## L'imagerie optique : la résolution cellulaire au service de la chirurgie illustrée par deux outils utilisés dans le service de neurochirurgie du Centre Hospitalier Sainte-Anne (Paris, France)

Optical imaging: the cellular resolution in the service of surgery illustrated by two tools used in the Neurosurgery Department of Sainte-Anne Hospital (Paris, France)

M Zanello [1,2], D Abi Haidar [3,4], C Boccara [5,6] B Devaux [1,2]

- 1. Service de neurochirurgie Centre Hospitalier Sainte Anne, Paris.
- 2. Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Paris.
- 3. IMNC Laboratory UMR 8165-CNRS/IN2P3 Paris-Saclay university, Orsay (France).
- 4. Paris Diderot University Sorbonne Paris Cité, Paris.
- 5. Langevin Institute ESPC, Paris.
- 6. LLTech Cochin Hospital's Business Incubator, Paris.

#### Mots clés

- ♦ Neurochirurgie
- ♦ Imagerie Optique
- ◆ OCT plein champ
- Microscopie biphotonique
- ◆ Épilepsie

#### Résumé

Le traitement de première ligne des tumeurs cérébrales ou des lésions épileptogènes est l'exérèse neurochirurgicale. L'étendue de la résection est directement corrélée à la survie sans progression, à la survie globale ainsi qu'au contrôle épileptique chez les patients souffrant de lésions cérébrales. Or, à l'heure actuelle, aucun outil ne permet de connaître précisément et en temps réel la nature du tissu rencontré lors d'une chirurgie oncologique : tissu sain, infiltré ou tumoral ?

L'imagerie optique a connu de grands développements durant la fin du XXème siècle et le début du XXIème siècle permettant désormais d'acquérir des informations sur le tissu abordé lors d'un acte chirurgical avec une résolution de l'ordre du micromètre et en temps réel. Elle devrait donc pouvoir guider le chirurgien durant l'exérèse tumorale afin de retirer la majorité du tissu pathologique tout en respectant le tissu sain. Cet article résume l'expérience du Centre Hospitalier Sainte Anne en imagerie optique avec deux techniques complémentaires : l'analyse de la fluorescence endogène du tissu après excitation bi-photonique en collaboration avec le laboratoire IMNC et la tomographie par cohérence optique plein champ en collaboration avec l'institut Langevin. Tout tissu biologique peut émettre de la fluorescence grâce à la présence de plusieurs molécules endogènes capable d'émettre un signal de fluorescence après excitation lumineuse : les fluorophores endogènes. L'analyse de cette fluorescence « naturelle » des tissus permet d'obtenir des images de résolution cellulaire sans avoir recours à un marqueur exogène. L'acquisition de cette fluorescence endogène peut se faire via un microscope conventionnel ou via un endomicroscope fibré, qui peut s'insérer plus facilement dans le champ opératoire. Différents contrastes ont pu être analysés par microscopie de fluorescence sous excitation non linéaire : 4 contrastes d'imagerie différents : spectrale, temps de vie de fluorescence, signal de la génération de la seconde harmonique et fluorescence. Cette multimodalité est très importante pour fournir une réponse fiable et surtout reproductible. L'analyse de la fluorescence endogène sur des échantillons tumoraux fixés puis frais a montré qu'il existait des différences significatives entre le tissu tumoral et le tissu sain.

La tomographie par cohérence optique plein champ permet d'obtenir, de nouveau sans aucun marqueur extérieur, une image de résolution micrométrique semblable à celle obtenue par la fixation à l'Hématoxyline-Eosine. Un endomicroscope a été développé afin de permettre au chirurgien d'obtenir en temps réel des images microscopiques du champ opératoire et donc d'être guidé durant son geste.

La combinaison de ces méthodes semble être la clé pour guider de façon fiable et rapide le chirurgien. L'imagerie optique doit désormais concrétiser au bloc opératoire les promesses entrevues afin d'améliorer la précision du geste neurochirurgical.

