

**Titre:** Validation de l'imagerie intravasculaire par tomographie par cohérence optique sérielle et microscopie confocale en fluorescence  
Title: Validation of intravascular imaging by serial optical coherence tomography and fluorescence confocal microscopy

**Auteur:** Pier-Luc Tardif  
Author:

**Date:** 2018

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

**Référence:** Tardif, P.-L. (2018). Validation de l'imagerie intravasculaire par tomographie par cohérence optique sérielle et microscopie confocale en fluorescence [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
Citation: <https://publications.polymtl.ca/3054/>

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

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/3054/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Frédéric Lesage  
Advisors:

**Programme:** Génie biomédical  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

VALIDATION DE L'IMAGERIE INTRAVASCULAIRE PAR TOMOGRAPHIE PAR  
COHÉRENCE OPTIQUE SÉRIELLE ET MICROSCOPIE CONFOCALE EN  
FLUORESCENCE

PIER-LUC TARDIF

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

AVRIL 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

VALIDATION DE L'IMAGERIE INTRAVASCULAIRE PAR TOMOGRAPHIE PAR  
COHÉRENCE OPTIQUE SÉRIELLE ET MICROSCOPIE CONFOCALE EN  
FLUORESCENCE

présenté par : TARDIF Pier-Luc

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

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

M. COHEN-ADAD Julien, Ph. D, président

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

M. GERVAIS Thomas, Ph. D, membre

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier Dr. Frédéric Lesage ainsi que mes collègues du Laboratoire d’Imagerie Optique Moléculaire, principalement Alexandre Castonguay, Joël Lefebvre et Patrick Delafontaine-Martel pour leur aide et leur support soutenu.

## RÉSUMÉ

Les récentes avancées dans le domaine de la biophotonique offrent de nouveaux outils prometteurs dans le champ de l'histologie, plus précisément dans l'étude des maladies cardiovasculaires. En effet, la combinaison de différentes techniques d'imagerie, comme l'ultrasonographie intravasculaire (IVUS), la spectroscopie proche infra-rouge (NIRS), la tomographie par cohérence optique (OCT) et l'imagerie moléculaire par fluorescence (NIRF) offrent tous des avantages qui permettent d'améliorer les diagnostics autant en recherche fondamentale que dans le domaine de la santé clinique. Dans les études *ex vivo*, l'histologie conventionnelle demeure à ce jour le "gold standard" de mesure de géométrie et de composition moléculaire de plaques d'athérosclérose. Cependant, certains problèmes liés à l'histologie rendent cette méthode imparfaite. En effet, même si cette dernière offre beaucoup d'information sur la composition moléculaire des tissus étudiés, le sous-échantillonnage de l'organe fait en sorte que beaucoup d'information par rapport à la localisation de la tranche est perdue. Plus précisément, dans le domaine de la cardiologie, il est d'un grand intérêt d'obtenir des outils de diagnostic permettant de cibler et de localiser avec précision les plaques d'athéroscléroses vulnérables, à risque de se rompre et de causer des syndromes coronaires aigus (ACV, infarctus du myocarde).

Le document suivant présente une méthode permettant de colocaliser les plaques d'athérosclérose imagées *in vivo* avec un cathéter multimode développé par le Laboratoire d'Imagerie Optique Moléculaire (LIOM) et avec un microscope à double modalité (OCT, microscope confocal en fluorescence). La méthode a été testée sur 5 lapins *New Zealand White* maintenu sur une diète riche en cholestérol pendant 14 semaines. Différents lits vasculaires ont ensuite été imités à l'aide d'un cathéter IVUS/NIRF. Un marqueur fluorophore lié à une molécule d'adhésion (*Inter Cellular Adhesion Molecule-1*, ou ICAM-1) était injecté au site imité afin d'obtenir un signal en fluorescence provenant de plaques athérosclérotiques. Les animaux ont ensuite été sacrifiés et les lits vasculaires ont été conservés pour être imités avec notre microscope OCT/confocal en fluorescence. Le microscope était combiné à un vibratome lié à une lame de rasoir et de moteurs de précision micrométrique, permettant de trancher très finement l'échantillon et d'imager successivement et automatiquement chaque tranche. Cela nous permettait, à l'aide d'algorithmes développés en Python, d'obtenir une reconstruction entière de l'artère, et par le fait même de localiser avec précision les plaques athérosclérotiques. Les expériences ont aussi montré qu'il est possible de récupérer les tranches après l'acquisition de données et de les analyser en histologie

conventionnelle, ce qui permet de valider les résultats obtenus *in vivo* et *ex vivo*. Bien qu'il s'agisse d'une étude préliminaire, l'étude s'est avérée être une preuve de concept valide, permettant de démontrer la faisabilité de la méthode.

Mon projet s'inscrit dans une étude plus large menée sur des lapins et des porcs diabétiques conjointement par l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM) et Polytechnique Montréal qui cible les plaques vulnérables. L'étude globale vise à développer des méthodes invasives d'imagerie par cathétérisme pour la caractérisation de la vulnérabilité des plaques d'athérosclérose en combinant plusieurs modalités *in vivo*, incluant l'ultrasonographie intravasculaire (IVUS), l'histologie virtuelle (VH), la spectroscopie par proche infrarouge (NIRS), la tomographie par cohérence optique (OCT) et l'imagerie moléculaire par fluorescence (NIRF) (cette dernière ciblant une molécule d'adhésion cellulaire (ICAM-1) et les monomères de collagène); la validation des résultats est obtenue par histologie massive en imagerie 3-D puis par histologie conventionnelle avec immunohistochimie. Le cathéter multimodalités mis au point par notre équipe permet d'ailleurs la collecte des images IVUS et NIRF. Plus précisément, mon projet de maîtrise portait sur le développement d'une méthode permettant de colocaliser les plaques d'athérosclérose entre les données dans les données acquises avec le cathéter et avec un microscope à double modalité (OCT, microscope confocal en fluorescence). Les deux microscopes combinés permettent de simultanément obtenir une carte anatomique des vaisseaux (OCT) et d'obtenir un signal en fluorescence provenant de la plaque d'athérosclérose (confocal).

En raison des longueurs d'ondes beaucoup plus courtes utilisées (proche infrarouge), l'OCT offre une résolution latérale supérieure que l'IVUS, et son aspect interférométrique permet d'imager en trois dimensions. L'OCT offre aussi une meilleure résolution axiale grâce à sa courte longueur de cohérence. Cependant, puisque le proche infrarouge est beaucoup diffusé dans les tissus vivants, l'OCT n'a pas eu très grande longueur de pénétration. Pour remédier à cela, un sectionnement automatique du segment vasculaire d'intérêt effectué à l'aide d'une lame tranchante liée à un vibratome, ce qui nous permettait d'imager le segment de vaisseau entier en recollant par ordinateur des tranches minces (200um) imagées successivement.

Le mémoire suivant présente la méthode que nous avons mise au point ainsi que la publication qui en a résulté, soit un article dans le International journal of Molecular Biology.

## ABSTRACT

Recent advances in biophotonics are offering new tools in the field of histology. Imaging techniques such as Optical Coherence Tomography (OCT), intravascular ultrasound (IVUS), near-infrared spectroscopy (NIRS), near-infrared fluorescence imaging (NIRF) and their combination all have advantages that can lead to more precise diagnostics, both in fundamental research and in clinical sciences. In the field of cardiology, conventional histology remains as of today the gold standard for measuring atherosclerotic plaque geometry and molecular composition. However, conventional histology does have its shortcomings. For instance, even if histology gives plenty of information of tissue molecular composition, it requires the experimenter to significantly downsample the studies organ, thus losing information on tissue localization. This manuscript describes a novel approach developed by our laboratory, Laboratoire d'Imagerie Optique Moléculaire (LIOM), that allows us to colocalize atherosclerotic plaques imaged in vivo with a multimodal catheter (IVUS, NIRF) with a double-modality (OCT, confocal fluorescence microscopy). The method was tested on 5 New Zealand White rabbits subjected to a cholesterol-rich diet for 14 weeks. Pullbacks were performed with the catheter on different vascular beds in the rabbit aortas. A fluorophore bound to an adhesion molecule (Inter Cellular Adhesion Molecule-1, or ICAM-1) was injected in the bloodstream before pullbacks, offering a source of signal for the fluorescence imaging. Vascular beds were then salvaged after sacrifices, embedded in agarose gels and imaged in the OCT/confocal microscope built by our team. A vibratome attached to a razorblade and micrometer-precise motor were used to cut thin slices automatically, allowing to image each slice one after the other. Custom algorithms written in Python allowed to stitch all the slices, in order to obtain a 3D view of the whole segment (massive 3D histology). The slices could also be saved for conventional histology after the procedure. This allowed us to validate measurements done with the catheter and the microscope.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT.....	VI
TABLE DES MATIÈRES .....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XI
LISTE DES ANNEXES.....	XII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	5
2.1 Athérosclérose.....	5
2.1.1 Mécanismes de formation .....	5
2.1.2 Syndromes coronariens aigus.....	7
2.2 Techniques d'imageries des plaques d'athérosclérose .....	8
2.2.3 NIRF intravasculaire .....	10
2.2.4 OCT.....	11
2.2.5 Microscopie confocale .....	17
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE : ÉTUDE CHEZ LE LAPIN.....	20
3.1 Montage expérimental.....	20
3.1.1 Cathéter multimode .....	20
3.1.2 Microscope multimode.....	21
3.2 Protocole expérimental.....	25
3.2.1 Acquisition de données in vivo .....	25
3.2.2 Acquisition de données ex vivo .....	26
3.2.3 Reconstruction par ordinateur .....	28

3.2.4 Colocalisation.....	33
3.2.5 Comparaison avec l'histologie.....	35
3.2.6 Limites et difficultés.....	36
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: VALIDATING INTRAVASCULAR IMAGING WITH SERIAL OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY AND CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPY .....	39
4.1. Introduction .....	40
4.2. Results .....	42
4.2.1. In Vitro Affinity of Anti-ICAM-1 Antibody .....	42
4.2.2. In Vivo Catheter Imaging.....	42
4.2.3. Serial Imaging System, Ex Vivo OCT Reconstructions and Fluorescence Alignment	44
4.2.4 Alignment and Tissue Deformation .....	47
4.2.5. Validation of Intravascular Molecular Imaging .....	48
4.3. Discussion .....	49
4.3.1 Slicing Optimization .....	50
4.3.2. Optical Optimization .....	51
4.3.3. Big-Data Processing.....	51
4.4. Materials and Methods .....	51
4.4.1. Animal Model for Atherosclerosis.....	51
4.4.2. Balloon Dilatation Procedures .....	52
4.4.3. Bimodal Near-Infrared Fluorescence (NIRF)/Intravascular Ultrasound (IVUS) Imaging Catheter System.....	52
4.4.4. In Vivo NIRF Imaging Procedure.....	53
4.4.5. Ex Vivo Imaging System and Methods.....	53
4.5. Conclusions .....	55

CHAPITRE 5 ÉTUDE SUR LES PORCS DIABÉTIQUES.....	59
5.1    Méthodologie .....	59
5.2    Résultats .....	61
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE .....	68
6.1    Étude chez le lapin .....	68
6.2    Étude chez le porc .....	69
CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....	73
RÉFÉRENCES .....	75
ANNEXES .....	85

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1: Caractéristiques des cathéters imageant avec différentes modalités.....	60
Tableaux 4.2 Résultats en fluorescence pour le cathéter, le Lumina et le microscope confocal pour les sondes ICAM-1.....	61
Tableaux 4.3 Résultats en fluorescence pour le cathéter, le Lumina et le microscope confocal pour les sondes collagène.....	62
Tableau 4.4: Mesures de fluorescence en microscopie confocale pour la sonde ICAM-1+.....	63
Tableau 4.5: Mesures de fluorescence en microscopie confocale pour la sonde ICAM-1+.....	63

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Accumulation de cellules spumeuses dans les premiers stades de l'athérogénèse .....	6
Figure 2: Lien entre les fonctions de corrélation et la fonction de spectre. ....	13
Figure 3: Schéma d'un OCT simplifié montrant les différents champs électriques. ....	15
Figure 4: Diagramme de microscope confocal en configuration EPI. ....	18
Figure 5: Comparaison entre la PSF en microscopie conventionnelle et en confocal. ....	19
Figure 6: Schéma du cathéter multimode et des dispositifs utilisés.....	21
Figure 7: Microscope double modalité.....	23
Figure 8: Composantes principales du vibratome. ....	24
Figure 9: Schéma montrant le chemin suivi par le cathéter, ainsi que le cathéter utilisé . ....	25
Figure 10: Moule de plastique employé pour fixer l'artère dans le gel d'agarose.....	27
Figure 11: Modèle de déplacement des mosaïques.....	30
Figure 12: Étapes du traitement d'image pour une tranche acquise avec le microscope confocale. ....	32
Figure 13: Reconstruction d'une partie de l'aorte du lapin 4 du modèle 1 avec des voxels isotropes de 6.5um.....	33
Figure 14: Comparaison entre les scans NIRF in vivo et ex vivo acquis avec le Lumina pour les 4 lapins du modèle 1.....	34
Figure 15: Exemple de tranche après être colorée avec le Trichrome de Masson et le Von Koss	36
Figure 16: B-scan acquis dans un bassin d'eau, sans échantillon.....	37
Figure 17: LAD du porc 7331, imagé en OCT. ....	65
Figure 18: Exemple de résultats obtenus dans la LCX du porc 7331 (ICAM-1 +).....	66
Figure 19: Comparaison du signal fluorescent sur la longueur de la LCX du porc 7331 .....	67

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACV	accident cérébro-vasculaire
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DC	Courant Direct (direct current)
FOV	Champ de vue (Field of View)
HUVEC	Human Umbilical Vein Cells
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
ICG	Indocyanine Green
IVA	Intraventricular Anterior Artery
IVUS	ultrason intra-vasculaire (intravascular ultrasound)
LCX	Left Circumflex Artery
LDL	low density lipoprotein
NIRF	Fluorescence proche infrarouge (Near Infrared Fluorescence)
NIRS	Spectroscopie proche infrarouge (Near Infrared Spectroscopy)
MHz	MegaHertz
OCT	Tomographie par cohérence optique (Optical Coherence Tomography)
PMT	Tube photomultiplicateur (photomultiplicator tube)
PSF	Point-spread function
RCA	Right Coronary Artery
SS-OCT	Swept-source optical coherence tomography
SNR	Rapport signal sur bruit (Signal to noise ratio)
TD-OCT	Time-domain optical coherence tomography
TNF-alpha	Tumor Necrosis Factor Alpha
VH	Histologie virtuelle
USB	Universal serial bus

## **LISTE DES ANNEXES**

ANNEXE A - RÉSULTATS EN FLUORESCENCE ACQUIS AVEC LE CATHÉTER MULTIMODE .....	85
ANNEXE B - RÉSULTATS EN FLUORESCENCE ACQUIS AVEC LE LUMINA.....	86

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires et les autres maladies liées à l'athérosclérose représentent la principale cause de décès dans le monde. L'athérosclérose est une maladie complexe liée à une concentration élevée de lipoprotéines, caractérisée par la formation de plaques dans les artères [1]. Selon une étude mené en 2008, le fardeau des maladies cardiovasculaires s'élevait entre 5500 et 11000 morts, 33000 et 67000 hospitalisations pour un total entre 291 000 et 583 000 jours au Canada [2]. Selon l'agence de la santé publique du Canada, les maladies cardiovasculaires ont entraîné des dépenses de 7,6 milliards en coûts directs (soins de santé) et 14,6 milliards en coûts indirects (perte de productivité par incapacité ou décès). Malgré que le taux de mortalité ajusté pour l'âge des maladies coronariennes ait diminué dans les dernières décennies, le vieillissement de la population fait en sorte que la prévalence des maladies coronariennes risque d'augmenter dans les années à venir. En effet, la diminution du taux de mortalité n'est pas due à une diminution de la prévalence, mais à un meilleur taux de survie aux infarctus du myocarde. On peut donc voir pourquoi il est d'un grand intérêt de développer des méthodes permettant de détecter et d'évaluer quantitativement et qualitativement l'avancement de la formation de plaques athérosclérotiques, et ce de manière fiable et efficace.

Les plaques de cholestérol obstruent la circulation sanguine en réduisant la taille du lumen dans les vaisseaux et peuvent aussi causer des thromboses, pouvant mener à des infarctus du myocarde si les plaques sont dans les artères coronariennes ou à des accidents cérébrovasculaires (ACV) si elles sont dans les artères menant au cerveau. Plus précisément, les plaques qui sont à risque d'induire de tels événements potentiellement mortels, appelés syndromes coronariens aigus, sont dites "vulnérables". Elles se caractérisent par une coque fibreuse mince, un cœur nécrotique et un noyau lipidique. Notre étude porte principalement sur la caractérisation moléculaire de ces plaques afin de développer des méthodes diagnostiques et de validation plus efficaces.

À ce jour, l'angiographie coronarienne demeure l'étalon-or de l'imagerie invasive pour le diagnostic des maladies cardiovasculaires. Cependant, cette technique sous évalue la quantité et la taille de plaques athérosclérotiques, puisqu'elle ne permet pas de visualiser les parois artérielles. D'autres techniques, comme l'imagerie ultrasonographie intravasculaire (IVUS) et de la tomographie par cohérence optique (OCT) intravasculaires, n'ont pas ce problème. En effet, l'IVUS, reposant sur l'envoi d'ultrason, permet d'évaluer le fardeau lipidique et la sévérité des sténoses. D'un autre côté,

l'OCT peut visualiser les macrophages et la rupture des plaques, mais ne peut pas voir le fardeau lipidique en raison de sa faible longueur de pénétration (de l'ordre du millimètre). Ces techniques sont donc complémentaires, mais n'offrent pas toute l'information requise pour offrir un diagnostic parfait de l'état et de l'avancement des maladies coronariennes. En effet, ces techniques offrent très peu d'information sur la composition moléculaire des plaques, et donc sur leur vulnérabilité. Des sondes fluorescentes moléculaires ciblant des marqueurs précis caractérisant certains stades de formation de l'athérosclérose peuvent être utilisés afin de répondre à cette question. Cette technique s'appelle fluorescence proche infrarouge (NIRF). En combinant l'IVUS et le NIRF à l'aide d'un cathéter multimode, on peut obtenir une carte anatomique à bonne résolution du vaisseau sanguin étudié en plus d'obtenir de l'information sur la composition moléculaire.

Puisqu'il n'existe présentement aucune méthode *in vivo* connue permettant d'estimer simultanément le fardeau athérosclérotique et la composition moléculaire des plaques, il est présentement très difficile de valider la fiabilité d'un cathéter IVUS/NIRF. De plus, l'histologie conventionnelle, qui servirait typiquement d'étalon-or pour de telles validations, offre peu d'information sur le contexte anatomique des plaques. Afin de valider les mesures réalisées *in vivo*, il est important d'avoir une méthode *ex vivo* fournissant autant d'information sur la géométrie des vaisseaux et des plaques athérosclérotiques, en plus de fournir la même information sur la composition moléculaire que le NIRF. Il est aussi important d'être en mesure de pouvoir co-localiser les plaques entre les deux modalités d'imagerie. En effet, dans la plupart des études en recherche fondamentale ou clinique, la validation de l'efficacité de nouvelles modalités d'imageries repose sur l'histologie conventionnelle, où des agents de coloration sont utilisés afin de marquer des molécules ou des types de tissu. Cependant, on performe typiquement des analyses histologiques sur des tranches extrêmement minces (environ 5um) provenant de tissus étudiés. Cela force l'expérimentateur à sous échantillonner les tissus étudiés et à sacrifier de l'information sur la localisation précise des échantillons étudiés.

Ce mémoire présente une nouvelle approche d'histologie massive 3D reposant entièrement sur des techniques biophotoniques permettant de valider les résultats obtenus à l'aide d'un cathéter IVUS/NIRF développé par notre équipe. La méthode repose sur un microscope utilisant la tomographie par cohérence optique (OCT) et la microscopie confocale afin d'obtenir une carte anatomique à haute résolution d'artères et un signal provenant de marqueurs moléculaires liés à l'athérosclérose simultanément. Un trancheur constitué de moteurs ayant une précision

micrométrique et un vibratome permet d'automatiquement imager successivement des tranches minces (200um) de l'organe et des algorithmes sont utilisés afin d'obtenir une reconstruction 3D du vaisseau sanguins entiers. Notre hypothèse était que notre dispositif avait les avantages de l'histologie conventionnelle, sans toutefois avoir à sous échantillonner, et donc qu'aucune résolution spatiale n'est sacrifiée et qu'aucune information sur la provenance du signal n'est perdue. Une étude préliminaire a été réalisée sur des modèles de lapin chez lesquels des plaques d'athérosclérose avaient été formées par l'entremise d'une diète riche en lipide. Le document suivant décrit la pathologie étudiée, les avancées technologiques qui ont mené à l'invention de notre microscope, le protocole suivi ainsi que les résultats obtenus, qui ont culminé en une publication dans le International Journal of Molecular Biology en automne 2016.

L'étude principale était réalisée sur 8 porcs diabétiques. Les procédures chirurgicales sur les animaux ont été faites, mais l'analyse des résultats et les expériences *ex vivo* sont encore en cours de route. Des porcs étaient utilisés comme modèle, principalement car il possède une anatomie très similaire à celle de l'humain. De plus, ils développent des plaques spontanément et très rapidement lorsque soumis à une diète riche en cholestérol et à une induction iatrogénique du diabète. De plus, la composition des plaques développées chez les porcs est très semblable à celle chez l'humain. On y retrouve entre autres un fardeau lipidique important, des coques fibreuses, l'invasion de macrophages et des cœurs nécrotiques riches en lipides. Un plus grand nombre de techniques d'images L'étude avait deux objectifs principaux; 1- Découvrir de nouveaux biomarqueurs morphologiques et moléculaires de la vulnérabilité de plaques athérosclérotiques, permettant de prédire leur rupture et 2- jeter les bases d'un nouvel étalon-or reposant sur l'histologie massive 3D *ex vivo* permettant de d'interpréter les résultats acquis *in vivo* dans de futures études. Plus précisément, les buts de mon projet de recherche étaient de 1- Prouver que le protocole peut être réalisé entièrement dans un modèle animal, et les vaisseaux sanguins peuvent être analysés *ex vivo* 2-Développer une méthode avec notre microscope OCT/Fluorescence permettant de valider les résultats acquis avec le cathéter multimode, plus précisément de colocaliser le signal fluorescent entre les deux modalités et 3-Être en mesure de créer des cartes 3D avec les données OCT du microscope permettant de localiser la plaque athérosclérotique 4-Prouver que notre protocole permet de distinguer les contrôles positifs et négatifs pour les différentes sondes.

Le projet était d'une grande envergure et n'aurait pu être réalisé sans la contribution d'une équipe multidisciplinaire. Le cathéter IVUS/NIRF présent dans ce mémoire a été conçu par Dr. Maxime

Abra (École Polytechnique de Montréal) et les procédures *in vivo* ont été réalisées par l'équipe de recherche fondamentale d'Institut de Cardiologie de Montréal, principalement par Dre. Marie-Jeanne Bertrand. Le microscope OCT/Confocal a été conçu et construit en majorité par Dr. Alexandre Castonguay (École Polytechnique de Montréal) et les algorithmes de reconstruit ont été développés par Joël Lefebvre (École Polytechnique de Montréal). Les analyses histologiques ont été performées à l'Institut de Cardiologie de Montréal.

Mes contributions à l'étude ont principalement été d'acquérir les données *ex vivo* avec le microscope OCT/Confocal, ainsi que d'analyser les résultats. J'ai aussi comparé les données à ceux acquises avec le cathéter IVUS/NIRF, c'est-à-dire que j'ai co-registré les plaques et les sources de signal en fluorescence. De plus, j'ai apporté les modifications nécessaires au microscope (changement des sources lumineuse, alignement, remplacement des lentilles et du sténopé pour une iris) en plus d'optimiser le processus de tranchage. Finalement, j'ai mis au point la méthode de traitement des images OCT et confocale dans ImageJ.

## CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

Cette section a pour but de résumer les connaissances acquises sur la pathologie étudiée et les méthodes d'imageries utilisées à ce jour pour diagnostiquer l'avancement de plaques athérosclérotiques. Elle place les maladies ischémiques dans son contexte économique afin de souligner l'importance de développer des méthodes de diagnostic efficaces en tant qu'enjeu de société. Les mécanismes de formation et de rupture des plaques d'athérosclérose, ainsi qu'une classification des différents types de plaques, sont décrits. Ce chapitre offre aussi un historique des différentes méthodes d'imagerie utilisées dans le cadre de cette étude. Ces modalités seront distinguées en deux parties, soient les méthodes *in vivo* et les méthodes *ex vivo*. Les applications, les modes de fonctionnement, ainsi que les avantages et désavantages de chaque méthode sont présentés, afin de montrer l'utilité de combiner les modalités entre elles pour obtenir des outils optimaux.

### 2.1 Athérosclérose

#### 2.1.1 Mécanismes de formation

Les mécanismes de formation de plaques de cholestérol sont complexes et font interagir plusieurs processus simultanément, ce qui rend la progression de la maladie très difficile à prédire. On comprend aujourd'hui que la formation de plaques d'athérosclérose est en majorité due à une forte concentration sanguine d'apolipoprotéine B, principalement des lipoprotéines de basse densité *low density lipoprotein* (LDL). Cependant, le tabagisme, l'hypertension, l'excès de poids, l'inactivité physique et un taux de cholestérol élevé sont aussi des facteurs augmentant les risques de formation de plaques athérosclérotiques [3].

La première étape dans la formation de plaque est l'accumulation de LDL sur les parois artérielles. Les LDL sont alors oxydés, ce qui induit une expression par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses de molécules d'adhésion, comme les molécules d'adhésion intercellulaires-1 (ICAM-1), de chimioattractants et de facteurs de croissance. Ces molécules agissent sur les récepteurs des monocytes et les font migrer, les guident et influencent leur différentiation entre macrophages et cellules dendritiques [4]. Ensuite, par des processus qui ne sont que partiellement

compris à ce jour, les lipides pénètrent dans les macrophages pour former des cellules spumeuses. Une accumulation importante de ces cellules se manifeste en xanthomes ou en stries de lipides sur l'intima des artères. Les cellules spumeuses sont facilement reconnues par la microscopie conventionnelle.

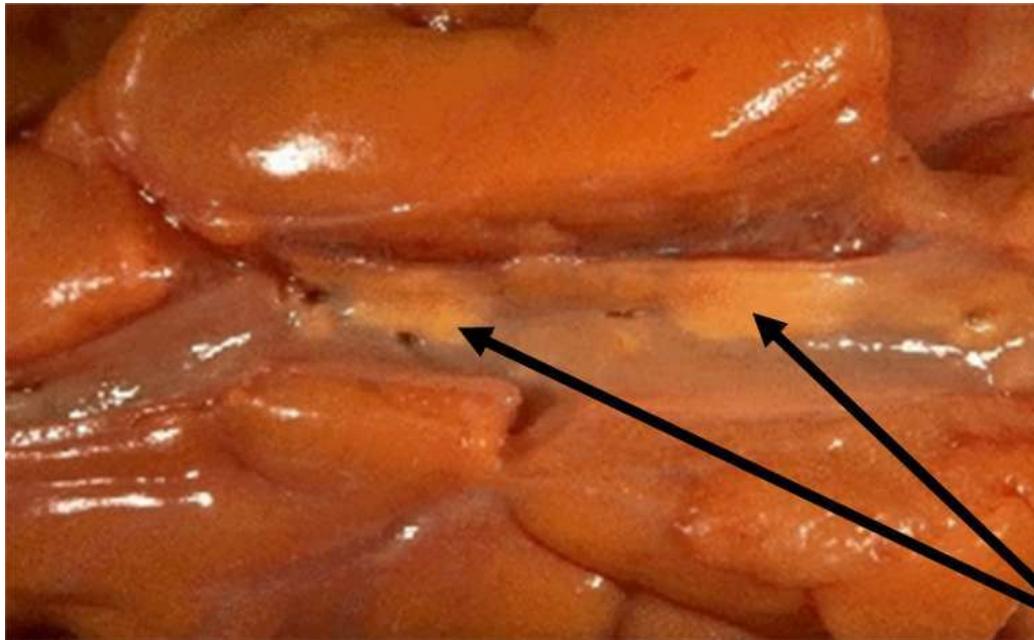


Figure 1 : Accumulation de cellules spumeuses dans les premiers stades de l'athérogénèse

Les amas sont pointés pas les flèches noires. Tirés de <http://wwwf.imperial.ac.uk/~ajm8/BioFluids/Pictures/>

Il est possible qu'avec le temps un noyau lipidique, soit une accumulation de matériaux non-cellulaires et riches en lipides, commence à se former sous certains des xanthomes situés à des sites propices. Typiquement, on observe ce type de lésions dans les artères coronaires à partir d'âges variant entre 20 et 30 ans [5]. Des macrophages infiltrent ces noyaux lipidiques, tombent en apoptose et forment un cœur nécrotique. Les plaques d'athérosclérose qui contiennent un tel cœur portent alors le nom de fibroathérome.

