un aspect-clé de la fabrication de ce composant est que l'on doit viser le transfert des grandes longueurs d'onde d'une fibre à l'autre plutôt que le transfert des courtes longueurs d'onde. Lors de la fabrication, la diminution de la taille du cœur se fera sentir d'abord aux plus grandes longueurs d'onde et il sera plus simple d'ajuster le transfert du signal large bande de l'OCT pour affecter ce dernier le moins possible. On apportera ainsi la plus faible réduction possible à la structure. Pour les signaux visibles, seuls les modes plus élevés fuiront du cœur, ce qui résultera en quelques pertes, mais moins grandes que si le composant est davantage étiré. Un exemple de spectre de transmission de ce type de multiplexeur est présenté à la

figure 2.7. On peut y voir que le signal injecté dans la branche bleue sera transféré à la branche mauve à plus de 91 % entre 1250 nm et 1350 nm. La largeur de bande nécessaire à maintenir une bonne résolution axiale en OCT est donc peu affectée par les bords de bande. Ce genre de composant peut transmettre des signaux d'excitation de fluorescence ou de spectroscopie de façon achromatique dans le proche infrarouge et le visible avec des transmissions de l'ordre de 50 % à 60 %.

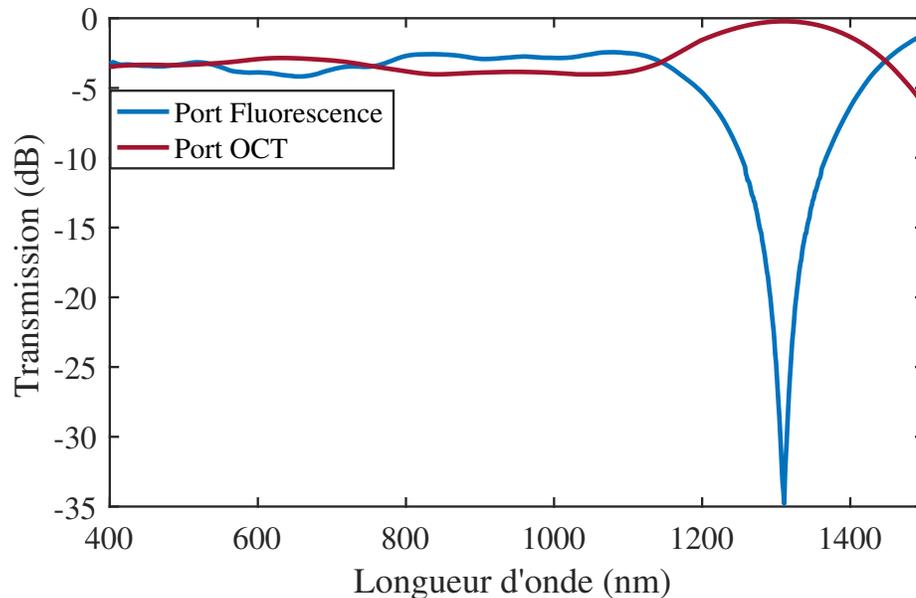


Figure 2.7 Spectre d'un multiplexeur OCT-fluorescence pour le spectre allant du visible au proche infrarouge.

2.9.2 DCFC à grande gaine interne

Cette section aborde le passage de coupleur DCF symétrique à coupleur asymétrique. Le travail préalable réalisé au laboratoire et publié dans la littérature permettait de produire des coupleurs ayant autour de 40 % d'extraction multimode et transmettant 90 % du signal de coeur monomode à 1300 nm [79]. Ces coupleurs sont réalisés à partir de deux fibres DCF identiques accolées, fusionnées et étirées. D'autres coupleurs en fibre DCF ont été rapportés dans la littérature, fabriqués par torsion [105], polissage [106] ou fusion étirage [91]. Les performances multimodes de ces coupleurs n'excédaient cependant pas 30 %. La limitation théorique de ces composants prédit que le transfert multimode ne pourra jamais dépasser 50 % étant donné la géométrie employée. Le travail préliminaire réalisé en début de thèse a permis de rendre la production de ce type de composants répétable et avec une reproductibilité de

90 %, de même que d'augmenter le transfert multimode à 46 % tout en préservant le signal de coeur >95 %. Par la suite, des versions asymétriques du coupleur ont vu le jour afin de dépasser cette barrière théorique de 50 % de transfert multimode. Ces travaux ont été publiés dans la revue *Optics Letters*, l'article est présenté au chapitre 3, [80].

L'article présente une nouvelle méthode design pour les composants en fibre à double gaine. Un modèle de prédiction des taux de transmission est décrit, basé sur l'étendue optique des guides d'onde employés. Avec une méthode de retrait à l'acide de la gaine externe, des coupleurs ont été produits avec des transmissions multimode de 70 % de 400 nm à 1600 nm, tout en préservant le signal monomode se propageant dans le coeur de 1200 nm à 1450 nm. Cette extraction de signal multimode est achromatique du visible au proche infrarouge. Une démonstration du gain en efficacité du coupleur est démontrée dans un montage d'imagerie par encodage spectrale en imageant un embryon de souris fixé. Le gain en signal se chiffre à un facteur 1.5 à 2 selon l'échantillon employé par rapport au coupleur DCF symétrique.

2.9.3 DCFC à petite gaine interne ou sDCFC

Les coupleurs de la section précédente avec une grande gaine interne se généralisent pour diverses tailles de gaine en utilisant un procédé semblable. Cependant, lorsque la gaine interne devient petite par rapport à la gaine externe, cette technique de fabrication ne fonctionne plus. L'étirage requis pour obtenir un début de couplage multimode devient si grand qu'il ne permet plus de préserver le signal monomode. On peut chiffrer la condition de petite gaine interne lorsque la gaine externe dépasse 50 % de la surface transverse de la fibre. Ainsi, pour une fibre de 125 μm de diamètre, lorsque la gaine interne devient moins de 90 μm en diamètre, on peut considérer que la gaine interne est petite devant la gaine externe. Une série de fibres avec des gaines internes de l'ordre de 30 à 80 μm sont disponibles et rencontrent ce critère. La barrière de la gaine externe devient difficile à franchir et beaucoup de signal peut se retrouver guidé dans cette portion de la fibre au lieu d'être extrait dans le coupleur.

Une fraction conséquente des fibres optiques à double gaine commercialement disponibles possèdent un petit diamètre de gaine interne. Les techniques employées jusqu'à maintenant ne seront d'aucune utilité pour produire un coupleur en fibre à petite gaine (sDCFC). En effet, pour atteindre un transfert du signal multimode entre la gaine interne et l'autre fibre, il faut étirer le composant de façon significative, ce qui résultera en de lourdes pertes sur le signal de coeur. Des stratégies comme les attaques chimiques, ou le polissage pour réduire la paroi de la gaine externe, fragiliseront trop la fibre pour rendre le composant utilisable hors du banc de fabrication. Ces stratégies impliquent de retirer près de la moitié du volume de la fibre dans la section de fabrication du composant en vue d'obtenir un transfert multimode

sans affecter le signal monomode. Bien qu'en théorie possibles, ces stratégies sont vouées à l'échec sur le plan expérimental.

Pour la catégorie de coupleurs à petite gaine, une nouvelle méthode de fabrication et plusieurs concepts de design ont dû être développés dans le cadre de cette thèse. Ces nouveaux développements, de même qu'une preuve d'application en microscopie confocale sont publiés comme co-premier auteur dans un article, *Double-clad fiber coupler for partially coherent detection*, publié dans la revue *Optics Express* [25]. L'article détaille les trois nouveaux principes de conception qu'il faut appliquer pour réaliser des composants à double gaine à petite gaine interne. Il s'agit de la capture monomode adiabatique, de l'expulsion multimode complète et de la double asymétrie dans la géométrie du composant. La fabrication du coupleur est ensuite présentée en détails, avec ses caractéristiques de performances. Il permet d'extraire plus de 70 % du signal de gaine interne vers 600 nm, atteignant 80 % à 800 nm, soit la longueur d'onde de design. Plus de 80 % du signal de cœur est transmis sur toute la plage de 600 nm à 800 nm. Une application du coupleur en microscopie confocale à 780 nm est présentée pour démontrer l'efficacité de ce composant. Un gain en signal d'un facteur 31 a été mesuré par rapport aux composants fibrés monomodes commercialement disponibles. Le contraste de bruit de tavelure a également grandement été réduit à des valeurs comparables à celles de sténopés similaires en géométrie libre rapportés dans la littérature. Les résolutions latérales et axiales n'ont subies que de légères dégradations par rapport aux valeurs prédites théoriquement. En effet, la résolution axiale du système a été mesurée à 4 μm , alors que la prédiction théorique se chiffre à 2.6 μm pour le microscope présenté.

La nouvelle méthode de design et de fabrication de coupleurs à petite gaine interne a permis d'améliorer davantage les coupleurs à grande gaine interne. Un coupleur à grande gaine interne présentant des performances proches des prédictions théoriques maximales a pu être fabriqué (91 % d'extraction multimode dans l'implémentation réalisée). Ce composant a été intégré au montage d'imagerie OCT et fluorescence présenté au chapitre 4. Des implémentations en imagerie du coupleur à petite gaine interne sont présentées dans ce chapitre [127]. Une nouvelle série de coupleurs en injection multimode a aussi pu être développée à partir de ces résultats [128]. Un tel type de coupleur est sommairement présenté, de même que les résultats d'une expérience de coagulation laser assistée par OCT.

CHAPITRE 3 ARTICLE 1 : ASYMMETRIC DOUBLE-CLAD FIBER COUPLERS FOR ENDOSCOPY

Auteurs

Wendy-Julie Madore, Etienne De Montigny, Olivier Ouellette, Simon Lemire-Renaud, Mikael Leduc, Xavier Daxhelet, Nicolas Godbout and Caroline Boudoux

Wendy-Julie Madore a mené la modélisation, le design, la fabrication, la caractérisation du coupleur ainsi que son application à l'image par encodage spectral. Etienne De Montigny a collaboré à l'élaboration de la technique de caractérisation des composants. Wendy-Julie Madore et Etienne De Montigny ont également collaboré pour la revue de littérature, la rédaction du manuscrit, la construction des figures et la révision du manuscrit. Olivier Ouellette a participé à la fabrication et à la caractérisation des coupleurs. Simon Lemire-Renaud et Xavier Daxhelet ont contribué au design du coupler et à la révision du manuscrit. Mikael Leduc a fourni de l'aide technique sur la fabrication des coupleurs. Caroline Boudoux et Nicolas Godbout ont contribué aux révisions de l'article et à des discussions sur les résultats. Nicolas Godbout a aussi participé au design et à la modélisation du composant du composant. Caroline Boudoux a également contribué à l'élaboration du montage d'imagerie par encodage spectral. Cet article a été publié dans la revue *Optics Letters*.

3.1 Abstract

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

3.2 Introduction

Double-clad fibers (DCFs) - originally developed for high power lasers [129] - are gaining popularity in biomedical imaging and sensing as they allow the combination of coherent and

incoherent imaging through their single-mode core and multi-mode inner cladding regions, respectively. While this combination was first used to obtain speckle-free high-resolution endoscopic images [78], DCFs were rapidly used for dual-modality imaging requiring coherent and incoherent light detection. The combination of optical coherence tomography (OCT) with fluorescence maps, for instance, provides high resolution imaging based on backscattering with specific molecular contrast [47, 105, 106, 101].

In order to minimize coupling losses and improve the robustness of current free-space beam-splitter (or dichroic filter) approaches, all-fiber DCF couplers (DCFCs) can be fabricated using twisting [105], polishing [106] or fusion-tapering [79, 91]. These techniques typically involve two identical commercially available DCFs. We previously reported such a coupler designed for OCT and fluorescence detection [99] with an achromatic transmission of 90 % single-mode light and more than 40 % multi-mode light extraction. This previous design was limited to a theoretical equipartition limit of 50 %, dictated by the symmetry imposed by the combination of the two identical fibers. For detection of weak signals, however, an ideal DCFC would show a more efficient multi-mode extraction capability over a wide spectral range, without affecting the single-mode transmission.

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

3.3 Methodology

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

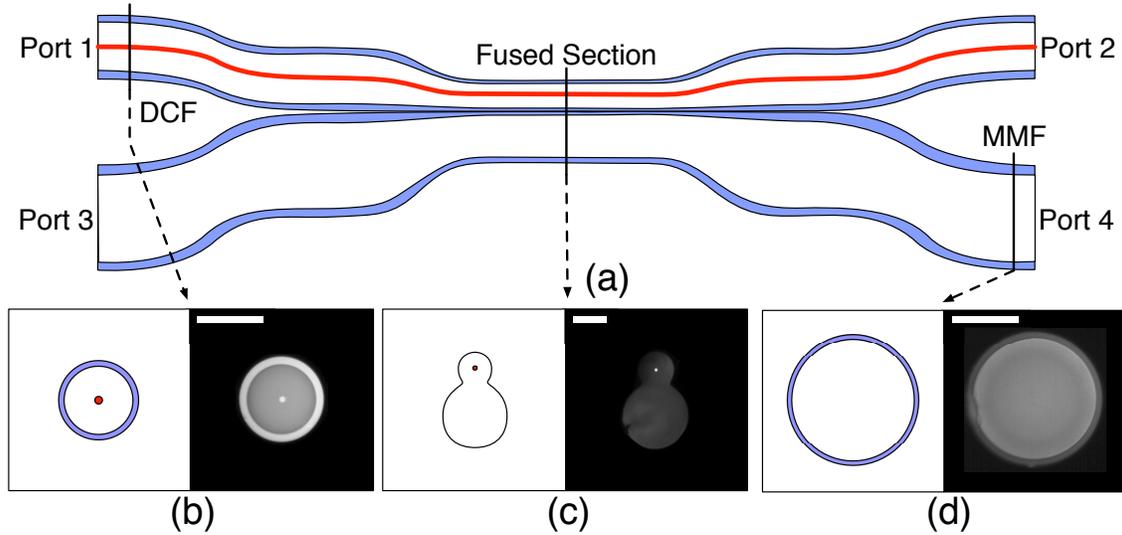


Figure 3.1 (a) Schematic diagram of an asymmetric DCF coupler achieved by fusing a DCF (top) with a MMF (bottom). The core, inner cladding and outer cladding regions are shown in red, white and blue, respectively. (b-d) Schematic diagrams (left) and photographs (right) of cross-sections of the DCF (b), a representative fused-section (c), and the MMF (d). In (c), one can appreciate the absence of outer cladding, which was removed chemically. Scale bar : 100 μm .

Fig. 1((b),(d)) shows schematic diagrams (left) and photographs (right) of the cross-sections of the two commercially available fibers used for fabricating the A-DCFC. The DCF is a 125 μm -diameter fiber (Nufern SM-9/105/125-20A) having a 9 μm core (numerical aperture (NA) of 0.12, cut-off at 1210 nm) and a 105 μm inner cladding (0.2 NA), while the MMF is a 220 μm -diameter coreless multimodal fiber (Nufern MM200/220-22A, 0.22 NA). Fig. 1(c) shows a schematic diagram (left) and a photograph (right) of the cross-section of the fused section of the coupler.

Higher extraction of the multi-mode signal is achieved by modifying the fusion process. After removing both fibers' acrylic coating on a span of 30 mm, this zone is etched with hydrofluoric acid in order to remove the external cladding which lowers the multimodal signal transfer. The etching rate is tuned in order to have sufficient surface quality before the fusion of both fibers ($0.2 \mu\text{m min}^{-1}$ in a 49% HF solution diluted 1 :2 with demineralized water)[130].

The fibers are installed side by side and maintained mechanically with appropriate tension and geometry on a custom fusion-tapering setup. Both fibers are fused with a micro-torch fuelled with an oxygen-propane mix in order to heat the glass up to temperatures ranging from 1500 $^{\circ}\text{C}$ to 1600 $^{\circ}\text{C}$. The fusion initiates a coalescence of the structure into an ellipse (within ≈ 200 s), preserving the refractive index profiles over the cross-section of the coupler. During the fusion step of the process, the single-mode response is monitored with a broadband source

(BBS : Hewlett-Packard, Broadband Light Source, 83437A, 1200 nm to 1650 nm) injected in the core of the DCF and sent to an optical spectrum analyzer (OSA : ANDO Electric, AQ6317). Tapering of the coupler is then performed until losses begin to appear on the single-mode signal. The coupler is glued on a glass substrate using low-shrinkage UV curing glue and secured in a stainless steel tube, which is sealed on both ends with flexible boots.

Two alternate metrics are used to characterize DCFs. A first metric is the coupling ratio, γ , defined as :

$$\gamma_2 = \frac{P_2}{P_2 + P_4}, \quad (3.1)$$

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

$$T_{i-j} = \frac{P_j}{P_i}, \quad (3.2)$$

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

3.4 Results and discussion

While the single-mode transmission of the A-DCFC is monitored during the fabrication process, the multi-mode transmission is measured on a different setup once the device has been packaged. Fig. 2 shows the multi-mode characterization setup consisting of a swept-source laser centered at 1310 nm (20 kHz, 25 mW, 75 nm bandwidth)[77] focused on the cleaved face of a DCF through a diffuser in order to excite a high number of modes. This DCF segment is placed in a mode scrambler to promote uniform excitation of modes. The free end of the DCF is then first spliced with Port 1 of the device under test and signal is measured at Ports 2 and 4 using a calibrated integrating sphere (Thorlabs, NJ, S145C). The injection power is measured afterwards by sectioning the input branch of the coupler to take into account possible loss due to the splice (cutback technique). Figs. 2(b) and (c) show transmission curves for near-infrared (using the wavelength-swept source and a photodetector) and visible spectra (using a BBS and an OSA).

This A-DCFC transmits more than 95% of the single-mode signal (from Port 1 to Port 2, as well as from Port 2 to Port 1) and more than 75% of the multi-mode signal (from Port 2 to Port 3, as well as from Port 1 to Port 4) over the near-infrared spectral band (1260 nm to 1340 nm). In the visible range, the A-DCFC transmits $\approx 72\%$ in either direction. The propagation of visible light through the core however is slightly multi-mode (15 to 20 supported modes) as the cut-off of the DCF has been measured at 1210 nm using the 0.2 dB criterion.

Our A-DCFC compares well with previously reported DCFCs, as these iterations exploited symmetric designs which are subjected to the equipartition limit. In the near-infrared region, multi-mode transmission around 40% was achieved [79, 91]. In the visible region, used for fluorescence detection, the A-DCFC nearly doubles the extracted light from the inner cladding. It also shows a lower chromaticity from 450 nm to 1000 nm, compared with the symmetric version. This can be explained by the additional chemical etching step in the asymmetric version, exposing the inner cladding, and thus facilitating transmission at shorter wavelengths. Single-mode core propagation in the A-DCFC is slightly better than that of the symmetric version, since only a shallow taper is imposed to the structure.

To demonstrate the potential of this new device for biomedical applications, we integrated the A-DCFC in a spectrally encoded (SE) wide-field imaging setup [84], which allows for rapid imaging while adding an additional requirement that the A-DCFC be achromatic. In a SE imaging setup (shown in Fig. 3(a)), the fast-axis scanner is replaced by a diffraction grating which spreads wavelengths from a broadband source across a sample. The slow axis is achieved using a galvanometer-mounted mirror (Thorlabs, NJ, GVSM001). The polygon-based wavelength-swept laser is coupled to the core of the DCF (Port 1) through a splice with single-mode fiber (Corning, SMF-28). Light travels to the imaging arm (Port 2) and is collimated into an 2.8 mm-diameter beam (Thorlabs, NJ, F260APC-C). The wavelengths are then spread using a diffraction grating (Wasatch Photonics, 1004-1, 1145 l/mm) and finally focused through a 100 mm focal achromatic doublet (Thorlabs, NJ, AC254-100-C) on the sample. Backscattered light couples in part coherently through the core and is sent to a photodetector (New Focus, FC-1117) via an optical circulator (Thorlabs, NJ, CIR-1310-50-APC) for single-mode imaging. A larger fraction of the backscattered light from the sample couples back into the inner cladding and is extracted by the A-DCFC (to Port 3) to a photodetector (Thorlabs, NJ, PDA10CS). A custom beam dump is installed on the end of Port 4 to prevent backreflections. Imaging is performed at a rate of 20 images/s over a field of view of 1 cm^2 . We acquired 800 by 800 pixel images of a 28-day-old mouse embryo fixed in 4% paraformaldehyde shown in Fig. 3(b).

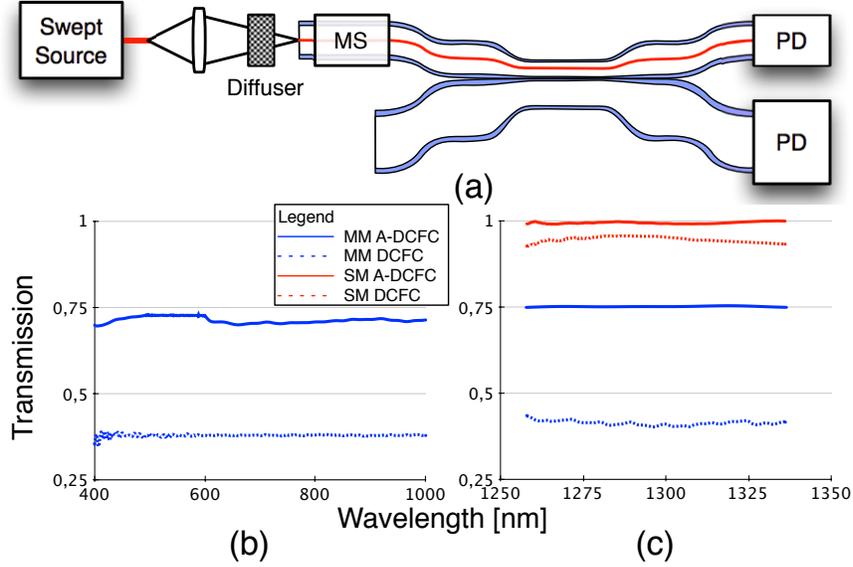


Figure 3.2 (a) Characterization setup for the multi-mode transmission. (b) Comparison of multi-mode transmission in the visible range for symmetric (dashed line) and asymmetric (solid line) designs. (c) Comparison of single-mode (red) and multi-mode (blue) transmission for symmetric (dashed line) and asymmetric (solid line) designs in the near infrared range. MS : Mode scrambler, PD : Photodetector.

Fig. 3 further compares images acquired in single-mode detection (Fig. 3(c), taken from Media 1) with images acquired in the multi-mode detection using a symmetric DCFC (Fig. 3(d), taken from Media 2) and an A-DCFC (Fig. 3(e), taken from Media 3). As reported previously, the multi-mode detection allows for both speckle reduction, increased signal collection (factor varying from 4 to 10 depending on the sample) and for depth of field improvement. In both multi-mode images, we can appreciate the three-dimensional aspect of the sample and more easily identify features such as paws, eyeballs and nostrils. While displayed in different intensity scales, the multi-mode image comparison allows appreciating the increased collection efficiency (factor of 1.5 to 2 depending on the sample) of the A-DCFC for weakly backscattering sample.

The equipartition limit being overcome, we define a new theoretical limit for multi-mode transmission. This can be achieved by comparing the etendues of the fibers used, leading to new guidelines for asymmetric designs. The optical etendue (or throughput), G , is commonly defined [131] as follows :

$$dG = n^2 dS \int \cos \theta d\Omega, \quad (3.3)$$

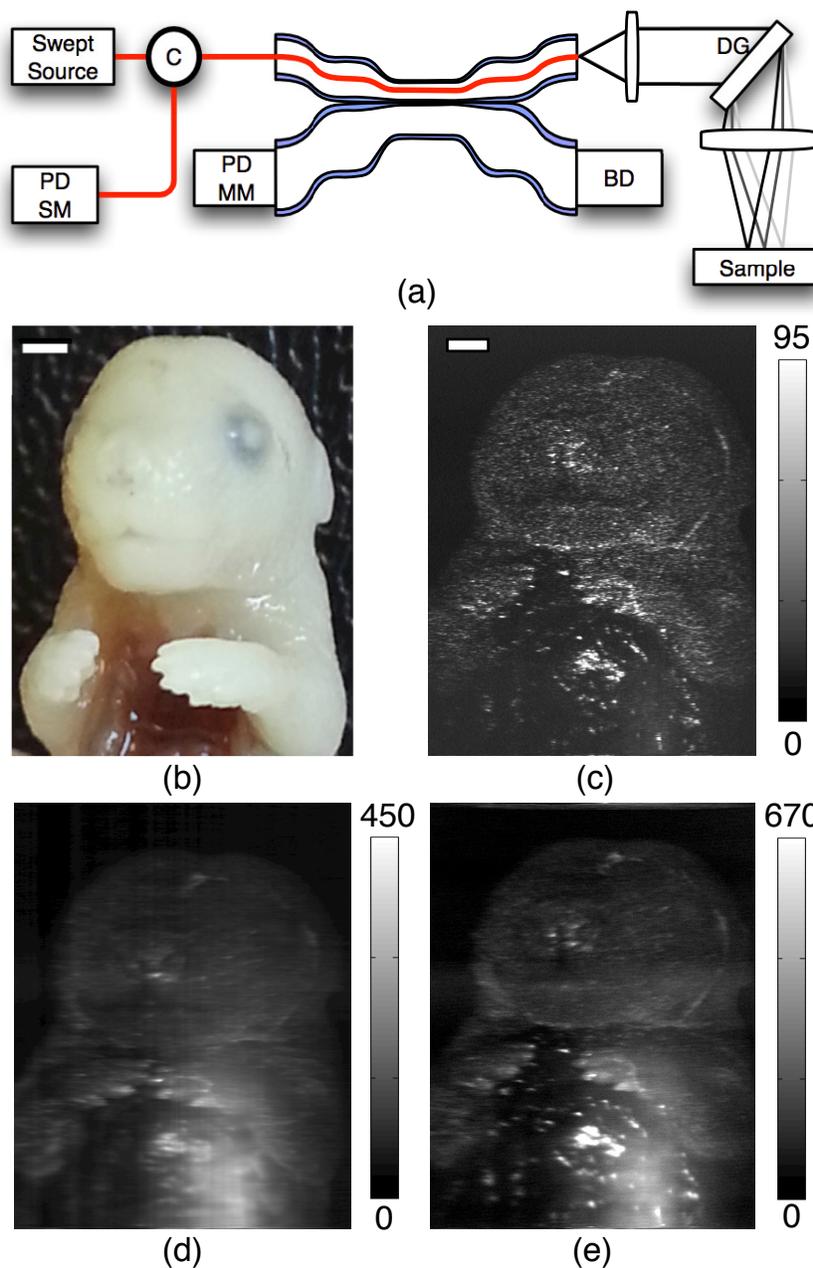


Figure 3.3 (a) Diagram of the SE imaging setup. PD : Photodetector, BD : Beam dump, DG : Diffraction grating, C : Circulator, galvanometer-mounted mirror not shown. (b) Picture of the sample : a mouse embryo fixed in 4% paraformaldehyde. (c-e) Images of the embryo with the A-DCFC ((c) single-mode (Media 1) and (e) multi-mode (Media 3)) compared with a DCFC ((d) multi-mode (Media 2)). Scale bar : 1 mm. Grey scale in nW.

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

$$G = \pi S n^2 \sin^2 \alpha. \quad (3.4)$$

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

$$G = \pi S (\text{NA})^2. \quad (3.5)$$

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

$$T_{2-3} = \frac{G_3}{G_3 + G_1} = \frac{1}{1 + \frac{G_1}{G_3}}. \quad (3.6)$$

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

3.5 Conclusion

In conclusion, we demonstrated an asymmetric DCFC capable of more than 70 % multi-mode transmission, while leaving the core signal unperturbed (more than 95 % transmission). This design exceeds the previous equipartition limit exploiting the asymmetry in the fiber combination. The coupler was realized using two commercially available fibers, as well as

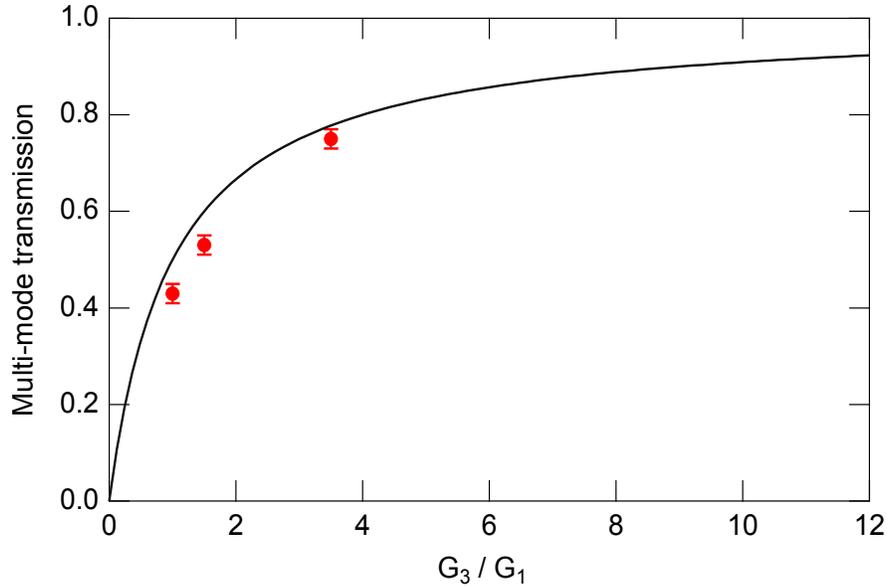


Figure 3.4 Multi-mode transmission as a function of etendue ratio. The solid line shows the theoretical prediction, while the dots show experimental data points from couplers with different combinations of fibers.

fabricated and characterized using a systematic and detailed approach. To demonstrate the potential of this new device, we integrated the coupler in a spectrally encoded imaging setup with a low reflectivity sample. We finally defined a new theoretical multi-mode transmission limit using the concept of optical etendue and predicted the feasibility of an asymptotically perfect device. Several applications can benefit from this improved signal collection such as optical coherence tomography combined with fluorescence imaging, spectroscopy or Raman scattering.

The authors would like to gratefully acknowledge the technical contribution of Dr. Matthias Strupler, Dr. Amber M. Beckley, Mr. Fouzi Benboujja, Mr. Nadir Goulamhousen and Mr. Etienne Duchesne de Lamotte. This work was funded by Canada Foundation for Innovation (CFI) Leaders grant and a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Ideas to Innovation grant. Ms. Madore, Mr. De Montigny and Mr. Ouellette are NSERC scholars.

CHAPITRE 4 IMAGERIE MULTIMODALE - PREUVE DE PRINCIPE

Le chapitre précédent a présenté un coupleur en fibre à double gaine permettant de réaliser des systèmes d'imagerie efficaces pour la collection de faibles signaux optiques. L'amélioration de la collection multimode a été montrée pour le coupleur à grande gaine dans un montage d'imagerie par encodage spectral à 1300 nm. Ce coupleur, ainsi que le coupleur à petite gaine présenté à la section 2.9.3 et détaillé dans [25], ont également un impact pour combiner différentes modalités d'imagerie simultanément à travers la même fibre optique. Ce chapitre traite de quatre implémentations d'imagerie multimodale comme preuve de principe de l'utilisation de ces coupleurs.

La première implémentation emploie des coupleurs à grande gaine interne pour combiner l'OCT et l'imagerie par fluorescence. Un système de table combinant ces deux modalités et permettant la détection de rhodamine 6g est décrit en détails. Le système permet également d'acquérir des spectres d'émission de fluorescence. Une version endoscopique est présentée, avec une sonde en fibre à double gaine. La deuxième implémentation emploie également un coupleur en fibre à grande gaine pour combiner l'OCT et la fluorescence, mais cette fois dans une sonde aiguille pour accéder en profondeur dans les tissus biologiques. Le système est optimisé pour détecter la fluorescence de cellules marquées avec un fluorophore excité à 488 nm. La troisième implémentation est basée sur le coupleur à petite gaine interne. Les contributions dans la conception et la fabrication de ce composant sont détaillées dans [25]. Les principaux résultats de microscopie confocale en réflectance et en fluorescence sont présentés ici. De plus, des images d'un montage tri-modal combinant l'OCT et l'imagerie confocale encodée spectralement en réflectance et en fluorescence est présenté. La quatrième implémentation est basée sur un coupleur d'injection, s'appuyant sur les principes des deux types de coupleurs présentés : il s'agit d'un coupleur permettant l'injection de signal multimode dans la gaine interne. Ceci permet de montrer la coagulation laser assistée par OCT sur des échantillons biologiques.

4.1 Système d'imagerie multimodale combinant l'OCT et la fluorescence

La version asymétrique du coupleur en fibre à double gaine (A-DCFC) présentée au chapitre 3 permet d'améliorer l'extraction du signal multimode à travers le coupleur tout en préservant le signal de cœur. Il s'agit d'une amélioration considérable des performances par rapport aux travaux rapportés dans la littérature. Le A-DCFC permet de combiner l'OCT et l'imagerie par fluorescence, car il est très efficace pour transmettre le signal OCT avec un minimum

de pertes, de même que le signal de fluorescence avec une grande surface de détection et une grande efficacité d'extraction. Un tel système d'imagerie multimodale a été réalisé au laboratoire et est présenté à la section 4.1.1 dans un contexte de système de table. Une sonde est ensuite intégrée au système afin de diminuer la taille de la tête d'imagerie. Cette première sonde est adaptée à l'analyse des trompes de Fallope et des organes gynécologiques. Une version similaire de ce système a été publiée dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Prof. David Sampson à University of Western Australia. Une autre sonde a été conçue pour être intégrée directement dans une aiguille hypodermique et pour exciter un autre fluorophore. Les travaux ont fait l'objet de deux articles : l'un comme quatrième auteure *Dual-modality needle probe for combined fluorescence imaging and three-dimensional optical coherence tomography* [99], et l'autre comme troisième auteure *Molecular imaging needles : dual-modality optical coherence tomography and fluorescence imaging of labeled antibodies deep in tissue* [96].

4.1.1 Conception du système

Le système complet doit combiner un système OCT à 1300 nm et un système d'imagerie par fluorescence. Pour une preuve de concept, nous allons employer des échantillons à l'aide de rhodamine 6g, un fluorophore commercial. Le pic d'excitation de ce fluorophore est de 530 nm. Le système OCT est modifié afin d'y greffer un module de fluorescence afin d'obtenir des données colocalisées et simultanées pour l'acquisition. Ce système est ainsi adapté à l'utilisation en contexte clinique, car il est plus rapide d'acquérir les deux modalités simultanément. L'analyse des échantillons est également grandement facilitée.

Le système OCT employé est constitué d'un laser à balayage en longueur d'onde MEMS VCSEL (Micro-Electro-Mechanical System Vertical-Cavity Surface-Emitting Laser) avec une longueur d'onde centrale de 1300 nm et une largeur de bande de 110 nm (Thorlabs, USA). Le laser est couplé à un interféromètre et à un module d'acquisition de données. La tête d'imagerie est placée dans le bras d'échantillon d'un interféromètre de type Michelson. La lentille objectif (LSM03 5×, Thorlabs, USA) possède une longueur focale effective de 36 mm. Les résolutions latérales de ce système sont d'au plus 25 μm et la résolution axiale est de 15 μm dans le champ de vue. Le champ de vue couvre une région de 10 mm \times 10 mm \times 5 mm. La source à balayage possède une puissance de sortie moyenne de 35 mW et une vitesse de balayage de 100 kHz. Le module d'acquisition des données permet un affichage d'images en temps réel et une acquisition tridimensionnelle rapide de 17 s pour un volume de 10 mm \times 10 mm \times 5 mm contenant 1024 \times 1024 \times 512 pixels. L'affichage d'un volume sauvegardé prend environ 3 min.

Les fibres employées sont monomodes dans cette plage de longueur d'onde. La SMF28 (Cor-

ning USA) est employée pour fabriquer les nouveaux composants tout-fibre qui permettent de convertir le montage en système multimodal. La figure 4.1 présente le schéma du nouveau montage d'imagerie multimodale. Pour injecter le signal d'excitation de fluorescence, un coupleur multiplexeur a été développé. Un coupleur à fibre à double gaine asymétrique est également intégré au montage afin d'extraire le signal de fluorescence collecté de l'échantillon par la gaine interne de la fibre. La fibre allant à la tête d'imagerie est également une fibre à double gaine. L'optique de la tête d'imagerie a été remplacée par un collimateur (F200-APC-C, Thorlabs, USA) et une lentille objectif (AC254-040-B, Thorlabs, USA). Enfin, la dernière partie du système de fluorescence est une série de filtres pour rejeter le laser d'excitation et un détecteur (femtowatt receiver 2151, New Focus, USA) ou un spectromètre (Maya2000, Ocean Optics, USA). L'acquisition de données se fait au moyen du logiciel ThorImage pour le système OCT et d'un logiciel maison en LabView pour la fluorescence.

4.1.2 Caractérisation des performances d'imagerie

Le coupleur en fibre double gaine employé ici est un composant considéré comme «asymptotiquement parfait», en ce sens où il extrait plus de 90 % du signal multimode tout en préservant plus de 90 % du signal monomode à 1300 nm. Il s'agit d'une amélioration en extraction du signal multimode par rapport aux résultats rapportés dans la littérature, qui tournent autour de 70 % pour des transmissions monomodes similaires (travaux présentés au chapitre 3 dans l'article *Double-clad fiber couplers for endoscopy*). Ce composant a bénéficié d'un raffinement au niveau de la méthode de fabrication afin de lui permettre de passer la barre des 85 % d'extraction multimode tout en employant de fibres multimodes à diamètres standards de 125 μm ou 250 μm faciles à manipuler. L'inclusion des trois nouveaux concepts de design du coupleur à petite gaine interne, dont la double asymétrie, a permis d'atteindre cette amélioration substantielle des performances pour les coupleurs à grande gaine interne.

Les performances d'imagerie du système ont été caractérisées par les métriques de transmission en puissance, de résolutions latérales, de résolution axiale et de puissance à l'échantillon. Les résolutions latérales ont été mesurées avec une cible de résolution USAF1951 en prenant la réponse d'étalement de bord. Cette même cible a été imagée en ajoutant une lamelle fluorescente sur la cible pour obtenir les valeurs de résolutions latérales du système en fluorescence. Les valeurs mesurées sont présentées dans le tableau 4.1. Il est à noter que les valeurs de transmission sont mesurées à l'échantillon et normalisées par la puissance de sortie du laser. L'efficacité de collection de la fluorescence, de l'échantillon au détecteur, est de 24.3 %. La majorité de cette perte provient de la lentille de collection et du collimateur (30 % de perte par passage dans le système collimateur-lentille). Une lentille et un collimateur avec

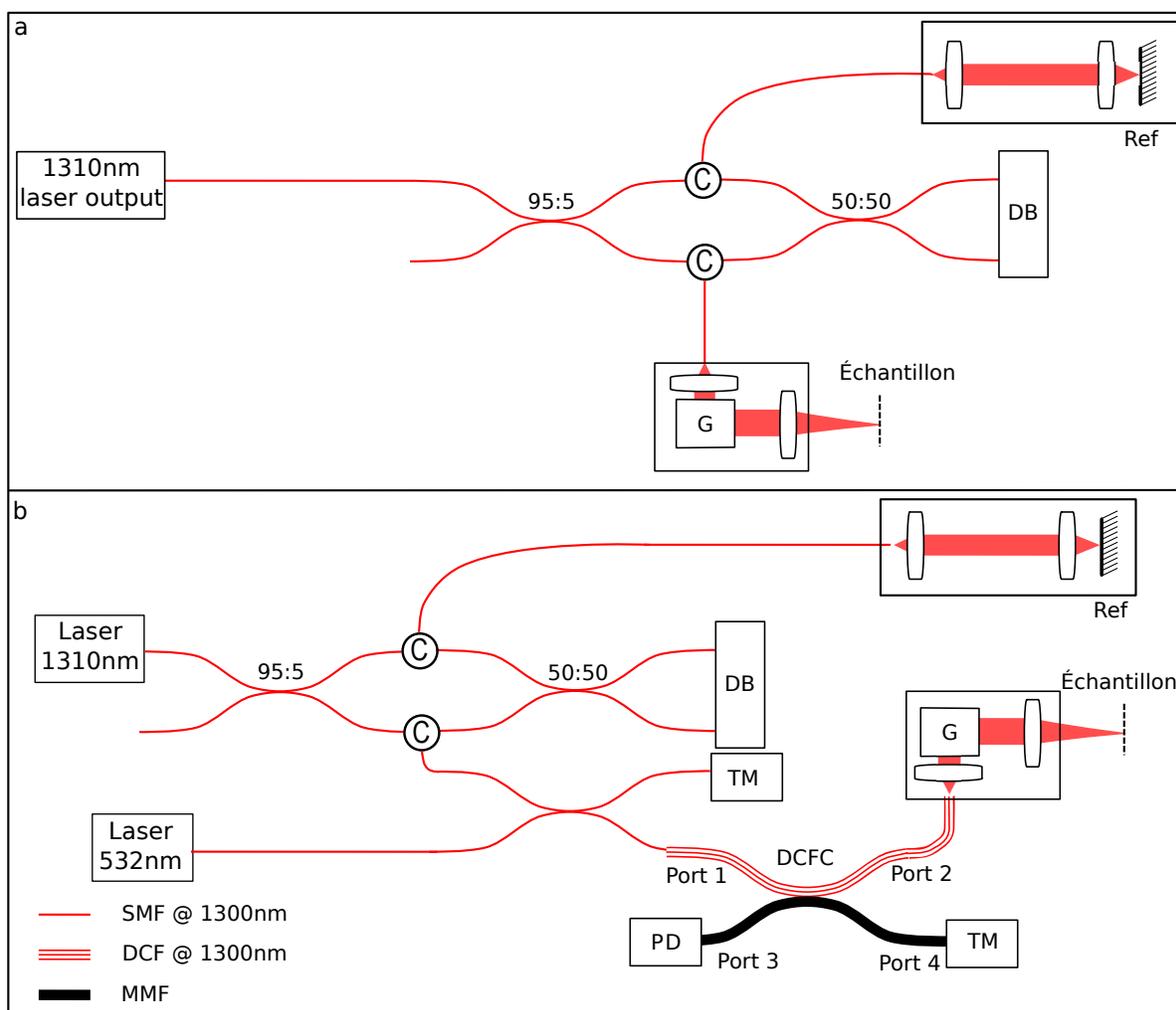


Figure 4.1 Schéma du système multimodal OCT et fluorescence en système de table. (a) présente un schéma du système OCT de base et (b) présente le système modifié pour y inclure l'imagerie par fluorescence. Ref : bras de référence, DB : détecteur balancé, SMF : fibre monomode, DCF : fibre à double gaine, MMF : fibre multimode, PD : photodétecteur et TM : terminaison morte.

des revêtements antiréflexion appropriés dans le visible permettraient de diminuer les pertes. Cette amélioration s'effectuerait au détriment du signal OCT (les réflexions sur la lentille objectif seraient très importantes et créeraient des artefacts d'auto-interférence dans le bras d'échantillon). Le compromis réalisé est une lentille avec un revêtement de transmission centrée à 800 nm, qui offre à la fois une excellente transmission à 1300 nm (pour le signal OCT) et une transmission correcte dans le visible (signal d'excitation de fluorescence). Ce compromis serait plus approprié si l'imagerie par fluorescence s'effectuait vers 800 nm, mais peu de fluorophores y sont disponibles. La majorité des fluorophores disponibles couvrent la région

visible du spectre. Seule l'*Indocyanine Green* est disponible dans l'infrarouge et approuvé pour l'utilisation clinique. Son action n'est cependant pas ciblée (une fois métabolisé, le fluorophore se distribue dans tous le corps). De plus, peu de processus d'auto fluorescence dans le proche infrarouge sont connus sur les tissus humains. Les résolutions latérales présentées au tableau 4.1 ont été mesurées dans l'air au centre du champ de vue. Il est à noter que le doublet achromatique détériore plus rapidement la résolution vers les bords du champ de vue que la lentille objectif du système OCT commercial.

Tableau 4.1 Performances du système de table multimodal OCT et fluorescence

Métrique	OCT SM	OCT DCF	Fluo DCF
Résolution latérale (Δx)	20 μm	17 μm	13 μm
Résolution latérale (Δy)	20 μm	17 μm	13 μm
Résolution axiale (air) (Δz)	16 μm	16 μm	N/A
A-Line/s	100 000	100 000	N/A
Profondeur d'imagerie*	12 mm	12 mm	N/A
Transmission	37.5 %	35 %	17 %
Puissance à l'échantillon	15 mW	14 mW	1.7 mW

La sensibilité de détection du système en fluorescence est ensuite mesurée. Pour ce faire, plusieurs échantillons de concentrations différentes de rhodamine ont été préparés par dilutions successives avec de l'eau distillée (pH 7). Les concentrations vont de 10 nmol à 2.5 mmol. Les résultats sont présentés à la figure 4.2. Seules les faibles concentrations autour du seuil de détection ont été placées sur le graphique, de 100 nmol à 50 μmol . Un échantillon d'eau distillée a également été mesuré. La puissance à l'échantillon a été réglée à 220 μW .

On peut ainsi établir la limite de détection du système en fluorescence en prenant le point de perte de linéarité de la courbe d'intensité mesurée en fonction de la concentration. Ce seuil de détection est de 700 nmol.

Conclusion : Les composants développés permettent un système tout-fibre efficace. Les valeurs de puissance laser nécessaires pour illuminer l'échantillon sont plus raisonnables pour une utilisation en clinique en raison des faibles pertes dans le système. En effet, passer de 98 % de pertes à moins de 50 % permet d'obtenir des puissances plus raisonnables afin de conserver autour de 1 mW à l'échantillon. Ceci permet de passer d'un laser ayant une puissance de sortie de 500 mW à un laser de 20 mW. Il est également à noter qu'il est possible d'injecter soit plusieurs diodes d'illuminations individuellement pour créer une illumination multibande, ou simplement d'illuminer avec une source blanche, les deux options sont possibles avec le type de système présenté. Ce type d'illumination permet de combiner à l'OCT des modalités d'imagerie moléculaire comme la spectroscopie, la fluorescence ou l'imagerie Raman.

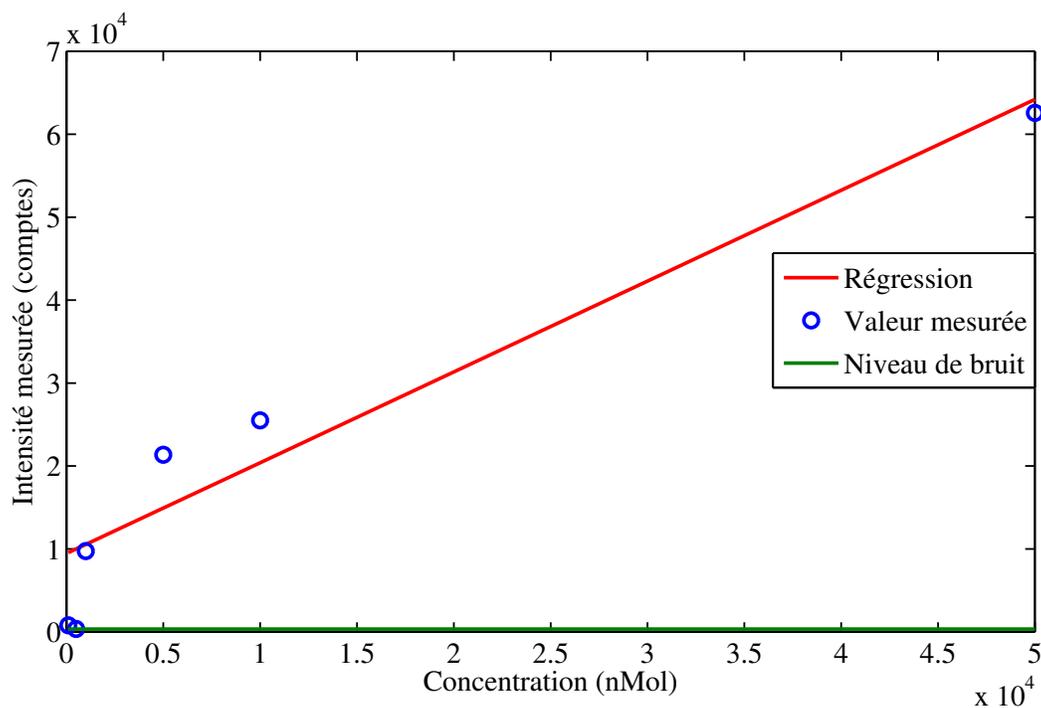


Figure 4.2 Sensibilité du système de fluorescence mesurée avec une série de concentrations de rhodamine 6g en solution dans l'eau distillée. La tendance linéaire est interrompue à 700 nmol.

4.1.3 Résultats d'imagerie sur modèles animaux

Pour obtenir un fantôme d'imagerie proche de la réalité clinique et répliquer au mieux les tissus humains, des échantillons de trompes et de cornes utérines de porc ont été employées. Des injections de rhodamine ont ensuite été effectuées pour simuler des sites préférentiels de fluorescence. Ce type d'acquisition permet d'obtenir un volume tridimensionnel d'information morphologique avec l'OCT et une carte de fluorescence selon la présence de fluorophore.

La figure 4.3 présente un échantillon de trompe de Fallope de porc repliée. Le volume OCT acquis est présenté en (a) comme un rendu 3D en échelle de gris et la carte de fluorescence acquise lui est surimposée en échelle de rouge. Une première injection de solution saline a été réalisée dans la trompe de gauche (marquée S) et une seconde injection de solution de rhodamine a été réalisée dans la trompe de droite (marquée R). Un peu de solution fluorescente a diffusé dans le péritoine (flèches). Comme le péritoine est en surface, le signal de fluorescence est beaucoup plus intense que celui provenant de l'injection dans la trompe de droite. En

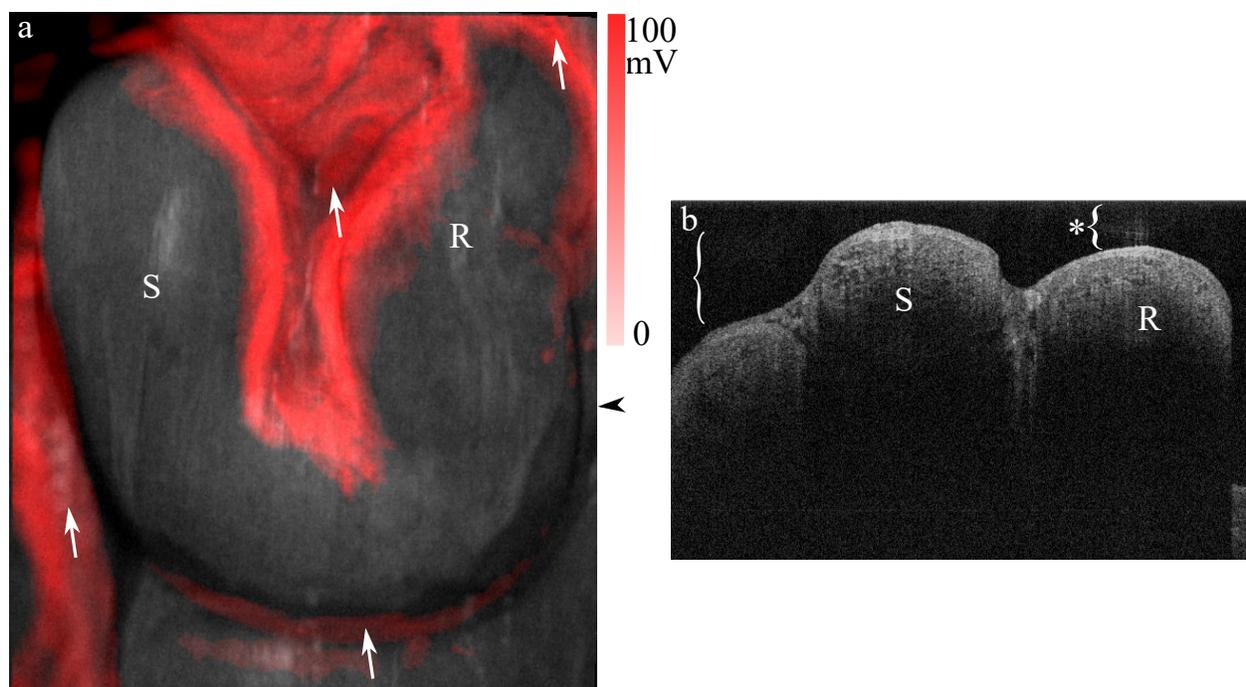


Figure 4.3 Imagerie multimodale d'échantillons de porc avec le système de table. Le volume OCT en (a) est présenté dans un rendu 3D en échelle de gris alors que l'acquisition de fluorescence est présentée en échelle de rouge. Une injection de salin a été pratiquée dans la trompe marquée S et une injection de solution de rhodamine a été pratiquée dans la trompe marquée R. Un peu de rhodamine a également diffusé dans le péritoine (flèches). L'image (b) montre une section transverse en OCT issue du plan indiqué par la tête de flèche noire. Les régions d'injections sont identifiées avec la même convention qu'en (a). Les accolades montrent des régions où des artefacts d'imagerie sont présents. Il s'agit de duplicata de l'image principale causés par l'utilisation de la fibre DCF. L'accolade avec l'astérisque (*) montre l'artéfact replié et donc un peu mieux visible. La région imagée en (a) mesure 3 mm×3 mm.

effet, les tissus absorbent davantage dans la plage visible du spectre. Une faible proportion du signal d'excitation se rend à l'intérieur de la trompe et le faible signal de fluorescence émis est en partie absorbé avant sa détection par le système. Il est à noter que les filtres produisent 12 densités optiques sur la région de collection de la fluorescence. Des spectres de fluorescence ont été acquis pour valider la réjection complète du laser d'excitation et le signal de réflectance est effectivement complètement filtré (l'intensité résultante du laser d'excitation est comparable au niveau de bruit du système). La figure 4.3(b) montre une section transverse issue du volume OCT au plan indiqué par la tête de flèche noire. Les deux sites d'injections sont identifiés avec la même convention qu'en (a). Les deux segments de trompe sont visibles sous le péritoine. Des accolades montrent l'emplacement d'artefacts d'imagerie

causés par l'emploi de fibre DCF. Ces artéfacts se manifestent comme des duplicata de l'image principale présentant une plus faible intensité. L'accolade marquée d'un astérisque montre l'artéfact replié et donc plus visible. L'intensité et la position de ces artéfacts dépendent de la réflectivité de l'échantillon imagé, de même que du laser employé et de la longueur de fibre DCF dans l'interféromètre.