### Keywords

- Neurosurgery
- Optical imaging
- ◆ Full field OCT
- ♦ Bi-photon microscopy
- ◆ Epilepsy

### Abstract

The first-line treatment of cerebral tumors or low-grade epilepsy-associated neuroepithelial tumors starts by surgical resection. The extent of resection is related to progression free survival and overall survival for patients suffering from brain tumors, and to the seizure control in patients harboring low-grade epilepsy-associated neuroepithelial tumors. Nowadays, no operative tool allow to know precisely and in real time the tissue's nature during glioma resection: healthy tissue, infiltrated tissue or tumor? Optical imaging has developed significantly

### Correspondance:

Dr Marc Zanello, MD

Service de neurochirurgie - Centre Hospitalier Sainte-Anne - 1, rue Cabanis 75014 Paris. Tél/Fax : +33 01 45 65 84 87 - E-mail : marc.zanello@orange.fr

Disponible en ligne sur www.acad-chirurgie.fr

1634-0647 - © 2017 Académie nationale de chirurgie. Tous droits réservés.

DOI: 10.14607/emem.2017.2.018

at the end of the 20th century and at the beginning of the 21st century: it is possible to obtain information about the tissue's nature with a micrometric resolution and fast acquisition. Concerning surgical oncology, optical imaging seems able to guide the surgeon during tumor resection, in order to remove pathological tissue while respecting healthy tissue. This article summarizes the experience of the Sainte Anne Hospital in optical imaging with two complementary methods: the tissue endogenous fluorescence analysis with two-photon microscopy in collaboration with the IMNC laboratory and the full field optical coherence tomography in collaboration with the Langevin Institute.

Endogenous fluorescence is obtained without any dye: the biological tissues possess naturally fluorescent molecules. Endogenous fluorescence analysis can be realized with two-photon microscopy: it allows to obtain 4 different optical contrasts: spectral imaging, fluorescence lifetime, second harmonic generation signal and fluorescence. This optical imaging method exhibits a fast acquisition time and a micrometric resolution. Endogenous fluorescence analysis of fixed fresh human brain samples showed that there were significant differences between tumor and healthy tissue.

Full field optical coherence tomography gives access, without any dye, to an image of micrometric resolution similar to the slide obtained after Hematoxylin-Eosin staining. An endomicroscope was developed that can fit into the operating room to deliver microscopic details on the tissue in real time.

Combining these methods will be the key to help the surgeon in a reliable and fast manner. Optical imaging has to the potential to overcome previous limit and to increase the quality of surgeon's acts.

Les tumeurs cérébrales malignes sont parmi les pathologies présentant le pronostic le plus réservé : leur taux de survie à 10 ans n'est que de 28,8 % et de 2,6 % pour la tumeur maligne la plus fréquente, le glioblastome (1). Parallèlement à ces tumeurs très agressives, les lésions bénignes associées à l'épilepsie sont responsables d'une épilepsie pharmacorésistante altérant significativement la qualité de vie des patients (2,3). Dans les deux situations, la prise en charge de référence débute par une exérèse chirurgicale la plus large possible du tissu malade tout en respectant le tissu cérébral sain, hautement fonctionnel. Les glioblastomes sont des tumeurs infiltrantes avec des cellules tumorales retrouvées à plus d'un centimètre de la lésion visualisée sur l'imagerie préopératoire (4), illustrant la difficulté de réséquer la totalité de la tumeur tout en respectant le tissu cérébral sain hautement fonctionnel. En effet, à l'heure actuelle, aucun outil chirurgical ne permet de connaître la nature du tissu rencontré : sain, infiltré ou tumoral. Or l'œil du chirurgien ne saurait suffire malgré l'aide du microscope opératoire. A l'heure actuelle, seul l'examen anatomopathologique extemporané renseigne le chirurgien sur la nature histologique du tissu : celui-ci est cependant long en pratique clinique, plus d'une demi-heure le plus souvent, peut être faussé par le polymorphisme tumoral et rend inutilisable les prélèvements inclus dans l'analyse. Il est donc nécessaire de développer des instruments pouvant guider le chirurgien au bloc opératoire afin de réaliser une exérèse la plus précise possible de la lésion tumorale sans endommager le tissu sain voisin.

