

## LA MICROENDOSCOPIE CONFOCALE, UNE NOUVELLE PERSPECTIVE POUR LE DIAGNOSTIC *IN VIVO* DES CANCERS DE LA TÊTE ET DU COU

BREUSKIN Ingrid<sup>1,2</sup>, ABBACI Muriel<sup>1</sup>, ARMAS Gian Luca<sup>1,2</sup>, EL AHMED Ahmed<sup>1,2</sup>, BOSQ Jacques<sup>3</sup>, FERCHIOU Malek<sup>3</sup>, CASIRAGHI Odile<sup>3</sup>, TEMAM Stéphane<sup>2</sup>, LAPLACE-BUILHE Corinne<sup>1</sup>

### **Adresses :**

<sup>1</sup> *Imaging and Cytometry Platform, IR4M, IRCIV, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

<sup>2</sup> *Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

<sup>3</sup> *Department of Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

### **Résumé :**

L'analyse histologique des tissus est essentielle au diagnostic de cancer. Néanmoins, la réalisation d'une biopsie reste une procédure invasive, qui parfois doit être répétée et peut retarder le début du traitement. Par ailleurs, à ce jour, aucun outil n'est disponible durant l'intervention chirurgicale pour évaluer de façon fine les marges de résection tumorale. Récemment, des technologies optiques basées sur la miniaturisation des systèmes d'imagerie ont été proposées pour réaliser de manière non invasive des « biopsies optiques ». L'Endomicroscopie Confocale par Minisondes (ECM) est une de ces technologies. Elle permet une observation dynamique *in vivo* des tissus au niveau microscopique et ainsi une évaluation en temps réel de la tumeur en elle-même, mais aussi de ses limites. Cette technologie pourrait être utile dans la prise en charge des lésions cancéreuses et précancéreuses, tant pour leur diagnostic que d'un point de vue thérapeutique, afin de permettre aux chirurgiens de mieux définir les marges de résection. Dans cette présentation, nous reprenons le travail réalisé à l'Institut Gustave Roussy sur l'ECM dans les cancers de la tête et du cou.

Tout d'abord, nous présentons les résultats d'une étude de corrélation comparant les images d'ECM - réalisées avec des agents de contraste morphologiques (acriflavine et fluorescéine) - et les images d'histologie conventionnelle en hématoxyline-éosine-safran. Les images d'ECM sont interprétées par les anatomo-pathologistes avec une très grande sensibilité et spécificité. Cette étude montre que l'ECM offre des images de type et de qualité « histologiques », qui peuvent être aussi informatives pour les anatomo-pathologistes que l'histologie conventionnelle.

Ensuite, nous avons évalué l'association d'une imagerie fonctionnelle et morphologique. Basé sur le différentiel métabolique qui existe entre les cellules cancéreuses et les cellules non cancéreuses, les tissus ont été marqués avec du désoxyglucose fluorescent (2-NBDG) afin de visualiser l'activité cellulaire, et avec un marqueur morphologique (bleu de méthylène). Dans cette étude, nous avons montré que l'intensité de fluorescence, liée à l'absorption de NBDG, est plus élevée dans les tissus cancéreux que dans les tissus non-cancéreux. Cependant, dans certains tissus sains, métaboliquement actifs, la captation basale de glucose est élevée et ne permet pas de discriminer le tissu sain du tissu tumoral. Dès lors, associer le NBDG

à un marqueur morphologique, permet d'améliorer considérablement l'information optique en additionnant l'architecture tissulaire à l'activité métabolique.

Enfin, nous avons testé une imagerie moléculaire spécifique de l'EGFR. Ce récepteur est surexprimé dans de nombreux cancers dont ceux de la tête et du cou. Lors de ce travail, nous avons mis en œuvre le couplage d'un anticorps anti-EGFR utilisé en clinique, le cetuximab, avec un agent fluorescent. Les images d'ECM montrent une bonne spécificité du cetuximab fluorescent pour les cellules cancéreuses, mais également, dans une moindre mesure, pour les cellules de la couche basale des épithéliums malpighiens sains. Néanmoins, combiné avec des agents de contraste morphologiques, cet agent moléculaire pourrait être intéressant pour discriminer spécifiquement les cellules cancéreuses du reste des tissus dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

En conclusion, L'ECM permet d'obtenir des informations histologiques extemporanées et « en face », qui pourraient être utiles dans la pratique clinique quotidienne. Notre travail, mené en commun par des ingénieurs, des anatomo-pathologistes et des chirurgiens ORL, pourrait ouvrir des pistes pour améliorer la prise en charge à la fois diagnostique et thérapeutique des patients porteurs d'un cancer de la tête et du cou.

Les auteurs remercient l'INCa (Institut National Contre le Cancer - Subvention O7/1D0604/END-119-5/LL-AC), Wallonie Bruxelles International, la Fondation Gustave Roussy et la Fondation des "Gueules Cassées" pour le soutien de leurs recherches.

## **IMAGING BY CONFOCAL ENDOMICROSCOPY: NEW INSIGHT FOR *IN VIVO* TISSUE DIAGNOSIS OF HEAD AND NECK CANCER**

BREUSKIN Ingrid<sup>1,2</sup>, ABBACI Muriel<sup>1</sup>, ARMAS Gian Luca<sup>1,2</sup>, EL AHMED Ahmed<sup>1,2</sup>, BOSQ Jacques<sup>3</sup>, FERCHIOU Malek<sup>3</sup>, CASIRAGHI Odile<sup>3</sup>, TEMAM Stéphane<sup>2</sup>, LAPLACE-BUILHE Corinne<sup>1</sup>

### **Addresses :**

<sup>1</sup> *Imaging and Cytometry Platform, IR4M, IRCIV, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

<sup>2</sup> *Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

<sup>3</sup> *Department of Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

### **Abstract:**

Histological analysis of tissues is essential for cancer diagnosis, but biopsy is still an invasive procedure. Sometimes not conducted in the good place, it may be not helpful for diagnosis, and may need a redo which could delay the treatment decision. Moreover, today, except the surgeon's eyes, nothing during the surgical procedure is available to assess tumor margins. Probe-based Confocal Laser Endomicroscopy (pCLE) is a non-invasive and real-time optical technology. It provides *in vivo* dynamic observation of tissues at the microscopic level, enabling cellular visualization ("optical biopsies"). pCLE allows a better evaluation of the tumor and its borders. This technology could be useful to diagnose cancer through "optical biopsies" and to guide the surgeon during the resection procedure. In this presentation, we summarize the ongoing work of the Gustave Roussy Institute on pCLE in head and neck cancer. We have evaluated the potential of pCLE to help *in vivo* diagnosis and treatment of head and neck cancers and precancerous lesions.