4.1.4 Passage au système endoscopique

Dans le cadre de l'application clinique d'imagerie des trompes de Fallope, une sonde de petit diamètre permettrait d'imager la surface interne des trompes. La sonde présentée ici est basée sur les travaux présentés au chapitre 6. Ce chapitre détaille le cahier de charge pour une sonde endoscopique adaptée à l'imagerie des trompes de Fallope, de même que le design optique de la sonde et la caractérisation des performances d'imagerie. La fibre monomode a été remplacée par une fibre à double gaine et le miroir en or remplacé par un miroir en argent afin d'étendre la plage de réflectivité dans le visible. Un résumé des caractéristiques d'imagerie OCT à 1300 nm de cette sonde est présenté au tableau 4.2 et comparé aux requis de sonde du chapitre 6. La transmission dans le visible de la sonde est de 82 %.

Tableau 4.2 Validation de l'atteinte des critères quantitatifs pour la sonde multimodale

Métrique	Performances visées	Sonde fixe DCF
Résolution latérale (Δx)	60 μm	13 μm
Résolution latérale (Δy)	60 μm	15 μm
Résolution axiale (air) (Δz)	16 μm	16 μm
Zone de Rayleigh	500 μm à plus de 1 mm	2 mm
Ouverture numérique	≤ 0.1	0.024
Transmission	$\geq 75\%$	90 %
Collection	$\geq 60\%$	83 %
Diamètre visé	1 mm	1.2 mm
Longueur	10 cm	15 cm

La courbe de sensibilité du système multimodal endoscopique a été mesurée avec les mêmes concentrations de rhodamine (R6g) que le système de table. Cette courbe est présentée à la figure 4.4. La puissance à l'échantillon a été réglée à 200 μW pour comparer avec les résultats obtenus avec le système de table. Les concentrations présentées à la figure 4.4 s'étendent de 10 nmol à 10 μmol . Une fois de plus, un échantillon d'eau a été mesuré comme contrôle.

La limite de détection du système en fluorescence est établie comme le point de perte de linéarité de la courbe d'intensité mesurée en fonction de la concentration. On obtient 40 nmol. Des concentrations plus faibles peuvent être détectées, mais l'erreur sur la concentration

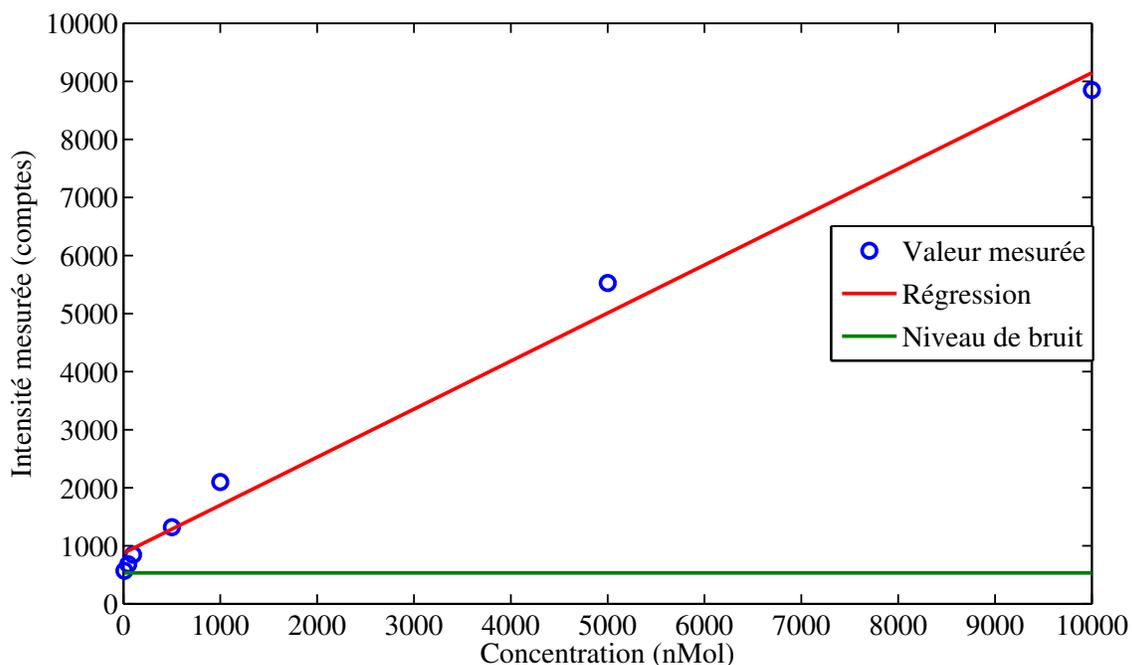


Figure 4.4 Sensibilité du système de fluorescence mesurée avec une série de concentrations de rhodamine 6g.

calculée ne sera pas constante.

Les deux systèmes OCT et fluorescence ont été employés pour imager des échantillons animaux frais injectés de rhodamine. Dans les deux cas, la qualité des images est peu affectée par le passage au système multimodal par rapport au système OCT initial, autant pour le système de table que pour le système endoscopique. Pour le système d'imagerie par fluorescence, il est possible d'acquérir une carte d'intensité de fluorescence. Pour chaque ligne-A acquise en OCT, la puissance de fluorescence est mesurée. Ceci donne la valeur de fluorescence intégrée sur la profondeur de la ligne-A. Ainsi, une carte d'intensité peut être superposée au volume OCT produit. En remplaçant un détecteur de puissance par un spectromètre, des spectres de rhodamine ont été acquis pour chaque ligne-A au lieu d'une puissance. Dans le cas de la rhodamine 6g, le maximum du spectre change en fonction de la concentration du fluorophore. Il est ainsi possible de mieux interpréter la composition des tissus. L'OCT aide l'interprétation des images grâce à son contraste morphologique et permet d'identifier les structures présentes. Le spectre de la rhodamine permet de mieux discerner la quantité de fluorophore

présente. Avec une carte de puissance, pour une mesure de puissance donnée, il est difficile de distinguer le cas d'un fluorophore en grande concentration enfui profondément dans le tissu ou un fluorophore moins concentré, mais plutôt localisé en surface. La variabilité du spectre avec la concentration est donc une caractéristique intéressante de la rhodamine 6g.

La deuxième implémentation de système d'imagerie multimodale combine l'OCT et l'imagerie par fluorescence excitée à 488 nm. Un autre exemple de sonde multimodale basée sur la même géométrie cylindrique et l'assemblage de fibres optiques permet d'obtenir des résultats comparables d'OCT et d'imagerie par fluorescence. La sonde est plutôt encapsulée dans une aiguille hypodermique plutôt que dans un capillaire de verre. Il s'agit d'un système d'imagerie similaire, à la différence que la longueur d'onde d'excitation de la fluorescence est 488 nm avec un laser à argon. Deux publications présentent ces travaux, la première où j'ai contribué comme 4e auteur [99] et la seconde comme 3e auteure [96]. Un fantôme de géométrie cylindrique a été imagé avec la sonde pour montrer le gain d'information apporté par la fluorescence des tissus. La figure 4.5 montre un schéma de la structure du fantôme. Il s'agit d'un canal entouré d'une matrice de silicone diffusante grâce à des inclusions de TiO_2 . Cette matrice diffusante contient également trois fils de nylon, le premier agissant comme contrôle non fluorescent et les deux autres étant identiques, mais disposés à différentes distances du canal central. La sous-figure 4.5(a) présente un schéma tridimensionnel du fantôme, alors qu'une vue en coupe transverse est présentée en 4.5(b), avec les dimensions des principales composantes d'intérêt. Les sous-figures 4.5(c) et (d) présentent la reconstruction tridimensionnelle et en coupe transverse d'une acquisition OCT et fluorescence du fantôme. Tel qu'attendu, l'image OCT est uniforme, avec des régions sombres dans le canal central et dans les fils de nylon, étant donné qu'il n'y a pas de diffuseurs dans ces régions. L'acquisition en fluorescence ne présente pas de signal dans la matrice de silicone ni dans le fil de nylon contrôle. Une intensité de fluorescence plus élevée est détectée dans la région du fil le plus rapproché du canal central. Le fil le plus rapproché de la fenêtre d'imagerie est situé à environ 880 μm alors que le fil fluorescent plus éloigné est situé à environ 1.33 mm. Une différence d'intensité de 9.9 dB distingue les deux fils sur la carte de fluorescence. Cette valeur est consistante avec la décroissance d'efficacité de collection de la sonde en fonction de la profondeur mesurée à 22.7 dB mm^{-1} , ce qui donne une valeur attendue de 10 dB de différence de signal pour les deux positions de fils. Il est à noter que les images OCT permettent l'interprétation des images de fluorescence, dans le cas présent en permettant de distinguer entre deux éléments identiquement fluorescents à des profondeurs différentes par rapport à deux éléments de concentrations différentes à une même profondeur.

Cette sonde a ensuite été appliquée à la détection du cancer du foie. La figure 4.6 présente des expériences d'imagerie de tissus marqués d'anticorps fluorescents par immunohistochimie. Les

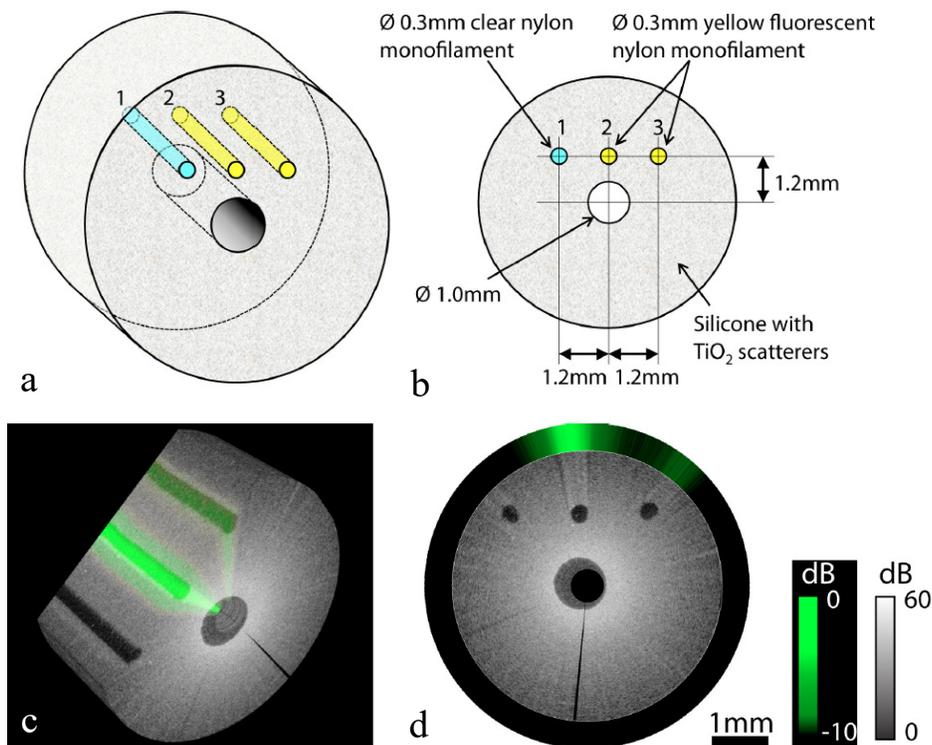


Figure 4.5 Imagerie multimodale d'un fantôme en géométrie cylindrique. (a) et (b) présentent respectivement un schéma tridimensionnel du fantôme et une vue en coupe transverse. Le fantôme est constitué d'une matrice de silicone avec des inclusions de TiO_2 , deux fils de nylon fluorescents et un fil contrôle. Les dimensions caractéristiques du fantôme sont données en (b). (c) présente une reconstruction tridimensionnelle d'une acquisition OCT et fluorescence du fantôme. Le volume OCT est affiché en échelle de gris et la carte de fluorescence associée est présentée en échelle de vert. (d) montre une coupe transverse issue de l'acquisition tridimensionnelle. Tel qu'attendu, le silicone est uniforme vu à l'OCT et le canal central et les fils de nylon apparaissent comme des creux noirs dus à l'absence de diffuseurs. La carte de fluorescence montre une intensité de fluorescence plus élevée dans le fil plus proche du canal central (9.9 dB plus intense). La barre d'échelle présente 1 mm. La figure est modifiée de [96].

sous-figures 4.6 (a) à (f) présentent des images issues de sections de foie humain marquées, alors que les sous-figures 4.6 (g) et (h) montrent des acquisitions multimodales dans un foie intact de souris marqué par fluorescence. Le détail du protocole de marquage fluorescent pour les spécimens humains et murins est donné à l'annexe C, de même que le protocole d'imagerie. Les échantillons humains sont déposés sur une lame de microscope et couverts d'une microlamelle. Les images acquises avec la sonde aiguille ont été comparées avec les images (fig. 4.6(f)) issues d'un microscope grand champ en fluorescence (IX2-ILL100 Inverted

Microscope, Olympus Corporation, USA) avec un objectif $4\times$ (UPlanFLN $4\times/0.13$, Olympus Corporation, USA). Les figures 4.6(a) et (b) présentent les acquisitions OCT et fluorescence respectivement du spécimen de foie humain en champ large. Les figures 4.6(c) et (d) montrent les agrandissement ($4\times$) des régions pointillées des deux sous-figures (a) et (b). La figure 4.6(e) montre le composite des deux images (c) et (d). Des canaux biliaires sont identifiés, de même que des cellules progénitrices du foie (encadré rose, agrandissement $10\times$). Les canaux biliaires sont identifiables par leur marquage fluorescent, mais également par leur position dans une corde de tissu conjonctif présentant une plus faible rétrodiffusion du signal OCT. Les cellules progénitrices quant à elles sont localisées dans le parenchyme hépatique, mais non visibles sur les images OCT.

Les sous-figures 4.6(g) et (h) présentent deux sections transverses générées lors d'une même acquisition tridimensionnelle dans un foie de souris. Avec la même convention de présentation que la figure 4.5, la carte d'intensité de fluorescence est présentée en anneau autour de l'image OCT en radar. Le canal biliaire se présente comme une région de tissu conjonctif moins diffusant sur l'image OCT (carte radar en gris). La fluorescence des cellules épithéliales liées aux anticorps fluorescents est présente sur la région correspondante de la carte de fluorescence (anneau en intensité de vert). Le modèle de souris employé ne développe pas de cellules progénitrices du foie. Les régions fluorescentes plus rapprochées de la sonde présentent un signal plus fort, car la sonde est plus efficace à collecter ce signal, mais également parce que les tissus n'ont pas diffusé ou absorbé le signal d'intérêt. En travaillant dans une plage de longueurs d'onde visible, l'atténuation des tissus biologiques est importante par rapport aux longueurs d'onde plus grande, comme dans le proche infrarouge. Une façon de minimiser cet inconvénient serait de travailler avec un marqueur fluorescent dans le proche infrarouge, comme la gamme d'AlexaFluor proche infrarouge (comprenant des longueurs d'onde d'excitation de 660 nm, 680 nm, 700 nm, 750 nm et 790 nm). Cette gamme de longueurs d'onde offre également l'avantage de générer moins d'autofluorescence naturelle des tissus, en plus d'être approuvée pour l'utilisation sur des modèles animaux.

4.2 Imagerie confocale en réflectance et en fluorescence

La troisième implémentation d'imagerie multimodale est réalisée avec le coupleur à petite gaine interne. Ce coupleur a été intégré dans un montage de microscopie confocale à 785 nm permet de faire de la détection partiellement cohérente de façon efficace. Le montage peut aussi être employé en mode de détection pleinement cohérente en utilisant un coupleur équi-partiteur de puissance en fibre monomode à 800 nm. Des échantillons de tissus porcins ont été imagés avec le microscope dans les deux configurations de détection à des fins de comparaison.

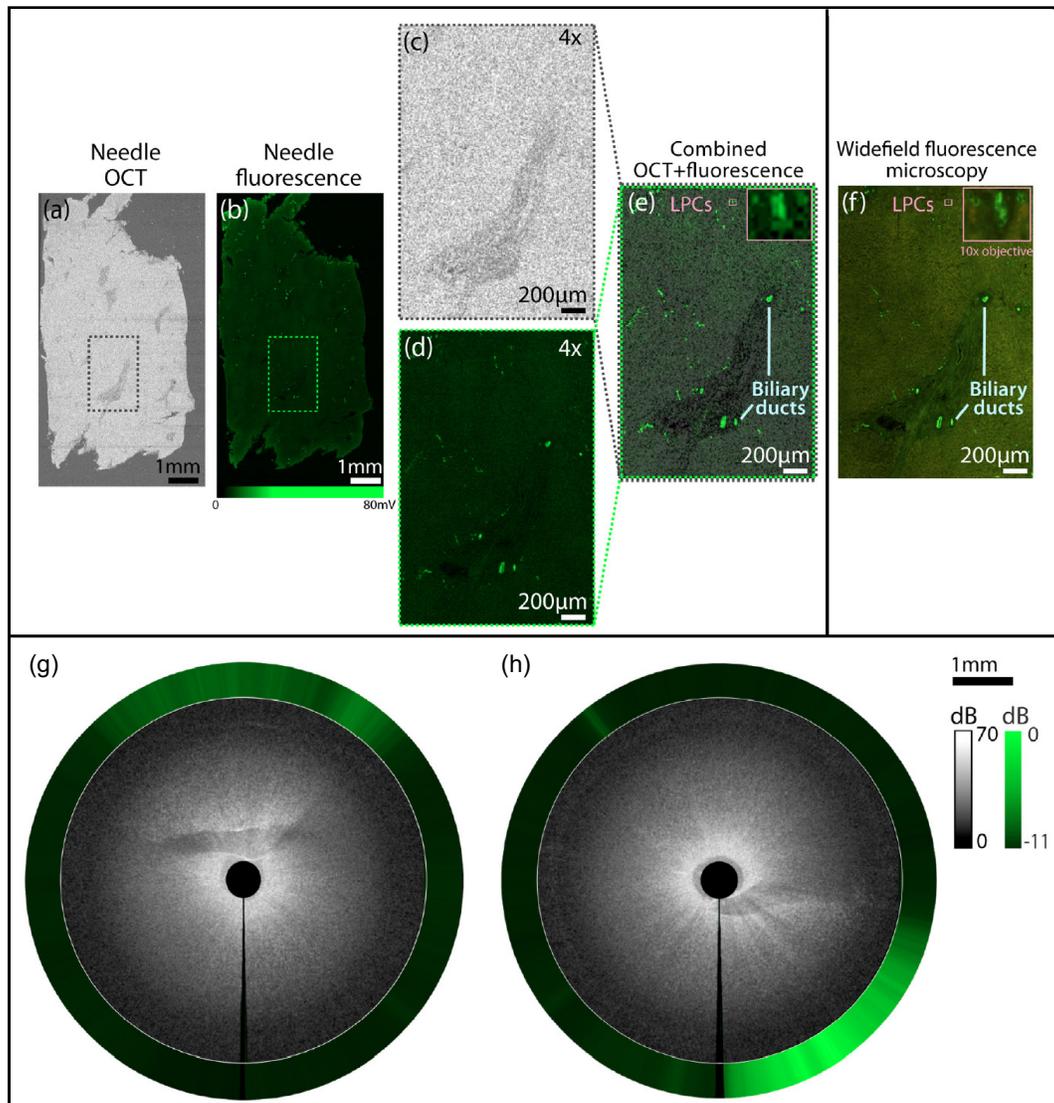


Figure 4.6 Imagerie multimodale de coupes de spécimens de foie humain et d'un foie entier de souris avec marquage fluorescent réalisé avec la sonde aiguille. (a) et (b) présentent les acquisitions grand champ en OCT et en fluorescence respectivement d'une tranche de $20\ \mu\text{m}$ de foie humain marqué par immunohistochimie. (c) et (d) montrent les agrandissements (échelle $4\times$) des encadrés pointillés en (a) et (b). (e) montre l'image composite générée en combinant les deux images (c) et (d), avec un agrandissement (encadré rose) équivalent à $10\times$ pour montrer une cellule progénitrice du foie. Les canaux biliaires sont également identifiés. Cette image se compare à celle prise par un microscope en fluorescence commercial (f). (g) et (h) montrent deux sections transverses acquises au cours d'une même acquisition tridimensionnelle. La fluorescence est due aux cellules épithéliales (échelle de vert) des canaux biliaires, ces derniers étant visibles comme des régions plus sombres sur l'image OCT (échelle de gris). La figure est modifiée de [96]

La figure 4.7 compare des images de tissus biologiques acquises séquentiellement en utilisant un coupleur équilibré de puissance en fibre monomode (colonne de gauche) et le sDCFC (colonne de droite). L'échantillon est constitué de tissu de thyroïde de porc fraîchement excisé et imagé à 1 image/seconde. La luminosité et le contraste des images ont été ajustés séparément pour permettre la comparaison malgré les intensités différentes. Les encadrés montrent l'effet de la réduction du contraste de tavelure dans l'imagerie des tissus biologiques. L'encadré du haut (agrandi en 4.7(c) (Détection cohérente, CD) et 4.7(d) (Détection partiellement cohérente, PCD) respectivement) montre une structure (flèche) qui est le résultat du bruit de tavelure car sa texture change entre l'image de gauche et celle de droite. Les structures pointées par les flèches dans l'encadré du bas (agrandi en 4.7(e) (CD) et 4.7(f) (PCD)) ne sont pas de grains de tavelure mais des éléments propres à la cellule, car ils sont toujours présents lorsque le contraste de tavelure diminue.

Le coupleur permet également d'employer le contraste de fluorescence en plus du contraste de réflectance en imagerie confocale. En injectant un laser d'excitation de fluorescence dans le système et en installant des filtres sur la ligne de détection, le microscope peut acquérir la fluorescence de l'échantillon à cette gamme de longueurs d'onde. L'emploi d'un filtre dichroïque avant la détection peut permettre d'acquérir les canaux de réflectance et de fluorescence simultanément. Il est également possible, si l'application le requiert, de multiplexer plusieurs signaux d'excitation de fluorescence et de séparer spectralement la sortie en plusieurs lignes de détection et ainsi acquérir la fluorescence de plusieurs fluorophores à la fois. Enfin, un détecteur de puissance peut être remplacé par un spectromètre pour acquérir des spectres à la place d'une intensité par pixel. Le gain en signal collecté et en efficacité d'illumination grâce aux coupleurs à petite gaine interne est tel que ces schémas de détection deviennent possibles. De plus, l'équipement nécessaire est simplifié : les tubes photomultiplicateurs ne sont plus nécessaires comme dans les microscopes confocaux commerciaux, de simples photodiodes suffisent comme détecteurs. Un exemple d'acquisition combinée de fluorescence et de réflectance est présenté à la figure 4.8. Une lame de microscope avec une couche de cellules confluentes a été imagée (FluoCells prepared slide #6, ThermoFisher Scientific, USA). Les mitochondries sont marquées avec AlexaFluor555 goat anti-Mouse IgG (conjugué à l'anticorps monoclonal inhibiteur de protéine anti-OxPhos Complex V). L'échantillon est un standard de marquage cellulaire préparé avec des cellules fibroblaste de peau de cerf. La figure 4.8(a) présente une cellule de la lame imagée en microscopie confocale en réflectance à 780 nm. On peut y voir l'aspect filamenteux caractéristique des cellules fibroblastes. La structure elliptique entourée d'un cercle noir correspond au noyau de la cellule principale. Cette cellule est rattachée à la queue d'un autre fibroblaste (structure linéaire diagonale dans la partie gauche de l'image). La figure 4.8(b) présente l'acquisition de fluorescence réalisée

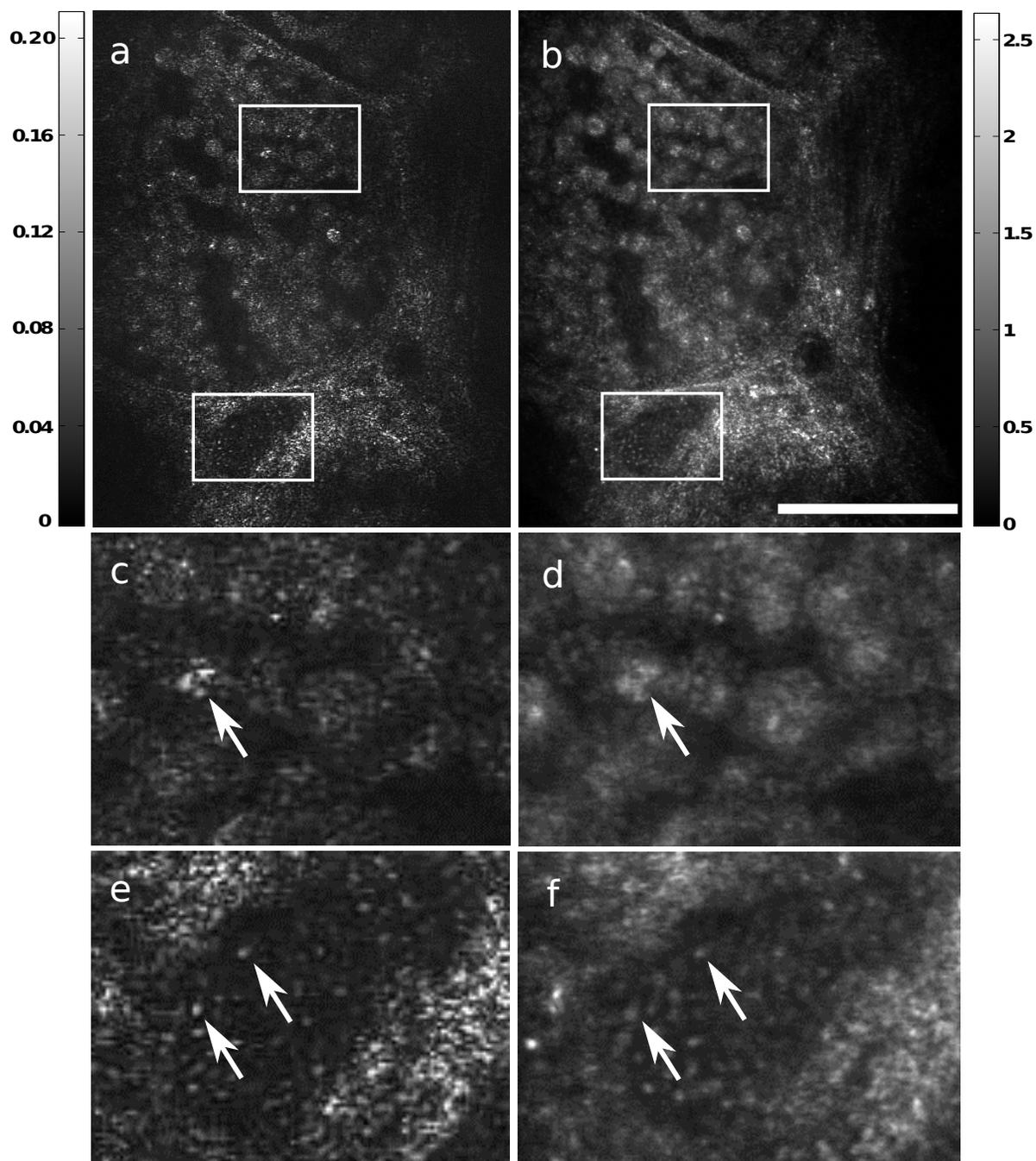
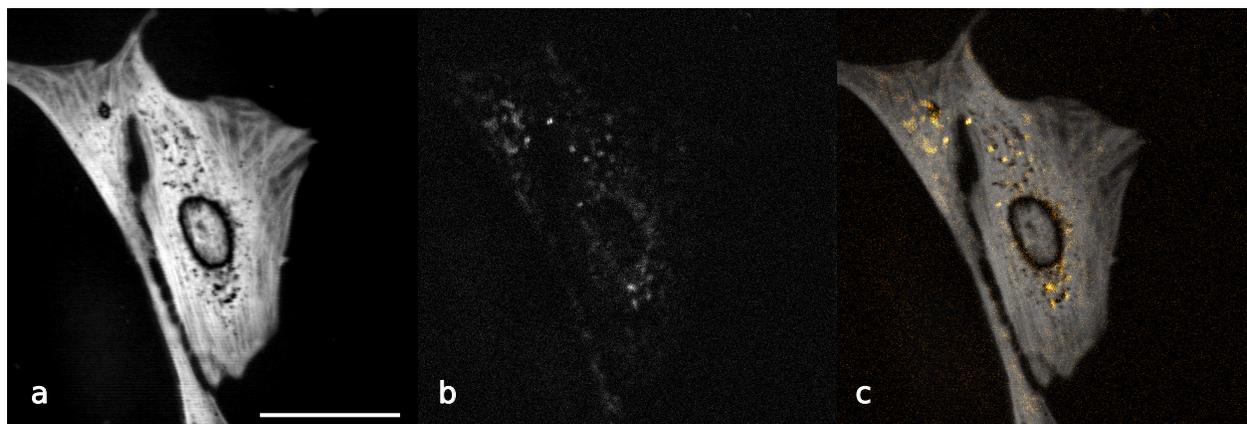


Figure 4.7 Images de tissu de thyroïde porcine en détection cohérente (colonne de gauche) et partiellement cohérente (colonne de droite). (c) et (d) montrent des agrandissements des encadrés du haut des images (a) et (b). Les flèches pointent une structure dont la texture change lorsque le contraste de tavelure décroît. (e) et (f) montrent des agrandissements des encadrés du bas des images (a) et (b). Les flèches pointent des points brillants qui sont toujours visibles lorsque le contraste de tavelure décroît. La barre d'échelle représente $100\ \mu\text{m}$. Les échelles d'intensité sont en unités arbitraires.

sur le même champ de vue, avec un laser d'excitation à 532 nm. L'émission a été filtrée pour ne conserver que la puissance contenue dans les longueurs d'onde de plus de 550 nm, avec 11 densités optiques de filtrage. Les mitochondries apparaissent comme de petites pochettes plus lumineuses dans le cytoplasme autour du noyau. La figure 4.8(c) présente l'image composite des cartes de réflectance et de fluorescence de la cellule. Cette image permet de confirmer que les mitochondries marquées sont bien localisées autour du noyau et dans le cytoplasme.



s

Figure 4.8 Images en microscopie confocale à l'aide du sDCFC ((a) réflectance, (b) fluorescence et (c) composite) de cellules fibroblastes où les mitochondries ont été marquées avec une molécule fluorescente (AlexaFluor555 goat anti-Mouse IgG). La barre d'échelle représente 100 μm .

Une publication subséquente (comme 3e auteure) a également fait état de l'impact d'un tel coupleur dans un montage d'imagerie préclinique [127]. Cette implémentation emploie le coupleur pour réaliser de la microscopie confocale par encodage spectral en réflectance (SECM). Le laser d'excitation employé couvre la plage spectrale de 760 nm à 800 nm. Le microscope présenté permet également d'imager les échantillons par fluorescence encodée spectralement (SEFI) et par OCT. Les trois modalités d'imagerie sont simultanées et colocalisées dans l'échantillon, avec des vitesses d'imagerie en temps réel (10 images par seconde). La figure 4.9 présente un exemple d'imagerie avec ce système, réalisé sur le bout d'un doigt. Les sous-figures 4.9(a) et (b) présentent une cible de résolution acquise avec les sous-systèmes SECM et OCT respectivement. La figure 4.9(c) présente l'image composite de trois fils à coudre trempés dans une solution fluorescente. Le fil de gauche est un contrôle trempé dans l'eau distillée, le fil du centre est trempé dans une solution d'AlexaFluo790 à 6.5 μmol et le fil de droite est trempé dans l'AlexaFluo790 à 65 μmol . La carte de réflectance est présentée sur une échelle de gris alors que la carte de fluorescence est présentée sur une échelle verte. La

barre d'échelle est $50\ \mu\text{m}$. Les sous-figures (d) et (e) présentent un doigt en SECM et en OCT respectivement. La ligne rouge montre la projection du plan d'imagerie OCT dans le champ de vue confocal, alors que la ligne bleue montre la projection du plan d'imagerie SECM dans le champ de vue OCT. La flèche pointe un canal sudoripare (barre d'échelle : $100\ \mu\text{m}$).

4.3 Problématique d'injection multimode

La quatrième implémentation d'imagerie multimodale nécessite une variation sur la conception du coupleur en fibre à double gaine. La problématique d'injection multimode est hautement similaire à la problématique d'extraction de signaux, en ce sens où il faut interagir avec la gaine interne sans coupler dans la gaine externe et sans perturber le signal de cœur. Ce type de coupleur se prédit comme la figure 3.4, avec le ratio $\frac{G_3}{G_1}$ qui tend vers 0 quand la transmission tend vers 1. Il est donc à conclure qu'il est préférable d'injecter d'une petite gaine vers une grande gaine, tout comme il est préférable d'extraire d'une gaine de plus petite taille vers une gaine de plus grande taille. Les résultats du chapitre précédent et la nouvelles méthode de design présentée dans ce chapitre ?? permettent de réaliser des composants d'injection efficaces, tout en préservant le signal de cœur. Les résultats de ce type de coupleur, de même qu'une application qui combine l'OCT avec de la coagulation par laser, ont été publiés (3e auteure) [128].

La figure 4.10 présente un exemple de coagulation laser assistée par OCT. Les deux processus sont colocalisés dans la même fibre optique grâce au coupleur d'injection à double gaine. Le laser de coagulation à $1436\ \text{nm}$ est injecté en régime multimode à partir d'une fibre de $50\ \mu\text{m}$ de diamètre, tandis que l'imagerie OCT s'effectue par le cœur de la fibre double gaine à une longueur d'onde centrale de $1315\ \text{nm}$. Les sous-figures 4.10(a) à (d) montrent le processus de coagulation à basse énergie ($113\ \text{mW}$ moyen ou $5.7\ \text{mJ}$ par impulsion), alors que les sous-figures 4.10(e) à (h) montrent la même expérience à plus haute énergie ($172\ \text{mW}$ moyen ou $8.6\ \text{mJ}$ par impulsion). Les figures 4.10(a) et (e) montrent une image OCT en profondeur de la région de l'œsophage de porc où la coagulation prend place (flèche blanche). Les figures 4.10(c) et (g) montrent l'image OCT en profondeur après le processus de coagulation, le site coagulé est indiqué par la flèche blanche. Les figures 4.10(b) et (f) montrent l'OCT en mode-M, où la même position dans l'échantillon (ligne-A, axe vertical) évolue au cours du temps (axe horizontal) lorsque le laser de coagulation irradie l'échantillon. Les flèches rouges montrent l'emplacement temporel des impulsions de coagulation, alors que les flèches jaunes indiquent le moment où le seuil de coagulation est atteint (après 14 impulsions à basse énergie et après 3 impulsions à haute énergie). Les figures 4.10(d) et (h) montrent une vue en lumière blanche (grossissement $4\times$) du site de coagulation. À basse énergie, la taille de la

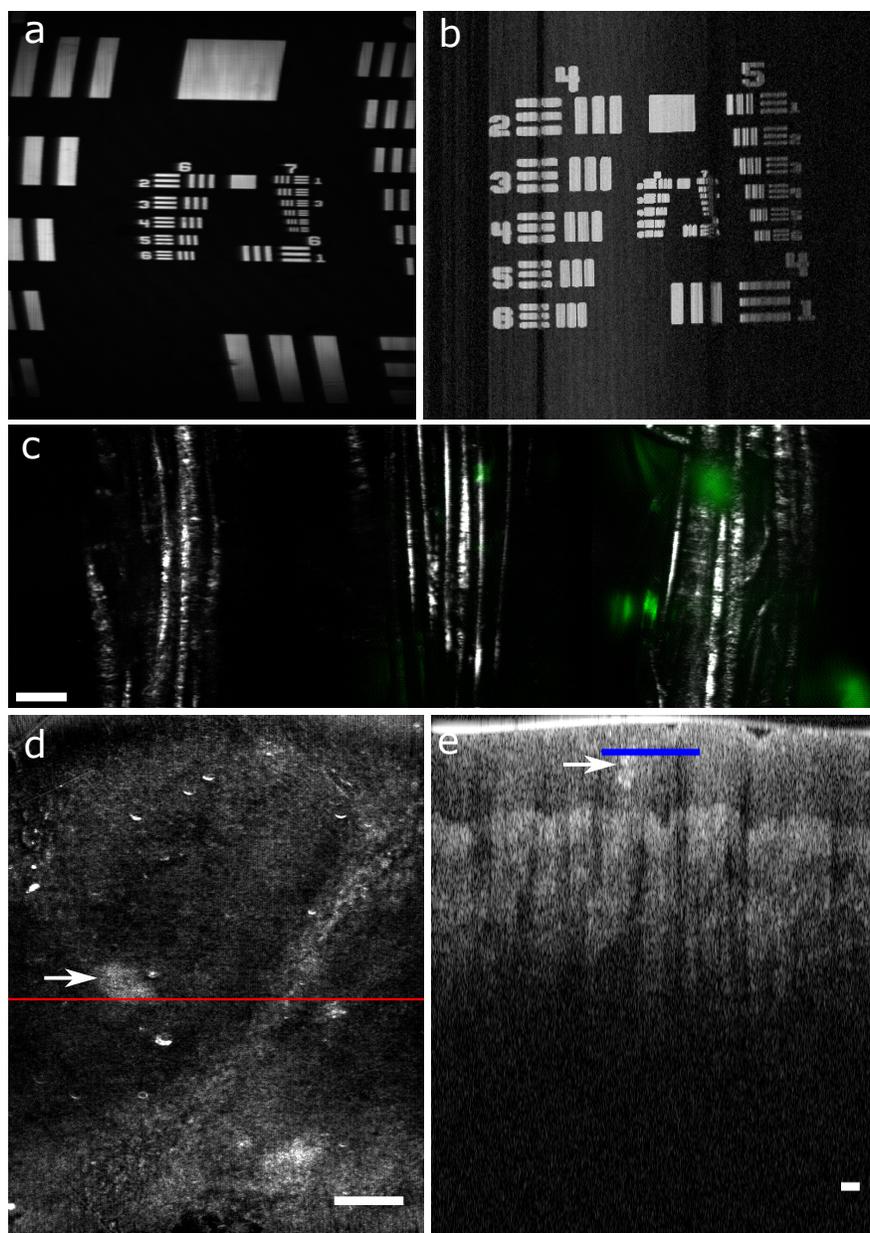


Figure 4.9 Caractérisation du système d'imagerie trimodal. a) et b) présentent une cible de résolution USAF1951 imagée par SECM et par OCT respectivement. c) montre trois fils à coudre trempés dans l'AlexaFluor790 à trois concentrations différentes (contrôle dans l'eau, $6.5 \mu\text{mol}$ et $65 \mu\text{mol}$). La barre d'échelle représente $50 \mu\text{m}$. d) et e) présentent l'image d'un doigt par SECM et OCT respectivement. Les lignes de couleurs montrent la projection de la modalité complémentaire dans le champ de vue. La barre d'échelle représente $100 \mu\text{m}$.

marque est d'environ $315 \mu\text{m}$ alors qu'à haute énergie elle est d'environ $930 \mu\text{m}$. Le seuil de coagulation a été établi en fonction du changement des propriétés de diffusion de l'oesophage,

montrées en 4.10(i) et (j). Ces deux figures présentent une régression linéaire sur les pentes de 265 lignes-A moyennées dans la région d'intérêt. Dans les deux cas étudiés, le processus de coagulation augmente la diffusion des tissus en surface, puis plus profondément. Cette augmentation de la diffusion se manifeste sur les images OCT comme un signal plus intense en surface, obscurcissant les régions plus en profondeur de l'échantillon à cet endroit.

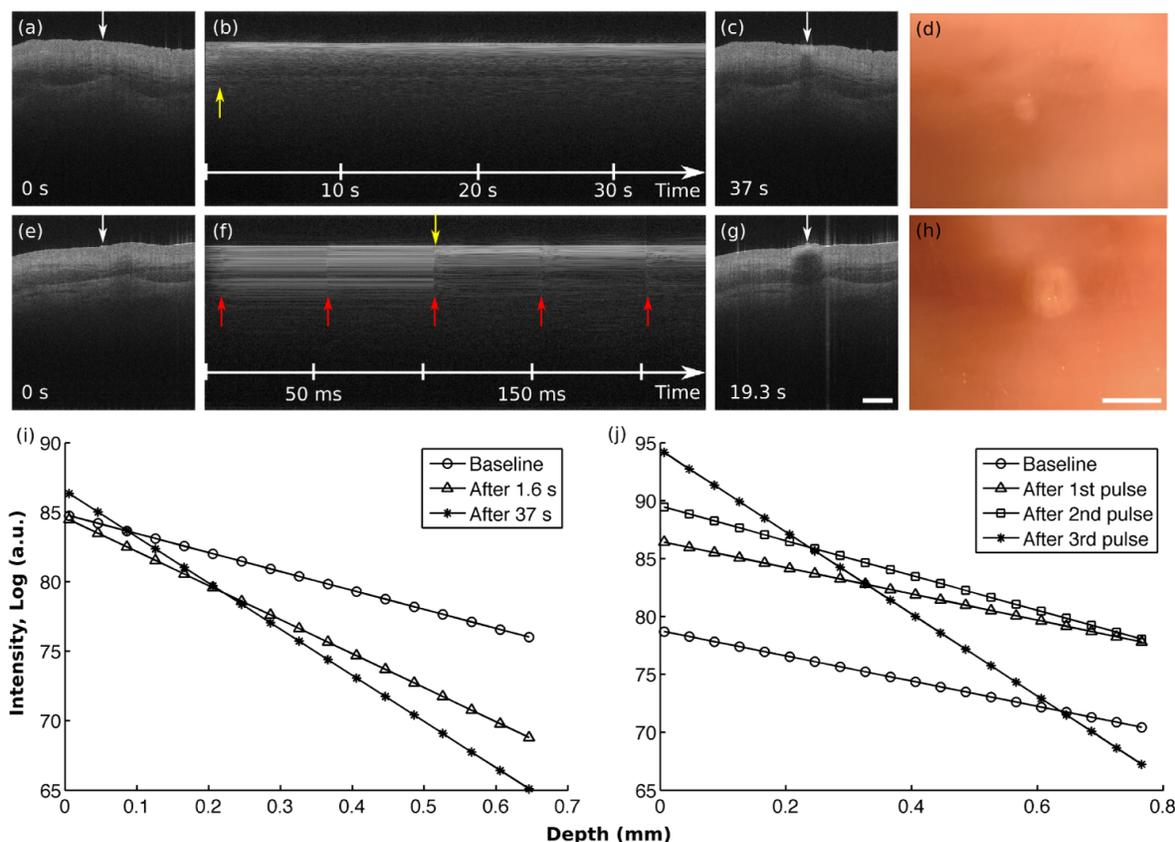


Figure 4.10 Exemple de coagulation laser assistée par OCT sur un échantillon de larynx de porc. a) à d) présentent l'expérience de coagulation réalisée à basse énergie (5.7 mJ par impulsion), alors que e) à h) présentent la même expérience à haute énergie (8.6 mJ par impulsion). a) et e) présentent une image OCT en profondeur de l'échantillon d'œsophage de porc au site de marquage avant le début de la coagulation. c) et g) montrent l'image OCT prise au même endroit après la coagulation. Les sites de marquage sont identifiés par une flèche blanche. Les sites de coagulation sont également visibles au microscope en lumière blanche (d) et h)). b) et f) montrent l'acquisition OCT en mode-M lors de la coagulation. Les flèches rouges montrent l'emplacement des impulsions laser alors que les flèches jaunes montrent l'atteinte du seuil de coagulation. Ce seuil est déterminé en analysant la décroissance en profondeur du signal dans l'échantillon. i) et j) présentent une régression linéaire sur la moyenne de 265 lignes-A dans la région d'intérêt à différents moments du processus. La barre d'échelle représente 1 mm.

4.4 Discussion et conclusion

Traditionnellement, les systèmes d'OCT et fluorescence utilisent des cubes séparateurs de puissance ou des miroirs dichroïques pour multiplexer les signaux d'OCT et de fluorescence, de même que pour séparer l'émission de fluorescence du signal OCT au retour de l'échantillon. Les signaux doivent passer par au moins une injection dans une fibre optique avant d'aller au bras d'imagerie, ce qui rend le système sujet aux désalignements et aux pertes importantes de signal. Les signaux doivent aussi passer par deux systèmes de filtrage par miroir dichroïque. Ceci limite la concentration minimale détectable par le système de fluorescence, en plus d'ajouter des pertes au parcours du système OCT. Ces pertes résultent en une profondeur d'imagerie moins grande, car les signaux rétrodiffusés en profondeur sont très faibles à cause de l'atténuation des tissus biologiques.

Le système d'OCT et fluorescence présenté ici comporte deux variantes : une version de table et une version endoscopique. Leurs limites de détection du signal de fluorescence sont respectivement de 700 nmol et 40 nmol pour des puissances à l'échantillon comparables (220 μ W pour le système de table et 200 μ W le système endoscopique). Le système endoscopique est plus efficace pour propager les signaux que le système de table. En effet, pour obtenir la même puissance à l'échantillon, il faut atténuer le laser d'injection davantage (0.4OD additionnel). Les pertes dans le collimateur et la lentille du bras d'imagerie du système de table sont responsables de cet écart. De plus, la collection de la sonde est plus efficace que celle du système de table, ce qui permet d'augmenter de plus d'un ordre de grandeur la concentration minimale détectable avec la système. La sonde se compare bien avec la sonde aiguille réalisée par nos collaborateurs en Australie. Cette dernière possède un seuil de détection extrapolé à 1.5 nmol. Une façon d'améliorer davantage l'efficacité de collection de fluorescence serait d'employer une fibre GRIN avec un coeur de 110 μ m au lieu de 60 μ m. Ceci permettrait un gain d'un facteur 3.4 dû à l'aire de collection plus grande.

L'ajout de la modalité de fluorescence à la sonde affecte peu ses performances en OCT. Les résolutions et profondeurs d'imagerie demeurent similaires (aux tolérances de fabrication près). Une autre amélioration pourrait être d'ajouter plusieurs segments de fibres GRIN différentes en bout de sonde en plus de l'espaceur. Ceci permettrait d'ajouter de la flexibilité au design de la sonde, chaque segment de GRIN agissant comme une lentille différente. Une plus grande région d'imagerie et un focus plus en profondeur dans le tissu pourraient ainsi être atteints, de même que des résolutions latérales un peu plus faibles.

Le passage de la fibre monomode à la fibre DCF dans un système OCT implique l'introduction d'artéfacts dans les images. Ces artéfacts sont dus à l'interférence entre le signal du coeur et un

signal couplant, par exemple, dans la gaine pour ensuite retourner dans le cœur (phénomène qui peut se produire aux épissures ou dans le coupleur DCFC). Le délai (profondeur apparente de l'artéfact sur l'image) dépend de la distance parcourue dans la gaine (indice effectif plus faible que pour le mode de cœur). Ces artefacts peuvent être minimisés lorsque les interfaces de changement d'indice dans l'échantillon sont faibles (échantillon en immersion dans l'eau au lieu de l'air). Il est parfois possible d'augmenter la longueur des bras de l'interféromètre jusqu'à ce que la différence de chemin optique entre les artefacts et le signal de cœur dépasse la longueur de cohérence instantanée du laser employé. Avec le VCSEL, ceci implique plus de 15 m de fibre pour évacuer la majorité des artefacts.

Le développement de coupleurs en fibres à double gaine et de coupleurs multiplexeurs efficaces permettent d'améliorer l'efficacité d'un système d'imagerie multimodal OCT et fluorescence. De plus, comme les DCFC ont des réponses achromatiques en extraction multimode, il est possible d'étendre les applications à la spectroscopie sur une large plage. Ces coupleurs permettent également d'ajuster le système à l'application choisie, en minimisant les pertes à l'injection du laser ou en couplant une source large. Le système performe bien autant pour des fluorophores dans le visible que dans le proche infrarouge (les résultats sur l'AlexaFluor 790 ne sont pas présentés ici, mais sont similaires à ceux dans le visible).

Ce type de plateforme d'imagerie multimodale permet une plus grande robustesse que les systèmes précédents, en plus d'une acquisition simultanée et colocalisée pour toutes les modalités. Il s'agit d'un outil rapide et simple à utiliser pour des études longitudinales, ou pour imager un grand nombre d'échantillons. La preuve de principe pour l'imagerie multimodale a également été démontrée pour l'imagerie confocale en réflectance et en fluorescence, de même que dans un système tri-modal d'imagerie préclinique sur des échantillons de porc. Ce type de système d'imagerie permet d'étudier plusieurs propriétés optiques des tissus biologiques de façon simultanée et colocalisée.

En conclusion, deux systèmes d'imagerie multimodale combinant l'OCT et l'imagerie par fluorescence (en intensité ou spectroscopique) ont été conçus, développés et caractérisés. Une preuve de principe d'imagerie multimodale impliquant la microscopie confocale a également été présentée avec le coupleur à petite gaine interne. Une preuve de principe de coagulation laser guidée par OCT a également été démontrée avec un nouveau coupleur adapté à l'injection multimode. Le développement de coupleurs dédiés en fibres à double gaine est important afin d'améliorer les performances d'imagerie, la stabilité et la facilité d'utilisation de tels systèmes. Ce type de système peut s'optimiser en fonction des propriétés optiques de l'organe ou de l'échantillon choisi.

CHAPITRE 5 IMAGERIE PRÉ-CLINIQUE DES TROMPES DE FALLOPE

Ce chapitre vise à valider le choix de l'OCT en tant que modalité d'imagerie morphologique pour les trompes de Fallope. La trompe renferme en son centre la muqueuse, qui représente la paroi interne. L'examen de la muqueuse est essentiel, car c'est à l'intérieur ou en surface de cette dernière que se développent les pathologies des trompes. Il convient donc d'établir si cette modalité d'imagerie peut discerner entre les tissus sains et les tissus pathologiques. De plus, il convient d'établir si l'OCT peut discerner divers types de pathologies entre elles. Il est évident que l'identification de tumeurs de grande taille (de l'ordre des cm) ne requiert pas l'OCT. Dans la majorité des cas, l'examen macroscopique ou à l'oeil nu permet d'identifier ces tumeurs. Il est important de différencier un tissu cancéreux d'un tissu sain dans le cas par exemple de tumeurs de petit volume, difficilement distinguables à l'oeil nu. Il est également important d'identifier les conditions bénignes, qui sont des déviations des tissus sains, mais sans conséquence à court terme sur la santé. L'efficacité à identifier ces tumeurs de petit volume et ces conditions bénignes permet d'identifier les limitations de l'OCT comme modalité d'imagerie. Ces limitations permettent ensuite de valider le choix de l'OCT dans un contexte clinique de diagnostic et de dépistage du cancer ovarien.

Avant de déployer un système clinique sur mesure, les normes éthiques canadiennes et québécoises requièrent un certain niveau de validation de la technologie avant l'utilisation sur sujets humains. Les nouvelles technologies doivent d'abord être testées *in vitro* sur des cultures cellulaires lorsque possible. Une fois effets bénéfiques et adverses établis, le système peut être testé sur un ou des modèles animaux. Le modèle choisi doit être à la fois le plus proche possible de l'humain et le plus petit possible. Une rétroaction est effectuée afin d'attester des effets bénéfiques et adverses de la nouvelle technologie sur le modèle animal choisi. L'étape suivante permet de premières expérimentations sur sujet humain *ex vivo* afin de poursuivre l'évaluation du rapport entre les bénéfices et les effets adverses. Si après toutes ces étapes les bénéfices dépassent les effets adverses, alors seulement les essais *in vivo* sur sujets humains sont autorisés.

Les seules modalités d'imagerie cliniquement approuvées pour la visualisation directe des tissus gynécologiques sont l'ultrason transvaginal et l'hystérocopie transcol en lumière blanche. Bien que des démonstrations probantes des capacités d'imagerie de l'OCT ont été réalisées pour d'autres organes, notamment en cardiologie, en gastro-entérologie et en pneumologie, l'utilisation en gynécologie est encore peu développée. Il a donc été décidé d'entreprendre une validation depuis le début. L'étape de l'imagerie cellulaire n'apporte pas d'effets adverses ni

de bénéfiques probants, car il n’y a pas de structures à analyser à l’OCT. Tout de même, des sphéroïdes de cellules de tumeurs ovariennes ont été imagés sans en causer la mort. Cette validation a permis de passer au travail sur modèles animaux, qui peut s’effectuer ici sur des organes prélevés lors de nécropsies (équivalent animal de l’autopsie). Trois modèles ont été investigués : la souris, le chien et le cochon. Après cette validation, des échantillons de spécimens de tumeurs ovariennes et de trompes de Fallope humaines fixés en paraffine ont été imagés afin de démontrer que les tissus humains ne sont pas dégradés non plus. Enfin l’étape subséquente est d’imager des tissus humains frais ex vivo, directement lors de chirurgies. Cette étape requiert l’approbation du protocole expérimental par un comité d’éthique de la recherche. Il faut également que chaque patiente donne son consentement libre et éclairé pour procéder à l’imagerie des organes. La dernière étape de validation de l’appareil serait une étude in vivo sur sujets humains, ce qui dépasse le cadre de cette thèse. Il faudrait pour cette étape une nouvelle approbation éthique ainsi que le consentement de chacune des participantes.

Ce chapitre se divise en deux grands thèmes. D’abord, une étude sur des modèles animaux valide que le contraste et la résolution de l’OCT permettent de voir des structures pertinentes dans les tissus gynécologiques. Une analyse de ces modèles est également réalisée par rapport aux dimensions physiques des organes, afin de trouver un modèle animal qui servira à développer un protocole d’imagerie avant d’étudier des spécimens humains en milieu hospitalier. Le modèle choisi doit également permettre de tester les prototypes de sonde avant l’utilisation clinique. La seconde partie du chapitre traite de l’imagerie de spécimens humains fixés en paraffine. Trois types de spécimens sont étudiés. Un premier type est constitué de trompes de Fallope saines. Le second type regroupe les tumeurs de petit volume (Serous tubal epithelial carcinoma - STIC). Enfin, le troisième type regroupe des tumeurs ovariennes différenciées. Ce dernier type est utilisé pour établir si l’OCT peut distinguer différentes pathologies gynécologiques.