L'étape suivante est la formation de fibrose, ainsi qu'une calcification des plaques. En effet, les tissus connectifs des lésions athérosclérotiques sont graduellement remplacés par des tissus fibreux riches en collagènes, surtout entre les cœurs nécrotiques et le lumen de l'artère; une coque fibreuse se forme alors [6]. De plus, les macrophages en apoptose, les matrices extracellulaires et les

matériaux du cœur nécrotique forment un site propice à l'accumulation de granules de calcium microscopiques, qui peuvent s'agglomérer en dépôts de calcium. Cela cause avec le temps une calcification des plaques d'athérosclérose. On dit de ces plaques qu'elles sont fibrocalcifiques [7].

### **2.1.2 Syndromes coronariens aigus**

Tel que mentionné préalablement, la principale cause des syndromes coronariens aigus est la rupture de plaques d'athéroscléroses vulnérables. Cependant, il existe trois types de mécanismes pouvant mener à la formation de thrombus endoluminaux, c'est à dire des thrombus qui peuvent bloquer la circulation sanguine; 1- la rupture de TCFA (thin-cap fibroatheroma) ou plaques vulnérables, 2- l'érosion superficielle et 3- les nodules calcifiées

La rupture de plaques vulnérable est responsable d'entre 55 et 65% des processus thrombotiques. Tel que décrit précédemment, ces plaques vulnérables sont caractérisées par un large cœur nécrotique (plus de 25% de l'aire de la plaque, une coque fibreuse très mince (de moins de 65um d'épaisseur) et une infiltration importante de macrophages. L'instabilité de ces plaques peut aussi être causées par l'altération de forces mécaniques et tensorielles au sein de la plaque. En effet, une distribution excentrique d'un noyau lipidique peut créer une répartition inégale du stress sur la coque fibreuse, surtout sur les régions appauvries en collagène, entraînant ultimement une rupture. La rupture de la plaque est parfois spontanée, mais peut aussi être entraînée par d'autres facteurs comme le stress, l'activité physique, la colère, l'infection ou la prise de cocaïne/stimulants. Le cœur nécrotique contient des composantes hautement thrombogéniques qui déclenchent une cascade d'évènement menant ultimement à la formation d'un caillot sanguin lorsqu'en contact avec la circulation sanguine. Le facteur tissulaire VII (hémostase secondaire) mène à la formation d'un thrombus sur les parois du vaisseau, ce qui limite le flot sanguin. Une glycoprotéine sanguine nommée facteur de von Willerbrand est alors relâchée par les plaquettes sanguines activées. Ce phénomène, combiné au clivage de fibrinogène en monomères de fibrines, cause la formation d'un thrombus occlusif riche en plaquettes (blanc) ou en érythrocytes (rouge). Le facteur inhibiteur du plasminogène-1 favorise l'accumulation du thrombi dans le lumen [8].

L'érosion est la deuxième cause la plus importante de syndrome coronaire aigu, responsable de 30-35% des accidents. Le processus n'est pas parfaitement compris à ce jour. La plupart du temps, on n'observe pas d'épithélium de surface sous le thrombus à l'autopsie. De plus, la coque fibreuse est

souvent épaisse, il n'y a pas de cœur nécrotique, et on observe un remodelage négatif de la paroi du vaisseau.

Finalement, les nodules calcifiés sont une cause d'entre 2 et 7% des syndromes coronaires aigus. Les nodules créent des brèches à la surface de l'intima, ce qui cause la formation de thrombus surimposés. On retrouve ces nodules principalement chez les hommes âgés avec des artères tortueuses, chez les diabétiques ou chez les personnes atteintes d'insuffisance rénale chronique.

## 2.2 Techniques d'imageries des plaques d'athérosclérose

Plusieurs technologies permettant d'offrir une analyse qualitative et quantitative des plaques d'athérosclérose sont disponibles, autant dans le domaine clinique que dans celui de la recherche fondamentale. Dans cette section, on distingue les méthodes *in vivo* des méthodes *ex vivo*. On présente leur mode de fonctionnement, ainsi que leurs avantages et inconvénients. On présente premièrement les méthodes d'imagerie minimalement invasive par cathétérisme, soient angiographie coronarienne et l'imagerie par ultrason intra-vasculaire (IVUS). Ensuite, on décrit les méthodes employées dans notre étude sur notre système d'imagerie, soient la tomographie par cohérence optique (OCT) et la microscopie confocale. L'emphase sera mise sur les aspects de chaque technologie qui sont utiles dans le cadre de notre étude.

### 2.2.1 Angiographie

L'angiographie est une méthode d'imagerie minimalement invasive permettant de visualiser en temps réel un réseau d'artères, de veines, ou même les chambres cardiaques. L'invention de cette technique est attribuée au neurologue Portugais Egas Moniz, qui l'a utilisé pour la première fois en 1927 pour visualiser des maladies du système nerveux, comme des tumeurs. L'angiographie consiste à injecter un agent qui吸 les rayons X à l'aide d'un cathéter dans le vaisseau qu'on désire imager. Des rayons X sont ensuite envoyés à travers la région d'intérêt et sont captés par un détecteur placé de l'autre côté. Grâce à l'agent absorbant, les vaisseaux apparaissent donc comme opaques (noirs) sur l'image, et on peut donc distinguer le lumen des vaisseaux du reste des organes et des parties du corps. L'application la plus répandue de l'angiographie est l'angiographie coronarienne (ou coronarographie), qui permet de visualiser le réseau d'artères irrigant le myocarde (muscle cardiaque). Un cathéter est introduit à partir d'une artère dans l'avant-bras et est guidé à travers le réseau artériel jusqu'à l'artère coronaire majeure. On peut alors observer la taille des

artères coronaires tout le long de leur trajet. Plus précisément, on peut voir, s'il y a lieu, le rétrécissement de ces vaisseaux, caractéristique de la présence d'une plaque d'athérosclérose, qui diminue évidemment la taille du lumen.

La principale faiblesse de l'angiographie coronarienne est que bien qu'elle permette de voir avec précision le lumen des artères coronaires, elle ne permet pas d'observer l'intima, ou les plaques d'athérosclérose comme tel. Ainsi, cette méthode ne renseigne pas sur la taille des plaques. De plus, l'angiographie n'offre qu'une vue bi-dimensionnelle des vaisseaux, ce qui fait en sorte qu'on ne peut pas avoir une vue de la forme excentrique des artères. Cela fait en sorte que l'angiographie peut sous-estimer ou surévaluer la taille réelle des sténoses, dépendamment de l'angle de vision (le premier cas est plus commun). De plus, les syndromes coronaires aigus ne sont pas toujours causés par des plaques qui limitent la circulation sanguine, mais qui peuvent tout de même causer des sténoses. En effet, à cause du remodelage que les artères peuvent subir afin d'accommorder les plaques. La taille du lumen d'une artère coronaire peut donc rester identique jusqu'à ce que 40% du vaisseau soit obstrué par une plaque athéromateuse. Finalement, il est important de noter que la coronarographie n'offre aucune information sur la composition moléculaire des plaques d'athérosclérose, ni sur leur vulnérabilité.

### **2.2.2 IVUS**

L'IVUS est une autre méthode invasive qui fonctionne par cathétérisme. La première publication sur le sujet remonte à un article de 1967 par Omoto, intitulé "Intracardiac Scanning of the Heart with the Aid of Ultrasonic Intravenous Probe."<sup>[9]</sup> Un transducteur émettant des ultrasons entre 20 et 45 MHz est guidé par le cathéter jusqu'au lit vasculaire d'intérêt. On retire ensuite le transducteur lentement sur une courte distance (de l'ordre du centimètre) tout en imageant. Les ultrasons vont entrer en collision avec les parois de l'artère et seront ensuite captés par le transducteur. En connaissant la vitesse du son dans le sang, on peut savoir la distance parcourue par les ondes sonores. On peut alors obtenir une série de coupes transversales du vaisseau, permettant de voir non seulement le lumen, mais sa géométrie et ses parois. Les ondes sonores pénètrent aussi dans l'intima (jusqu'à environ 5mm), permettant de visualiser les tissus situés sous l'aventice, de même que les noyaux lipidiques situées sous les coques fibreuses, dans les stades plus avancés de l'athérosclérose. Les coefficients de réflexion sont aussi différents entre les plaques d'athérome et les parois artérielles, ce qui fait en sorte que l'IVUS permet de distinguer ces deux types de tissus,

et ainsi d'obtenir une mesure de la quantité plaque, contrairement à la coronarographie. L'IVUS permet aussi de visualiser le remodelage de la forme du vaisseau.

Puisque la résolution spatiale est proportionnelle à la longueur d'onde, et que les longueurs d'ondes des ultrasons sont beaucoup plus longues que pour la lumière visible, la résolution spatiale des images IVUS laisse parfois à désirer (de l'ordre de 100 micromètres). Quoique suffisante pour voir les plaques, cette résolution n'est pas suffisante pour détecter un épaississement de l'intima, qui est caractéristique du début de la pathologie. De plus, la résolution n'est pas suffisamment bonne pour voir les coques fibreuses très minces, qui sont un des signes principaux des plaques vulnérables [10]. Malgré que l'IVUS possède certains avantages par rapport à la coronarographie, elle n'offre toujours pas d'information sur la composition moléculaire des plaques. Il est donc intéressant de conjuguer cette technique d'imagerie à une méthode qui peut contourner ce problème, soit la fluorescence proche infrarouge (NIRF).

### 2.2.3 NIRF intravasculaire

Comme son nom l'indique, cette technique consiste à exciter un fluorophore avec une source émettant dans le proche infrarouge. Avec un cathéter, un fluorophore lié à un anticorps ou un peptide ciblant une molécule d'intérêt est envoyé dans la circulation sanguine. L'anticorps se lie alors à sa molécule cible et on peut ensuite exciter le fluorophore. À l'aide d'une fibre optique et d'une diode laser, on peut exciter le fluorophore. En retirant graduellement le cathéter, et en faisant tourner la sortie de la fibre optique, on peut obtenir une carte bi-dimensionnelle des parois de l'artère et des sources de signal, soient les plaques d'athéromes. En utilisant certains marqueurs moléculaires caractéristiques des plaques athérosclérotiques, comme des molécules d'adhésion (ICAM-1) présentes dans les lésions très jeunes, ou le collagène, présent dans les coques fibreuses, on peut non seulement obtenir de l'information sur la localisation et la composition moléculaire des plaques. On a donc ici une technique qui peut renseigner sur la vulnérabilité des plaques. De plus, l'hémoglobine absorbe moins la lumière dans le proche infrarouge (650-950nm) que dans le spectre visible. En effet, la détection de photons dans l'infrarouge peut être faites même après que ces derniers aient franchi plusieurs centimètres de tissus humains. Dans la lumière visible, le coefficient d'extinction des photons est plutôt de l'ordre du  $\text{mm}^{-1}$ . Cela est important même quand on image de petites artères coronaires, dans lesquelles la concentration d'hémoglobine est élevée

[11]. À noter que cette technique est très sensible, permettant de détecter des fluorophores jusqu'à des concentrations de l'ordre de la picomole.

## 2.2.4 OCT

L'OCT repose sur un principe presque identique à l'IVUS, mais en remplaçant des ondes sonores par des ondes lumineuses, typiquement dans l'infrarouge. La méthode se base sur les principes d'interférence lumineuse, plus précisément sur l'interférence avec une source lumineuse à faible cohérence. Un faisceau de lumière avec une courte longueur de cohérence est envoyé à travers une lame séparatrice 50/50. La moitié du faisceau est envoyé vers un bras de référence avec un miroir à son extrémité. L'autre faisceau est envoyé vers un échantillon biologique, possiblement l'épithélium d'un organe. Les deux bras ont la même longueur. Le bras d'échantillon peut être remplacé par une fibre optique, permettant d'utiliser la technique *in vivo*. En plaçant la fibre dans un cathéter rotatif, et en retirant graduellement le cathéter en imageant, on peut obtenir une carte tri-dimensionnelle, tout comme en IVUS. La lumière réfléchie par l'échantillon et par le miroir est recombinée vers un détecteur. Dépendamment de la distance traversée par la lumière à l'intérieur du tissu avant d'être réfléchie, on aura de l'interférence destructive ou constructive. On peut alors obtenir une reconstruction tri-dimensionnelle du tissu étudié. La lumière envoyée est typiquement dans l'infrarouge, ce qui fait en sorte qu'on peut obtenir des images jusqu'à quelques millimètres de profondeur. [12]

Il existe plusieurs façons de scanner le tissu biologique en profondeur. La méthode la plus ancienne s'appelle l'OCT dans le domaine temporel (TD-OCT) [13]. Cette méthode repose sur l'emploi d'une lumière à large spectre et d'un miroir de référence qui se déplace rapidement. On peut ainsi obtenir une fonction du signal en fonction de la profondeur (typiquement le long de l'axe des z par convention) dans l'échantillon, portant le nom de *A-line*. Une image peut être obtenue en scannant une série successive de *A-lines*, ce qui porte le nom de *B-line*. En scannant, dans une 3<sup>e</sup> direction, on obtient un scan en trois dimensions (C-scan) [14]. Cependant, la nécessité de déplacer le miroir de référence rend le processus assez lent (environ 400 *A-lines*/s) [13]. En utilisant une source à large spectre, il est possible d'obtenir une *A-line* en une seule acquisition. On peut capter le signal d'interférence soit à l'aide d'un spectromètre (OCT dans le domaine spectral, ou SD-OCT pour *spectral domain OCT*) ou en balayant le spectre de fréquence successivement (SS-OCT, pour *swept-source OCT*). On peut alors obtenir un *A-line* en faisant la transformée de Fourier du signal

dans le domaine fréquentiel. De plus, ces techniques ont typiquement un rapport signal à bruit supérieur aux TD-OCT, car le réflecteur du bras de référence est parfait (ne se déplace pas).

La résolution axiale de l'OCT est caractérisée par sa longueur de cohérence. On suppose une distribution fréquentielle Gaussienne de la source lumineuse, représenté pa

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

Avec  $\omega$  la fréquence angulaire,  $\omega_0$  la fréquence angulaire centrale et  $\sigma$  l'écart type. On peut alors prouver que le temps de cohérence  $\tau_c$  de la source est alors donné par

$$\tau_c = \frac{2\sqrt{2\ln 2}}{\sigma} \quad (2)$$

On définit la longueur de cohérence  $l_c$  comme la distance parcourue par la lumière pendant le temps de cohérence, donc  $l_c = c \tau_c$ , avec  $c$  la vitesse de la lumière *in vacuo*. Pour les deux types d'OCT, la résolution axiale est inversement proportionnelle à la largeur de bande du laser, et donc proportionnelle à la longueur de cohérence. On peut prouver que cette résolution est donnée par

$$\delta z = \frac{2\ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{n\Delta\lambda} \quad (3)$$

Avec  $\lambda_0$  est la longueur d'onde centrale,  $n$  est l'indice de réfraction dans le médium imagé et  $\Delta\lambda$  est la largeur à mi-hauteur de la fonction de distribution des longueurs d'ondes. Par exemple, en supposant  $\lambda_0 = 800\text{nm}$ ,  $\Delta\lambda = 80\text{nm}$  et  $n = 1.4$ , on trouve une résolution d'environ 2.5 micromètres. On voit que la résolution est donc vastement supérieure à celle de l'IVUS.

Afin de calculer une expression du signal OCT produit, il est plus simple de travailler en termes de nombre d'ondes  $k$ . La longueur de cohérence s'exprime alors comme

$$l_c = \frac{2\sqrt{\ln(2)}}{\Delta k} \quad (4)$$

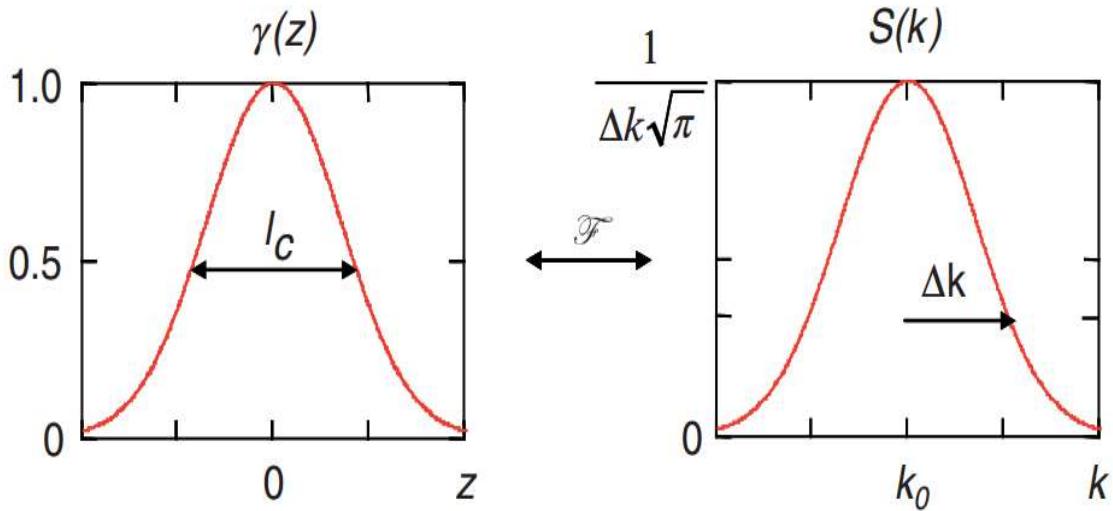


Figure 2: Lien entre les fonctions de corrélation et la fonction de spectre.

Tiré de Optical Coherence Tomography : Technology and applications, James G Fujimoto, 2008

avec  $\Delta k$  la largeur à mi-hauteur de la distribution des nombres d'ondes. La fonction de cohérence dans l'espace  $\gamma(z)$  et la fonction de spectre en fonction du nombre d'onde  $S(k)$  sont liés par une transformée de Fourier, comme le montre la figure 1.

Considérons un champ électrique incident provenant de la source laser exprimé par

$$E_i = s(k, \omega) e^{i(kz - \omega t)} \quad (5)$$

où  $s(k, \omega)$  est l'amplitude du champ en fonction du nombre d'onde et de la fréquence angulaire, tel que

$$S(k) = |s(k, \omega)|^2 \quad (6)$$

Cette onde traverse la lame séparatrice et est réfléchie par le miroir et l'échantillon avec des amplitudes de

$$E_R = \frac{E_i}{\sqrt{2}} r_R e^{2ikz_R} \quad (7a)$$

$$E_R = \frac{E_i}{\sqrt{2}} r_R e^{2ikz_R} \quad (7b)$$

où  $r_R$  est la réflectivité du miroir et  $z_R$  est la distance entre le miroir et la lame séparatrice. Dans l'équation du bras d'échantillon,  $r_S(z_s)$  est la réflectivité en fonction de la profondeur dans l'échantillon et l'opérateur  $\otimes$  indique la convolution. La puissance réfléchie par les deux extrémités des bras sont données par l'amplitude au carré des réflectivités. Il est souvent utile de définir les coefficients de réflexions comme

$$R = |r|^2 \quad (8)$$

Typiquement, les coefficients de réflexion des éléments au sein d'un échantillon sont très petits (de l'ordre de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), par rapport à celui du miroir qui est près de 1. Il est généralement adéquat de supposer que les éléments réfléchissants dans le tissu étudié est une suite de réflecteurs ponctuels pouvant être représentés par des fonctions de Dirac. On peut alors représenter  $r_S(z_s)$  comme

$$r_S(z_s) = \sum_{n=1}^N r_{S_n} \delta(z_s - z_{S_n}) \quad (9)$$

où les  $z_{S_n}$  représentent les distances des différents réfléchisseurs et les  $r_{S_n}$  sont les réflectivités associées. L'intensité du courant  $i_D$  généré au photodétecteur est donnée par

$$i_D = \rho |E_R + E_S|^2 \quad (10)$$

où  $\rho$  est la responsivité du détecteur. En calculant ce résultat, et en considérant que la moitié de l'intensité de chaque faisceau est encore diminué de moitié au retour en passant dans la lame séparatrice, on trouve en remplaçant 7a et 7b dans 10

$$\begin{aligned}
 I_D(k) &= \frac{\rho}{4} [S(k)(R_R + R_I + R_2 + \dots)] \\
 &+ \frac{\rho}{4} S(k) \left( \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} \left( e^{2ik(z_R - z_{Sn})} + e^{-2ik(z_R - z_{Sn})} \right) \right) \\
 &+ \frac{\rho}{4} S(k) \left( \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{Sn} R_{Sm}} \left( e^{2ik(z_{Sn} - z_{Sm})} + e^{-2ik(z_{Sn} - z_{Sm})} \right) \right)
 \end{aligned} \tag{11}$$

On réalise que l'équation se simplifie avec les lois trigonométriques

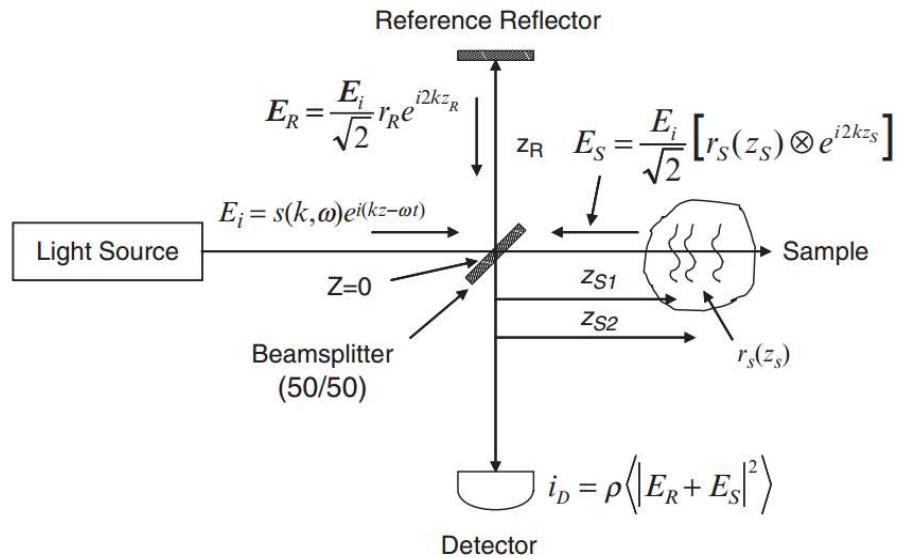


Figure 3: Schéma d'un OCT simplifié montrant les différents champs électriques.

Tiré de Optical Coherence Tomography : Technology and applications, James G Fujimoto, 2008

$$\begin{aligned}
I_D(k) = & \frac{\rho}{4} [S(k)(R_R + R_I + R_2 + \dots)] \\
& + \frac{\rho}{4} S(k) \left( \sum_{n=1}^N \sqrt{R_R R_{Sn}} \cos(2k(z_R - z_{Sn})) \right) \\
& + \frac{\rho}{4} S(k) \left( \sum_{n \neq m=1}^N \sqrt{R_{Sn} R_{Sm}} \cos(2k(z_R - z_{Sn})) \right)
\end{aligned} \tag{12}$$

On remarque en regardant l'équation 12 que le signal est caractérisé par 3 termes. Le premier terme est simplement proportionnel à l'intensité de la réflexion du miroir et du tissu. Le terme est constant temporellement et représente donc un courant direct (DC) dans le détecteur. Il s'agit du plus gros terme et donc de la plus grande partie du signal. Le second terme est celui qui intéresse l'expérimentateur. Il s'agit de l'interférence lié à la différence de parcours du faisceau lumineux dans chaque bras. On appelle souvent ce terme "composante de corrélation croisée". Puisque ce terme est proportionnel à la racine carrée des coefficients de réflexion, le terme est généralement plus petit que le terme en DC. Le troisième terme, appelé autocorrélation, est lié à l'interférence entre les différents réflecteurs au sein de l'échantillon. Il est la cause d'artéfacts dans le signal OCT. Cependant, puisque qu'il est proportionnel au produit des racines carrés de deux coefficients de réflexion d'éléments dans l'échantillon, il est généralement beaucoup plus petit que les deux premiers termes et peut souvent être négligé.

L'OCT a été développé en 1990 par deux groupes indépendants de chercheurs, soient celui de Naohiro Tanno de l'université Yamagata au Japon et celui de James G. Fujimoto du MIT. Les premiers usages de l'OCT étaient dans le domaine de l'ophtalmologie, premièrement de manière *in vitro* en 1991, puis dans un contexte clinique en 1996 [15]. On l'utilisait principalement pour imager le segment antérieur des yeux, ainsi que les maladies de la rétine, comme les détachements ou les trous maculaires [16]. On pouvait aussi l'utiliser pour voir les couches de fibres nerveuses de la rétine [17]. Aujourd'hui, l'OCT n'est plus exclusivement utilisé en ophtalmologie. On l'utilise aussi dans le domaine de la dermatologie, particulièrement dans le diagnostic de tumeurs ou dans l'étude des effets de coups de Soleil [18]. L'OCT est aussi beaucoup utilisé dans l'étude du cerveau. Par exemple, en neurochirurgie, on peut imager des tumeurs cérébrales en comparant les coefficients de réflexion entre les tissus corticaux et les tissus tumoraux [19].

Dans le domaine de la cardiologie, la technique possède de nombreux avantages. Par exemple, en raison de son excellente résolution spatiale, l'OCT permet de distinguer l'intima du media et de l'adventia dans les artères, contrairement à l'IVUS [20]. L'OCT peut aussi distinguer la plaque fibreuse de la plaque calcifiée et de la plaque riche en lipide. De plus, la sensibilité à la biréfringence des tissus permet d'identifier les tissus fibreux, le collagène et les lipides [21]. L'excellente résolution de l'OCT permet aussi d'identifier les coques fibreuses très minces de certaines plaques athérosclérotiques (moins de 100 microns), qui sont caractéristiques des plaques vulnérables. L'OCT est donc une technique qui peut potentiellement offrir plus d'information sur les plaques athérosclérotiques que l'IVUS. Cependant, les ondes infrarouges sont beaucoup plus absorbées que les ondes ultrasons. Cela fait en sorte qu'il est nécessaire d'envoyer de l'eau dans le vaisseau ("flush") avant d'imager en OCT, sinon toute la lumière sera absorbée avant même de se rendre aux parois du vaisseau.

À noter que l'OCT n'est pas exclusivement utilisé *in vivo*. On peut en effet placer un microscope dans le bras d'échantillon au lieu d'une fibre optique et imager de minces tranches d'un organe.

### 2.2.5 Microscopie confocale

La microscopie confocale utilise un microscope avec un sténopé placé devant le détecteur afin d'imager un seul point ou un seul plan focal dans un échantillon épais. Cette technique permet de seulement collecter la lumière collimée, provenant du plan focal. Il existe deux configurations de microscopes confocaux; on peut placer la source lumineuse et le détecteur de chaque côté de l'échantillon (en transmission) ou on peut placer la source et le détecteur du même côté (en réflexion, aussi appelé configuration epi). En configuration epi, la lumière réfléchie repasse par l'objectif et une lame séparatrice est utilisée pour diriger cette lumière vers le détecteur. L'invention de la microscopie confocale remonte à 1957, par Marvin Minsky. Cependant, la technique a été oubliée pendant longtemps, car les sources lumineuses n'étaient pas assez puissantes et les détecteurs pas assez sensibles. Il faut attendre jusqu'à 1985 pour voir le premier microscope confocal avec balayage laser, développé par William Bradshaw Amos et John Graham White de l'université Cambridge [22].

Le principe est de placer le sténopé au focus d'une lentille convergente. Si la lumière est collimée (focus à l'infini) à son entrée dans la lentille, elle passera à travers le sténopé et se rendra au détecteur. Si on place un télescope avant l'objectif, la seule lumière qui sera collimée sera celle qui

provient du plan focal de l'objectif. Les photons balistiques hors-focus sont rejetés par le sténopé. On obtient donc une façon simple d'imager un unique plan focal très mince, sans trancher l'échantillon étudié. Plus le sténopé est petit, plus la résolution axiale et latérale sera bonne. Le sténopé permet en effet de se débarrasser des lobes secondaires de la fonction d'étalement (PSF) du système optique. La résolution est limitée par la dispersion et l'absorption dans les tissus, la limite de diffraction du montage optique et le rapport signal sur bruit (SNR). En raison de l'extinction en fonction de la profondeur, qui suit typiquement une loi de Beer-Lambert, la profondeur maximale où le signal est encore suffisant pour imager est typiquement de l'ordre de la centaine de micromètres, à des résolutions spatiales de l'ordre du micron. Il faut donc avoir recours à une chirurgie pour tout type d'acquisition d'image *in vivo*. Afin d'obtenir une image, des miroirs placés sur des galvanomètres sont utilisés afin de balayer dans l'axe des X et l'axe des Y. En appliquant un courant alternatif sur les galvanomètres, on peut faire bouger les miroirs et balayer rapidement sur un axe (axe rapide) et lentement dans l'axe perpendiculaire (axe lent). En déplaçant l'échantillon en Z, on peut changer la position du focus et ainsi obtenir une représentation tridimensionnelle du tissu étudié.