First, we present the results of a correlation study comparing pCLE - used with morphological contrast agents (acriflavin and fluorescein) - and conventional optical microscopy with Hematoxylin-Eosin. pCLE images were interpreted by pathologists with a very high sensitivity and specificity, showing that this technique provides "histological-like images" which can be as informative as conventional histology to the pathologists.

Second, we have assessed the use of pCLE for combined functional and morphological imaging. To visualize cellular activity, tissues were stained with fluorescently labeled deoxyglucose (2-NBDG). As cancerous cells are metabolically more active than non cancerous cells, NBDG was used as a specific marker for cancerous cells. Methylene blue was used as a morphologic marker. In this study, we have shown that the fluorescence intensity related to 2-NBDG uptake was mostly higher in cancerous tissue than in non cancerous tissues. But sometimes, basal glucose uptake was high in non cancerous tissue (such as muscle) leading to false positives. A combined staining with methylene blue allows for a better comparison of glucose activity with tissue architecture.

Finally, we have tested pCLE with a specific molecular agent. EGFR is overexpressed in head and neck cancers. Thus, we have conjugated a clinically approved antibody, the cetuximab - directed against the extra-cellular portion of EGFR - to a fluorescent marker. We have then used this fluorescent-cetuximab to label head and neck cancer specimens. In this study, pCLE images showed that

fluorescent-cetuximab signal is specific to EGFR of cancerous cells, but also to a less extent to the basal layer of healthy squamous epithelium. Nevertheless, this molecular agent in combination with morphological agents could be interesting to specifically discriminate head and neck cancerous cells from their environment.

In conclusion, our work demonstrates the pCLE ability to provide “live” and “en-face” information's which could be useful in the daily ENT clinic. This technology represents the tissue in its natural environment and enables the observation of physiological and pathophysiological processes. Our work, conducted in common with engineers, pathologists and head and neck surgeons, could open ways to improve diagnosis and treatment of head and neck cancers.

The authors acknowledge the French INCa agency (Institut National Contre le Cancer) (Grant n° O7/1D0604/END-119-5/LL-AC), Wallonie Bruxelles International, the Gustave Roussy Foundation and the “Gueules Cassées” Foundation for support of their research.

IMAGERIE BIPHOTONIQUE PULMONAIRE :  
LA LONGUE QUETE DE L'EX VIVO A L'IN VIVO

FIOLE Daniel<sup>1,2</sup>, DOUADY Julien<sup>2</sup>, TOURNIER Jean-Nicolas<sup>1,3</sup>

(1) *Unité Interactions Hôte-Agents pathogènes,  
Institut de Recherche Biomédicale des Armées  
24 avenue des maquis du Grésivaudan  
38702 La Tronche cedex, France*

(2) *Equipe Matériaux, Optique et Techniques Instrumentales pour le Vivant  
Laboratoire Interdisciplinaire de Physique  
UMR 5588 CNRS / Université Joseph Fourier – Grenoble 1  
38041 Grenoble, France*

(3) *Ecole du Val-de-Grâce  
1, place A. Lavéran  
75005 Paris, France*

L'imagerie pulmonaire *in vivo* est un challenge prometteur pour mieux comprendre les processus immunitaires impliqués dans les infections pulmonaires, qui demeurent la principale cause de mortalité dans le monde.

Récemment, Bhattacharya a cité les mouvements tissulaires comme étant la bête noire de l'imagerie pulmonaire *in vivo*<sup>1</sup>, du fait de la ventilation et des battements cardiaques. Nous avons tout d'abord développé une stratégie destinée à contourner ces problèmes grâce à un protocole d'imagerie *ex vivo* sur explants de poumons maintenus en conditions favorables à la dynamique cellulaire. Une seconde approche originale permet désormais l'imagerie *in vivo*, en conditions physiologiques, de souris anesthésiées et ventilées.

La première étape a été l'imagerie, à 37°C et en milieu nutritif, de poumons de souris peu de temps après euthanasie. Ce *modus operandi* associant les microscopies confocale et biphotonique de la GFP (Green Fluorescent Protein), ainsi que la génération de seconde harmonique (SHG) du collagène pulmonaire, permet l'étude dynamique du comportement cellulaire en présence de lipopolysaccharides (LPS) chez des souris dont les cellules CX<sub>3</sub>CR1 expriment constitutivement la GFP. Ces travaux mettent en lumière à la fois le comportement spécifique des cellules CX<sub>3</sub>CR1 selon l'état d'activation par le LPS et le rôle crucial de cette population cellulaire dans la capture de bactéries inhalées<sup>2</sup> (Fig. 1). La GFP étant exprimée par deux populations principales de cellules dans les poumons (monocytes et cellules dendritiques), nous définissons un critère morphologique pour différencier ces populations. Nous avons ainsi montré que le LPS induit une augmentation spécifique de la vitesse des cellules CX<sub>3</sub>CR1 de types monocyte et dendritique.

Si l'imagerie *ex vivo* fournit des résultats intéressants sur le comportement cellulaire et sur les interactions hôte-pathogènes, rien ne peut remplacer les études *in vivo*.

Deux approches récemment publiées contournent les mouvements physiologiques en stabilisant les poumons, soit en collant l'échantillon<sup>3</sup> soit en utilisant un système d'aspiration<sup>4</sup> avec des résultats très intéressants. Notre approche est sensiblement différente : nous tirons profit de ces mouvements pulmonaires plutôt que de chercher à les supprimer.

Quelques secondes d'apnée sont imposées à une souris anesthésiée, diminuant fortement les mouvements basses fréquences dus à la ventilation. Les mouvements hautes fréquences

restants, liés à l'activité cardiaque, sont utilisés comme substitut à un système de balayage. Ces mouvements étant peu reproductibles, il est essentiel de trier et réaligner les images d'intérêt : le signal de SHG du collagène sert de référence à l'échantillonnage et au recadrage des images.