5.1 Modèles animaux

Pour débiter les travaux, on valide le potentiel de l’OCT sur un modèle animal proche de l’humain. La littérature ne semble pas indiquer de modèle particulier pour l’imagerie. Un groupe utilise la vache comme modèle de fertilité, alors que d’autres groupes emploient la souris. Soulignons tout de même que le modèle médical de la trompe est la souris, autant pour les études anatomiques que pour les tests de développement de tumeurs et d’effet d’agents chimiothérapeutiques.

Pour des questions d’accessibilité et de réglementation, nous avons opté pour une sélection

de modèles animaux parmi ceux disponibles à l'animalerie du CHUM. L'animalerie contient les animaux suivants : poissons, souris, rat, cobaye, lapins, chien et porcs. Nous avons décidé de limiter l'étude à trois modèles par souci de concision : la souris, le chien et le porc. Ce choix se motive ainsi :

La souris Ce modèle est déjà connu en médecine au point de vue anatomique. Une importante documentation existe concernant ce modèle. Les pathologistes ont acquis de l'expérience avec ce modèle au cours de leur formation.

Le chien Le modèle canin se rapproche davantage de l'humain au point de vue de la dimension des organes.

Le porc Il s'agit d'un modèle couramment employé qui réplique bien l'humain au niveau métabolique. Selon la taille, il peut également mieux répliquer la dimension chez l'humain.

Dans un premier temps, nous prendrons des échantillons animaux sains, le but étant de constituer une première banque de données contenant les différentes structures gynécologiques animales à l'OCT.

5.1.1 Extraction et préparation des tissus

Les tissus sains animaux sont accessibles lors de nécropsies à l'animalerie du CHUM. D'un point de vue éthique, il est préférable, lors du sacrifice d'un animal, d'utiliser au maximum le matériel biologique disponible. Ainsi, nous avons préféré nous greffer aux diverses nécropsies déjà programmées par les divers groupes de recherche, étant donné que les expériences visées ne compromettraient pas l'intégrité des organes reproducteurs. Une fois que les divers groupes de recherche à qui appartiennent l'animal sacrifié ont terminé leurs prélèvements, nous avons procédé à une hystérectomie totale sous supervision vétérinaire. Pour chaque hystérectomie, le spécimen est coupé au milieu du vagin et l'épiploon est laissé sur le spécimen afin de limiter les manipulations. Une fois les échantillons prélevés, ils sont déposés dans une solution saline à 0.9% et placés au frais pour les préserver jusqu'à la séance d'imagerie. À cette étape, on s'assure de manipuler les tissus le moins possible. Les spécimens récoltés sont ensuite transportés dans une glacière jusqu'à Polytechnique pour les séances d'imagerie.

Les tissus prélevés doivent être imagés le plus rapidement possible. En effet, il faut disposer des spécimens dans les 48h après leur extraction, ou les congeler selon une procédure qui les préservera pour des séances d'imagerie futures. Cette procédure est suivie afin de garantir les bonnes pratiques en matière de biosécurité et limiter les risques biologiques. Les objectifs de la séance d'imagerie sont établis à l'avance, de telle sorte que les tissus peuvent être préparés

efficacement. Le système d'imagerie doit être fonctionnel et prêt à imager à l'arrivée des tissus.

L'hystérectomie totale fournit les tissus suivants :

- col utérin et une partie du vagin,
- utérus,
- cornes utérines,
- trompes de Fallope,
- ovaires,
- péritoine, épiploon (tissu structurel qui maintient les viscères en place), ligaments et autres tissus structurels gynécologiques.

L'utérus et les cornes utérines doivent être ouverts pour imager la muqueuse interne, à moins d'avoir une sonde d'une longueur conséquente (jusqu'à 60 cm pour la partie proximale de la corne utérine de chien ou chez les porcs matures). Les ovaires sont séparés du pavillon pour être imagés séparément. Les trompes peuvent être imagées par l'extérieur, car l'enveloppe musculaire est beaucoup plus fine que chez l'humain.

5.1.2 Comparaison de trois modèles animaux

Dans le but d'évaluer le contraste OCT dans les tissus gynécologiques frais, les organes reproducteurs de souris, de porc et de chien ont été analysés à l'OCT. Nous cherchons à identifier les différentes structures visibles à l'OCT sur ces organes. De plus, un modèle animal qui réplique bien l'anatomie et les dimensions des trompes de Fallope humaines est recherché. Une trompe humaine fait 10 cm de longueur et présente une ouverture variant de 1 mm à 1 cm de diamètre interne.

Modèle murin

La souris constitue un bon modèle de l'humain du point de vue des structures anatomiques, bien que les dimensions des organes soient réduites d'un facteur 8 à 10 par rapport aux organes humains associés. Nous avons imagé les ovaires, les trompes de Fallope, les cornes utérines et la muqueuse de l'utérus. Au total, 8 spécimens de souris ont été analysés. La figure 5.1 montre le spécimen brut et identifie les principales structures anatomiques macroscopiques d'intérêt.

D'emblée, on remarque la petite dimension des structures anatomiques de la souris. Les ovaires sont facilement identifiables. Ils sont attachés à une couche adipeuse, ou *fat pad* en anglais, caractéristique de l'anatomie de la souris. La dissection des ovaires est délicate.

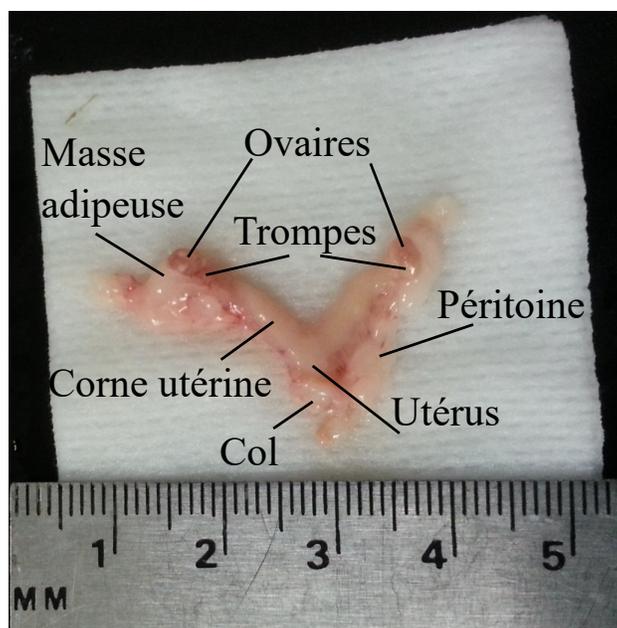


Figure 5.1 Macroscopie d'un spécimen d'hystérectomie murin. Les ovaires siègent sur une couche adipeuse caractéristique et les trompes de Fallope se retrouvent en opposition par rapport à cette couche graisseuse.

Chaque ovaire est confiné dans un sac, de même que les trompes. Le sac doit être retiré pour exposer l'ovaire et les trompes. La couche adipeuse doit être retirée de façon précise à l'aide de binoculaires, sans quoi les trompes de Fallope seront abîmées. Elles sont repliées sur l'ovaire du côté opposé à la couche adipeuse. Les trompes se jettent ensuite dans la corne utérine. La présence d'une couche adipeuse et d'un sac diffère de chez l'humain, de même que le repliement des trompes à la surface de l'ovaire. De plus, chez l'humain, un interstice existe entre l'ovaire et le pavillon de la trompe. Les trompes sont dépliées entre l'utérus et l'ovaire, sans passer par un sac. Enfin, chez la majorité des femmes, il n'y a pas de cornes utérines.

Les volumes OCT ont été acquis sur des dimensions de $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ (plan $x-y$), couvrant l'ovaire, les trompes de Fallope et la partie distale de la corne utérine. La figure 5.2 présente un exemple d'un tel volume, sur l'adnexe droit de la souris 4, avec la barre d'échelle représentant $500\text{ }\mu\text{m}$. Les sous-figures 5.2(a) à (e) montrent diverses tranches du volume dans l'adnexe droit. Un rendu 3D de l'acquisition OCT (c) montre l'ovaire, la trompe de Fallope repliée à sa surface, et la connection avec la corne utérine. (a), (b) et (e) montrent trois images transverses issues du rendu 3D (c) selon les lignes de mêmes indices, ainsi qu'au bout de la flèche. La figure 5.2(a) présente une image OCT caractéristique d'une trompe de Fallope de

souris en vue transverse, située par-dessus l'ovaire et le tissu adipeux. La trompe semble vide à cet endroit, avec les villosités situées sur la face intérieure de la trompe. Plus loin dans la partie distale (plus près de l'ovaire), deux ovules, sous forme de complexes ovum-cumulus (têtes de flèches), sont visibles dans la vue transverse (b). Ces complexes se présentent comme un cœur brillant entouré d'un nuage de cellules peu compact appelé cumulus. Ces ovules sont graduellement poussés vers l'utérus par les cellules ciliées de l'épithélium de la trompe (non visibles sur les images OCT). La figure 5.2(d) montre une vue en face à 100 μm en profondeur dans le carré. Selon cette coupe, les complexes ovum-cumulus précédents (têtes de flèche) sont visibles le long de l'axe transverse et sont suivis par trois autres complexes issus de la même ovulation. Enfin, (e) montre un exemple d'un ovocyte en développement dans son follicule ovarien.

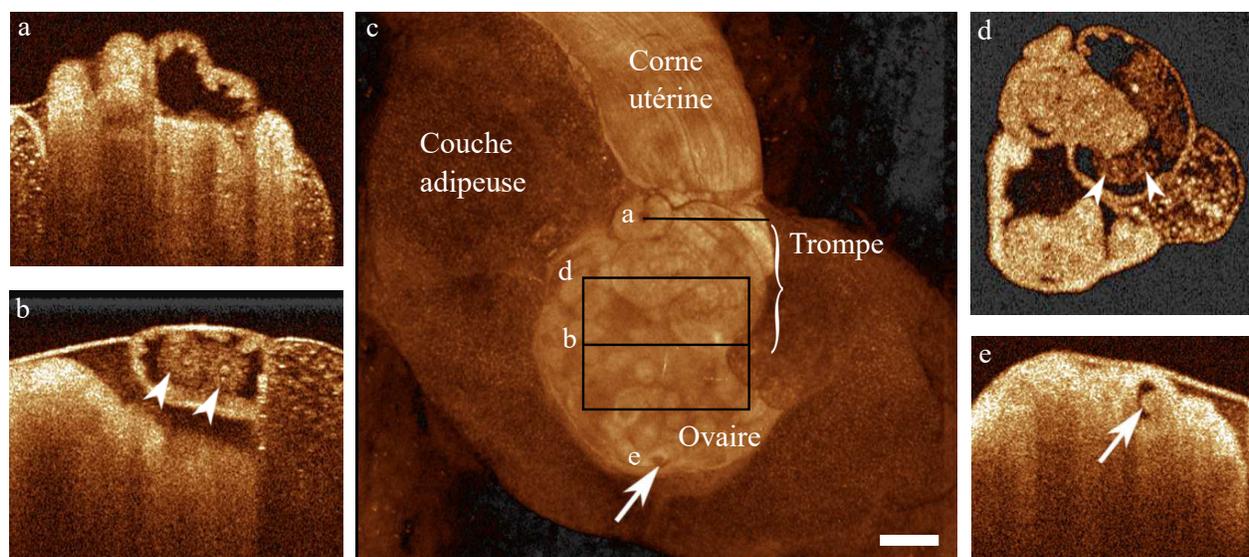


Figure 5.2 Images OCT extraites d'un volume acquis sur l'adnexe droit du spécimen murin 4. Un rendu 3D (c) montre l'ovaire droit sur lequel s'enroule la trompe de Fallope avant de se connecter à la corne utérine. Deux images transverses sont présentées en (a) et (b) et ont été prélevées dans les plans notés par les lignes identifiées avec l'indice correspondant. La vue transverse de la trompe révèle le lumen vide en (a) et deux ovules en (b) (têtes de flèche). (d) montre une vue en profondeur dans un plan en face où les ovules sont visibles (têtes de flèche). Le plan est pris 100 μm sous la surface dans le cadre carré. (e) présente un autre plan transverse avec un ovule en développement dans son follicule ovarien (flèche). La barre d'échelle représente 500 μm .

La figure 5.3 présente des images de muqueuse utérine de souris. Ces structures diffèrent grandement chez l'humain. Moins de 10% des femmes ont des cornes utérines, ces dernières étant de petite longueur lorsque présentes. La muqueuse utérine de la souris ressemble da-

vantage à la muqueuse du col utérin qu'à la muqueuse utérine chez l'humain. Nous allons tout de même analyser ces tissus comme point de départ pour la comparaison avec les autres modèles animaux. La figure 5.3 présente une image extraite d'un volume OCT d'un utérus de souris ouvert (l'intérieur est placé vers le haut de l'image). Deux régions différentes sont visibles sur l'image OCT et correspondent respectivement aux deux structures de l'utérus murin, soit l'endomètre Ed et le muscle utérin M. Il n'y a pas de glandes endométriales visibles dans cet échantillon.

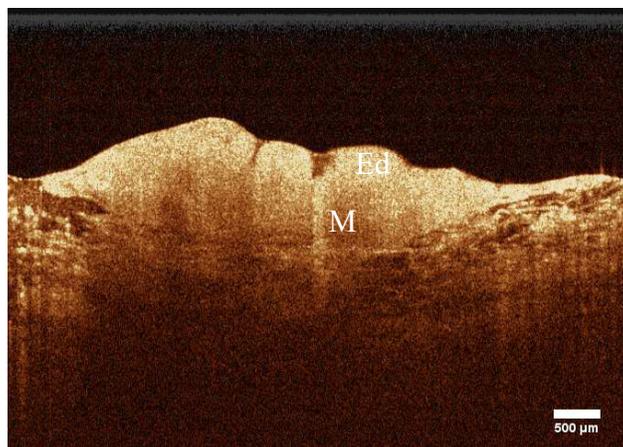


Figure 5.3 Image représentative d'un utérus de souris issue d'une volume OCT. Deux zones sont présentes dans cet échantillon : l'endomètre (Ed) et la paroi musculaire (M). L'échantillon a été ouvert pour exposer la face interne vers le haut. Ici peu de glandes endométriales sont visibles. La barre d'échelle représente 500 µm.

Conclusion : Le contraste et la résolution de l'OCT permettent de voir plusieurs de structures propres au domaine gynécologique. Il est possible de discerner l'ovaire des trompes de Fallope et de la couche adipeuse. Des ovules sont distinguables à différents stades de développement. Dans l'utérus, l'endomètre et la couche musculaires sont discernables. Le modèle murin réplique très bien la majorité des organes humains, mais n'offre pas d'organe de taille suffisante pour répliquer les trompes humaines. Il faut trouver un modèle plus gros pour y parvenir. Il s'agit cependant d'un modèle qui peut s'imaginer de l'extérieur (pas besoin d'ouvrir les organes) étant donné la petite taille des organes comparé à la profondeur de pénétration de l'OCT. Étant donné les dimensions des organes humains, il est nécessaire de valider si l'imagerie par l'extérieur est réalisable, sinon une sonde doit être développée pour accéder à l'intérieur des trompes.

Modèle canin

Le modèle canin est notre premier modèle de taille conséquente pour répliquer les trompes de Fallope de l'humain. Les organes reproducteurs de 5 chiennes ont été utilisés pour cette étude. Les ovaires, le sac ovarien, les cornes utérines et la muqueuse utérine ont été analysés. Ces structures sont présentées en vue macroscopique à la figure 5.4. On remarque la taille importante des cornes utérines. Sur l'image (a), la bourse ovarienne a été retirée sur l'adnexe gauche pour exposer l'ovaire. Les cornes utérines sont de grandes dimensions (environ 30 cm en longueur) et possèdent une paroi musculaire épaisse. Les trompes de Fallope à proprement parler ne font que 5 à 6 mm de longueur et se limitent à moins de 2 mm de diamètre externe chez les grands chiens. Ces organes diffèrent de chez l'humain, car l'ovaire humain n'est pas contenu dans une bourse ovarienne. Il n'y a également pas de corne utérine chez l'humain (chez la grande majorité des femmes). De plus, les trompes de Fallope mesurent environ 10 cm de longueur et passent de 1 mm à 1 cm de diamètre interne, ce qui est nettement plus grand que des trompes canines. Il est à noter que la région de la corne utérine proche de l'utérus possède un lumen de 1 et 2 mm de diamètre, ce qui peut simuler la taille d'un lumen de trompe de Fallope humaine, en dépit de l'absence de villosités.

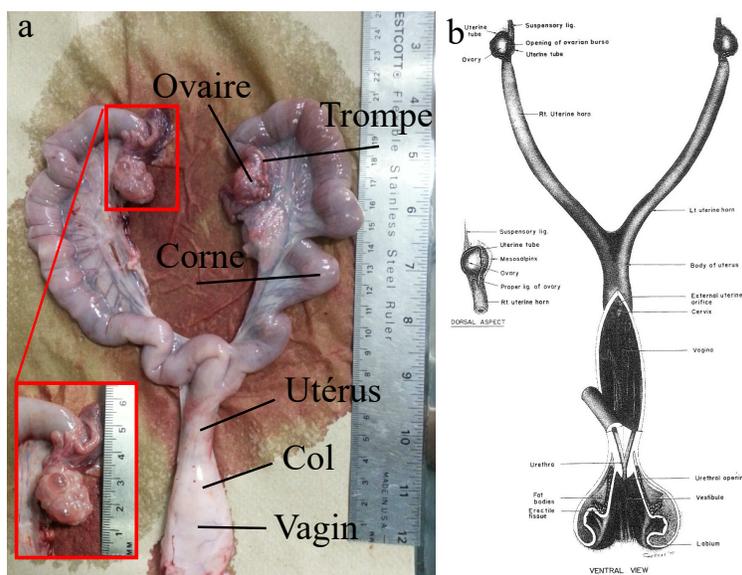


Figure 5.4 Macroscopie (a) et planche anatomique (b) du système reproducteur canin. Les ovaires ont la particularité chez le chien d'être scellés dans la bourse ovarienne, retirée ici sur l'adnexe gauche pour exposer l'ovaire. La planche anatomique est reproduite de Ellenberger, 1908.

On remarque à l'inspection de la figure 5.5 que les chiennes ne possèdent pas de trompe de

Fallope développées. Chez les cinq spécimens étudiés, une structure atrophiée sert de lien entre la corne utérine et l'ovaire à l'intérieur de la bourse ovarienne. Les cinq chiennes étaient à des moments différents de leur cycle menstruel, ce qui permet d'apprécier à quel point l'ovaire se transforme sous l'effet des chaleurs (phénomène bisannuel). La figure 5.5 présente des images OCT d'un ovaire canin présentant plusieurs stades de développement d'ovules. Les figures (a) et (c) montrent deux coupes prises dans le même volume pour l'ovaire gauche du spécimen canin 1, à l'approche de ses chaleurs. Plusieurs stades de développement de l'ovule sont visibles, notamment un follicule primaire (tête de flèche), un follicule secondaire (flèche blanche) et un follicule de Graaf (avec l'ovule sur le podium avec le cumulus en formation). Les couches d'épithélium germinal (flèche noire) et de cortex ovarien (C) sont visibles sur les images. Ces structures sont visibles sur les agrandissements dans les encadrés de couleurs correspondantes en (b) et (d).

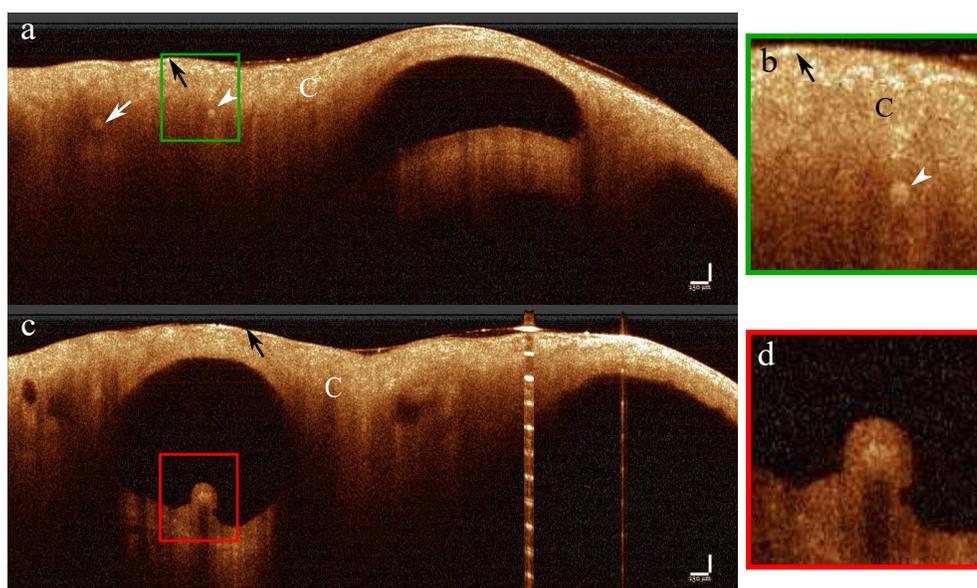


Figure 5.5 Images OCT extraites d'un volume acquis sur l'adnexe gauche du spécimen canin 1. (a) et (c) montrent des sections OCT en profondeur de l'ovaire gauche d'une chienne proche de ses chaleurs, étant donné la présence de plusieurs vésicules de Graaf (grands cercles noirs dans les images). Deux régions ont été agrandies en (b) et (d) et ont été prélevées dans les plans notés par les carrés de couleur correspondants. Les flèches noires identifient les régions montrant l'épithélium germinal de l'ovaire et la lettre C indique la région sous-jacente, le cortex ovarien. Les têtes de flèche pointent des follicules primaires, dont le développement n'a pas encore commencé. La flèche blanche montre un follicule secondaire. L'agrandissement en (d) présente un follicule de Graaf dans lequel l'ovule sur son podium s'entoure du cumulus en prévision de l'ovulation. La barre d'échelle représente 250 μm .

Un second volume OCT est acquis avec l'utérus ouvert sur la longueur est présentée à la

figure 5.6. La face interne est présentée en haut de la figure. Trois couches sont visibles sur les deux sous-figures. En partant du lumen, l'épithélium est visible comme une mince couche de cellules (qui peut s'épaissir lors des chaleurs). La seconde couche, d'épaisseur variable, mais substantiellement plus épaisse que l'épithélium est l'endomètre. Cette structure renferme plusieurs vaisseaux sanguins (flèche) et glandes endométriales (têtes de flèche). Enfin la dernière couche, le myomètre, est composée de muscle lisse.

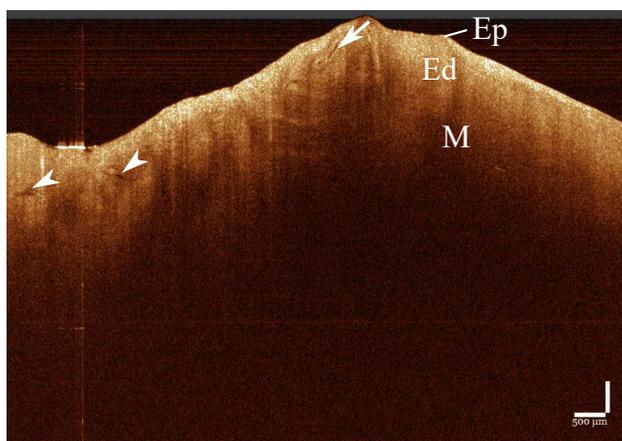


Figure 5.6 Image OCT d'un utérus canin (spécimen 1) en coupe transverse dépliée. L'épithélium (Ep), l'endomètre (Ed) et la paroi musculaire (M) sont visibles en partant du haut de l'image OCT et en progressant vers le bas. La quantité de glandes endométriales et l'épaisseur de l'endomètre dépendent du moment de l'année. La barre d'échelle représente 500 µm.

Conclusion : Les images OCT révèlent des structures pertinentes pour l'analyse de tissus gynécologiques. Le contraste et la résolution permettent de se repérer dans le spécimen. Ce modèle ne permet pas d'obtenir de trompe de taille suffisante pour répliquer celles de l'humain. Cependant, les cornes utérines ont une dimension suffisante pour simuler une trompe humaine (peut constituer un bon fantôme biologique avec une muqueuse lisse), plus proche des trompes de femmes âgées.

Modèle porcin

Le porc constitue un modèle plus lourd à garder en animalerie que les deux modèles précédents, mais permet d'obtenir des animaux de taille plus grande. Un total de 10 porcs dont le poids varie de 30 kg à 70 kg ont été imagés, après que les tissus ont été récoltés en nécropsie. Les ovaires, les trompes, les cornes utérines et la muqueuse utérine ont été imagés. La figure 5.7 présente une vue macroscopique et une planche anatomique d'un spécimen porcin. On remarque la grande ressemblance de la configuration de l'ovaire et de la trompe de Fallope

en comparaison avec l'humain et la souris. L'isthme et l'ampoule humaine ressemblent à la trompe de porc. Par contre, la partie frangée et le pavillon sont morphologiquement très différents.

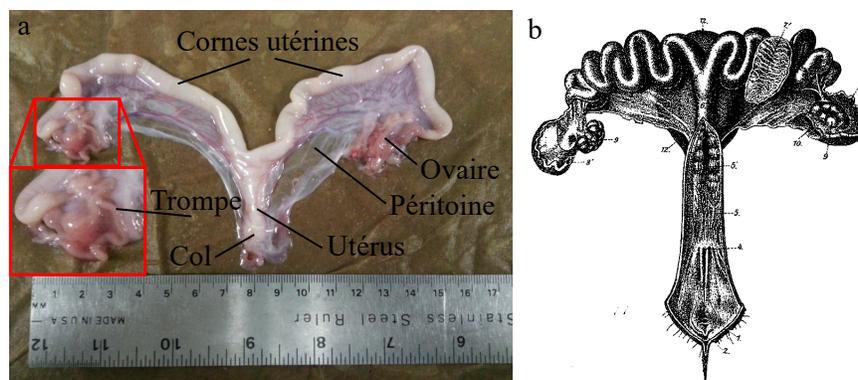


Figure 5.7 Macroscopie (a) et planche anatomique (b) d'un spécimen porcin (spécimen 2). Ici la taille des cornes utérines est très grande par rapport au reste du spécimen, elles peuvent atteindre 60 cm chez un porc mature. Les trompes de Fallope et les ovaires sont disposés comme chez l'humain avec des dimensions semblables. Cependant, le pavillon et la partie frangée de la trompe diffèrent grandement au niveau morphologique entre le porc et l'humain. La planche anatomique est reproduite de Ellenberger, 1908.

La figure 5.8 présente des images OCT issues d'un volume acquis sur l'adnexe gauche du spécimen 2. (a) présente une image OCT en profondeur de l'ovaire. Les couches de l'ovaire sont identifiables, soit l'épithélium germinale (flèche noire), le cortex ovarien (C) et la medulla (flèche blanche). Le cortex ovarien est la zone où les follicules se développent pour former les ovules, tandis que la medulla est une région riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le groupe des sous-figures (b) à (d) présente des coupes OCT de la trompe de Fallope repliée. (b) présente une trompe dans la vue longitudinale ($x-z$), où les couches de villosités (tête de flèche), muscle (M) et de péritoine (P) sont identifiées. (c) montre une coupe transverse ($y-z$) du même segment de trompe où un lumen (Lu) est visible. Enfin la coupe en (d) montre une vue en face ($x-y$) et en profondeur dans la trompe, où les mêmes structures sont identifiées.

Les porcs de 45 kg et plus offrent des trompes de tailles et de structures comparables à l'ampoule et à l'isthme de la trompe humaine, qui constituent la majeure partie des trompes. La structure de l'utérus ressemble à celle de l'humain et comporte trois couches. La première est l'épithélium, variable en épaisseur au cours du cycle hormonal. Cet épithélium apparaît comme une couche légèrement plus sombre que la couche sous-jacente. La seconde couche est l'endomètre, également d'épaisseur variable, qui comporte plusieurs vaisseaux sanguins (flèche) et une quantité variable de glandes endométriales (tête de flèche). Il est à noter que

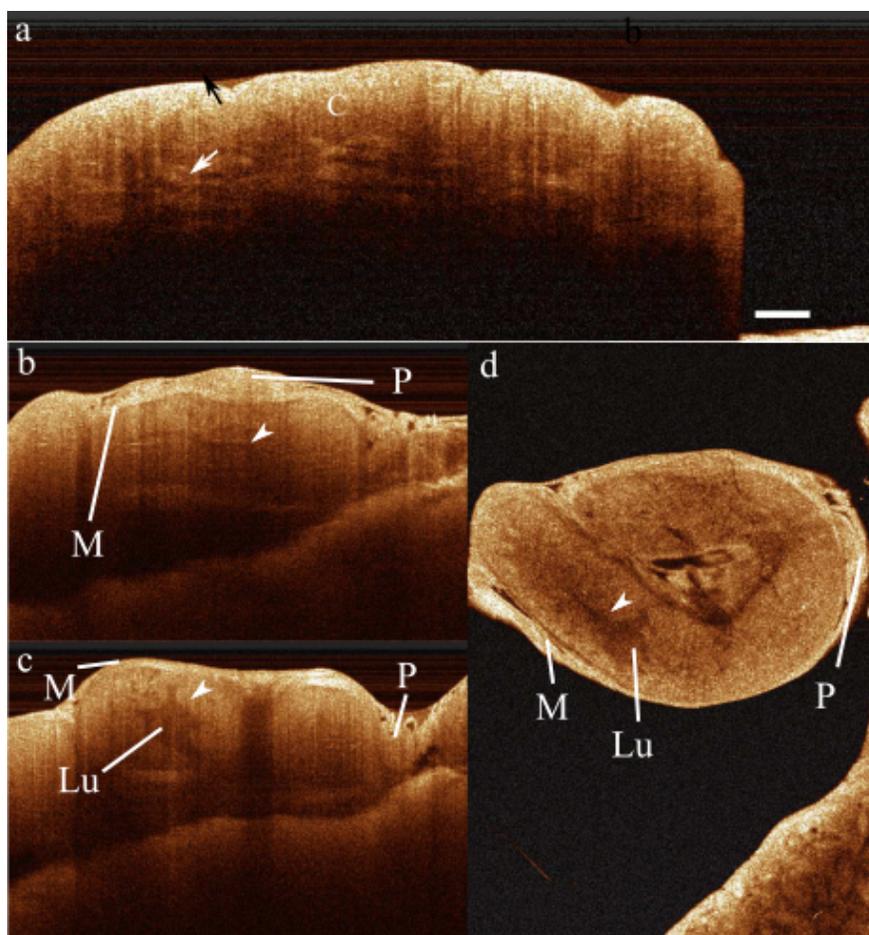


Figure 5.8 Images OCT extraites d'un volume acquis sur l'adnexe gauche du spécimen porcine 2. (a) montre une section OCT en profondeur d'un ovaire de porc. L'épithélium germinale est pointé par la flèche noire, le cortex ovarien est identifié par la lettre C et la région de la medulla est pointée par la flèche blanche. Les coupes (b) et (c) montrent deux plans transverses ($x-z$ et $y-z$) en coupe d'une trompe de Fallope porcine. L'image (d) montre le repliement de ce même segment de trompe avec une vue en face. Le lumen (Lu), la paroi musculaire (M), le péritoine (P) et les villosités (têtes de flèche) sont identifiés sur les trois plans. La barre d'échelle représente 500 μm .

l'utérus porcine possède des renflements de l'endomètre (surface vallonnée due à l'épaisseur variée), visibles à l'OCT. La dernière couche est le myomètre, composé de deux couches de muscles lisses, l'une circulaire et l'autre longitudinale. Ces couches sont cependant trop profondes pour être observées à l'OCT, trop peu de signal revenant de cette portion de l'échantillon.

Conclusion : Ce modèle permet d'obtenir des trompes de Fallope dont l'anatomie et la dimension ressemblent celles de l'humain. Ce modèle est retenu pour répliquer l'ampoule et

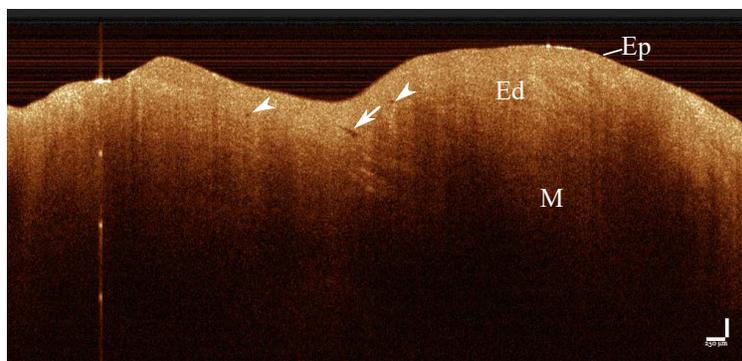


Figure 5.9 Image OCT représentative d'un volume OCT d'un spécimen d'utérus porcin. Les trois couches de l'utérus sont identifiées : l'épithélium (Ep), l'endomètre (Ed) et le myomètre (M). La barre d'échelle représente 500 μm .

l'isthme de la trompe humaine (aucun des modèles animaux étudiés ne possède de structure comparable au pavillon humain de la trompe). L'utérus est également similaire à l'humain, avec une cavité interne de taille comparable. Les cornes utérines porcines ne sont pas utiles pour répliquer les structures gynécologiques humaines.

5.2 Tissus humains en paraffine

Une seconde étape de validation du contraste OCT dans les tissus ovariens humains est de déterminer s'il est possible de distinguer des tissus pathologiques et des tissus sains. Comme des échantillons de tissus gynécologiques humains sont mis en paraffine et consignés dans la biobanque du CHUM, nous pouvons avoir accès à ces échantillons pour les étudier. Le contraste est cependant différent du contraste du tissu frais, car le processus de fixation a pour objectif de remplacer l'eau des tissus par de la formaline, puis de la paraffine. La formaline dissout le gras par exemple. Une zone riche en tissus adipeux sur un échantillon frais génère beaucoup de rétrodiffusion et apparaît comme étant très brillante. Lorsque cet échantillon est fixé, les graisses sont dissoutes et il reste un vide là où le tissu adipeux se trouvait. Cette région apparaît noire sur les images OCT, car aucun signal n'y est rétrodiffusé.

L'étude présentée dans la prochaine section vise trois objectifs. Le premier est de cataloguer les structures visibles à l'OCT et de les comparer à l'histologie afin de former un atlas. Comme les blocs de paraffine sont fixés, il est possible d'avoir une bonne correspondance entre le volume OCT et une lame histologique prise à la surface du bloc. Le second objectif est de voir les différences entre les tissus sains et pathologiques. Le troisième objectif est de discerner divers types de pathologies et possiblement des conditions bénignes qui peuvent

être précurseurs de cancer. Dans cette section, nous allons d'abord établir à quoi ressemble une trompe de Fallope saine à l'OCT, puis nous allons étudier quelques cas de lésions *in situ*, les STICs. Enfin, nous allons étudier les 5 types de pathologies malignes les plus communes en cancer de l'ovaire : les tumeurs séreuses de haut grade, les tumeurs séreuses de bas grade, les tumeurs endométrioïdes, les tumeurs mucineuses et les tumeurs à cellules claires.

5.2.1 Échantillons de la biobanque du CHUM

Pour l'analyse des fragments de tumeurs, l'accès aux tissus est possible grâce à une biobanque du CHUM (protocole BD04.002). Cette banque de tissus biologiques permet de retracer des fragments de tumeurs de cancer ovariens, ainsi que certaines données associées à la patiente (diagnostic, date de la chirurgie, type de tissus, latéralité, pré- ou post-chimiothérapie). Tous les échantillons en paraffine étudiés dans le cadre de cette thèse sont issus de cette biobanque. Les échantillons de trompes saines et de STICs sont issus de trompes, alors que les échantillons de tumeurs proviennent d'ovaires et de tissus d'épiploon (les tumeurs dans les trompes ne sont pas disponibles). La liste des spécimens étudiés et leurs caractéristiques (lorsque disponibles) sont listées à l'annexe B.

5.2.2 Protocole d'imagerie et préparation des échantillons

Les échantillons sont sélectionnés aléatoirement dans la biobanque selon les caractéristiques principales établies. Cette sélection a été effectuée par un membre de l'Institut du Cancer de Montréal. Les échantillons et les histologies correspondantes ont ensuite été sortis de la banque. Chaque bloc de paraffine a été inventorié avec son code de classement de la biobanque, puis l'histologie H&E correspondante a été reprise si elle était trop discordante (dans certains cas plusieurs lames ont été prises entre l'histologie au dossier et la surface actuelle du bloc de paraffine). Chaque bloc de paraffine a été placé sous le système OCT pour l'imagerie en s'assurant de limiter les plans de saturation et l'inclinaison de la surface du bloc. Pour chaque bloc, des volumes de 10 mm×10 mm latéralement (plan $x-y$) et 5 mm en profondeur ont été acquis en quantité suffisante pour acquérir les zones où le tissu est situé avec un léger recouvrement. Ceci a généré entre 2 et 8 volumes OCT par bloc. Par la suite, chaque lame histologique a été numérisée au microscope au grandissement 20× (soit le Olympus BX61VS ou Hamamatsu NanoZoomer). Chaque volume a été individuellement vérifié, puis exporté en images et traité. Les images ont été exportées de manière normalisée, afin de pouvoir comparer les niveaux de gris. Les blocs d'images ont ensuite été convertis en données 8 bits, puis une moyenne mouvante sur 4 plans a été réalisée pour rehausser la qualité des images. Un ajustement fin de la luminosité et du contraste est ensuite appliqué

pour optimiser les images présentées dans la thèse.

5.2.3 Échantillons de trompes saines

Les trompes en paraffine sont en général présentées selon la coupe transversale, ce qui facilite l'interprétation des images. La figure 5.10 présente la section transversale d'une trompe de Fallope saine chez une jeune patiente. La sous-figure 5.10(a) présente une image en face en OCT, le premier plan non saturé dans le plan $x-y$. La sous-figure 5.10(b) présente la section histologique correspondante avec la teinture conventionnelle H&E. Les structures suivantes peuvent être identifiées sur les deux vues, de l'extérieur vers l'intérieur : le péritoine, la paroi musculaire, les microvillosités et le lumen (espace entre les microvillosités). La zone contenant la muqueuse (microvillosités) est celle nécessitant analyse, car c'est dans cette région que les lésions et tumeurs prennent naissance. D'autres structures sont visibles du côté gauche sur l'extérieur de la trompe : des vaisseaux sanguins et des ligaments.

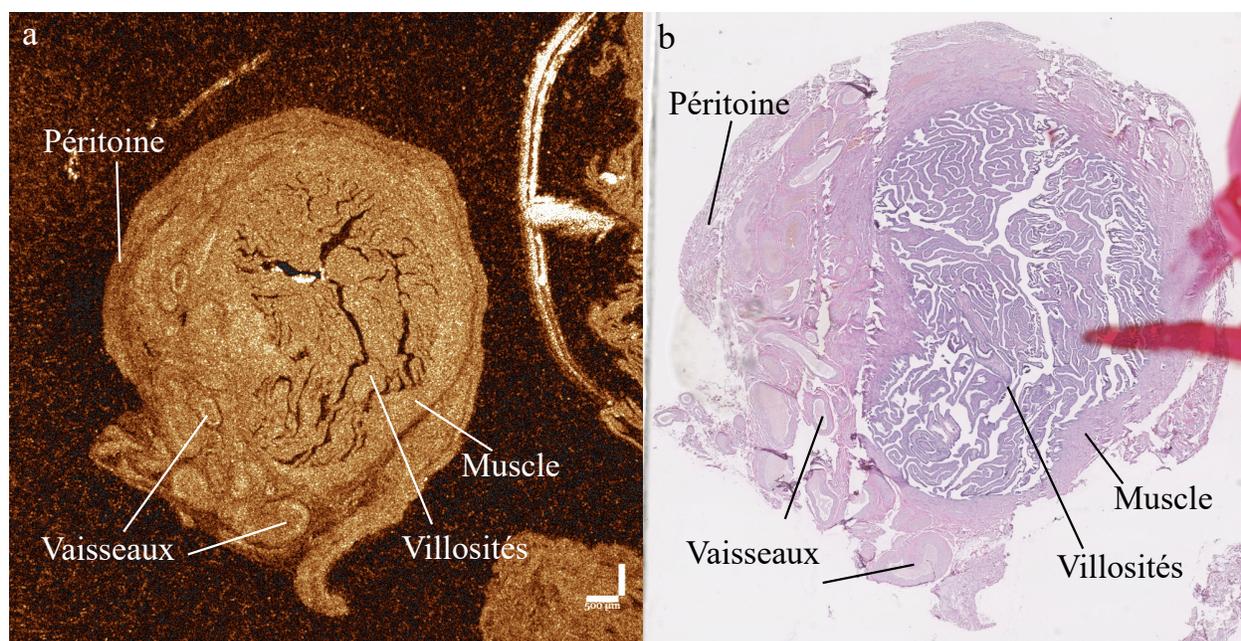


Figure 5.10 Structure transverse d'une trompe de Fallope saine à l'OCT et à l'histologie. En (a), on retrouve un segment situé au niveau de l'ampoule en vue transverse. En (b), on retrouve l'histologie correspondante. La région pertinente pour la suite de l'étude est celle définie par les villosités, à l'intérieur de la paroi musculaire. Échantillon tiré du bloc 10476A3. Barre d'échelle : 500 μm .

Ces structures varient tout au long de la trompe sur une même patiente, chaque segment de la trompe étant proportionné différemment. Sur la figure 5.11, trois coupes sont présentées : la

première dans la partie centrale (ampoule) et la seconde dans la partie distale (infundibulum) et la troisième dans la partie proximale (isthme) de la trompe d'une même patiente. Sur chacune des coupes sont identifiées les trois principales régions ou tuniques tubaires : le péritoine ou la séreuse, la paroi musculaire (myosalpinx) et les microvillosités ou la muqueuse (endosalpinx). Sur la coupe en 5.11(a) et (d), on retrouve une condition bénigne nommée corps de Walthard. Il s'agit d'une excroissance de cellules épithéliales ovariennes pouvant contenir des inclusions kystiques et pouvant atteindre 6 mm.

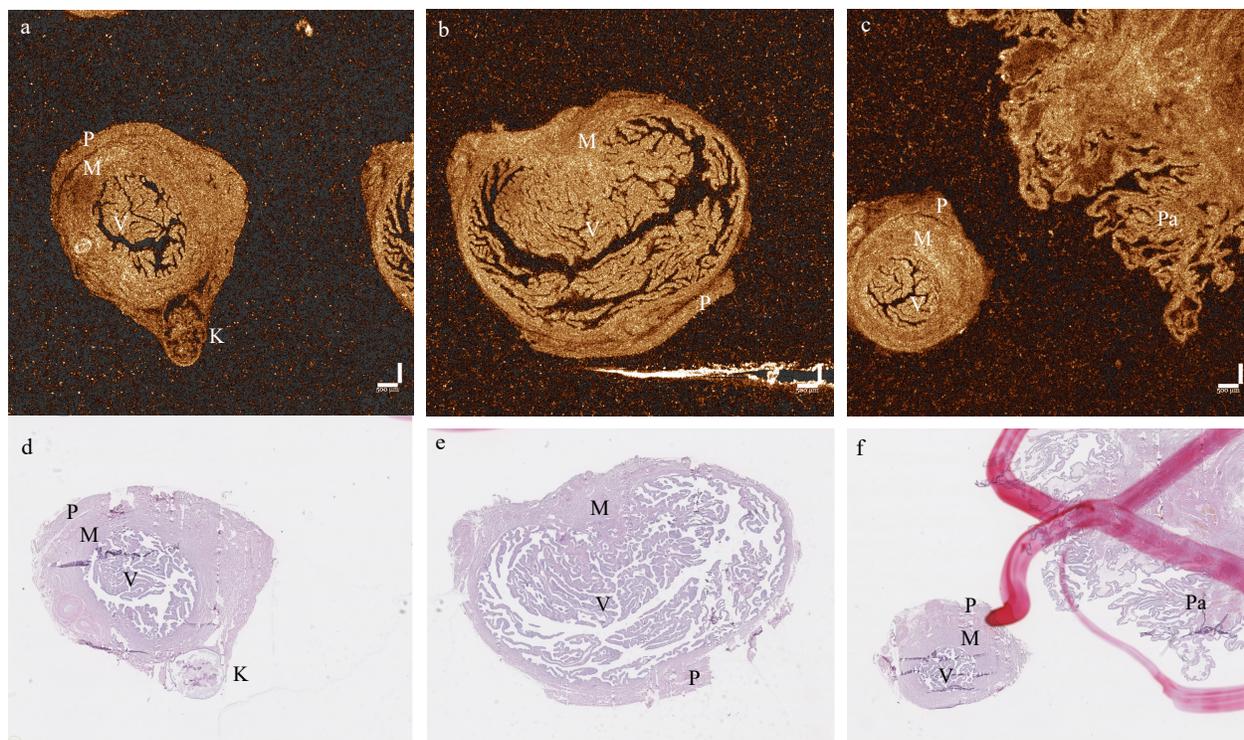


Figure 5.11 Changement morphologique longitudinal de la trompe de Fallope à l'OCT et à l'histologie. En (a), un segment situé centre de la trompe, dans l'ampoule en vue transverse. En (b), un segment de la trompe distale (l'infundibulum) est présenté. En (c), la partie inférieure gauche de l'image présente un segment proximal (l'isthme) et la partie supérieure droite une petite région du pavillon (Pa), dans la partie frangée. En (d), (e) et (f) sont présentées les histologies correspondantes à (a), (b) et (c) respectivement. Sur chaque coupe sont identifiées les régions des villosités (V), la paroi musculaire (M) et le péritoine (P). Sur les coupes (a) et (d), un corps de Walthard (K) est présent. Échantillon tiré du bloc 14369A12. Barre d'échelle : 500 μ m.

La figure 5.11 présente les changements morphologiques dans l'axe longitudinal de la trompe de Fallope pour une même patiente. La sous-figure 5.11(a) et son histologie correspondante en 5.11(d) montrent une trompe avec un lumen d'environ 4 mm. La sous-figure 5.11(b) et

son histologie correspondante en 5.11(e) présentent la région transitoire entre la trompe et le pavillon, où on y retrouve un lumen d'environ 8 mm. Dans la sous-figure 5.11(c) et son histologie correspondante 5.11(f), on retrouve deux structures. La première dans la partie inférieure gauche est une section transverse de la trompe prise dans l'isthme alors que la structure dans la partie supérieure droite est un fragment de la partie frangée du pavillon. Le segment d'isthme présente la section la plus étroite de la trompe et montre ici un lumen d'environ 2 mm. Le pavillon quant à lui constitue l'extrémité distale de la trompe qui enveloppe une partie de l'ovaire. Le pavillon est la plus grosse partie de la trompe et présente sur ses deux faces des structures en cryptes comme celles pointées (extension des microvillosités). Il s'agit d'une zone cruciale à analyser, bien qu'elle représente un défi dû à sa grande taille.

Ces images à elles seules ne permettent pas d'apprécier combien varie la muqueuse. Une première variation importante est la densité des microvillosités selon l'âge de la patiente. En effet, plus l'âge de la patiente augmente, plus les villosités s'atrophient et se raréfient, ce processus s'accéléralant après la ménopause jusqu'à ne laisser qu'un tube à la muqueuse lisse. La figure 5.12 en présente quelques exemples. Chacune des coupes a été prise dans l'ampoule à des fins de comparaison. La sous-figure 5.12a) et son histologie correspondante en 5.12 d) présentent un segment de trompe avec une paroi musculaire fine et des villosités très épaisses, ce qui est caractéristique d'une femme peu avant sa ménopause. Ainsi, la trompe est plus souple, mais plus densément peuplée à l'intérieur. La sous-figure 5.12b) et son histologie correspondante en 5.12e) présentent un autre cas de figure où la paroi musculaire est épaisse, mais les villosités plus fines et plus compactes. On peut présumer une patiente plus jeune et une trompe plus rigide que dans le cas précédent. Enfin la sous-figure 5.12c) et son histologie correspondante en 5.12f) présentent le cas de la section transverse d'une trompe d'une femme post-ménopausée et avancée en âge. On y retrouve un lumen pratiquement sans villosités. De plus, la paroi musculaire est particulièrement épaisse. Certaines trompes peuvent également être plus ou moins tortueuses et présenter des rétrécissements ou des obstructions, comme dans le cas de la figure 5.12f), où la trompe se subdivise en deux lumens distincts. Plusieurs types d'obstructions peuvent survenir, soit de nature structurelle, kystique, ou autre. En effet, il peut arriver que les trompes aient subi des torsions à un quelconque moment dans la vie de la patiente, et se retrouveront donc entortillées et plus difficiles à naviguer. Il s'agit de conditions bénignes, mais impossibles à prédire avant analyse interne de la trompe. Il s'agit du genre de condition qui n'augmente pas les facteurs de risques en cas de cancers ovariens ou associés à l'ovaire, mais qui peuvent avoir un impact sur le plan de la fertilité.

Conclusion : En dépit de la variabilité, il est possible de bien se situer à l'intérieur des trompes et nous sommes en mesure, à partir des images OCT, de retrouver les structures d'intérêt (villosités, muscle, vaisseaux sanguins, péritoine). Les deux éléments qui pourraient

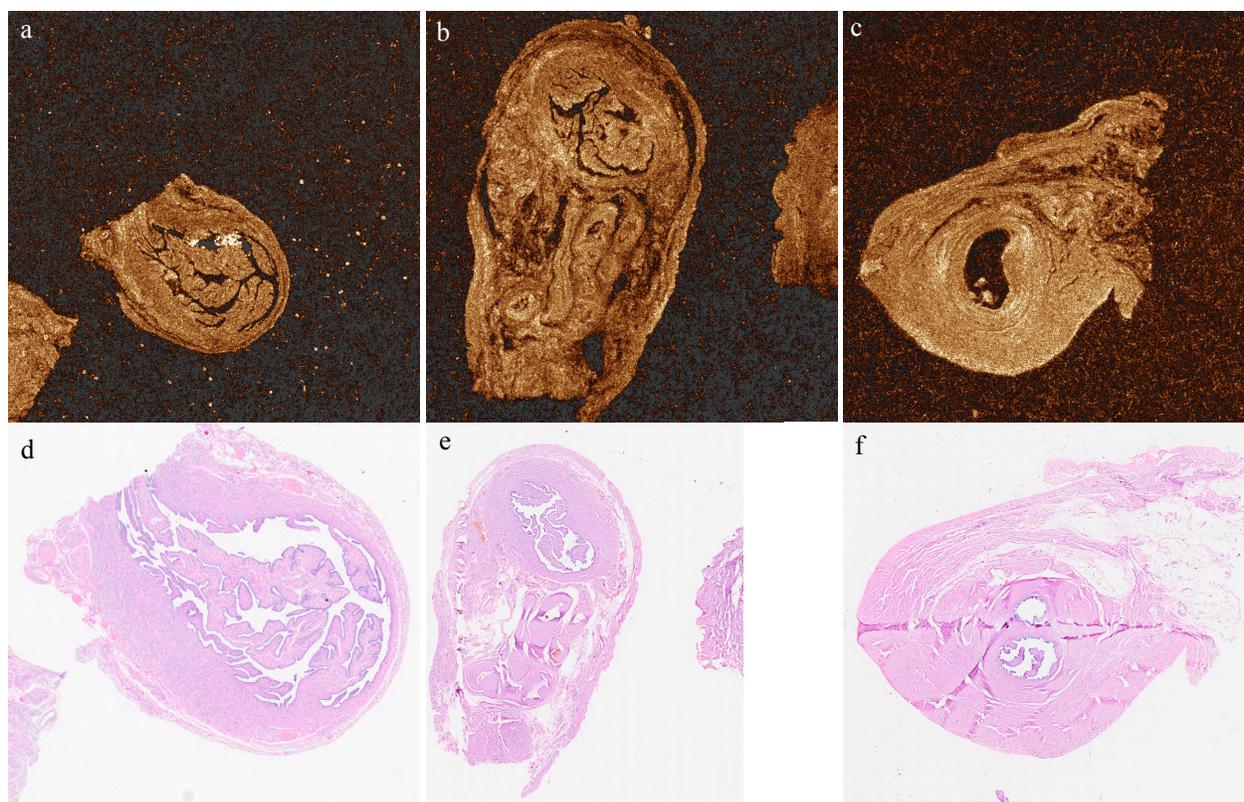


Figure 5.12 Variabilité en âge et en densité des trompes à l'OCT et à l'histologie. En (a), un segment situé au niveau de l'ampoule est présenté en vue transverse, présentant des villosités plus épaisses et avec une paroi musculaire mince (la membrane séreuse a été retirée). En (b), un segment de l'ampoule est montré, mais présentant des villosités plus fines et une paroi musculaire très épaisse (ici la membrane séreuse a été conservée). En (c), un segment de l'ampoule d'une patiente âgée est présenté, où les villosités ont complètement disparu post-ménopause. Il n'y reste que la paroi musculaire lisse, qui est particulièrement épaisse. En (d), (e) et (f) sont présentées les histologies correspondantes à (a), (b) et (c) respectivement. Échantillons tirés des blocs 9004B3, 14144A11 et 9068B12 dans l'ordre. Barre d'échelle : 500 μm .

impacter le plus l'insertion de la sonde sont l'épaisseur de la paroi musculaire et la densité des villosités.

5.2.4 Échantillons de trompes avec STICs

Une condition particulièrement importante à détecter dans les trompes de Fallope est le carcinome intraépithélial tubaire séreux ou STIC (l'acronyme tient pour la version anglaise *Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma*). Cette condition est un carcinome *in situ* qui peut se

propager selon deux voies : s'infiltrer au-delà de la membrane basale (donc désormais à haut potentiel métastatique) et par propagation pagetoïde, en longeant la muqueuse séreuse. Étant donné sa situation dans la trompe, il est également mobile par ce second processus. Le tissu peut s'effriter et la masse cancéreuse de quelques centaines de micromètres à peine peut aller s'implanter ailleurs (par exemple sur l'ovaire, dans le péritoine ou dans la cavité abdominale). Il s'agit d'une seconde voie métastatique très efficace. Ce type de lésion constitue le nerf de la guerre en terme de dépistage précoce. Malheureusement, ces carcinomes sont difficiles à trouver cliniquement étant donné leur faible taille et le grand volume des trompes de Fallope. Depuis 1999, seulement 12 cas ont été relevés sur tous les cas de la biobanque au CHUM et ce sont ces cas qui seront étudiés dans l'analyse qui suit.