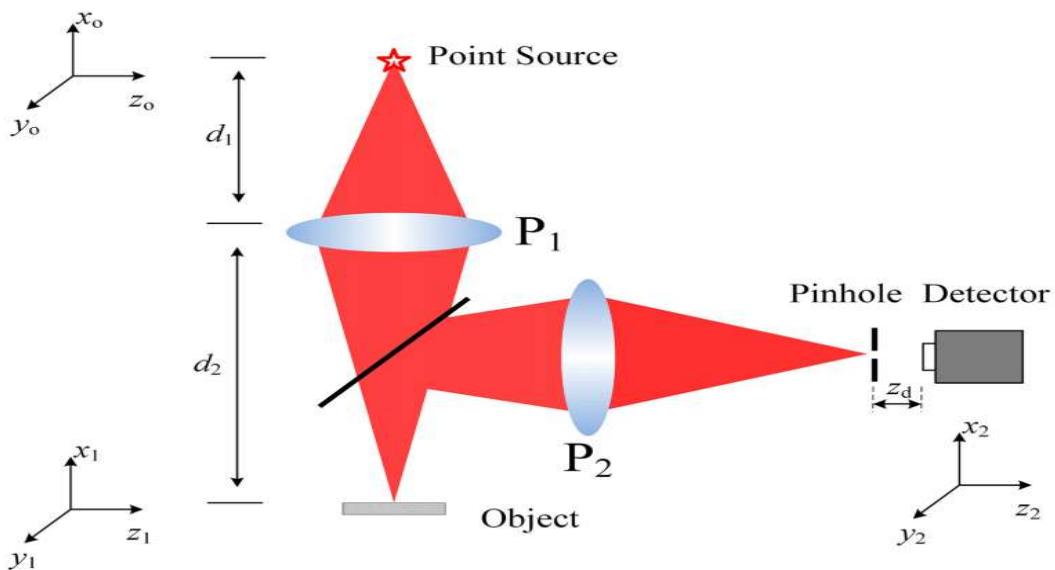


Figure 4: Diagramme de microscope confocal en configuration EPI.

Les valeurs de  $d_1$  et  $d_2$  représentent les distances entre la source lumineuse et la première lentille et entre la première lentille et l'objet imagé respectivement. Les trois systèmes d'axes sont utilisés pour décrire la propagation lumineuse provenant de la source  $(x_0, y_0, z_0)$ , après la première lentille  $(x_1, y_1, z_1)$  et après la deuxième lentille  $(x_2, y_2, z_2)$ . Tiré de Confocal Microscopy par Jian Liu et Jiubin Tan (2016).

La figure 4 compare la PSF obtenue en microscopie conventionnelle à celle obtenue en microscopie confocale.

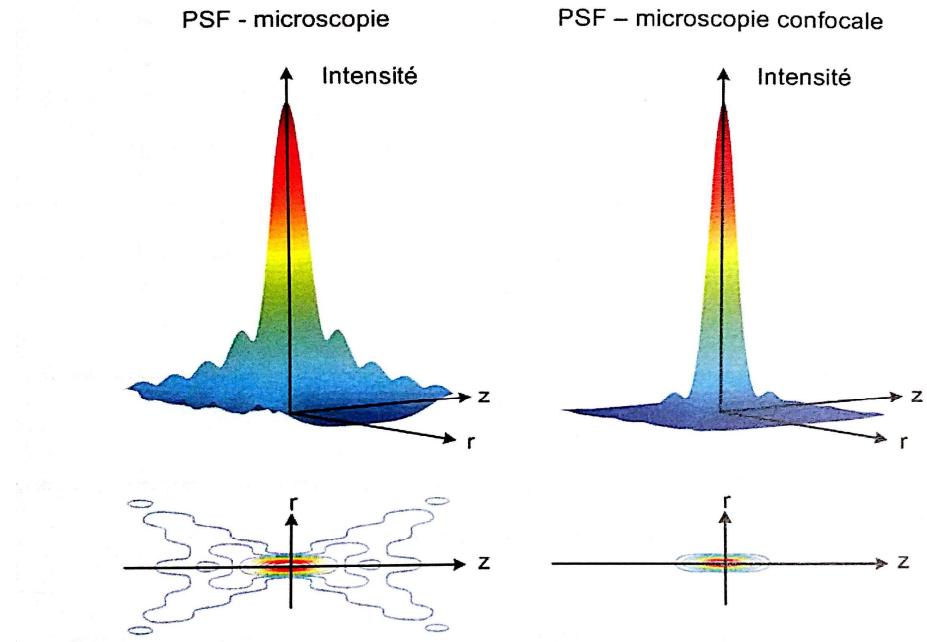


Figure 5: Comparaison entre la PSF en microscopie conventionnelle et en confocal.

On voit que les lobes secondaires de PSF disparaissent considérablement grâce au sténopé. Tiré de Fundamentals of biomedical optics, Caroline Boudoux, 2017.

On peut employer un agent de contraste fluorescent afin d'augmenter le signal de certains tissus. En configuration EPI, il faut alors remplacer la lame séparatrice par un dichroïque, qui est transparent pour une certaine plage de longueurs d'ondes et réfléchissant pour une autre plage passé un certain seuil.

La microscopie confocale est utilisée dans un bon nombre de domaines liés aux sciences de la santé. En dermatologie, on peut l'utiliser afin de détecter des tumeurs malignes des sections histologiques, par exemple [23]. En neurologie, on a utilisé la microscopie confocale conjugué à un système d'histologie automatique afin d'imager un cerveau entier. (Kleinfeld et al., 2011) En cardiologie, il a été démontré que la microscopie confocale peut être utilisée *in vivo* afin de détecter l'activité de macrophages dans les plaques athérosclérotiques [24].

## CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE : ÉTUDE CHEZ LE LAPIN

### 3.1 Montage expérimental

Cette section décrit les montages expérimentaux utilisés. On y décrit le cathéter multimode utilisé *in vivo* afin de d'imager les plaques d'athérosclérose dans les aortes de lapins malades. On décrit ensuite le montage expérimental *ex vivo*, c'est-à-dire le microscope OCT/confocal, ainsi que le vibratome lié aux moteurs de précision micrométriques dans les 3 directions. On explique ensuite le protocole suivi, étape par étape, de la diète servie aux lapins jusqu'aux tranches analysées en histologie. Finalement, on décrit les algorithmes utilisés afin de reconstruire les vaisseaux sanguins.

#### 3.1.1 Cathéter multimode

Le cathéter multimode utilisé est celui décrit dans l'article de Abran, M. 2015 (Biomed Opt. Express). Il est conçu pour pouvoir acquérir simultanément des images IVUS et NIRF. Le transducteur utilisé pour l'IVUS et son câble coaxial provenaient d'un cathéter commercial de 45 MHz (Revolution, Volcano Therapeutics, Rancho Cordova, CA, USA). Le transducteur était collé à une fibre optique de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre. Le tout avait un diamètre de 1.1mm, qui pouvait être placé dans un cathéter de 1.4 mm. Un miroir de 500  $\mu\text{m}$  à angle droit avec une hypoténuse d'aluminium était utilisé pour une illumination *side-fire*, c'est à dire en perpendiculairement au sens de la fibre. Un moteur rotatif (MicroMo, Clearwater, FL, USA) était utilisé pour faire tourner la fibre et le transducteur, à une vitesse de 30 tours/minutes. Il était possible de prendre 256 acquisitions à chaque révolution du cathéter. Avec un moteur linéaire (Zaber Technologies, Vancouver, BC, Canada), on peut imager tout en retirant le cathéter et ainsi obtenir des images IVUS 3D (et 2D en NIRF). Un joint rotatif était utilisé afin de connecter les parties fixes aux parties rotatives de la fibre optique. Un collecteur tournant était utilisé pour transmettre et recevoir le signal électrique.

Pour ce qui est de la fluorescence, une diode laser de 780 nm de longueur d'onde était utilisée pour exciter le fluorophore. Des filtres d'excitation de  $769 \pm 20$  nm et d'émission de  $832 \pm 19$  nm étaient utilisés, séparés par un dichroïque de 801 nm de longueur d'onde limite. L'intensité du signal fluorescent était mesurée par un tube photomultiplicateur (PMT, Hamamatsu Photonics,

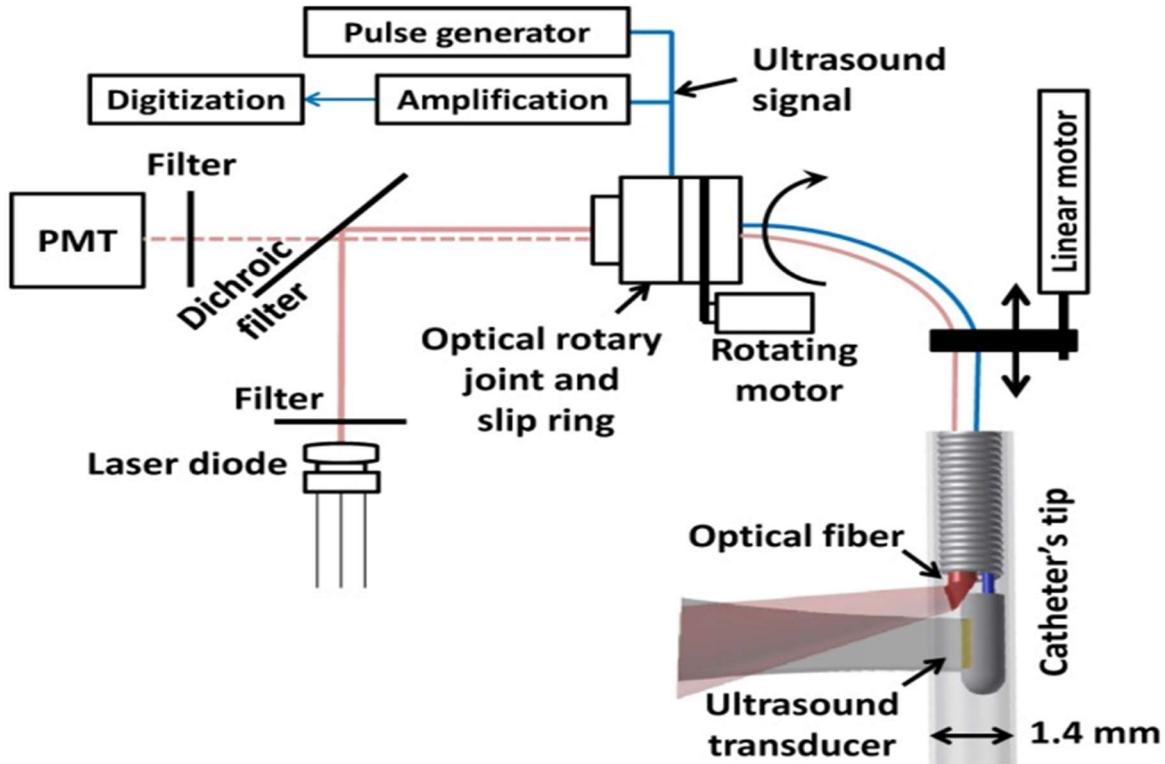


Figure 6: Schéma du cathéter multimode et des dispositifs utilisés.

Hamamatsu City, Japan). Les fluorophores utilisés étaient la teinture infrarouge 800-CW (IRDye 800CW) ou l'*indocyanine green* (ICG), mais les filtres et le dichroïque sont amovibles et peuvent être remplacés au besoin si un fluorophore différent est utilisé. Un algorithme de compensation était utilisé afin d'ajuster le signal de fluorescence en fonction de l'atténuation du sang.

Une interface conçue sur mesure sur MATLAB (The MathWorks, Inc, Natick, MA) était utilisée afin d'acquérir, reconstruire et afficher les données. La connexion à l'ordinateur était faite par une simple entrée USB, à un débit maximal de 250 Mb/s.

### 3.1.2 Microscope multimode

Le montage expérimental *ex vivo* utilisé est inspiré de l'article de Wang, H. (NeuroImage, 2014). Il est constitué de deux composantes principales: la partie optique du montage, soient les microscopes OCT et confocal, et la partie du vibratome, servant à faire le tranchage sériel.

Le montage est présenté sur la figure 7. Le microscope OCT utilisait une source laser swept-source (L-SS1310) avec une longueur d'onde centrale de 1310nm avec une largeur de bande de 100nm (Axsun technologies, Boston, Mass). Le faisceau était couplé à une fibre optique monomode, qui

se séparait en deux pour aller vers les bras d'échantillons et de référence. Dans le bras de référence, la lumière était dirigée vers un miroir dichroïque avec une longueur d'onde de coupure de 875nm orienté à 45 degrés (MD-875). La lumière était ensuite dirigée vers des miroirs montés sur des galvanomètres (MG) qui permettent de balayer un champ de vision. Le faisceau passait dans un télescope fait d'une lentille L1 et L2 avec des distances focales de 35 et 100 mm respectivement. Cela permettait d'ajuster la taille du faisceau afin que la pupille de l'objectif (O1) soit bien remplie. L'échantillon était monté sur des moteurs micrométriques (MM-XYZ) pouvant se déplacer dans les trois dimensions. Cela permettait de placer avec précision la région de l'artère souhaitée dans le FOV, ainsi que de déplacer l'échantillon pour le trancher. Un moteur rotatif DC et une lame de rasoir étaient utilisés à cet effet. Le miroir de référence (MR) était monté sur un stage micrométrique (SM) permettant d'ajuster précisément la longueur du bras de référence. Les faisceaux réfléchis par les deux bras étaient ensuite renvoyés vers leur fibre optique respective et dirigés vers des photodéTECTeurs (Thorlabs, Newton, NJ). Les deux signaux étaient alors soustraits et le signal résultant était transmis vers l'ordinateur à l'aide d'une carte d'acquisition analogue vers digital (ATS-9350, AlazarTech, Montréal).

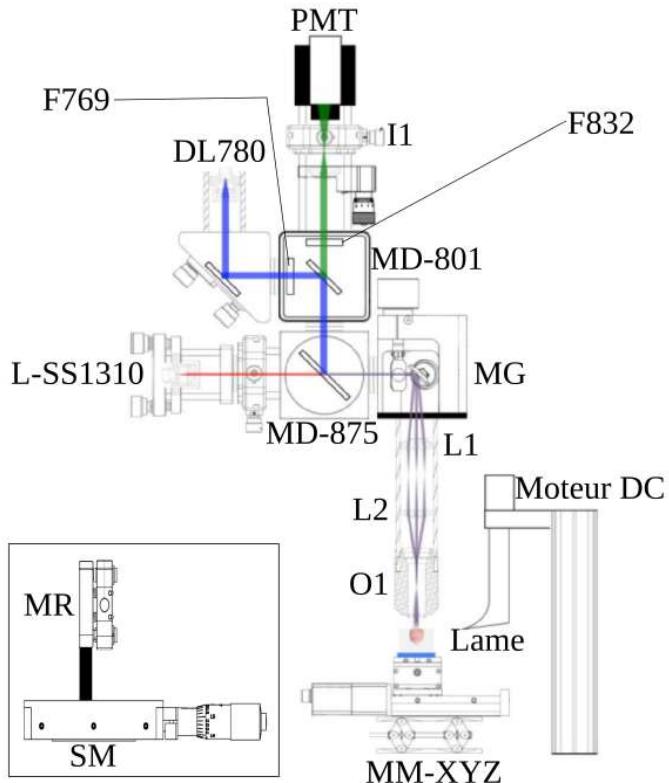


Figure 7 Microscope double modalité

Initialement tiré de l'article de Castonguay, 2015. L'encadré montre les composantes du bras de référence

Le microscope confocal utilisait une diode (DL780), des filtres (F769 et F832) et un dichroïque (MD-801) identiques à ceux utilisés dans le montage expérimental *in vivo* pour le NIRF. La lumière passait ensuite par le dichroïque MD-875, le télescope et l'objectif O1 de l'OCT. La lumière réfléchie et filtrée passait ensuite par une lentille convergente. Puisque l'objectif 3X ne permettait pas d'obtenir assez de puissance, il n'était pas possible d'avoir un rapport signal sur bruit satisfaisant avec un sténopé de petite taille, on avait recours à un iris de taille ajustable (I1) pour faire le sectionnage optique. Un tube photomultiplicateur (PMT) était utilisé pour acquérir le signal fluorescent. L'objectif était conçu pour être utilisé dans l'air, et puisque les échantillons étaient submergés dans l'eau lorsqu'il était utilisé, une chambre à air entourait l'objectif. La chambre était faite d'une lamelle à l'extrémité inférieure et de tubes à cages optiques sur les côtés.

Toutes les pièces du vibratome, à part les moteurs, ont été conçus sur mesure à l'École Polytechnique. Un moteur rotatif (Faulhaber, Schönaich, Allemagne) était attaché à un arbre avec une extrémité désaxé de 0.8mm (A). Ce dernier était lié au vibratome par une pièce de plastique (B). Lorsque le moteur tournait (60 Hz), la partie flexible de la pièce principale du vibratome (C) induisait un mouvement latéral sur la pièce tenant la lame de rasoir (E) et (F). La lame était tenue

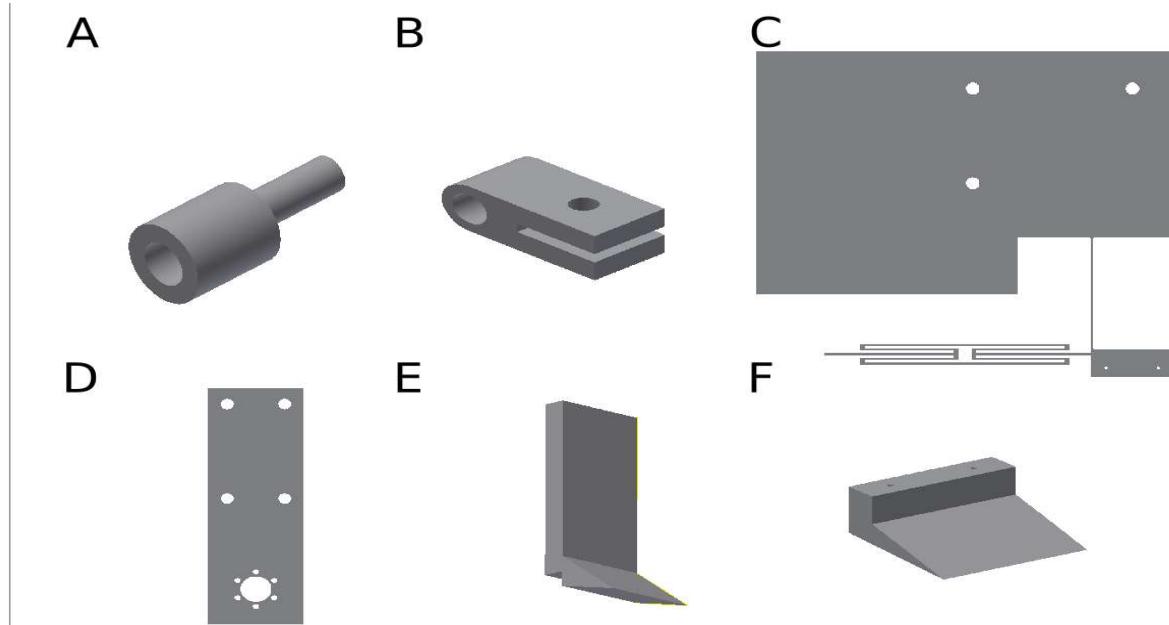


Figure 8: Composantes principales du vibratome.

(A) Arbre désaxé de 0.8mm. (B) Pièce de plastique attachant l'arbre à la (C) pièce principale du vibratome (D) pièce attachant le moteur rotatif à (C). (E) et (F)Pièce retenant la lame de rasoir au montage

à un angle de 11 degrés vers le bas. Le moteur rotatif était fixé à la pièce principale du vibratome par une autre pièce confectionnée sur mesure (D). Lorsque que le moteur rotatif est activé, la lame effectue un mouvement latéral, permettant de trancher un échantillon lorsqu'un échantillon était approché par l'entreprise de moteurs latéraux (Zaber, Vancouver, Canada) avec une précision micrométrique. Un moteur vertical (Thorlabs, Newton, NJ) permettait d'ajuster la hauteur de l'échantillon imagé avec précision. Le vibratome, les moteurs et tous les éléments liés à l'acquisition étaient contrôlés par une interface conçue sur mesure sur MATLAB. Des algorithmes étaient implémentés dans l'interface afin de permettre que toute l'acquisition des vaisseaux se fassent automatiquement.

## 3.2 Protocole expérimental

Le protocole comportait trois étapes principales, 1- La prise de données in vivo avec le cathéter multimode et l'extraction des lits vasculaires, 2- L'acquisition des volumes OCT/Confocal après 3- La reconstruction des données (histologie massive 3D). La section suivante présente les trois étapes en détail.

### 3.2.1 Acquisition de données in vivo

Six lapins (*New Zealand White*), ont été nourris avec une diète de 0.5% de cholestérol pendant 14 semaines. 5 des lapins ont subi des blessures par ballons à la semaine zéro (modèle 1), alors qu'un des lapins a seulement été sujet à la diète (modèle 2). Un des lapins n'a pas pu compléter l'étude à la suite de complications neurologiques causées par la dénudation d'une artère par ballon. Les animaux étaient mis sous anesthésie générale (kétamine, 35 mg/kg et buprénorphine, 10 mg/kg). Des blessures étaient induites à l'aide d'un ballon introduit par l'entremise d'un cathéter d'introduction radial (Cordis Corporation, Fremont, CA), introduit par l'artère carotide droite. Un cathéter avec un ballon de 4mm Boston Scientific, Marlborough, MA) était amené à la bifurcation

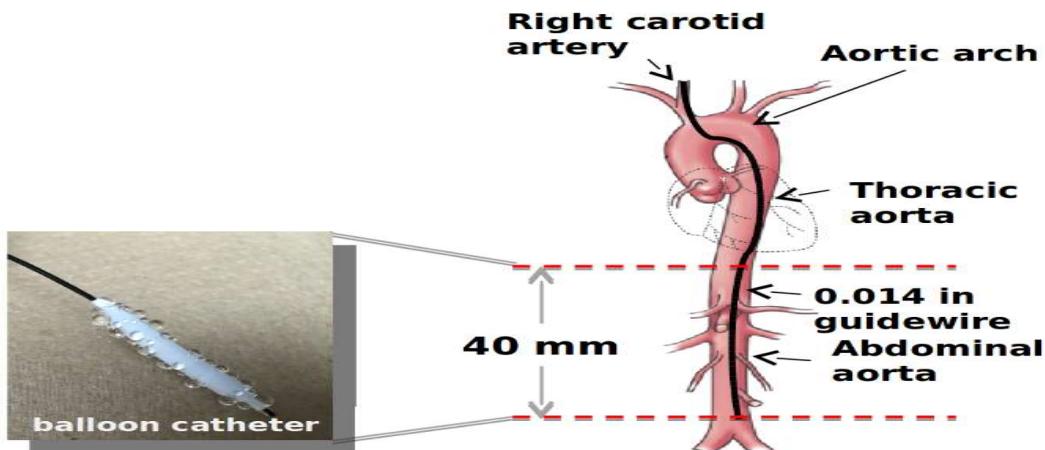


Figure 9: Schéma montrant le chemin suivi par le cathéter, ainsi que le cathéter utilisé.

iliaque, gonflé à 8 atmosphères et retiré 3 fois sur une distance de 40mm, dans la direction distale de l'aorte abdominale.

Les blessures causées par le ballon induisaient de l'inflammation dans l'aorte. Le ballon était ensuite retiré et une sonde fluorescente était injecté au site de blessure. Les sondes étaient constituées d'un fluorophore (ICG pour le modèle 2 et IRDye 800CW pour le modèle 1) lié à un

anticorps anti-ICAM-1 ou anti-collagène. Ces molécules sont typiquement retrouvées dans les sites contenant de l'inflammation ou dans les plaques d'athéroscléroses, et étaient donc pour nous un bon contrôle afin de tester l'efficacité du dispositif. Sur le lapin 1 et 4 du modèle 1, les sondes ICAM-1 et collagène ont toutes deux été injectées, mais sur des parties différentes de l'aorte. Le cathéter double modalités était inséré 40 minutes après l'injection. Cela permettait de s'assurer que le fluorophore restant dans l'aorte était celui qui s'était lié aux molécules ciblées, car tout ce qui ne s'attachait pas à la paroi serait dilué dans la circulation sanguine. Cela réduisait les risques d'obtenir un signal non-spécifique. Les *pullbacks* étaient ensuite effectués. Le cathéter rotatif était retiré à une vitesse de 0.5mm/s avec une vitesse de rotation de 10 rotations/s sur des distances de 50mm (modèle 1) et 100mm (modèle 2). Pendant ces *pullbacks*, les données IVUS et NIRF étaient acquises simultanément en sauvegardées sur un ordinateur portable.

Les animaux étaient ensuite sacrifiés par exsanguination et les aortes abdominales etiliaques étaient retirées afin d'être imagées avec le microscope à double modalités. Les aortes étaient conservées dans une solution de 4% de formaldéhyde et conservées à 4 degrés Celsius.

### 3.2.2 Acquisition de données ex vivo

Avant de passer les échantillons au tranchage, ils étaient imaginés avec un microscope sensible à la fluorescence (IVIS Lumina XRMS, Perkin Elmer, Mass, USA). Cela permettait d'obtenir une localisation à plus basse résolution spatiale des sources intenses de signal avant de détruire l'échantillon au tranchage. On pouvait aussi comparer les images acquises au Lumina avec les données des *pullbacks*.

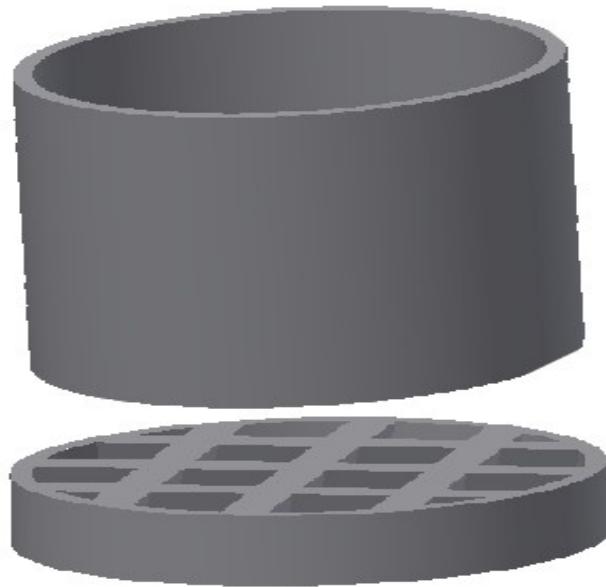


Figure 10: Moule de plastique employé pour fixer l'artère dans le gel d'agarose.

À la première étape était de s'assurer de retirer les tissus conjonctifs placés autour des artères. Cette étape était très importante, car ce tissu pouvait flotter au-dessus de l'échantillon et bloquer la lumière, empêchant ainsi d'imager l'échantillon adéquatement. Les artères devaient être placés à la verticale dans un gel d'agarose de 4% m/v à l'aide de moules de plastique cylindriques confectionnés sur mesure et imprimés avec une imprimante 3D. Afin de rendre le tranchage plus facile, il était aussi utile d'injecter de l'agarose dans le lumen du vaisseau à l'aide d'une seringue.

La plupart des artères étaient plus longues que la hauteur du moule (3 cm). Il était donc nécessaire de couper les vaisseaux et de les imager en plusieurs acquisitions. La hauteur des moules étaient contraintes par la hauteur du bassin dans lequel l'échantillon était placé. En effet, les parois supérieures ne pouvaient monter de plus de 3cm, car à ce point elles touchaient le vibratome et ne pouvait monter davantage.

Pour les lapins du modèle 1, un objectif de 3X à air était utilisé, alors qu'un de 10X à immersion dans l'eau était utilisé pour le modèle 2, procurant une meilleure résolution latérale. Afin de s'assurer que l'échantillon était placé au focus de l'objectif, un algorithme de détection de surface était utilisé. L'interface entre l'eau et l'échantillon correspond à la position où le gradient d'un A-line est maximisé. Afin de minimiser les effets négatifs provenant de la déformation des tissus par

le tranchage, le focus était placé à une distance de 50um sous l'interface. Le champ de vision était de 2.5mm x 2.5mm avec l'objectif 3X, et de 1mm X 1mm avec le 10X. L'acquisition était faite sur 800um en profondeur dans le cas des images OCT. Puisque le diamètre des artères était plus grand que le champ de vision, il fallait créer une mosaïque afin d'imager une tranche entière. Les moteurs Zaber en X et Y permettaient de déplacer la partie de l'artère imagée. Un recouvrement de 20% de la largeur du champ de vision était conservé entre 2 tranches voisines afin de permettre d'obtenir un bon recalage lors de la reconstruction. Pour un même champ de vision, le volume OCT et l'image confocale pouvaient être acquises simultanément. Une fois la tranche entière imagée, les 200um du dessus étaient enlevés à l'aide du trancheur, le moteur montait l'échantillon de 200um et le processus était répété automatiquement, jusqu'à ce que le vaisseau sanguin entier soit imaginé. Les tranches tombaient dans un réceptacle placé au fond du bassin, ce qui permettait de les récupérer et de les analyser en histologie conventionnelle.