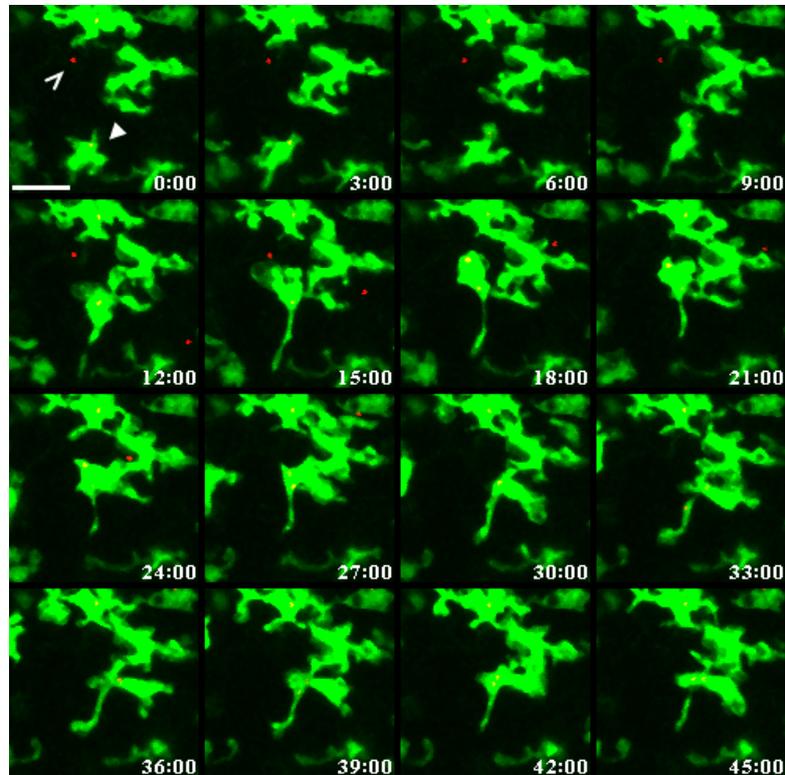


Figure 1 : Projection en Z d'une série temporelle 3D de la capture d'une spore de *Bacillus anthracis* (chevron blanc, marquage à l'Alexa 647) par une cellule CX<sub>3</sub>CR1 (triangle blanc) sur une tranche de poumon 30 minutes après infection intratrachéale. Echelle = 20 µm, 3 minutes entre chaque image.

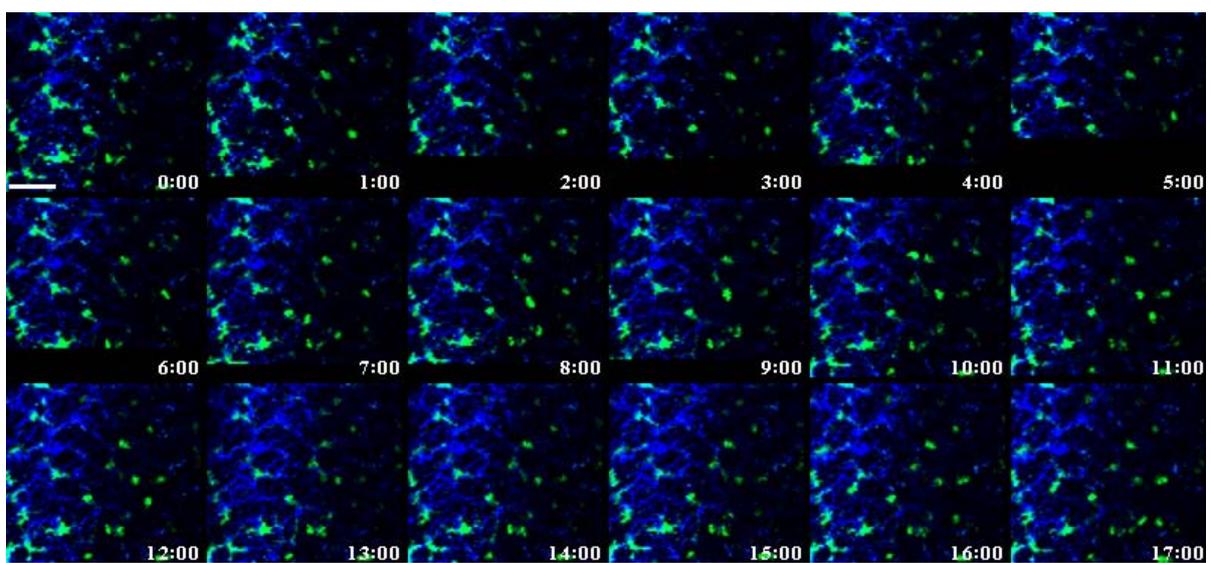


Figure 2 : Série temporelle de 17 minutes d'un poumon de souris anesthésiée et ventilée après injection de LPS. Collagène en bleu (SHG) et cellules CX<sub>3</sub>CR1 en vert (GFP). Echelle = 40 µm.

L'utilisation d'un tel protocole permet l'acquisition d'images de résolution micrométrique de leucocytes CX<sub>3</sub>CR1 pulmonaires se déplaçant le long du réseau de collagène alvéolaire pendant quelques dizaines de minutes, à la fréquence d'une image par minute (Fig. 2).

La principale originalité de ce travail réside dans l'utilisation du mouvement cardiaque comme substitut physiologique à un système de balayage. Ce nouveau protocole pourrait bientôt fournir des résultats intéressants sur le comportement cellulaire, conduisant à une meilleure compréhension des processus immunitaires.

1 Bhattacharya et al, *Nat Meth* **8**, 57-58 (2011)

2 Fiore et al, *proc. SPIE*, 8086-43 (2011)

3 Kreisel et al, *PNAS* **107**, 18073-18078 (2010)

4 Looney et al, *Nat Meth* **8**, 91 (2011)

THE LONG QUEST OF LUNG TWO-PHOTON DYNAMIC IMAGING:  
FROM *EX* TO *IN VIVO*

FIOLE Daniel<sup>1,2</sup>, DOUADY Julien<sup>2</sup>, TOURNIER Jean-Nicolas<sup>1,3</sup>

(1) *Unité Interactions Hôte-Agents pathogènes,  
Institut de Recherche Biomédicale des Armées  
24 avenue des maquis du Grésivaudan  
38702 La Tronche cedex, France*

(2) *Equipe Matériaux, Optique et Techniques Instrumentales pour le Vivant  
Laboratoire Interdisciplinaire de Physique  
UMR 5588 CNRS / Université Joseph Fourier - Grenoble 1  
38041 Grenoble, France*

(3) *Ecole du Val-de-Grâce  
1, place A. Lavéran  
75005 Paris, France*

Lung *in vivo* imaging is one of the most promising challenges aiming to a better understanding of immunological processes involved in pulmonary infectious diseases, which remain the major cause of death around the world.