Les STICs se présentent avec une grande variété de formes et de tailles. L'évolution à partir de l'épithélium normal est présentée à la figure 5.13. Il s'agit du consensus actuel des chercheurs, bien que plusieurs autres théories sont proposées pour tenter de décrire les conditions d'apparition des STICs. Un épithélium séreux sain montre des caractéristiques variables, comme une monocouche de cellules ou un épithélium pseudo-stratifié, la présence de lymphocytes en petite quantité, la forte présence de cellules sécrétoires et de cellules ciliées, ainsi que des noyaux cellulaires ronds et une très faible activité mitotique. Les pathologistes doivent s'entraîner à cataloguer les différentes formes de l'épithélium sain, car il peut présenter plusieurs variations morphologiques qui sont tout de même saines. Un des exemples les plus frappants est un artéfact de coupe, qui fait en sorte que l'épithélium semble présenter plusieurs couches de cellules, alors qu'il n'y en a qu'une seule. Un exemple d'épithélium sain est présenté à la figure 5.13(a). On y retrouve le stroma (S) d'une villosité de la trompe, entouré de son épithélium (Ep), sous forme d'une couche mauve plus foncée. Plusieurs cellules typiques de l'épithélium tubaire y sont présentes : un lymphocyte (tête de flèche blanche), une cellule ciliée (tête de flèche noire) et une cellule sécrétoire (tête de flèche rouge). L'épithélium supérieur de la villosité semble se présenter avec plusieurs couches de cellules, alors qu'il n'en est rien.

Une lésion précurseur survient quand les cellules épithéliales commencent à démontrer des signes de noyaux atypiques ou s'organisent en une architecture atypique [132]. La figure 5.13(b) montre une telle lésion. La région atteinte est notée par l'accolade, alors que le reste de l'épithélium est sain (vis-à-vis l'astérisque). La transition entre la lésion STIL et le STIC se produit quand l'index de prolifération cellulaire dépasse la barre des 10 % (mesurable avec une teinture au Ki-67 comptant la fraction de noyaux teints par l'anticorps). En général, pour un STIC établi, l'index de prolifération dépasse les 50 %. Ils présentent en plus une architecture atypique, une forme de noyaux atypique, une perte de polarité des noyaux et un ratio noyaux/cytoplasme supérieur à la normale [133]. Un exemple de STIC est présenté

à la figure 5.13(c), avec un encadré sur la région transitoire. Le losange indique la région STIC, alors que les astérisques dans l'agrandissement montrent les régions d'épithélium sain. Le carcinome se compose de plusieurs couches de cellules agencées de façon désordonnée. Les STICs ont des tailles allant de quelques dizaines de cellules épithéliales à quelques centimètres carrés en surface. Les masses STICs les plus importantes en volume se retrouvent sur la partie frangée du pavillon de la trompe, alors que les lésions STICs de petite taille ou couvrant une grande surface se retrouvent dans le tiers distal de la trompe de Fallope.

La figure 5.14 présente à quoi ressemble un carcinome in situ dans les trompes de Fallope vue à OCT (a) avec l'histologie correspondante (b). Il s'agit d'une masse de plusieurs millimètres sur la partie frangée du pavillon de la trompe. Le STIC mesure 5 mm par 7 mm selon les grandes diagonales. La région notée C sur les deux sous-figures indique le STIC, alors que la région saine du stroma est noté S. Une limite claire entre les deux régions est visible à la fois à l'OCT et sur la section histologique correspondante. Enfin, des trous de poinçon sont visibles sur les deux images.

La figure 5.15 présente le cas plus subtil d'un STIC à grande surface à l'intérieur de la trompe. La sous-figure (a) présente l'image OCT en face et la sous-figure (b) présente l'histologie correspondante. Ici la mention *grande surface* réfère au fait que le STIC se propage de façon pagetoïde (il s'étend comme un tapis à l'intérieur de la trompe). La tranche transverse de l'histologie ne capture qu'une ligne de cet étalement. Sur la figure 5.15, on note l'épaississement de l'épithélium caractéristique du carcinome in situ. Ces épaississements se retrouvent également sur les images OCT, comme une ligne plus brillante bordant le tissu (têtes de flèche rouge et noire). En contraste, l'épithélium sain n'est presque pas visible à l'OCT, la taille des cellules étant inférieure à la résolution (tête de flèche blanche bordée bleue). Sur la figure, le champ de vue est de 4 mm.

Conclusion : Le cas des STICs à grande surface est plus difficile à détecter que celui des STICs en volume. Ce type de condition n'a aucune chance d'être détecté à l'examen macroscopique clinique. Même avec le protocole SEE-FIM, beaucoup plus lourd, il peut encore passer inaperçu en dépit des efforts. Un STIC peut avoir une surface de plusieurs centaines de microns carrés et passer inaperçu entre les deux échantillons séparés de 2 mm. Il en va de même pour un STIC massif de 1 mm de diamètre, trop petit pour être aperçu en surface du pavillon. L'OCT permet de venir sonder rapidement la totalité du pavillon, en surface et légèrement en profondeur afin d'y trouver les STICs massifs. Dans le cas des STICs à grande surface, en bas d'un certain niveau d'épaississement de l'épithélium, il ne sera pas possible de les détecter même à l'OCT. Cette technique, plus performante que l'examen macroscopique, ne sera pas en mesure de discerner un STIL d'un épithélium normal, ou même d'un STIC en

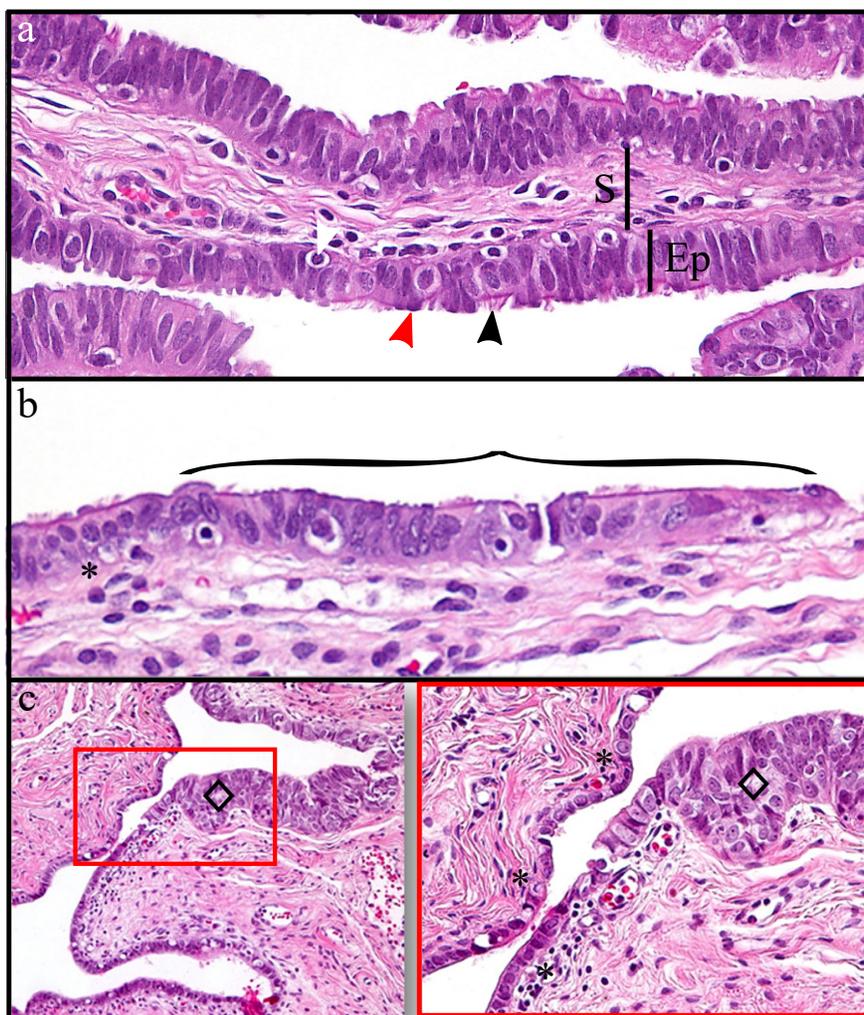


Figure 5.13 Évolution d'un épithélium sain de trompe à une lésion intraépithéliale tubaire, puis à un carcinome intraépithélial tubaire séreux. En (a), une microvillosité à l'intérieur de la trompe montre un stroma sain (S) entouré de son épithélium (Ep). On y retrouve les cellules typiques de l'épithélium tubaire : les lymphocytes (tête de flèche blanche), les cellules ciliées (tête de flèche noire) et les cellules sécrétoires (tête de flèche rouge). Une lésion STIL est présente en (b) dans la région marquée par l'accolade. L'épithélium sain est situé au-dessus de l'astérisque (*). En (c), on retrouve un carcinome (STIC), avec un agrandissement de la région de transition d'épithélium. Le carcinome est situé dans la région notée par un losange, alors que l'épithélium sain est situé dans les régions notées par l'astérisque (*). Les histologies sont modifiées de [132].

début de prolifération. Dans le cas d'un épaissement conséquent (3 à 4 couches de cellules épithéliales), il est possible de voir le STIC à l'OCT sans l'endommager. Cette taille de carcinome passe totalement inaperçue à l'examen macroscopique et rien ne garantit l'absence de cette condition avec le protocole SEE-FIM. L'OCT semble donc manquer de sensibilité

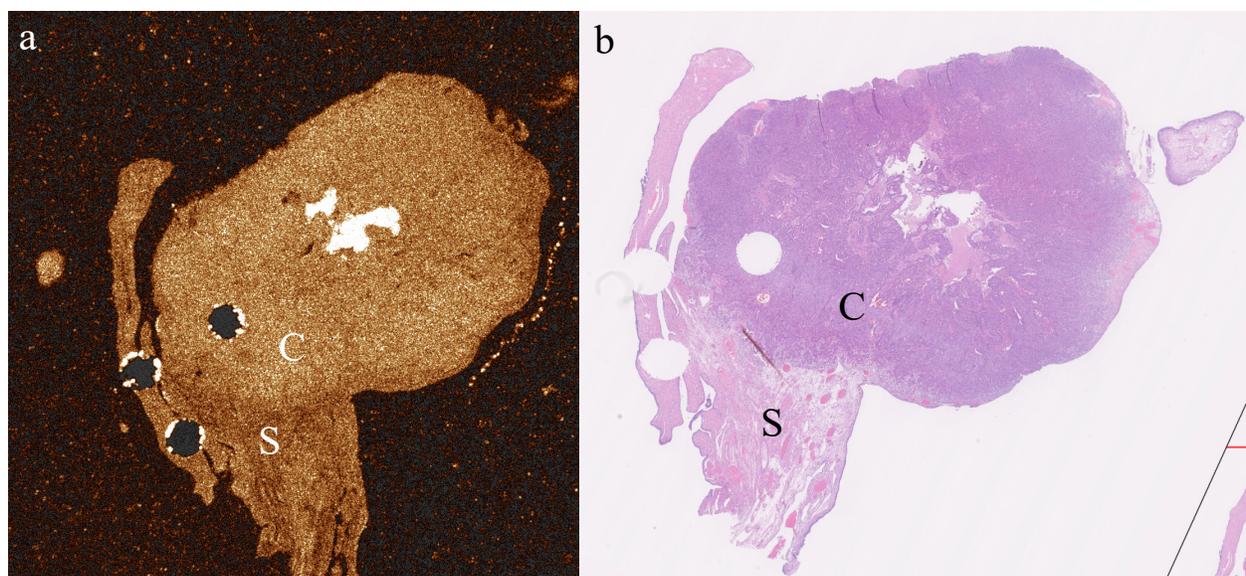


Figure 5.14 Carcinome intraépithélial tubaire séreux (STIC). La sous-figure (a) présente le premier plan en face non saturé du volume OCT et la sous-figure (b) présente l'histologie correspondante. Le carcinome (C) est clairement discernable du stroma (S). Le STIC est constitué d'un amas de cellules denses à gros noyaux, se traduisant par davantage de signal rétrodiffusé à l'OCT et à une plus grande proportion d'hématoxiline (mauve) sur l'histologie. Échantillon tiré du bloc 6894B17.

pour les lésions de très petite taille.

5.2.5 Échantillons de tumeurs ovariennes

Étant donné la grande rareté des échantillons de STICs, il a été décidé de valider le potentiel de l'OCT à discerner les tissus pathologiques des tissus sains à l'aide de spécimens de tumeurs d'un tissu proche de la trompe, soit l'ovaire. Pour cette portion de l'étude, nous avons sélectionné les 5 catégories de tumeurs ovariennes les plus fréquentes. Il s'agit des tumeurs de types séreuses (redivisées en haut et bas grade), mucineuses, endométrioïdes et à cellules claires.

Résultats d'imagerie OCT de pathologies de l'ovaire

Les tumeurs de catégorie séreuse se présentent habituellement de la façon de la figure 5.16 à l'OCT, selon le grade. Les tumeurs de bas grade sont morphologiquement différentes de celle de haut grade. Cependant, les zones de tumeurs présentent des textures caractéristiques. Les tumeurs de haut grade (moitié du haut de la figure 5.16) montrent des masses très compactes

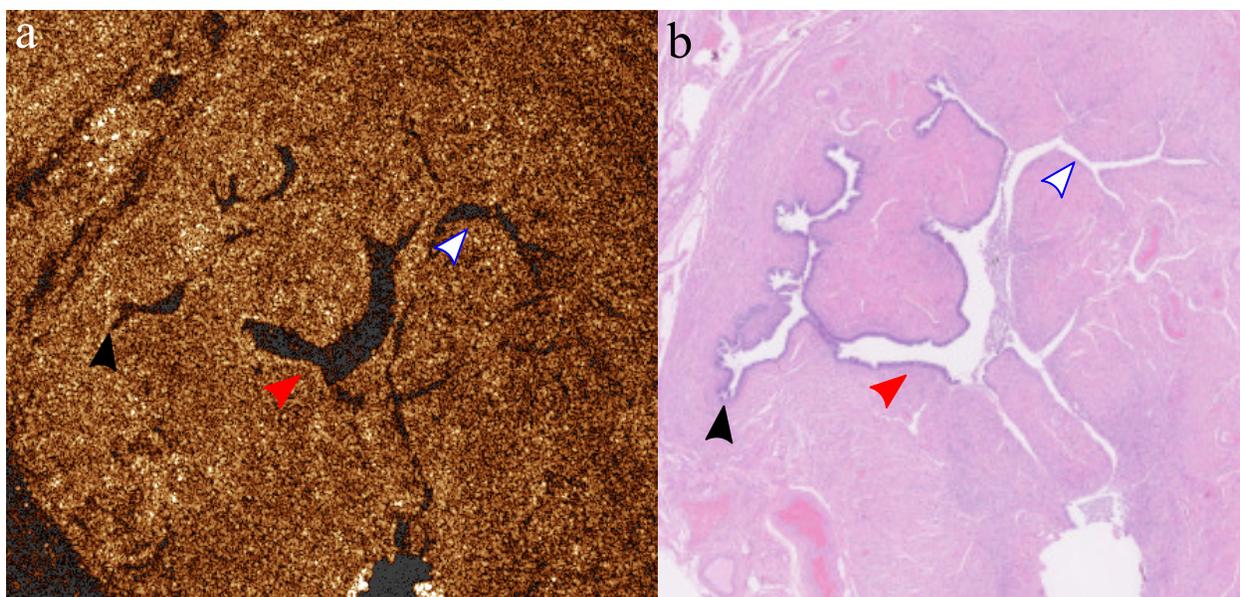


Figure 5.15 Carcinome intraépithélial tubaire séreux (STIC) de grande surface. Ce type de STIC prend la forme d'une grande surface d'épithélium légèrement épaissi, sans former de masses compactes volumineuses. En (a), le premier plan non saturé du volume OCT présente la section transverse d'une trompe de Fallope. En (b) se retrouve l'histologie correspondante. Les têtes de flèche noire et rouge pointent des régions du STIC se présentant comme un épaississement de l'épithélium. La tête de flèche blanche bordée bleue pointe un segment d'épithélium sain, dont l'épaisseur est plus petite que la résolution de l'OCT. Le champ de vue est de 4 mm. Échantillon tiré du bloc 641A12.

de cellules avec un faible ratio cytoplasme/noyau (notées *), qui diffusent davantage que le stroma sain, indiqué par la flèche. Il s'agit de carcinome à architecture solide. Dans le cas des tumeurs de bas grade (moitié du bas de la figure 5.16), les régions tumorales sont indiquées par une croix, dans une structure toujours plus diffusante que le stroma sain (flèche), mais moins compacte que dans le cas de haut grade. Il s'agit d'une architecture papillaire caractéristique de l'épithélium séreux dans les tumeurs de bas grade. Les trous, indiqués par des cercles, proviennent de carottes de tissus extraites pour des analyses génétiques et protéomiques sur cet échantillon.

Les tumeurs de catégorie endométrioïde se présentent comme des inclusions d'endomètre dans le stroma. La figure 5.17 présente un exemple de tumeur endométrioïde. On y retrouve une architecture villo-glandulaire (*) similaire à l'endomètre utérin, qui pousse à même le stroma sain (flèche). Des vaisseaux sanguins de très grande taille par rapport à la normale sont également visibles (+), de même que des trous (o) issus de portions d'échantillons prélevés à même le bloc.

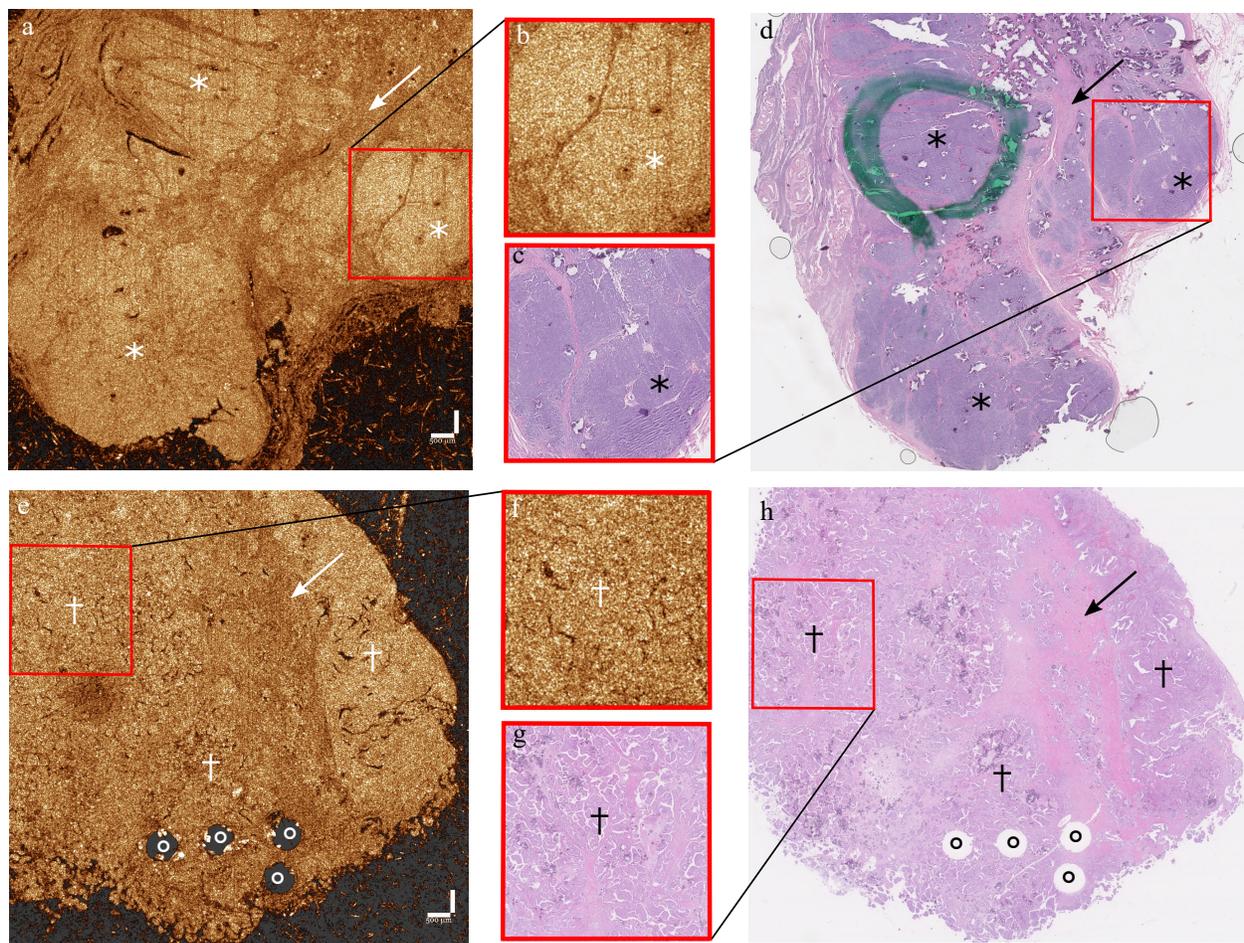


Figure 5.16 Tumeurs de type séreux vues à l'OCT et à l'histologie. En (a), un segment de tumeur ovarienne de haut grade séreux est présenté, avec un agrandissement d'une zone cancéreuse présenté en (b). L'histologie correspondante est présentée en (d), avec un agrandissement (c) de la zone correspondante à (b). Ce type de tumeur est réputé provenir de la trompe et présente des carcinomes à architecture solide (*) entourant le stroma (flèche). En (e), un segment de tumeur ovarienne de bas grade séreux est présenté, avec un agrandissement d'une zone cancéreuse présenté en (f). L'histologie correspondante est présentée en (h), avec un agrandissement (g) de la zone correspondante à (f). Ce type de tumeur est plutôt issu d'implants de cellules saines de trompe et présente une architecture papillaire (croix) entourant le stroma (flèche). Des trous (cercles), proviennent de sections prélevées pour des analyses externes. Échantillons tirés des blocs 8962A6 (HGS) et 25164B2 (LGS). Barre d'échelle : 500 μm

Les tumeurs de catégorie mucineuse se présentent de façon différente. Elles se retrouvent souvent en surface, visibles comme une discontinuité d'épithélium. Deux exemples de cancer, linéaire et massif, sont présentés dans la figure 5.18. Les flèches indiquent des zones de croissance de l'épithélium colonnaire stratifié présentant une architecture glandulaire. Il

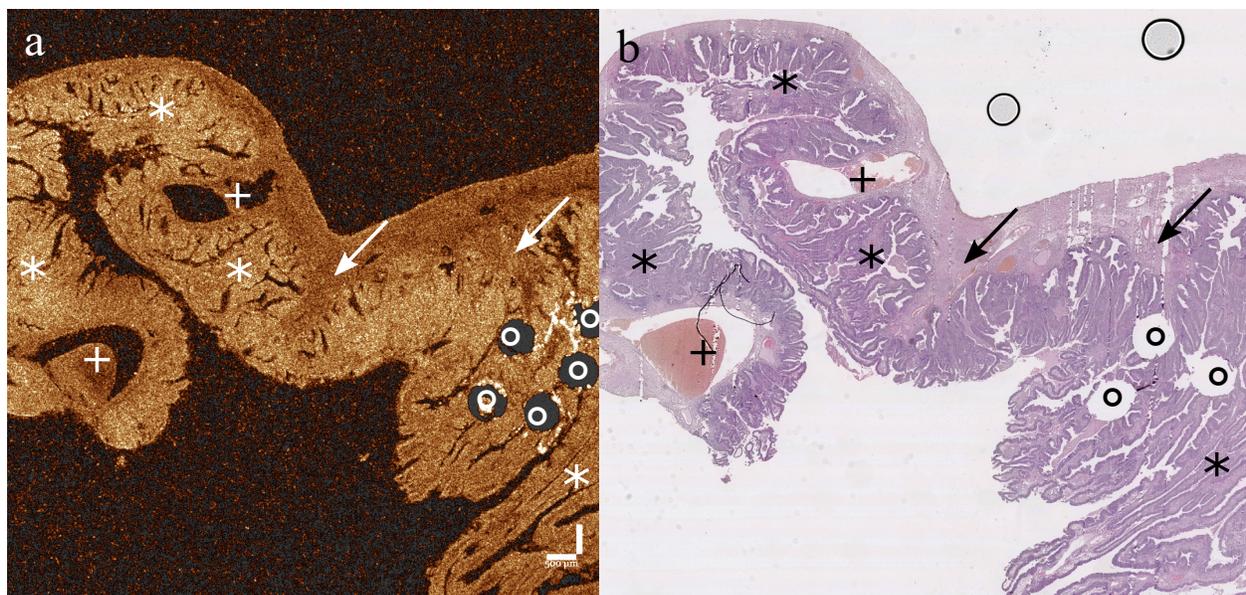


Figure 5.17 Spécimen de tumeur endométriöide. L'image (a) présente le premier plan en face non saturé d'un volume OCT et l'image (b) donne l'histologie correspondante. Il existe correspondance entre les structures visibles selon les deux procédés : l'architecture villo-glandulaire (*) occupe la majeure partie du spécimen, en croissance à partir du stroma (flèche). Des vaisseaux sanguins de grande taille sont visibles (+), alors que ceux de l'ovaire sain sont de taille substantiellement plus petits. Des trous d'extraction de carottes de tissu sont également présents (o). Échantillon tiré du bloc 6879A5. Barre d'échelle : 500 µm.

s'agit d'un épithélium semblable à celui de l'intestin. Une discontinuité est visible entre cet épithélium et le stroma.

Enfin, les tumeurs de la catégorie cellules claires sont les plus difficiles à distinguer. En effet, les cellules changent de contenu, une différence subtile sur le plan morphologique. La figure 5.19 présente un spécimen de tumeur à cellules claires. L'ovaire est envahi par un amas désordonné de cellules de tailles différentes agencées dans une architecture tubulo-kystique. Les cellules remplies de glycogène et des masses glandulaires (flèches) se répartissent entre des régions plus denses en cellules, ces deux régions étant distinctes du stroma (tête de flèche). Deux trous dus à des extractions d'échantillons sont visibles (o).

Conclusion : Les tumeurs ovariennes peuvent être différenciées qualitativement sur une image OCT en coupe transverse. Chacune présente son type d'architecture et il existe une bonne corrélation entre les structures visibles à l'OCT et à l'histologie. Cependant, étant donné le très grand volume de données à analyser, il serait pertinent d'automatiser la classification des types de tissus.

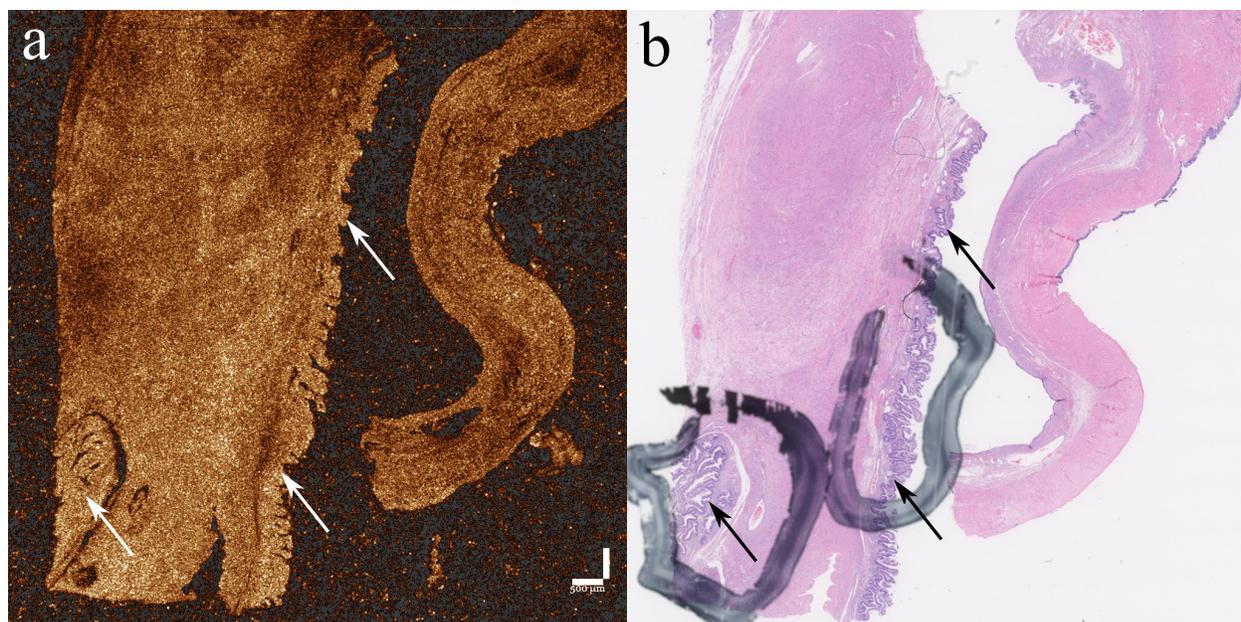


Figure 5.18 Spécimen de tumeur endométrioïde. L'image en (a) présente un plan en face issu d'un volume OCT et l'image (b) présente l'histologie correspondante. Un épithélium discordant par rapport à l'épithélium ovarien cubique simple est distinctement visible sur les deux images (flèche). La tumeur se présente comme une architecture glandulaire qui diffère du stroma sain. Échantillon tiré du bloc 19505A13. Barre d'échelle : 500 µm.

5.3 Conclusion

L'OCT permet de visualiser les tissus gynécologiques dans une analyse tri-dimensionnelle qui donne également accès à une information en profondeur, sans avoir besoin de couper, fixer et teindre l'échantillon. Les volumes acquis font 10×10 mm latéralement par 5 mm en profondeur. Il existe une valeur ajoutée à analyser un volume de données plutôt qu'une image bi-dimensionnelle, en ce sens où le volume permet de limiter les problématiques de positionnement (la prise d'une image d'une dizaine de microns de largeur par quelques millimètres de longueur et de profondeur peut être difficile à reproduire d'un échantillon à l'autre ou dans une étude longitudinale d'un temps d'analyse à un autre). Ceci permet également de suivre certaines structures tri-dimensionnelles difficiles à interpréter sur une coupe 2D : par exemple, des vaisseaux sanguins par rapport à des glandes. Les images obtenues ont des profondeurs de l'ordre de 1.5 mm à 2 mm avec une résolution axiale de 15 µm dans l'air. Les résolutions latérales sont de l'ordre de 25 µm dans les deux directions complémentaires.

Avec ces résolutions et profondeurs de pénétration, les différentes couches anatomiques ont pu être distinguées sur les trois modèles animaux. Le cortex ovarien est distinguable de la

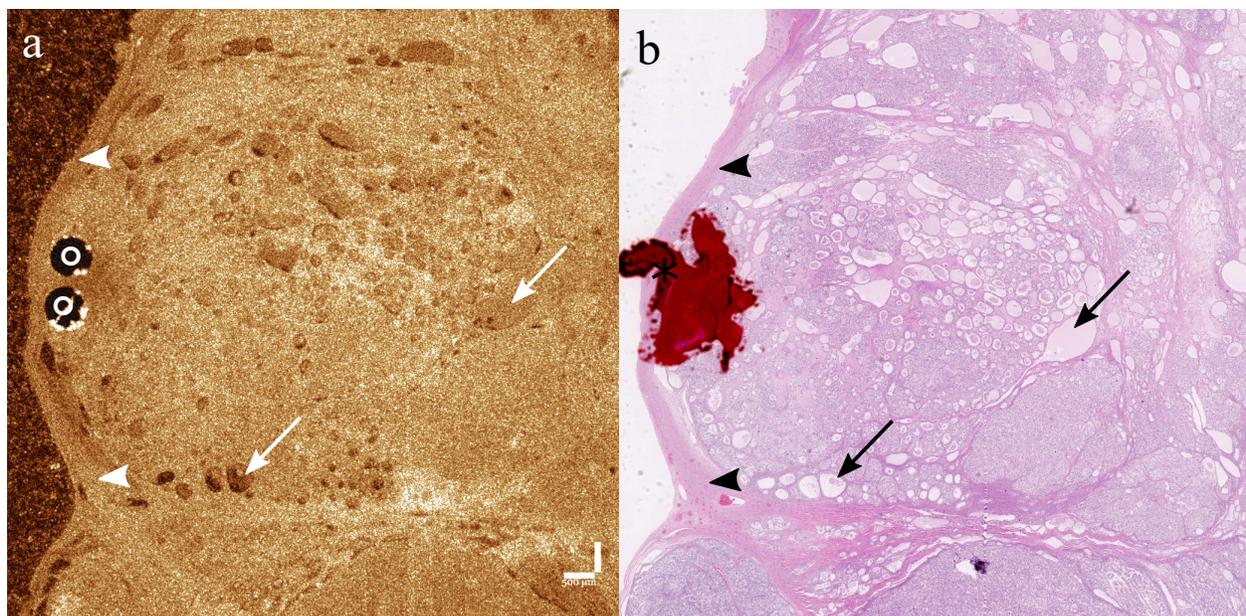


Figure 5.19 Spécimen de tumeur à cellules claires. Une coupe en face du volume OCT est présentée en (a) et son histologie correspondante en (b). Les flèches pointent des structures glandulaires et kystiques enchevêtrées avec des amas plus denses de cellules. Le stroma sain est indiqué par des têtes de flèche. Deux trous d'échantillonnage sont présents dans l'image OCT. Échantillon tiré du bloc 14958A10. Barre d'échelle : 500 µm.

médulla et la couche d'épithélium germinale peut être visible. Des follicules ovariens à divers stades de développement ont également pu être imagés (taille variant de quelques dizaines de microns à plusieurs millimètres de diamètre). Les modèles animaux employés ont des trompes de Fallope avec un péritoine et une membrane musculaire très fine, ce qui permet d'imager à travers la trompe. Lors de l'imagerie de l'utérus, l'épithélium utérin a pu être observé, de même que l'endomètre avec ses glandes et la paroi musculaire.

Suite aux observations présentées dans ce chapitre, on conclut que l'OCT permet de différencier les tissus gynécologiques de trois modèles animaux (souris, porc et chien). Les spécimens analysés incluent l'utérus, la corne utérine, la trompe de Fallope et l'ovaire. À la suite de cette analyse, il ressort que la souris est un bon modèle morphologique, mais ne présente pas les dimensions suffisantes pour répliquer de façon fidèle les trompes humaines (un facteur homothétique d'environ 8 à 10 est présent entre les dimensions des trompes murines et humaines). Le meilleur modèle trouvé est le porc, conditionnellement à ce que ce dernier ait une taille suffisante (plus de 45 kg). Il n'y a cependant pas de réplique de la partie frangée du pavillon de la trompe chez les animaux étudiés.

Des échantillons de trompes humaines en paraffine ont ensuite été étudiés. Tout d'abord,

des trompes saines ont été analysées pour comprendre leur morphologie interne de même que leur évolution longitudinale et selon certains facteurs comme l'âge de la patiente. Ceci a permis d'explorer le contexte morphologique des spécimens et d'établir certains requis pour l'élaboration d'une sonde, qui seront discutés dans le chapitre suivant. Des échantillons de trompes pathologiques (STICs) ont ensuite été analysés. Il en ressort certaines limitations de l'OCT sur le plan de la résolution qui ne permettent pas de voir tous les degrés de lésion. En particulier, lorsque les lésions ne font que quelques couches de cellules à peine, la résolution de l'OCT devient limitante pour distinguer ces cellules des tissus environnants. Cependant, lorsque les lésions font de l'ordre de plusieurs dizaines de micromètres, elles deviennent distinguables à l'OCT, même si elles proviennent de tissus fixés en paraffine.

Enfin, une étude a été réalisée sur les 5 types de tumeurs ovariennes le plus fréquentes. Ceci a permis de constituer un atlas d'images pour distinguer chaque type de tumeur, de même que d'apprendre à corréliser l'OCT et l'histologie sur ces spécimens. Une étude quantitative est également en cours pour établir des critères objectifs quantitatifs que l'on pourrait employer pour entraîner un algorithme de classification.

CHAPITRE 6 SONDES ENDOSCOPIQUES À FIBRE UNIQUE POUR L'IMAGERIE DES TROMPES DE FALLOPE

Ce chapitre présente le développement des prototypes de sonde permettant d'imager la surface interne des trompes de Fallope afin d'y découvrir des anomalies à signaler au diagnostic en pathologie. L'objectif premier du chapitre est de quantifier les performances d'imagerie modifiées par le passage d'un système de table à un système endoscopique dans le contexte clinique visé (peropératoire ex situ). De plus, ces endoscopes doivent être compatibles avec les requis cliniques et les réglementations actuelles. On rappelle que l'objectif de la thèse est d'analyser la muqueuse interne de la trompe de Fallope, un organe de 10 cm de longueur avec une ouverture variant de 1 mm à 1 cm en diamètre.

Une section méthodologie explique d'abord les requis quantitatifs et qualitatifs à rencontrer pour obtenir un outil utile en clinique dans un contexte peropératoire. Tel que discuté au chapitre 2, l'interférométrie en trajet commun est retenue comme approche pour simplifier les manœuvres d'alignement avec la sonde. Une sonde à canule fixe est présentée, avec les étapes de conception, d'assemblage et de caractérisation. Par la suite, une seconde sonde intégrant un micro-moteur est décrite, avec l'emphasis sur le moteur et les micro-miroirs fabriqués sur mesure, ainsi que l'assemblage et la caractérisation. Une comparaison des deux sondes avec la tête d'imagerie du système commercial de table est réalisée, autant sur le plan quantitatif que qualitatif. Des considérations de détection sont abordées afin d'optimiser la détection du signal en OCT. L'ensemble des éléments discutés dans ce chapitre mène ensuite à l'élaboration d'un protocole d'imagerie préclinique et clinique. Enfin, le chapitre se termine sur une discussion et une conclusion.

6.1 Méthodologie

Un endoscope utilisé sur des organes retirés lors d'une excision chirurgicale constitue un instrument médical actif de classe II. Il entre également dans la catégorie des instruments non-effractifs de classe I. Selon l'énoncé de politique *Ligne directrice - Orientation sur le système de classification fondé sur le risque des instruments autres que les instruments diagnostiques in vitro (IDIV)*, paragraphe 5, « la classification finale de l'instrument sera déterminée par la règle qui accordera le risque le plus élevé ». Il s'agit donc d'un instrument de classe II. Si les performances d'un tel dispositif justifient l'approbation par Santé Canada, il sera considéré comme un instrument actif de classe III, car une mauvaise lecture du diagnostic peut avoir des conséquences graves pour le patient (invalidité, mort), car il deviendrait « le seul déterminant

ou un déterminant essentiel » pour un diagnostic de cancer dans les trompes de Fallope.

Ces considérations sont prise en compte dans l'élaboration du cahier de charge pour la conception d'une sonde OCT permettant d'aller inspecter l'intérieur des trompes de Fallope. La section suivante détaille ces critères.

6.1.1 Critères de design

On souhaite dans un premier temps réaliser une sonde qui respecte les contraintes d'imagerie dans les trompes humaines, tout en demeurant le plus fidèle possible aux performances d'un système de table. Ce dernier est considéré comme référence pour la suite des travaux. Une certaine dégradation des performances est tolérable. Les principales valeurs cibles sont énumérées ici.

Zone de Rayleigh : minimum de $500\ \mu\text{m}$ à plus de $1\ \text{mm}$, car les villosités de la trompe s'étendent jusqu'à la paroi musculaire.

Résolution axiale et latérale axiale : $\leq 16\ \mu\text{m}$, latérale : $\leq 60\ \mu\text{m}$ dans la zone d'imagerie, afin de conserver une qualité d'image suffisante pour identifier les lésions.

Ouverture numérique : faible (≤ 0.1), car le système doit pouvoir préserver sa résolution sur plus de $500\ \mu\text{m}$

Efficacité de transmission du signal (plus de 75%). La qualité des sondes commerciales est comparable à cette valeur.

Efficacité de collection du signal (plus de 60%). On cherche la valeur la plus élevée possible afin de récolter les faibles signaux rétrodiffusés à de plus grandes profondeurs.

Taille (diamètre externe) : visée $1\ \text{mm}$, car il s'agit de la plus petite section de la trompe de Fallope humaine.

Longueur de la sonde visée : $10\ \text{cm}$, car il s'agit de la longueur moyenne d'une trompe humaine.

Imagerie avec et sans contact , car il peut y avoir des villosités en contact avec la sonde ou des régions remplies de fluide.

De plus, une série de critères qualitatifs devront être satisfaits pour que la sonde puisse être attrayante à utiliser.

- compatibilité avec l'usage clinique
- facilité d'utilisation en salle d'opération
- robustesse et fiabilité

- interchangeabilité (rapidité d’installation)
- possibilité d’accéder à l’intérieur des trompes
- résistance aux courbures et contraintes lors de l’insertion
- manœuvrabilité dans la trompe (négocier les tortuosités)
- ergonomie

Un autre aspect important est le temps d’installation requis pour rendre le système opérationnel. Ceci est amélioré en employant un disque dur à état solide pour l’acquisition des données et un système en configuration trajet commun. Ces modifications permettent de rendre le système opérationnel en moins de 5 min. Un premier prototype de sonde endoscopique tout-fibre a été développée afin de rencontrer les contraintes d’imagerie des trompes de Fallope humaines. Cette sonde sur mesure a été conçue et construite au laboratoire. La conception mécanique, la conception optique, l’assemblage, la caractérisation et le protocole d’imagerie sont présentés dans la section suivante.

6.2 Sondes à canule fixe

Une sonde OCT miniaturisable dans sa plus grande simplicité est une sonde sans mécanisme de balayage. En effet, les premières sondes à fibre unique dans la littérature sans mécanisme de balayage sont sorties à la fin des années 1990. Les quelques articles à cet effet présentent des implémentations permettant d’imager en face dans l’axe de la sonde. De plus, les modèles de prédiction des performances de ce type de sonde avec lentilles GRIN souffraient de trop grandes approximations et n’étaient donc pas fiables pour assister le design optique. Les premiers prototypes de sonde à vision latérale ont émergé environ en même temps et quelques publications ont présenté les premières sondes efficaces basées sur ce principe [134]. Les éléments à prendre en compte lors de la conception de sondes de très petite taille imageant latéralement sont la maximisation de l’efficacité de collection, la minimisation des pertes optiques dans la sonde, la résistance mécanique d’une sonde très fine, l’astigmatisme induit par les parois cylindriques pour la vue latérale et le compromis entre la profondeur d’imagerie et la résolution latérale.

La sonde à canule fixe est une sonde sans mécanisme de balayage. Elle permet de faire de l’imagerie dans la direction latérale de la sonde, le long du faisceau laser. Afin de former une image, on peut tourner la sonde afin d’imager les tissus autour de la circonférence ou tirer la sonde lors d’un « pull-back » afin de faire une image là où passe la sonde. En combinant ces deux mouvements, on peut faire un scan 3D des tissus en géométrie cylindrique. Cette configuration a été présentée plus en détails au chapitre 4.

6.2.1 Design mécanique

Afin de résister à l'insertion dans les trompes sans l'aide d'une canule externe, la sonde doit être rigide sur un minimum de 10 cm. Les parois de la sonde sont constituées de couches de capillaires de verre dur, laissant tout de même une légère flexibilité transversale. La tête de la sonde a été modelée avec de la colle optique pour être ronde avec une transition lisse vers la paroi externe de la sonde afin d'éliminer les risques de perforation et de limiter les dommages à la muqueuse durant l'insertion. Au bout des tubes de verre, la fibre optique est recouverte d'une couche d'hytrel afin de limiter les risques de dommages mécaniques durant la manipulation. La figure 6.1 présente les principales caractéristiques physiques de la sonde. La sonde réalisée, dont le diamètre final est de 1.2 mm, peut imager en contact et sans contact.

6.2.2 Design optique

Le diamètre externe de la sonde doit demeurer autour de 1 mm afin d'espérer accéder à l'intérieur de l'isthme (partie la plus petite de la trompe). L'optique de collimation a été implémentée directement dans la fibre optique, étant donné la faible disponibilité de pièces en micro-optique de moins de 1 mm. La sonde est faite de 2 m de fibre SMF-28 (Corning, USA), un espaceur de fibre sans coeur (NCF ou « No Core Fiber » - fibre de silice pure tirée sur mesure, COPL, Université Laval, Canada) et une fibre à gradient d'indice (GRIN - GIF625, Thorlabs, USA). La fibre SMF-28 possède un coeur de $8.2\ \mu\text{m}$, un diamètre externe de $125\ \mu\text{m}$ et une ouverture numérique (NA) de 0.12. La fibre NCF est hautement multimode avec une gaine en gel guidant, suivie d'une gaine d'acrylate standard. Le diamètre du coeur de silice est de $125\ \mu\text{m}$ avec 0.5 NA. La fibre GRIN est une fibre à gradient d'indice multimode tolérante aux courbures avec un coeur de $62.5\ \mu\text{m}$, un diamètre externe de $125\ \mu\text{m}$ et 0.275 NA. Les longueurs de l'espaceur ($180\ \mu\text{m}$) et du segment GRIN ($300\ \mu\text{m}$) sont choisies pour permettre une bonne qualité d'imagerie de la fin de la paroi externe de la sonde jusqu'à 2 mm hors de la sonde, avec une limite de diffraction simulée de moins de $60\ \mu\text{m}$ sur la zone d'imagerie de 2 mm. Afin de faire dévier les rayons et d'imager latéralement, un miroir cylindrique poli à angle (#47-628, Edmund Optics, USA) est ajouté face à la sonde fibrée, à l'intérieur du capillaire externe. Une déposition d'or a été réalisée sur le miroir afin d'améliorer les performances optiques (Laboratoire de Microfabrication, École Polytechnique Montréal). Le dépôt est une structure en trois couches de haute réflectivité et de haute qualité de surface : 30 nm de chrome, 200 nm d'or pur et une couche protectrice de 20 nm de silice pure. Avec ce nouveau dépôt sur le miroir, la transmission de la sonde est passée de 65 % à 95 %.

La figure 6.2 présente les principales caractéristiques optiques de la sonde simulées avec le logiciel OSLO (Lambda Research, USA). La figure 6.2(a) montre également les courbes

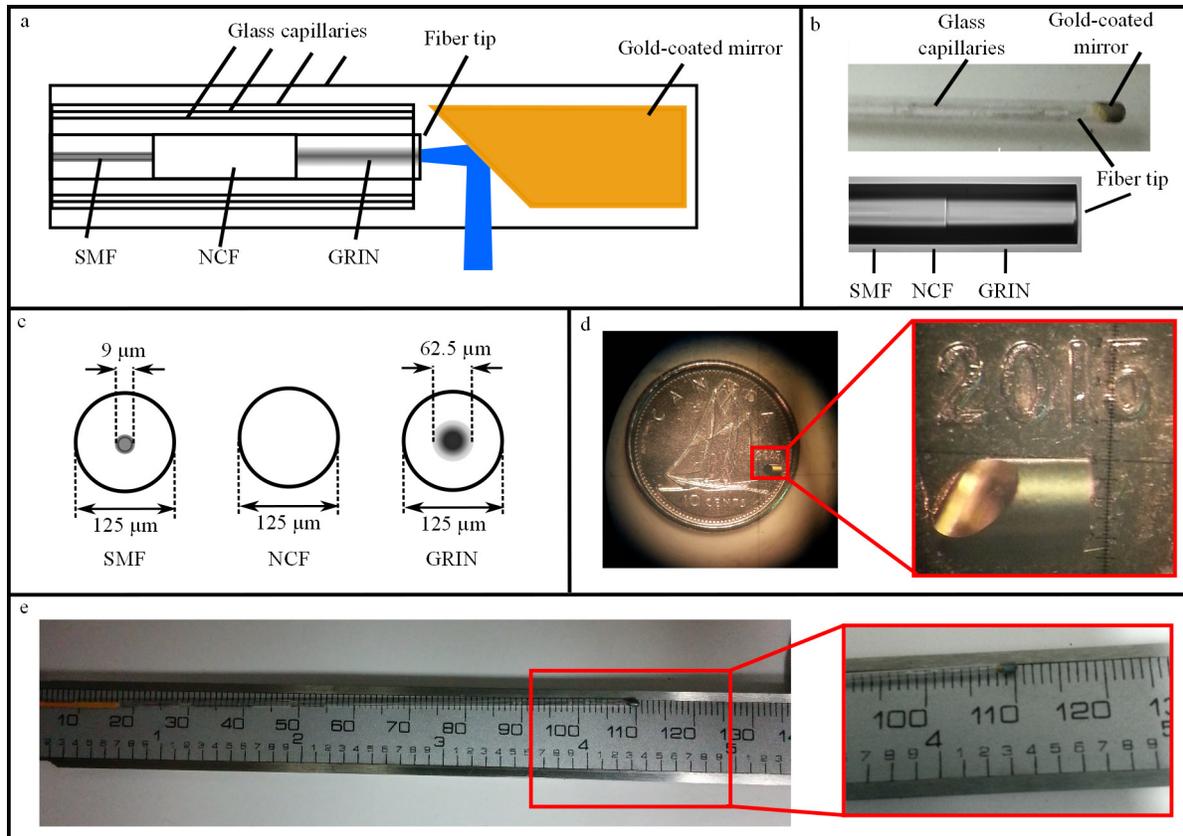


Figure 6.1 Schémas et photographies de la sonde terminée. (a) Schéma explicatif du fonctionnement de la sonde pour imager latéralement, le signal OCT étant présenté en bleu. (b) Photographie du bout de la sonde finale, avec un agrandissement au microscope de l'optique fibrée de collimation. (c) Caractéristiques physiques des trois fibres employées pour l'optique de collimation, soit une fibre monomode à 1300 nm (SMF), une fibre sans coeur (NCF) et une fibre à gradient d'indice (GRIN). (d) Photographie du miroir après la déposition d'or. (e) Photographie de la sonde finale, avec un agrandissement du bout.

d'aberration de la simulation, avec l'axe de propagation en z correspondant à la direction d'imagerie (ligne-A). La longueur focale effective de la sonde est de $256 \mu\text{m}$ et présente une NA de 0.024. Le décalage focal chromatique pour l'ensemble du spectre OCT de la source est de $10 \mu\text{m}$ entre 1250 nm et 1350 nm. La figure 6.2(a) montre aussi la fonction d'étalement ponctuel pour chaque axe transverse du faisceau, présentant un léger astigmatisme. Les courbes d'affaïssement de Coddington indiquent un faisceau quasi-parfaitement collimé dans les deux axes (x, y), avec une longueur focale résiduelle de -37 mm dans le plan des x et -2 mm dans le plan des y . La figure 6.2(b) montre le diagramme de tache (étalement du faisceau) du faisceau de sortie de la sonde pour 5 distances à partir de la paroi externe

de la sonde, s'étalant de 0 mm à 2 mm vers l'extérieur avec des incréments de 0.5 mm. Un disque d'Airy de $43\ \mu\text{m}$ est représenté en noir sur chaque schéma montrant que chaque rayon paraxial sortant de la sonde est inclus à l'intérieur de la limite de diffraction.

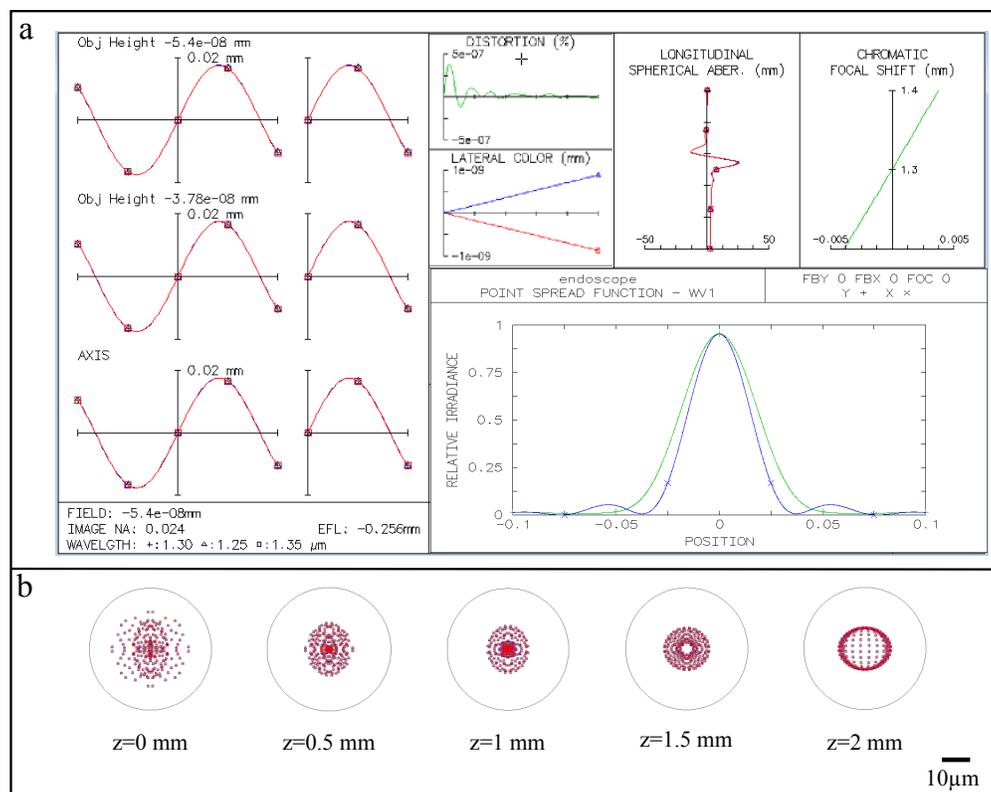


Figure 6.2 Performances optiques simulées de la sonde à canule fixe. (a) montre les courbes simulées pour les différentes aberrations (diagrammes de rayons, distorsion, étalement de couleur, aberration sphérique longitudinale et chromaticité de la focale), en plus de la fonction d'étalement ponctuel dans les axes x et y, faisant ressortir un léger astigmatisme de la sonde. (b) montre le diagramme de tache simulé dans Oslo pour 5 distances de la paroi externe de la sonde à 2 mm hors de la sonde. Chaque ligne-A est acquise dans la direction z. Pour (a) et (b), les unités sont des mm.