### 3.2.3 Reconstruction par ordinateur

Une fois les données acquises, des algorithmes écrits en Python développés par notre équipe étaient utilisés afin de reconstruire les volumes entiers. En effet, puisqu'il fallait plusieurs volumes pour couvrir le FOV entier contenant l'aorte, il fallait déterminer le cadre de référence des positions des mosaïques et ensuite recoller les volumes (ou les images pour les données en fluorescence). On pouvait ensuite traiter les images afin d'améliorer les contrastes et pour corriger certains effets optiques. Finalement, on pouvait recoller les tranches OCT et obtenir une vue tridimensionnelle du vaisseau entier.

La première étape consistait à rendre isotropes les voxels des volumes OCT. La résolution était ramenée à des pixels isotropes de 6.5um de côtés, correspondant à la résolution axiale de l'OCT. L'étape suivante était de créer un modèle de déplacement des moteurs Zaber afin de trouver la position réelle des mosaïques. En effet, les moteurs n'étaient pas nécessairement parfaitement alignés avec les axes de balayage des galvanomètres, donc il était nécessaire de déterminer les angles de rotation entre les deux référentiels. Cela était fait en appliquant une méthode de corrélation de phase. La méthode consiste à calculer la transformée de Fourier inverse de la matrice de corrélation de phase entre 2 volumes voisins. Supposons que nous avons deux volumes voisins  $A(x,y,z)$  et  $B(x,y,z)$ , et soient leur transformée de Fourier dans l'espace de phase  $A(k,l,m)$  et  $B(k,l,m)$ . La matrice de corrélation de phases de ces deux volumes,  $Q(k,l,m)$ , est donnée par

$$Q(k,l,m) = \frac{B(k,l,m) \cdot A^*(k,l,m)}{|B(k,l,m) \cdot A^*(k,l,m)|} \quad (13)$$

Les  $*$  dénotent les conjugués complexes des matrices. En raison des propriétés de la transformée de Fourier, une différence de phase dans l'espace de Fourier correspond à une translation dans l'autre espace. La transformée de Fourier inverse de  $Q(k,l,m)$  donne alors  $Q(x,y,z)$  et sa valeur maximale donne le décalage entre les deux volumes. La transformée de Fourier inverse est données par

$$Q(x,y,z) = \sum_{k=0}^{N_k-1} \sum_{l=0}^{N_l-1} \sum_{m=0}^{N_m-1} Q(k,l,m) \cdot e^{2\pi i \left( \frac{xk}{N_k} + \frac{yl}{N_l} + \frac{zm}{N_m} \right)} \quad (14)$$

Où  $N_k$ ,  $N_l$  et  $N_m$  sont les nombres de voxels selon les dimensions  $k$ ,  $l$  et  $m$  respectivement, et  $i$  est l'unité imaginaire. Le recollage en X et Y était alors complété en résolvant l'équation de Laplace avec les conditions frontières de Dirichlet dans la région de recouvrement. La même méthode était employée pour les images provenant de la microscopie confocale. Cela permettait d'obtenir une translation continue et fluide entre les mosaïques. On pouvait ajuster la fraction de la zone de recouvrement qui était considérée dans le calcul de diffusion. Utiliser la région entière créait une transition plus fluide entre les mosaïques, mais pouvaient rendre l'image plus floue dans ces régions.

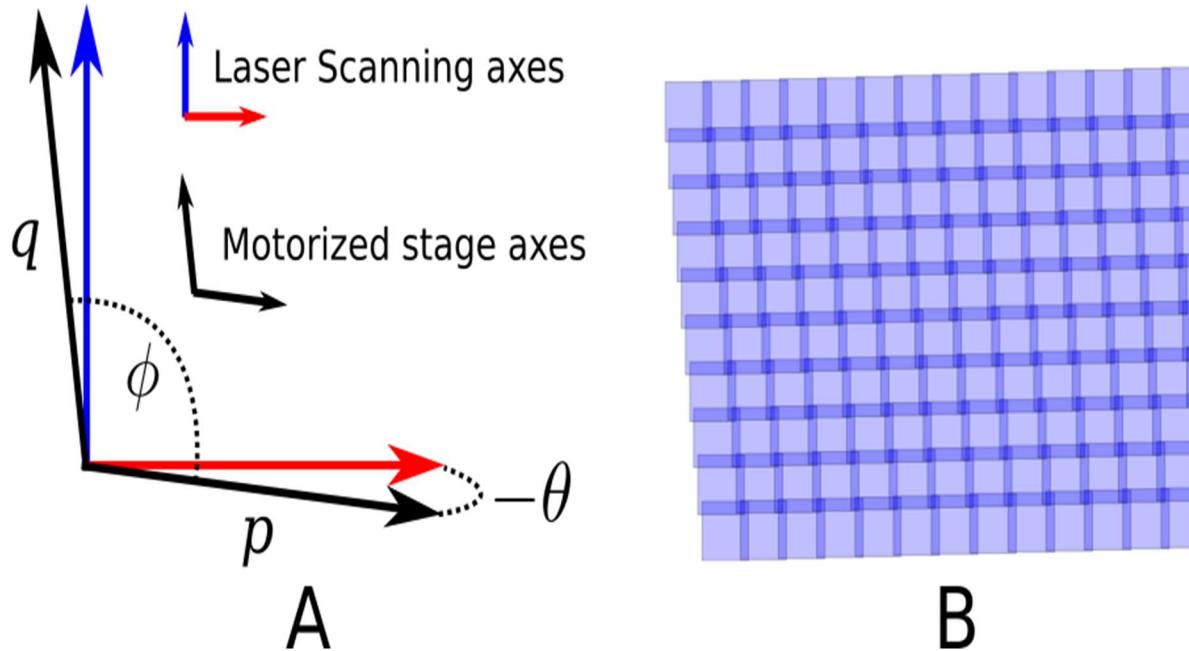


Figure 11: Modèle de déplacement des mosaïques.

(A) Différence entre le système d'axe de scanning des lasers et celui des moteurs motorisés. (B) Recollage obtenu après les calculs de changement de système d'axe

Quelques algorithmes additionnels étaient employés afin d'améliorer la qualité des données. Premièrement, on rognait les parties des données contenant uniquement de l'agarose afin de seulement garder l'artère dans le champ de vision. Pour chaque *A-line*, on ajustait une courbe exponentielle décroissante, basée sur la loi de Beer-Lambert. On pouvait alors extraire le coefficient d'extinction des *A-lines*, et ainsi corriger l'intensité pour l'extinction. Les masques du tissus étaient calculés afin de cacher le lumen et l'agarose entourant les tissus. Les masques étaient calculés à l'aide de la méthode de seuil de Otsu. Le principe de cette méthode est de trouver un seuil de valeur séparant l'ensemble de données en deux classes. Le seuil est déterminé de façon à minimiser la variance au sein des deux classes. La variance intra-classe peut être représentée par une somme pondérée des variances de chaque classe. Cela correspond à maximiser la variance entre les deux classes. En supposant des fonctions de probabilités en fonction du seuil  $w_1(t)$  et  $w_2(t)$ , le but est de minimiser la fonction

$$\sigma_w^2(t) = w_1(t)\sigma_1^2(t) + w_2(t)\sigma_2^2(t) \quad (14)$$

où  $\sigma_w$  est la variance intra-classe, et  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$  sont les variances de chaque classe. L'algorithme de Otsu consiste à calculer  $\sigma_w$  pour des incrément de  $t$  à partir de l'histogramme des volumes. La valeur de  $t$  qui maximise la fonction est celle qui est utilisée. On peut alors former des images ou des volumes binaires, avec 0 pour les valeurs sous le seuil et 1 en haut du seuil. Cette carte binaire constitue le masque utilisé.

L'étape suivante était de recoller les tranches selon l'axe de Z. Pour ce faire, on calculait des images 2D du gradient du signal en fonction de la profondeur. On pouvait ensuite calculer les matrices de corrélation croisées entre deux tranches successives et trouver le recalage adéquat. Le même algorithme qu'en X-Y était ensuite utilisé pour créer une transition fluide dans le volume final.

Les images acquises avec le microscope confocal devaient être déconvolées afin d'avoir une résolution spatiale suffisante. En effet, puisque nous utilisions une iris au lieu d'un sténopé conventionnel, la profondeur de champ était plus grande que l'épaisseur d'une tranche. Cela faisait en sorte que du signal fluorescent provenant d'une tranche inférieure pouvait être détecté sur la tranche présentement imagée. Les images étaient traitées avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, New York, NY, USA). Il fallait que la PSF utilisée dans les calculs soient représentative de celle mesurée avec le microscope afin que la déconvolution corrige adéquatement les effets négatifs causés par l'iris. Nous avions préalablement caractérisé notre système à l'aide d'une cible de résolution USAF-1951 placé par-dessus un mouchoir imbibé d'ICG. Les bandes sombres et brillantes nous ont permis de trouver la résolution latérale. En déplaçant le moteur en z, nous avons pu tracer un profil du signal en fonction de la distance par rapport au plan focal. Nous avons alors pu estimer que notre PSF avait une largeur à mi-hauteur de 4.4um latéralement et de 146um axialement. En supposant qu'il était raisonnable d'affirmer que notre profil de faisceau était gaussien, on pouvait générer une PSF avec une fonction contenue dans ImageJ. La déconvolution reposait sur un calcul fait à partir du modèle optique 3D de Born et Wolf. On utilisait la méthode de Otsu sur les images en fluorescence avant de superposer ces données sur les images OCT afin de confirmer que le signal fluorescent provenait de plaques athérosclérotiques (sur les parois du lumen). Afin de comparer les deux ensembles de données, on prenait la moyenne par rapport à l'axe des Z des volumes OCT pour chaque tranche afin d'avoir une image en deux dimensions.

Notons qu'il était nécessaire d'avoir un ordinateur avec une capacité de calcul élevée afin d'effectuer les reconstructions, en raison de la grande taille des jeux de données. En effet, les données acquises en OCT pour une seule artère pouvaient facilement nécessiter plusieurs centaines

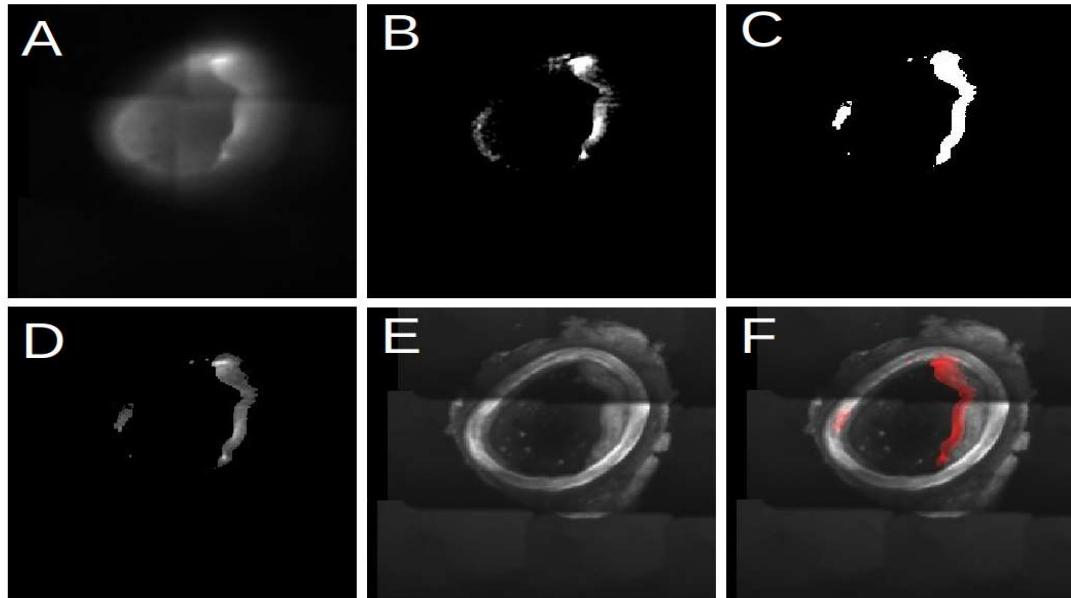


Figure 12 Étapes du traitement d'image pour une tranche acquise avec le microscope confocal.

L'image brute (A) subit une déconvolution (B). La méthode de Otsu est ensuite employée (C) et le masque résultant est appliqué (D). La moyenne d'un volume OCT est calculé par rapport à l'axe des z (E). Les images sont ensuite superposées, avec la fluorescence en rouge afin de mieux distinguer les deux ensembles de données (F).

de gigaoctets d'espace d'emmagasinage. Un ordinateur de six cœurs avec 64 Gb de mémoire vive était donc utilisé afin de reconstruire les volumes dans un temps raisonnables (quelques heures). Un exemple de reconstruction OCT finale est montrée sur la figure 13.

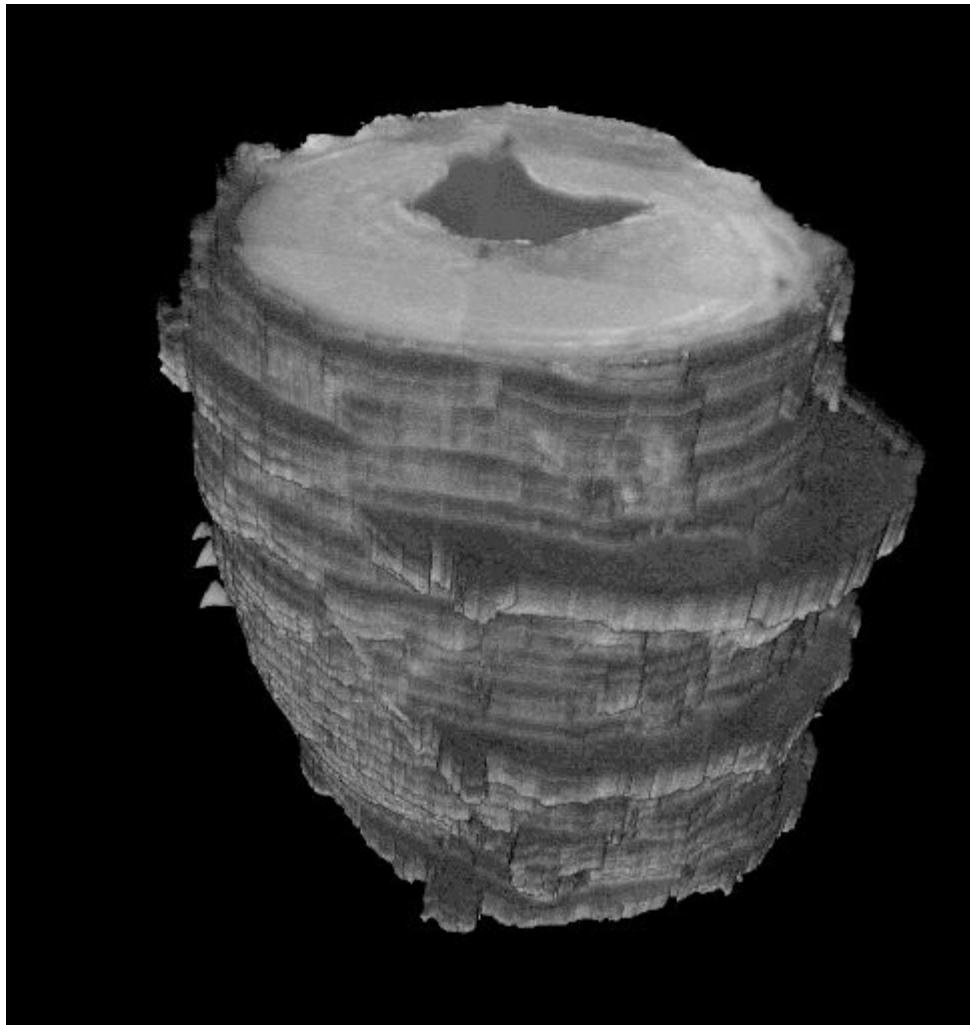


Figure 13: Reconstruction d'une partie de l'aorte du lapin 4 du modèle 1 avec des voxels isotropes de 6.5um.

### 3.2.4 Colocalisation

Le but ultime du microscope OCT/confocal est de fournir une méthode d'histologie qui combine une excellente résolution spatiale et une localisation précise de plaques athérosclérotiques, tout en fournissant de l'information sur la composition chimique de ces plaques. De plus, afin de démontrer que l'histologie massive 3D fait avec notre microscope peut valider des mesures acquises *in vivo*, il était important de montrer qu'il était possible de co-localiser certains points de repères visibles autant sur les *pullbacks* IVUS que sur les données OCT. Dans le modèle 2, il était possible de visualiser l'artère abdominale et les artères iliaques avec les deux modalités. Il était

aussi possible d'observer plusieurs bifurcations sur les données provenant des deux types de scan. Il est à noter que les tissus subissent un rétrécissement significatif entre le moment de l'extraction des vaisseaux et le moment de les imager avec le microscope. Un facteur de rétrécissement de 61% a été calculé. À cause du manque de pression intra-artérielle, on observait une distortion des parois artérielles. Il était donc impossible d'obtenir un modèle de déformation précis.

On pouvait comparer ces données à aux scans NIRF acquis *in vivo*. Les résultats sont montrés sur la figure 13. On observe une excellente correspondance entre le signal *in vivo* et le signal au Lumina.

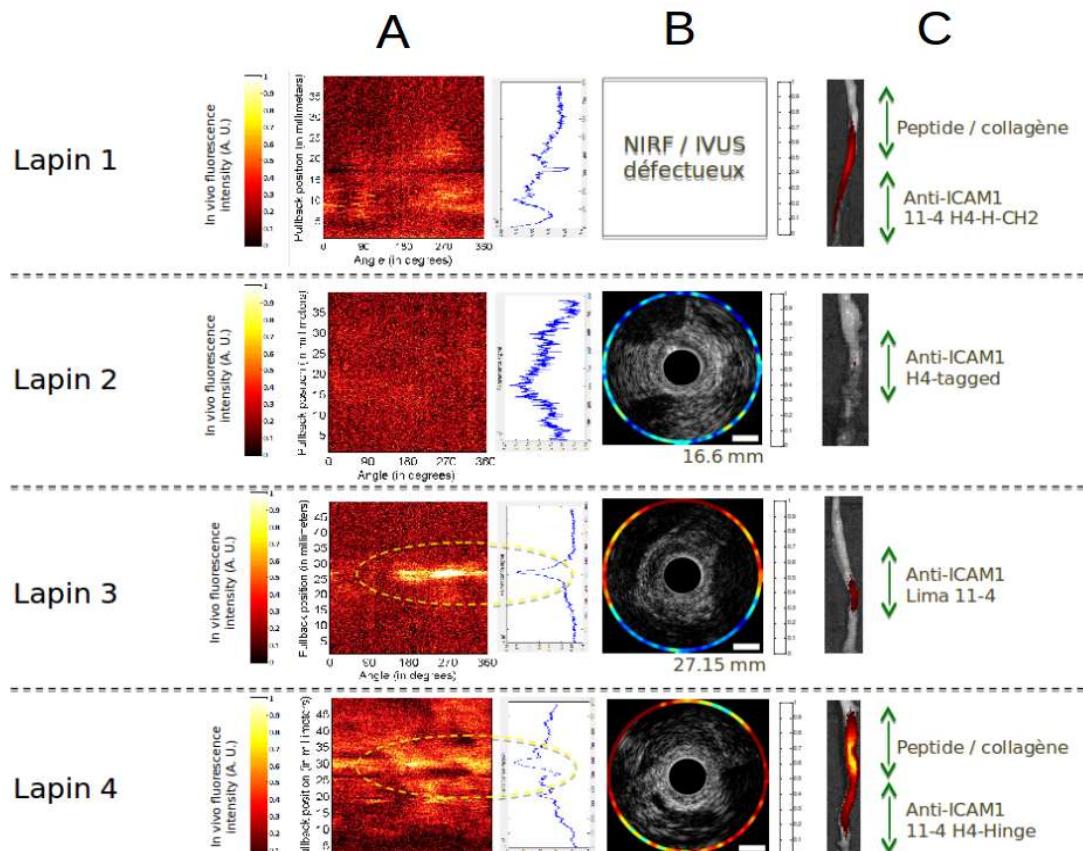


Figure 14: Comparaison entre les scans NIRF *in vivo* et *ex vivo* acquis avec le Lumina pour les 4 lapins du modèle 1.

On peut voir que le lapin 2 est le seul qui n'offrait aucun signal spécifique. La colonne A montre les images 2D obtenus avec les *pullbacks*, ainsi que le profil 1D moyen. La colonne B montre la superposition des données IVUS-NIRF pour une position précise. La colonne C montre les images acquises avec le lumina, ainsi que la sonde utilisée. On peut voir une bonne coregistration particulièrement sur le lapin 4.

### 3.2.5 Comparaison avec l'histologie

Tel que mentionné, il était possible de récupérer les tranches après les acquisitions OCT et de les analyser en histologie conventionnelle. Les tranches d'agarose étaient conservées dans une solution de 10% de paraformaldéhyde à 4°C. Les tranches tombaient dans un réceptacle en plastique imprimé sur mesure à l'imprimante 3D placé au fond du bassin d'eau. Cela permettait de récupérer les tranches dans l'ordre dans lequel elles ont été imagées. Cependant, la méthode n'était pas parfaite puisque certaines tranches flottaient avant de toucher le fond et ne se rendaient pas au réceptacle. Il n'a donc pas été possible de comparer les tranches d'histologie avec les autres modalités d'imageries pour une position précise dans le vaisseau.

Deux colorations étaient utilisées, soient le Trichrome de Masson et la coloration de Von Kossa. La première peut être utilisée pour cibler plusieurs composantes, comme la kératine, les fibres musculaires, les os, le cytoplasme, les noyaux cellulaires et le collagène. Dans notre cas, c'est cette dernière catégorie qui nous intéressait. Le Trichrome donne une couleur bleue aux fibres de collagène. Puisque nous savons que le collagène est abondant dans les coques fibreuses, typiques des stades plus avancés de plaques athérosclérotiques. La coloration de Von Kossa pour sa part permet de colorer les amas de calcium, qui sont aussi présents dans certains types de plaques (calcifiées).

### 3.2.6 Limites et difficultés

Un des buts de l'étude préliminaire était d'identifier les limites et les difficultés associées au protocole, surtout en ce qui a trait au protocole d'imagerie *ex vivo*. En effet, la procédure avait préalablement été employée presque exclusivement sur des cerveaux. Ces tissus sont généralement plus faciles à trancher, car ils sont moins rigides que ceux des artères. La présence de tissus conjonctifs rendait aussi le tranchage plus difficile. Tel que mentionné plus tôt, ce tissu pouvait flotter et bloquer la lumière, empêchant de visionner la région d'intérêt. De plus, une mauvaise coupe donnait lieu à un interface eau/tissu inégale en hauteur. Cela faisait en sorte que l'échantillon imagé n'était pas nécessairement au plan focal, ce qui causait une perte de signal et de résolution axiale.

De plus, certains artéfacts liés à l'acquisition diminuent la qualité des images. En raison du grand champ de vision, des effets de vignettage pouvaient être observées sur les côtés des mosaïques. Le vignettage est un effet de perte de signal aux extrémités d'une image, causée par la nature sphérique des lentilles. Cela causait l'apparition d'une délimitation claire entre les mosaïques au lieu d'une transition fluide. Un autre artéfact était causé par la lamelle entre l'objectif et l'eau. En effet, elle avait un grand coefficient de réflexion et le signal provenant de la lamelle pouvait être observé sur les A-lines. Cependant, si le bras de référence avait la bonne longueur, il était possible d'enlever l'artéfact de la région d'intérêt, c'est-à-dire la distance correspondant à la position du plan focal. De plus, des réflexions internes entre les éléments optiques peuvent aussi créer des artéfacts. Finalement, nous avons observé une fréquence parasite provenant de notre source laser. Il était cependant possible de diminuer les effets de cette fréquence en appliquant un filtre gaussien sur la référence. On peut voir le résultat sur la figure 15.

Il était impossible pour nous d'enlever parfaitement les effets de cette fréquence parasite. Heureusement, elle ne causait pas d'artéfacts dans la région d'intérêt. Cependant, on pouvait voir les effets de cette fréquence si une tranche n'était pas parfaitement au focus en raison d'un défaut de coupe.

Une autre faiblesse de notre méthode était le manque de résolution axiale et latérale en microscopie confocale. L'usage d'un objectif de 3X dans le cas du modèle 1 était avantageux pour l'OCT, car on pouvait avoir un plus grand FOV et ainsi imager plus rapidement tout le vaisseau en prenant moins de données. Cependant, cela se faisait au détriment de la qualité du signal et de la résolution en microscopie confocale. En effet, le seul moyen d'obtenir un SNR satisfaisant était de remplacer le sténopé par un iris, ce qui nous faisait perdre de la résolution. Il était alors nécessaire de déconvoluer les images.

## **CHAPITRE 4      ARTICLE 1: VALIDATING INTRAVASCULAR IMAGING WITH SERIAL OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY AND CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPY**

Published the International Journal of Molecular Biology on December 15 2016.

Pier-Luc Tardif 1,2,\* , Marie-Jeanne Bertrand 2,3, Maxime Abran 1,2, Alexandre Castonguay 1 , Joël Lefebvre 1 , Barbara E. Stähli 2 , Nolwenn Merlet 2 , Teodora Mihalache-Avram 2 , Pascale Geoffroy 2 , Mélanie Mecteau 2 , David Busseuil 2 , Feng Ni 4 , Abedelnasser Abulrob 4 , Éric Rhéaume 2,3, Philippe L'Allier 2,3, Jean-Claude Tardif 2,3 and Frédéric Lesage 1,2,\*

1 Département de Génie Électrique et Institut de Génie Biomédical, École Polytechnique de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada; maxime.abran@gmail.com (M.A.); alexandre.castonguay87@gmail.com (A.C.); joel.lefebvre@gmail.com (J.L.)

2 Montreal Heart Institute, Montreal, QC H1T 1C8, Canada; mariejeanne.bertrand@gmail.com (M.-J.B.); barbarastaehli@hotmail.com (B.E.S.); nolwenn.merlet@gmail.com (N.M.); Teodora.Mihalache-Avram@icm-mhi.org (T.M.-A.); Pascale.Geoffroy@icm-mhi.org (P.G.); melanie.mecteau@icm-mhi.org (M.M.); david.busseuil@icm-biobanque.org (D.B.); Eric.Rheaume@icm-mhi.org (É.R.); philippe.l\_lallier@icloud.com (P.L.); jean-claude.tardif@icm-mhi.org (J.-C.T.)

3 Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

4 National Research Council Canada (NRCC), Montreal, QC H3A 1A3, Canada; Feng.Ni@cnrc-nrc.gc.ca (F.N.); abedelnasser.abulrob@nrc-cnrc.gc.ca (A.A.)

\* Correspondence: pierluctardif@gmail.com (P.-L.T.); frederic.lesage@polymtl.ca (F.L.); Tel.: +1-514-340-4711 (ext. 7542) (F.L.)