Bhattacharya recently mentioned tissue motion as the “*bête noire* of lung *in vivo* imaging”<sup>1</sup>, coming from both breathing and heart beating. We have developed a strategy tending to overcome these pitfalls first by developing an *ex vivo* lung imaging protocol on harvested lung slices kept in favourable conditions for cell dynamic conservation, and then by developing a novel approach leading to real physiological *in vivo* lung imaging of anesthetized and ventilated mice.

The first step was *ex vivo* imaging of mouse lungs a short time after euthanasia, keeping the sample in 37°C nutritive medium. This *modus operandi* using confocal and/or two-photon microscopy of green fluorescent protein (GFP) as much as second harmonic generation (SHG) of pulmonary alveolar collagen fibers allows the dynamic study of cell behaviour in lipopolysaccharide (LPS) activated mice which CX<sub>3</sub>CR1 leukocytes express constitutively the GFP. These experiments highlight both the different behaviour of CX<sub>3</sub>CR1 cells depending on the LPS-activation state of mice, and the crucial role of this cell population in bacteria uptake<sup>2</sup> (Fig. 1). As GFP is expressed in two main subsets in the lung, monocytes and dendritic cells, we used their roundness to differentiate the cell dynamic analysis. We proved that LPS induces a specific increase of cell velocity of both round-shaped monocyte-like and dendritic cell-like CX<sub>3</sub>CR1 populations.

Although *ex vivo* imaging is able of providing greatly interesting data about cell behaviour and host-pathogen interactions, nothing can be substituted to the study of living sample.

Two approaches recently published address the tissue motion issue by mechanically stabilizing the lungs, either gluing the sample<sup>3</sup> or using a suction system<sup>4</sup>, providing many high level results. Our approach is entirely different in the sense we do not try to achieve a complete stabilization or immobilization of the lungs. The strategy herein described is aimed to make the best use of tissue motion.

Few seconds apnea are achieved to anesthetized mice, greatly diminishing lowest frequency movements due to breathing. Remaining highest frequency movements due to heart beating are used as a substitute for scanning system: the laser focalized spot sweeps the sample

only as a result of heart beating movements without immobilizing the lung. Because the residual motion is not reproducible, it is essential to sort out and realign images of interest, which is helped by the use of SHG from collagen as a reference for both sampling and realignment phases.

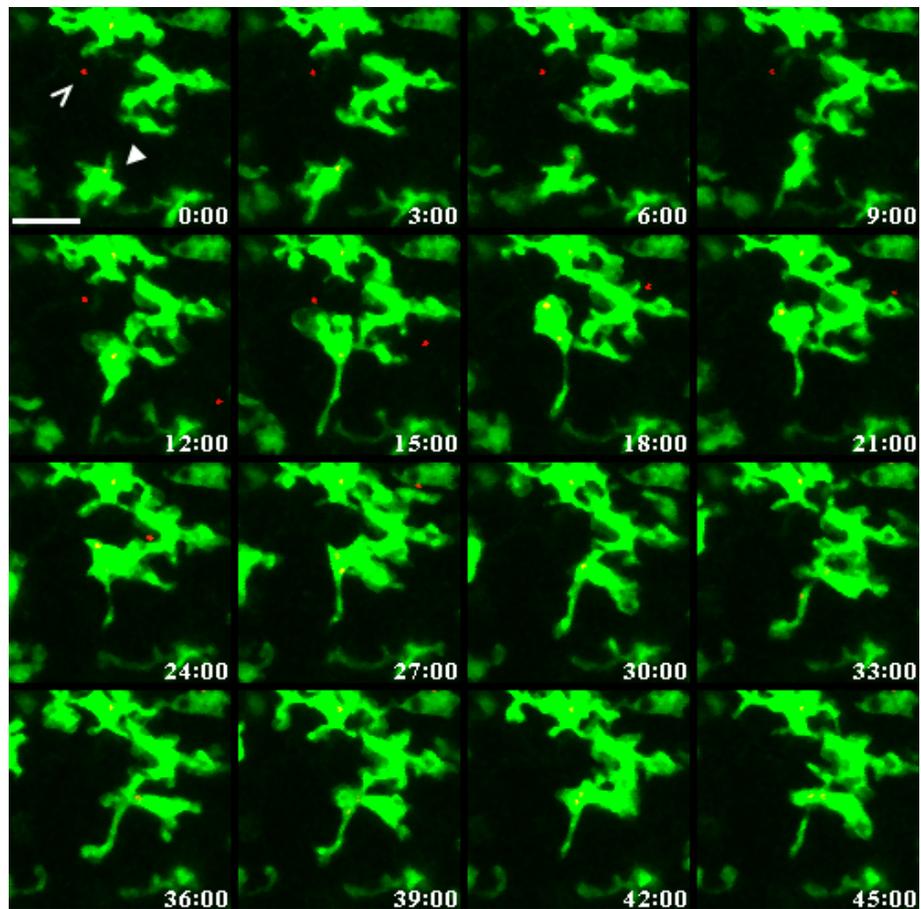
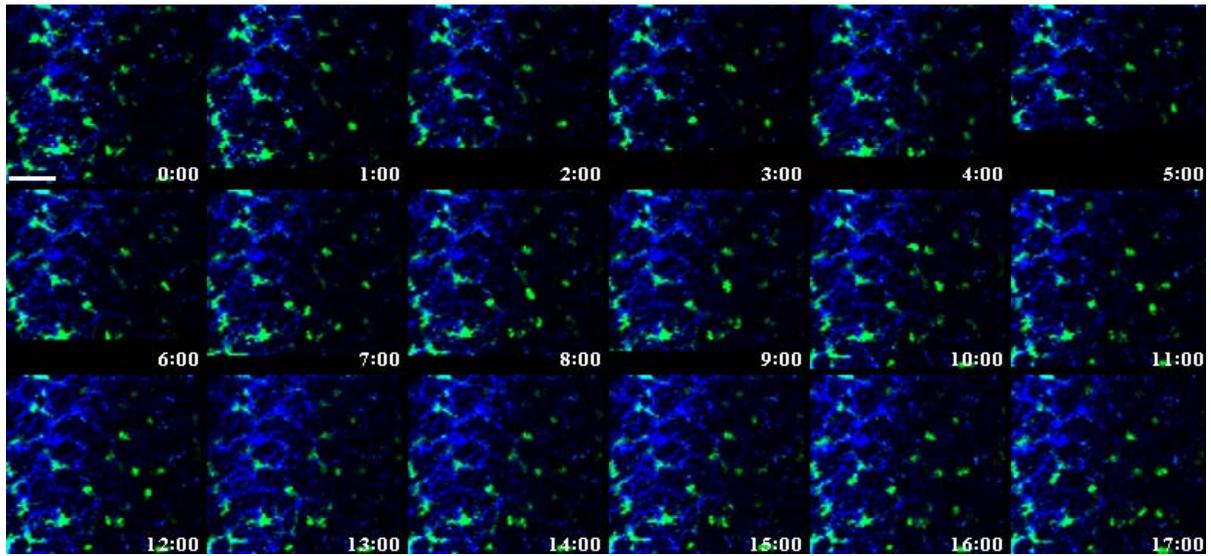