Plusieurs outils ont été développés pour assister le neurochirurgien durant l'exérèse tumorale. Le gold standard reste la neuronavigation mais l'échographie per-opératoire ou l'IRM per-opératoire deviennent de plus en plus courantes. Toutefois ces outils ne permettent pas de délimiter précisément les berges de l'exérèse. La microscopie de fluorescence est donc une solution proposée depuis la fin des années 1990 (5). Cette technique nécessite que le patient reçoive de l'Acide 5-Aminolevulinique (5-ALA) avant l'opération. Le 5-ALA est spécifiquement absorbée et métabolisée en Protoporphyrine IX (PpIX) dans les cellules tumorales, où elle s'accumule. Le PpIX est une molécule fluorescente : un microscope chirurgical équipé d'un filtre adéquat permet de guider l'exérèse vers les zones de forte densité cellulaire tumorale. Cette technique permet d'accroitre significativement le taux d'exérèse tumorale et le taux de survie sans récidive, toutefois la sensibilité est encore trop faible pour identifier correctement les marges tumorales au niveau desquelles la densité cellulaire est plus faible (6,7).

De plus, l'utilisation d'un marqueur externe induit certaines limites inhérentes à tout marqueur : faux négatifs et faux positifs ainsi qu'au patient : contre-indications, effets secondaires. Quant aux outils développés pour l'analyse à l'échelon cellulaire, il s'agit principalement de microscopes confocaux qui ne permettent d'exploiter qu'un seul contraste optique (8). Or il existe des techniques d'imagerie optique donnant accès à différents contrastes optiques en temps réel et à l'échelle du micron sur les tissus biologiques, sans nécessité de marqueur externe (9).

Le but de cet article est de présenter l'expérience du Centre Hospitalier Sainte Anne dans le développement et l'utilisation de deux techniques d'imagerie optique ne requérant aucun marquage préalable : l'analyse de la fluorescence endogène du tissu après excitation bi-photonique (en collaboration avec le laboratoire IMNC : Imagerie et Modélisation en Neurobiologie et Cancérologie) et la tomographie par cohérence optique plein champ (en collaboration avec l'équipe de l'Institut Langevin et de LLTech).

### Analyse de la fluorescence endogène du tissu cérébral humain après excitation biphotonique

### Contexte

La fluorescence à un photon est la propriété que possèdent certaines molécules, les fluorophores, d'absorber de l'énergie lumineuse et de la réémettre rapidement sous forme de rayonnement de longueur d'onde plus grande. Il existe dans tout tissu biologique des fluorophores endogènes qui, excités à la longueur d'onde adéquate, émettent de la fluorescence. Après des travaux sur un modèle murin 10, cinq fluorophores ont été sélectionnées pour étudier la fluorescence endogène du cerveau humain : 1/le Nicotinamide Adénine Dinucléotide dans sa forme réduite (NADH), 2/la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD), 3/les Lipopigments, 4 et 5/deux groupes distincts de Porphyrine (Porphyrine I et Porphyrine II). La fluorescence endogène du tissu cérébral humain est une propriété intrinsèque du tissu : il n'y a donc pas besoin d'utiliser un marqueur externe, source de biais et de potentielles complications.

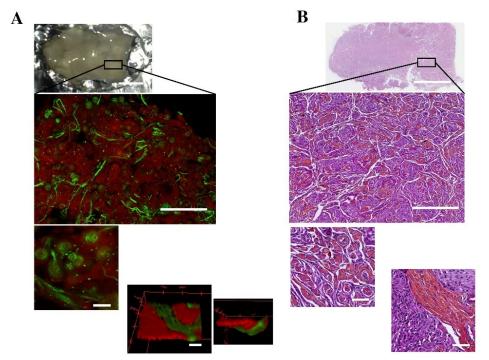
Afin d'étudier la fluorescence tissulaire en per-opératoire, la technique la plus fréquemment employée est la microscopie confocale, qui ne donne accès qu'à un seul type de contraste optique, a une profondeur de pénétration dans les tissus biologiques très limitée et qui nécessite d'illuminer tout le tissu analysé. Cependant, depuis le début du XXème siècle, la microscopie bi-photonique s'est imposée comme la méthode de choix pour analyser les tissus biologiques : elle donne accès à différents contrastes optiques, pénètre plus profondément dans le tissu et réduit les risques de phototoxicité et photoblanchiment. Un outil chirurgical bi-photonique pourra fournir des informations sur la nature du tissu rencontré au cours d'une intervention à l'échelon cellulaire et sans rencontrer les mêmes difficultés que les outils d'architecture confocale. Le but du travail mené en collaboration avec le laboratoire