Academic Editors: Michael Henein and Joseph V. Moxon Received: 31 August 2016; Accepted: 9 December 2016; Published: 15 December 2016

**Abstract:** Atherosclerotic cardiovascular diseases are characterized by the formation of a plaque in the arterial wall. Intravascular ultrasound (IVUS) provides high-resolution images allowing delineation of atherosclerotic plaques. When combined with near infrared fluorescence (NIRF), the plaque can also be studied at a molecular level with a large variety of biomarkers. In this work, we present a system enabling automated volumetric histology imaging of excised aortas that can

spatially correlate results with combined IVUS/NIRF imaging of lipid-rich atheroma in cholesterol-fed rabbits. Pullbacks in the rabbit aortas were performed with a dual modality IVUS/NIRF catheter developed by our group. Ex vivo three-dimensional (3D) histology was performed combining optical coherence tomography (OCT) and confocal fluorescence microscopy, providing high-resolution anatomical and molecular information, respectively, to validate in vivo findings. The microscope was combined with a serial slicer allowing for the imaging of the whole vessel automatically. Colocalization of in vivo and ex vivo results is demonstrated. Slices can then be recovered to be tested in conventional histology. Keywords: intravascular ultrasound (IVUS); near-infrared fluorescence (NIRF); atherosclerosis; ex vivo three-dimensional (3D) histology; optical coherence tomography (OCT); confocal fluorescence microscopy

## 4.1. Introduction

Atherosclerosis is a chronic immune-mediated inflammatory disease that arises from a series of complex events triggered by endothelial dysfunction, lipid accumulation in the arterial wall, and infiltration of monocyte-derived macrophages [1,2]. Acute coronary syndromes (ACS) occur mostly from the rupture of modestly stenotic lipid-rich “vulnerable” plaques, which leads to endoluminal thrombus formation, myocardial ischemia, and sudden cardiac death [3,4]. Although coronary angiography remains the gold standard for epicardial coronary stenoses assessment and treatment, it frequently underestimates true plaque burden and provides no information regarding plaque composition [5]. Intravascular ultrasound (IVUS) imaging has been established as an adjunct imaging technology to coronary angiography, widely used in both clinical and research applications [6]. By generating in vivo cross-sectional images of the vessel wall and lumen, IVUS enables the characterization of atherosclerotic vessel segments by providing accurate lumen and vessel dimensions, as well as non-protruding plaques, positive vascular remodeling, and plaque burden assessment [7,8]. Conventional grayscale IVUS is, however, limited with regards to the analysis of plaque composition [9], whereas emerging molecular imaging technologies, such as fluorescence imaging, have been developed to overcome these limitations. Multimodality imaging systems, such as the dual-modality IVUS/near-infrared fluorescence (NIRF) imaging catheter previously engineered by our group and others [10,11,12,13], were designed for integrated

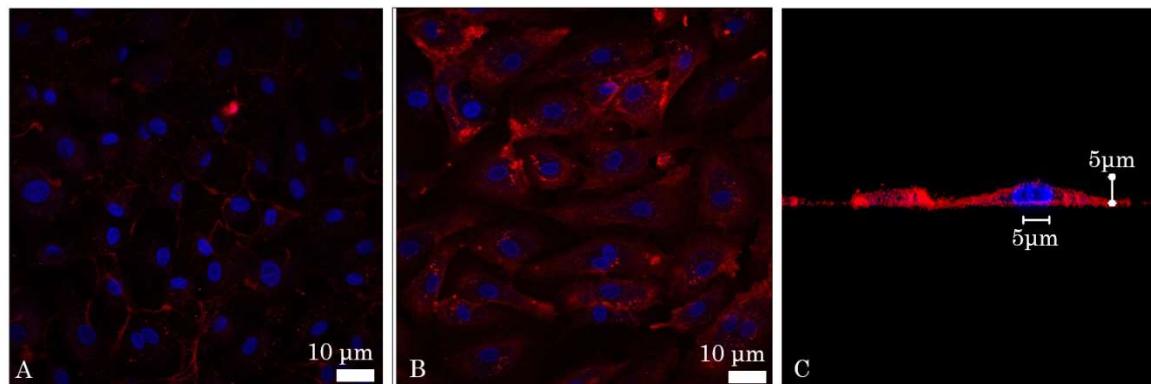
microstructural and molecular plaque imaging, thus enabling a more detailed plaque characterization. The use of molecular probes in conjunction with fluorescence imaging has been shown to provide complementary information with regards to plaque activity and inflammation [14,15,16,17,18,19]. Translation of molecular imaging results to clinical applications, however, requires validation; and despite impressive advances in intravascular imaging over the past decade, histology remains the gold standard for determining plaque composition and geometry. Although providing high-resolution cross-sectional images of the arterial wall, histology remains limited to the number of tissue sections analyzed and by the lack of anatomical context; thus resulting in missed valuable data. When comparing *in vivo* intravascular imaging applications with histology, colocalization is often challenged by geometric distortions and tissue shrinkage, as well as the lack of anatomical landmarks and the limited resolution of IVUS imaging.

OCT-based block-face three-dimensional (3D) histology combined with serial cutting of tissues has been proven in the past to be an efficient technique to reconstruct and visualize whole intact organs or tissues [20,21]. Previous work has demonstrated the use of serial OCT imaging primarily for brain imaging. However, this method has so far never been used for cardiovascular imaging. From the spatial resolution of optical coherence tomography (OCT), largely superior to IVUS [6], and the capacity of confocal fluorescence microscopy to efficiently identify the same molecular biomarkers as NIRF imaging [22], we developed a novel *ex vivo* automated 3D histology platform comprising a dual-modality imaging system based on OCT-coupled fluorescence sensitive confocal microscopy [21]. In this work we detail the process of image reconstruction using this system and, for the first time, describe its use for the purpose of atherosclerosis detection and localization in iliac arteries and aortas of an atherosclerotic rabbit model. Fluorescent signal colocalization obtained from *in vivo* and *ex vivo* imaging was performed to validate the potential of these methods to be co-registered and for OCT-combined fluorescence sensitive confocal microscopy to serve as a future histology add-on validation tool in the development of novel molecular probes.

## 4.2. Results

### 4.2.1. In Vitro Affinity of Anti-ICAM-1 Antibody

A fluorescently labelled anti-intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antibody was used as a marker of inflammation below. Four ICAM-1 probes were initially tested in vitro, but only one showed positive affinity with inflammation (Figure 1). Fluorescence confocal microscopy images were taken to evaluate the affinity of the anti-ICAM-1 antibody with mammalian cells. Human Umbilical Vein Cells (HUVEC) were imaged before and after being activated by Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alpha), which induces inflammation. Placing the fluorophore bound to the ICAM-1 antibody in the cell growth medium followed by flushing, it was observed that the signal was far more present for the TNF-alpha activated cells, suggesting that the ICAM-1 antibody does in fact have affinity with inflammation (Figure 1). Deconvolution was also performed to form a transverse image of the cell to show that the signal was localized on the cellular membrane and not in the growth medium or the cytoplasm (Figure 1C).

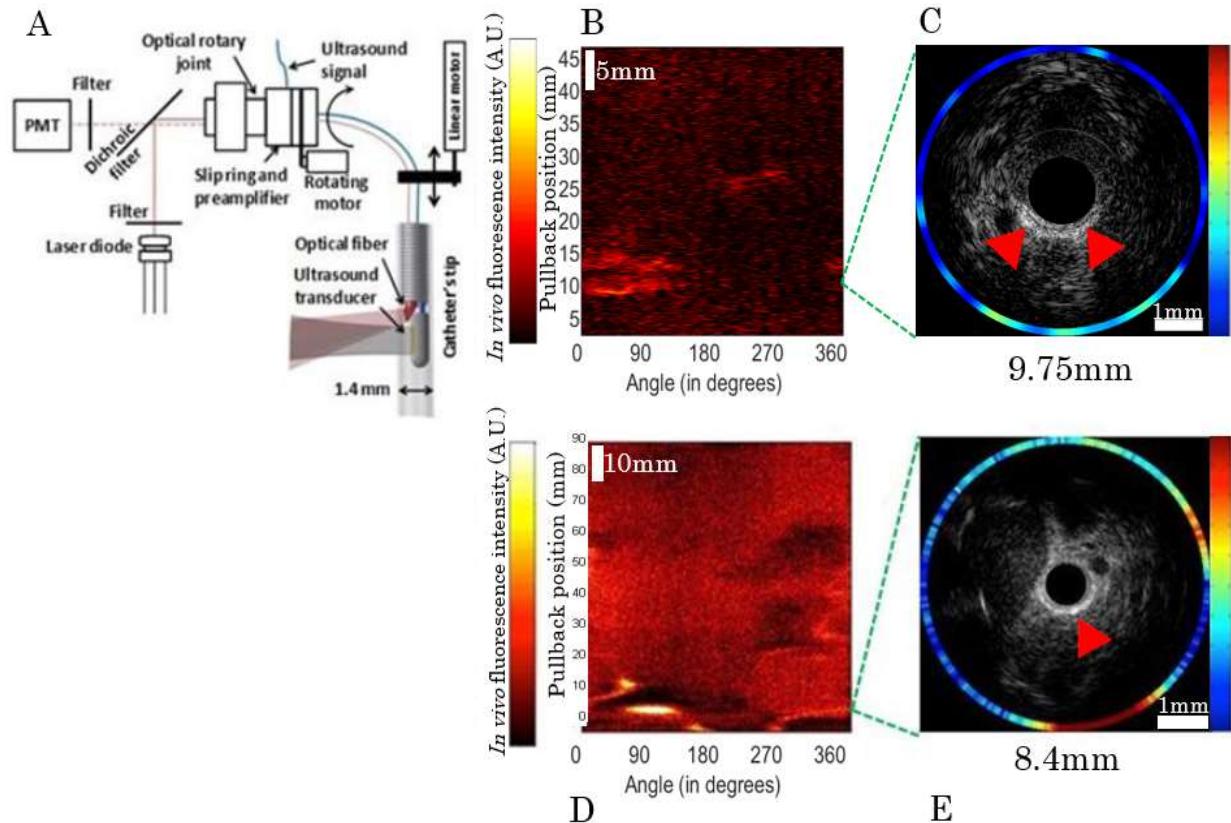


**Figure 1.** Fluorescent confocal images of in vitro affinity of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) antibody (A) Inactivated and (B) Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) activated Human Umbilical Vein Cells (HUVEC). The nuclei (blue) were stained with DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate) (C) deconvolved image of a cell. The fluorescence signal (red) is not present in the cytoplasm or the nucleus, but is, rather, located on the cell membrane.

### 4.2.2. In Vivo Catheter Imaging

Five atherosclerotic rabbits were imaged following either an in vivo targeted molecular probes injection (model 1) or an intravenous indocyanine green (ICG) (model 2) injection with a dual

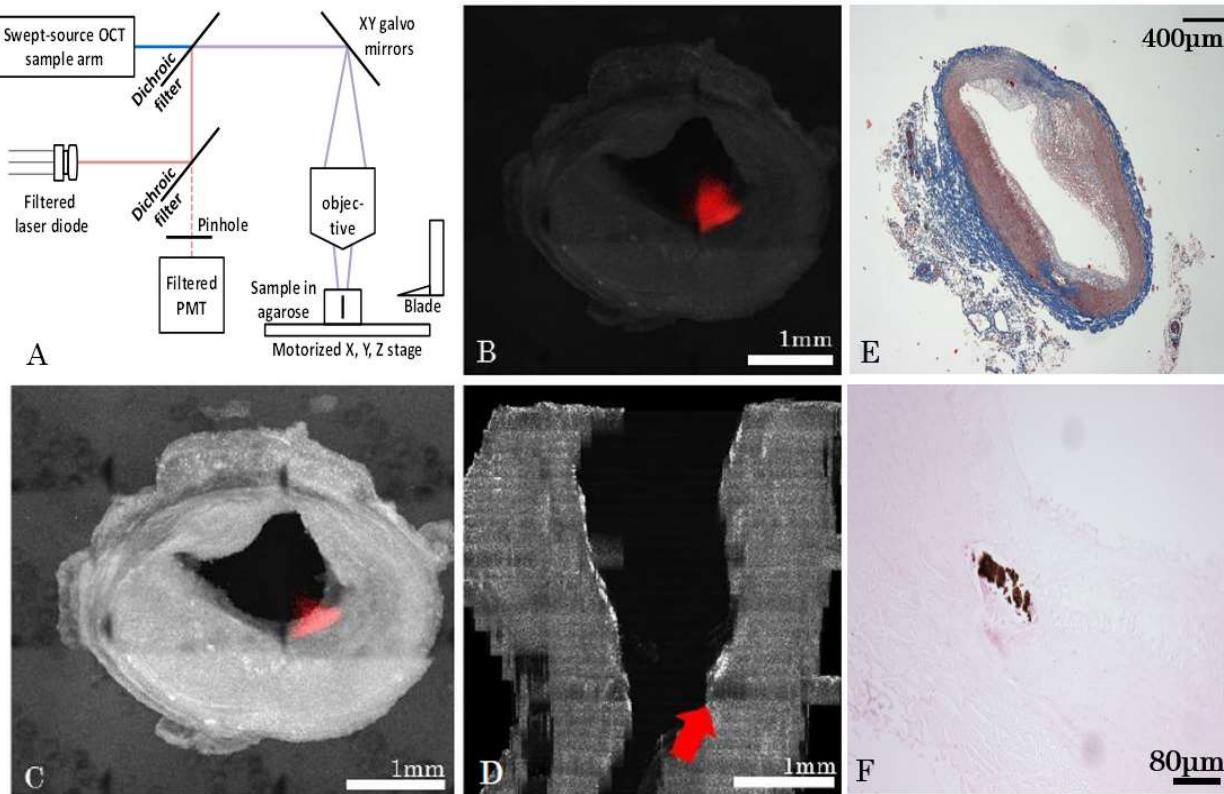
IVUS/NIRF imaging catheter designed by our group (Figure 2). The IVUS had a frequency of 45 MHz and the excitation wavelength of the NIRF was 780 nm. As shown in Figure 2B,C, a strong in vivo signal was obtained following injection of an ICAM-1 nanobody probe at 30.05 mm of pullback in model 1, with partial correlation with the echolucent region on IVUS imaging. Other ICAM-1 nanobodies that did not show affinity in vitro were also injected with the purpose of evaluating their targeting ability. For these, weak signals were detected by in vivo NIRF/IVUS imaging, despite the presence of plaque on IVUS. In model 2, a strong but localized signal was seen at 8.4 mm of catheter pullback correlated with IVUS imaging, with the plaque pointed by the red arrow (Figure 2E). The pulse generated by the ultrasound (US), created an artifact and a mask was applied to hide the catheter on the images up to the artifact radial position, which extended 50  $\mu$ m past the wall of the catheter. Thus, part of the mask intersected the vessel wall (Figure 2E) in smaller vessels, but not in bigger ones (Figure 2C). A ring artifact that can be seen off Figure 2C was caused by a reflection on the sheath surrounding the catheter.



**Figure 2[M1][PT2].** In vivo imaging system and typical images. (A) Overview of the bimodal catheter system with a detailed view of the catheter's tip. PMT stands for photomultiplier tube; (B) Paired in vivo near-infrared fluorescence signal detected over 360 degrees with 50 mm pullback length; and (C) integrated NIRF-IVUS cross-sectional imaging with partial fluorescence signal and echolucent plaque colocalization (shown by red arrows) in model 1. Atherosclerotic plaque, shown by echolucent signal on IVUS (D,E), was partly correlated with indocyanine green (ICG)-fluorescence signal at 8.4 mm of pullback (red arrow) in model 2.

#### 4.2.3. Serial Imaging System, Ex Vivo OCT Reconstructions and Fluorescence Alignment

The model 1 rabbits were imaged with a  $3\times$  objective whereas the model 2 rabbit was imaged with a  $10\times$  water immersion objective. The former being designed to work in air, a chamber was built between the end of the objective and water by gluing a glass window to the aluminum lens tube. Typical results are presented in [Figure 3B–D](#) for raw, processed, and 3D reconstruction data, respectively. Fluorescence signal was higher at the surface or near the arterial wall, which suggests that the ICAM-1 nanobodies bind to lipid plaques and that these molecular probes are sources of specific signals. The processed slices can then be recovered after slicing and imaged in standard histology ([Figure 3E,F](#)), here, with Masson Trichrome ([Figure 2E](#)) and Von Kossa ([Figure 3F](#)) to detect calcification.



**Figure 3.** Ex vivo optical coherence tomography (OCT) and confocal reconstruction for a model 1-type rabbit. **(A)** Overview of the serial histology imaging system; **(B)** Example of an averaged slice (raw data) with the fluorescence image superimposed on it (i.e., red signal); **(C[M3][PT4])** Example of the same slice after Beer-Lambert corrections, contrast adjustment, and deconvolution (Log-scale), with superimposed fluorescence image (red); **(D)** Localization of the tissue slice (c) on a 3D reconstruction (shown by red arrow); **(E)** Histology slice colored with Masson Trichrome and a 4 $\times$  objective **(F)** Same slice imaged with VonKossa and a 20 $\times$  objective.

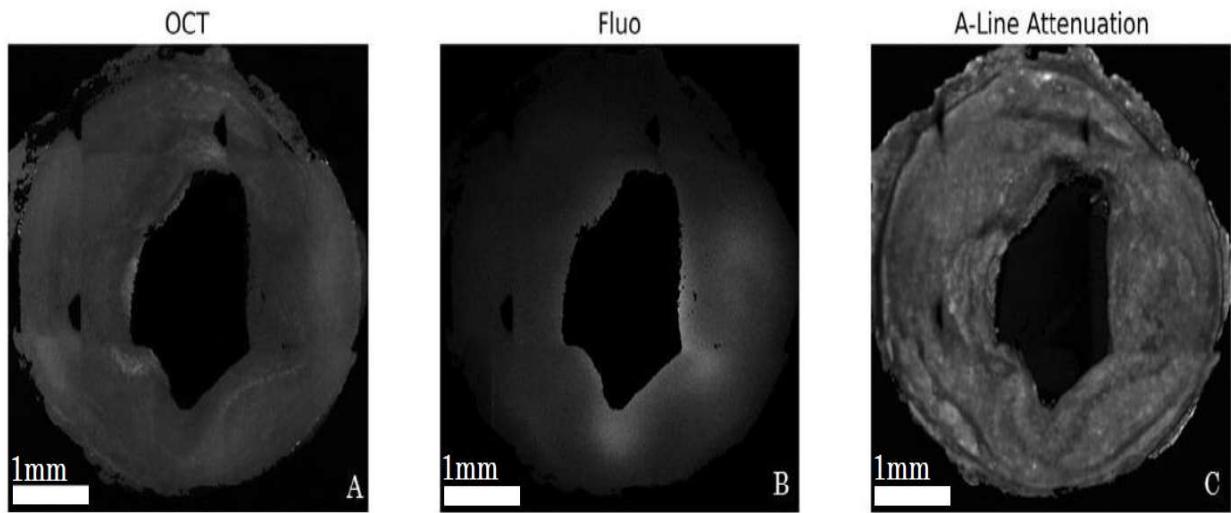
#### Data Reconstruction

Due to tissue attenuation of the OCT signal and serial mosaic acquisitions, specific algorithms were developed to reconstruct full 3D volumes. A custom Python stitching and signal correction algorithm was developed, allowing complete artery reconstructions and atherosclerosis localization based on both modalities. The following steps were implemented:

- For each tissue slice, the volume position in the mosaic reference frame was estimated using microscope acquisition data;

- Volumes were then stitched for each tissue slice;
- Post processing was performed that included cropping of the field of view, identification of lumen mask and Beer-Lambert intensity correction;
- After post processing steps, slices were assembled together in order to form a longitudinal 3D volume.

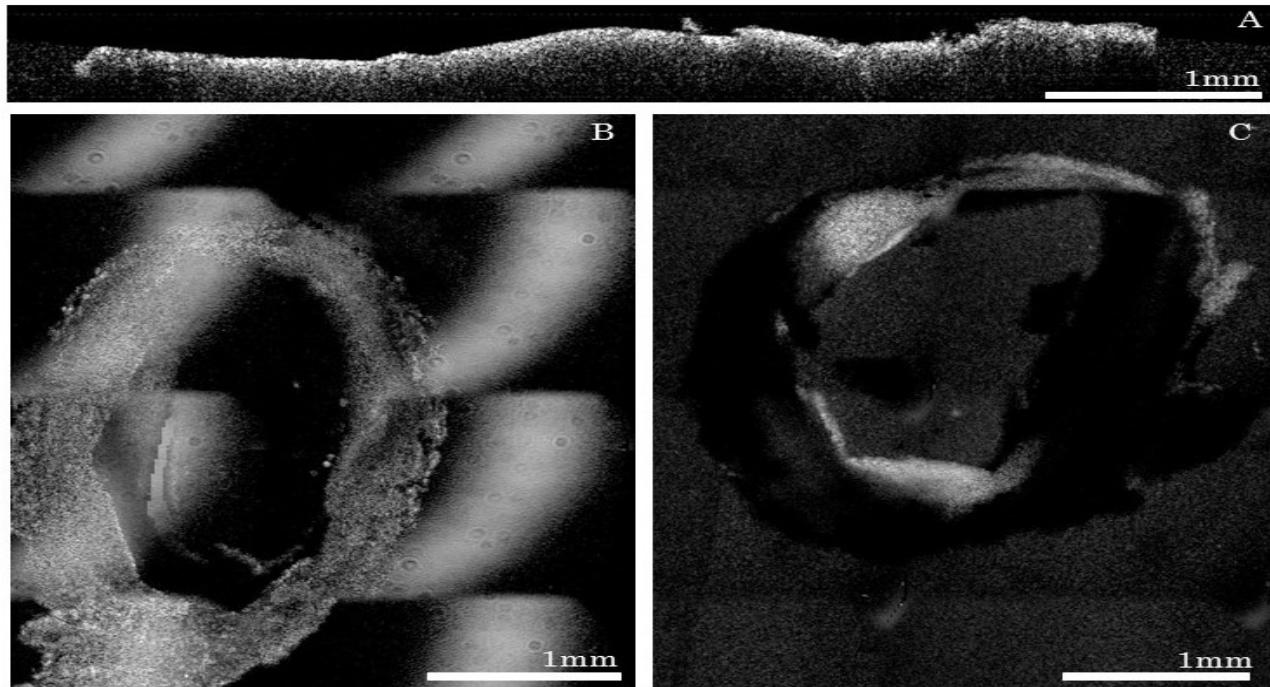
Figure 4A,B show typical images after the post processing steps (masks, Beer-Lambert correction, intensity artifacts correction, and cropping) applied to an averaged OCT slice and fluorescence image, respectively. Figure 4C shows the attenuation map used for Beer-Lambert correction for a particular slice.



**Figure 4.** [M5][PT6]Corrected images for model 1 rabbit for OCT (A); and fluorescence (B); A-line attenuation map used for OCT intensity correction outlines detailed tissue structures (C).

As previously mentioned, with an under-filled objective used in fluorescence imaging, deeper tissue slices could contaminate the signal of the imaged slice in fluorescence due to the extended point-spread function (PSF), thus, requiring a deconvolution algorithm to generate precise fluorescence images. A synthetic PSF was generated using the PSF generator plugin in the ImageJ software (National Institutes of Health, New York, NY, USA) using the Born and Wolf 3D optical model. It had a FWHM of 4.4  $\mu\text{m}$  in the x-y direction and of 146  $\mu\text{m}$  in the z direction and was used to correct fluorescence images.

When comparing to brain imaging obtained from a similar technology, the automatic *ex vivo* imaging technique required careful preparation of arterial tissues, as conjunctive tissues could cause cutting artifacts (Figure 5A), thus making it challenging to obtain uniform cuts. An algorithm was applied during image acquisitions to ensure fine control of the focal depth and to avoid placing tissues in areas where OCT had instrumental artifacts (spurious reflections) or outside the focal zone of the objective (Figure 5B,C).

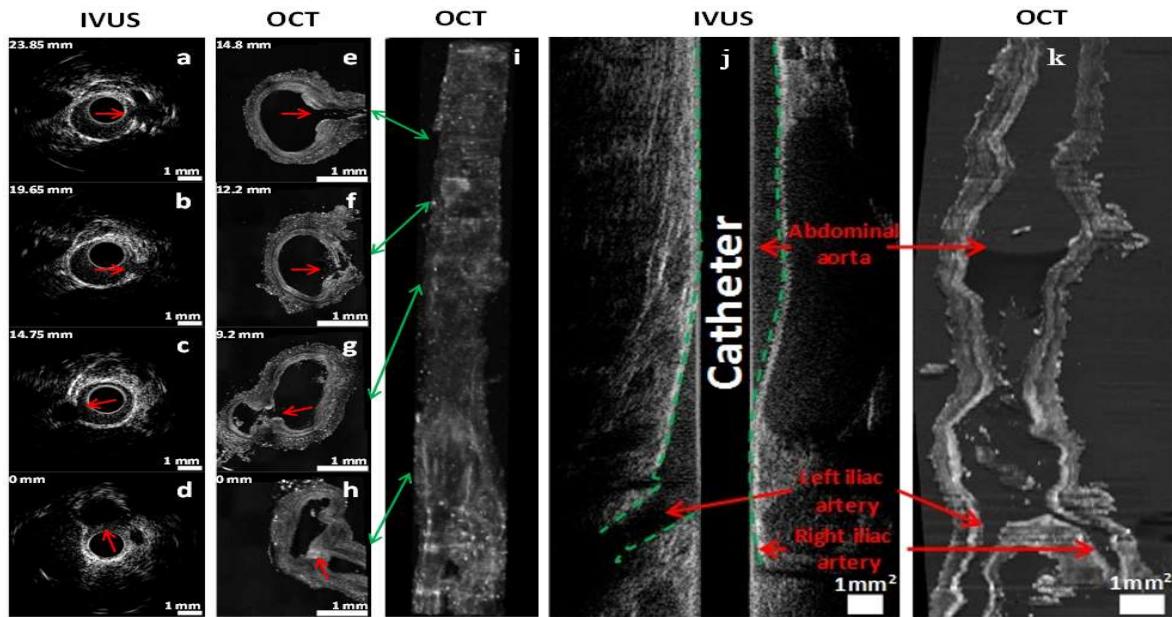


**Figure 5.** Sources of imaging artifacts and their effects during acquisitions: (A) Unevenly cut slice; (B) Artifact caused by the glass when the reference arm was not properly placed; (C) Slice that was imaged while not placed at the focal point of the lens.

#### 4.2.4 Alignment and Tissue Deformation

Due to *ex vivo* tissue fixation and a lack of intra-arterial pressure, which led to tissue dehydration and shrinkage, the comparison of *in vivo* and corresponding *ex vivo* vessel segments was challenging. Despite the average tissue shrinkage ratio of 61% that was calculated in our experiments, imaging colocalization was possible using landmarks. Longitudinal views of both IVUS and OCT anatomical imaging of an arterial segment are presented in Figure 6. The abdominal aorta and iliac arteries were visualized with both modalities, which served as reference points for colocalization. While longitudinal co-registration was possible, precise pixel-wise

deformation models could not be applied since the arterial wall was highly distorted in ex vivo OCT images given the lack of blood flow in fixed tissues. Nevertheless, longitudinal segments could be identified accurately, which enabled comparisons of pullback in vivo results to ex vivo data.

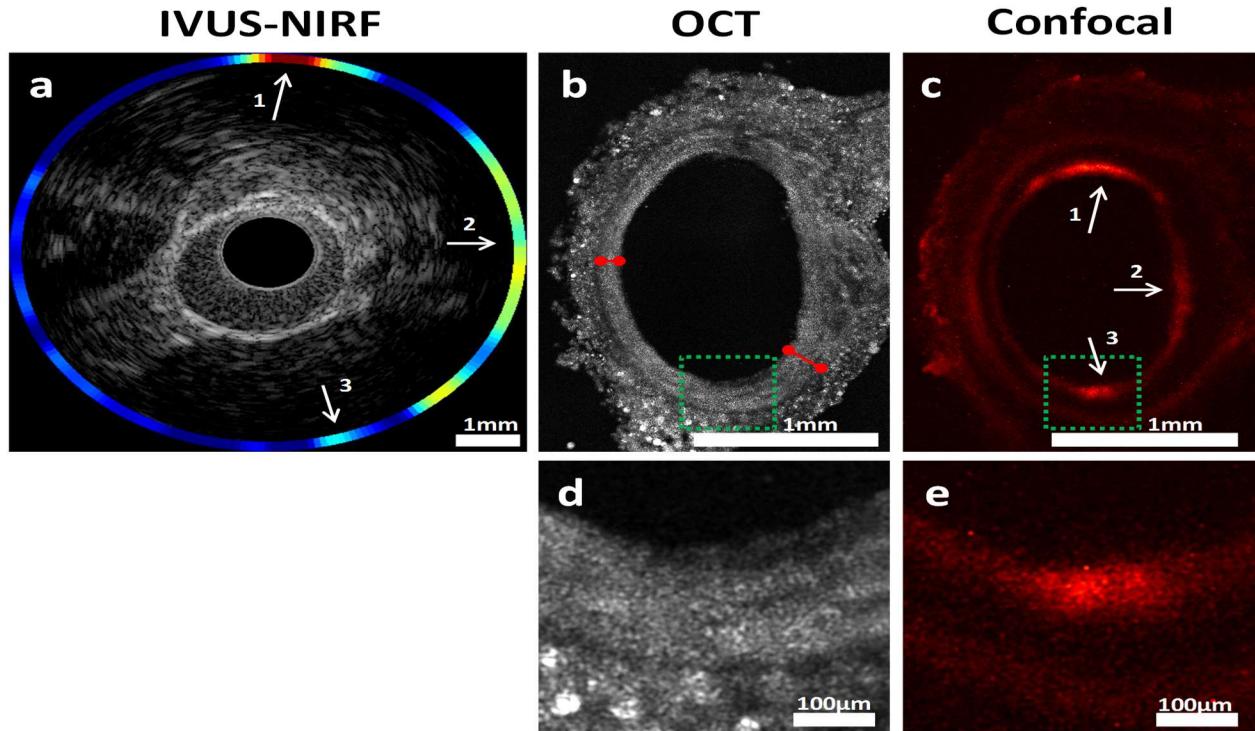


**Figure 6.** Intravascular ultrasound (IVUS) and OCT colocalization of anatomical landmarks in model 2. **(a-d)** In vivo IVUS cross-sectional images; **(e-h)** Ex vivo OCT cross-sectional images; **(i)** 3D reconstruction in OCT using a maximum intensity projection algorithm. Indicated numbers in mm (upper left of each image) represent the distances between the cross-section and the iliac bifurcation. The catheter was introduced in the right iliac artery, located at the bottom-right in the OCT image in **(h,i)**. Green arrows indicate the location of the cross-section slices on 3D reconstruction. Red arrows denote side branches (anatomical landmarks) used for colocalization. Longitudinal view of the abdominal aorta and iliac arteries in IVUS and OCT imaging in model 2; **(j)** In vivo IVUS image of a 50 mm artery segment (green dashed lines delineates the arterial wall); **(k)** Ex vivo OCT image of the same segment, which shrunk to a length of 30 mm after ex vivo tissue fixation. Scale bars represent a region of 1 mm by 1 mm.