Figure 3: Z-projection of a 3D time-lapse imaging of a *Bacillus anthracis* spore uptake (open white arrow, Alexa 647 staining) by a pulmonary CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> leukocyte (full white arrow) on a lung slice 3<sup>h</sup>30 after intratracheal infection. Scale bar = 20 μm, 3 min between each frames.



**Figure 4: Time lapse on the lung of an anesthetized and ventilated LPS-injected mouse over 17 minutes. Collagen in blue (SHG) and CX<sub>3</sub>CR1 cells in green (GFP). Scale bar = 40 μm.**

The use of such a process allowed us to collect roughly one micrometer resolved images of pulmonary CX<sub>3</sub>CR1 leukocytes moving among the alveoli collagen mesh for a few tens of minutes at a one image by minute rate (Fig. 2).

The main originality of this work is the use of heart beating movements as a physiological and powerful way to scan the living sample instead of trying to immobilize it, making the best use of tissue motion. This protocol may provide soon physiological data about cells behaviour leading to a better understanding of immunological processes.

- 1 Bhattacharya et al, *Nat Meth* **8**, 57-58 (2011)
- 2 Fiore et al, *proc. SPIE*, 8086-43 (2011)
- 3 Kreisel et al, *PNAS* **107**, 18073-18078 (2010)
- 4 Looney et al, *Nat Meth* **8**, 91 (2011)

# DEVELOPPEMENT INSTRUMENTAL POUR LE TRANSFERT PRE-INDUSTRIEL ET CLINIQUE D'UN SYSTEME DE CYSTOSCOPIE PANORAMIQUE MULTI- MODALITES

BLONDEL Walter, DAUL Christian, WOLF Didier

*Centre de Recherche en Automatique de Nancy, ENSEM, INPL*

*2 avenue de la Forêt de Haye, 54516 Vandœuvre-lès-Nancy cedex*

## **Résumé**

Actuellement, la détection du cancer de la vessie se base sur l'exploration de la paroi urothéliale par endoscopie conventionnelle c'est-à-dire en lumière blanche. La sensibilité de cette méthode est d'environ 60%. Depuis 2007, l'utilisation de la fluorescence induite (ou exogène) permet une nette amélioration de la sensibilité diagnostique puisqu'elle est alors de l'ordre de 90%. La technique repose sur l'instillation une heure avant l'examen d'un agent photosensibilisant dans la vessie au moyen d'une sonde. Cet agent (Hexvix, avec autorisation de mise sur le marché obtenue en France en 2006) entraîne l'accumulation intracellulaire préférentielle de porphyrines (fluorescente) dans les cellules malignes. Lors de l'illumination ultérieure en lumière bleue, les cellules néoplasiques émettent une fluorescence qui permet de visualiser la tumeur. Le principe de la méthode est donc d'augmenter le contraste visuel entre les cellules bénignes et les cellules malignes par l'interaction d'une lumière spécifique, et ainsi de guider efficacement les biopsies. Cependant la spécificité est médiocre dans les deux cas (nombreux faux positifs).

Ainsi, nous consacrons une partie de nos travaux au développement d'une instrumentation utilisable sur tout type de cystoscope du commerce afin d'améliorer la spécificité. Cet outil comprend un générateur intégrant des sources d'excitations lumineuses en lumière blanche et en lumière violette (excitation de fluorescence) multiplexées dans le temps au rythme de l'acquisition vidéo qui sera associé à un système d'acquisition vidéo dans plusieurs bandes spectrales miniaturisé et synchronisé avec le générateur. Une autre partie de nos travaux concerne le traitement d'images avec la réalisation d'une plateforme logicielle permettant à la fois la visualisation simultanée des séquences d'images bimodalités (en lumière blanche et en fluorescence) et la réalisation d'images panoramiques, construites automatiquement à partir des séquences vidéo acquises. L'objectif est l'extraction d'indices de distribution spatiale permettant une amélioration de la prise en charge des lésions multi-focales notamment. Le principe, déjà validé en laboratoire, nécessite maintenant d'être pré-industrialisé pour une validation clinique.

Ce développement doit être réalisé prochainement dans le cadre d'un projet Technologie pour la Santé (Tecsant) de l'Agence Nationale de la Recherche grâce au partenariat entre 3 laboratoires de recherche, 2 industriels et 1 partenaire clinique.

DEVELOPPEMENT INSTRUMENTAL POUR LE TRANSFERT PRE-INDUSTRIEL  
ET CLINIQUE D'UN SYSTÈME DE CYSTOSCOPIE PANORAMIQUE MULTI-  
MODALITES

BLONDEL Walter, DAUL Christian, WOLF Didier

*Centre de Recherche en Automatique de Nancy, ENSEM, INPL*

*2 avenue de la Forêt de Haye, 54516 Vandœuvre-lès-Nancy cedex*

**Abstract**

Currently, bladder cancer detection is based on examination of urothelial wall using conventional (i.e. white light) endoscopy. Such a method achieves a sensitivity of about 60%. Since 2007, induced (or exogen) fluorescence has been used and allows a great increase of sensitivity that can get as high as 90%. Such a technique is based on instillation of a photosensitizing molecule within the bladder an hour before examination. Such a molecule (Hexvix that has had marketing authorization application in France since 2006) induces intracellular accumulation of (fluorescent) porphyrins in malignant cells. During the ensuing blue light illumination, neoplastic cells emit fluorescence light that allow visualization of the tumor. The aim of the method is to increase visual contrast between benign and malignant cells through interaction with a specific light and therefore efficiently guiding biopsies. However specificity remains low in both cases (too many false positives).