Figure 1. Echantillon fixé de ménin-

A/Echantillon de méningiome avec délimitation de la zone d'intérêt, Echelle: 500 µm; Image de fluorescence biphotonique (rouge) et signal de seconde harmonique (vert), Echelle : 100 µm; Grossissement de l'image précédente permettant de retrouver des enroulements concentriques de collagène et des psammomes, Echelle : 10 µm; Image en 3 dimensions d'une fibre de collagène (vert), Echelle : 10 B/Coupe histologique macroscopique, Echelle : 500  $\mu m$  ; Image miroir de la zone d'intérêt explorée en fluorescence biphotonique après fixation à l'Hématoxyline-Eosine, Echelle: 100 μm; Grossissement de l'image précédente permettant de confirmer la présence des enroulements concen-. triques de collagène et des psammomes, Echelle :  $10 \, \mu m$  ; La fibre de collagène précédemment explorée en 3 dimensions, Echelle: 10 µm.

Eosine) en B. De haut en bas :

giome grade II. Comparaison entre les images obtenues par la plateforme biphotonique en A et le gold-standard histologique (fixation à l'Hématoxyline-



Tiré de Zanello et al, J Biophotonics, 2016

IMNC est d'étudier pour la première fois la fluorescence endogène produite par des échantillons, fixés puis frais, de tumeur cérébrale humaine sur deux plateformes optiques : conventionnelle et bi-photonique du laboratoire IMNC, et de confronter les résultats avec des échantillons contrôles appropriés.

### Matériel

Les échantillons fixés de méningiome provenaient de la tumorothèque du Service de Neuropathologie du Centre Hospitalier Sainte Anne. Les échantillons biologiques frais provenaient de patients adultes nouvellement opérés au sein du service de Neurochirurgie du Centre Hospitalier Sainte Anne. Le (Comité de Protection des Personnes) CPP Ile de France III a donné son accord pour ce protocole (N°XXX). Les échantillons représentaient les trois tumeurs cérébrales les plus fréquentes : glioblastomes, métastases et méningiomes. Le groupe contrôle était divisé en deux parties : cortex macroscopiquement sain provenant de chirurgie de l'épilepsie pour les glioblastomes et les métastases et dure-mère saine pour les méningiomes.

Une première plateforme optique était présente au sein du Service de Neuropathologie du Centre Hospitalier Sainte Anne : cette plateforme fonctionnait avec deux diodes lasers à 375 nm et à 405 nm et permettait d'acquérir deux contrastes optiques complémentaires différents par voie fibrée : 1/la spectroscopie et 2/la mesure de la durée de vie de la fluorescence. Ayant servi pour le modèle murin, la plateforme de référence était située à moins de 200 mètres du bloc opératoire afin d'assurer un état des échantillons le plus proche possible de l'in vivo.

La deuxième plateforme optique se situait dans le laboratoire IMNC à Orsay. Cette dernière était munie d'un microscope multimodal et d'un laser femtoseconde accordable sur une large bande spectrale. L'imagerie était donc multimodale : 1/ spectrale, 2/de la durée de vie de la fluorescence (FLIM), 3/la fluorescence sous excitation mono et bi-photonique et 4/la génération de la seconde harmonique (SHG). Les échantillons frais de tissu cérébral humain étaient transportés par un coursier dédié jusqu'à cette plateforme (délai moyen de 90 minutes).