6.2.3 Assemblage

Les trois segments de fibre sont séquentiellement accolés ensemble au moyen d'épissures avec un système de fusion à filament (FFS-2000, Vytran Corporation, USA). Chaque pièce de NCF et de GRIN est précautionneusement accolée au segment précédent au moyen d'une épissure, puis clivée à la bonne longueur, mesurée et inspectée au microscope avec la caméra d'inspection du système de fusion. Cette partie de la sonde est ensuite insérée dans trois

capillaires de quartz propres (#CV2033, CV4055 and CV6084, VitroCom, USA), emboîtés de façon concentrique et maintenus centrés à l'aide de colle optique. Cette sonde encapsulée est ensuite insérée dans le tube externe de la sonde, également nettoyé avant insertion (#CV1012, VitroCom, USA). Le miroir d'or est placé au bout de l'assemblage. Quand un positionnement optimal de la sonde fibrée et du miroir est atteint, les composants sont collés ensemble avec de la colle optique curée à la lampe au mercure. L'embout de la sonde est ensuite modelé en colle optique de façon arrondie pour éviter d'abîmer les tissus lors de l'insertion de la sonde. Une couche de protection en hytrel 900 μm est ajoutée à la fibre à l'extérieur des capillaires de verre et une poignée de 2.4 mm de diamètre et de 5 cm de longueur est ajoutée pour manipuler la sonde de façon sécuritaire et rajouter une protection mécanique à la fibre.

6.2.4 Caractérisation

Une fois la sonde fabriquée, on s'assure qu'elle performe selon les critères du cahier de charge. La caractérisation est effectuée en deux temps. D'abord, les critères quantitatifs présentés dans le cahier de charge en début de chapitre sont mesurés un par un pour ce prototype. Ensuite, des séances d'imagerie sur des échantillons animaux permettent d'évaluer l'ensemble des critères de nature qualitative. Les sous-sections suivantes présentent les résultats de ces expériences.

Critères quantitatifs

La sonde est caractérisée optiquement afin d'assurer que les performances rencontrent celles spécifiées dans le cahier de charge et les simulations. Les résolutions latérales mesurées sont de 23 μm et 25 μm en x et y respectivement. Ces valeurs correspondent à la réponse d'étalement de bord mesurée à partir d'une cible de résolution USAF1951 et se comparent bien aux résolutions théoriques de 22 μm et 26 μm respectivement. La résolution axiale (z) est de 16 μm . La profondeur d'imagerie dans des échantillons biologiques diffusants comme le doigt et l'utérus est approximativement 2 mm.

La sonde est utilisée en interféromètre en trajet commun. Ceci permet d'en faciliter l'utilisation et le remplacement. Il n'y a pas de bras de référence externe à ajuster en longueur à chaque remplacement, la référence étant prise avec la réflexion sur la dernière interface verre-air au sortir de la fibre GRIN. La dispersion induite par les divers éléments optiques est également assurée d'être très proche pour les deux trajets dans l'interféromètre, par construction. Les ajustements nécessaires pour rendre la sonde fonctionnelle pour l'imagerie sont donc minimaux.

La comparaison des performances d'imagerie avec les valeurs attendues est présentée dans le tableau 6.1. La sonde a été testée en contournant l'interféromètre d'un système commercial à l'aide d'un circulateur afin d'utiliser la sonde en mode trajet-commun. La détection avec la sonde s'est effectué avec le détecteur en couplage AC tel que discuté dans le chapitre 2.

Tableau 6.1 Validation de l'atteinte des critères quantitatifs pour la sonde fixe

Métrique	Visé	Réalisé
Résolution latérale (Δx)	$\leq 60 \mu\text{m}$	23 μm
Résolution latérale (Δy)	$\leq 60 \mu\text{m}$	25 μm
Résolution axiale (air) (Δz)	16 μm	16 μm
Zone de Rayleigh	500 μm à plus de 1 mm	2 mm
Ouverture numérique	≤ 0.1	0.024
Transmission	$\geq 75 \%$	95 %
Collection	$\geq 60 \%$	90 %
Diamètre visé	1 mm	1.2 mm
Longueur	10 cm	10 cm

Dans l'ensemble, les spécifications de la sonde respectent le cahier de charge établi au départ. En effet, il y a une faible dégradation de la résolution latérale et un léger astigmatisme induit par l'utilisation de la sonde dans l'air, mais l'ensemble des autres métriques sont préservées ou légèrement améliorées. Comme la sonde sera employée dans un milieu dont l'indice de réfraction est proche de celui de l'eau, les résolutions latérales et l'astigmatisme devraient diminuer légèrement étant donné le saut d'indice plus faible avec celui du verre.

Critères qualitatifs

Les images d'échantillons biologiques obtenues avec la sonde ont été comparées avec celles obtenues avec le système de table, considéré comme référence. La dégradation de la qualité des images est mineure. La profondeur d'imagerie dans les échantillons biologiques comme l'utérus est de l'ordre de 2 mm. La figure 6.3 présente un exemple d'image acquise avec la sonde à canule fixe. L'échantillon est un doigt. L'épithélium (Ep) est situé en haut de l'image et apparaît comme une ligne brillante. L'épiderme (E) est situé juste en dessous et contient des canaux sudoripares (flèches noires). Le derme (d) se présente comme une région plus diffusante contenant des vaisseaux sanguins (têtes de flèches blanches). Peu de signal semble provenir de l'intérieur des vaisseaux sanguins.

La série de critères qualitatifs présentés en début de chapitre a été validée. La sonde est en effet **facile d'utilisation** : elle ne comporte pas de pièces mobiles ou d'alignement préliminaire. Une fois le circulateur et la sonde branchés, ainsi que le laser allumé et l'acquisition active,

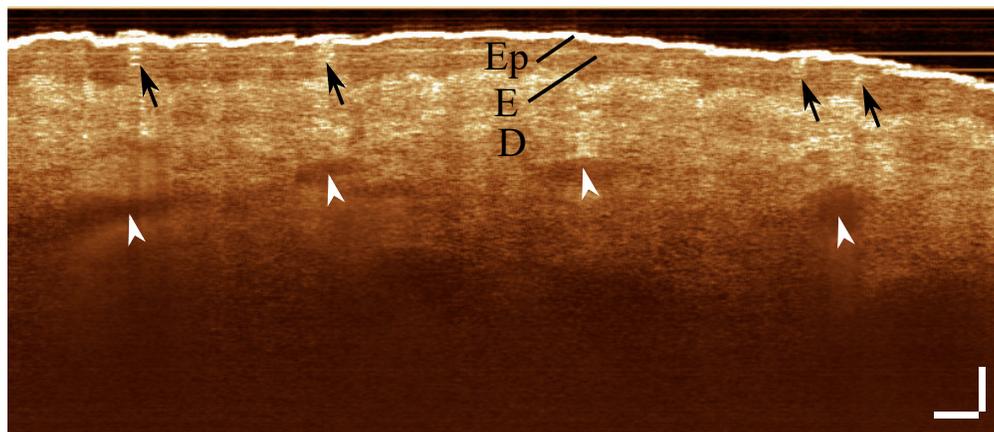


Figure 6.3 Image d'un doigt réalisée avec la sonde à canule fixe. L'épithélium est visible comme une ligne brillante en haut de l'image. L'épiderme (E) se présente comme une couche plus sombre sous l'épithélium et contient des canaux sudoripares (flèches noires). Le derme (D) est situé plus en profondeur et se présente comme une région plus riche en signal. Des vaisseaux sanguins sont visibles en profondeur (têtes de flèches blanches). Certaines régions sous les vaisseaux sanguins sont floues, probablement à cause d'un mouvement pulsatile de la circulation sanguine. Barres d'échelles : 500 μm .

les images sont aussitôt disponibles. La sonde est également **robuste et fiable** dans le cadre des tests qui ont été effectués. Plusieurs utilisateurs l'ont manipulé pour produire des images avec succès et aucune sonde n'a été cassée dans les expériences sur animaux. Tel que mentionné, la sonde est **interchangeable rapidement**. Au besoin, si l'on désire changer de sonde, l'opération prend à peine 1 minute, car elle s'utilise en configuration trajet-commun. La sonde permet l'**accès à l'intérieur de cavités** pour imager, comme l'utérus et les trompes de Fallope. Elle supporte bien l'insertion grâce à sa rigidité. Elle est également **résistante** aux courbures et aux contraintes d'insertion (passage dans des cols étroits). La sonde est également **manoeuvrable** dans les tortuosités des échantillons. Enfin, la sonde est **ergonomique** : elle ne glisse pas des mains même recouverte de fluides, elle se lave facilement et se tient de façon confortable.

Conclusion : Pour cette implémentation de prototype sans balayage, les critères de design sont rencontrés, la sonde est utilisable dans un contexte pré-clinique et elle est également compatible avec l'ajout d'un module de fluorescence moyennant quelques modifications. Il sera possible d'intégrer de la fibre à double gaine au lieu de la fibre monomode afin de collecter un signal de fluorescence ou de spectroscopie sans altérer le fonctionnement de base de la sonde. Les détails de cette sonde à base de fibre à double gaine, ainsi que sa caractérisation sont présentés plus en détails au chapitre 4.

Une amélioration naturelle du prototype est l'ajout d'un mécanisme de balayage dans la sonde afin de diminuer le temps d'acquisition des images et le frottement entre la sonde et les tissus à imager. Plusieurs mécanismes de balayage sont disponibles sur le marché. Ceux permettant l'intégration dans une sonde retiennent l'attention ici, comme les miroirs montés sur MEMS, les moteurs rotatifs, les jonctions rotatives et les scanners piézo-électriques. Pour le travail qui suit, le choix s'est porté sur un micro-moteur rotatif.

6.3 Sondes à micro-moteur rotatif

Le micro-moteur rotatif permet de monter une pièce réfléchive ou réfractive en bout de sonde afin de faire dévier le faisceau lumineux vers la paroi de la sonde et vers l'extérieur. Ainsi, en faisant tourner cet élément, on peut balayer la circonférence de la sonde, ce qui permet d'acquérir des données d'imagerie en géométrie radiale au lieu de cartésienne. De plus, en tirant (ou en poussant) sur la sonde, les données s'acquièrent dans la géométrie cylindrique de façon naturelle, ce qui convient dans le cas qui nous intéresse, l'intérieur des trompes de Fallope.

6.3.1 Requis du micro-moteur

Le micro-moteur doit être de petite taille (proche de 1 mm de diamètre), posséder une vitesse de rotation conséquente (ici autour de 6000 rpm ou rotations par minute), avoir une alimentation électrique de petit courant et posséder un couple suffisant pour accélérer la charge (miroir ou prisme) apposée à l'arbre de transmission. Le moteur qui a été retenu ici est un moteur de la série SBL-02 (SBL02-06H1-PG02-4.3, Namiki Corporation, Japon), avec la demande particulière de 3 m de micro-fils électriques entre le moteur et la connection au circuit de contrôle. Il s'agit d'un moteur à stator sans encoche (*slotless* en anglais). Le moteur est alimenté par une tension continue de 7.5 V, possède une vitesse de rotation maximale à vide de 16700 rpm, un couple de 17 $\mu\text{N m}$ et la force maximale permise sur l'arbre de transmission est de 2.9 Newton. Le diamètre externe est de 2 mm, ce qui est fait l'un des plus petits moteurs rotatifs disponibles sur le marché au moment des travaux. Le plus petit possède un diamètre externe de 1.5 mm et un couple 5 fois plus élevé (100 $\mu\text{N m}$), mais n'offre pas de vitesse de rotation suffisante (3800 rpm à vide).

Le moteur est contrôlé par un circuit d'alimentation (SHSD024-01A, Namiki Corporation, Japon). La carte offre plusieurs options de contrôle du moteur. L'option de contrôle retenue est le mode VR, qui permet de contrôler de façon physique le moteur. Il faut fournir une alimentation électrique de 7 V DC avec un courant maximal de 30 mA par les pattes 6 et 7

du connecteur CN2. La direction de rotation du moteur est sélectionnée avec l'interrupteur SW4 et la vitesse de rotation avec le potentiomètre variable VR2. Les valeurs de gains sont ajustées avec l'interrupteur SW3 et le potentiomètre VR1. Le moteur peut aussi être contrôlé par ordinateur avec un programme propriétaire Namiki en japonais, mais ce dernier manque de stabilité. Le mode VR permet de fixer les paramètres de contrôle du moteur et de ne plus les changer par la suite, ce qui permet d'être plus rapide lors de l'installation du système en milieu clinique.

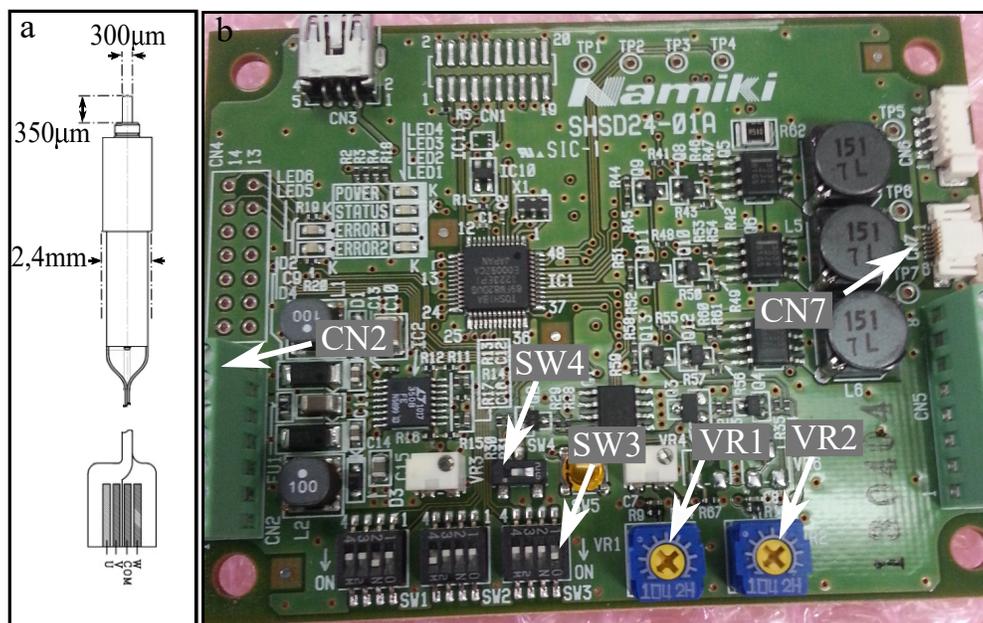


Figure 6.4 Plan et schéma du moteur choisi et du circuit d'alimentation. (a) présente les dimensions externes de la capsule du moteur et de l'arbre de transmission. (b) montre une photographie du circuit d'alimentation et de contrôle avec les principaux ports de contrôles identifiés. Les connecteurs CN2 et CN7 servent à alimenter le moteur et à le raccorder au circuit d'alimentation respectivement. Les interrupteurs SW3 et SW4 servent à fixer le sens de rotation du moteur et le mode de contrôle. Les potentiomètres variables VR1 et VR2 servent à contrôler la vitesse de rotation du moteur et le gain.

La charge à faire tourner est un miroir. Cependant, ce dernier doit être le plus léger possible afin d'entraver au minimum la rotation du moteur et d'éviter les effets de déséquilibre ou de précession. Les miroirs et les prismes commercialement disponibles ont un minimum de 1 mm de diamètre ou côté avec des dépôts d'aluminium de piètre qualité (Edmund Optics, Knight Optical Ltd). Pour contrecarrer ces désagréments, de même que pour faciliter l'alignement du moteur, de l'arbre de transmission et du miroir, de nouveaux micro-miroirs ont été développés.

6.3.2 Design et fabrication des micro-miroirs

L'arbre du moteur retenu pour les expériences est $300\ \mu\text{m}$ de diamètre externe et $350\ \mu\text{m}$ de longueur (extérieur au moteur). Les micro-miroirs fabriqués le sont à base de capillaires de verre avec un diamètre intérieur de $300\ \mu\text{m}$, s'ajustant à l'arbre de transmission pour se centrer sur l'axe de rotation. De plus, cette approche permet de réduire la quantité de verre requise dans le miroir et alléger la structure. Au bout du capillaire, une microlamelle de microscope ($100\ \mu\text{m}$ d'épaisseur) est collée à 45° avec de l'époxy. Une fois séchée, la structure est polie pour ne laisser de micro-lamelle et d'époxy que sur l'axe du capillaire, le miroir ayant le diamètre externe du capillaire en verre (ici $800\ \mu\text{m}$). Les structures ainsi produites sont envoyées pour déposition d'une couche métallique réfléchive. Cette couche réfléchive est en fait constituée de trois matériaux. D'abord, une couche de $20\ \text{nm}$ de chrome est déposée pour augmenter l'adhérence du dépôt au verre. Ensuite, $200\ \text{nm}$ d'or sont déposés pour constituer la couche réfléchive du miroir en tant que tel. Enfin, une couche protectrice de $20\ \text{nm}$ de silice est déposée. Il ne reste qu'à couper le capillaire de verre après quelques millimètres de la surface réfléchive et les miroirs sont prêts à l'emploi.

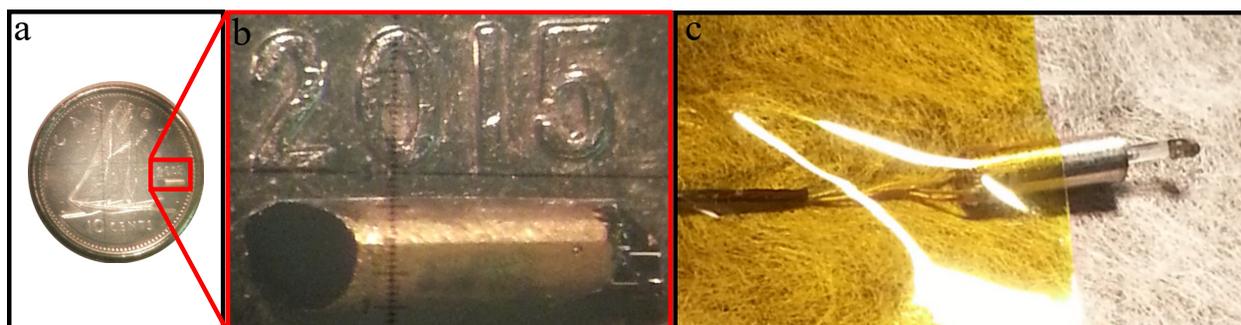


Figure 6.5 Photographie et agrandissement du micro-miroir. (a) et (b) montrent le micro-miroir en contexte avec un agrandissement. (c) montre le micro-miroir monté sur l'arbre de transmission du micro-moteur.

6.3.3 Assemblage

L'assemblage de la sonde ressemble fort à celle de la sonde précédente, en ce qui a trait à la structure fibre SM-NCF-GRIN. Il s'ajoute le montage du miroir sur l'arbre de transmission du moteur et la gestion des fils électriques.

Le montage du miroir sur l'arbre du moteur est une étape délicate, car elle dictera la façon dont le miroir sera entraîné en rotation à haute vitesse (plus de 180 rotations par minute).

On s'assure que la colle ne s'infiltré pas dans le moteur le long de l'arbre et que l'axe du miroir corresponde le mieux possible à l'axe de rotation. Un assemblage avec des structures guides concentriques réalisé avec des capillaires de verre permet de remplir ces deux requis simultanément. On veille également à ne pas salir ou abîmer le miroir en cours d'assemblage.

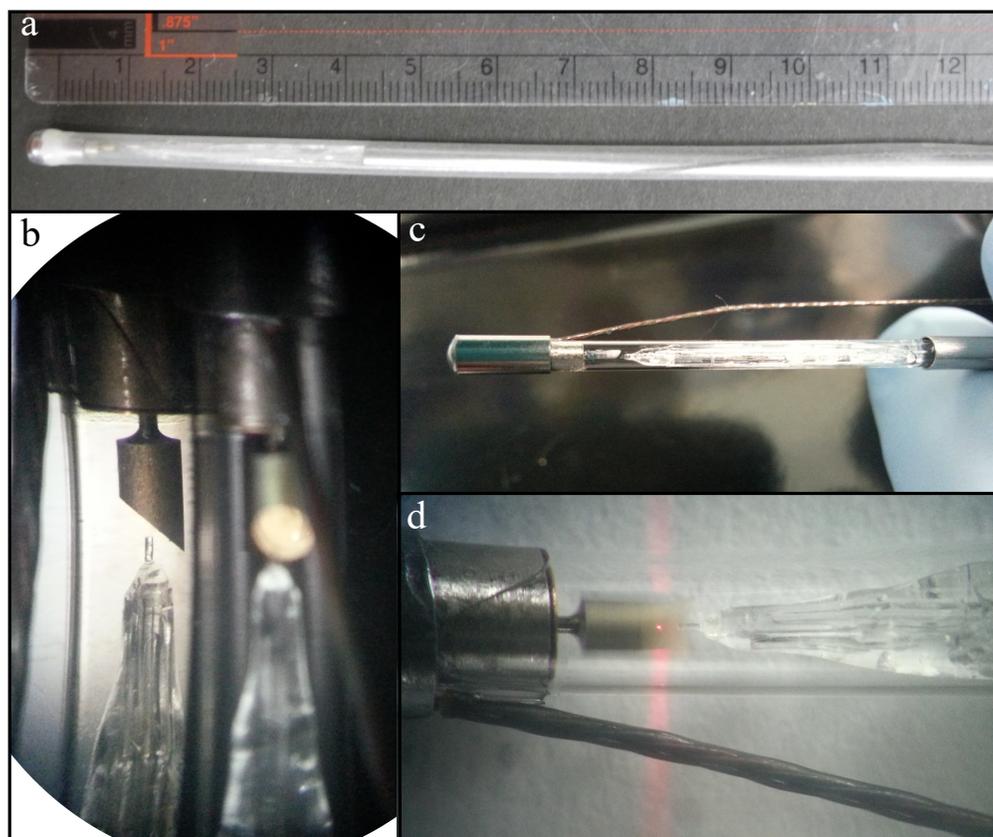


Figure 6.6 Photographies de la sonde à micro-moteur rotatif. (a) Sonde prête à l'emploi avec son sac stérile. (b) Vue au microscope de l'assemblage du micro-miroir et de la portion fibre SM-NCF-GRIN. La vue sur l'autre axe est obtenue avec un miroir à 45° et le focus a été ajusté sur la vue transverse. (c) Sonde assemblée sans son sac stérile. Le fil d'alimentation est situé à l'extérieur du capillaire de verre, mais il se trouve protégé par l'embout d'acier inoxydable. (d) Sonde en fonctionnement avec un laser d'alignement rouge en fonction. Le micro-miroir tourne à 15000 rpm. Avec l'intégration sur le temps de la photographie, on peut voir la trace du balayage du faisceau laser ainsi qu'un point rouge à l'endroit où se réfléchit le laser sur le micro-miroir.

Une fois le miroir monté et séché, il faut l'insérer dans le capillaire de verre. Afin d'assurer le centrage de la structure SM-NCF-GRIN avec la sonde, un assemblage concentrique de capillaires de tailles compatibles est collé ensemble avec de la colle optique. Cet assemblage laisse dépasser le bout de la structure SM-NCF-GRIN, permettant d'approcher du miroir.

La dernière étape cruciale de l'assemblage de la sonde est le positionnement du miroir et de la structure de capillaires. Les micro-fils d'alimentation du moteur sont passés à l'extérieur du capillaire externe. Ceci permet de garder le centrage du miroir par rapport à la structure SM-NCF-GRIN. Ils sont ensuite délicatement repliés pour insérer le moteur et le miroir par un bout du capillaire externe. Un capuchon est formé avec une petite section de tube d'acier inoxydable et de capillaires remplis de colle pour sceller l'extrémité du moteur. Le bout est ensuite arrondi pour faciliter l'insertion de la sonde dans les tissus. La structure SM-NCF-GRIN est ensuite insérée par la dernière ouverture du capillaire externe. Le positionnement de la structure fibrée par rapport au miroir est validé avec un faisceau laser rouge afin d'optimiser les performances optiques de la sonde (la distance fibre-miroir doit être la plus petite possible tout en respectant la distance minimale pour ne pas abimer la face clivée de la fibre GRIN). Une fois le positionnement optimal atteint, la sonde est fixée en place en curant la colle optique avec une lumière UV (lampe au mercure).

6.3.4 Caractérisation

Les performances d'imagerie ont été évaluées de la même façon que pour la sonde à canule sans balayage. Les résolutions latérales ont été évaluées avec la cible de résolution USAF1951 avec le critères d'étalement de bord. Les images sont acquises avec un détecteur en couplage AC comme pour la sonde à canule fixe.

Critères quantitatifs

Le tableau 6.2 résume les performances d'imagerie de la sonde en rotation, avec en rappel les performances désirées. On peut voir que les performances sont très proches de celles attendues, voire plus performantes. En effet, la sonde respecte les requis de résolution et de profondeur d'imagerie et surpasse la collection et la transmission attendues. Les résolutions latérales mesurées sont de $27\ \mu\text{m}$ et $29\ \mu\text{m}$ en x et y respectivement (les valeurs simulées sont de $22\ \mu\text{m}$ et $26\ \mu\text{m}$ respectivement). Cependant, cette sonde présente un diamètre supérieur à celui attendu. En effet, avec $2.4\ \text{mm}$ de diamètre externe, cette sonde ne sera pas en mesure d'atteindre les régions les plus étroites de la trompe. Il est à noter cependant que la région d'intérêt pour le développement des STICs est le tiers distal de la trompe, qui constitue la partie la plus large (de $4\ \text{mm}$ à $10\ \text{mm}$ de lumen). Cette sonde est donc plus adaptée pour sonder cette région, étant donné sa plus grande taille et sa zone d'imagerie déplacée $1\ \text{mm}$ plus en profondeur que la sonde à canule fixe. Un autre avantage de cette sonde est sa vitesse de balayage. En effet, son balayage mécanique à l'aide du micro-moteur se fait à très grande vitesse ($8000\ \text{rpm}$). Cette vitesse de rotation permet d'acquérir plusieurs scans radiaux. Il ne

reste qu'à coupler mécaniquement la sonde à un moteur externe pour effectuer un retrait et réaliser une acquisition tridimensionnelle de la trompe. Les vitesses de retrait requises sont de l'ordre de quelques millimètres par seconde, ce qui rend l'acquisition d'une trompe très rapide. De plus, cette imagerie s'effectue avec moins de frottement de la sonde sur la paroi muqueuse, entraînant moins de dommages aux tissus fragiles. Par opposition, la sonde à canule fixe doit soit effectuer un retrait seulement et offrir une tranche longitudinale de la trompe, ou employer une rotation (manuelle ou avec un moteur en rotation, dans les deux cas atteignant un maximum de 2 tours par seconde), puis un retrait avec un moteur. Ce type d'acquisition avec un moteur en rotation et un moteur en translation prend plusieurs minutes par segment de trompe. Le micro-moteur permet d'accélérer l'acquisition en tournant à vitesse élevée pour acquérir des images radiales.

Tableau 6.2 Validation de l'atteinte des critères quantitatifs pour la sonde rotative.

Métrique	Visé	Réalisé
Résolution latérale (Δx)	$\leq 60 \mu\text{m}$	27 μm
Résolution latérale (Δy)	$\leq 60 \mu\text{m}$	29 μm
Résolution axiale (air) (Δz)	16 μm	16 μm
Zone de Rayleigh	500 μm à plus de 1 mm	750 μm
Ouverture numérique	≤ 0.1	0.024
Transmission	$\geq 75 \%$	95 %
Collection	$\geq 60 \%$	85 %
Diamètre visé	1 mm	2.4 mm
Longueur	10 cm	15 cm

Le moteur employé offert par Namiki présente un léger inconvénient : il ne fonctionne pas tout à fait selon ses spécifications de vitesse. Il semble qu'il ne puisse pas tourner dans une plage de vitesse située entre 1 et 8000 rpm. De plus, sa vitesse de rotation est parfois instable. La façon de minimiser ces problèmes est l'option de contrôle par le mode VR, ce qui a été retenu. La vitesse de rotation de 8000 rpm est légèrement supérieure à celle optimale pour conserver la résolution latérale sur un tour, qui se situe davantage autour de 6500 rpm avec le laser VCSEL à 100 kHz. La conséquence est d'utiliser les lignes-A sur plusieurs tours consécutifs au même endroit afin de reconstruire un scan radial. Ceci n'est pas un problème à haute vitesse, mais impose une lourdeur supplémentaire lors de la reconstruction des images.

Critères qualitatifs

Lorsque vient le temps d'imager des échantillons humides, un sac stérile de protection peut être employé. Ce sac sert à protéger l'échantillon de la sonde, mais également la sonde des

fluides du spécimen imagé. Comme plusieurs spécimens peuvent être imagés avec la même sonde, changer le sac est plus simple et hygiénique que nettoyer la sonde à chaque fois. Le sac employé provient de la compagnie MedTronic et cause des pertes de signal d'environ 4 % par passage. Il est également à noter que le fil d'alimentation électrique mesure 300 μm de diamètre et est opaque aux longueurs d'onde employées. Il obscurcit une portion de l'image d'environ 14°.

La sonde s'emploie de façon rapide, simple et sécuritaire. Elle respecte les mêmes requis qualitatifs que la sonde à canule. Il est également à noter que les séances d'imageries sont beaucoup plus courtes étant donné le temps d'acquisition considérablement réduit.

Conclusion : La sonde avec micro-moteur et micro-miroir permet l'imagerie des trompes de Fallope dans la géométrie naturelle de l'organe. Acquérir un volume est beaucoup plus rapide et les performances d'imagerie rencontrent les critères attendus. Nous pouvons donc conclure que cette sonde est prête pour l'utilisation en clinique. Maintenant que les deux sondes dédiées sont réalisées, il est intéressant de les comparer entre elles et avec le système de référence, soit le système de table.

6.4 Comparaison des trois têtes d'imagerie

Un comparatif un peu plus précis des trois têtes d'imagerie est abordé dans cette section. Le système de table est utilisé comme référence de comparaison pour les deux sondes développées. Une étude plus approfondie des performances d'imagerie selon la profondeur est d'abord conduite pour quantifier les performances des trois systèmes. Ensuite, une comparaison qualitative est présentée pour déterminer les meilleures conditions d'emploi de chaque système. Enfin, les impacts de la détection AC versus DC sont discutés.

6.4.1 Comparaison quantitative

Le tableau 6.3 présente la comparaison des performances du système de table commercial, de la sonde fixe et de la sonde rotative. On remarque que la sonde fixe se compare bien aux deux autres systèmes en terme de performances optiques et que la sonde rotative voit sa vitesse d'acquisition augmenter au coût d'une dégradation de sa résolution latérale et d'une augmentation de sa taille.

Un outil de calibration a été employé pour caractériser les performances d'imagerie en profondeur des trois têtes d'imagerie. Il s'agit d'une rondelle constituée d'une série de miroirs situés à des profondeurs différentes et recouverte d'une couche de polymère diffusant à base de TiO_2 [135]. Un exemple d'image de cet objet est présenté à la figure 6.7 et a été réalisé

Tableau 6.3 Comparaison des performances selon la tête d'imagerie avec le système VCSEL-OCT.

Métrique	Système de table	Sonde fixe	Sonde rotative
Résolution latérale (Δx)	25 μm	23 μm	27 μm
Résolution latérale (Δy)	25 μm	25 μm	29 μm
Résolution axiale (air) (Δz)	16 μm	16 μm	16 μm
A-Line/s	100 000	100 000	100 000
Profondeur d'imagerie*	12 mm	12 mm	10 mm
Transmission	90 %	95 %	95 %
Puissance à l'échantillon	15 mW	15 mW	15 mW
Géométrie d'imagerie	cartésienne	cartésienne et cylindrique	cylindrique

* Profondeur d'imagerie indique ici la distance à laquelle le système peut former une image dans l'air.

avec le système de table.

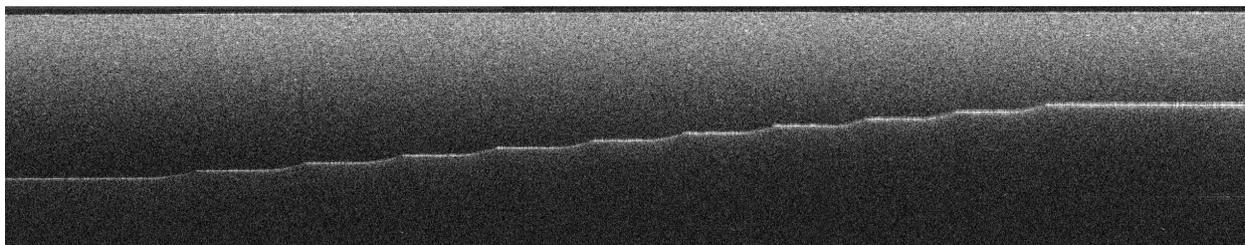


Figure 6.7 Image de la rondelle de calibration avec le système de table. Les différents paliers en profondeur sont des miroirs espacés de 100 μm et recouverts d'un fantôme diffusant.

À partir de cette image, la décroissance en profondeur du signal, ou ligne-A, a été extraite pour chaque palier et tracée sur un même graphique. Une attention particulière a été portée à la standardisation des niveaux de gris afin de pouvoir comparer les trois têtes d'imagerie entre elles. En effet, le logiciel d'acquisition fourni avec le système VCSEL ne permet pas de comparer les niveaux de gris après l'exportation des données brutes. Pour chaque acquisition de la rondelle, l'exportation s'est faite avec un programme sur mesure qui fixe les bornes du signal exporté de même que l'échelle des niveaux de gris appliquée à l'image. Ainsi, chaque niveau de gris entre 0 et 255 correspond à une valeur connue du signal en dB. À partir de cette valeur, nous pouvons retrouver un signal en échelle linéaire directement proportionnel à la transformée de Fourier du signal mesuré sur le détecteur. Le facteur de proportionnalité n'est pas connu, mais demeure le même pour toutes les acquisitions faites avec le système.

Une métrique que l'on peut extraire de ces images est la décroissance en profondeur du rapport signal sur bruit. Étant donné la présence de diffuseurs avant les miroirs, la rondelle de

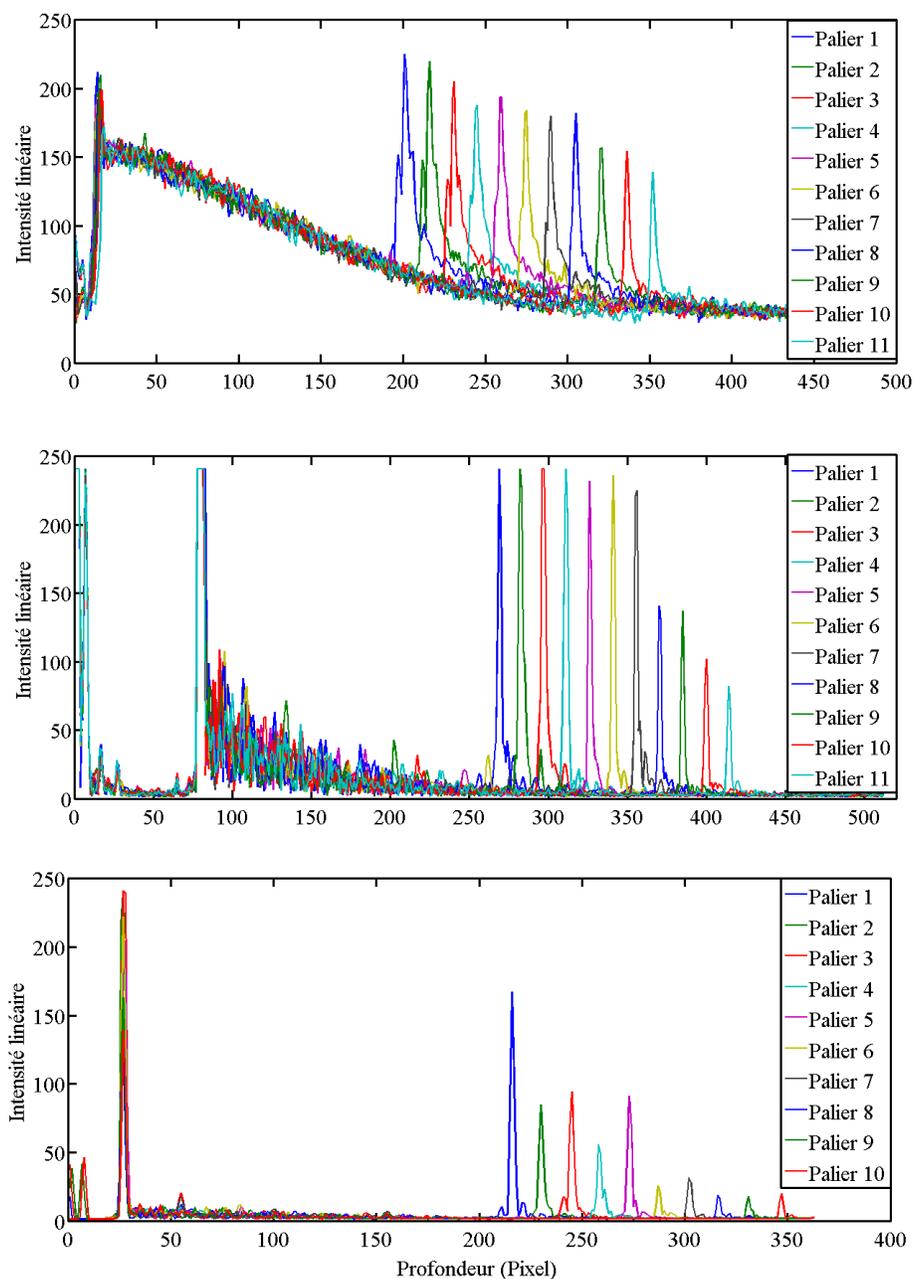


Figure 6.8 Comparaison des performances d'imagerie en profondeur des trois systèmes à l'étude. Pour chaque sous-figure, les lignes-A en profondeur pour chaque miroir de la rondelle de calibration sont rapportées sur un même graphique. Chaque ligne-A présente une première réflexion à l'interface entre l'air et le matériau diffusant, une région de diffusion, puis un pic de réflectivité élevée représentant le miroir en profondeur. (a) présente la réponse du système de table conventionnel. (b) et (c) montrent les réponses des deux sondes employées en trajet commun. L'échelle d'intensité est une intensité linéaire, directement proportionnelle à la transformée de Fourier de signal électrique au détecteur.

calibration représente une situation d'imagerie comparable à l'imagerie des tissus biologiques. La comparaison de la décroissance du rapport signal sur bruit, rapporté en dB, est présentée à la figure 6.9. Les trois systèmes performant de façon comparable sur les profondeurs d'imagerie étudiées du zéro de l'interféromètre à 5 mm décalé en profondeur.

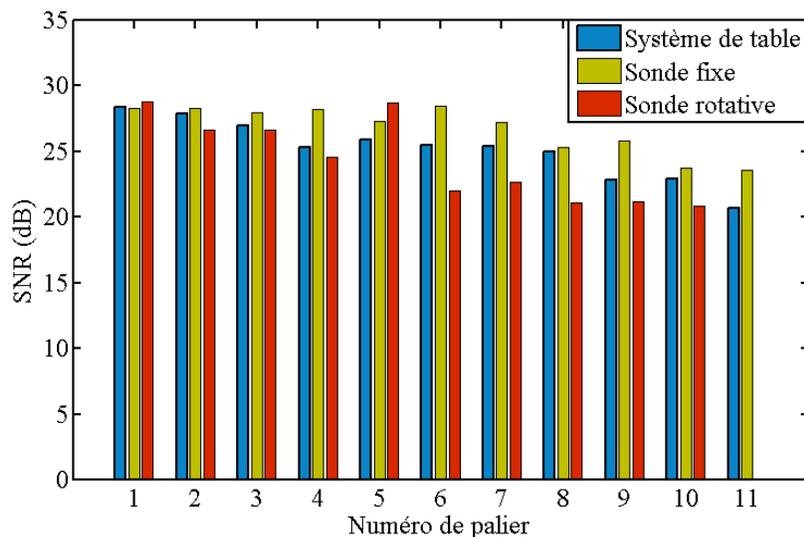


Figure 6.9 Comparaison des valeurs de rapports signal sur bruit des miroirs de la rondelle de calibration des trois systèmes à l'étude. Chaque ensemble de données présente les valeurs mesurées de rapport signal sur bruit selon le palier considéré, le premier palier étant celui le plus près de la surface de la rondelle de calibration.

6.4.2 Détection en couplage alternatif vs couplage en mode continu

Pour illustrer la différence entre le type de couplage de détection, la figure 6.10 présente deux lignes-A issues d'une rondelle de calibration pour des paramètres d'acquisitions identiques hormis le détecteur. Les deux acquisitions ont été réalisées avec le système de table. La sous-figure du haut présente le signal obtenu avec la détection en couplage AC alors que la sous-figure du bas montre le signal obtenu avec la détection balancée DC conventionnelle. Les détecteurs employés sont respectivement le PDB410C-AC et PDB420C (Thorlabs, USA). Il s'agit de deux détecteurs à gain fixe. Cependant, la bande passante est légèrement différente : 75 MHz pour le DC et 100 MHz pour le AC. L'impact de cette variation de bande passante est visible sur la figure b, car le signal tend à s'estomper rapidement après le pixel 300 (correspondant à 4.5 mm en profondeur), alors qu'à cette profondeur le détecteur AC préserve le signal. On remarque également que le niveau de bruit est différent sur les deux courbes :

il persiste une composante continue sur la détection couplée continue. Le rapport signal sur bruit est amélioré d'un facteur 1,8 (2.6 dB) en utilisant le couplage AC. Il est donc avantageux de migrer vers une détection balancée ou en trajet commun en couplage alternatif et c'est l'approche qui sera employée dans la suite de cette thèse.

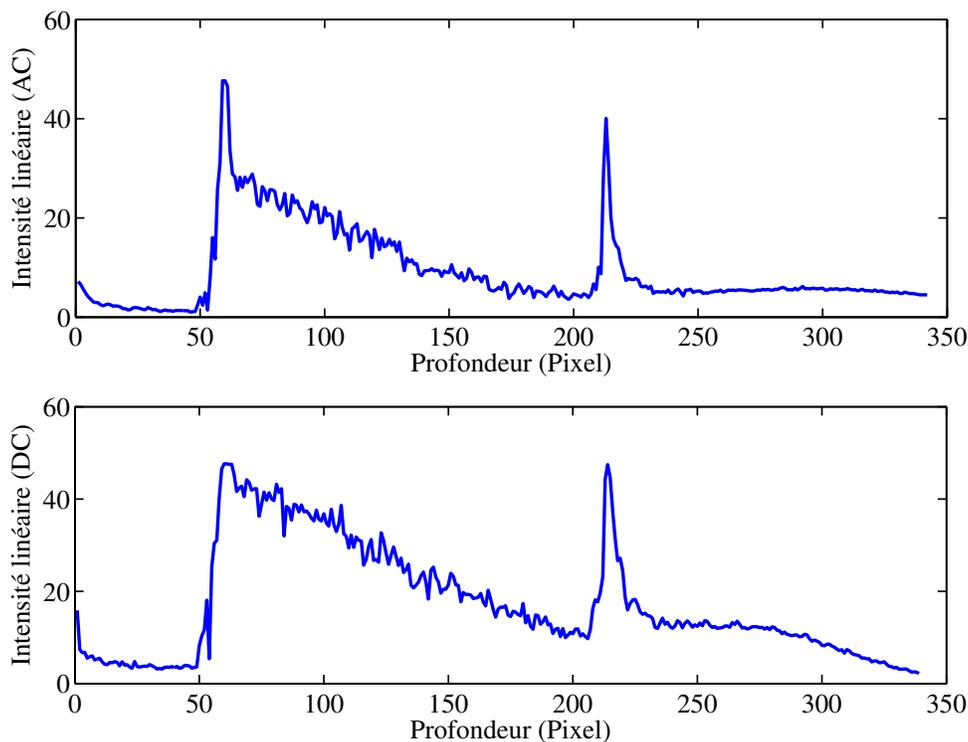


Figure 6.10 Deux lignes-A issues de la rondelle de calibration pour le quatrième palier en profondeur. Les acquisitions sont réalisées avec le système de table. La sous-figure (a) montre la réponse en profondeur pour une détection en couplage alternatif au détecteur et la sous-figure (b) montre la même situation en couplage DC. Le niveau de bruit est beaucoup plus faible dans le cas de la détection AC. Le rapport signal sur bruit est amélioré d'un facteur 1.8 (2.6 dB) au pixel 213 (à 3 mm en profondeur).

6.5 Validation préclinique des sondes

L'atteinte des critères qualitatifs peut s'établir dans un contexte d'utilisation proche de la clinique. Un protocole d'imagerie sur échantillons animaux frais a été réalisé dans l'objectif de répondre à cette question, de même que d'établir un protocole d'imagerie transférable sur tissus humains.

Dans un premier temps, on teste les performances d'imagerie à distance en balayant la sonde

au-dessus d'un tissu animal préparé pour en exposer la zone d'intérêt à imager. Le tissu est d'abord excisé de l'animal selon la procédure décrite précédemment (section imagerie d'échantillons animaux). Un morceau d'environ 1 cm de longueur est ensuite retiré (trompe ou corne utérine) et ouvert sur le sens de la longueur pour en exposer la muqueuse lorsque possible. Ces tissus sont ensuite déposés dans un pétri puis placés sur un moteur en translation pour en contrôler le déplacement par rapport à la sonde. Les images sont ensuite acquises et traitées. Dans un deuxième temps, la sonde est insérée directement à l'intérieur de la structure d'intérêt encore intacte. On procède à un « pull-back » en acquérant les données afin de former une image.

Lors de la réception des spécimens animaux, le traitement est identique à celui du chapitre 5 pour l'imagerie avec le système de table. Les échantillons sont séparés du corps de l'hystérectomie, puis sectionnés et nettoyés pour enlever les structures superflues. Le système d'imagerie est ensuite mis en route. Une première acquisition avec le système de table permet de localiser les régions intéressantes de l'échantillon. Par la suite, la sonde à canule fixe est montée à la place de la tête du système commercial et le détecteur est changé. Cette opération prend environ 2 min. L'échantillon à imager est placé dans un pétri fixé au moteur en translation. La sonde est insérée dans l'échantillon proche des régions d'intérêt identifiées précédemment. La séance d'imagerie peut ensuite commencer et deux acquisitions sont faites au même endroit avant de changer d'angle ou de position. À la fin de la séance, la sonde est lavée à l'eau et désinfectée à l'alcool. On recommence ensuite la même procédure avec la sonde en rotation. Il est important de noter que les sondes qui ont été en contact direct avec les échantillons animaux ne peuvent être employées sur des échantillons humains. Les sondes testées sur des animaux ne sont donc pas envoyées en clinique par la suite.

6.6 Discussion et conclusion

Deux sondes ont été conçues et fabriquées pour l'imagerie de la muqueuse de la trompe de Fallope. Chacune permet de miser sur un aspect important de la problématique : la sonde à canule fixe assure d'imager le plus loin possible dans la trompe, alors que la sonde rotative permet d'imager de façon plus efficace et moins dommageable le tiers distal de la trompe. Cette portion proche de l'ovaire représente le site de formation des STICs selon l'opinion médicale actuelle. De plus, chaque sonde offre des performances comparables au système de table commercial, pris comme référence. Ainsi, le changement de géométrie et la diminution drastique de taille des sondes n'entraînent pas de dégradation trop importante des performances d'imagerie. Ces sondes sont donc prêtes pour des tests cliniques sur spécimens humains.

Avec ces résultats, nous avons identifié les meilleures conditions d'utilisation de chaque tête d'imagerie. Chaque système présente ses avantages et ses inconvénients pour l'imagerie des trompes de Fallope. Le système de table permet d'imager un grand champ de vue et de visualiser des volumes et des sections 2D. Le fait de pouvoir visualiser les tissus de l'extérieur sur des largeurs jusqu'à 10 mm présente un avantage important pour étudier les éléments externes à la trompe et la partie frangée du pavillon. Cette structure est volumineuse et l'examen externe est tout aussi important que l'examen interne. Le système de table permet donc d'adresser ce requis facilement.

La sonde à canule fixe présente le plus petit diamètre et une forme effilée. Elle est donc idéale pour être insérée sur une très grande distance directement dans la trompe. Sa rigidité, conférée par l'assemblage de capillaires de verre, permet de manoeuvrer dans les endroits tortueux des échantillons sans se briser. Elle permet également d'obtenir des images de bonne qualité sur une profondeur sans précédent dans la littérature. Il s'agit d'un bon outil pour imager à la fois en contact avec la sonde (dans les segments plus étroits) et un peu plus loin (dans les segments de transition) lorsque la trompe s'élargit.

La sonde à micro-moteur rotatif présente une bonne qualité d'imagerie à une très grande vitesse d'acquisition. Son diamètre plus grand permet l'étude d'un segment d'échantillon plus large, comme le tiers distal de la trompe, là où celle-ci s'élargit vers le pavillon. Sa grande vitesse d'acquisition en font un outil très pratique et une visualisation 2D est possible avec le logiciel du système.

L'astigmatisme de la sonde induit par la courbure du capillaire de verre est un phénomène gérable. En effet, les mesures d'astigmatisme présentées dans ce chapitre (simulées et mesurées) ont été prises dans l'air. Comme l'environnement biologique dans lequel les sondes sont appelées à être utilisées possède un indice de réfraction plus proche de celui de l'eau (1.33), il est à envisager que cette valeur d'astigmatisme va décroître. En effet, ce phénomène dépend entre autres du saut d'indice entre le capillaire et le milieu externe et ce saut d'indice s'estompera en partie. Des sondes similaires rapportées dans la littérature [82, 83] présentent une diminution d'astigmatisme pouvant atteindre un facteur 2.

Les deux sondes développées dans ce chapitre se comparent favorablement aux résultats de la littérature. Des sondes similaires employées à 1300 nm ont des résolutions latérales de 15 μm et des profondeurs d'imagerie de l'ordre de 500 μm à 800 μm . Les sondes développées ici ont des résolutions latérales un peu moins bonnes, mais une profondeur d'imagerie plus grande. Elles ont aussi un taux de dégradation moins grand de la résolution latérale et du SNR en profondeur.

Une fois que la visibilité des franges d'interférence a été maximisée (intensité et polarisation

des deux bras ajustés), la profondeur d'imagerie atteignable dépend du système employé. La limite de la profondeur d'imagerie dépend de plusieurs facteurs : la longueur de cohérence instantanée du laser employé, la bande passante du détecteur, le repliement spectral et l'efficacité de l'optique de collection. Par exemple, la longueur de cohérence instantanée du laser donne la plage sur laquelle les faisceaux échantillons et référence peuvent interférer. Plus la longueur de cohérence instantanée est courte, plus l'interférence se produit sur une faible différence de distance (de fréquence) entre les deux bras de l'interféromètre. Ceci impose la plus grande distance (sur l'image) ou fréquence (dans l'interférogramme) qu'il est possible de détecter à partir du zéro de l'interféromètre. On recherche donc une longueur de cohérence instantanée de plusieurs millimètres, voir des centimètres, ce qui dépend de la finesse du mécanisme de filtrage en longueur d'onde. Dans le cas du laser VCSEL, cette finesse est très grande et la longueur de cohérence instantanée de ce laser est de 100 mm. Pour le même genre de raison, la bande passante du détecteur peut venir limiter la plage de fréquences détectables, donc la plus grande fréquence de l'interférogramme qui sera acquise. Pour imaginer à des profondeurs de plus de 5 mm, il faut typiquement une bande passante de plus de 100 MHz. Comme le gain du détecteur est relié à sa bande passante, il faut rechercher un détecteur donnant suffisamment de bande passante pour la profondeur d'imagerie recherchée, mais présentant suffisamment de gain pour produire des images de qualité. Il est d'ordinaire assez simple de changer de détecteur si celui-ci limite la profondeur d'imagerie. Le repliement spectral (*aliasing* en anglais) peut également venir limiter la profondeur d'imagerie. En effet, lors du traitement de signal OCT, l'information du signe de la phase est perdue, donc il est impossible de savoir de quel côté un objet à une fréquence donnée est situé par rapport au bras de référence. Enfin, l'efficacité de l'optique de collection dicte la quantité de signal provenant de l'échantillon qui peut retourner au système pour être détecté. Plus la collection est efficace, plus de faibles signaux (issus de plus grandes profondeurs) pourront être collectés et contribuer à former l'image.

En conclusion, deux sondes OCT dédiées à l'imagerie des trompes de Fallope ont été développées dans ce chapitre. Les critères quantitatifs et qualitatifs à atteindre ont été énoncés en début de chapitre et ces critères ont été rencontrés pour chacune des sondes. La conception, l'assemblage et la caractérisation ont été présentés en détail pour la sonde à canule fixe et pour la sonde à micro-moteur rotatif. Une amélioration au mécanisme de détection est proposée pour les systèmes OCT en général, mais plus particulièrement pour l'emploi efficace des sondes employées en trajet commun. La comparaison entre le système de table et les deux sondes produites est très favorable. Enfin, toutes ces considérations ont mené à l'élaboration d'un protocole d'imagerie sur échantillons animaux frais en prévision de l'imagerie en clinique avec ces systèmes OCT.

CHAPITRE 7 ÉTUDE CLINIQUE PRÉLIMINAIRE

Les critères d'imagerie extraits de la littérature doivent être confrontés à la réalité de l'imagerie en milieu clinique. Au besoin, ces critères devront être corrigés pour produire un cahier de charge final pour le système d'imagerie. Nous avons identifié l'OCT comme modalité d'imagerie morphologique permettant d'imager les lésions précurseurs dans les trompes. Il semble cependant que cette modalité d'imagerie manque de sensibilité dans le cas de lésions de faible épaisseur ou de peu de cellules. Il faut donc la combiner avec une modalité d'imagerie plus sensible comme la fluorescence ou la spectroscopie par fluorescence. Les propriétés d'auto-fluorescence des trompes de Fallope sont peu connues. Ce chapitre présente donc une étude pilote en milieu clinique avec trois objectifs. Le premier objectif est d'établir les requis pour la sonde spectroscopique en fluorescence. Le second objectif est de confirmer les requis des sondes d'imagerie développées pour l'OCT. Le troisième objectif est de valider le protocole d'imagerie clinique développé au chapitre précédent.