Therefore, part of our work focuses on developing a new type of instrumentation that can be used on any type of commercially available cystoscope in order to achieve a better specificity. Such instrumentation is made of a generator including excitation white and violet (for fluorescence excitation) light sources that are time-multiplexed at video acquisition's pace. Such a light generator will be associated to a system of video acquisition in several spectral bandwidths that will be miniaturized and synchronized with the light generator. Another part of our work deals with image processing through a software platform allowing both simultaneous visualization of bimodal images (white light and fluorescence) as well as a making of panoramic images, automatically built from video sequences acquired. The goal is to extract spatial distribution indices allowing a better clinical care of multi-focal lesions. Such a methodology has already been validated in laboratory and now requires to be pre-industrialized for validation in a clinical environment.

Such a development should soon be realized in the framework of a Tecsan project (technologies for healthcare) within the *Agence Nationale de la Recherche* thanks to a partnership gathering 3 research laboratories, 2 private companies and 1 clinical partner.

# SPIRIT: UN SYSTEME PROCHE INFRAROUGE RESOLU EN TEMPS POUR IMAGER L'ACTIVITE CEREBRALE.

POULET Patrick<sup>1</sup>, NOUIZI Farouk<sup>1</sup>, TORREGROSSA Murielle<sup>1</sup>, ZINT Chantal Virginie<sup>2</sup>, UHRING Wilfried<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 Université de Strasbourg/CNRS, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg, France

<sup>2</sup>Institut d'Electronique du Solide et des Systèmes, UMR 7163 CNRS-Université de Strasbourg, 23 rue du Loess, 67037 Strasbourg, France

## Résumé

La spectroscopie proche infrarouge (NIRS) permet l'enregistrement de paramètres physiologiques tels que le flux sanguin cérébral ou la saturation du sang en oxygène. L'objectif de ce travail est de construire un dispositif NIRS repoussant les limites des appareils actuels, qui utilisent des sources de lumière continue en contact direct avec la peau. Trois industriels et deux laboratoires de recherche se sont associés pour réaliser un système d'imagerie à porte temporelle et illumination surfacique du sujet [1].

La lumière émise par 4 diodes laser, en régime picoseconde et en mode séquentiel, est injectée dans une fibre optique 4x1, munie d'un diffuseur frontal. Les photons rétrodiffusés sont détectés par une camera CCD intensifiée. La photocathode de l'intensificateur d'images est alimentée par des impulsions électriques de quelques centaines de picosecondes. L'instrument est contrôlé par un module FPGA qui génère les impulsions de commande des diodes laser, de la photocathode et la synchronisation de la caméra CCD (Fig. 1).

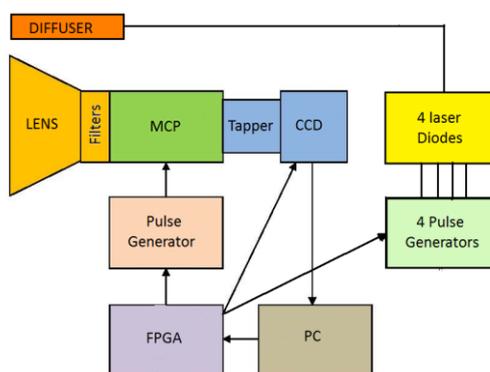


Figure 1. Schéma du système SPIRIT.

Afin d'évaluer le dispositif pour l'imagerie de l'activité cérébrale, une étude par simulation a été réalisée sur un fantôme de tête. Les tissus sont classés selon 6

types : matière blanche, matière grise (MG), vaisseaux, peau, os et liquide céphalo-rachidien. Un voxel est caractérisé par 6 fractions tissulaires. Les propriétés optiques, absorption et diffusion réduite, de ces classes ont été estimées, à 690 et 800 nm, à partir d'une analyse bibliographique [2].

Une activation cérébrale provoque une augmentation rapide du flux sanguin et de l'oxygénation sanguine, limitée à une région du cortex préfrontal. Ces variations correspondent à une diminution, à 690 nm, et à une augmentation, à 800 nm, d'environ 5% des coefficients d'absorption optique des régions activées.

Une impulsion lumineuse picoseconde illumine une région de 50 mm de diamètre, située sur le front droit. La propagation des photons est modélisée par l'équation de diffusion, les photons se propageant de manière aléatoire dans les tissus. Les solutions de l'équation de diffusion sont les cartes 3D des densités de photons résolues en temps de vol. Ces cartes sont additionnées sur des intervalles de temps de 200 ps, correspondant à la résolution du dispositif expérimental.

*Figure 2. Cartes des différences de densités de photons à la surface de la tête, (période au repos moins période activée).*

La figure 2 montre les différences entre les cartes surfaciques calculées au repos et lors d'activation, pour 6 portes temporelles entre 200 et 1400 ps. La zone de MG activée est clairement visualisée, la différence maximale se situant entre 600 et 800 ps. Ces résultats sont en accord avec les valeurs attendues, pour les variations d'amplitude des densités de photons à la surface de la tête, inférieures à 1% des valeurs moyennes. La différence maximale se situe à un temps de vol plus court que celui généralement admis. Ce fait est dû à la géométrie employée.

Une calibration des simulations sur des données acquises sur des objets test a été réalisée, afin de valider la détectivité d'une activation cérébrale avec le système SPIRIT. Un rapport contraste à bruit de 1 devrait être obtenu avec un temps d'acquisition de 0,1 s et une résolution spatiale de 1 mm<sup>2</sup>. Ces résultats valident le projet SPIRIT. Les premières applications cliniques concerneront la détection précoce de la maladie d'Alzheimer.

Les auteurs remercient tous les partenaires du projet SPIRIT. Ces travaux ont bénéficié des soutiens financiers des régions Alsace et Limousin, de la DGCIS et d'OSEO.

[1] Amouroux M., Poulet P., Uhring W., "SPIRIT : un projet de spectromètre proche infrarouge par imagerie temporelle", *Photoniques*, 40 : 34-36, 2009.

[2] Nouzi F., Diaz-Ayil G., Blé F.X., Dubois B., Uhring W., Poulet P., "Time gated near infrared spectroscopic imaging of brain activation: a simulation proof of concept", *Proc. of SPIE*, 7896: 78960L, 2011.