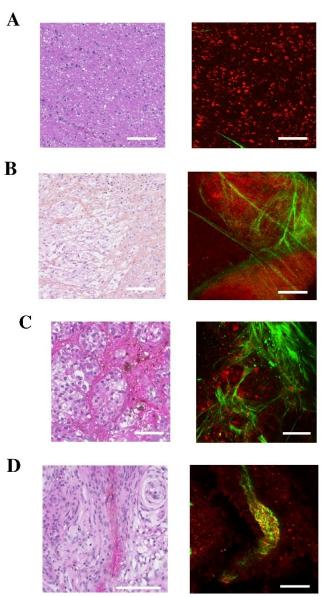
# Résultats

## Corrélation entre les images obtenues sur la plateforme bi-photonique et le gold-standard histologique

L'analyse d'échantillons fixés de méningiome a permis de : 1/ s'assurer de la présence des fluorophores d'intérêt au sein du tissu humain pathologique, 2/de corréler les images anatomopathologiques de référence (fixation à l'Hématoxyline-Eosine) et les images de fluorescence endogène et de seconde harmonique, 3/de mettre en lumière la relation entre le grade OMS du méningiome et l'intensité de la fluorescence détectée (11) (Fig 1).

## Exemples représentatifs des différents types tumoraux étudiés sur la plateforme biphotonique

L'étude de la cohorte de tissu cérébral humain frais a comporté 16 glioblastomes, 14 métastases et 8 méningiomes. Le groupe contrôle était constitué de 11 échantillons corticaux provenant de chirurgie de l'épilepsie et 5 échantillons de dure -mère saine. Cette étude a révélée : 1/ que l'excitation sur la plateforme bi-photonique n'entraînait pas de lésion macroscopique sur les échantillons frais, 2/ qu'il existait des différences significatives entre tumeurs et échantillons contrôles en terme d'intensité de fluorescence (significativement plus faible pour les tumeurs que pour le groupe contrôle) et de temps de vie de fluorescence (significativement plus long pour les tumeurs que pour le groupe contrôle), 3/que les images de fluorescence endogène sont facilement exploitables par les neuropathologistes car proches des images histologiques de référence et 4/que le développement, actuellement en cours, d'un endomicroscope opératoire biphotonique devrait permettre de distinguer le tissu sain du tissu infiltré à l'échelon intra-cellulaire et en peropératoire (12) (Fig 2).



Tiré de Zanello et al, Sci Rep, 2017

# La tomographie par cohérence optique plein champ

### Contexte

La tomographie par cohérence optique a été développée au début des années 1990 (13). Il s'agit d'un « échographe lumineux »: l'analyse du trajet parcouru par un signal lumineux dirigé vers un tissu biologique permet d'obtenir des détails sur l'architecture de ce dernier. Actuellement, la tomographie par cohérence optique est couramment utilisée en ophtalmologie. Cependant de nombreux groupes travaillent sur l'adaptation de la tomographie par cohérence optique pour d'autres applications telles que l'imagerie optique per opératoire. L'équipe de l'Institut Langevin et de LLTech a développé un type particulier de tomographie par cohérence optique : la tomographie par cohérence optique plein champ (14). Le principe est d'obtenir une image de résolution micrométrique de la pièce biologique afin d'avoir accès en temps réel à des informations très proches de celles obtenues par le gold-standard de neuropathologie, l'étude au microscope de

Figure 2. Echantillons frais. Comparaison entre le gold-standard histologique (fixation à l'Hématoxyline-Eosine) et les images obtenues sur la plateforme biphotonique. A/Echantillon de cortex provenant d'une chirurgie de l'épilepsie; B/Echantillon de glioblastome; C/Echantillon de métastase cérébrale et D/Echantillon de méningiome. Echelle: 100 µm.

lames fixées avec de l'Hématoxyline-Eosine. Cet outil de surface semble donc pouvoir renseigner sur la nature histologique du tissu en temps réel.

Le but du travail mené en collaboration entre le Centre Hospitalier Sainte Anne et l'équipe de l'Institut Langevin et de LLTech explorait donc les possibilités de la tomographie par cohérence optique plein champ, tout d'abord à l'aide d'un microscope utilisable dans le laboratoire de neuropathologie puis grâce à un endoscope pouvant être utilisé *in vivo*.