#### 4.2.5. Validation of Intravascular Molecular Imaging

Using the methodological steps outlined above, in vivo ICG accumulation identified with NIRF imaging was confirmed using high-resolution fluorescence confocal imaging, as shown in [Figure](#)

7. Intimal thickening was also observed on ex vivo OCT, an indication of the presence of plaque. Figure 7b shows that the intimal thickness varied from 100  $\mu$ m to 200  $\mu$ m (red arrows), a difference not perceptible in IVUS, which has a resolution of about 100  $\mu$ m.



**Figure 7.** Cross-sectional view of the abdominal aorta in model 2. (a) IVUS-NIRF imaging in vivo; (b) OCT imaging ex vivo; (c) Confocal fluorescence microscopy imaging ex vivo; (d,e) Enlarged sections of the green region of (b,c). Red arrows identify the intimal thickness at two locations in the OCT image. White arrows indicate colocalization between in vivo and ex vivo fluorescence. Arrow 3 shows a weaker colocalization due to the limitation of our blood attenuation compensation algorithm [19], further supporting the need for co-registered ex vivo validation.

### 4.3. Discussion

Combining IVUS and fluorescence imaging (NIRF) within a single catheter may yield a reliable method that could be used to detect and locate atherosclerotic plaques in the arterial wall. This imaging method overcomes the shortcomings of coronary angiography, whereas fluorescence provides information regarding plaque composition and biology. Translation of such imaging technology to clinical applications requires robust preclinical validation, and co-registration of in vivo data to ex vivo assessments is essential for better plaque assessment. In the present work, we

demonstrated that multimodal custom serial imaging of tissue sections can be used to corroborate in vivo findings using OCT and confocal imaging to provide high spatial resolution. Our system is also compatible with conventional histology, as the slices from the vibratome can be recovered in the correct order using a small container placed in front of the agarose block and stained using standard procedures.

The main shortcoming of conventional histology is that although it offers information on molecular tissue composition, it does not provide accurate anatomical localization of said tissues. There is, at the moment, no existing method that can reliably corroborate the in vivo plaque localization and composition measurements done with an intravascular catheter during pullbacks. The method described here can, however, combine the molecular composition determination aspect of conventional histology, while the 3D reconstructions allow colocalization to be performed. Furthermore, in conventional histology, images are formed after the tissue is sliced, which leads to additional deformations and difficulties in reconstructing the 3D view. With the block-face OCT technique, images are taken before slicing, facilitating 3D assembly. Our method, while not a substitute for standard histology, is projected to be a complementary method that can help to bridge in vivo and histological data. The ability to co-localize tissues between the in vivo and ex vivo tissues offers a novel approach that could be used to validate future intravascular molecular imaging studies. Having a reliable way to confirm the data gathered in in vivo scans will smooth the transition between the fundamental research and clinical domains, leading to more effective, invasive imagery techniques and eventually better treatments for patients.

### 4.3.1 Slicing Optimization

One of the most challenging aspect of the ex vivo imaging process was to obtain uniform flat slices with the vibratome, as the connective tissue surrounding the artery rendered slicing more difficult. Residual connective tissue remaining above the sample after slicing appeared to block the light and/or cause inaccurate surface detection, thus, leading to some slices being imaged while being out of focus. Furthermore, slice stitching in the z-direction was very sensitive to the flatness of the slices. Keeping the slicer blade completely flat and straight at all times was difficult and resulted in different slice thicknesses. Crooked or uneven slices were problematic during reconstructions, since stitching was based on surface detection. To overcome these difficulties, a fixed overlap between slices was imposed. However, this could create gaps, which sometimes led to the presence

of dark bands between slices in the longitudinal reconstruction of the aorta. It should be noted that those overlaps may also induce a small bias when approximating tissue shrinkage as the z-stitching was highly dependent on these. Finally, evaluating the shrinking factor was also made more difficult by the fact that our method relied on finding landmarks, which were sometimes sparse. Optimizing tissue embedding and a careful removal of connective tissue is, thus, key to gathering quality data.

### **4.3.2. Optical Optimization**

In the case of the  $3\times$  objective, the glass used to protect it from water where the sample was imaged was a source of artifacts, since a reflection and its harmonics could be seen with the OCT scanner. While adjusting the reference arm's length could minimize the effect of the glass by imaging in the opportune zones, it was never possible to fully remove its effects since the automatic imaging process, which takes a few days to perform, always yielded a few images that were not situated in the ideal zone. Since the glass has very high reflectivity, the artifact often saturated the detector and information was lost when it could be observed within the imaged tissue. It was, thus, very important for the experimenter to place the glass at a position that did not create an artifact near the focal point of the objective.

### **4.3.3. Big-Data Processing**

The size of the datasets acquired was a factor that rendered data analysis quite cumbersome. A raw dataset of 500 GB for a single artery section required significant computing power to process and disk space for storage. Even lowering the resolution by going from a  $10\times$  to a  $3\times$  objective, the image sizes only decreased by half. Improvement in processing in terms of efficiency and storage will be required to enable large-scale studies.

## **4.4. Materials and Methods**

### **4.4.1. Animal Model for Atherosclerosis**

Six adult, male, New Zealand White rabbits (3–4 kg, 3 months old; Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada) were fed a 0.5% cholesterol diet (Harlan Techlab Diets, Madison, WI, USA) to induce atherosclerosis. Two rabbit models were used: model 1 ( $n = 5$ ), balloon injury performed at week 0, followed by 14-weeks cholesterol-enriched diet; model 2 ( $n = 1$ ), 14-weeks

of high-cholesterol diet. One rabbit did not complete the study due to neurologic complications after completion of balloon denudation. The experimental protocols were approved by the animal ethics committee of the Montreal Heart Institute Research Center (Projet ID code: 2015-1827, 2015-32-02, accepted on 24 March 2015) according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

#### **4.4.2. Balloon Dilatation Procedures**

Under general anesthesia (ketamine (35 mg/kg) and buprenorphine (10 mg/kg) administered intramuscularly, inhaled isoflurane (3%v/v, Baxter, Deerfield, IL, USA) and supplemental oxygen), balloon injury of the abdominal arterial wall was performed using a 5 French (F) radial introducer catheter (Cordis Corporation, Fremont, CA, USA) introduced through the right carotid artery. Under fluoroscopic guidance (Siemens, Berlin, Germany), a 4.0 mm PTCA balloon catheter (Boston Scientific, Marlborough, MA, USA) was advanced at the iliac bifurcation over a 0.014 inch guidewire (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA), inflated with 8 atm and retracted three times in the distal 40 mm of the abdominal aorta. The right carotid artery was ligated at the end of the procedure.

#### **4.4.3. Bimodal Near-Infrared Fluorescence (NIRF)/Intravascular Ultrasound (IVUS) Imaging Catheter System**

The *in vivo* imaging system (Figure 3A) used in this study, designed as an ultrasound-optical imaging catheter linked to an optical assembly and custom-made electronics, was previously described in [10]. The catheter combines an optical fiber for fluorescence imaging and an ultrasound transducer for acoustic imaging. An electronic circuit synchronizes the acquisition with two motors driving the rotating/translating catheter assembly, and raw data is transferred directly to a laptop via a universal serial bus (USB) connection at rates of up to 250 Mbps. A custom Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) user interface filters the signals and reconstructs and displays the images in real time during acquisition. Fluorescence excitation was performed using a 780 nm laser diode and emission was detected by a photomultiplier tube (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan), combined with a bandpass optical filter ( $832 \pm 19$  nm). A compensation algorithm was used to adjust the fluorescence signal amplitude for blood attenuation [10].

#### 4.4.4. In Vivo NIRF Imaging Procedure

In vivo NIRF imaging was performed under anesthesia, as previously described, using a 5 F introducer (Cordis Corporation, Fremont, CA, USA) placed in the left carotid artery (model 1; n = 4). Four novel tentative imaging probes (nanobodies) targeting ICAM-1 receptors (National Research Council Canada, Ottawa, CA, USA), labeled with infrared dye 800CW, were injected under fluoroscopic guidance (Siemens, Germany) in the denuded segment of the abdominal aorta of model 1, followed by intravascular IVUS/NIRF imaging. Intravenous indocyanine green (ICG, 10 mg/kg) was injected in model 2 (n = 1) and intravascular imaging was performing through a right carotid artery access 40 min after dye injection. Automated imaging pullbacks were performed in the abdominal aorta of both animal models and in the right iliac artery of model 2 at a pullback speed of 0.5 mm/s and a frame rate of 10 images/s over a total length of 50 and 100 mm, respectively. After in vivo imaging procedures, the animals were sacrificed by exsanguination under anesthesia and then underwent abdominal aorta and iliac arteries resection. The samples were fixed in 4% formaldehyde and kept at 4 °C.

#### 4.4.5. Ex Vivo Imaging System and Methods

Prior to ex vivo imaging, the distal 40 mm of the abdominal aorta and iliac arteries were mounted in a 4% cylindrical agarose block with 0.5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Ex vivo imaging was performed using a custom made automated serialized dual-modality setup for OCT and confocal fluorescence microscopy, incorporating a swept-source laser with a central wavelength of 1310 nm and a tuning bandwidth of 100 nm for OCT. The confocal laser passed through a filter cube before being reflected at a 90° angle by a long pass dichroic mirror at 875 nm which allowed for it to be combined with the OCT laser beam (Figure 3), allowing simultaneous acquisition of OCT and confocal data. To overcome limited light penetration in the tissue and scattering from microscopic imaging, a vibratome allowed sequential sectioning of the tissue block face in order to reveal new tissue regions to image. Following a previously described design, a dual flexure part isolated vibration of the blade from a direct current (DC) motor on a one-axis yielding precise cutting of the tissue. X and Y stages allowed moving the sample relative to the objective and imaging every sub-region (1 by 1 mm). Tissue samples embedded in agarose blocks were placed underneath a 10× water immersion objective for model 2. After an entire section was imaged, a 200-µm slice of tissue was removed and the process was repeated automatically. For

each slice, the Z position of the sample was adjusted in order to have the focus approximately 50  $\mu\text{m}$  under the tissue surface, thus avoiding imaging of deformed tissue due to its slicing. The images from both in vivo and ex vivo systems were analyzed using Matlab. Anatomical landmarks allowed for a precise sub-millimeter colocalization of in vivo and ex vivo images, along with the calculation of the shrinkage ratio of the excised tissue. To obtain three-dimensional (3D) reconstructions, imaging data was downsampled to a voxel size of 4  $\mu\text{m}$  by 4  $\mu\text{m}$  by 200  $\mu\text{m}$ , converted in DICOM and loaded with Osirix (Pixmeo, Geneva, Switzerland). A maximum intensity projection algorithm was applied to generate a three-dimensional view of the vessels. The ex vivo imaging system generated cross-sectional OCT image slices with a pixel size of 2  $\mu\text{m}$  by 2  $\mu\text{m}$  and a depth of 6.5  $\mu\text{m}$ . The resulting dataset had a size of over 500 GB. In fluorescence confocal microscopy, one cross-sectional image was obtained for each 200- $\mu\text{m}$  depth. Colocalization between the IVUS and OCT images was performed. [Figure 6](#) compares the OCT reconstruction with the IVUS scan for rabbit 1. Colocalization between images relied on finding biological landmarks, primarily bifurcations. Pullbacks began at the bifurcation between the left and right iliac artery and could be seen on both types of scans, providing a good starting point. For model 1, aortas were imaged using the aforementioned OCT/confocal microscope, but with a 3 $\times$  air objective and a 5  $\mu\text{m}$   $\times$  5  $\mu\text{m}$  pixel size. Axial resolution was unchanged. A glass was added between the objective and the water to create an air chamber. The field of view (FOV) in the lateral directions was set to 2.5 mm  $\times$  2.5 mm. The ICAM-1 fluorophore was sensitive to a 776 nm wavelength. The 3 $\times$  objective did not allow for a high enough signal-to-noise ratio (SNR) with a small pinhole (100  $\mu\text{m}$ ), and an iris was used instead. This, however, came at the cost of lateral resolution (4.4  $\mu\text{m}$ ). The vibratome blade was inclined at an approximately 20-degree angle with the plane of the agarose gel. Connective tissue was removed before embedding the aorta in agarose with a razor blade. Three-dimensional reconstructions of the aortas were done using custom Python algorithms developed for this purpose. Since an iris was used instead of a pinhole, deconvolution was performed on the fluorescence images in order to locate more accurately the sources of signal.

For OCT images, the first reconstruction step was to find the volumes position within the mosaic reference frame. A displacement model of the sample-motorized stage was used to estimate each XY tile position within the mosaic. The model parameters were estimated from the data by computing the phase-correlation based pairwise registration [[23](#)] of all neighboring tiles within the

mosaic and by inverting the model, solving for each parameter. The next step was to stitch together the volumes for each slice. Adjacent volumes were blended together by finding the medial axis of their 2D overlap region and by applying a small Gaussian feathering to ensure a smooth transition between tiles. Each tissue slice was stitched separately.

A few post processing steps were then applied on each slice to remove intensity artifacts, to limit the field of view to the tissue, to compute the lumen mask, and, finally, to estimate and compensate the light attenuation with depth in the OCT volumes. This last step was done by fitting a Beer-Lambert law on each A-Line and by estimating the attenuation coefficient from this fit [24]. The Beer-Lambert law was then used again with the average tissue attenuation coefficient to normalize the OCT volume and thus reduce its contrast variation with depth.

The last reconstruction step was to stitch the slices together in the z direction to get a complete 3D volume. This was done by computing the shift between adjacent slices using the cross-correlation of their 2D image gradient magnitude. Then, the slices were stitched together by solving the Laplace equation with Dirichlet boundary conditions over their masked overlap region. The tissue mask was used to remove the gaps introduced by the slice cutting artifacts.

Colocalization between the IVUS and OCT images was performed. Colocalization between images relied on finding biological landmarks, primarily vessel bifurcations. Pullbacks began at the bifurcation between the left and right iliac artery and could be seen on both types of scans for model 2, providing a good starting point. The distance between the same landmarks was measured by knowing the pixel size (6.5  $\mu\text{m}$ ) for OCT, and by comparing it to the distance found on the IVUS data, which was recorded during acquisition.

## 4.5. Conclusions

In conclusion, a method for atherosclerotic plaque detection and molecular characterization has been investigated both *in vivo* and *ex vivo* in a rabbit model. The *in vivo* method relied on an intravascular catheter that combined IVUS and fluorescence imaging, while the *ex vivo* method combined an OCT and a fluorescence confocal microscope with a custom serial slicer and stitching algorithm to reconstruct whole 3D segments of aortas and locate the presence of plaque with great accuracy. Colocalization between the *in vivo* and *ex vivo* data was performed by finding landmarks between the IVUS and OCT volumes. This massive histology method is a promising approach to validating future intravascular catheters; it could potentially become a new gold standard to

validate intravascular molecular imaging, and it is a great addition to the currently used histology methods.

**Acknowledgments:** This study was supported by CIHR operating grant 273578 to F. Lesage.

**Author Contributions:** Pier-Luc Tardif, Maxime Abran, Alexandre Castonguay, and Joël Lefebvre acquired the 3D histology data and performed image reconstruction; Philippe L'Allier, Marie-Jeanne Bertrand, Maxime Abran, Nolwenn Merlet, Teodora Mihalache-Avram, Pascale Geoffroy, Mélanie Mecteau, and David Busseuil performed the catheter experiments; Feng Ni and Abedelnasser Abulrob synthesized the molecular probes; Éric Rhéaume and Teodora Mihalache-Avram performed histological validations; Philippe L'Allier, Marie-Jeanne Bertrand, and Frédéric Lesage wrote the article; Philippe L'Allier, Jean-Claude Tardif, and Frédéric Lesage designed and supervised the study.

**Conflicts of Interest:** authors declare no conflict of interest

Libby, P.; Okamoto, Y.; Rocha, V.Z.; Folco, E. Inflammation in atherosclerosis transition from theory to practice. *Circ. J.* **2010**, *74*, 213–220.

Libby, P.; Ridker, P.M.; Hansson, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **2011**, *473*, 317–325.

Bentzon, J.F.; Otsuka, F.; Virmani, R.; Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 1852–1866.

Muller, J.E.; Tofler, G.H.; Stone, P.H. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* **1989**, *79*, 733–743.

Mintz, G.S.; Painter, J.A.; Pichard, A.D.; Kent, K.M.; Satler, L.F.; Popma, J.J.; Chuang, Y.C.; Bucher, T.A.; Sokolowicz, L.E.; Leon, M.B. Atherosclerosis in angiographically “normal” coronary artery reference segments: An intravascular ultrasound study with clinical correlations. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1995**, *25*, 1479–1485.

Tardif, J.C.; Lesage, F.; Harel, F.; Romeo, P.; Pressacco, J. Imaging biomarkers in atherosclerosis trials. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2011**, *4*, 319–333.

Berry, C.L.; L'Allier, P.; Grégoire, J.; Lespérance, J.; Lévesque, S.; Ibrahim, R.; Tardif, J.C. Comparison of intravascular ultrasound and quantitative coronary angiography for the assessment of coronary artery disease progression. *Circulation* **2007**, *115*, 1851–1857.

- Mintz, G.S.; Garcia-Garcia, H.M.; Nicholls, S.J.; Weissman, N.J.; Bruining, N.; Crowe, T.; Tardif, J.C.; Serruys, P.W. Clinical experts consensus document on standards of acquisition, measurement and reporting of intravascular ultrasound regression/progression studies. *EuroIntervention* **2011**, *6*, 1123–1130.
- Sanchez, O.D.; Sakakura, K.; Otsuka, F.; Yahagi, K.; Virmani, R.; Joner, M. Expectations and limitations in contemporary intravascular imaging: Lessons learned from pathology. *Expert Rev Cardiovasc. Ther.* **2014**, *12*, 601–611.
- Abran, M.; Cloutier, G.; Cardinal, M.H.R.; Chayer, B.; Tardif, J.C.; Lesage, F. Development of a photoacoustic ultrasound and fluorescence imaging catheter for the study of atherosclerotic plaque. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **2014**, *8*, 696–703.
- Dixon, A.J.; Hossack, J. Intravascular near-infrared fluorescence catheter with ultrasound guidance and blood attenuation correction. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, doi:10.1117/1.JBO.18.5.056009.
- Mallas, G.; Brooks, D.H.; Rosenthal, A.; Nudelman, R.N.; Mauskapf, A.; Jaffer, F.A.; Ntziachristos, V. Improving quantification of intravascular fluorescence imaging using structural information. *Phys. Med. Biol.* **2012**, *57*, 6395–6406.
- Bec, J.; Xie, H.; Yankelevich, D.R.; Zhou, F.; Sun, Y.; Ghata, N.; Aldredge, R.; Marcu, L. Design construction and validation of a rotary multifunctional intravascular diagnostic catheter combining multispectral fluorescence lifetime imaging and intravascular ultrasound. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *4*, 319–333.
- Jaffer, F.A.; Calfon, M.A.; Rosenthal, A.; Mallas, G.; Razansky, R.N.; Mauskapf, A.; Weissleder, R.; Libby, P.; Ntziachristos, V. Two-dimensional intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of inflammation in atherosclerosis and stent-induced vascular injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *57*, 2516–2526.
- Jaffer, F.A.; Vinegoni, C.; John, M.C.; Aikawa, E.; Gold, H.K.; Finn, A.V.; Ntziachristos, V.; Libby, P.; Weissleder, R. Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis. *Circulation* **2008**, *118*, 1802–1809.
- Nahrendorf, M.; Jaffer, F.A.; Kelly, K.A.; Sosnovik, D.E.; Aikawa, E.; Libby, P.; Weissleder, R. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation* **2006**, *114*, 1504–1511.

- Rouleau, L.; Berti, R.; Ng, V.W.K.; Matteau-Pelletier, C.; Lam, T.; Saboural, P.; Kakkar, A.K.; Lesage, F.; Rhéaume, E.; Tardif, J.C. VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice. *Contrast Med. Mol. Imaging* **2013**, *8*, 27–39.
- De Vries, B.M.W.; Hillebrands, J.; van Dam, G.M.; Tio, R.A.; de Jong, J.S.; Slart, R.H.J.A.; Zeebregts, C.J. Images in cardiovascular medicine. Multispectral near-infrared fluorescence molecular imaging of matrix metalloproteinases in a human carotid plaque using a matrix-degrading metalloproteinase-sensitive activatable fluorescent probe. *Circulation* **2009**, *119*, e534–e536.
- Abra, M.; Stähli, B.E.; Merlet, N.; Mihalache-Avram, T.; Mecteau, M.; Rhéaume, E.; Busseuil, D.; Tardif, J.C.; Lesage, F. Validating a bimodal intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) catheter for atherosclerotic plaque detection in rabbits. *Biomed Opt Express* **2015**, *6*, 3989–3999.
- Wang, H.; Zhu, J.; Akkin, T. Serial optical coherence scanner for large-scale brain imaging at microscopic resolution. *NeuroImage* **2014**, *84*, 1007–1017.
- Castonguay, A.; Avti, P.K.; Moeini, M.; Pouliot, P.; Tabatabaei, M.S.; Bélanger, S.; Lesage, F. Investigating the correlation between white matter and microvasculature in aging using large scale optical coherence tomography and confocal fluorescence imaging combined with tissue sectioning. *Proc. SPIE* **2015**, *9328*, doi:10.1117/12.2077830.
- Pande, A.N.; Kohler, R.H.; Aikawa, E.; Weissleder, R.; Jaffer, F.A. Detection of macrophage activity in atherosclerosis in vivo using multichannel, high-resolution laser scanning fluorescence microscopy. *J Biomed Opt.* **2006**, *11*, doi:10.1117/1.2186337.
- Preibisch, S.; Saalfeld, S. Fast stitching of large 3d biological datasets. In Proceedings of the 2nd ImageJ User and Developer Conference, Luxembourg, 7–8 November 2008.
- Faber, D.; van der Meer, F.; Aalders, M.; van Leeuwen, T. Quantitative measurement of attenuation coefficients of weakly scattering media using optical coherence tomography. *Opt. Express* **2004**, *12*, 4353–4365.

## CHAPITRE 5 ÉTUDE SUR LES PORCS DIABÉTIQUES

Les expériences réalisées chez les lapins constituaient une étude préliminaire. L'étude principale est menée chez des porcs diabétiques. Les procédures sur les animaux ont été réalisées mais l'analyse des données est encore en cours de route. Le protocole était similaire à celui suivi chez les lapins, mais des modalités d'imagerie additionnelles ont été employées. Les codes de reconstructions ont aussi été optimisés.

### 5.1 Méthodologie

Huit porcs mâle diabétique castrés de souche Yucatan (Sinclair Laboratories, Missouri, USA) âgés de 7 mois et pesant environ 25 kg ont été soumis à une diète avec une haute teneur en gras 20% lard, 2% cholestérol et 1.5% cholate de sodium). Les animaux ont été soumis à la diète pendant 20 semaines, jusqu'au sacrifice des animaux. Le diabète était induit chez les animaux par injection d'alloxan par la compagnie Sinclair Laboratories avant leur réception à l'ICM. La glycémie des porcs était mesurée deux fois par jour pendant la période d'acclimatation des porcs (7 jours) et une fois par semaine ensuite, ou quand des changements au comportement des animaux étaient observés (léthargie, désorientation, diminution de l'appétit, troubles d'équilibre, tremblements, convulsions et coma). De l'insuline (0.1 U/kg sous-cutané, mélange d'insuline R ( $\frac{1}{3}$  dose) et insuline NPH ( $\frac{2}{3}$  dose)) était administrée au besoin.

Les animaux étaient intubés et maintenus endormis par inhalation d'isoflurane (0,5-1,5%) pendant la procédure. En plus du cathéter multimodalités, capable d'acquérir des données IVUS, NIRF et photoacoustiques, 3 autres techniques d'imagerie étaient employées, soient l'histologie virtuelle par IVUS (IVUS-VH), l'OCT et la spectroscopie par proche infrarouge (NIRS). Ces modalités étaient toutes réalisées à l'aide d'un cathéter différent. La taille de chaque cathéter, leur fréquence d'acquisition des images, leur énergie requise, la vitesse des *pullbacks* ainsi que les caractéristiques morphologiques visualisées sont résumés dans le tableau 1

Tableau 4.1: Caractéristiques des cathéters imageant avec différentes modalités

	Taille cathéter	Fréquence d'images (images/s)	Énergie MHz	Pullback (mm/s)	Caractéristiques morphologiques visualisées de la plaque d'athérosclérose
IVUS	4.2	13	30	0,07	Fardeau lipidique, distribution de la plaque, calcifications, remodelage externe
NIRF					Macrophages
Photoacoustique					Composition et distribution de la plaque
IVUS-VH	3.5	7-30	30-40	1	Fardeau lipidique, composition de la plaque, distribution de la plaque, identification TCFA
OCT	2.7	15-20	15-20	1	Composition et distribution de la plaque, cap fibreux mince, macrophages, néovascularisation, collagène
NIRS	3.2	NA	40	0.5	Distribution de la plaque, macrophages

Les données étaient acquises dans les trois artères coronaires épicardiques principales, soient l'artère coronaire droite (RCA), l'interventriculaire antérieure (IVA) et la circonflexe gauche (LCX). Les cathéters étaient menés vers la portion distale des vaisseaux à l'aide d'un guide de 0.014 pouces, et les *pullbacks* étaient effectués de la portion distale à la portion proximale. Les bifurcations ne servaient de points de repères. Des données hémodynamiques et des mesures de sévérité des sténoses par *instant flow reverse* étaient acquises, mais les résultats dépassent le cadre de ce document et les résultats seront omis. À chaque site d'intérêt, une sonde (ICAM-1 ou collagène) était injectée *in situ* afin d'acquérir les données NIRF. Pour ICAM-1, on envoyait des contrôles positifs et négatifs afin de s'assurer que le signal obtenu était spécifique. On avait au total 8 contrôles positifs pour ICAM+ (#7329 (RCA), 7342 (LCX), 7343 (LCX), 7318 (RCA), 7303 (RCA), 7331 (LCX), 7332 (IVA) et Rose 1 (IVA)) et 5 ICAM- ((7342 (IVA), 7318 (LCX), 7329 (LCX), 7331 (IVA) 7332 (RCA) ). Pour la sonde collagène, nous avions deux contrôles positifs (7318 (IVA), 7332 (LCX) ). Les fluorophores liés aux sondes n'étaient pas les mêmes pour l'ICAM-1 et pour le collagène. Pour ICAM-1, la diode laser émettait à une longueur d'onde de 680nm et un dichroïque avec une longueur d'onde de coupure de. Pour la sonde collagène, le faisceau avait une longueur d'onde de 730nm avec un

dichroïque coupant à 780nm. Il fallait évidemment utiliser les diodes appropriées pour le microscope confocale aussi.

Les artères imagées *in vivo* ont été récupérées pour être imagées, tout comme les aortes de lapin, avec le microscope OCT/Confocal. Avant le tranchage, les coronaires étaient imaginées avec le Lumina. Les artères tranchées étaient conservées afin d'être analysées en histologie. En raison du grand nombre de données, les vaisseaux étaient reconstruits avec une résolution de 21.5um afin d'accélérer le processus.

## 5.2 Résultats

Les résultats comparant les signaux de fluorescence obtenus avec le cathéter, le Lumina et le microscope confocal. Plus précisément, nous voulions déterminer s'il était possible d'obtenir un signal spécifique à l'ICAM-1 et au collagène, et ce d'une modalité à l'autre. Les tableaux 2 et 3 résument les résultats pour la sonde ICAM-1 et collagène respectivement.

Tableau 4.2 : Résultats en fluorescence pour le cathéter, le Lumina et le microscope confocal pour les sondes ICAM-1

Coronaire	Contrôle (+/-)	Fluorescence cathéter	Fluorescence Lumina	Fluorescence confocal
7342-LCX	+	Fort	Fort	Faible
7343-LCX	+	Faible	Faible	Fort
7329-RCA	+	Faible	Fort	-
7318-RCA	+	Fort	Fort	Fort
7303-RCA	+	Fort	Fort	-
7331-LCX	+	Fort	Fort	Fort
7332-LAD	+	Fort	Fort	-
Rose-1 (Porc sain) – LAD	+	Fort	Fort	Fort
7342-LAD	-	Fort	Aucun	-
7329-LCX	-	-	Aucun	Très Faible
7318-LCX	-	Faible	Aucun	Très Faible
7331-LAD (post-mortem)	-	Fort	Fort	Très Faible
7332-RCA	-	Fort	Fort	Fort
Rose-1 (Porc sain) – RCA	-	Aucun	Aucun	-

Tableau 4.3 : Résultats en fluorescence pour le cathéter, le Lumina et le microscope confocal pour les sondes collagène.