Ce chapitre présente une étude préliminaire sur 5 sujets humains pour répondre aux trois objectifs énoncés. Avec la sonde à canule fixe de 1.2 mm développée précédemment et une sonde de fluorescence, une première série de 5 patientes ont été recrutées et leurs trompes ont été analysées. Le protocole clinique et la méthodologie sont d'abord présentés, suivi du protocole de pathologie pour l'identification des tissus. Les résultats sont ensuite présentés, d'abord avec l'OCT, puis avec la fluorescence. Enfin, une discussion sur la validation clinique de la sonde et une conclusion terminent le chapitre.

7.1 Protocole et méthodologie

L'imagerie des trompes de Fallope se déroule dans un contexte peropératoire au CHUM Notre-Dame, sous la supervision du personnel de chirurgie. Le médecin en charge du projet de recherche clinique est Dre Diane Provencher, gynécologue-oncologue et chirurgienne au CHUM. Le système d'imagerie est placé dans l'antichambre attenante à la salle de chirurgie. Pour chaque patiente recrutée, la documentation requise et la requête de recherche en pathologie sont remplies. Les outils chirurgicaux additionnels sont préparés par le personnel médical. Une fois les échantillons d'hystérectomie retirés, ils nous sont remis pour le protocole de recherche avec une pince chirurgicale et deux séries de petites agrafes hémostatiques stériles. À la réception des échantillons, le chronomètre est mis en route, puis l'échantillon est mesuré et photographié. Une première inspection macroscopique, d'abord à l'œil puis avec le système OCT de table, est réalisée pour repérer des anomalies. La tête d'imagerie du sys-

tème est ensuite changée pour installer la sonde à canule fixe. La sonde est insérée à plusieurs reprises dans chaque trompe pour réaliser les acquisitions OCT. Une série de 5 zones par trompe est identifiée pour une analyse en pathologie et des agrafes chirurgicales sont placées dans le tissu conjonctif sous ces zones pour former des repères visuels stables qui n'abîmeront pas le tissu. Les acquisitions de fluorescence sont ensuite réalisées. Une séance complète d'imagerie dure 30 min.

Un exemple d'hystérectomie est présenté à la figure 7.1, de même que l'échantillon préparé pour le pathologiste. La figure 7.1a) montre une photographie d'une hystérectomie prise durant l'examen macroscopique du spécimen. L'utérus (Ut), le col (Col), les trompes de Fallope (T_g et T_d) et les ovaires (Ov_g et Ov_d) sont identifiés. L'astérisque (*) indique également le pavillon, par où la sonde est insérée. La figure 7.1b) montre la pose d'agrafes chirurgicales (têtes de flèche) permettant d'identifier les régions d'intérêt pour l'analyse pathologique. Les agrafes sont placées dans le tissu conjonctif entourant la trompe, ce qui permet d'obtenir un positionnement précis et facilement localisable en pathologie.

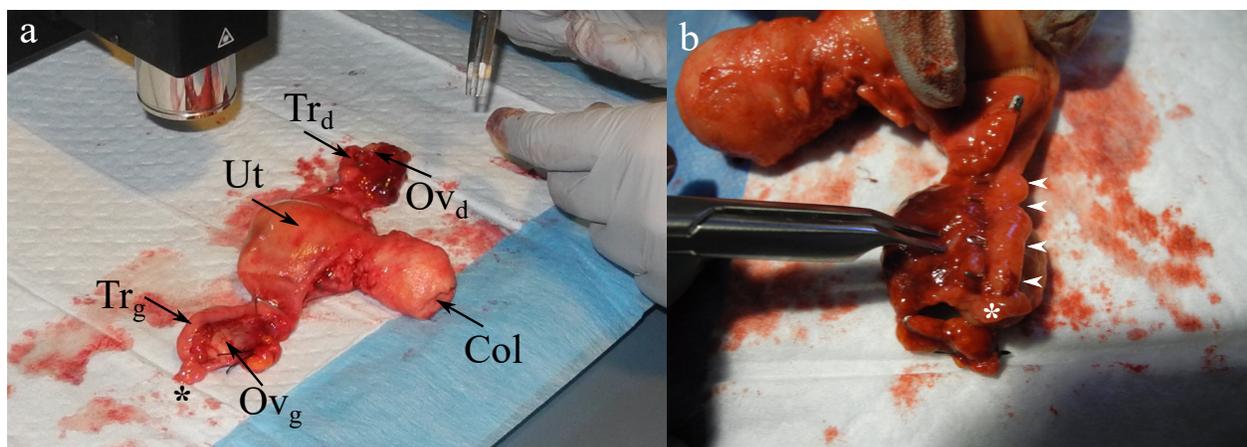


Figure 7.1 Photographie d'un échantillon d'hystérectomie lors de l'analyse macroscopique (a) et après la pose d'agrafes chirurgicales pour la correspondance avec la pathologie (b). L'Utérus (Ut), le col (Col), les trompes de Fallope (T_g et T_d) et les ovaires (Ov_g et Ov_d) sont identifiés. L'astérisque (*) montre le pavillon, où la sonde OCT est insérée. Les têtes de flèche montrent la position des agrafes chirurgicales, disposées de l'autre côté de la trompe.

7.2 Protocole de pathologie

Le protocole de pathologie est fourni avec chaque échantillon afin que les différentes équipes de techniciens puissent traiter les tissus de la même façon d'un cas à l'autre. Le schéma de la figure 7.2 identifie le positionnement des agrafes et la séquence de numérotation requise pour

la mise en paraffine des spécimens. Les cassettes de paraffine numérotées 1 à 5 contiennent les régions d'intérêt de la trompe gauche, alors que les cassettes numérotées 6 à 10 contiennent les régions d'intérêt de la trompe droite. La latéralité est établie comme en pathologie, selon la position du ligament ovarien. Les échantillons sont découpés sur une section de 3 mm vis-à-vis chaque agrafe, puis fixée en formaline, puis mis en paraffine dans une cassette numérotée avec la date et le numéro d'agrafe. Par exemple, la cassette de la patiente fictive du 21 février 2016 pour la première agrafe porterait l'inscription 2016 – 02 – 21 – 1. Une lame histologique teinte à l'hématoxiline et à l'éosine (H&E) est prise en surface de chaque bloc. Les blocs de paraffine et les lames sont ensuite remis au pathologiste participant au projet, le Dr Kurosh Rahimi. Le reste des échantillons d'ovaire et d'utérus, de même que les segments de trompe non utilisés dans le projet suivent le cours normal d'analyse histopathologique par état frais.

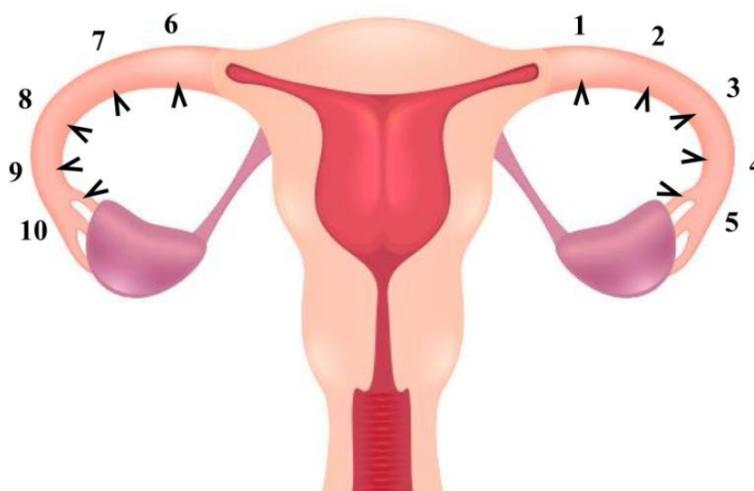


Figure 7.2 Schéma de placement des agrafes et convention de numérotation des échantillons traités en pathologie. Le ligament ovarien s'attache à la partie postérieure de l'utérus.

Cinq patientes ont été recrutées pour l'étude pilote. Les critères d'inclusion sont de prendre part à une chirurgie prophylactique ou à une hystérectomie avec ovariectomie bilatérale. Les critères d'exclusion sont les suivants : la patiente a un diagnostic de cancer ovarien ou la patiente est mineure ou majeure inapte.

7.3 Résultats OCT

L'étude pilote a été réalisée avec le système de table et la sonde statique pour l'acquisition OCT. Deux exemples d'acquisitions avec le système de table sont présentés à la figure 7.3. Il s'agit de vues de la trompe de Fallope au niveau de l'ampoule, (a) à (c), puis au niveau du pavillon, (d) à (f). On peut voir sur la figure 7.3(a) et (c) que la profondeur de pénétration du système d'imagerie est nettement insuffisante pour analyser toute la trompe à partir de l'extérieur. Il faudrait prendre plusieurs volumes tout autour de la trompe pour visualiser tout le lumen. Cependant, le système de table est bien adapté pour imaginer la région du pavillon, étant donné le grand volume. Le pavillon doit être analysé en entier, de l'intérieur comme de l'extérieur. On note la présence de nombreux vaisseaux sanguins dans la partie frangée du pavillon, concordant avec l'histologie.

La sonde statique a été insérée avec succès dans les 10 trompes étudiées. L'insertion dans le pavillon présente un défi, en ce sens où il faut tenir la trompe par l'infundibulum (1.5 cm plus loin) pour éviter d'abimer la partie frangée externe du pavillon. L'insertion dans le pavillon est rapide (environ 10 s). La seconde étape d'insertion est de négocier les tortuosités de la trompe avec la sonde. Deux inflexions sont critiques : la jonction entre l'infundibulum et l'ampoule, et le milieu de l'ampoule. Ces deux inflexions sont complexes à manœuvrer, car elles font suivre une trajectoire tri-dimensionnelle à la trompe. Ces inflexions semblent varier d'une patiente à l'autre en ce qui a trait à l'amplitude et au positionnement exact. L'insertion de la sonde a permis d'accéder à l'isthme, la partie la plus étroite de la trompe, mais sans réussir à joindre la jonction utéro-tubale. La sonde de 1.2 mm de diamètre est trop grosse pour accéder à l'utérus via la trompe. Il est également à noter que 9 des 10 trompes analysées ont mesuré moins de 10 cm de longueur. Le temps d'insertion varie entre 20 s et 45 s.

Pour éviter des dommages aux trompes, le bout de la sonde a été poli. Cette action corrective a été apportée après la séance d'imagerie sur la première patiente où des dommages ont été constatés au niveau des villosités lors de l'analyse histologique. La figure 7.4 montre les histologies d'un site abîmé sur la figure 7.4a) après insertion de la sonde. Après ajustement de l'embout, l'intégrité des villosités est préservée, même après 4 insertions de la sonde, dont le résultat figure en 7.4b). L'astérisque (*) montre l'endroit où la sonde a été insérée. Les têtes de flèche montrent les sites de bris des villosités. L'encadré rouge montre un agrandissement de la région touchée.

Un exemple d'images acquises avec la sonde est présenté à la figure 7.5. Une coupe en profondeur est présentée dans l'axe longitudinal de la trompe, l'aspect vertical a été étiré afin de pouvoir visualiser les structures. L'orientation de l'image montre l'intérieur de la trompe

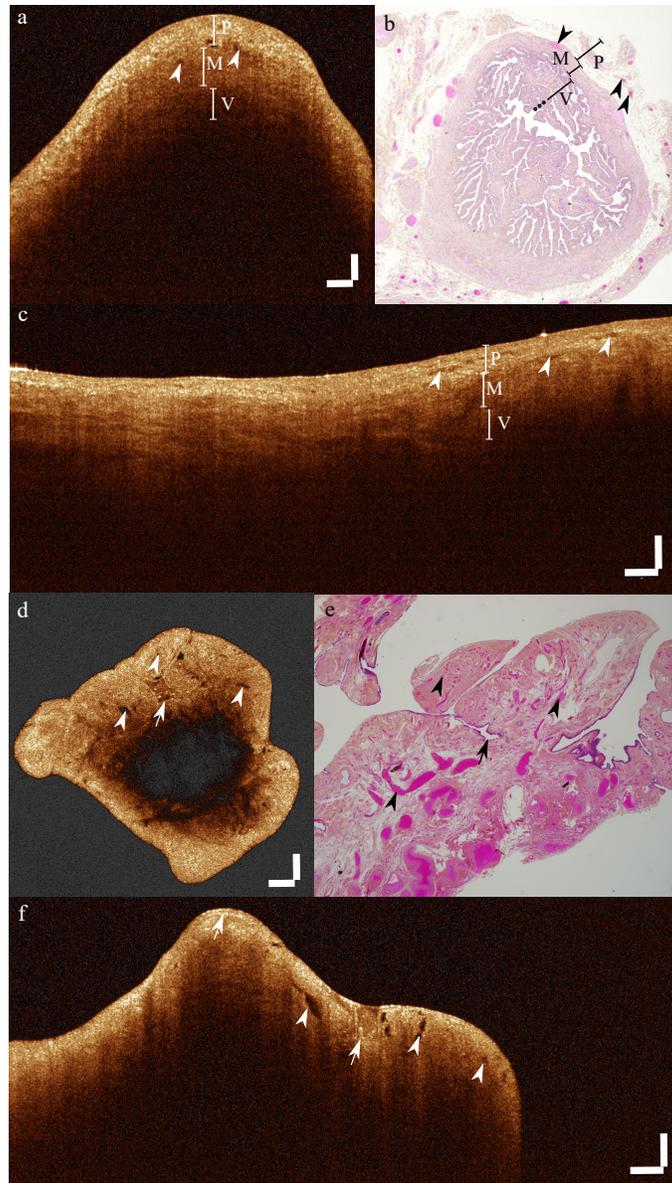


Figure 7.3 Images issues d'acquisitions 3D OCT avec le système de table pour un segment de l'ampoule et un segment de pavillon. Les images OCT en (a) et en (c) sont issues d'un volume OCT acquis dans la région de l'ampoule de la trompe gauche en vue transverse et longitudinale respectivement. L'histologie correspondante est présentée en (b). Le péritoine (P), la paroi musculaire (M) et les villosités (V) sont identifiés sur chaque image. Les têtes de flèche montrent les vaisseaux sanguins, abondants dans le péritoine. La seconde moitié de la figure présente le pavillon. Les figures (d) et (f) présentent deux coupes transverses issues d'un volume OCT. L'histologie correspondante est présentée en (e). Les vaisseaux sanguins sont identifiés par les têtes de flèche. La flèche montre l'épithélium du pavillon. Les barres d'échelle représentent 500 μm .

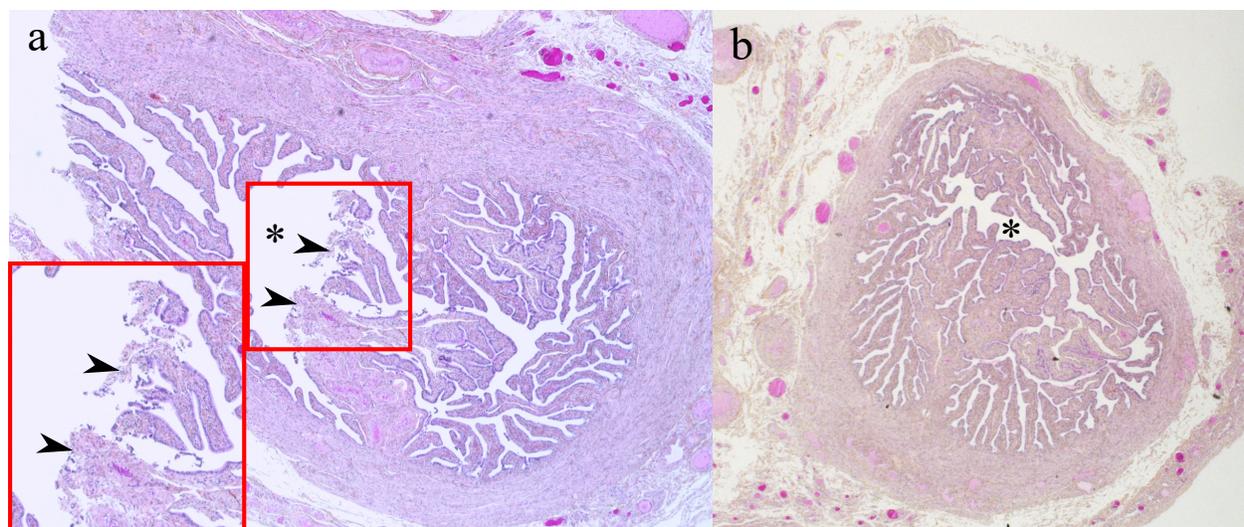


Figure 7.4 Impact de l'embout de la sonde sur l'intégrité des villosités de la trompe. a) présente un segment de trompe abîmé par l'insertion du premier prototype de sonde qui n'a pas été suffisamment arrondi, avec un agrandissement de la région d'intérêt dans l'encadré rouge. b) montre un segment de trompe après 4 insertions du second prototype de sonde, avec un embout suffisamment lisse. L'astérisque (*) montre l'endroit où la sonde a été insérée et les têtes de flèche montrent les régions de bris des villosités.

en haut, en allant vers l'extérieur de la trompe vers le bas. L'isthme est situé à gauche, alors que le pavillon est à l'extrémité droite. Un agrandissement des sections morphologiques de la trompe est présenté (b à f). La section isthmique présente quelques artéfacts de mouvement, car la sonde semble adhérer aux tissus au départ. Dans cette région, il faut noter que le rapport entre l'épaisseur de la paroi musculaire et le lumen est plus élevé, ce qui rend la trompe plus rigide que dans les sections plus élargies. À partir de l'encadré (c), on retrouve l'élargissement de la transition vers l'ampoule. La région de l'ampoule se poursuit jusqu'à l'encadré (e), qui présente l'infundibulum, en forme d'entonnoir pour faire la transition vers le pavillon et la partie frangée externe de la trompe. Le rétrécissement apparent est dû au fait que l'on doit tenir la trompe par ce segment lors des insertions et des mesures, ce qui fait que la sonde n'est pas nécessairement centrée dans cette région. Enfin l'encadré (f) montre le pavillon et la transition vers la partie frangée. Le signal s'atténue en profondeur et l'extérieur de la paroi n'est plus visible. Cette région est irriguée par de plus gros vaisseaux que le reste de la trompe, en plus de faire près de 1 cm de diamètre interne et au moins 5 mm de paroi. La sonde peut permettre l'analyse de la partie interne du pavillon, mais pas de la partie externe. L'usage du système de table demeure approprié pour sonder l'extérieur de la partie frangée. Dans toutes les régions, on retrouve les villosités, poussées contre la paroi

musculaire de la trompe. Elles apparaissent comme des lignes plus brillantes. Au centre se retrouve la paroi musculaire et la membrane péritonéale enveloppe la trompe à l'extérieur. Cette dernière apparaît comme une couche plus brillante et rétrodiffuse davantage de signal que le muscle qu'elle entoure. Les trois régions difficiles à négocier à l'insertion sont situées à l'entrée du pavillon (à droite de (f)), dans l'infundibulum (e) et dans l'ampoule (ici entre (c) et (d)). Il s'agit des premières images OCT endoscopiques réalisées par l'intérieur de la trompe. Ce sont également les premières images OCT des différents segments de la trompe de Fallope chez l'humain.

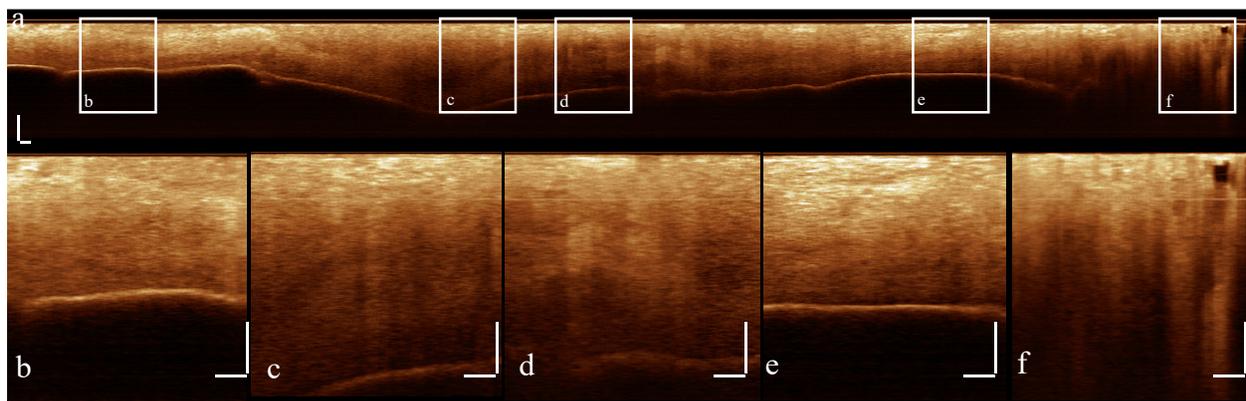


Figure 7.5 Images issues d'acquisition avec la sonde statique suivant l'axe longitudinal de la trompe. Une tranche en profondeur de toute l'acquisition sur une longueur de 12 cm est présentée en (a), avec un facteur vertical agrandi pour visualiser les structures. Les encadrés sont associés aux agrandissements identifiés correspondants (b) à (f) et correspondent en ordre alphabétique à l'isthme, deux régions de l'ampoule, l'infundibulum et au pavillon. Les barres d'échelle représentent 500 μm .

7.4 Spectres d'autofluorescence

Une sonde sur mesure a été développée et assemblée pour acquérir les spectres préliminaires d'autofluorescence dans les trompes de Fallope. La sonde est constituée de deux fibres sans cœur hautement multimode (125 μm de diamètre, 0.5NA). Une des fibres sert de source d'illumination et la seconde de détection. Les deux fibres sont introduites et collées dans un capillaire de verre à l'aide de colle optique biocompatible (AB9195, AngströmBond). La lumière d'excitation est couplée dans la fibre à l'aide d'un support en translation à 3 axes et d'un objectif de microscope 20 \times . La source employée est une combinaison de 6 diodes à état solide filtrées spectralement selon 6 plages de longueurs d'onde (SpectraX, Lumencor, USA). Les spectres d'excitation mesurés sont présentés à la figure 7.6, de même qu'une photo de

la sonde de fluorescence. La puissance injectée peut être ajustée de façon continue, de même que le nombre de diodes d'illumination actives. La puissance maximale en sortie de la sonde de fluorescence est de $200 \mu\text{W}$ pour une source individuelle. Le signal collecté par la fibre de détection est filtré (Chroma, USA) pour retirer le signal de réflectance avec une série de filtres et une lentille pour conjuguer la sortie de la fibre de détection avec l'entrée de la fibre de $200 \mu\text{m}$ allant au spectromètre (Maya2000Pro, Ocean Optics, USA). Les mesures de spectres ont été réalisées dans la salle attenante à la salle de chirurgie, les lumières éteintes, avec un temps d'intégration de 1 s. Même dans ces conditions, la sonde est suffisamment sensible pour collecter la lumière provenant de la salle de chirurgie. Un soin particulier a été apporté lors des manipulations pour éviter la corruption des spectres par la lumière ambiante.

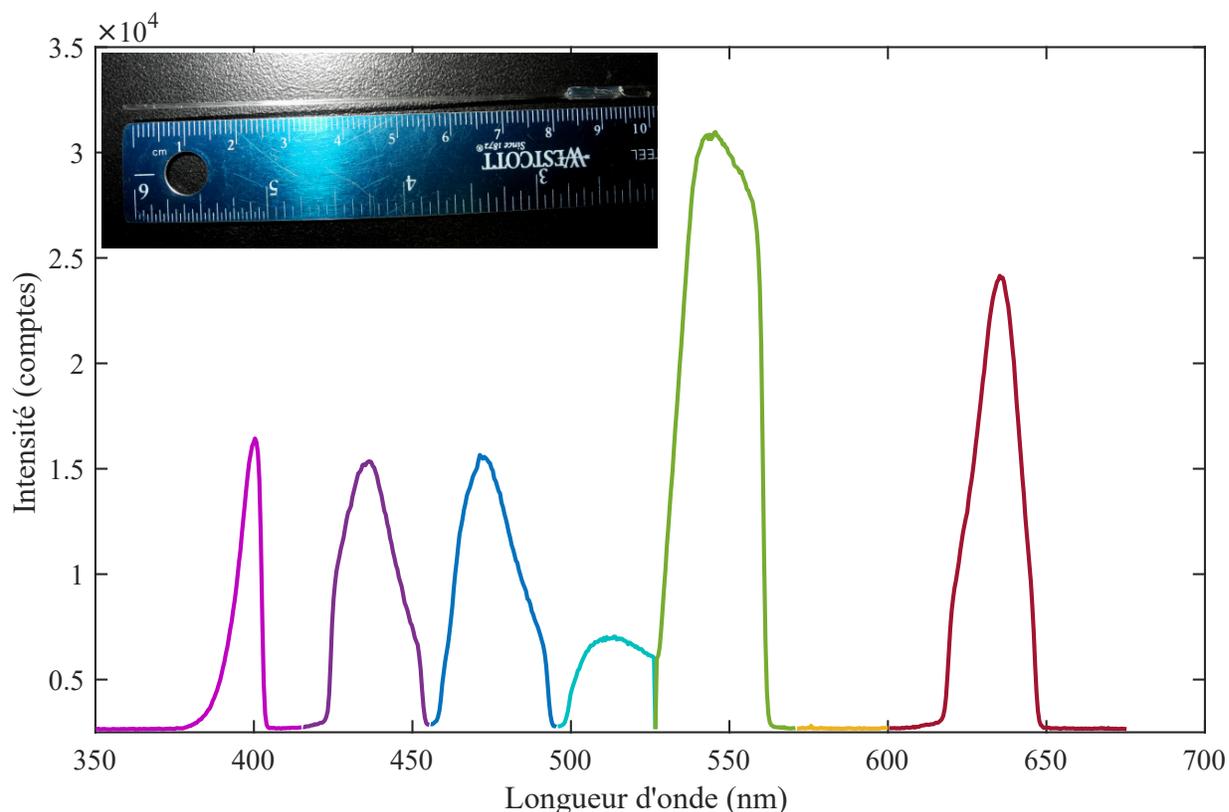


Figure 7.6 Spectres de la source Lumencor mesurés en sortie de la sonde de fluorescence et photographie de la sonde employée (coin supérieur gauche).

Un exemple de spectre mesuré est présenté à la figure 7.7. Les spectres d'auto fluorescence du pavillon et de l'ampoule de la trompe pour 2 sources d'illumination sont rapportés sur le même graphique. Chaque spectre a été acquis indépendamment et représente la moyenne de

plusieurs acquisitions. On remarque que l'autofluorescence est très faible. De plus, le processus est plus fort dans le pavillon et pour la source d'excitation bleue. La puissance détectée au spectromètre correspond à quelques fW à peine. L'autofluorescence pour les autres plages spectrales n'est pas montré, car le signal est noyé dans le bruit. Un maxima secondaire entre 600 et 650 nm est présent sur les spectres du pavillon et non sur celui de l'ampoule.

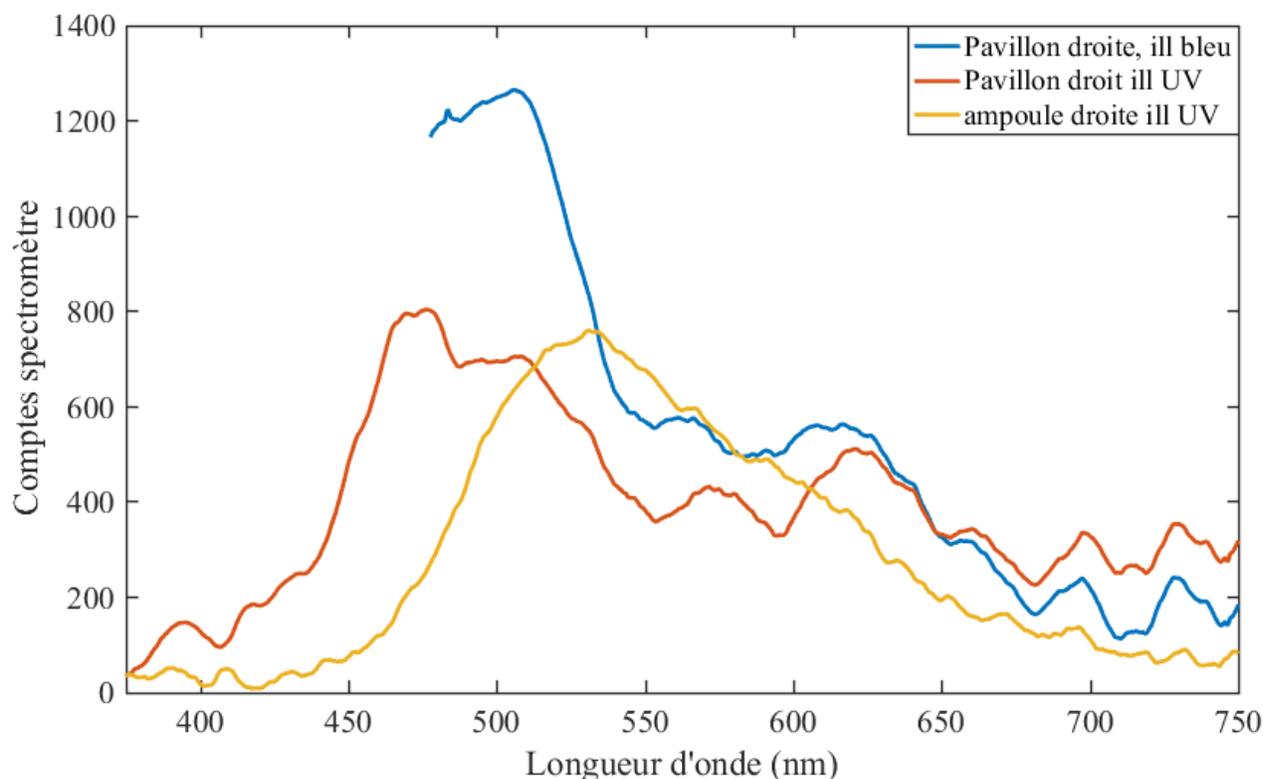


Figure 7.7 Spectres d'autofluorescence du pavillon et l'ampoule de la trompe de Fallope pour deux longueurs d'onde d'excitation. Les spectres sont superposés selon la plage spectrale. Un maximum secondaire est présent sur les spectres du pavillon et non sur celui de l'ampoule.

7.5 Validation clinique de la sonde

L'imagerie avec le système de table permet de procéder à une inspection rapide des trompes, ce qui est avantageux pour guider l'insertion de la sonde (vérifier la présence d'obstructions ou de kystes). De plus, le système de table permet de capturer de façon efficace la grande surface du pavillon, qui doit être sondée de l'extérieur et de l'intérieur. Avec une profondeur de pénétration de l'ordre du mm, la partie frangée peut être totalement couverte. Il est à

rappeler que cette section de la trompe est capitale à analyser, car elle fait partie des sites préférentiels pour la formation de STICs et de lésions séreuses. Il s'agit cependant d'une partie très fragile qu'il ne faut pas toucher, sans quoi les tissus très délicats seront abîmés ou arrachés et ne pourront pas être analysés en pathologie.

Les acquisitions avec la sonde permettent d'inspecter la majeure partie de la trompe de Fallope. L'insertion de la sonde est facile et prend moins d'une minute par trompe. Trois endroits difficiles à manoeuvrer ont été identifiés, soit l'insertion dans le pavillon, la transition entre l'infundibulum et le milieu de l'ampoule. Grâce à une sonde rigide avec un bout arrondi, il est possible de négocier l'insertion dans ces régions tortueuses sans abîmer les tissus. Le segment le plus étroit de la trompe n'a pas pu être imagé avec la sonde, car cette dernière est trop grosse pour se rendre jusqu'à la jonction utéro-tubale. Avec l'œdème induit par la chirurgie, le lumen de la trompe se rétrécit et le lumen fait moins que le 1 mm de diamètre annoncé dans les ouvrages d'anatomie. La forme arrondie en bout de sonde est cruciale afin de préserver les tissus durant l'insertion. Le polissage de toute surface accrochante est nécessaire.

Des images OCT de la majeure partie de la trompe ont été acquises. Ces images permettent de voir l'évolution des microvillosités dans les différents segments de la trompe. Les acquisitions avec la sonde permettent d'imager de l'intérieur vers l'extérieur. La membrane externe est visible sur 8 des 10 trompes imagées. Il s'agit des premières images réalisées avec une sonde endoscopique à l'intérieur de trompes humaines. Il s'agit également des premières images OCT des différentes sections morphologiques de la trompe.

Les spectres d'autofluorescence acquis sont de très faible intensité. Il s'agit des premiers spectres d'autofluorescence du pavillon et de l'infundibulum des trompes de Fallope, les autres études de la littérature ne rapportent seulement qu'une puissance intégrée sur une partie du spectre. Afin de mesurer la fluorescence de façon plus efficace, il faut améliorer la sonde et la rendre très efficace. Les signaux mesurés sont très faibles et imposent de grandes contraintes sur l'efficacité de collection. De plus, il semble qu'il y ait davantage de fluorescence avec les longueurs d'onde d'excitation vers le violet. Le pavillon semble plus fluorescent que l'infundibulum. Il faudra cependant plus de mesures afin de pouvoir confirmer ces observations.

Le protocole d'imagerie est fonctionnel et permet d'être bien organisé et coordonné avec les équipes médicales en chirurgie et en pathologie. Il a cependant été remarqué qu'il est préférable de faire la découpe des spécimens après fixation dans la formaline. Le protocole de pathologie sera donc ajusté en conséquence pour l'étude clinique subséquente, réalisée sur 25 patientes et présentée au chapitre 8.

Les objectifs de ce chapitre sont d'identifier les requis pour une sonde de spectroscopie par

fluorescence, de confirmer les requis cliniques de la sonde OCT et de confirmer le protocole d'imagerie. Les requis de la sonde de spectroscopie sont très contraignants, il faut une efficacité de collection élevée (plus de 80 %), un faible diamètre pour mesurer à l'intérieur de la trompe (moins de 5 mm) et une efficacité d'illumination élevée sur la plage du visible et spécialement dans la région du bleu et du proche UV (la plus faible atténuation possible de la fibre optique). En ce qui a trait aux requis cliniques de la sonde OCT, la sonde statique répond bien aux besoins d'imagerie. La qualité des images est suffisante, l'efficacité de la sonde est adaptée et le passage du système de table au système endoscopique se fait rapidement et sans ajustement. Dans un cas idéal, il faudrait réduire le diamètre externe de la sonde et viser des dimensions de l'ordre de 750 μm afin de pouvoir visualiser la totalité de la trompe. Cependant, une telle diminution en taille s'effectue au coût d'une diminution de la rigidité, peu importe le matériau employé comme structure externe de la sonde. Cette rigidité est capitale pour procéder à l'insertion de la sonde, spécialement dans trois régions de transition. Enfin, le protocole clinique est validé et confirmé, avec une modification dans le traitement en pathologie en ce qui a trait à l'ordre de fixation et de découpe des spécimens imagés. Comme les marques de régions d'intérêts sont des agrafes, ces dernières supportent bien de passer 1 mois en formaline, contrairement à des marques d'encre.

7.6 Conclusion

Les trois objectifs de validation clinique ont été rencontrés avec l'étude pilote réalisée sur 5 patientes. Les premiers spectres d'auto fluorescence du pavillon et de l'infundibulum des trompes de Fallope ont été mesurés. Des mesures additionnelles sont requises avant de pouvoir tirer des conclusions, car les intensités mesurées sont très faibles. Ces mesures ont permis d'établir des requis pour une seconde itération de sonde en fluorescence. La sonde statique OCT a également acquis avec succès les premières images OCT réalisées de l'intérieur de la trompe. La sonde est cependant trop large pour accéder à la jonction utéro-tubale à cause de l'enflure générée par la chirurgie. La majorité de la trompe (plus de 80 %) a cependant pu être imagée chez chacune des 5 patientes enrôlées dans l'étude. Enfin, cette étude pilote a permis de consolider le protocole d'imagerie clinique et d'optimiser le traitement de fixation des spécimens.

CHAPITRE 8 IMAGERIE CLINIQUE EX SITU PER-OPÉRATOIRE

Un système combinant efficacement l'OCT et l'imagerie par fluorescence dans une sonde à fibre unique est prometteur pour la détection de lésions de petit volume dans les trompes de Fallope. Ce type de système présente également des atouts pour le passage à l'imagerie in vivo par hystéroscopie. Ces avantages comptent entre autres la miniaturisation de la sonde en dessous de 1 mm, l'imagerie rapide et la possibilité de rendre une partie de la sonde flexible. Parmi les étapes nécessaires pour réaliser ce type d'instrument, il faut caractériser l'auto fluorescence des tissus gynécologiques. Il faut également connaître l'allure des tissus sains, bénins et pathologiques sous chacune des modalités d'imagerie.

À partir des résultats établis aux chapitres précédents, une étude clinique est réalisée sur 25 sujets humains. Cette étude comporte deux volets indépendants : l'étude des tissus par l'OCT et la caractérisation de l'auto fluorescence des trompes de Fallope. Cette étude pilote veut répondre à 5 objectifs spécifiques.

1. Définir une procédure clinique endoscopique pour l'évaluation rapide des trompes de Fallope.
2. Comparer les spectres d'auto fluorescence de différentes régions de la trompe de Fallope, de l'utérus et des ovaires pour relever des différences spectrales.
3. Déterminer si le spectre d'auto fluorescence apporte une information pertinente en plus de l'intensité de fluorescence.
4. Établir un atlas d'images types de trompes saines
5. Établir un atlas d'images types de conditions bénignes (kystes, hydatides, etc)

Ce chapitre porte sur cette étude clinique réalisée au CHUM Notre-Dame. Le protocole de recherche et même que les approbations éthiques sont détaillés. La méthodologie de l'étude est ensuite présentée. Les résultats de l'étude pilote sont détaillés, avec le compte-rendu du recrutement, les résultats du volet OCT et les résultats du volet de spectroscopie par auto fluorescence. Les résultats OCT incluent l'imagerie de trompes saines, de cas bénins et d'imagerie en cas de ligatures tubales. Le chapitre se poursuit sur une discussion des résultats en fonction des objectifs établis au début de l'étude et se termine sur une conclusion.

8.1 Méthodologie

L'étude pilote présentée fait l'objet d'une approbation des comités d'éthique de la recherche de Polytechnique (CÉR-14/15-19) et du CHUM (14.159), de même que du comité scientifique du CHUM. Il vise l'imagerie par OCT et par autofluorescence des échantillons frais de trompes de Fallope et d'utérus obtenus lors d'hystérectomies complètes avec ovariectomie bilatérale.

8.1.1 Recrutement

Un total de 25 patientes ont consenti de participer à l'étude durant le cours normal de leur chirurgie. Le recrutement s'est effectué à la clinique de gynécologie du CHUM lors des consultations patients par Dre Diane Provencher. Les critères d'inclusion sont de prendre part à une hystérectomie avec ovariectomie pour une prophylaxie et ou un cancer de l'endomètre. Les critères d'exclusion couvrent les patientes mineures ou majeures inaptes, ainsi que les cas de cancer de la trompe ou des ovaires. Les données ont été désidentifiées et Dre Provencher ainsi que Dre Mes-Masson détiennent le lien entre les dossiers patientes et les dossiers d'imagerie. Les membres de l'équipe médicale du projet ont accès au dossier médical des patientes.

Un total de 25 femmes ont été recrutées pour cette étude pilote, âgées entre 25 et 89 ans. Les spécimens étudiés comptent 49 trompes de Fallope, 24 utérus et 49 ovaires. Un total de 279 volumes OCT de trompes, 66 volumes d'ovaires et 21 volumes d'utérus ont été acquis. Le temps moyen d'imagerie par patiente est de 30 min, subdivisé en 20 min pour l'OCT et 10 min pour les mesures spectroscopiques. Une moyenne de 15 volumes OCT et 12 spectres sont acquis par patiente.

8.1.2 Protocole d'imagerie

Les observations réalisées lors de l'étude pilote préliminaire sur 5 patientes ont permis de confirmer le protocole d'imagerie employé. Lors du début de la chirurgie, la requête de pathologie et le protocole sont remplis. Lors de la réception du spécimen, le chronomètre est mis en marche. Une inspection macroscopique est réalisée et des photographies sont prises au besoin. Le spécimen est installé sous la tête d'imagerie du système OCT de table, pour une inspection extérieure rapide des trompes. En cas de régions suspectes, un volume OCT est acquis. Le système OCT est ensuite changé de configuration pour installer la sonde endoscopique fixe. Nous procédons ensuite à l'insertion de la sonde dans la trompe pour imager. La sonde est ensuite insérée dans l'utérus par le col pour réaliser des volumes dans la cavité utérine. Le système est à nouveau changé de configuration pour installer la sonde rotative. Cette sonde est ensuite employée pour imager l'intérieur de l'infundibulum et du pavillon.

Cinq régions par trompes sont identifiées pour l'analyse pathologique et des agrafes hémostatiques sont installées dans le tissu péritonéal entourant la trompe pour identifier chacune des régions. Si la sonde rotative peut passer par le col, des images sont acquises de la cavité utérine. Le temps du chronomètre est noté. Le système OCT est ensuite mis de côté pour faire place au système de fluorescence. Les lumières de l'antichambre sont éteintes et les mesures spectroscopiques de fluorescence sont enregistrées pour plusieurs régions de la trompe, l'utérus et des ovaires. Des mesures de bruit ambiant sont également enregistrées. Le chronomètre est arrêté et le temps total noté, puis les échantillons sont remis avec les autres prélèvements pour l'analyse en pathologie.

Le système OCT et les sondes OCT employées sont les mêmes que celles employées pour l'étude préliminaire (chapitre 7). La sonde de fluorescence a cependant été modifiée pour employer des fibres multimodes de 440 μm de diamètre externe pour l'illumination et la collection, disposées côte-à-côte et polies pour ne pas abîmer les tissus fragiles de la trompe.

8.1.3 Protocole de pathologie

Le protocole de pathologie de l'étude pilote préliminaire est utilisé, en conservant la modification sur l'ordre de fixation et de coupe des échantillons avant la mise en paraffine. La convention de numérotation des échantillons demeure la même qu'à la figure 7.2. La pathologiste en charge de l'analyse des lames histologiques est Dr Kurosh Rahimi au CHUM Notre-Dame.

8.2 Résultats de l'étude pilote : imagerie OCT

La partie OCT de l'étude a généré une très grande quantité de données (1.75 Tb de données brutes). L'emphase de cette section est mise sur les images bi-dimensionnelles issues de trompes de Fallope saines ou présentant des conditions bénignes nécessaires pour constituer un atlas. Les trompes de Fallope ont été imagées avec le système de table pour la partie frangée du pavillon. Elles ont ensuite été imagées avec la sonde statique et la sonde rotative pour l'inspection des villosités. Quelques cas sont ici proposés pour montrer l'information obtenue avec l'analyse des images OCT. Un cas de trompes saines est d'abord analysé, puis deux cas de conditions bénignes. Un cas de ligature tubale est aussi présenté pour évaluer l'impact de cette procédure et les défis qu'elle pose.

8.2.1 Trompes saines et prophylaxies

Les chirurgies prophylactiques sont recommandées comme mesure préventive pour les femmes présentant de hauts risques de développer un cancer ovarien. Tous les cas de prophylaxies étudiés provenaient de sujet mutées BRCA 1 et/ou 2, ou avec une autre combinaison de gènes à risques (BRAF1 ou KRAS). Ces patientes sont jeunes (pré-ménopause), cette procédure est recommandée vers 30 à 40 ans selon les antécédents médicaux (par rapport au cancer du sein). Cette mesure cible les lésions séreuses dans les trompes avant qu'elles ne se propagent à l'ovaire.

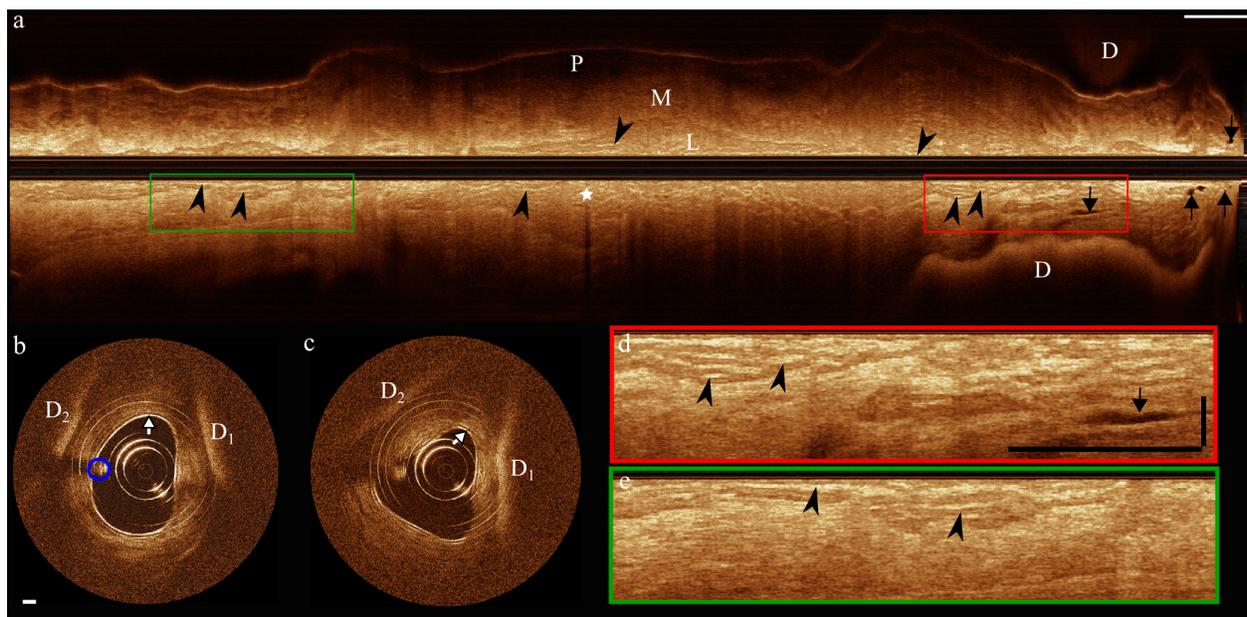


Figure 8.1 Analyse OCT d'un cas de prophylaxie réalisée avec les deux prototypes de sonde. Les acquisitions avec la sonde fixe sont présentées à la sous-figure (a) sur une longueur de 9.5 cm. La sonde est située dans le canal sombre au centre de cette l'image. Des agrandissements d'un facteur 3 sont présentés dans les encadrés (d) vert (ampoule) et (e) rouge (pavillon). Les flèches à tête triangulaire noires pointent des régions d'œdème. Les trois couches de tissus de la trompe sont identifiées : le lumen (L), le muscle (M) et le péritoine (P). Un vaisseau sanguin est situé sous en marqueur en étoile et atténue le signal en profondeur. Les doigts qui tiennent la trompe sont identifiés par la lettre D. Les images (b) et (c) présentent des sections transverses acquises avec la sonde rotative dans la région du pavillon. Les villosités sont visibles au contact du sac stérile. Le fil d'alimentation est encerclé en bleu en (b) et l'enveloppe stérile est identifiée par la flèche à tête triangulaire blanche. Les doigts tenant la trompe sont identifiés par D₁ et D₂. Barres d'échelle : 500 μm.

La figure 8.1 présente des images OCT issues d'acquisitions réalisées avec les deux prototypes de sonde. La sous-figure (a) présente deux images transverses acquises avec la sonde à canule

fixe sur 9.5 cm de longueur. La sonde est située dans le canal foncé au centre de l'image et la trompe se déploie vers l'extérieur à la verticale de l'image. La fin du segment isthmique est située à la gauche de l'image et le pavillon s'étend à droite. Les trois régions anatomiques sont identifiées sur la figure, soit le lumen (L), le muscle (M) et le péritoine (P). Les têtes de flèche pointent l'épithélium des microvillosités dans plusieurs segments de la trompe. L'encadré vert est situé dans l'ampoule (agrandissement d'un facteur 3 en (e)) où ces structures sont visibles. L'encadré rouge (agrandissement en (d)) est issu du pavillon et montre un exemple d'œdème (flèches noires à tête triangulaire). Les doigts supportant la trompe au moment de l'acquisition sont visibles à travers la trompe et sont identifiés par la lettre D. Un vaisseau sanguin est situé sous le marqueur (étoile blanche) et contient suffisamment de sang pour atténuer le signal OCT le long des lignes acquises dans cette région. Les sous-figures (b) et (c) présentent deux sections transverses issues du pavillon acquises avec la sonde rotative. Le fil d'alimentation électrique est encerclé en bleu en (b). La flèche triangulaire blanche identifie l'enveloppe stérile enfilée sur la sonde et entrant en contact avec le tissu de la trompe. Les villosités sont plus visibles en (d). Les doigts sont visibles et sont identifiées par D_1 et D_2 .

La figure 8.2 présente un exemple d'analyse du pavillon. La figure 8.2(a) montre une section histologique prise dans la partie frangée du pavillon de la trompe de Fallope. L'encadré rouge présente un agrandissement pour montrer des exemples de vaisseaux sanguins (flèches) et de régions d'œdème induit par la chirurgie (*). Les figures 8.2(b) et (c) montrent deux images OCT en coupe transverse issues du volume OCT acquis dans la même région. Des exemples de vaisseaux sanguins et des régions d'œdème sont identifiés avec la même convention qu'en (a). En (d) est présentée une vue en plongée d'une projection tridimensionnelle de la trompe de Fallope réalisée à partir du volume OCT. La projection est réalisée par rapport aux points de maxima d'intensité dans le volume pour chaque ligne-A. Les plans d'où sont tirés les sections (b) et (c) sont identifiés par les lignes pointillées et les flèches pointent vers l'image correspondante. La partie frangée du pavillon peut être couverte en entier en réalisant 2 à 4 volumes (selon la taille du pavillon) OCT de $10 \times 10 \times 5$ mm.

8.2.2 Tumeurs bénignes : kystes paratubaires, hydatide de Morgagni et corps de Walthard

Plusieurs conditions bénignes peuvent affecter les trompes de Fallope, sans causer de symptômes ou de dangers pour la santé. La majorité de ces conditions se manifestent comme des structures kystiques sur la partie extérieure de la trompe de Fallope. À l'inspection macroscopique, ces structures se présentent comme des bulles jaunâtres remplies de liquide. La consistance peut être plus ou moins compressible selon l'épaisseur de la paroi.

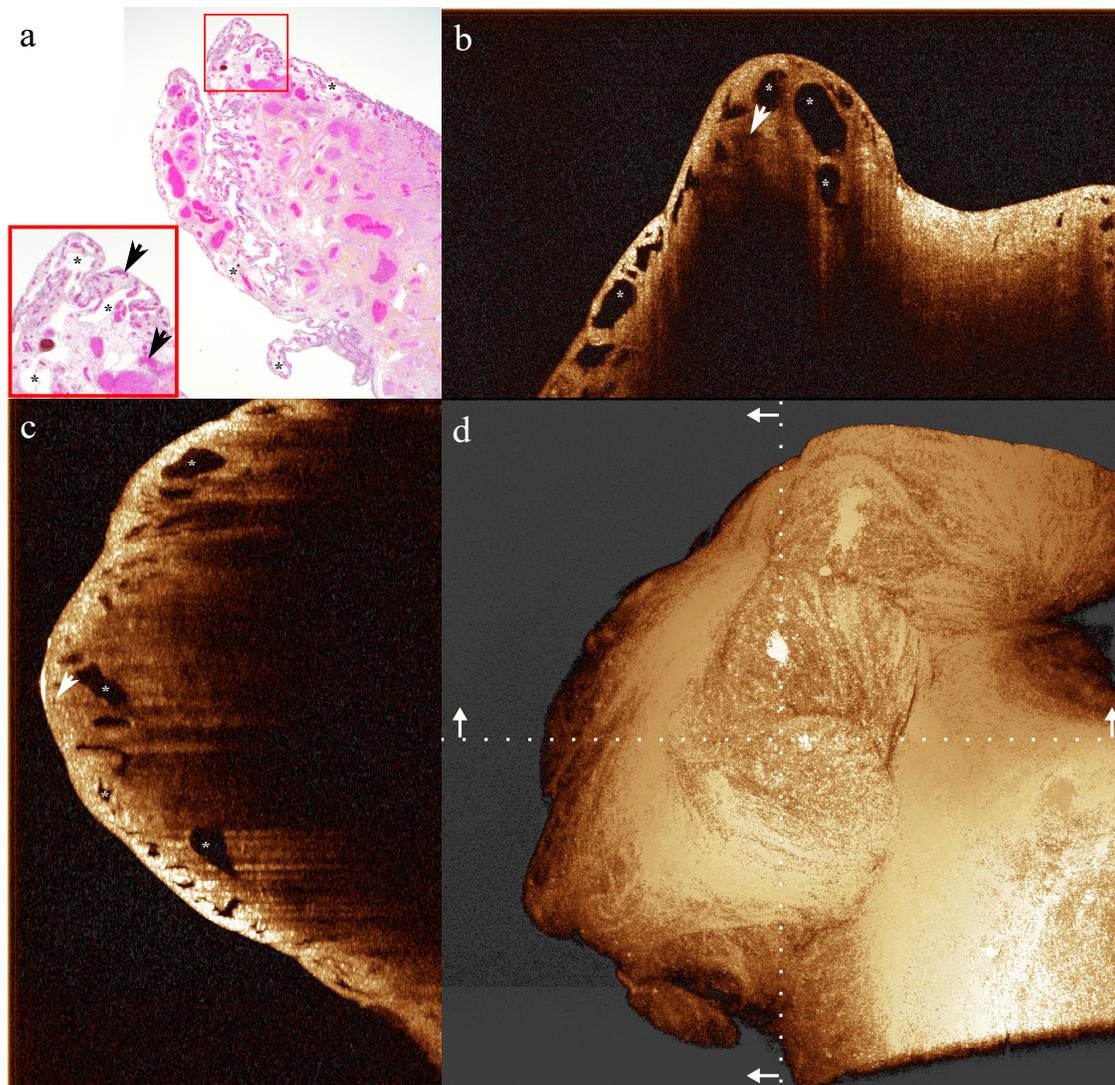


Figure 8.2 Pavillon de la trompe de Fallope issu d'une prophylaxie. L'histologie d'une terminaison de la partie frangée du pavillon est présentée en (a) avec un agrandissement dans l'encadré rouge. Les flèches pointent des vaisseaux sanguins, présents en grande quantité et les astérisques (*) identifient des régions d'œdème induits par la procédure chirurgicale. Les images (b) et (c) sont des sections transverses issues du volume OCT acquis dans cette région. Les flèches et les astérisques identifient des structures similaires à celles identifiées en sur l'histologie. L'image (d) est la vue en plongée d'une projection tridimensionnelle du pavillon de la trompe. Les lignes pointillées et les flèches identifient les plans d'où sont issues les images transverses (b) et (c). Barre d'échelle : 1 mm.