#### Matériel

Le microscope de tomographie par cohérence optique plein champ était basé sur une architecture dite d'interféromètre de Linnik. Une lampe halogène éclairait l'échantillon via l'objectif à immersion avec une longueur d'onde centrale de 700 nm. Le signal renvoyé par le tissu était extrait via un logiciel dédié. Les images natives faisaient un mm² avec une résolution axiale d'un micromètre puis étaient rattachées ensemble via le logiciel LLTech dédié afin de couvrir un champ de vue plus large.

L'endoscope opératoire est une adaptation du microscope qui fonctionne avec un logiciel propre. Son optique fait 200 mm de long pour 5 mm de diamètre. La résolution axiale est de six micromètres avec un champ de vue d'un millimètre de rayon. La fréquence d'image varie de 1 à 10Hz.

Les échantillons murins provenaient de l'équipe de l'institut Langevin et de LLTech.

Les échantillons biologiques frais provenaient de patients adultes nouvellement opérés au sein du service de Neurochirurgie du Centre Hospitalier Sainte Anne. Cette étude étant une preuve de concept, l'échantillonnage était le plus large possible (tissus provenant de chirurgie de l'épilepsie ou d'exérèse tumorale).

### Résultats

### Coupe d'hippocampe obtenue via le microscope de tomographie par cohérence optique plein champ

L'étude préliminaire menée via le microscope de tomographie par cohérence optique plein champ a permis de confirmer la résolution de l'outil sur des tissus cérébraux humains. Les neuropathologistes ont pu facilement travailler avec les images obtenues car proches de celle du gold standard histopathologique. Les fibres blanches, les structures vasculaires, le type de cellules étaient reconnaissables. Les détails fins des noyaux cellulaires apparaissaient en négatif sur les images obtenues (15) (Fig 3).

### Concordance entre une coupe histologique de cerveau murin et les images obtenues avec l'endoscope

L'endoscope opératoire a été testé sur des échantillons de cerveaux murins : la vitesse d'acquisition autorise un travail à main levé prudent, c'est-à-dire que l'endoscope peut produire des images OCT quasiment en temps réel. La résolution permet de reconnaître les principales structures d'une tranche de cerveau murin (16) (Fig 4).

### **Perspectives**

L'imagerie optique semble être une technique prometteuse pour offrir les caractéristiques nécessaires à une utilisation au

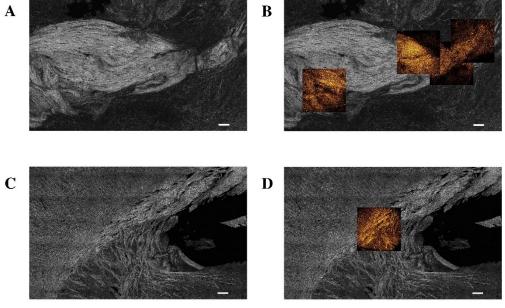


Figure 3. Coupe d'hippocampe obtenue lors d'une chirurgie de l'épilepsie analysé à l'aide du microscope de tomographie par cohérence optique plein champ. De gauche à droite et de haut en bas : Neurones pyramidales de la couche 4 de la corne d'Ammon (fixation Hémalun et Phloxine), Echelle: 40 µm; Image miroir en tomographie par cohérence optique plein champ, Echelle : 40 µm ; Couche granulé du gyrus denté (fixation Hémalun et Phloxine), Echelle : 80 µm; Image miroir en tomographie par cohérence optique plein champ, Echelle: 80 µm. Image macroscopique de la coupe d'hippocampe, Echelle: 900 µm.

Reproduit avec l'autorisation de E. Benoit a la Guillaume

bloc opératoire : la vitesse d'acquisition est élevée, les neuropathologistes peuvent facilement travailler avec les données obtenues, les différents types tissulaires sont différenciables avec ces techniques. La distinction entre des berges infiltrées et la tumeur solide étant la situation la plus difficile, il semble judicieux d'associer les différentes solutions d'imagerie optique afin d'avoir accès à la fois aux données structurelles et aux données métaboliques de l'échantillon analysé. Cette étape de preuve de concept doit donc désormais ouvrir à la validation *in vivo* de ces outils

### Remerciements

Centre Hospitalier Sainte Anne : Johan Pallud, Pascale Varlet, Edouard Dezamis, Georges Abi Lahoud, François Nataf, Baris Turak, Francine Chassoux, Elisabeth Landre, Catherine Oppenheim.