Coronaire	Contrôle (+/-)	Fluorescence cathéter	Fluorescence Lumina	Fluorescence confocal
7332-LCX	+	Fort	Fort	Fort
7303-Carotide Gauche	+	Fort	Fort	-
7318-LAD	+	Faible	Fort	Faible
Rose-2 (porc sain)-LCX	+	-	Fort	Faible
7303-LAD	-	Faible	Aucun	Aucun

Certains résultats ne figurent pas pour le microscope confocal, car les premières acquisitions ont seulement été réalisées en OCT, sauf pour l'artère 7303-LAD, qui n'a pas été tranchée au moment de la rédaction. Pour le porc Rose-2, l'animal est mort avant de pouvoir faire l'acquisition par cathéter, mais la sonde a quand même été injectée. On s'attend évidemment à avoir un signal fort chez les contrôles positifs et faible ou non-existent chez les contrôles négatifs. C'est généralement ce qu'on observe, voir les annexes A et B, mais il y a quelques cas qu'il est nécessaire de discuter. Principalement, nous avons obtenu un signal important pour toutes les modalités pour les coronaires 7331-LAD et 7332-RCA. Dans le premier cas, l'injection de la sonde a été faite après le décès de l'animal. Sans circulation sanguine, le fluorophore demeure au site de l'injection même si l'anticorps ne se lie pas nécessairement à la molécule d'intérêt. On aura donc un signal non spécifique très puissant. Dans le cas de 7332-RCA, on observait un signal très fort dans les trois modalités. Ce résultat est surprenant car l'injection n'a pas été réalisée post-mortem dans ce cas. Il est possible qu'il s'agisse d'un faux positif, ou que la mauvaise sonde ait été injectée. Pour les sondes ICAM-1+, les résultats concordent entre toutes les modalités.

Dans le cas des données confocales, était nécessaire de distinguer le signal fluorescent spécifique à la sonde de l'autofluorescence générée par les tissus. Pour ce faire, nous partions de l'hypothèse que le signal spécifique se situait uniquement sur les parois du lumen. On pouvait alors sélectionner des régions de tissus situés loin des parois et calculer le signal moyen, et le comparer au signal loin le long des parois. On mesurait aussi le SNR entre le signal présumé spécifique et le bruit de fond, soit le signal moyen mesuré dans l'agarose. Les résultats présentés dans le tableau 4 montrent la tranche avec le meilleur SNR dans chaque cas. Les valeurs de signaux brutes sont basées sur une échelle arbitraire dans l'interface MATLAB allant de 0 à 7. Les résultats pour la sonde ICAM-1 sont montrés dans le tableau 4.

Tableau 4.4: Mesures de fluorescence en microscopie confocale pour la sonde ICAM-1+. La plage dynamique allait de 0 à 7.

Coronaire	Contrôle (+/-)	Signal parois	Signal tissu	Signal agarose	Rapport parois/tissu	SNR
7342-LCX	+	0.1090	0.0136	0.0096	8.0147	11.4136
7343-LCX	+	0.6760	0.0218	0.0078	31.0092	87.0013
7318-RCA	+	0.2340	0.0191	0.0083	12.2513	28.3293
7331-LCX	+	1.7360	0.0889	0.0085	19.5276	203.7559
Rose-1 (Porc sain) - LAD	+	0.4650	0.0132	0.0015	35.2273	314.1892
7329-LCX	-	1.5290	0.4570	0.0459	3.3457	33.3115
7318-LCX	-	0.1870	0.1010	0.0086	1.8515	21.7189
7331-LAD (post-mortem)	-	0.2410	0.0494	0.0073	4.8785	33.1044
7332-RCA	-	1.3530	0.1020	0.0255	13.2647	53.0588

On remarque premièrement que même les signaux les plus forts (1.736) restait bien en dessous du maximum de la plage dynamique. Ceci s'expliquait par l'objectif 3X qui ne collectait pas assez de lumière pour saturer le détecteur. On définissait arbitrairement qu'un rapport de signal parois/tissu de plus de 10 était "Fort", qu'un d'entre 5 et 10 était "Faible" et que de moins de 5 était "Très faible". Un signal très faible peut être considéré comme non-existant selon notre estimation. En comparant les rapports parois/tissu pour les contrôles positifs et négatifs à l'aide d'un t-test non-pairé, on trouve un P-value de 0.0461 entre les deux distributions, avec un t-value de 2.41. Cela semble suggérer qu'on peut effectivement utiliser notre méthode *ex vivo* afin de diagnostiquer avec confiance la présence ou non de ICAM-1 dans la plaque et rejeter l'hypothèse nulle. Cependant, plusieurs sources d'erreurs, comme le petit nombre d'échantillons, sont à considérer. Ces causes d'erreurs seront discutées plus en détail dans la section de discussion qui suit.

Tableau 4.5 : Mesures de fluorescence en microscopie confocale pour la sonde collagène. La plage dynamique allait de 0 à 7.

		Signal parois	Signal tissu	Signal agarose	Rapport parois/tissu	SNR
7332-LCX	+	0.0191	0.0094	0.0099	2.0341	1.9391
7318-IVA	+	0.0222	0.0098	0.0074	2.2769	3.0000
Rose 2-LCX (post-mortem)	+	0.0280	0.0124	0.0084	2.2581	3.3215
7303-IVA	-	0.0016	0.0010	0.0008	1.5347	1.8343

Les résultats en fluorescence avec le microscope confocal pour la sonde collagène sont montrés dans le tableau 5. On remarque que les SNR étaient extrêmement faibles dans tous les cas, et qu'il est pratiquement impossible de distinguer le signal provenant de la sonde avec l'autofluorescence. Le signal était difficile à distinguer de l'autofluorescence est que le collagène, contrairement au ICAM-1+, ne se retrouve pas principalement sur les parois externes de la plaque. On le retrouve dans la plaque dans les tissus du vaisseau lui-même. On délimitait deux catégories de signal avec la méthode

de Otsu et on supposait que la classe avec les plus grandes valeurs correspondait au signal spécifique. Même en faisant cela, un rapport de 2.03 entre le signal présumé spécifique et l'autofluorescence est beaucoup trop petit pour affirmer que la sonde fonctionne. Encore une fois, peut-être qu'un objectif avec une puissance de grossissement supérieure permettrait de valider ou d'infirmer la qualité de la sonde. La puissance du laser aurait aussi pu être augmentée pour une même tranche. Si la ratio signal/tissu augmente, cela suggère que le signal est bel et bien lié à la présence de la sonde. Il est aussi impossible pour nous de dire si on peut distinguer les populations des deux groupes en termes de signal. On ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle et dire que les deux groupes sont significativement différents. Évidemment, si l'expérience était à refaire, un plus grand nombre d'échantillons augmenterait le poids de l'analyse des résultats, car il est très difficile de tirer une conclusion avec seulement 3 positifs et 1 négatif. Cependant, les résultats *in vivo* et ceux faits avec le Lumina étaient très encourageants et semblaient montrer que la sonde était efficace dans le cas de l'analyse par cathéter, comme le montre le tableau 3.

L'OCT peut aussi être utilisé pour voir directement la présence de plaque athérosclérotique sur les parois de l'intima. Comme on peut voir sur la figure 16, le signal provenant de la plaque est moins fort que celui provenant du tissu. On peut voir que la pathologie était assez avancée chez l'animal. Cependant, les vaisseaux sanguins s'affaissent lorsqu'il n'y a plus de pression sanguine et la plaque semble plus occlusive qu'elle ne l'était réellement. Cette image a été reconstruite à 10um au lieu de 21.5um pour mieux montrer le pouvoir de résolution et la qualité d'image qu'il était possible d'obtenir avec notre système. L'aspect 3D de la modalité permet aussi d'obtenir une localisation précise de la plaque et de mesurer sa position par rapport au début du *pullback*. On calculait une longueur de vaisseau de 22,22mm, comparativement au *pullback* de 30mm. Les tissus ont tendance à rapetisser après l'extraction des vaisseaux. Il y a cependant d'autres causes qui peuvent induire des biais dans le calcul de mesure de la longueur des vaisseaux. Premièrement, en raison de la discrétisation de la longueur en pixels, la précision du recouvrement des tranches lors du recollage en z ne peut être supérieure à la taille des voxels. Il est donc possible qu'à chaque tranche, on ajoute une erreur de 10um. Par exemple, sur la figure 17, on avait un total de 89 tranches, ce qui peut mener à une erreur de 890um sur la longueur totale. À noter qu'il est possible d'avoir des erreurs de recouvrement de plus d'un voxel, ce qui accentue le problème. De plus, il était parfois difficile de

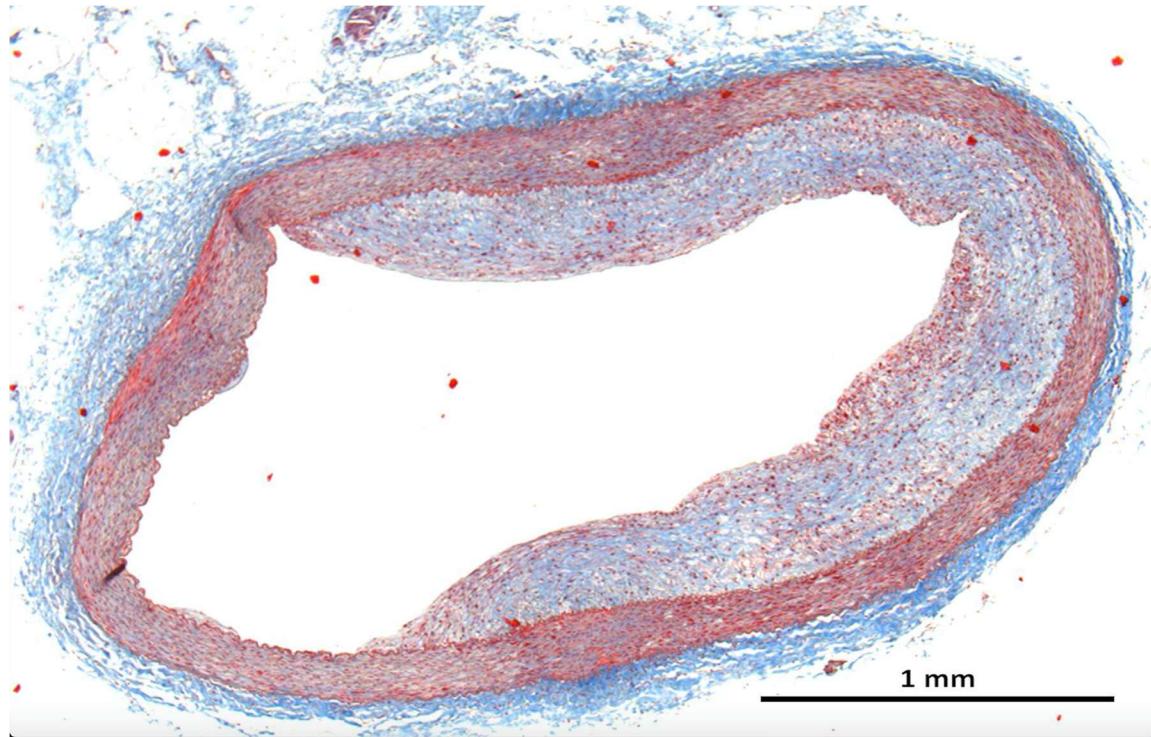


Figure 17: LAD du porc 7331, imaged en OCT.

(A) Vue transversale. (B) Moyenne projetée selon l'axe des Z d'une tranche de la LAD du porc 7331. Le volume a été reconstruit à 10um de résolution. La région entourée en vert montre une plaque athérosclérotique. Les tranches noires sont causées par des défauts liés au tranchage qui font que certaines tranches n'étaient pas au focus pendant l'acquisition.

garder le vaisseau parfaitement droit dans le réceptacle de plastique lorsqu'il était fixé dans l'agarose. Un échantillon qui était légèrement de biais semblait plus court lorsque imaged à l'OCT. Ces différences de longueur entre les modalités rendaient la coregistration de signal en fluorescence plus difficile entre les données *in vivo* et *ex vivo*. On peut voir un exemple sur la figure 18. Si on compare la position des tranches choisies par rapport à la longueur totale du vaisseau imaged, on trouve des rapports de 0.29 *in vivo* et 0.25 *ex vivo*. La légère différence peut être expliquée par le fait qu'il n'y avait pas de marqueur anatomique claire et que les deux tranches ont dû être choisie approximativement. Les différences de longueur peuvent être expliquées par les biais sur les mesures *ex vivo* énoncées préalablement. La différence de longueur entre les deux modalités semble être plus grande si on reconstruit à plus faible résolution. Comme expliqué précédemment, on accumule en général une erreur d'au moins un voxel à chaque tranche. Si les voxels sont plus gros, l'erreur accumulée est pire.

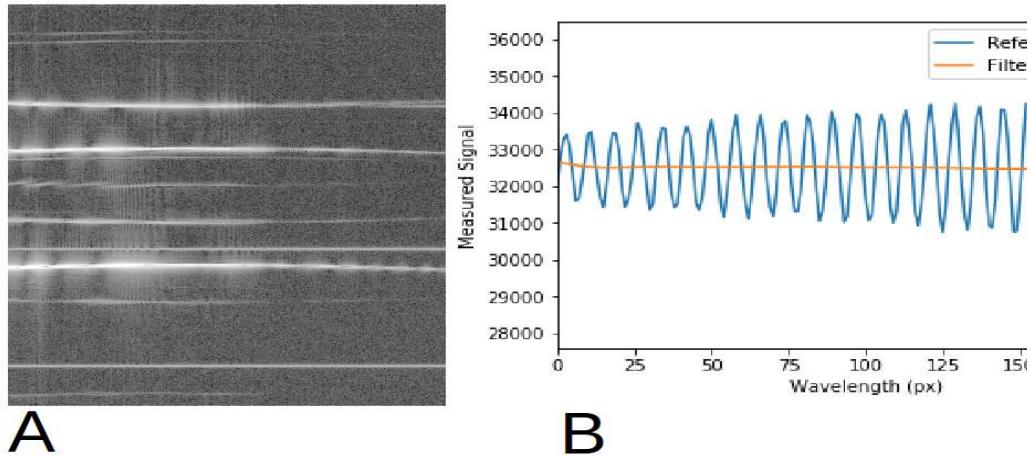


Figure 18: Figure 17: Exemple de résultats obtenus dans la LCX du porc 7331 (ICAM-1 +)

Comparaison des coupes transversales en IVUS (A) et en OCT(B). Les lignes pointillées vertes sur (A) soulignent l'intima du vaisseau. La partie distale du vaisseau est au bas de l'image dans les deux cas. (C) montre une superposition des images IVUS (noir et blanc) et NIRF (couleurs) pour une tranche à 8.75mm de la portion distale. (D) montre la superposition des images OCT (noirs et blancs) et confocal (rouge) à une distance de 989um de la portion distale.



La figure 19 montre un exemple de résultats comparant les données acquises avec le Lumina et celles acquises *in vivo* avec le cathéter.

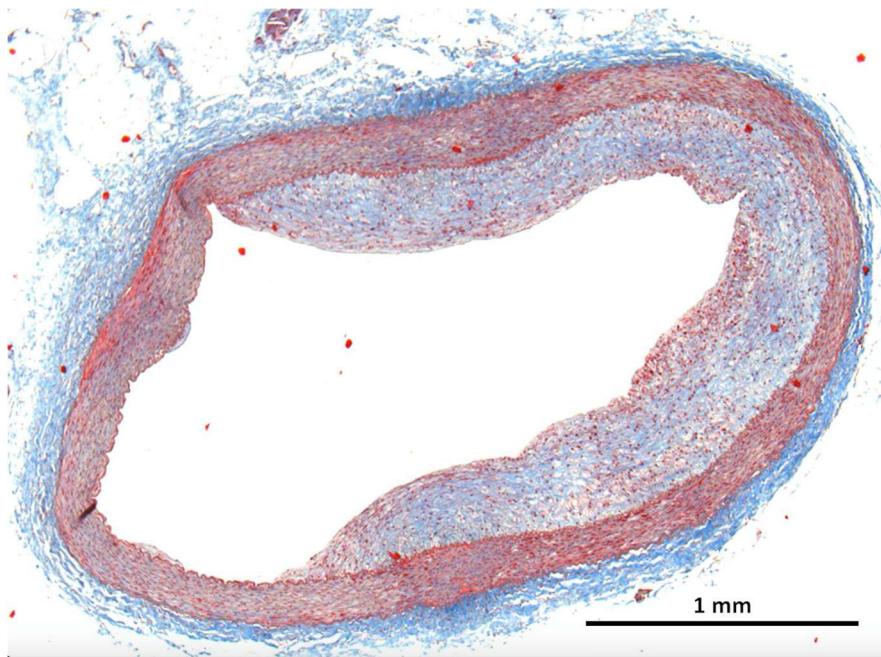


Figure 19: Comparaison du signal fluorescent sur la longueur de la LCX du porc 7331

L'image (A) avec le Lumina et avec le cathéter (B). On observe un signal en fluorescence fort sur toute la longueur du vaisseau dans les deux cas. On remarque qu'il est important d'utiliser la bonne échelle dans le cas du Lumina, car sinon on peut ne pas percevoir le signal adéquatement (gauche)

## CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

### 6.1 Étude chez le lapin

L'étude chez le lapin semble démontrer que le cathéter multimode pourrait éventuellement devenir une méthode efficace de détection et de caractérisation de plaques d'athérosclérose. L'IVUS permet de localiser les plaques et d'estimer le fardeau lipidique, ce qui ne peut pas être fait par l'angiographie coronarienne. De plus, le NIRF quantifie la présence d'un marqueur moléculaire désiré, contrairement à l'IVUS. La conjugaison des deux méthodes offrirait donc un outil permettant de diagnostiquer et prévenir plus adéquatement les accidents coronariens. Cependant, l'introduction d'une nouvelle méthode comme celle présenté dans ce manuscrit nécessite tout d'abord une validation rigoureuse et une coregistration robuste à l'aide d'une méthode *in vivo*. C'est pourquoi les données étaient imagées analysées avec le Lumina et notre microscope multimode lié au trancheur sérié. Nous avons démontré qu'il était possible de coregistrer la présence de fluorescence sur les données *in vivo* et *ex vivo* en utilisant des marqueurs anatomiques, comme des bifurcations, comme points de repères. La comparaison entre les données NIRF et les données acquises au Lumina correspondent presque parfaitement si on compare les positions et les intensités des signaux. De plus, les tests réalisés sur des cellules HUVEC activées au TNF-alpha montrent que la sonde utilisée possède des affinités avec l'inflammation, ce qui suggère que le signal fluorescent obtenu avec les différentes modalités est spécifique et lié à la présence de lésions athérosclérotiques.

L'étude nous a aussi permis de cibler les principaux problèmes et faiblesses du protocole, surtout en lien à la reconstruction des données. Premièrement, le tranchage est plus difficile en raison des tissus conjonctifs et de la rigidité des vaisseaux. En effet, le microscope avait auparavant uniquement été utilisé pour couper des cerveaux, qui se tranchent plus facilement. Nous observons donc parfois des défauts de coupe, qui font en sorte que l'interface de la tranche imagée sort du focus, ce qui diminue la qualité des images. De plus, si la tranche sort du focus, elle se trouve parfois dans la région où des harmoniques générées par la lamelle de verre sont présents. On observait alors de forts artéfacts, masquant le signal du tissu. Le passage d'un objectif de 10X à 3X imposait de placer une iris au lieu d'un sténopé. Tel que mentionné, cela diminue la résolution axiale et latérale en microscopie confocale et force l'utilisateur à déconvoluer les données.

L'étude préliminaire chez les lapins visait à qui valider la faisabilité de la méthode, des tests par cathéter jusqu'à l'analyse des tranches en histologie conventionnelle. Elle nous a permis de confirmer que la procédure pouvait être complétée chez le lapin sans que l'animal meure au cours de la prise de données, que les aortes pouvaient être récupérées après le sacrifice, que les aortes pouvaient être imagées entièrement avec le microscope OCT/confocal, et que les tranches pouvaient être analysées en histologie sans être endommagées dans une étape préalable. Cependant, tous les animaux étaient dans le groupe positif (ie aucune sonde non-spécifique n'était testée). Il est donc impossible pour nous de d'affirmer que la méthode, permet de distinguer entre des individus d'un groupe positif ou négatif. On ne peut donc pas confirmer à la fin de cette étude que le cathéter permet véritablement de poser un diagnostic sur l'état de santé de l'animal. De plus, il n'est pas clair qu'il existe véritablement un lien entre la quantité d'ICAM-1 présent dans les plaques d'athérosclérose et la vulnérabilité de ces dernières. L'étude ne prouve donc pas que notre protocole, *in vivo* ou *ex vivo*, permet d'évaluer la vulnérabilité des plaques. Finalement, les résultats obtenus avec le microscope et le vibratome tels que présentés dans l'article sont purement qualitatifs, surtout en ce qui a trait à la fluorescence. En effet, les résultats sont plutôt de nature binaire (y a-t-il présence de signal ou non).

Malgré ces faiblesses, l'étude a rempli son rôle de preuve de concept, et nous a permis de démontrer qu'il était possible de coregistrer les données entre les modalités. De plus, les expériences ont permis de confirmer qu'il était possible d'obtenir une carte anatomique à haute résolution d'un vaisseau entier en OCT et de superposer à cela des données acquises en microscopie confocale. Finalement, nous avons prouvé qu'il est possible de comparer nos résultats avec l'histologie conventionnelle, qui demeure l'étalon-or en biologie moléculaire.

## 6.2 Étude chez le porc

L'étude chez le porc était plus exhaustive et rigoureuse que celle chez le lapin. En effet, des sondes positives et négatives étaient utilisées afin de vérifier si nos différents dispositifs pouvaient distinguer un signal spécifique d'un non spécifique. De plus, deux sondes ciblant deux molécules différentes étaient testées (ICAM-1 et collagène) et le nombre d'échantillons étaient plus grand.

Les résultats sont encourageants, mais il est impossible de dire qu'ils sont concluants. En moyenne, on observe une plus grande quantité de signal chez les animaux du groupe contrôle positif par rapport au groupe négatif. On peut attribuer les résultats *in vivo* aberrants de la LAD du porc 7331 au fait que

l'injection ait été fait post-mortem. Cependant, le 7332-RCA demeure pour nous une donnée aberrante. Il est possible que la mauvaise sonde ait tout simplement ait été utilisée. Cependant, le faible signal en microscopie confocale suggère que le la sonde n'a pas adhéré à du ICAM-1 et que le fluorophore s'est enlevé après avoir lavé la coronaire. Il est aussi important de mentionner que le Lumina est une méthode simple et rapide de comparer le signal en fluorescence des différents vaisseaux. Cependant, la méthode n'a pas la résolution spatiale requise pour valider avec précision et coregistrer les mesures comme le microscope OCT/confocal le peut. On ne peut donc pas utiliser le Lumina comme étalon ou comme méthode de validation exclusive des données *pullbacks*.

Un des principaux problèmes du protocole était la grande quantité de tests effectués sur les animaux ainsi que le temps total de la procédure. En effet, l'animal pouvait être sous intubation pendant plusieurs heures avant même de passer à l'étape du cathéter multimode. Cela faisait en sorte que l'animal était parfois dans un état critique une fois rendu à ce point. Les porcs 7303 et 7332 sont morts pendant que la prise de données avec le cathéter IVUS/NIRF, et le porc 7318 a été victime d'un arrêt cardiaque pendant un des tests sur la carotide étiquetée avec le ICAM-1+ (RCA). La sonde ICAM-1+ a aussi été faite post-mortem chez le porc 7343. Dans une étude future, il serait donc peut-être préférable de tester moins de modalités d'imagerie afin de s'assurer que les tests sur notre cathéter multimode sont effectués adéquatement sur des animaux dans un état moins critique. À noter que les animaux étaient très malades au moment de la procédure et leur état précaire rendait l'anesthésie prolongée dangereuse en raison du risque d'arrêts cardiaques. Cette contrainte temporelle forçait les expérimentateurs à effectuer les manipulations le plus rapidement possible et des scans IVUS qui laissaient parfois à désirer ne pouvaient être recommencés. Typiquement, on voulait attendre 10 minutes entre le moment de l'injection et l'acquisition avec le cathéter. Cependant, il était parfois difficile de descendre dans les coronaires avec le cathéter et il arrivait parfois au cathéter de briser. Le temps entre l'injection et l'acquisition montait donc parfois jusqu'à 30 minutes, ce qui ajoutait encore plus de temps à la procédure.

La principale faiblesse du montage *ex vivo* était le fait que les images étaient acquises au 3X. Cela nuisait à la résolution axiale et latérale des données en fluorescence confocale, et rendait le signal plutôt faible par rapport à la plage dynamique de la PMT. Cela faisait en sorte qu'il était plus difficile de distinguer avec confiance un signal spécifique à un signal provenant d'autofluorescence des tissus. La résolution moindre rendait la localisation du signal moins précise, et nous forçait à déconvoluer les images et à appliquer des masques afin d'avoir des images acceptables. Les signaux en microscopie

confocale pour les coronaires étiquetées avec la sonde collagène sont tout simplement trop faible pour tirer une quelconque conclusion sur l'efficacité de la sonde ou du microscope.

Pour la reconstruction d'images OCT, tel que mentionné précédemment, la rigidité des vaisseaux et la présence de tissus conjonctifs autour des coronaires rendaient le tranchage plus difficile et pouvaient causer des erreurs de recollage, ou pouvait faire en sorte que les tranches n'étaient pas au focus, lorsque imagées. Le grand nombre de coronaires et la grande quantité de données générées nous forçaient à reconstruire à plus basse résolution (21.5um au lieu de 10um ou 6.5um) afin de reconstruire et analyser le tout dans un temps raisonnable. Tel que mentionné préalablement, reconstruire avec de plus grands voxels augmentait l'erreur sur l'estimation de la longueur. Des tranches mal coupées pouvaient aussi induire de tel biais, car notre algorithme recollait alors mal les tranches voisines. Cela, combiné au rétrécissent des vaisseaux après leur extraction et à leur direction dans le gel d'agarose, menait parfois à des différences d'un facteur de presque 10 entre les longueurs mesurées en IVUS et les longueurs en OCT. Même si on peut tout de même coregistrer entre les deux modalités en se fiant sur les rapports de longueurs, il serait important de rectifier ces erreurs d'estimation de longueurs si on veut que la méthode devienne un standard de validation accepté rigoureux. Une solution pourrait être d'étudier plus en détail comment les tissus rétrécissent lorsque conservés pendant longtemps dans une solution de para-formaldéhyde à 4 degrés Celsius.

La quantité de coronaire est trop petite lorsque vient le temps de faire des analyses statistiques. La présence de deux faux positifs dans le cas des coronaires étiquetés ICAM-1 demeurent problématique. Même si on observe généralement plus de signal dans les coronaires ICAM-1+, et ce pour toutes les modalités, il est impossible pour nous d'affirmer avec certitude que le protocole présenté permet de distinguer entre les deux sondes. Notre t-test effectué semble montrer que les résultats tendent vers le résultat espéré, mais l'échantillonnage (5 positifs et 4 négatifs) est tout simplement trop faible.

La reproductibilité de la méthode est aussi quelque chose de questionable. En raison de la quantité de manipulations *in vivo* et *ex vivo*, du niveau de santé des animaux, de la déformation des tissus après l'extraction des vaisseaux, de l'objectif utilisé et de la difficulté de tranchage, il était difficile de copier parfaitement toutes les étapes pour chaque coronaire.