# SPIRIT: A TIME GATED NEAR INFRARED SYSTEM FOR BRAIN ACTIVATION IMAGING.

POULET Patrick<sup>1</sup>, NOUIZI Farouk<sup>1</sup>, TORREGROSSA Murielle<sup>1</sup>, ZINT Chantal  
Virginie<sup>2</sup>, UHRING Wilfried<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 Université de  
Strasbourg/CNRS, 4 rue Kirschleger, 67085 Strasbourg, France

<sup>2</sup>Institut d'Electronique du Solide et des Systèmes, UMR 7163 CNRS-Université de  
Strasbourg, 23 rue du Loess, 67037 Strasbourg, France

## Abstract

Follow-up of physiological parameters such as regional blood flow and oxygen saturation can be computed from Near Infra-Red Spectroscopy (NIRS) measurements. Our goal is to build a NIRS apparatus that overcomes the main limitations of currently available systems, which use continuous-wave sources, placed in contact with the skin. We built a non contact, time resolved, imaging system, with the illumination of the whole region of interest. Three companies and two laboratories have merged their skills to build this device [1].

Light emitted by 4 laser diodes, working sequentially in a picosecond regime, is injected in a four-furcated optical fiber ended with a light distributor. Back scattered photons are detected by an intensified CCD camera. The photocathode of the image intensifier, including a micro channel plate, is powered with electrical pulses of some hundred of picoseconds. The instrument is controlled by an FPGA based module which generates the pulse sequences for the laser diodes, the photocathode and the trigger of the CCD camera (Fig. 1).

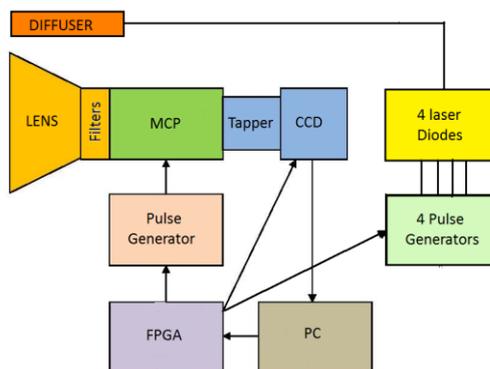


Figure 1. Scheme of the SPIRIT system.

In order to evaluate the proposed method for brain activation imaging, we implemented a time resolved 3D simulation study, using a digital head phantom. The head tissues were segmented into 6 classes: white matter, gray matter (GM),

vessels, skin, skull and cerebrospinal fluid. Each voxel is characterized by 6 tissue fractions. The optical absorption and reduced scattering coefficients of the 6 classes were determined according to published values [2]. Simulations were made at 690 and 800 nm.

Brain activation produces a rapid increase of cerebral blood flow, resulting in an increase of local blood oxygenation. We chose to increase these parameters in an activated region of the prefrontal cortex. Due to activation, the optical absorption coefficient of the GM was decreased / increased by about 5 % at 690 nm and 800 nm, respectively.

Photon migration can be approximated by the diffusion equation, because the photons undergo a random walk, before being absorbed or reemitted. A uniform ultra-short laser pulse, 50 mm in diameter, is launched on the right front of the head. The solutions of the diffusion equation are the time resolved 3D photon densities maps. These maps are summed on time intervals 200 ps long, corresponding to the expected resolution of the setup.

Figure 2 shows the differences between the surface maps computed on the “at-rest” phantom minus the “activated” brain phantom, for 6 time intervals between 200 and 1400 ps. The activated GM area is clearly localized, with a maximum lying in the 600-800 ps time interval after the light pulse. The simulation results agree with expected values for the amplitude variations of the time profiles, lower than 1% of the mean value. The time of this difference maximum is shorter than usually reported, due to the en-face geometry.

*Figure 2. Time gated surface maps of the density photons differences, “at rest” minus “activated” periods.*

Aiming at evaluating the detection of brain activation, we performed some calibration analysis by comparing simulations with experimental data acquired on a resin cylinder. A contrast to noise ratio equal to 1 could be expected with an acquisition time of 0.1 s and a spatial resolution of 1 mm<sup>2</sup>. These results give us confidence in the feature of the Spirit system to detect brain activation. First applications will concern the early diagnosis of Alzheimer disease.

The authors thank all partners of the SPIRIT project. This work was performed with the financial assistance of the Alsace and Limousin regions, DGCIS and OSEO.

[1] Amouroux M., Poulet P., Uhring W., “SPIRIT : un projet de spectromètre proche infrarouge par imagerie temporelle”, *Photoniques*, 40 : 34-36, 2009.

[2] Nouizi F., Diaz-Ayil G., Blé F.X., Dubois B., Uhring W., Poulet P., “Time gated near infrared spectroscopic imaging of brain activation: a simulation proof of concept”, *Proc. of SPIE*, 7896: 78960L, 2011.

## DETECTION D'ALTERATIONS DE LA PEAU PAR SPECTROSCOPIE DE REFLECTANCE DIFFUSE

KOENIG Anne, PLANAT-CHRETIEN Anne, FACOMPRES Aurelie, NAHAS Amir, POHER Vincent, GIOUX Sylvain, DINTEN Jean-Marc.

*CEA-LETI MINATEC, 17 av des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France*  
[anne.koenig@cea.fr](mailto:anne.koenig@cea.fr)

La spectroscopie de réflectance diffuse a été largement utilisée pour déterminer les propriétés d'absorption et de diffusion dans les tissus. Dans cette étude, nous proposons de développer un système de lecture optique bas-coût, utilisable en environnement clinique, pour détecter l'altération des tissus de la peau. L'idée est d'établir une méthode de lecture précoce et objective pour détecter une inflammation avant l'apparition des signes visuels. La technique est basée sur la spectroscopie de réflectance diffuse résolue spatialement. Dans cet article nous présentons tout d'abord le système et la méthode que nous avons développée ensuite les résultats obtenus dans une étude préclinique sur porcs.

Pour déterminer les coefficients d'absorption et de diffusion de la peau une sonde spectroscopique a été spécifiée. Le système, aisément transportable, se compose d'une lampe halogène comme source d'excitation, d'une sonde fibrée pour l'éclairage et la détection, d'un spectromètre à fibre Ocean Optics HR4000CG pour la détection et l'enregistrement des spectres rétrodiffusés, d'un moteur pour la lecture de chacune des fibres de détection, et d'un PC pour contrôler l'acquisition des données en moins de cinq secondes puis leur traitement. La sonde placée sur la zone à lire est constituée d'une fibre d'illumination (500  $\mu\text{m}$  de diamètre) et d'un réseau de fibres optiques pour la collection de la lumière rétrodiffusée à la surface du tissu (300  $\mu\text{m}$  de diamètre). La géométrie de placement des fibres de détection à différentes distances de la fibre d'illumination est optimisée pour les mesures cliniques.