La figure 8.3 montre un exemple d'images provenant d'un spécimen de trompe de Fallope issu d'une prophylaxie et imagé avec le système de table. En 8.3(a) et (b), on retrouve deux sections correspondantes prises au niveau de l'ampoule de la trompe. Sur l'histologie (a),

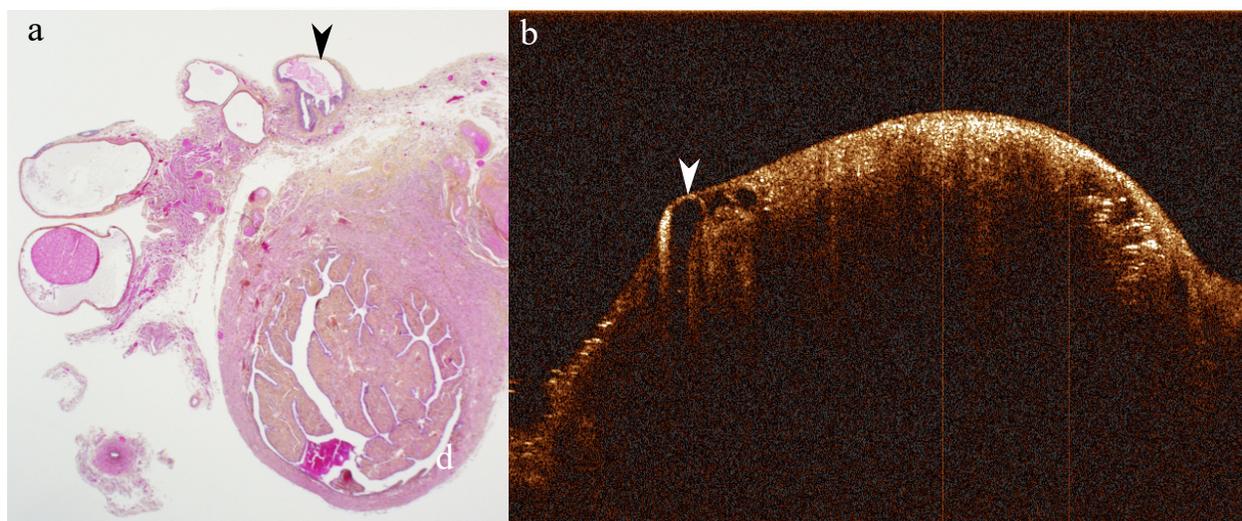


Figure 8.3 Trompe saine issue d'une prophylaxie imagée à l'OCT. La sous-figure (a) présente l'histologie d'un segment de l'ampoule. Une série de kystes sont visibles, pointée par la tête de flèche noire. La sous-figure (b) montre une image transverse de la trompe issue d'un volume OCT acquis au même endroit. Le kyste correspondant à celui identifié précédemment est indiqué par la tête de flèche blanche.

une chaîne de kystes est visible et celui sur la partie antérieure de la trompe est identifié par la tête de flèche noire. L'image OCT (b) est issue d'un volume acquis dans la même section de la trompe et correspond au plan de la section histologique. Le même kyste est identifié par la tête de flèche blanche. La suite de la série de kystes n'est pas visible, car elle se retrouve sous la trompe. L'OCT ne permet pas d'imager adéquatement l'intérieur de la trompe, mais permet tout de même d'analyser le contenu du péritoine et de la paroi musculaire, où plusieurs conditions bénignes peuvent se loger. Ces conditions ne sont pas adéquatement visibles lorsque la trompe est imagée de l'intérieur avec la sonde. Le dernier segment de la trompe est très important à examiner et présente une grande surface à analyser.

Une condition intéressante pour l'étude est l'hydatide de Morgagni. Elle est catégorisée comme tumeur bénigne de la trompe [136]. Son incidence est inconnue à ce jour, mais elle est présente dans 35 % des procédures laparoscopiques exploratoires en cas d'infertilité. L'hydatide se manifeste comme un kyste de forme ellipsoïde de dimensions allant de 0.5 à 2 cm. Il s'agit de vestiges des canaux embryonnaires de Muller ou de Wolf (qui donneront respectivement les trompes de Fallope et une partie du vagin chez la femme ou le canal déférent chez l'homme). Elle ne présente pas de symptôme et de complication évolutive. Il se peut que l'hydatide se torde, causant des douleurs aiguës à l'abdomen et dont le traitement est le retrait chirurgical. En plus du liquide, les hydatides peuvent contenir des masses solides et

des micro-calcifications. Une condition plus fréquente est la présence de corps de Walthard, localisés dans la séreuse tubaire. Ils peuvent mesurer quelques millimètres de longueur dans la plus grande dimension. Ils proviennent d'îlots de cellules épithéliales ovariennes qui s'invaginent et peuvent former des cavités kystiques. Cette condition est souvent présente chez les femmes ménopausées et a été rapportée dans 15 à 20 % des pelvoscopies de routine.

La figure 8.4 (a) à (c) présente un exemple de trompe avec une hydatide de Morgagni, tandis que 8.4 (d) et (e) montre un exemple de corps de Walthard. En 8.4 (a), une section histologique du péritoine est présentée avec deux kystes de Morgagni (T_1 et T_2). Les figures 8.4 (b) et (c) sont issues du volume OCT acquis sur ce site. Les deux images sont perpendiculaires et chaque image coïncide avec la ligne pointillée de l'image complémentaire. La figure 8.4 (d) présente une section histologique d'une série de corps de Walthard. Malheureusement, étant donné qu'il s'agit d'une couche de cellules épithéliales en inclusion dans du tissu majoritairement adipeux, l'intégrité des corps est difficile à préserver (le processus de fixation dissout les tissus adipeux). Les deux sites présumés sont cependant identifiés par des têtes de flèches. La figure 8.4 (e) présente une image OCT issue du volume acquis sur ce site. Les deux régions correspondant aux corps de Walthard sont identifiés par les têtes de flèche.

8.2.3 Ligatures tubales

Les ligatures tubales constituent une procédure fréquente pour assurer la stérilité. Il s'agit de refermer chacune des trompes afin d'empêcher le transit de l'ovule vers l'utérus. La procédure a changé de forme au cours des années, elle se pratiquait auparavant à l'aide de suture au milieu de chacune des trompes. Cette procédure se révèle souvent peu efficace. La pratique a plutôt évolué vers le retrait chirurgical d'un segment de 1 cm de chacune des trompes au niveau de l'ampoule. Chaque segment de trompe restant est ensuite refermé. Une nouvelle procédure incite plutôt à pratiquer une fibrectomie, qui consiste à retirer la partie frangée du pavillon et à coudre l'extrémité de la trompe. Ce type de procédure est pressenti pour limiter à la source la possibilité de migration de lésions séreuses potentielles de la trompe à l'ovaire. Une étude clinique est en cours d'approbation afin d'étudier les impacts d'une telle procédure sur la réduction réelle des risques de cancer ovarien. Ce type de procédure pose un problème d'insertion de la sonde pour l'inspection des trompes de Fallope. Deux cas de ligatures se sont présentés au courant de l'étude. Dans le premier cas, la sonde a pu être partiellement insérée dans la trompe. Dans le second cas, la sonde n'a pas pu être insérée, car la ligature était située au niveau du pavillon, soit au point d'entrée de la sonde.

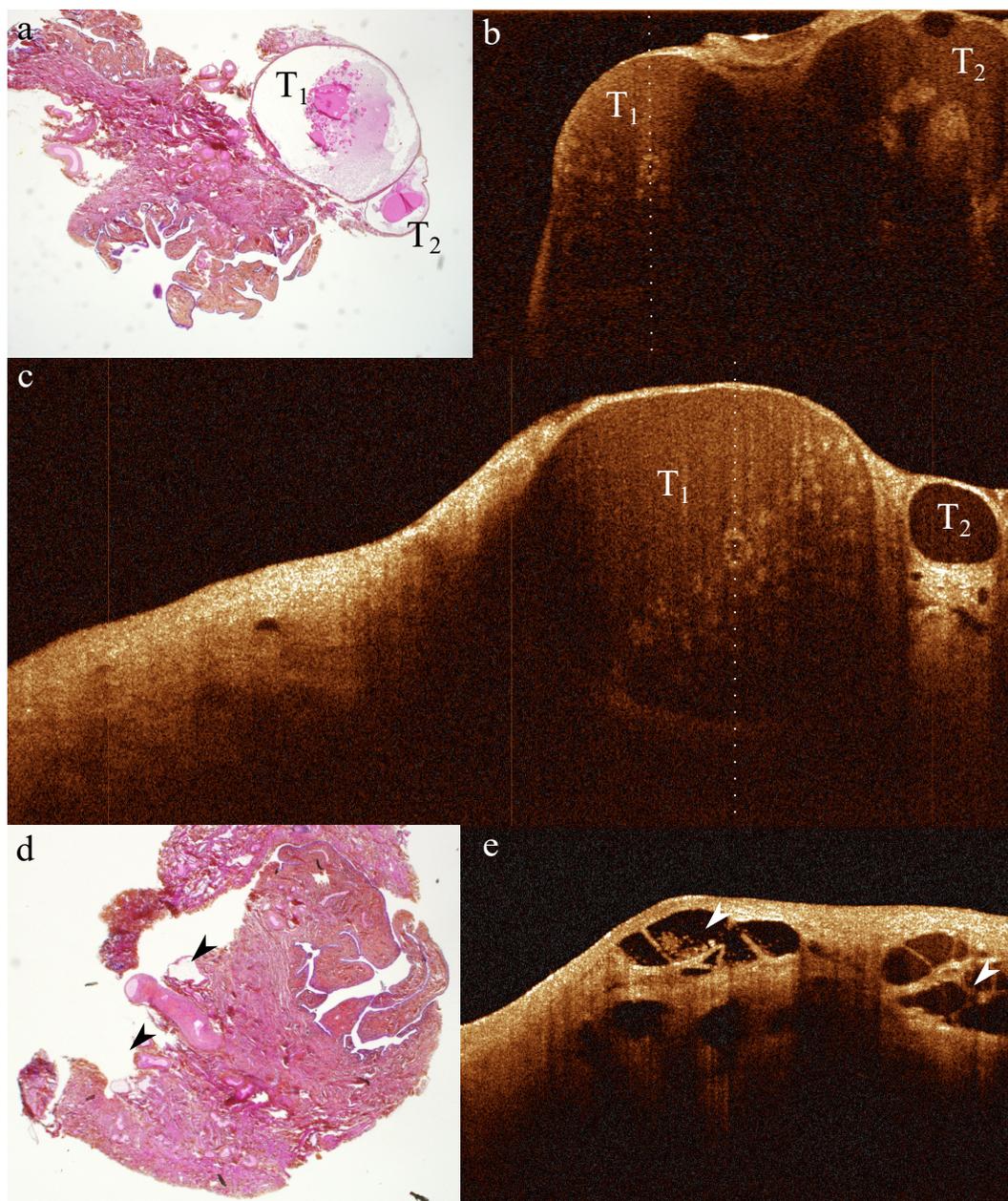


Figure 8.4 Hydatide de Morgagni, (a) à (c), et corps de Walthard, (d) et (e), imagés sur une trompe de Fallope à l'OCT. En (a) est présentée la section histologique d'un site où deux hydatides de Morgagni sont présentes (T_1 et T_2). Les images OCT (a) et (c) sont issues du volume OCT acquis de cette région et sont orthogonales entre elles, localisées respectivement sur la ligne pointillée de l'image complémentaire. La figure (c) présente une section histologique d'un site où sont présents des corps de Walthard (tête de flèche). (e) montre l'image OCT correspondante. Barre d'échelle : 1 mm.

8.3 Résultats de l'étude pilote : spectroscopie d'autofluorescence

Les mesures d'autofluorescence des trompes ont été acquises après la séance d'imagerie OCT. La sonde ponctuelle a été modifiée pour sonder une plus grande région avec des fibres de plus grand diamètre et une plus grande distance entre l'illumination et la détection pour sonder légèrement plus en profondeur. Des spectres dans les régions du pavillon, de l'infundibulum et de l'ampoule ont été acquis sur les trompes de Fallope. Des spectres ont également été acquis sur les ovaires, le col et dans la cavité utérine. Des spectres ont été acquis avec chacune des 6 sources d'excitations tels que présentés à la figure 7.6.

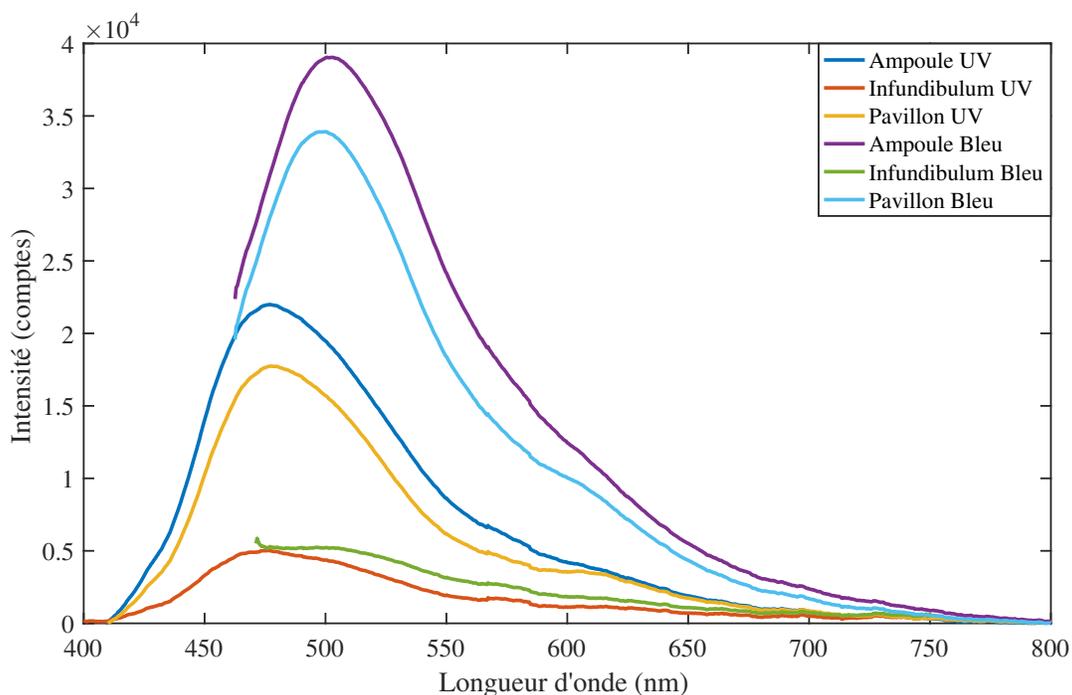


Figure 8.5 Spectres d'autofluorescence de trois différents segments de la trompe de Fallope. Les spectres illuminés avec la source UV et la source bleue sont présentés, les autres sources ne présentant par de signal d'autofluorescence suffisant.

La figure 8.5 présente les courbes d'autofluorescence de trois segments de la trompe de Fallope. Les spectres d'autofluorescence proviennent de l'illumination UV et de l'illumination bleue, les autres sources d'excitation ne produisant pas de signal suffisant. Les spectres de l'ampoule et du pavillon sont plus intenses que ceux de l'infundibulum. De plus, le spectre du pavillon présente une excroissance additionnelle dans la région 600 nm à 650 nm, peu visible sur les spectres des autres segments de trompe.

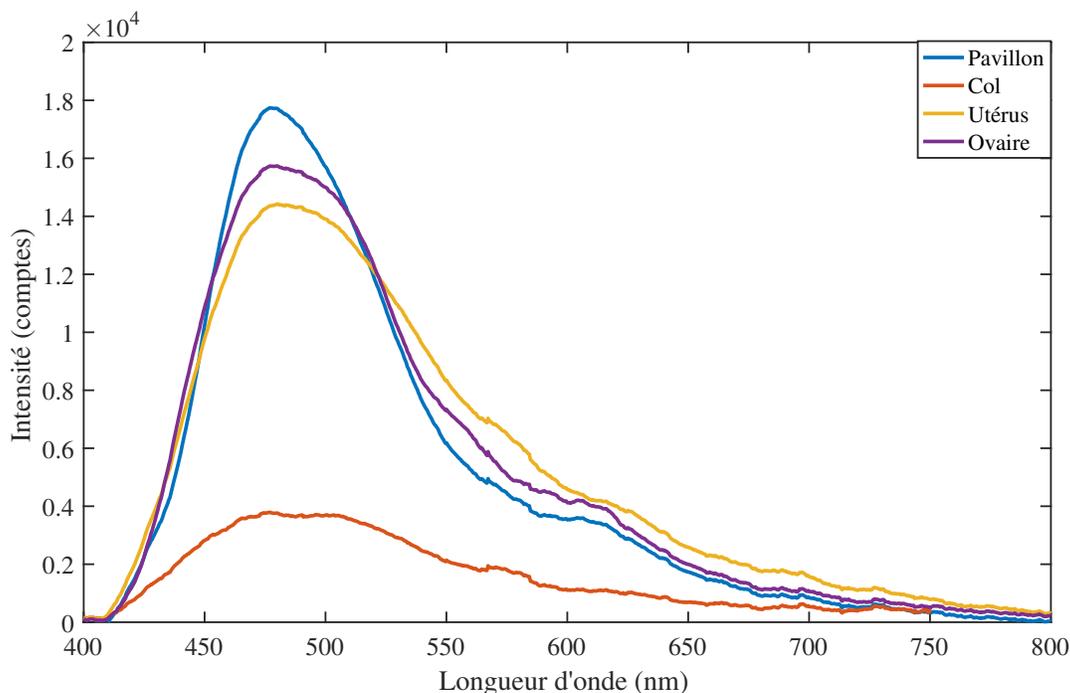


Figure 8.6 Spectres d'autofluorescence des tissus gynécologiques incluant le pavillon de la trompe de Fallope, l'ovaire, le col de l'utérus et l'endomètre. Les spectres des tissus illuminés avec la source UV sont présentés.

La figure 8.6 présente les spectres d'autofluorescence comparatifs entre le pavillon de la trompe de Fallope, l'ovaire, le col de l'utérus et l'endomètre. La source d'illumination est la source UV. Des spectres avec la source bleue ont également été mesurés nettement au-dessus du niveau de bruit, mais ne sont pas présentés ici. Les autres spectres acquis avec les sources d'excitation à plus grande longueur d'onde ne sont pas présentés. Les tissus d'où ont été acquis ces spectres sont tous sains. Les spectres des régions pathologiques ne sont pas montrés ici. Les maxima d'intensité sont situés autour de 480 nm pour les quatre spectres. La décroissance vers les plus grandes longueurs d'onde présente une pente et des maxima secondaires différents selon l'organe sondé.

8.4 Discussion

Nous avons réalisé une étude clinique sur des spécimens de prophylaxie de trompes humaines. Un total de 25 patientes ont été recrutées pour participer à cette étude et leur consentement a été obtenu. L'étude comporte deux volets. Le premier concerne l'étude des structures visible à l'OCT. Le second volet explore les propriétés spectrales de l'autofluorescence des trompes

de Fallope.

Le premier objectif de cette étude est de définir une procédure clinique endoscopique per-opératoire pour l'évaluation rapide des trompes de Fallope. Cet objectif a été atteint, car le protocole d'imagerie employé est reproductible et s'inscrit dans la fenêtre de temps allouée pour l'examen optique des tissus avant de les envoyer en pathologie. Cette fenêtre temporelle est d'un maximum de 30 min. Les séances d'imagerie à l'OCT ont pris en moyenne 20 min alors que les mesures en fluorescence en ont pris 10. Cette plage de temps devra être réduite dans le futur, afin d'assurer que la pathologie ait accès aux tissus les plus frais possible pour leur procédure diagnostique. La procédure d'imagerie en 4 étapes fonctionne adéquatement. La première étape est l'inspection macroscopique et externe des organes grâce au système de table et permet d'obtenir de l'information sur les régions d'intérêt potentielles. La seconde étape implique l'acquisition d'images ou de volumes OCT avec la sonde à canule fixe. L'insertion de la sonde est un point critique dans la procédure, car il faut porter attention à ne pas abîmer les tissus dans les régions courbées de la trompe. Cette étape permet d'avoir une vue interne de la trompe sur la majorité de sa longueur. La troisième étape consiste à imager le pavillon et l'infundibulum (et l'ampoule si la dimension le permet) avec la sonde rotative. Cette partie de la séance d'imagerie permet d'acquérir rapidement plusieurs volumes de cette région d'intérêt. Enfin la quatrième étape est l'étude spectroscopique avec la sonde de d'auto fluorescence.

Le second objectif de l'étude est de comparer les divers spectres d'auto fluorescence acquis sur les spécimens obtenus. Dans un premier temps, les spectres sont comparés sur les régions différentes de la trompe de Fallope. Dans un deuxième temps, les spectres moyens de la trompe pour le pavillon sont comparés aux organes avoisinants : ovaire, col de l'utérus et endomètre. Les spectres ont été mesurés avec 6 sources d'excitation différentes. Cependant, seules les sources UV et bleue ont permis d'acquérir des spectres d'auto fluorescence d'intensité intéressante pour être exploités. Les trois régions distales de la trompe de Fallope présentent des spectres différents et ceux-ci diffèrent également des spectres des organes avoisinants. Une étude sur plus de patientes se révèle nécessaire afin de donner un poids statistique à ces résultats.

Le troisième objectif est de déterminer si le spectre d'auto fluorescence apporte une information pertinente par rapport à une intensité de fluorescence intégrée sur une région du spectre. La réponse doit être nuancée. Les spectres d'auto fluorescence sont suffisamment différents pour apporter une information moléculaire propre à chaque point sondé. Ceci pourrait expliquer pourquoi la littérature n'arrive pas à obtenir des résultats consistants pour les cartes d'intensité de fluorescence de la trompe prises avec des filtres relativement fin spectralement

(≈ 30 nm) [72, 73]. Cependant, les contraintes d'instrumentation pour acquérir un spectre sur des tissus biologiques sont plus lourdes que pour une mesure de puissance. Par contre, il est facile avec l'information spectrale de distinguer si le système ne mesure que du bruit ou s'il mesure un signal modulé par un élément absorbant (présence de sang par exemple). De plus, la forme du spectre introduit davantage de degrés de liberté pour l'interprétation des résultats que les deux seuils d'une mesure de puissance (niveau de bruit du système et niveau distinguant les tissus sains des pathologies). La carte spectrale ou la carte d'intensité de fluorescence doivent toujours être interprétées avec une connaissance de la structure du tissu sondé (fournie par l'OCT ou une autre méthode). Une avenue prometteuse serait d'identifier quelques régions spectrales (environ 10 nm) dont le comportement varie selon la présence de pathologie et d'employer des ratios entre les puissances intégrées sur ces plages. Ceci nécessite une bonne connaissance des propriétés spectrales d'autofluorescence des trompes de Fallope et davantage de tests afin de confirmer le nombre et la longueur d'onde centrale de ces régions. Ainsi, un système multimodal OCT et imagerie par fluorescence pourrait sur-échantillonner un volume OCT et pour chaque image radiale, générer en alternance une carte de fluorescence sur les plages spectrales choisies. L'acquisition serait plus rapide avec un tel système, tout en préservant les avantages de chaque configuration de système de fluorescence.

Les quatrième et cinquième objectifs de l'étude sont de constituer des atlas d'images types de trompes saines et présentant des conditions bénignes. Ces deux objectifs ont été remplis avec des images transverses et des volumes OCT de 20 cas sains et 5 cas présentant des tumeurs bénignes. Les conditions bénignes imagées incluent des kystes paratubaires, une hydatide de Morgagni et des corps de Walthard. Des images ont été générées pour chaque segment de la trompe sauf l'isthme. Les volumes et images OCT générés avec le système de table permettent de bien apprécier les structures bénignes souvent localisées dans le péritoine ou l'extérieur de la paroi musculaire.

8.5 Conclusion

L'étude clinique présentée dans ce chapitre permet de confirmer que l'OCT et l'autofluorescence des tissus sont deux modalités d'imagerie pertinentes à l'analyse des trompes de Fallope dans un contexte diagnostique. Le but ici n'est pas de créer un instrument qui remplacera le travail du pathologiste, mais bien qui l'assistera dans sa tâche d'examen minutieux de la trompe de Fallope afin d'y relever toute anomalie, spécialement les lésions STICs. Les résultats présentés ici permettent de justifier la poursuite des travaux afin d'augmenter le nombre de patientes et ainsi pouvoir observer des lésions STICs, présentes dans environ 1 % des cas de prophylaxie. Les spectres d'autofluorescence acquis ont permis de montrer une dépendance

notable à la région anatomique où le spectre est acquis, que ce soit entre les différentes régions de la trompe ou par rapport aux organes gynécologiques avoisinants. Nous avons défini une procédure clinique pour l'imagerie peropératoire des trompes de Fallope et avons testé un protocole de comparaison avec la pathologie au moyen d'agrafes hémostatiques. Enfin, cette étude a permis de générer le début d'un atlas d'images types des différentes parties de la trompe de Fallope autant pour des cas sains que pour des tumeurs bénignes. L'impact réel de ce type d'imagerie sur la détection de lésions cancéreuses demeure une question ouverte qui nécessite investigation. Il est légitime de croire qu'un instrument d'analyse exhaustive des trompes de Fallope puisse se greffer à un protocole clinique comme le SEE-FIM, lourd en ressources et en coût pour le système de santé, mais essentiel pour obtenir le diagnostic le plus juste possible pour la patiente. Enfin, dans un futur encore plus éloigné, il n'est pas improbable qu'un tel instrument, ayant fait ses preuves dans un contexte diagnostique, puisse être introduit comme instrument de dépistage *in vivo*. Ainsi, une évaluation de la patiente pourrait être réalisée avant de recommander une chirurgie prophylactique.

CHAPITRE 9 DISCUSSION GÉNÉRALE

La thèse porte sur l'implémentation d'un nouvel instrument pour l'identification de lésions dans la trompe de Fallope. Les modalités d'imagerie ciblées pour ce nouvel instrument font partie des modalités d'imagerie optique, plus précisément l'OCT pour l'information de nature morphologique et la spectroscopie par fluorescence pour l'information moléculaire qu'elle procure. Les résultats des chapitres précédents montrent l'application de ces modalités optiques à l'imagerie des organes reproducteurs féminins, en particulier la trompe de Fallope. Des résultats sur modèles animaux, de même que sur des tissus humains frais et fixés montrent l'intérêt de ces techniques autant pour des tissus *ex vivo* fixés que dans un contexte peropératoire en milieu hospitalier. Enfin, de nombreux développements en instrumentation sont présentés afin d'accommoder les requis techniques et les spécificités de chacun des deux modalités d'imagerie retenues, en plus de rendre ce système compatible avec les sondes endoscopiques de diamètre millimétrique, essentielles à l'imagerie des trompes de Fallope dans un contexte de diagnostic.

Les résultats présentés dans cette thèse permettent d'envisager de nouvelles avenues de recherche pour la suite de ce projet. D'abord, les composants en fibres à double gaine et les sondes peuvent être mis en valeur dans d'autres applications que celles envisagées dans le cadre de cette thèse. D'autres applications sont à envisager avec les systèmes d'imagerie développés, surtout dans le domaine de l'évaluation et du traitement de l'infertilité, de même que pour l'identification de lésions dans l'utérus par hystéroscopie. Enfin, l'instrument peut servir de tremplin pour un instrument de dépistage du cancer de l'ovaire, avec une utilisation *in vivo* potentiellement sous anesthésie locale.

9.1 Composants en fibre optique à double gaine

L'introduction des trois nouveaux concepts de design de composants à fibre a permis de réaliser les premiers coupleurs en fibre à double gaine à petite gaine interne. L'impact de ce type de composant est notable en imagerie confocale, tant en réflectance qu'en fluorescence. Les applications ne se limitent toutefois pas à la microscopie confocale. Toute application nécessitant une illumination cohérente et une détection partiellement cohérente peut bénéficier de ce type de coupleur. La conception et la méthode de fabrication sont indépendantes de la plage spectrale d'opération choisie : avec une fibre à petite gaine opérant dans une autre plage du spectre (visible par exemple, ou dans l'infrarouge autour de 1550 nm), il est possible de réaliser un composant présentant des performances comparables.

Les nouveaux concepts de design pour les fibres à petite gaine interne peuvent se transposer à la fabrication de composants à grande gaine interne. En effet, grâce à la combinaison de ces nouveaux critères de design et des connaissances obtenues précédemment pour les composants à grande gaine interne, il a été possible d'améliorer le processus de fabrication et d'obtenir des composants au comportement asymptotiquement parfait. De tels coupleurs à grande gaine interne ont été réalisés, avec une transmission monomode de plus de 90 % et un transfert multimode de 91 % sur la plage de longueurs d'onde de 1250 nm à 1350 nm. Un composant de ce type a été exploité dans le chapitre 4 pour le montage multimodal d'OCT et de fluorescence. Les composants permettant d'injecter le signal multimode tout en préservant le signal monomode bénéficient également des avancées des coupleurs sDCFC.

Ces composants en fibre à double gaine permettent de nouvelles opportunités en recherche et motiveront sûrement l'arrivée de nouvelles fibres optiques sur le marché. Le procédé de fabrication pourra s'adapter à ces nouvelles fibres et générer de nouveaux coupleurs prêts à l'emploi pour de nouvelles applications. La combinaison de modalités d'imagerie présente de nombreuses promesses, que ce soit pour obtenir plus d'informations simultanément, ou pour réaliser le diagnostic et le traitement d'une condition lors d'un même examen. Dans des domaines hors de l'imagerie, des applications en fabrication de senseurs sont également envisageables avec ces coupleurs. Par exemple, ces coupleurs peuvent être employés de concert avec des plasmons de surface dans une sonde fibrée avec un réseau de Bragg à angle pour détecter de très faibles changements d'indices de réfraction. Les résonances à différentes longueurs d'onde recouplent dans la gaine multimode et peuvent être détectées pour résoudre précisément un changement de propriété dans un milieu [137, 138] (articles en 3e et 4e auteur respectivement). Ces composants peuvent également être employés pour des applications de spectroscopie, étant donné leur faible dépendance en longueur d'onde.

9.2 Sondes de plus petit diamètre

L'instrumentation développée dans cette thèse, notamment l'appareil d'imagerie OCT et sa version multimodale, a pour but d'assister le pathologiste pour réaliser un diagnostic. Il est nécessaire de prévoir une étude clinique de plus grande envergure afin d'augmenter le poids statistique des résultats présentés dans le cadre de cette thèse, de même que pour évaluer de façon juste la spécificité et la sensibilité d'une sonde OCT et OCT-fluorescence.

La priorité au niveau clinique est d'analyser le tiers distal de la trompe de Fallope, comprenant la pavillon (interne et externe), l'infundibulum et l'ampoule distale. La solution proposée permet d'imager en deux temps, d'abord avec un système de table pour couvrir la partie externe et la partie frangée du pavillon, puis avec une sonde endoscopique pour imager la

muqueuse interne de la trompe. Cette technique est compatible avec le protocole pathologique SEE-FIM employé en clinique et pourrait le compléter afin d'augmenter le nombre de lésions détectées, tout en diminuant la charge de travail du pathologiste.

Les deux sondes développées ont respectivement 1.2 mm et 2.4 mm de diamètre externe. La première sonde permet un balayage manuel de l'échantillon et peut accéder au début de l'isthme. La seconde sonde possède un moteur rotatif pour un balayage radial, mais sa taille ne permet pas d'investiguer au-delà de l'ampoule distale. L'œdème induit par la procédure chirurgicale (qui serait tout de même présente en cas de procédure laparoscopique), fait rétrécir le lumen effectif de la trompe de quelques centaines de microns. Des sondes plus petites permettraient d'imager une plus grande partie de la trompe. Par exemple, une sonde de 1.5 mm pourrait permettre de sonder jusqu'à l'ampoule chez la majorité des patientes, même celles plus sujettes à l'œdème en cours de chirurgie. Une sonde avec un diamètre externe de l'ordre de 750 μm pourrait permettre de sonder jusqu'à la jonction utéro-tubale. Cette procédure reste cependant dépendante de la condition des trompes : s'il y a restriction ou ligature tubale, la sonde ne pourra pas passer, peu importe son diamètre externe.

Des mécanismes de balayage de plus petite taille pourraient être intégrés dans une prochaine version de la sonde. En effet, l'emploi de jonctions rotatives, comme en cardiologie, pourrait être bénéfique pour garder au minimum la taille de la sonde. Des joints rotatifs plus efficaces en fibre à double gaine commencent à faire leur apparition en recherche [97] et pourraient tout à fait être employées dans le système d'imagerie des trompes. Une autre avenue est un balayage de la fibre par actuateur piézo-électrique [108, 109]. Ce type de mécanisme peut dévier mécaniquement une fibre optique comme celle de la sonde, en plus de ne faire que 500 μm de diamètre externe et 5 mm de longueur. Un balayage longitudinal circulaire peut être converti en balayage radial par l'entremise d'un miroir conique. L'approche piézo-électrique est également compatible avec l'imagerie par fibres à double gaine.

9.3 Autres applications cliniques d'un salpingoscope

L'accès aux trompes de Fallope serait également un atout dans les cas d'évaluation de la fertilité. Une évaluation de la forme des trompes et des obstructions présentes est nécessaire afin d'identifier des avenues à suivre pour la procréation. Une sonde OCT permettrait d'évaluer ces éléments. La technique actuelle pour évaluer la morphologie des trompes est l'hystérosalpingographie, qui emploie des rayons-X à de multiples reprises durant l'examen pour vérifier l'écoulement d'un agent radio-opaque de l'utérus aux ovaires. Le système développé ici devrait être adapté pour le passage par la jonction utéro-tubale, qui fait approximativement 1 mm de diamètre interne. Il est ici à noter que l'œdème, présent en chirurgie diagnostique,

n'aurait pas d'effet ici, car l'utérus n'est pas clampé durant la procédure. Il n'y aurait donc pas rétrécissement de l'ouverture des trompes à cause de l'enflure comme observée au cours des études cliniques de cette thèse.

L'utilisation de l'OCT peut également permettre l'obtention d'informations en profondeur à travers les villosités de la trompe. Les caméras en lumière blanche ne sont pas employées en clinique à l'heure actuelle, tellement leur usage est peu commode et les images ne permettent pas d'analyser la totalité de la trompe. Ces endoscopes ne bénéficient pas d'une résolution suffisante et ont des champs de vue très limités. De plus, certains hôpitaux n'ont tout simplement pas cet équipement en leur possession. Une sonde OCT pourrait combler les lacunes de la sonde en lumière blanche

Une autre application d'un salpingoscope serait l'imagerie de l'utérus. Puisque le passage par la jonction utéro-tubale est plus limitant que le passage par le col de l'utérus, la même sonde pourrait être employée lors du passage dans l'utérus. L'OCT pourrait permettre de guider les biopsies de l'endomètre dans les cas de cancers de l'endomètre. En effet, la prise de biopsies s'effectue par un instrument différent de l'hystéroscope lumière blanche, ce qui mène à plusieurs biopsies mal positionnées, résultant en de faux négatifs. L'OCT pourrait être combiné à une autre modalité afin de sonder la paroi endométriale à la recherche de sites à biopsier, puis effectuer un marquage au laser de la région d'intérêt. Ces marques seraient visibles avec l'hystéroscope conventionnel et permettraient ainsi de valider que la bonne région a été biopsiée.

Une autre application serait le dépistage et diagnostic des infections de l'endomètre. Une autre cause fréquente de l'infertilité est une endométrite chronique. La biopsie de l'endomètre en un examen très douloureux permettant de diagnostiquer cette condition. Il est raisonnable de croire qu'une combinaison de l'OCT avec une modalité moléculaire comme la fluorescence ou la spectroscopie Raman pourrait identifier la présence d'infection et évaluer son étalement. Ce type de sonde permettrait également d'imager d'autres conditions utérines, comme la présence de polypes, de kystes ou de fibromes.

Une dernière application possible est le diagnostic et le traitement des synéchies utérines. Une synéchie est un développement fibreux chaotique joignant les parois utérines, apparaissant lorsqu'un processus de cicatrisation ne se déroule pas dans les conditions satisfaisantes. Ces synéchies sont souvent asymptomatiques et peuvent réduire fortement la fertilité de la patiente, entraîner des fausses couches à répétition en plus d'affecter le volume des règles. Le traitement se fait par laser sous anesthésie locale, avec surveillance hystéroscopique. Une sonde combinant l'OCT et l'ablation laser permettrait de réaliser cette intervention rapidement en combinant les deux instruments. Elle permettrait également de vérifier si des

dommages ont été apportés à la muqueuse utérine au cours de l'intervention.

9.4 Dépistage in vivo dans les trompes

L'instrument proposé atteindrait un maximum d'impact dans un cadre de dépistage en plus d'une utilisation pour le diagnostic. Pour ce faire, il faut poursuivre la miniaturisation de la sonde en changeant le mécanisme de balayage de la fibre. Les jonctions rotatives en fibres à double gaine et les céramiques piézo-électriques sont de bons candidats pour atteindre les requis de taille. En effet, d'après les observations cliniques réalisées au cours de cette thèse, un salpingoscope OCT devrait avoir un diamètre total de 750 μm au maximum, en plus d'être flexible pour pouvoir naviguer dans les tortuosités naturelles de la trompe (certaines patientes ont des trompes plus tortueuses que d'autres). Cette sonde permettrait d'étudier le tiers distal de la trompe avant d'avoir recours à la chirurgie diagnostique. Ceci permettrait, spécialement dans le cas des patientes à haut risque, de repousser la date de la chirurgie prophylactique et de faire des suivis efficaces. Si la présence de lésions est écartée, alors la patiente peut garder ses organes jusqu'au prochain suivi. Ceci augmenterait la qualité de vie des patientes à risque, car elles ne subiraient les désagréments de la ménopause chirurgicale que plus tard, lorsque nécessaire. Il reste cependant beaucoup de travail à accomplir avant d'en arriver à un instrument utilisable in vivo déployé comme examen de routine en gynécologie. Comme aucun accès direct aux trompes pour l'identification des lésions séreuses n'est possible à l'heure actuelle, cet instrument pourrait transformer la façon de traiter le cancer de l'ovaire et identifier de façon précoce le type de cancer séreux de haut grade, responsable de plus de 90 % des décès imputables au cancer de l'ovaire. Les résultats obtenus au cours de cette thèse vont dans cette direction, même s'il ne constituent que les balbutiements de cette idée.

L'OCT, et sa combinaison avec l'imagerie par fluorescence, sont de bons candidats pour apporter une solution au diagnostic et au dépistage du cancer de l'ovaire, spécialement pour les cancers d'origine tubale. Les résultats de cette thèse montrent le potentiel de ce type d'instrument pour la détection de lésions de petit volume.

CHAPITRE 10 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

10.1 Synthèse des travaux

Cette thèse traite du développement d'instrumentation optique pour l'imagerie du cancer de l'ovaire appliquée au diagnostic en milieu clinique. Le but est de réaliser un instrument adapté à l'imagerie de la trompe de Fallope pour dépister les lésions de petit volume. Pour ce faire, nous avons développé de nouveaux composants en fibre optique à double gaine pour combiner efficacement plusieurs modalités d'imagerie sans dégrader les performances de chaque modalité individuelle. La réalisation de ces coupleurs a nécessité le développement de nouvelles notions de conception. Une modélisation théorique des performances à l'aide du concept d'étendue optique a également été développée afin de guider le choix des fibres à intégrer dans le coupleur. Ceci ajoute de la flexibilité dans la conception et la fabrication de composants sur mesure pour diverses applications. Un tel composant est présenté par l'entremise d'une publication comme auteure principale. Ce composant est un coupleur basé sur une fibre à double gaine à grande gaine interne (A-DCFC). Le coupleur A-DCFC offre une transmission monomode de plus de 90 % sur la plage proche infrarouge couverte par le signal OCT, ici de 1250 nm à 1350 nm. Ce coupleur présente également une transmission multimode de 75 % dans le proche infrarouge et de plus de 72 % dans le visible. De plus, les performances multimodes du coupleur A-DCFC ont pu être augmentées à 85 % dans le visible et à 91 % dans le proche infrarouge, tout en préservant la transmission monomode à plus de 90 % pour le signal OCT à 1300 nm. Cela a été rendu possible par l'élaboration de trois nouveaux concepts de design de composants à double gaine, développés d'abord pour les coupleurs à double gaine à petite gaine interne.

Quatre preuves de principe de l'imagerie multimodale réalisées avec ces coupleurs sont ensuite présentées. Parmi les démonstrations, la combinaison de l'OCT et de l'imagerie par fluorescence ou par spectroscopie de fluorescence est démontrée dans une version de système de table, de sonde endoscopique et de sonde aiguille. Le système de table combine l'OCT à 1300 nm avec l'imagerie par fluorescence excitée à 532 nm. Les résolutions latérales de l'OCT et du système de fluorescence sont de 17 μm et 13 μm respectivement. La sensibilité du système de fluorescence a été mesurée à 700 nmol avec de la rhodamine 6g. Les systèmes endoscopiques présentés offrent des sensibilités encore plus grandes, tout en améliorant les résolutions latérales en OCT. La plus petite concentration mesurée avec la sonde OCT-fluorescence est de 40 nmol avec la rhodamine. La sonde aiguille a une concentration minimale mesurable extrapolée à 1.5 nmol avec l'AlexaFluor488. La distance de travail (1 mm) a été optimisée

pour imager avec la meilleure résolution les villosités internes de la trompe. Des échantillons de trompes de Fallope de porc et d'ovaires de souris ont été imagés avec la sonde de 1.2 mm de diamètre externe. Des échantillons de foie de souris et de foie humains ont été imagés avec la sonde aiguille de 570 μm de diamètre externe. Dans les cas étudiés, l'image structurale fournie par l'OCT favorise l'interprétation des images de fluorescence obtenues. Une démonstration des coupleurs à petite gaine interne pour l'imagerie confocale en réflectance et en fluorescence est démontrée. Un gain de signal d'un ordre de grandeur a été mesuré avec un échantillon de thyroïde de porc. La pénalité en résolution axiale est d'un facteur 2, alors que le contraste de bruit de tavelure est réduit d'un facteur 4 pour une détection partiellement cohérente. Ce coupleur a également été intégré à un microscope tri-modal combinant l'OCT, la microscopie confocale et l'imagerie par fluorescence dans un contexte préclinique. Les trois modalités sont colocalisées et acquises simultanément. Des images de doigt et de fils fluorescents ont été présentées. Un coupleur d'injection multimode a été développé à partir des avancées du A-DCFC et du sDCFC, permettant de réaliser l'injection multimode au lieu de l'extraction. Un exemple d'utilisation de ce type de coupleur est présenté dans une application de marquage par laser assistée par OCT. Le canal OCT permet d'évaluer l'état des tissus pour différentes conditions de coagulation à 1436 nm et d'analyser l'atténuation des tissus après chaque impulsion.

Dans le processus de transfert vers la clinique du système d'imagerie, des échantillons d'hystérectomies animales ont été imagés à l'OCT. Trois modèles animaux ont été étudiés afin de trouver celui qui se rapproche le plus de l'humain, ce qui a permis d'élaborer un protocole d'imagerie et de se familiariser avec la manipulation de tissus frais. Les tissus de souris (8 spécimens étudiés) offrent une bonne réplique des tissus humains, mais présentent des dimensions un ordre de grandeur trop petites. Les échantillons canins (5 spécimens étudiés) répliquent bien les ovaires, mais pas les trompes, celles-ci étant peu développées et enfouies dans la bourse ovarienne, une structure absente chez l'humain. Enfin, le modèle porcin (10 spécimens étudiés) est le plus fidèle à l'anatomie humaine des trompes de Fallope, en autant que le porc pèse plus de 45 kg. Des échantillons fixés de trompes de Fallope humaines et de tumeurs ovariennes ont ensuite été imagés à l'OCT afin de créer une banque de critères permettant de distinguer les tissus sains des tissus pathologiques. Des échantillons de trompes saines (12) et de STICs (13) ont été imagés. Les échantillons ovariens imagés comptent des tumeurs de haut grade séreux (12) et de bas grade séreux (9), des tumeurs endométrioïdes (7), des tumeurs à cellules claires (7) ainsi que des tumeurs mucineuses (8). L'OCT permet de distinguer entre les trompes saines et les tumeurs de type haut grade séreux. Selon le type de STIC, le carcinome peut être visible à l'OCT. En effet, les carcinomes massifs ont davantage de chances d'être détectés à l'OCT par rapport aux STICs à grande surface, pour

lequel l'OCT peut manquer de sensibilité. Les autres types de pathologies de l'ovaire sont discernables à l'OCT, mais certaines formes de ces pathologies sont encore difficiles à distinguer étant donnée la résolution inférieure à l'histologie.

À la lumière de ces résultats, deux prototypes de sondes endoscopiques ont été développés pour imager l'intérieur des trompes de Fallope. La première sonde est une sonde à canule fixe avec balayage manuel ou motorisé pour imager les échantillons. Elle présente un diamètre externe de 1.2 mm et opère à 1300 nm. Cette sonde présente une résolution latérale de 25 μm et une résolution axiale de 16 μm mesurées dans l'air. Elle permet de produire des images de 1.5 mm à 2 mm de profondeur dans les tissus gynécologiques. La seconde sonde est une sonde avec micro-moteur rotatif qui permet d'imager rapidement (8000 rpm) les tissus sur la circonférence de la sonde. Cette sonde présente un diamètre extérieur de 2.4 mm et opère également à 1300 nm. Elle présente des résolutions de 29 μm (latérale) et 16 μm (axiale) mesurées dans l'air. Ces deux modèles de sonde ont été caractérisés et se comparent favorablement aux performances du système d'imagerie commercial de table (VCSEL-OCT de Thorlabs, USA), considéré comme référence.

Pour débiter les travaux cliniques, l'imagerie OCT et par spectroscopie de fluorescence ont été réalisées par des systèmes séparés. Une première étude pilote a été réalisée pour ajuster le protocole d'imagerie et de pathologie avec les équipes médicales, de même que pour confirmer les paramètres de fabrication et d'imagerie des sondes endoscopiques. Cette étude clinique a été réalisée sur 5 patientes. Nous avons évalué les niveaux de signaux d'auto-fluorescence des trompes, peu documentés dans la littérature, en plus d'acquérir des images OCT de l'intérieur de la trompe. Ces données préliminaires nous ont permis d'apporter les correctifs nécessaires pour réaliser un étude clinique de plus grande envergure sur 25 patientes. Les deux études ont été réalisées en salle opératoire au CHUM Notre-Dame en collaboration avec les départements de gynécologie oncologique et de pathologie. Les images OCT acquises avec le système de table et les deux sondes endoscopiques ont permis de réaliser un atlas des structures visibles à l'OCT pour des cas sains (stroma, péritoine, vaisseaux sanguins, lumen, muscle, micro-villosités). Des cas de tumeurs bénignes ont également été rencontrés au cours de l'étude et ont permis d'interpréter ces conditions sur les images OCT, avec la validation d'un pathologiste. Une hydatide de Morgagni, des kystes paratubaires et des corps de Walthard ont été rencontrés comme tumeurs bénignes des trompes. L'analyse OCT des trompes et du pavillon requiert en alternance l'utilisation du système de table pour imager l'extérieur des trompes et des sondes endoscopiques pour imager l'intérieur des trompes. Des spectres d'auto-fluorescence de trompes de Fallope, d'ovaires et d'utérus sains et pathologiques ont également été obtenus. La combinaison des deux modalités d'imagerie montre une synergie bénéfique pour réaliser un instrument clinique.

10.2 Limitations de la solution proposée

Des images de trompes de Fallope ont été présentées au cours de cette thèse. Il y a cependant une grande valeur ajoutée à considérer l'information tridimensionnelle acquise dans un volume OCT plutôt que dans une image seule. En effet, surtout dans un contexte où les malformations aux trompes et les conditions bénignes sont fréquentes, bénéficier d'un contexte 3D autour des structures d'intérêt se révèle un atout pour l'interprétation des images. Ceci permet également de se repérer et de naviguer dans la trompe et facilite l'intégration des informations obtenues de la pathologie. Ceci permet de faire un lien entre l'examen macroscopique et l'analyse microscopique du pathologiste. Une limitation évidente des travaux cliniques de cette thèse est bien entendue la portée des résultats. En effet, pour obtenir des conclusions plus fermes sur les capacités réelles de l'OCT et de l'imagerie par auto-fluorescence, il faudrait une étude clinique de plus grande envergure, qui permettrait également d'étudier les cas d'intérêt pour le diagnostic et le dépistage du cancer ovarien : les STICs. Une telle étude demanderait des ressources conséquentes, étant donné qu'avec l'incidence du cancer ovarien, il faut environ 100 chirurgies prophylactiques pour détecter un cas de cancer sévère de haut grade (observations du département de pathologie au CHUM Notre-Dame). Cette incidence est probablement sous-estimée. Le nombre réel de cas de STICs est difficilement estimable, en raison de la grande probabilité de ne pas relever ces lésions à l'histopathologie. Néanmoins, il faudrait probablement entre 500 et 600 cas recrutés pour obtenir au moins 4 à 7 cas de STICs. Il est à rappeler que ces efforts ne seront pas vains, car chaque cas détecté de façon précoce influence grandement les chances de survie de la patiente. Une patiente ayant un cancer sévère trouvé en stade précoce a 90 % de chances de survie à 5 ans contre seulement 20 % lorsque détecté en stade avancé.

La gestion du très grand nombre de données générées par les acquisitions OCT est un défi. En effet, avec près de 75 GB de données par patiente, le stockage, le traitement et le transfert de données deviennent non négligeables en terme de temps. Le temps disponible pour manipuler les tissus est limité, car la pathologie doit travailler avec les spécimens les plus frais possible. Une fenêtre maximale de 30 min est prévue dans le cadre de ce projet, mais le temps d'imagerie idéal devrait se situer sous les 15 min. Il faudra donc prévoir des moyens de minimiser le temps consacré au traitement, à l'écriture et au stockage des données.

Les deux études cliniques réalisées au cours de ce projet ont permis d'arriver à la conclusion qu'il faudrait réduire davantage le diamètre des sondes. L'effet de l'œdème induit par la procédure chirurgicale fait enfler les tissus et restreint de façon conséquente le lumen de la trompe. Afin d'en analyser toute la longueur, il faudrait une sonde de diamètre avoisinant les 750 μm . Une sonde si petite permettrait d'accéder à la jonction utéro-tubale et d'analyser le

segment isthmique, inaccessibles avec les sondes réalisées dans le cadre de ce projet. Il faudrait également réduire la taille de la sonde à moteur rotatif à 1.5 mm afin de permettre l'insertion jusqu'à l'ampoule. Une analyse rapide et précise du tiers distal de la trompe permettrait d'identifier les sites préférentiels de développement des STICs. L'analyse de la partie frangée du pavillon demeure un défi étant donné la grande surface à sonder, tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la trompe. Des sondes à meilleures résolutions pourraient également aider à analyser l'épaisseur de l'épithélium. De plus, la sonde demeure partiellement ou complètement inutilisable en cas de ligature tubale, une procédure relativement fréquente prenant différentes formes selon le chirurgien ayant pratiqué l'intervention.

10.3 Améliorations futures

À la vue des ces limitations et des travaux de cette thèse, quelques développements futurs sont considérés ici afin d'orienter la suite des recherches.

L'état des connaissances en matière d'imagerie des trompes de Fallope mérite d'être largement approfondi. Pour ce faire, il faudra poursuivre l'imagerie à l'OCT et en spectroscopie par fluorescence afin de bien caractériser les tissus et mieux en comprendre les images et les propriétés optiques. Une fois cette étape franchie, il sera alors intéressant de réaliser une étude avec les mesures colocalisées et synchronisées d'OCT et de fluorescence dans les trompes. Les coupleurs développés dans cette thèse et le début des travaux sur les sondes, combinés aux nouvelles technologies émergentes de jonctions rotatives en fibre à double gaine et aux micro-moteurs de taille comparable au millimètre permettraient d'améliorer les systèmes développés dans cette thèse. Une meilleure connaissance des propriétés d'autofluorescence des tissus de la trompe permettront d'identifier les longueurs d'onde d'excitation les plus pertinentes pour distinguer les tissus sains des tissus pathologiques, de même que les bandes d'émission à prioriser. Ainsi, il sera possible de s'affranchir de la lourdeur imposée par l'acquisition d'un spectre à toutes les lignes-A pour chaque longueur d'onde d'émission étudiée, ce qui accélèrera grandement l'acquisition, tout en fournissant l'information nécessaire au diagnostic.

Une sonde de 750 μm de diamètre intégrant un mécanisme de balayage serait idéale pour cette application. Il reste encore du travail à réaliser au point de vue technologique pour en arriver à une telle sonde. L'impact de l'œdème causé par la procédure chirurgicale était difficilement prévisible avant d'arriver en milieu clinique. De plus, une grande variabilité de dimensions a été observée chez les 25 patientes recrutées, ce qui impose une contrainte de taille maximale plus serrée que celle estimée à 1 mm en début de projet.