Tout comme l'étude chez le lapin, il n'est pas certain que les sondes utilisées ciblent des marqueurs qui font partie de la signature d'une plaque vulnérable. L'étude ne prouve donc pas que notre méthode estime la vulnérabilité des plaques d'athérosclérose. Les marqueurs ciblés ont été choisis en raison de

leur forte présence dans la vaste majorité des plaques d'athérosclérose. Une étude future devrait cibler un marqueur qui est connu pour son lien avec la vulnérabilité des plaques. Rappelons cependant que l'étude sur les porcs n'est pas encore terminée et que d'autre avenues se présentent devant nous afin de découvrir des marqueurs en lien avec la vulnérabilité des plaques. La technique d'imagerie *ex vivo* n'est pas réservée exclusivement à l'OCT et à la microscopie confocale. Le montage du vibratome et des moteurs peut être conjugué à d'autres types de microscopie ou de spectroscopie afin d'obtenir de l'information supplémentaire sur la composition moléculaire de plaque athérosclérotique. En effet, nous prévoyons combiner d'autres techniques, comme la spectroscopie Raman, la spectroscopie Raman cohérente anti-Stokes (CARS), la génération de seconde harmonique (SHG) et la fluorescence à deux photons. Il sera donc possible de découvrir de nouveaux marqueurs moléculaires précurseurs de la rupture de plaque athérosclérotique et de syndromes coronariens aigus. Nous envisageons aussi de développer des algorithmes permettant d'identifier les différents types de tissus imaginés avec l'OCT, et de les segmenter selon leurs caractéristiques (réflectivité, atténuation, entropie, polarisation, etc.). Nous espérons ainsi pouvoir détecter et distinguer différents types de plaques uniquement à l'aide des données OCT, ce qui ouvrirait la porte à des diagnostics renseignant sur la composition moléculaire et la géométrie des plaques avec une seule modalité d'imagerie.

## CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Il est essentiel de faire un retour sur les objectifs énoncés préalablement afin de pouvoir tirer des conclusions sur le projet.

- 1- Prouver que le protocole peut être réalisé entièrement dans un modèle animal, et les vaisseaux sanguins peuvent être analysés *ex vivo* : L'article présenté dans la section précédente démontre que tout le protocole, de la diète des lapins jusqu'à l'analyse des tranches en histologie conventionnelle. Nous avons démontré que la procédure d'anesthésie et d'imagerie *in vivo* est réalisable chez les lapins sans que l'animal ne meure pendant la procédure. De plus, il a été démontré qu'il était possible de récupérer les lits vasculaires étudiés après le sacrifice, et de les conserver afin de les imager avec le microscope OCT/confocal développé par notre équipe. Chez les porcs, la quantité de tests et le temps des procédures faisait en sorte qu'il n'était pas toujours possible d'acquérir toutes les données désirées en raison de l'état précaire dans lequel se trouvait l'animal.
- 2- Développer une méthode de avec notre microscope OCT/Fluorescence permettant de valider les résultats acquis avec le cathéter multimode, plus précisément de colocaliser le signal fluorescent entre les deux modalités : Les deux études ont démontré que l'histologie virtuelle massive performée *ex vivo* permet de corroborer les mesures obtenues à l'aide du cathéter multimode. Plus précisément, il était possible de colocaliser des plaques avec l'OCT comme carte anatomique et la fluorescence comme source de signal provenant de la plaque.
- 3- Être en mesure de créer des cartes 3D avec les données OCT du microscope permettant de localiser la plaque athérosclérotique : Cela a été réalisé chez le lapin et le porc grâce au microscope à double modalités. Il y avait cependant des erreurs de recollage des tranches et des artefacts liés aux composantes du système et à la difficulté de trancher correctement les vaisseaux.
- 4- Prouver que notre protocole permet de distinguer les contrôles positifs et négatifs pour les différences sondes : En raison de nombreux facteurs liés à la difficulté des manipulations, il est très difficile d'obtenir des résultats constants et fiables. De plus, la présence de faux positifs nous fait douter de la fiabilité et de la spécificité de la méthode. Le nombre d'échantillons de coronaires est aussi petit, surtout considérant le fait que les coronaires n'ont pas toujours pu être imagées dans toutes les modalités, soit à cause d'erreurs des expérimentateurs ou à cause

de la mort prématurée de l'animal. La méthode présentée dans ce document semble toutefois prometteuse. Des scans additionnels avec le cathéter ont été réalisés chez d'autres lapins afin de perfectionner les résultats et obtenir plus de données. Les résultats de ces tests sont présentement en analyse.

Si un expérimentateur voulait s'inspirer de ce document afin de créer un protocole ou des dispositifs semblable aux nôtres, ou s'il/elle voulait recréer les expériences montrées, il y a quelques recommandations à considérer. Premièrement, diminuer le nombre de procédures sous anesthésie augmenterait les chances de pouvoir terminer les acquisitions IVUS/NIRF avant le décès de l'animal, et de répéter les *pullbacks* si nécessaire. Il serait peut-être meilleur d'imager les coronaires avec un objectif avec un grossissement supérieur à 3X afin d'avoir une meilleure résolution en microscopie confocale, même si le temps d'acquisition et la quantité de données serait supérieures. Il est clair que l'expérimentateur doit trouver un compromis entre la résolution axiale des données de microscopie confocale et la quantité de données finales. Finalement, il serait bon de trouver un moyen d'améliorer la qualité du tranchage afin d'éliminer autant que possible les artefacts liés au défaut de coupe. Injecter de l'agarose dans le lumen du vaisseau peut aussi rendre le tranchage un peu plus facile, car le vaisseau se déforme alors moins.

Rappelons que ce document présente une méthode qui consiste en une nouvelle approche d'histologie, qui combine une excellente résolution spatiale à une capacité d'indentification de marqueurs moléculaires. Notre microscope permet d'imager des organes animaux entiers en OCT dans des temps raisonnables en faisant de la microscopie confocale en fluorescence simultanément. Il devient donc possible de faire de l'histologie sans sous-échantillonner l'organe étudié. Une telle technique n'a jamais été utilisée auparavant afin de faire de l'histologie massive 3D appliquée au diagnostic de maladies cardiovasculaires. Nous croyons qu'avec de l'optimisation, il serait possible de créer un nouvel étalon-or en histologie reposant sur un dispositif semblable au notre. Cela pourrait mener vers des diagnostics pré-cliniques plus efficaces et précis, ce qui se traduit en une transition plus efficace et fiable du secteur de la recherche fondamental au secteur clinique.

## RÉFÉRENCES

1. Bentzon J.F., et al. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114:1852-66
2. David R. Boyd, Stephen J. Genuis, The environmental burden of disease in Canada: Respiratory disease, cardiovascular disease, cancer, and congenital affliction, *Environmental Research*, Volume 106, Issue 2, 2008, Pages 240-249, ISSN 0013-9351, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2007.08.009>.
3. Steinberg D, Witztum JL Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. . 2010;30:2311–2316.
4. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. . 2011;473:317–325.
5. Stary HC, Chandler AB et al., RWA definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. . 1994;14:840–856
6. Kragel AH, Reddy SG, Witten JT, Roberts WC Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. . 1989;80:1747–1756
7. Jacob Fog Bentzon, Fumiayuki Otsuka, Renu Virmani, Erling Falk, Mechanisms of Plaque Formation and Rupture, *Circulation Research*. 2014;114:1852-1866
8. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-874.) (Schwartz R. S., et al. Microemboli and microvascular obstruction in acute coronary thrombosis and sudden coronary death: relation to epicardial plaque histopathology. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2167- 2173.
9. Intravascular Ultrasound, Christopher J. Marrocco, Seminars in Vascular Surgery, Volume 25, Issue 3, September 2012, Pages 144–152
10. Fitzgerald PJ, St. Goar FG, Connolly AJ, et al. Intravascular ultrasound imaging of coronary arteries: is three layers the norm? *Circulation*. 1992;86:154-158.
11. Calfon MA, Vinegoni C, Ntziachristos V, Jaffer FA. Intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of atherosclerosis: toward coronary arterial visualization of biologically high-risk plaques. *Journal of Biomedical Optics*. 2010;15(1):011107. doi:10.1117/1.3280282.

12. W. Drexler and J. G. Fujimoto 1957, Optical Coherence Tomography: Technology and Applications ; Wolfgang Drexler, James G. Fujimoto, (Eds.). 2008.
13. Gabriele ML, Wollstein G, Ishikawa H, et al. Optical Coherence Tomography: History, Current Status, and Laboratory Work. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52(5):2425-2436. doi:10.1167/iovs.10-6312.
14. Boudoux, C. Fundamentals of Biomedical Optics, 2017.
15. Terashima M, Kaneda H, Suzuki T. The Rolehistory of of Optical Coherence Tomography in Coronary Intervention. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2012;27(1):1-12. doi:10.3904/kjim.2012.27.1.1.
16. Puliafito CA, Hee MR, Lin CP, et al. Imaging of macular diseases with optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 1995;102:217–229
17. Schuman JS, Hee MR, Puliafito CA, et al. Quantification of nerve fiber layer thickness in normal and glaucomatous eyes using optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol*. 1995;113:586–596
18. Brezinski ME, Optical coherence tomography: principles and applications, Academic Press, Burlington, 2006, 3–29.
19. Boppart SA, Brezinski ME, Pitriss C, Fujimoto JG, Optical coherence tomography for neurosurgical imaging of human intracortical melanoma, *Neurosurgery*, 1998, 43(4):834–841.
20. Jang IK, Bouma BE, Kang DH, et al. Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:604–609.
21. Yabushita H, Bouma BE, Houser SL, et al. Characterization of human atherosclerosis by optical coherence tomography. *Circulation*. 2002;106:1640–1645.
22. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *The Journal of Cell Biology*. 1987;105(1):41-48.
23. Z. S. Tannous et al., “ In vivo examination of lentigo malign and malig-nant melanoma in situ, lentigo maligna type by near-infrared reflectance confocal microscopy: comparison of in vivo confocal images with his-tologic sections,” *J. Am. Acad. Dermatol.* 46(2), 260–263 (2002)

24. Pande AN, Kohler RH, Aikawa E, Weissleider R, Jaffer FA; Detection of macrophage activity in atherosclerosis *in vivo* using multichannel, high-resolution laser scanning fluorescence microscopy. *J. Biomed. Opt.* 0001;11(2):021009-021009-7. )
25. Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1463-1465. doi:10.1093/bioinformatics/btp184.
- Libby, P.; Okamoto, Y.; Rocha, V.Z.; Folco, E. Inflammation in atherosclerosis transition from theory to practice. *Circ. J.* **2010**, *74*, 213–220.
- Libby, P.; Ridker, P.M.; Hansson, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **2011**, *473*, 317–325.
- Bentzon, J.F.; Otsuka, F.; Virmani, R.; Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 1852–1866.
- Muller, J.E.; Tofler, G.H.; Stone, P.H. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* **1989**, *79*, 733–743.
- Mintz, G.S.; Painter, J.A.; Pichard, A.D.; Kent, K.M.; Satler, L.F.; Popma, J.J.; Chuang, Y.C.; Bucher, T.A.; Sokolowicz, L.E.; Leon, M.B. Atherosclerosis in angiographically “normal” coronary artery reference segments: An intravascular ultrasound study with clinical correlations. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1995**, *25*, 1479–1485.
- Tardif, J.C.; Lesage, F.; Harel, F.; Romeo, P.; Pressacco, J. Imaging biomarkers in atherosclerosis trials. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2011**, *4*, 319–333.
- Berry, C.L.; L’Allier, P.; Grégoire, J.; Lespérance, J.; Lévesque, S.; Ibrahim, R.; Tardif, J.C. Comparison of intravascular ultrasound and quantitative coronary angiography for the assessment of coronary artery disease progression. *Circulation* **2007**, *115*, 1851–1857.
- Mintz, G.S.; Garcia-Garcia, H.M.; Nicholls, S.J.; Weissman, N.J.; Bruining, N.; Crowe, T.; Tardif, J.C.; Serruys, P.W. Clinical experts consensus document on standards of acquisition, measurement and reporting of intravascular ultrasound regression/progression studies. *EuroIntervention* **2011**, *6*, 1123–1130.
- Sanchez, O.D.; Sakakura, K.; Otsuka, F.; Yahagi, K.; Virmani, R.; Joner, M. Expectations and limitations in contemporary intravascular imaging: Lessons learned from pathology. *Expert Rev Cardiovasc. Ther.* **2014**, *12*, 601–611.

- Abran, M.; Cloutier, G.; Cardinal, M.H.R.; Chayer, B.; Tardif, J.C.; Lesage, F. Development of a photoacoustic ultrasound and fluorescence imaging catheter for the study of atherosclerotic plaque. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **2014**, *8*, 696–703.
- Dixon, A.J.; Hossack, J. Intravascular near-infrared fluorescence catheter with ultrasound guidance and blood attenuation correction. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, doi:10.1117/1.JBO.18.5.056009.
- Mallas, G.; Brooks, D.H.; Rosenthal, A.; Nudelman, R.N.; Mauskapf, A.; Jaffer, F.A.; Ntziachristos, V. Improving quantification of intravascular fluorescence imaging using structural information. *Phys. Med. Biol.* **2012**, *57*, 6395–6406.
- Bec, J.; Xie, H.; Yankelevich, D.R.; Zhou, F.; Sun, Y.; Ghata, N.; Aldredge, R.; Marcu, L. Design construction and validation of a rotary multifunctional intravascular diagnostic catheter combining multispectral fluorescence lifetime imaging and intravascular ultrasound. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *4*, 319–333.
- Jaffer, F.A.; Calfon, M.A.; Rosenthal, A.; Mallas, G.; Razansky, R.N.; Mauskapf, A.; Weissleder, R.; Libby, P.; Ntziachristos, V. Two-dimensional intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of inflammation in atherosclerosis and stent-induced vascular injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *57*, 2516–2526.
- Jaffer, F.A.; Vinegoni, C.; John, M.C.; Aikawa, E.; Gold, H.K.; Finn, A.V.; Ntziachristos, V.; Libby, P.; Weissleder, R. Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis. *Circulation* **2008**, *118*, 1802–1809.
- Nahrendorf, M.; Jaffer, F.A.; Kelly, K.A.; Sosnovik, D.E.; Aikawa, E.; Libby, P.; Weissleder, R. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation* **2006**, *114*, 1504–1511.
- Rouleau, L.; Berti, R.; Ng, V.W.K.; Matteau-Pelletier, C.; Lam, T.; Saboural, P.; Kakkar, A.K.; Lesage, F.; Rhéaume, E.; Tardif, J.C. VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice. *Contrast Med. Mol. Imaging* **2013**, *8*, 27–39.
- De Vries, B.M.W.; Hillebrands, J.; van Dam, G.M.; Tio, R.A.; de Jong, J.S.; Slart, R.H.J.A.; Zeebregts, C.J. Images in cardiovascular medicine. Multispectral near-infrared fluorescence molecular imaging of matrix metalloproteinases in a human carotid plaque using a matrix-

- degrading metalloproteinase-sensitive activatable fluorescent probe. *Circulation* **2009**, *119*, e534–e536.
- Abra, M.; Stähli, B.E.; Merlet, N.; Mihalache-Avram, T.; Mecteau, M.; Rhéaume, E.; Busseuil, D.; Tardif, J.C.; Lesage, F. Validating a bimodal intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) catheter for atherosclerotic plaque detection in rabbits. *Biomed Opt Express* **2015**, *6*, 3989–3999.
- Wang, H.; Zhu, J.; Akkin, T. Serial optical coherence scanner for large-scale brain imaging at microscopic resolution. *NeuroImage* **2014**, *84*, 1007–1017.
- Castonguay, A.; Avti, P.K.; Moeini, M.; Pouliot, P.; Tabatabaei, M.S.; Bélanger, S.; Lesage, F. Investigating the correlation between white matter and microvasculature in aging using large scale optical coherence tomography and confocal fluorescence imaging combined with tissue sectioning. *Proc. SPIE* **2015**, *9328*, doi:10.1117/12.2077830.
- Pande, A.N.; Kohler, R.H.; Aikawa, E.; Weissleder, R.; Jaffer, F.A. Detection of macrophage activity in atherosclerosis *in vivo* using multichannel, high-resolution laser scanning fluorescence microscopy. *J Biomed Opt.* **2006**, *11*, doi:10.1117/1.2186337.
- Preibisch, S.; Saalfeld, S. Fast stitching of large 3d biological datasets. In Proceedings of the 2nd ImageJ User and Developer Conference, Luxembourg, 7–8 November 2008.
- Faber, D.; van der Meer, F.; Aalders, M.; van Leeuwen, T. Quantitative measurement of attenuation coefficients of weakly scattering media using optical coherence tomography. *Opt. Express* **2004**, *12*, 4353–4365.

Abran, M.; Cloutier, G.; Cardinal, M.H.R.; Chayer, B.; Tardif, J.C.; Lesage, F. Development of a photoacoustic ultrasound and fluorescence imaging catheter for the study of atherosclerotic plaque. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **2014**, *8*, 696–703.

Abran, M.; Stähli, B.E.; Merlet, N.; Mihalache-Avram, T.; Mecteau, M.; Rhéaume, E.; Busseuil, D.; Tardif, J.C.; Lesage, F. Validating a bimodal intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) catheter for atherosclerotic plaque detection in rabbits. *Biomed Opt Express* **2015**, *6*, 3989–3999.

An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *The Journal of Cell Biology*. 1987;105(1):41-48.

Bec, J.; Xie, H.; Yankelevich, D.R.; Zhou, F.; Sun, Y.; Ghata, N.; Aldredge, R.; Marcu, L. Design construction and validation of a rotary multifunctional intravascular diagnostic catheter combining multispectral fluorescence lifetime imaging and intravascular ultrasound. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *4*, 319–333.

Bentzon, J.F.; Otsuka, F.; Virmani, R.; Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 1852–1866.

Berry, C.L.; L'Allier, P.; Grégoire, J.; Lespérance, J.; Lévesque, S.; Ibrahim, R.; Tardif, J.C. Comparison of intravascular ultrasound and quantitative coronary angiography for the assessment of coronary artery disease progression. *Circulation* **2007**, *115*, 1851–1857.

Boppart SA, Brezinski ME, Pitriss C, Fujimoto JG, Optical coherence tomography for neurosurgical imaging of human intracortical melanoma, *Neurosurgery*, 1998, 43(4):834–841.

Boudoux, C. *Fundamentals of Biomedical Optics*, 2017.

Brezinski ME, Optical coherence tomography: principles and applications, Academic Press, Burlington, 2006, 3–29.

Calfon MA, Vinegoni C, Ntziachristos V, Jaffer FA. Intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of atherosclerosis: toward coronary arterial visualization of biologically high-risk plaques. *Journal of Biomedical Optics*. 2010;15(1):011107. doi:10.1117/1.3280282.

Castonguay, A.; Avti, P.K.; Moeini, M.; Pouliot, P.; Tabatabaei, M.S.; Bélanger, S.; Lesage, F. Investigating the correlation between white matter and microvasculature in aging using large scale

optical coherence tomography and confocal fluorescence imaging combined with tissue sectioning. *Proc. SPIE* **2015**, *9328*, doi:10.1117/12.2077830.

David R. Boyd, Stephen J. Genuis, The environmental burden of disease in Canada: Respiratory disease, cardiovascular disease, cancer, and congenital affliction, *Environmental Research*, Volume 106, Issue 2, 2008, Pages 240-249, ISSN 0013-9351, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2007.08.009>.

De Vries, B.M.W.; Hillebrands, J.; van Dam, G.M.; Tio, R.A.; de Jong, J.S.; Slart, R.H.J.A.; Zeebregts, C.J. Images in cardiovascular medicine. Multispectral near-infrared fluorescence molecular imaging of matrix metalloproteinases in a human carotid plaque using a matrix-degrading metalloproteinase-sensitive activatable fluorescent probe. *Circulation* **2009**, *119*, e534–e536.

Dixon, A.J.; Hossack, J. Intravascular near-infrared fluorescence catheter with ultrasound guidance and blood attenuation correction. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, doi:10.1117/1.JBO.18.5.056009.

Faber, D.; van der Meer, F.; Aalders, M.; van Leeuwen, T. Quantitative measurement of attenuation coefficients of weakly scattering media using optical coherence tomography. *Opt. Express* **2004**, *12*, 4353–4365.

Fitzgerald PJ, St. Goar FG, Connolly AJ, et al. Intravascular ultrasound imaging of coronary arteries: is three layers the norm? *Circulation*. 1992;86:154-158.

Fujimoto, J. Optical Coherence Tomography : Technology and applications, 2008

Intravascular Ultrasound, Christopher J. Marrocco, Seminars in Vascular Surgery, Volume 25, Issue 3, September 2012, Pages 144–152

Jacob Fog Bentzon, Fumiayuki Otsuka, Renu Virmani, Erling Falk, Mechanisms of Plaque Formation and Rupture, *Circulation Research*. 2014;114:1852-1866

Jaffer, F.A.; Calfon, M.A.; Rosenthal, A.; Mallas, G.; Razansky, R.N.; Mauskapf, A.; Weissleder, R.; Libby, P.; Ntziachristos, V. Two-dimensional intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of inflammation in atherosclerosis and stent-induced vascular injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *57*, 2516–2526.

Jaffer, F.A.; Vinegoni, C.; John, M.C.; Aikawa, E.; Gold, H.K.; Finn, A.V.; Ntziachristos, V.; Libby, P.; Weissleder, R. Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis. *Circulation* **2008**, *118*, 1802–1809.

Jang IK, Bouma BE, Kang DH, et al. Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:604–609.

Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC. Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. *J Am Coll Cardiol*. 1989;80:1747–1756.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-874.

Libby, P.; Okamoto, Y.; Rocha, V.Z.; Folco, E. Inflammation in atherosclerosis transition from theory to practice. *Circ. J.* **2010**, *74*, 213–220.

Libby, P.; Ridker, P.M.; Hansson, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **2011**, *473*, 317–325.

Mallas, G.; Brooks, D.H.; Rosenthal, A.; Nudelman, R.N.; Mauskapf, A.; Jaffer, F.A.; Ntziachristos, V. Improving quantification of intravascular fluorescence imaging using structural information. *Phys. Med. Biol.* **2012**, *57*, 6395–6406.

Mintz, G.S.; Garcia-Garcia, H.M.; Nicholls, S.J.; Weissman, N.J.; Bruining, N.; Crowe, T.; Tardif, J.C.; Serruys, P.W. Clinical experts consensus document on standards of acquisition, measurement and reporting of intravascular ultrasound regression/progression studies. *EuroIntervention* **2011**, *6*, 1123–1130.

Mintz, G.S.; Painter, J.A.; Pichard, A.D.; Kent, K.M.; Satler, L.F.; Popma, J.J.; Chuang, Y.C.; Bucher, T.A.; Sokolowicz, L.E.; Leon, M.B. Atherosclerosis in angiographically “normal” coronary artery reference segments: An intravascular ultrasound study with clinical correlations. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1995**, *25*, 1479–1485.

Muller, J.E.; Tofler, G.H.; Stone, P.H. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* **1989**, *79*, 733–743.

Nahrendorf, M.; Jaffer, F.A.; Kelly, K.A.; Sosnovik, D.E.; Aikawa, E.; Libby, P.; Weissleder, R. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation* **2006**, *114*, 1504–1511.

- Pande, A.N.; Kohler, R.H.; Aikawa, E.; Weissleder, R.; Jaffer, F.A. Detection of macrophage activity in atherosclerosis in vivo using multichannel, high-resolution laser scanning fluorescence microscopy. *J Biomed Opt.* **2006**, *11*, doi:10.1117/1.2186337.
- Preibisch, S.; Saalfeld, S. Fast stitching of large 3d biological datasets. In Proceedings of the 2nd ImageJ User and Developer Conference, Luxembourg, 7–8 November 2008.
- Puliafito CA, Hee MR, Lin CP, et al. Imaging of macular diseases with optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 1995;102:217–229
- Rouleau, L.; Berti, R.; Ng, V.W.K.; Matteau-Pelletier, C.; Lam, T.; Saboural, P.; Kakkar, A.K.; Lesage, F.; Rhéaume, E.; Tardif, J.C. VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice. *Contrast Med. Mol. Imaging* **2013**, *8*, 27–39.
- Sanchez, O.D.; Sakakura, K.; Otsuka, F.; Yahagi, K.; Virmani, R.; Joner, M. Expectations and limitations in contemporary intravascular imaging: Lessons learned from pathology. *Expert Rev Cardiovasc. Ther.* **2014**, *12*, 601–611.
- Schuman JS, Hee MR, Puliafito CA, et al. Quantification of nerve fiber layer thickness in normal and glaucomatous eyes using optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol.* 1995;113:586–596
- Schwartz R. S., et al. Microemboli and microvascular obstruction in acute coronary thrombosis and sudden coronary death: relation to epicardial plaque histopathology. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2167- 2173.
- Stary HC, Chandler AB et al., RWA definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. . 1994;14:840–856
- Steinberg D, Witztum JL Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. . 2010;30:2311–2316.
- Tardif, J.C.; Lesage, F.; Harel, F.; Romeo, P.; Pressacco, J. Imaging biomarkers in atherosclerosis trials. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2011**, *4*, 319–333.
- Terashima M, Kaneda H, Suzuki T. The Rolehistory of of Optical Coherence Tomography in Coronary Intervention. The Korean Journal of Internal Medicine. 2012;27(1):1-12. doi:10.3904/kjim.2012.27.1.1.

Wang, H.; Zhu, J.; Akkin, T. Serial optical coherence scanner for large-scale brain imaging at microscopic resolution. *NeuroImage* **2014**, *84*, 1007–1017.

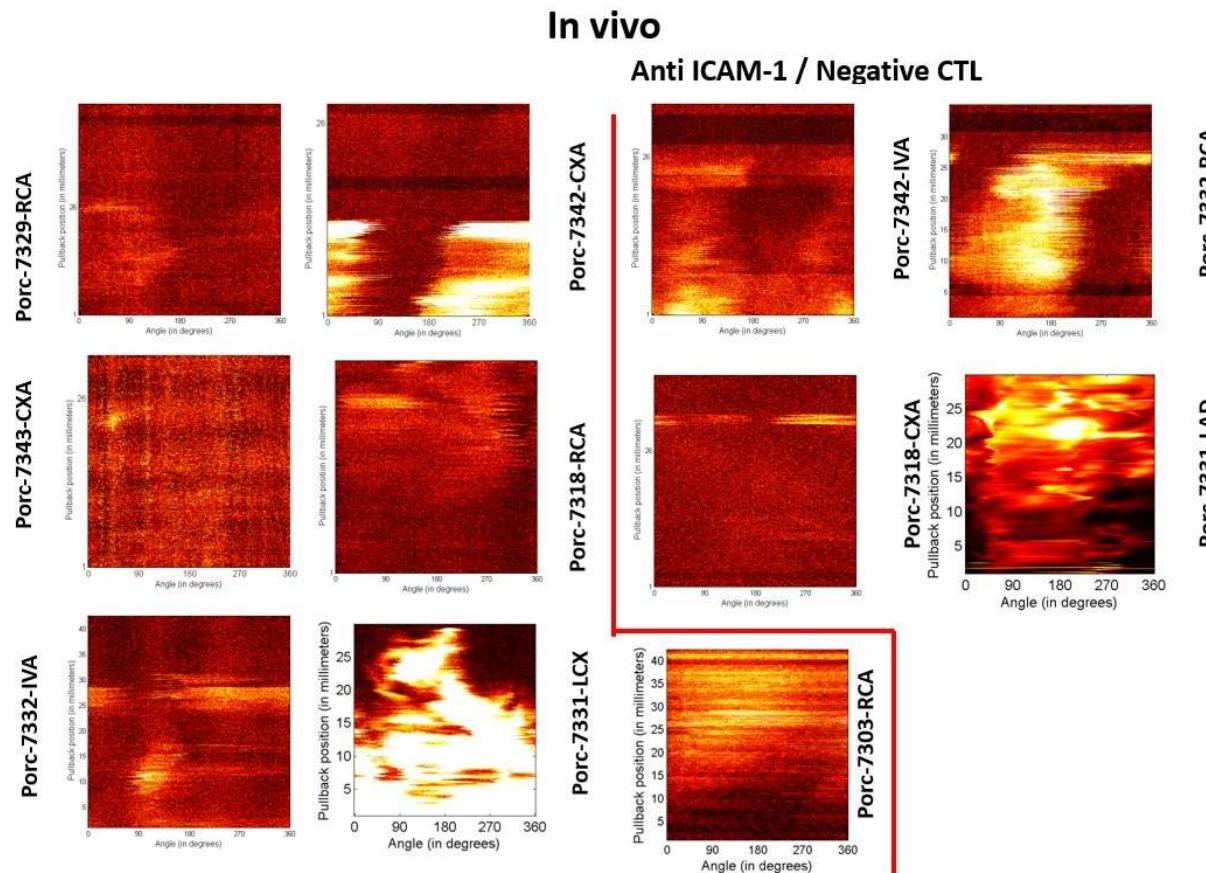
Wang, L. Biomedical Optics: Principles and Imaging, 2007.

Yabushita H, Bouma BE, Houser SL, et al. Characterization of human atherosclerosis by optical coherence tomography. *Circulation*. 2002;106:1640–1645.

Z. S. Tannous et al., “ In vivo examination of lentigo malign and malignant melanoma in situ, lentigo maligna type by near-infrared reflectance confocal microscopy: comparison of in vivo confocal images with his-tologic sections,” *J. Am. Acad. Dermatol.* *46*(2), 260–263 (2002)

## ANNEXES

### ANNEXE A - RÉSULTATS EN FLUORESCENCE ACQUIS AVEC LE CATHÉTER MULTIMODE



## ANNEXE B - RÉSULTATS EN FLUORESCENCE ACQUIS AVEC LE LUMINA