Les changements des propriétés optiques à différentes longueurs d'onde (400-1100nm), ou plus précisément des variations en quantité des principaux chromophores (oxyhémoglobine, désoxyhémoglobine, lipides et eau) présents dans la peau ou les tissus examinés sont le témoin de la réaction étudiée (injection d'un réactif) ou d'une maladie (mélanome). Cette approche a déjà été utilisée dans divers domaines tels que le cerveau, le colon ou la peau. Une méthode basée sur la comparaison des mesures à des courbes de référence donne accès aux paramètres optiques  $\mu_a$  et  $\mu_s'$  et a été appliquée pour de petites distances source-détecteur (300  $\mu\text{m}$ ) par Rajaram [1] ou Thueler [2].

La méthode de lecture optique est testée sur des porcs, injectés avec un réactif provoquant une réaction d'hypersensibilité retardée. La zone d'injection est lue avec la sonde à différents intervalles de temps post-injection. La lecture est faite en parallèle de manière visuelle et

tactile par un médecin. Une analyse des spectres de réflectance permet de détecter précocement un érythème. Cette détection seulement 20 heures après l'injection du réactif est possible alors que la lecture humaine se fait habituellement 72 heures post-injection.

Le signal de réflectance suit une décroissance exponentielle à une longueur d'onde spécifique en fonction de la distance entre fibres de détection et fibre d'illumination. La comparaison de cette décroissance aux valeurs fournies par une LUT déterminée préalablement par simulations Monte Carlo permet la déduction rapide des coefficients optiques avec une précision de 10% pour  $\mu_s'$  et 20% pour  $\mu_a$ . Ces résultats sont obtenus sur une série de mesures effectuées sur différents fantômes d'Intralipide (diffuseur) et d'encre noire (absorbeur) caractérisés par une méthode de référence (TCSPC). La détermination des coefficients optiques par cette méthode, couplée à l'analyse des spectres de réflectance selon les spectres d'absorption des chromophores offre des perspectives pour la détection d'autres pathologies.

[1] N. Rajaram et al., "Lookup table-based inverse model for determining optical properties of turbid media," *Journal of biomedical optics*, vol. 13, 2008, p. 050501.

[2] P. Thueler et al., "In vivo endoscopic tissue diagnostics based on spectroscopic absorption, scattering, and phase function properties," *Journal of biomedical optics*, vol. 8, 2003, p. 495.

# SKIN ALTERATION EXPLORATION BY DIFFUSE REFLECTANCE SPECTROSCOPY

KOENIG Anne, PLANAT-CHRETIEN Anne, FACOMPRES Aurelie, NAHAS Amir, POHER Vincent, GIOUX Sylvain, DINTEN Jean-Marc.

*CEA-LETI MINATEC, 17 av des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France*  
[anne.koenig@cea.fr](mailto:anne.koenig@cea.fr)

Diffuse reflectance spectroscopy has been widely used to determine scattering and absorption properties of tissues. In this study, we propose to develop a low-cost optical reading system, usable in a clinical environment, to detect the alteration of skin tissue. The idea is to establish a new and more objective scanning method to detect inflammation before the onset of visual signs. The technique is based upon the spatially resolved diffuse reflectance spectroscopy. In this paper we first present the system and the method we developed then results obtained in a preclinical study on pigs.

To determine the absorption and scattering coefficients  $\mu_a$  and  $\mu_s'$  of the skin a spectroscopic system bundle has been specified. The easily portable system consists of a tungsten halogen lamp as the source of excitation, a fibered probe for illumination and detection, a fibered spectrometer Ocean Optics HR4000CG for detection which can decompose and record the spectra of light backscattered at the surface of the tissue, an engine for reading each of the various sensing fibers, and a PC to control measurement acquisition in less than five seconds and processing of acquired data. The probe placed over the area to read is made of an illumination fiber (500  $\mu\text{m}$  diameter core) and a network of optical fibers for detection (300  $\mu\text{m}$  diameter core) located at different distances from the illumination fiber to collect light scattered in the tissue. The geometry of collection has been optimized for clinical measurements.

We chose to measure spatially resolved diffuse reflectance to interrogate tissue optical properties at various wavelengths (400-1100nm). A change of optical properties, or more precisely quantity variations of the main chromophores (oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, lipid and water) presents in the skin or the examined tissue are the witness of the reaction to study (injection of a reagent) or of a disease (melanoma). This approach had been already used in various areas such as the brain, the colon or the skin. A method based on the comparison of the measurements to reference curves gives access to a couple of optical parameters  $\mu_a$  and  $\mu_s'$ . This method has been applied for small source-detector distances (300  $\mu\text{m}$ ) by Rajaram [1] or Thueler [2].

The optical reading method is preclinically tested on pigs, injected with a reagent causing a delayed hypersensitivity reaction. The injection area is tested with the optical probe at several time intervals post injection. Reading is done in parallel visually and tacitly by a doctor. An analysis of the reflectance spectra allows detecting precociously erythema. Early

detection of erythema only 20 hours after the injection of a reagent is possible as human reading is usually done 72 hours post injection.

The reflectance signal at a specific wavelength as a function of the distance of detection fibers with respect to the illumination fiber follows an exponential decay. It is compared to the values given by a LUT determined earlier by Monte Carlo simulations. The Monte Carlo code is adapted to the specific probe geometry and enables fast deduction of the optical coefficients with a precision of 10 % for  $\mu_s'$  and 20% for  $\mu_a$ . These results are obtained on a series of measurements done on different liquid phantoms of Intralipid as scatterer and black ink as absorber characterized with a reference method (TCSPC). The determination of optical coefficient by this method, coupled to the analysis of the reflectance spectra according to the absorption spectra of the chromophores offers perspectives to detect other pathologies.

[1] N. Rajaram et al., "Lookup table-based inverse model for determining optical properties of turbid media," *Journal of biomedical optics*, vol. 13, 2008, p. 050501.

[2] P. Thueller et al., "In vivo endoscopic tissue diagnostics based on spectroscopic absorption, scattering, and phase function properties," *Journal of biomedical optics*, vol. 8, 2003, p. 495.