Laboratoire IMNC : Fanny Poulon, Ali Ibrahim. Institut Langevin et LLTech : Eugénie Dalimier, Emilie Benoît. This work is supported by PhysiCancer in Plan Cancer with "MEVO" and "IMOP" grant, by CNRS with "Défi instrumental" grant, and the Institut National de Physique Nucléaire et de Physique des Particules (IN2P3). This work was done in the PIMPA Platform partly funded by the French program "Investissement d'Avenir" run by the "Agence Nationale pour la Recherche" (grant "Infrastructure d'avenir en Biologie Santé - ANR - 11-INBS-0006").

### Références

- Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. Neuro-Oncol. 2015;17 Suppl 4:iv1-iv62.
- Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M. A Randomized, Controlled Trial of Surgery for Temporal-Lobe Epilepsy. N Engl J Med. 2001;345:311-8.
- Engel J, McDermott MP, Wiebe S, et al. Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. JAMA.

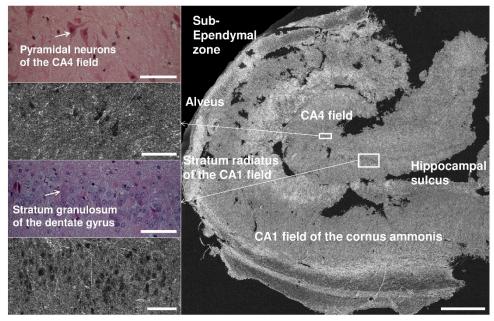


Figure 4. Comparaison entre les images obtenues par le microscope de tomographie par cohérence optique plein champ sur un cerveau murin fixé (A et C, niveaux de gris) et les zones explorées à l'aide de l'endoscope de tomographie par cohérence optique plein champ (B et D, niveaux de jaune). Echelle : 300 µm.

Tiré de Assayag et al, Neuroimage Clin, 2013

- 2012;307:922-30.
- Yamahara T, Numa Y, Oishi T, et al. Morphological and flow cytometric analysis of cell infiltration in glioblastoma: a comparison of autopsy brain and neuroimaging. Brain Tumor Pathol. 2010;27:81-87.
- Stummer W, Stocker S, Wagner S, et al. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. Neurosurgery. 1998;42:518-26.
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. Lancet Oncol. 2006;7:392-40.
- Stummer W, Tonn J-C, Mehdorn HM, et al. Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study. Clinical article. J Neurosurg. 2011;114:613 -73
- 8. Sanai N, Snyder LA, Honea NJ, et al. Intraoperative confocal microscopy in the visualization of 5-aminolevulinic acid fluorescence in low-grade gliomas. J Neurosurg. 2011;115:740-8.
- Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science. 1990;248:73-6.

- Abi Haidar D, Leh B, Zanello M, Siebert R. Spectral and lifetime domain measurements of rat brain tumors. Biomed Opt Express. 2015;6:1219-33.
- Zanello M, Poulon F, Varlet P, et al. Multimodal optical analysis of meningioma and comparison with histopathology. J Biophotonics. 2017;10:253-63.
- 12. Zanello M, Poulon F, Pallud J, et al. Multimodal optical analysis discriminates freshly extracted human sample of gliomas, metastases and meningiomas from their appropriate controls. Sci Rep. 2017;7:41724.
- 13. Huang D, Swanson EA, Lin CP, et al. Optical coherence tomography. Science. 1991;254:1178-81.
- 14. Moneron G, Boccara A-C, Dubois A. Polarization-sensitive full-field optical coherence tomography. Opt Lett. 2007;32:2058-60.
- Assayag O, Grieve K, Devaux B, et al. Imaging of non-tumorous and tumorous human brain tissues with full-field optical coherence tomography. NeuroImage Clin. 2013;2:549-57.
- 16. Benoit a la Guillaume E, Martins F, Boccara C, Harms F. Highresolution handheld rigid endomicroscope based on full-field optical coherence tomography. J Biomed Opt. 2016;21:26005.