La gestion du volume de données peut être grandement améliorée à l'aide de composantes

dédiées et de logiciels plus performants. En effet, il existe des outils permettant le traitement des données OCT en temps réel sur processeur graphique. Il faut également penser à l'écriture et au transfert de données, qui peuvent être réalisés avec des cartes d'acquisition haut débit et des disques durs de grande capacité en parallèle. Ces dispositions plus performantes devront cependant être gérées par un nouveau logiciel d'acquisition et d'affichage fait sur mesure et adapté aux besoins de l'application présentée ici.

Enfin, l'analyse des images OCT et des spectres de fluorescence pourrait être automatisée à l'aide d'algorithmes de classification. Classifier des spectres donne en général de bonnes performances, mais la classification d'images OCT présente des défis. En effet, la classification d'images 2D ne permet pas d'exploiter pleinement les capacités d'imagerie volumétriques de l'OCT. De plus, les algorithmes de classification nécessitent un très grand nombre de données provenant des différentes classes à trier (ici les différentes conditions à identifier : sain, STIC, kyste, etc.) provenant de plusieurs patients. Ce genre d'algorithme doit en général s'entraîner avec plus de 100 ensembles de données distincts par classe. Une fois de plus, l'augmentation du nombre de patientes imagées et la gestion des données sont cruciales pour cette partie du projet.

RÉFÉRENCES

- [1] G. Chene *et al.*, “Early detection of ovarian cancer : tomorrow? A review.” *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*, vol. 42, no. 1, pp. 5–11, 2013.
- [2] R. Kurman et I. Shih, “The Origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer-a proposed unifying theory,” *The American Journal of Surgical Pathology*, vol. 34, no. 3, pp. 433–443, 2010.
- [3] L. Gilbert *et al.*, “Assessment of symptomatic women for early diagnosis of ovarian cancer : results from the prospective DOvE pilot project.” *The Lancet Oncology*, vol. 13, no. 3, pp. 285–91, Mars 2012.
- [4] C. R. Bankhead *et al.*, “Identifying symptoms of ovarian cancer : a qualitative and quantitative study.” *BJOG*, vol. 115, no. 8, pp. 1008–14, Juillet 2008.
- [5] L. Gilbert. (2009, Décembre) Le projet dove. Centre universitaire de santé McGill. [En ligne]. Disponible : <http://cusc.ca/royalvic/article/projet-dove>
- [6] S. E. Rowling et P. Ramchandani, “Imaging of the fallopian tubes,” *Seminars in Roentgenology*, vol. 31, no. 4, pp. 299–311, 1996.
- [7] S. Perlman, P. Hertweck, et M. E. Fallat, “Paratubal and tubal abnormalities,” *Seminars in Pediatric Surgery*, vol. 14, no. 2, pp. 124–134, Mai 2005.
- [8] J. Baillargeon *et al.* (2008, Août) La chirurgie gynécologique, guide d’accompagnement et d’enseignement. CHUQ. [En ligne]. Disponible : http://www.chuq.qc.ca/NR/rdonlyres/D96349CB-48C4-4A46-9A17-22382567942D/0/chirurgie_gynecologique.pdf
- [9] O. Basso, “Diagnosing Ovarian Cancer Early (DOvE) by targeting symptomatic women,” McGill University Health Center, Montréal, Rapport Technique, 2013.
- [10] A. Gentry-Maharaj et U. Menon, “Screening for ovarian cancer in the general population.” *Best Practice & Research - Clinical Obstetrics & Gynaecology*, vol. 26, no. 2, pp. 243–56, Avril 2012.
- [11] S. S. Buys *et al.*, “Effect of screening on ovarian cancer mortality : the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial.” *JAMA*, vol. 305, no. 22, pp. 2295–303, Juin 2011.
- [12] I. J. Jacobs *et al.*, “Ovarian cancer screening and mortality in the {UK} collaborative trial of ovarian cancer screening (ukctocs) : a randomised controlled trial,” *The Lancet*, vol. 387, no. 10022, pp. 945 – 956, 2016.

- [13] C. R. Bankhead, S. T. Kehoe, et J. Austoker, “Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer : a systematic review.” *BJOG*, vol. 112, no. 7, pp. 857–65, 2005.
- [14] B. a. Goff, “Ovarian cancer : screening and early detection.” *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, vol. 39, no. 2, pp. 183–94, 2012.
- [15] N. Behtash, E. Ghayouri Azar, et F. Fakhrehajani, “Symptoms of ovarian cancer in young patients 2 years before diagnosis, a case-control study.” *European Journal of Cancer Care*, vol. 17, no. 5, pp. 483–7, 2008.
- [16] S. J. Skates *et al.*, “Toward an optimal algorithm for ovarian cancer screening with longitudinal tumor markers,” *Cancer*, vol. 76, no. 10 Suppl, pp. 2004–10, Novembre 1995.
- [17] I. Hellstrom *et al.*, “Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms.” *Cancer Letters*, vol. 296, no. 1, pp. 43–8, Octobre 2010.
- [18] K. Huhtinen *et al.*, “Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts.” *British Journal of Cancer*, vol. 100, no. 8, pp. 1315–9, Avril 2009.
- [19] K. Bis et T. Vrachliotis, “Pelvic endometriosis : MR imaging spectrum with laparoscopic correlation and diagnostic pitfalls,” *RadioGraphics*, vol. 17, no. 3, pp. 639–655, 1997.
- [20] A. Finch *et al.*, “Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation,” *JAMA*, vol. 296, no. 2, pp. 185–192, 2006.
- [21] U. Menon *et al.*, “Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers : results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS).” *The Lancet Oncology*, vol. 10, no. 4, pp. 327–40, Avril 2009.
- [22] B. a. Goff *et al.*, “Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics,” *JAMA*, vol. 291, no. 22, pp. 2705–12, Juin 2004.
- [23] A. Slomski, “Screening women for ovarian cancer still does more harm than good,” *JAMA*, vol. 307, no. 23, pp. 2474–2475, 2012.
- [24] M. W. McIntosh, C. Drescher, et M. M. Fitzgibbon, “Ovarian Cancer Early Detection Needs Better Imaging, Not Better Algorithms or Biomarkers,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 34, no. 2, pp. 199–200, 2016.
- [25] E. De Montigny *et al.*, “Double-clad fiber coupler for partially coherent detection,” *Optics Express*, vol. 23, no. 7, pp. 9040–9051, Avril 2015.

- [26] G. Chene *et al.*, “Surgical implications of the potential new tubal pathway for ovarian carcinogenesis.” *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, vol. 20, no. 2, pp. 153–9, 2013.
- [27] R. Katre *et al.*, “Tumors and pseudotumors of the secondary müllerian system : review with emphasis on cross-sectional imaging findings.” *American Journal of Roentgenology*, vol. 195, no. 6, pp. 1452–9, 2010.
- [28] Y. Lee *et al.*, “A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube,” *The Journal of Pathology*, vol. 211, no. 2006, pp. 26–35, 2007.
- [29] I. Alvarado-Cabrero *et al.*, “Carcinoma of the fallopian tube : a clinicopathological study of 105 cases with observations on staging and prognostic factors,” *Gynecologic Oncology*, vol. 72, no. 3, pp. 367–79, Mars 1999.
- [30] T. L. Moser *et al.*, “Evidence for preferential adhesion of ovarian epithelial carcinoma cells to type I collagen mediated by the $\alpha 2\text{bl}$ integrin,” *International Journal of Cancer*, vol. 67, pp. 695–701, 1996.
- [31] D. Bell, “Origins and molecular pathology of ovarian cancer,” *Modern Pathology*, vol. 18 Suppl 2, pp. S19–32, 2005.
- [32] E. Myers et L. Bastian, “Management of adnexal mass,” Duke Evidence-based Practice Center, Durham, Rapport Technique 130, 2006.
- [33] A. Kurjak *et al.*, “Preoperative diagnosis of primary fallopian tube carcinoma,” *Gynecologic Oncology*, vol. 68, no. 1, pp. 29–34, Janvier 1998.
- [34] C. M. Tempany *et al.*, “Staging of advanced ovarian cancer : comparison of imaging modalities—report from the Radiological Diagnostic Oncology Group,” *Radiology*, vol. 215, no. 3, pp. 761–7, Juin. 2000.
- [35] S. Kyriazi, S. B. Kaye, et N. M. DeSouza, “Imaging ovarian cancer and peritoneal metastases—current and emerging techniques.” *Nature Reviews - Clinical Oncology*, vol. 7, no. 7, pp. 381–93, 2010.
- [36] T. Meyer et G. J. Rustin, “Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer,” *British Journal of Cancer*, vol. 82, no. 9, pp. 1535–8, Mai 2000.
- [37] O. Bauer *et al.*, “Transcervical access and intra-luminal imaging of the fallopian tube in the non-anaesthetized patient ; preliminary results using a new technique for fallopian access,” *Human Reproduction (Oxford, England)*, vol. 7 Suppl 1, pp. 7–11, Juin 1992.
- [38] S. Rimbach, G. Bastert, et D. Wallwiener, “Technical results of falloposcopy for infertility diagnosis in a large multicentre study,” *Human Reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 5, pp. 925–30, Mai 2001.

- [39] F. Ahmadi, H. Haghighi, et F. Akhbari, "Hysterosalpingography," *Middle East Fertility Society Journal*, vol. 17, no. 3, pp. 210–214, Septembre 2012.
- [40] A. Chalazonitis *et al.*, "Hysterosalpingography : technique and applications." *Current Problems in Diagnostic Radiology*, vol. 38, no. 5, pp. 199–205, 2009.
- [41] M. Abbaci *et al.*, "Characterization of laryngeal carcinoma by confocal endomicroscopy," *Head & Neck Oncology*, vol. 1, no. Suppl 1, p. O14, 2009.
- [42] M. Ascencio *et al.*, "The place of confocal microscopy in gynecology," *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*, vol. 37, no. 1, pp. 64–71, 2008.
- [43] S. Srivastava *et al.*, "Computer-aided identification of ovarian cancer in confocal microendoscope images," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 13, no. 2, 2008.
- [44] H. Makhlof *et al.*, "Multispectral confocal microendoscope for in vivo and in situ imaging," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 13, no. 4, 2008.
- [45] A. A. Tanbakuchi *et al.*, "In vivo imaging of ovarian tissue using a novel confocal microlaparoscope," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 202, no. 1, pp. 9001 – 9009, 2010.
- [46] T.-Y. Wu *et al.*, "Confocal microlaparoscope for imaging the fallopian tube," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 19, no. 11, p. 116010, 2014.
- [47] D. Huang *et al.*, "Optical coherence tomography," *Science*, vol. 254, no. 5035, pp. 1178–1181, 1991.
- [48] J. M. Herrmann *et al.*, "Two- and three-dimensional high-resolution imaging of the human oviduct with optical coherence tomography," *Fertility and Sterility*, vol. 70, no. 1, pp. 155–158, Juillet 1998.
- [49] J. L. Fine *et al.*, "Direct Scanning of Pathology Specimens Using Spectral Domain Optical Coherence Tomography : A Pilot Study," *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, vol. 41, no. 6, pp. 1–13, 2011.
- [50] L. P. Hariri *et al.*, "Laparoscopic optical coherence tomography imaging of human ovarian cancer." *Gynecologic Oncology*, vol. 114, no. 2, pp. 188–94, 2009.
- [51] M. Kirillin *et al.*, "Criteria for pathology recognition in optical coherence tomography of fallopian tubes," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 17, no. 8, pp. 081 413–1–081 413–5, 2012.
- [52] M. Ascencio *et al.*, "The role and value of optical coherence tomography in gynecology," *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*, vol. 36, no. 8, pp. 749–55, 2007.

- [53] J. Burton *et al.*, “High-resolution three-dimensional in vivo imaging of mouse oviduct using optical coherence tomography,” *Biomedical Optics Express*, vol. 6, no. 7, pp. 2713–2723, 2015.
- [54] S. Wang *et al.*, “In vivo micro-scale tomography of ciliary behavior in the mammalian oviduct.” *Scientific Reports*, vol. 5, pp. 1–11, 2015.
- [55] H. Bao *et al.*, “Second harmonic generation imaging via nonlinear endomicroscopy.” *Optics Express*, vol. 18, no. 2, pp. 1255–60, Janvier 2010.
- [56] R. M. Williams *et al.*, “Strategies for high resolution imaging of epithelial ovarian cancer by laparoscopic nonlinear microscopy,” *Translational Oncology*, vol. 3, no. 3, pp. 181 – 194, 2010.
- [57] I. Veilleux *et al.*, “In vivo cell tracking with video rate multimodality laser scanning microscopy,” *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 14, no. 1, pp. 10–18, 2008.
- [58] O. Nadiarnykh *et al.*, “Alterations of the extracellular matrix in ovarian cancer studied by Second Harmonic Generation imaging microscopy.” *BMC Cancer*, vol. 10, p. 94, Janvier 2010.
- [59] N. D. Kirkpatrick, M. a. Brewer, et U. Utzinger, “Endogenous optical biomarkers of ovarian cancer evaluated with multiphoton microscopy.” *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 16, no. 10, pp. 2048–57, Octobre 2007.
- [60] K. Tilbury et P. Campagnola, “Applications of second-harmonic generation imaging microscopy in ovarian and breast cancer.” *Perspectives in Medicinal Chemistry.*, vol. 7, pp. 21–32, 2015.
- [61] J. Adur *et al.*, “Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 16, no. 9, pp. 096 017–1–096 017–10, 2011.
- [62] R. A. Sheth *et al.*, “Improved detection of ovarian cancer metastases by intraoperative quantitative fluorescence protease imaging in a pre-clinical model.” *Gynecologic Oncology*, vol. 112, no. 3, pp. 616–22, 2009.
- [63] M. Brewer *et al.*, “Fluorescence spectroscopy for in vivo characterization of ovarian tissue,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 29, no. 2, pp. 128–35, Janvier 2001.
- [64] U. Utzinger *et al.*, “Reflectance spectroscopy for in vivo characterization of ovarian tissue,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 28, no. 1, pp. 56–66, Janvier 2001.
- [65] S. Keereweer *et al.*, “Shifting focus in optical image-guided cancer therapy.” *Molecular Imaging and Biology*, vol. 16, no. 1, pp. 1–9, 2014.

- [66] P. Valdes et F. Leblond, "In vivo Fluorescence Detection in Surgery : A Review of Principles, Methods, and Clinical Applications," *Current Medical Imaging Reviews*, vol. 8, pp. 1–21, 2012.
- [67] G. M. Van Dam *et al.*, "Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting : first in-human results." *Nature Medicine*, vol. 17, no. 10, pp. 1315–9, Octobre 2011.
- [68] I. Campbell *et al.*, "Folate-binding Protein Is a Marker for Ovarian Cancer," *Cancer Research*, vol. 51, pp. 5329–5338, 1991.
- [69] R. George *et al.*, "Parallel factor analysis of ovarian autofluorescence as a cancer diagnostic," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 44, no. 4, pp. 282–295, 2012.
- [70] T. E. Renkoski, K. D. Hatch, et U. Utzinger, "Wide-field spectral imaging of human ovary autofluorescence and oncologic diagnosis via previously collected probe data," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 17, no. 3, pp. 036 003–1–036 003–13, 2012.
- [71] S. Kamath *et al.*, "Autofluorescence of normal, benign, and malignant ovarian tissues : A pilot study," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 27, p. 2, 2009.
- [72] J. N. McAlpine *et al.*, "Autofluorescence imaging can identify preinvasive or clinically occult lesions in fallopian tube epithelium : a promising step towards screening and early detection." *Gynecologic Oncology*, vol. 120, no. 3, pp. 385–92, 2011.
- [73] T. H. Tate *et al.*, "Multispectral fluorescence imaging of human ovarian and fallopian tube tissue for early-stage cancer detection," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 21, no. 5, p. 056005, 2016.
- [74] C. M. Krishna *et al.*, "Evaluation of the suitability of ex vivo handled ovarian tissues for optical diagnosis by raman microspectroscopy," *Biopolymers*, vol. 79, no. 5, pp. 269–276, 2005.
- [75] K. K. Maheedhar *et al.*, "Diagnosis of ovarian cancer by raman spectroscopy : A pilot study," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 26, p. 2, 2008.
- [76] M. Merman, A. Abramov, et D. Yelin, "Theoretical analysis of spectrally encoded endoscopy," *Optics Express*, vol. 17, no. 26, p. 24045, 2009.
- [77] S. H. Yun *et al.*, "High-speed wavelength-swept semiconductor laser with a polygon-scanner-based wavelength filter," *Optics Letters*, vol. 28, no. 20, pp. 1981–1983, Octobre 2003.
- [78] D. Yelin *et al.*, "Double-clad fiber for endoscopy," *Optics Letters*, vol. 29, no. 20, pp. 2408–2410, Octobre 2004.

- [79] S. Lemire-Renaud *et al.*, “Double-clad fiber coupler for endoscopy.” *Optics express*, vol. 18, no. 10, pp. 9755–64, Mai 2010.
- [80] W.-J. Madore *et al.*, “Asymmetric double-clad fiber couplers for endoscopy.” *Optics letters*, vol. 38, no. 21, pp. 4514–7, Novembre 2013.
- [81] D. Yelin *et al.*, “Three-dimensional miniature endoscopy.” *Nature*, vol. 443, no. 7113, p. 765, Octobre 2006.
- [82] L. Scolaro *et al.*, “High-sensitivity anastigmatic imaging needle for optical coherence tomography,” *Optics Letters*, vol. 37, no. 24, pp. 5247–5249, Décembre 2012.
- [83] D. Lorenser *et al.*, “Ultrathin side-viewing needle probe for optical coherence tomography,” *Optics Letters*, vol. 36, no. 19, pp. 3894–3896, Octobre 2011.
- [84] G. J. Tearney, M. Shishkov, et B. E. Bouma, “Spectrally encoded miniature endoscopy,” *Optics Letters*, vol. 27, no. 6, pp. 412–414, 2002.
- [85] A. Abramov, L. Minai, et D. Yelin, “Multiple-channel spectrally encoded imaging.” *Optics express*, vol. 18, no. 14, pp. 14 745–51, Juillet 2010.
- [86] G. Engel *et al.*, “Dual-channel spectrally encoded endoscopic probe.” *Biomedical optics express*, vol. 3, no. 8, pp. 1855–64, Août 2012.
- [87] E. Barhoum, R. Johnston, et E. Seibel, “Optical modeling of an ultrathin scanning fiber endoscope, a preliminary study of confocal versus non-confocal detection,” *Optics Express*, vol. 13, no. 19, pp. 7548–7562, Septembre 2005.
- [88] K. C. Maitland *et al.*, “Single fiber confocal microscope with a two-axis gimbaled MEMS scanner for cellular imaging,” *Optics Express*, vol. 14, no. 19, p. 8604, 2006.
- [89] V. J. a. Konda *et al.*, “First assessment of needle-based confocal laser endomicroscopy during EUS-FNA procedures of the pancreas (with videos).” *Gastrointestinal endoscopy*, vol. 74, no. 5, pp. 1049–60, Novembre 2011.
- [90] D. Kang *et al.*, “Endoscopic probe optics for spectrally encoded confocal microscopy.” *Biomedical optics express*, vol. 4, no. 10, pp. 1925–36, Janvier 2013.
- [91] H. Bao *et al.*, “Nonlinear endomicroscopy using a double-clad fiber coupler.” *Optics Letters*, vol. 35, no. 7, pp. 995–7, Avril 2010.
- [92] L. Fu, X. Gan, et M. Gu, “Nonlinear optical microscopy based on double-clad photonic crystal fibers.” *Optics express*, vol. 13, no. 14, pp. 5528–34, Juillet 2005.
- [93] L. Fu et M. Gu, “Double-clad photonic crystal fiber coupler for compact nonlinear optical microscopy imaging.” *Optics letters*, vol. 31, no. 10, pp. 1471–3, Mai 2006.
- [94] G. Liu *et al.*, “Rotational multiphoton endoscopy with a 1 micrometer fiber laser system.” *Optics letters*, vol. 34, no. 15, pp. 2249–51, Août 2009.

- [95] G. Liu et Z. Chen, "Fiber-based combined optical coherence and multiphoton endomicroscopy." *Journal of biomedical optics*, vol. 16, no. 3, p. 036010, Mars 2011.
- [96] L. Scolaro *et al.*, "Molecular imaging needles : dual-modality optical coherence tomography and fluorescence imaging of labeled antibodies deep in tissue," *Biomedical Optics Express*, vol. 6, no. 5, pp. 1767–1781, Mai 2015.
- [97] H. Pahlevaninezhad *et al.*, "Endoscopic high-resolution autofluorescence imaging and OCT of pulmonary vascular networks," *Optics Letters*, vol. 41, no. 14, pp. 3209–3212, 2016.
- [98] H. Pahlevaninezhad *et al.*, "A high-efficiency fiber-based imaging system for co-registered autofluorescence and optical coherence tomography." *Biomedical optics express*, vol. 5, no. 9, pp. 2978–87, Septembre 2014.
- [99] D. Lorensen *et al.*, "Dual-modality needle probe for combined fluorescence imaging and three-dimensional optical coherence tomography," *Optics Letters*, vol. 38, no. 3, pp. 266–268, Février 2013.
- [100] J. Mavadia *et al.*, "An all-fiber-optic endoscopy platform for simultaneous OCT and fluorescence imaging." *Biomedical Optics Express*, vol. 3, no. 11, pp. 2851–9, Novembre 2012.
- [101] H. Yoo *et al.*, "Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging in vivo." *Nature Medicine*, vol. 17, no. 12, pp. 1680–4, 2011.
- [102] L. P. Hariri *et al.*, "Simultaneous optical coherence tomography and laser induced fluorescence imaging in rat model of ovarian carcinogenesis," *Cancer Biology & Therapy*, vol. 10, no. 5, pp. 438–447, Septembre 2010.
- [103] S. Liang *et al.*, "Intravascular atherosclerotic imaging with combined fluorescence and optical coherence tomography probe based on a double-clad fiber combiner." *Journal of biomedical optics*, vol. 17, no. 7, p. 070501, Juillet 2012.
- [104] G. J. Ughi *et al.*, "Clinical characterization of coronary atherosclerosis with dual-modality oct and near-infrared autofluorescence imaging," *JACC : Cardiovascular Imaging*, pp. –, 2016.
- [105] S. Y. Ryu *et al.*, "Combined system of optical coherence tomography and fluorescence spectroscopy based on double-cladding fiber." *Optics letters*, vol. 33, no. 20, pp. 2347–9, Octobre 2008.
- [106] L. Wang *et al.*, "Optical probe based on double-clad optical fiber for fluorescence spectroscopy," *Optics Express*, vol. 15, no. 26, pp. 17 681–17 689, Décembre 2007.
- [107] T. Wang *et al.*, "Heartbeat OCT : in vivo intravascular megahertz-optical coherence tomography." *Biomedical optics express*, vol. 6, no. 12, pp. 5021–32, 2015.

- [108] C. Lee *et al.*, “Scanning fiber endoscopy with highly flexible, 1-mm catheterscopes for wide-field, full-color imaging,” *Journal of biophotonics*, vol. 3, pp. 385–407, 2010.
- [109] I. Yeoh *et al.*, “Electromechanical modeling and adaptive feedforward control of a self-sensing scanning fiber endoscope,” *ASME. J. Dyn. Sys., Meas., Control*, vol. 138, pp. 101 006–101 006, 2016.
- [110] Y. Yang *et al.*, “Potential role of a hybrid intraoperative probe based on OCT and positron detection for ovarian cancer detection and characterization.” *Biomedical Optics Express*, vol. 2, no. 7, pp. 1918–30, 2011.
- [111] Y. Yang *et al.*, “Integrated optical coherence tomography, ultrasound and photoacoustic imaging for ovarian tissue characterization.” *Biomedical Optics Express*, vol. 2, no. 9, pp. 2551–61, Septembre 2011.
- [112] M. Sato *et al.*, “Imaging characteristics of an 8.8mm long and 125um thick graded-index short multimode fiber probe,” *Applied Optics*, vol. 55, no. 12, pp. 3297–3305, Avril 2016.
- [113] M. Sato *et al.*, “Ultrathin forward-imaging short multimode fiber probe for full-field optical coherence microscopy,” *Optics Communications*, vol. 381, pp. 296 – 308, 2016.
- [114] X. Yang *et al.*, “Imaging deep skeletal muscle structure using a high-sensitivity ultrathin side-viewing optical coherence tomography needle probe,” *Biomedical Optics Express*, vol. 5, no. 1, pp. 136–148, Janvier 2014.
- [115] D. Lorensen, X. Yang, et D. D. Sampson, “Ultrathin fiber probes with extended depth of focus for optical coherence tomography,” *Optics Letters*, vol. 37, no. 10, pp. 1616–1618, Mai 2012.
- [116] X. Fu *et al.*, “Miniature forward-viewing common-path oct probe for imaging the renal pelvis,” *Biomedical Optics Express*, vol. 6, no. 4, pp. 1164–1171, Avril 2015.
- [117] L. Chang *et al.*, “Chip based common-path optical coherence tomography system with an on-chip microlens and multi-reference suppression algorithm,” *Optics Express*, vol. 24, no. 12, pp. 12 635–12 650, Juin 2016.
- [118] K.-S. Lee *et al.*, “Spectrally encoded common-path fiber-optic-based parallel optical coherence tomography,” *Optics Letters*, vol. 41, no. 18, pp. 4241–4244, Septembre 2016.
- [119] U. Sharma, N. M. Fried, et J. U. Kang, “All-fiber common-path optical coherence tomography : sensitivity optimization and system analysis,” *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 11, no. 4, pp. 799–805, July 2005.

- [120] R. L. P. van Veen *et al.*, “Determination of vis- nir absorption coefficients of mammalian fat, with time- and spatially resolved diffuse reflectance and transmission spectroscopy,” dans *OSA Annual BIOMED Topical Meeting*, 2004.
- [121] S. Nioka *et al.*, *Simulation Study of Breast Tissue Hemodynamics During Pressure Perturbation*. Boston, MA : Springer US, 2005, pp. 17–22.
- [122] D. Mackey *et al.*, *Morgan & Mikhail’s clinical anesthesiology*, 5th ed. New York : McGraw-Hill Education LLC., 2013.
- [123] S. Prahl. (2015) Tabulated molar extinction coefficient for hemoglobin in water. Oregon Medical Laser Center. [En ligne]. Disponible : <http://omlc.org/spectra/hemoglobin/summary.html>
- [124] G. Hale et M. R. Querry, “Optical constants of water in the 200nm to 200um wavelength region.” *Applied Optics*, vol. 12, pp. 555–563, 1973.
- [125] M. Keijzer *et al.*, “Fluorescence spectroscopy of turbid media : autofluorescence of the human aorta.” *Applied Optics*, vol. 28, pp. 4286–4292, 1989.
- [126] S. L. Jacques, “Role of tissue optics and pulse duration on tissue effects during high-power laser irradiation.” *Applied Optics*, vol. 32, no. 13, pp. 2447–2454, Mai 1993.
- [127] E. De Montigny *et al.*, “Tri-modal microscope for head and neck tissue identification,” *Biomedical Optics Express*, vol. 7, no. 3, pp. 732–745, Mars 2016.
- [128] K. Beaudette *et al.*, “Laser tissue coagulation and concurrent optical coherence tomography through a double-clad fiber coupler,” *Biomedical Optics Express*, vol. 6, no. 4, pp. 1293–1303, Avril 2015.
- [129] L. Zenteno, “High-power double-clad fiber lasers,” *Journal of Lightwave Technology*, vol. 11, no. 9, pp. 1435–1446, 1993.
- [130] A. Sayah *et al.*, “Fiber tips for scanning near-field optical microscopy fabricated by normal and reverse etching,” *Ultramicroscopy*, vol. 71, no. 1 - 4, pp. 59 – 63, 1998.
- [131] W. Wolfe, *Introduction to Radiometry*. SPIE tutorial texts (SPIE Optical Engineering Press), 1998.
- [132] I.-M. Shih. (2001) Ovarian cancer prevention, detection and treatment. Johns Hopkins Pathology. [En ligne]. Disponible : http://www.ovariancancerprevention.org/?page_id=160%20pour%20les%20images
- [133] A. M. Karst *et al.*, “Cyclin e1 deregulation occurs early in secretory cell transformation to promote formation of fallopian tube-derived high-grade serous ovarian cancers,” *Cancer Research*, vol. 74, no. 4, pp. 1141–1152, 2014.

- [134] G. J. Tearney *et al.*, “Scanning single-mode fiber optic catheter–endoscope for optical coherence tomography,” *Optics Letters*, vol. 21, no. 7, pp. 543–545, Avril 1996.
- [135] M. Strupler *et al.*, “Toward an automated method for optical coherence tomography characterization,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 20, no. 12, p. 126007, 2015.
- [136] V. Lavoué *et al.*, “Tumeurs primitives de la trompe de fallope,” *Gynécologie*, vol. 12, pp. 56 431–5, 2012.
- [137] M. D. Baiad *et al.*, “Surface plasmon resonance sensor interrogation with a double-clad fiber coupler and cladding modes excited by a tilted fiber bragg grating,” *Optics Letters*, vol. 38, no. 22, pp. 4911–4914, Novembre 2013.
- [138] M. D. Baiad *et al.*, “Capturing reflected cladding modes from a fiber Bragg grating with a double-clad fiber coupler,” *Optics Express*, vol. 21, no. 6, pp. 6873–6879, 2013.

ANNEXE A Liste des contributions

A.1 Articles de revue avec comité de lecture

1. **W.-J. Madore**, E. De Montigny, A. Deschênes, M. Leduc, A-M. Mes-Masson, K. Rahimi, D. Provencher, C. Boudoux, N. Godbout, “ Morphologic 3D scanning of fallopian tubes and ovaries using optical coherence tomography to assist ovarian cancer diagnosis”, *Journal of Biomedical Optics*, manuscrit en préparation.
2. **W.-J. Madore**, E. De Montigny, F. Benboujja, M. Leduc, C. Boudoux, N. Godbout, A-M. Mes-Masson, K. Rahimi, D. Provencher, “ Instrumentation dédiée à l’imagerie per-opératoire des trompes de Fallope”, Proffered papers from BRCA : Challenges and Opportunities - The Sixth International Symposium on Hereditary Breast and Ovarian Cancer, *Current Oncology* vol. 23 :3 (2016).
3. M. Jermyn, J. Desroches, K. Aubertin, K. St-Arnaud, **W.-J. Madore**, E. De Montigny, M.-C. Guiot, D. Trudel, B. Wilson, K. Petrecca, F. Leblond, “A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology”, *Physics in Medicine and Biology* 61, R370-R400 (2016).
4. E. De Montigny, N. Goulamhousen, **W.-J. Madore**, M. Strupler, O. E. Gologan, T. Ayad, and C. Boudoux, “Tri-modal microscope for head and neck tissue identification,” *Biomedical Optics Express* 7, 732-745 (2016), aussi dans *OCT News*.
5. E. De Montigny*, **W.J. Madore***, O. Ouellette, G. Bernard, M. Leduc, , M. Strupler, C. Boudoux, N. Godbout, “Double-clad fiber coupler for partially coherent detection,” *Optics Express*, 23, 9040-9051 (2015). *Ces auteurs ont contribué également à cet article.
6. K. Beaudette, H. W. Baac, **W.-J. Madore**, Martin Villiger, Nicolas Godbout, Brett E. Bouma, and Caroline Boudoux, “Laser tissue coagulation and concurrent optical coherence tomography through a double-clad fiber coupler,” *Biomedical Optics Express*, 6, 1293-1303 (2015).
7. **W.-J. Madore**, E. De Montigny, O. Ouellette, S. Lemire-Renaud, M. Leduc, X. Daxhelet, N. Godbout et C. Boudoux, “Asymmetric double-clad fiber coupler for endoscopy,” *Optics Letters*, 38 :21 (2013), aussi dans *OCT News*.
8. M. Baiad, M. Gagné, S. Lemire-Renaud, E. De Montigny, **W.J. Madore**, N. Godbout, C. Boudoux, and R. Kashyap, “Capturing reflected cladding modes from a fiber Bragg grating with a double-clad fiber coupler,” *Optics Express* 21, 6873-6879 (2013).

9. M. Baiad, M Gagné, **W.-J. Madore**, E. De Montigny, N. Godbout, C. Boudoux and R. Kashyap, “Surface plasmon resonance sensor interrogation with a double-clad fiber coupler and cladding modes excited by a tilted fiber Bragg grating,” *Optics Letters*, 38 :22 (2013).
10. D. Lorensen, B. Quirk, M. Auger, **W. J. Madore**, R. Kirk, N. Godbout, D. Sampson, C. Boudoux, and R. McLaughlin, “Dual-modality needle probe for combined fluorescence imaging and three-dimensional optical coherence tomography,” *Optics Letters* 38, 266-268 (2013).
11. **W. J. Madore**, “Les faisceaux d’Airy et leurs applications,” *Journal de Génie physique de Polytechnique*, 4, 13p. (2010).

A.2 Brevets et déclaration d’invention

1. F. Leblond, B. Wilson, A. Goyette, J. Pichette, K. Petrecca, C. Boudoux, **W.-J. Madore**, M. Strupler, “Biopsy device and method for obtaining a tomogram of a tissue volume using same,” brevet international #PCT/CA2014/050708, (2014).
2. N. Godbout, C. Boudoux, S. Lemire-Renaud, **W.-J. Madore**, X. Daxhelet, M. Leduc, “Asymmetric optical fiber coupler,” brevet international #PCT/CA2014/050065, (2014).
3. N. Godbout, M. Leduc, **W.-J. Madore**, “Improvements of the fusion-tapering process for the fabrication of optical fibre components,” Divulcation d’invention DIV-493, Polytechnique Montréal, (2014). Licence de procédé accordée à la compagnie *Thorlabs*.

A.2.1 Compte-rendus de conférence

1. E. De Montigny, A. Maniakas, **W.-J. Madore**, *et al.*, “OCT as a tool for rapid neck tissue identification in thyroid surgery”, American Society for Laser Medicine and Surgery Annual meeting, Accepté pour présentation orale, (2016).
2. **W.-J. Madore**, *et al.*, “Instrumentation dédiée à l’imagerie per-opératoire des trompes de Fallope”, BRCA : Challenges and Opportunities - The Sixth International Symposium on Hereditary Breast and Ovarian Cancer, Accepté pour affiche, (2016).
3. A. Maniakas, E. De Montigny, **W.-J. Madore**, *et al.*, “Intra-operative Rapid Tissue Identification in Thyroid and Parathyroid Surgery : A Novel High Resolution Optical Biopsy Tool” Canadian Society Of Otolaryngology-Head And Neck Surgery Annual Meeting, Accepté pour présentation orale, (2016).

4. **W.-J. Madore**, *et al.*, “ Morphologic 3D scanning of fallopian tubes to assist ovarian cancer diagnosis”, *Diagnosis and Treatment of Diseases in the Breast and Reproductive System II*, Photonics West, [9689-159], (2016).
5. E. De Montigny, **W.-J. Madore**, *et al.*, “Simultaneous multi-scale microscopy as a potential dedicated tool for intra-operative parathyroid identification during thyroid surgery”, *Optical Imaging, Therapeutics, and Advanced Technology in Head and Neck Surgery and Otolaryngology*, Photonics West, [9689-82], (2016).
6. **W. J. Madore**, E. De Montigny, O. Ouellette, G. Bernard, M. Leduc, N. Godbout, C. Boudoux, ” Double-clad fiber coupler for confocal endomicroscopy at 800 nm, ” *Endoscopic Microscopy IX*, Photonics West, 8927-20 (2014).
7. **W. J. Madore**, M. Leduc, S. Couture, S. O’Reilly, S. Lacroix et N. Godbout, ” Fabrication and characterization of all-fiber 90-degrees optical hybrids using a 4x4 coupler for signal analysis,” *Next-Generation Optical Communication : Components, Sub-Systems, and Systems III*, Photonics West, 9009-14 (2014).
8. **W. J. Madore**, E. De Montigny, O. Ouellette, G. Bernard, M. Leduc, C. Boudoux et N. Godbout, ” Double-clad fiber couplers for efficient multi-modal sensing,” *Photonic Instrumentation Engineering*, Photonics West, 8992-5 (2014).
9. E. De Montigny, **W. J. Madore**, M. Strupler, A.M. Beckley, F. Leblond, N. Godbout et C. Boudoux, ” Multimodal confocal microscopy based on a double-clad fiber coupler,” *Multimodal Biomedical Imaging IX*, Photonics West, 8937-7 (2014).
10. E. Khettal, **W. J. Madore**, M. Leduc et N. Godbout, ” Fabrication and characterization of 120-degrees optical hybrids as all-fiber monolithic 3x3 couplers,” *Optical Components and Materials XI*, Photonics West, 8982-33 (2014).
11. E. De Montigny, M. Strupler, N. Goulamhousen, **W. J. Madore**, T. Ayad, F. Leblond, et C. Boudoux, ” Multi-scale and functional microscopy for head and neck tissue identification,” *Optical Imaging, Therapeutics, and Advanced Technology in Head and Neck Surgery and Otolaryngology*, Photonics West, 8926-126 (2014).
12. L. Scolaro, D. Lorensen, **W. J. Madore**, A. Kramer, G. C. Yeoh, N. Godbout, D. D. Sampson, C. Boudoux et R. A. McLaughlin, ” High-sensitivity, dual-modality optical coherence tomography and fluorescence needle probe for imaging fluorescently labelled tissue,” *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XVIII*, Photonics West, 8934-85 (2014).
13. K. Beaudette, H. W. Baac, **W. J. Madore**, E. De Montigny, M.L. Villiger, N. Godbout, B.E. Bouma et C. Boudoux, ”Towards simultaneous and co-localized optical

- frequency domain imaging and laser therapy through a double clad fiber," *Optical Fibers and Sensors for Medical Diagnostics and Treatment Applications XIV*, Photonics West, 8938-22 (2014).
14. A. Goyette, A. Laurence, K. St-Arnaud, **W. J. Madore**, M. Strupler, A. M. Beckley, C. Boudoux, B. C. Wilson et F. Leblond, "Integrated optical spectroscopy system to guide brain needle biopsies," *Optical Techniques in Neurosurgery, Brain Imaging, and Neurobiology*, Photonics West, 8928-15 (2014).
 15. L. Scolaro, D. Lorensen, **W. J. Madore**, A. Kramer, G. C. Yeoh, N. Godbout, D. D. Sampson, C. Boudoux et R. A. McLaughlin, "Optical Needle Probe for Dual Optical Coherence Tomography and Fluorescence Imaging," *ANZCOP*, Australia (2013).
 16. **W. J. Madore**, E. De Montigny, O. Ouellette, E. D. Lamotte, M. Strupler, N. Goulamhousen, N. Godbout et C. Boudoux, "Novel double clad fiber coupler for endoscopy," *Fibers for biomedical applications II*, *Frontiers in Optics*, Orlando, FL, USA, FW5B.3 (2013).
 17. M. Baiad, M. Gagné, E. De Montigny, **W. J. Madore**, N. Godbout, C. Boudoux, and R. Kashyap, "High-efficiency, double-clad fiber coupler, cladding mode sensor using a tilted fiber Bragg grating," *CLEO-PR and OECC/PS*, Japan, 1569731221 (2013).
 18. M. Baiad, M. Gagné, E. De Montigny, **W. J. Madore**, N. Godbout, C. Boudoux, and R. Kashyap, "Optical fibre Bragg grating Cladding mode sensors", 5th Workshop on Optical Fiber Sensors (2013).
 19. **W. J. Madore**, E. De Montigny, N. Goulamhousen, Olivier Ouellette, E. Duchesne De Lamotte, N. Godbout, C. Boudoux, "Asymmetric double-clad fibre coupler for endoscopy," *Photonics North*, Invited Presentation, Ottawa (2013).
 20. **W. J. Madore**, E. De Montigny, S. Lemire-Renaud, E. Duchesne De Lamotte, M. Strupler, N. Godbout, C. Boudoux, "Novel double-clad fiber couplers for spectrally encoded endoscopy", *Endoscopic Microscopy VIII*, Photonics West, 8575-22 (2013).
 21. D. Lorensen, B. C. Quirk, M. Auger, **W. J. Madore**, R. W. Kirk, N. Godbout, D. D. Sampson, C. Boudoux, R. A. McLaughlin, "Double-clad fiber needle probe for combined optical coherence tomography and fluorescence imaging" *Photonics West*, 8571-56 (2013).
 22. E. De Montigny, N. Goulamhousen, **W. J. Madore**, M. Strupler, C. Boudoux, "Simultaneous multimodal microscopy for head and neck tissue identification", *Multimodal Biomedical Imaging VIII*, Photonics West, 8574-6 (2013).
 23. D. Lorensen, L. Scolaro, X. Yang, B. Quirk, R. Kirk, M. Auger, **W. J. Madore**, N. Godbout, M. Edmond, C. Simpson, C. Boudoux, R. McLaughlin, D. Sampson,

- "Advances in Performance and Capabilities of OCT Needle Probes," Endoscopic and Intravascular OCT, 2013 European Conferences on Biomedical Optics, 1649751 (2013).
24. **W. J. Madore**, S. O'Reilly, M. Faucher, S. Couture, M. Leduc, N. Godbout, S. Lacroix, "All-fiber 90 degrees optical hybrids using 4×4 coupler for signal analysis", Photonics North, OPTICS-7-26-4, (2012).

ANNEXE B Liste des spécimens étudiés et leurs caractéristiques

Tableau B.1 Inventaire des spécimens tubo-ovariens pour l'étude d'échantillons en paraffine

Catégorie	Code	Latéralité	Diagnostic
HGS	8969A6	d	Cystadénocarcinome papillaire séreux haut grade
HGS	9551B2	d	Cystadénocarcinome séreux haut grade
HGS	14792A4	d	Carcinome papillaire séreux haut grade
HGS	15317B1	Ep	Carcinome papillaire séreux haut grade
HGS	9659A1	d	Carcinome papillaire séreux haut grade
HGS	11059B1	d	Carcinome papillaire séreux haut grade
HGS	12890A5	d	Carcinome papillaire séreux haut grade
HGS	17681A2	Ep	Carcinome papillaire séreux haut grade
HGS	20645A8	d	Carcinome papillaire séreux haut grade
HGS	9912E1	g	Carcinome papillaire séreux haut grade
HGS	16751A18	d	Carcinome papillaire séreux haut grade
HGS	17294A3	d	Carcinome papillaire séreux haut grade
LGS	14022	-	Carcinome papillaire séreux bas grade
LGS	27251A3	-	Carcinome papillaire séreux bas grade
LGS	25164B2	d	Carcinome papillaire séreux bas grade
LGS	13949A5	d	Cystadénocarcinome papillaire séreux bas grade
LGS	17586-2	Ep	Cystadénocarcinome papillaire séreux bas grade
LGS	14964A8	g	Carcinome séreux bas grade
LGS	12404A7	g	Cystadénocarcinome papillaire séreux bas grade
LGS	21357B14	-	Carcinome papillaire séreux bas grade
LGS	11356A2	-	Carcinome papillaire séreux bas grade
Sain	10476A3	g	trompe saine
Sain	11534B1	d	trompe saine
Sain	12705A7	g	trompe saine
Sain	14369A12	g	trompe saine
Sain	23619B1	g	trompe saine
Sain	6867A11	d	trompe saine
Sain	6682A3	-	trompe saine
Sain	9004B3	g	trompe saine
Sain	922A9	g	trompe saine

Tableau B.2 Inventaire des spécimens tubo-ovariens pour l'étude d'échantillons en paraffine, continué

Catégorie	Code	Latéralité	Diagnostic
Sain	14144A11	g	trompe saine
Sain	9068B12	g	trompe saine
Sain	13024B10	g	trompe saine
Endométrioïde	22100A8	d	Adénocarcinome endométrioïde
Endométrioïde	21371A2	d	Adénocarcinome endométrioïde
Endométrioïde	17126A1	g	Adénocarcinome endométrioïde
Endométrioïde	3835A4	d	Adénocarcinome endométrioïde
Endométrioïde	5666B11	g	Adénocarcinome endométrioïde
Endométrioïde	18278A14	d	Adénocarcinome endométrioïde
Endométrioïde	6879A5	d	Adénocarcinome endométrioïde
Cellules claires	17505A10	d	Adénocarcinome à cellules claires
Cellules claires	5033A16	d	Adénocarcinome à cellules claires
Cellules claires	1340A1	g	Adénocarcinome à cellules claires
Cellules claires	14958A10	g	Adénocarcinome à cellules claires
Cellules claires	9157A9	d	Adénocarcinome à cellules claires
Cellules claires	14295A8	d	Adénocarcinome à cellules claires
Cellules claires	7936C10	-	Adénocarcinome à cellules claires
Mucineux	23312A16	g	Mucineux
Mucineux	14425B11	-	Mucineux avec infiltration
Mucineux	17346A3	-	Mucineux borderline
Mucineux	17394A2	-	Mucineux borderline
Mucineux	19505A13	-	Mucineux borderline
Mucineux	23539A4	d	Mucineux
Mucineux	14448A4	g	Mucineux
Mucineux	6995A9	-	Mucineux
STIC	26729A17	-	STIC
STIC	20251A11	-	STIC
STIC	13645A12	-	STIC
STIC	15732D14	-	STIC
STIC	15732D8	-	STIC
STIC	19275D14	-	STIC
STIC	641A7	-	STIC
STIC	641A12	-	STIC
STIC	15162C8	-	STIC
STIC	19611B19	-	STIC
STIC	6894B17	-	STIC
STIC	21056C29	-	STIC
STIC	17394B5	-	STIC

ANNEXE C Protocoles de teinture des spécimens de cancer du foie et protocole d'imagerie

C.1 Spécimens humains

Pour les spécimens humains, le marquage est réalisé par un protocole d'immunofluorescence en deux étapes. La première étape consiste à incuber le spécimen dans un bain d'anticorps primaires Souris-anti-Humain GTCM-5 (fourni par Prof. Martin Pera, University of Melbourne). Cet anticorps va se lier préférentiellement aux cellules épithéliales du canal biliaire ainsi qu'à un sous-groupe de cellules progénitrices du foie. Les spécimens sont ensuite incubés dans un second bain à base d'anticorps secondaires Lapin-anti-Souris conjugué au fluorophore AlexaFluo488 (AlexaFluor488 Rabbit Anti-Mouse IgG, Merck Millipore, USA). Cette étape permet de marquer par fluorescence les cellules liées aux anticorps GTCM-5. Les échantillons sont tranchés et déposés sur une lame de microscope, puis couverts d'une microlamelle No.1. L'AlexaFluor a été préféré ici comme fluorophore, car il présente une meilleure efficacité d'émission comparée à la fluorescéine. De plus, cette efficacité est stable sur un pH variant de 4 à 10. Le pH des tissus n'a donc pas été contrôlé pour cette série d'expériences.

C.2 Spécimens de souris

Les spécimens de souris proviennent d'une lignée Balb/C \times C57BL/6 \times FVB/N. Les foies ont été disséqués et purgés du sang par perfusion de PBS (Phosphate buffered Serum) contenant 1 % d'héparine par l'intermédiaire de la veine porte. Une solution de sérum d'anticorps EpCAM conjugué à l'AlexaFluo488 (1.5 mL) est injectée par le canal biliaire commun et laissée en incubation pour une durée de 20 min. La perfusion est ensuite rincée au PBS (5 mL) pour retirer les anticorps non liés dans la veine porte, l'artère hépatique et le canal biliaire commun.

C.3 Protocole d'imagerie

C.3.1 Sonde aiguille

Un laser à semi-conducteur doublé en fréquence (Sapphire SF 488, Coherent Inc. USA) sert de source d'excitation de la fluorescence. Il est combiné à un système d'imagerie OCT similaire à celui décrit au chapitre 4 à l'aide d'un multiplexeur. La sonde d'imagerie est un assemblage de

segments de fibre à double gaine, de fibre hautement multimode à saut d'indice ($425\ \mu\text{m}$), et de fibre à gradient d'indice ($179\ \mu\text{m}$) afin d'assurer une région d'imagerie efficace très proche de la sonde. Un dernier segment de fibre sans cœur est épissuré à l'assemblage et poli à 48° afin de dévier les rayons lumineux à angle droit pour imager sur le côté de la sonde. La sonde est ensuite insérée dans un capillaire de verre dur et chauffée afin de refermer l'extrémité et ainsi emprisonner une section d'air assurant le saut d'indice pour la réflexion totale interne (TIR). L'assemblage est ensuite collé dans une aiguille hypodermique de taille 24G dans laquelle une ouverture d'imagerie a été perforée au préalable par gravure électrochimique. La figure C.1 montre le détail d'assemblage de la sonde, de même qu'une photographie de son utilisation en balayage mécanique cartésien. La sonde présente des résolutions mesurées dans l'eau de $7\ \mu\text{m}$ en x et $9.6\ \mu\text{m}$ en y à $1300\ \text{nm}$. La distance de travail est évaluée à $410\ \mu\text{m}$ dans l'eau. En fluorescence, les meilleures résolutions latérales sont atteintes à environ $400\ \mu\text{m}$ de la sonde et se chiffrent à $12\ \mu\text{m}$ en x et $13\ \mu\text{m}$ en y .

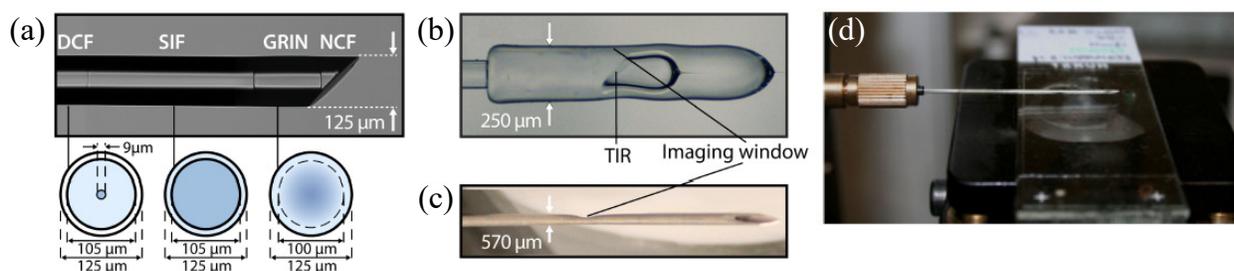


Figure C.1 Schéma de construction de la sonde aiguille. (a) montre une photographie de l'assemblage de fibre. (b) montre le capillaire de verre fondu sur l'assemblage de fibre afin de créer un segment d'air permettant de réfléchir les rayons vers le côté de la sonde pour l'imagerie. (c) présente une photographie de l'assemblage final dans la sonde hypodermique de taille 24. La fenêtre d'imagerie est pointée à la fois sur (b) et (c). (d) montre une photographie de la sonde aiguille dans un montage permettant un balayage mécanique dans un plan x - y de la lame contenant l'échantillon. L'immersion dans l'eau n'est pas montrée. DCF : fibre à double gaine, SIF : fibre multimode à saut d'indice, GRIN : fibre à gradient d'indice, NCF : fibre sans cœur, TIR : réflexion totale interne.

C.3.2 Imagerie multimodale

Les échantillons humains sur lame de microscope sont installés sur une plateforme de translation avec la sonde aiguille faisant face à l'échantillon. La sonde est placée au focus de fluorescence, à $400\ \mu\text{m}$ de l'échantillon et immergée dans l'eau. La puissance du laser d'excitation en fluorescence à l'échantillon est de $90\ \mu\text{W}$. L'acquisition des deux modalités d'imagerie est

réalisée de façon simultanée et partage le même signal de déclenchement d'acquisition. Pour chaque ligne-A, une puissance est acquise par le sous-système d'imagerie par fluorescence et correspond au signal de fluorescence intégré pour cette position. Chaque point d'acquisition est séparé de $4\ \mu\text{m}$ dans chacune des directions du plan de l'échantillon. Pour chaque point d'acquisition, 4 lignes-A ont été acquises, puis moyennées lors du traitement des données pour réduire le bruit. La puissance de fluorescence a été intégrée sur la plage de temps requises pour réaliser les 4 acquisitions OCT. La surface imagée a été ajustée pour couvrir les dimensions de l'échantillon. Pour donner un exemple de la rapidité d'imagerie du système, l'acquisition d'une ligne de 5 mm de longueur dans les conditions décrites ici prend 1 s. À des fins de comparaison, les images reconstruites sont comparées à celles obtenues d'un microscope grand champ en fluorescence (IX2-ILL100 Inverted Microscope, Olympus Corporation, USA) avec un objectif $4\times$ (UPlanFLN $4\times/0.13$, Olympus Corporation, USA). Le microscope grand champ employé présente cependant une meilleure résolution que la sonde dû à une plus grande ouverture numérique (0.13 contre 0.07). Les cellules progénitrices du foie sont tout de même visibles sur les images acquises par la sonde. Les images présentent également une quantité de signal d'autofluorescence, provenant du tissu et du système. La détection du signal de fluorescence a été réalisée sur une échelle de 80 mV, mais les images présentées ont un seuil de signal à 27 mV. Cette modification de la plage dynamique permet de mieux discerner la fluorescence des cellules marquées du bruit d'autofluorescence.

Les échantillons de foie de souris ont été imagés immédiatement après avoir été préparés comme décrit à la section C.2. L'aiguille est insérée dans le foie, puis retirée en tournant (aller-retour sur environ 360°) à une fréquence de 1 Hz. L'acquisition a été ajustée afin d'obtenir 1600 acquisitions par tour. La puissance d'excitation de fluorescence à l'échantillon est de $200\ \mu\text{W}$. Un foie contrôle a été imagé (sans marquage fluorescent) afin de valider que la fluorescence mesurée correspond bien au marquage spécifique des cellules épithéliales du canal biliaire. Aucune fluorescence n'a été détectée lors de l'imagerie du foie contrôle. Ceci permet de conclure que la fluorescence mesurée correspond bien aux cellules marquées par l'anticorps EpCAM liées au fluorophore, cet anticorps se liant exclusivement aux cellules épithéliales (figure 4.6). Ces régions de signal de fluorescence plus intenses correspondent également à des structures plus faiblement diffusantes à l'OCT, typiques du tissu conjonctif des canaux biliaires. Les images OCT aident ici à la compréhension des acquisitions de fluorescence.