

# CORRÉLATION ENTRE LA SURVENUE DE FISTULE POST- PANCREATICOUDODENECTOMIE (DP) ET LA PROPORTION DE FIBROSE PANCRÉATIQUE QUANTIFIÉE SELON 3 TECHNIQUES

Julija TODOROVIC<sup>1,3</sup>, Manon VAN CAUTEREN<sup>2,3</sup>, Alain FAUTREL<sup>3</sup>

*1. Université de Paris*

*2. Université de Rennes1*

*3. Plateforme d'Histo-Pathology High Precision, Université de Rennes 1,  
UMS Biosit, Inserm UMS 018, CNRS UMS3480*

alain.fautrel@univ-rennes1.fr

# CORRELATION BETWEEN OCCURRENCE OF FISTULA POSTPANCREATICODUODENECTOMY (DP) AND THE PROPORTION OF PANCREATIC FIBROSIS QUANTIFIED USING 3 TECHNIQUES

## ABSTRACT

Collagen fiber, produced by fibroblasts, is the most abundant protein in the human body. Found in the extracellular matrix (ECM), it ensures the healing of tissues by sometimes inducing fibrosis for which it is the main component. Its abundance and involvement in various pathological phenomena make this protein a topic of interest in the prediction of post-pancreaticoduodenectomy (PD) fistula. In this study, we present different microscopic techniques for quantifying collagen within sections of the human pancreas: Raman microscopy, second harmonic generation microscopy and polarized light epifluorescence microscopy used after staining collagen with Sirius Red (SR). These quantitative data are then compared with patients' clinical data as part of a statistical study highlighting a link between the fibrosis' proportion and the appearance of postoperative pancreatic fistula. Our analyses show, on one hand, that the quantification of the collagen-SR complex in polarized light remains the reference technique, and on the other hand, that collagen levels could be a key factor in the prediction of post-operative fistulas. On a larger scale and if future results allow it, this preliminary study will enable the highlighting of a clinical interest test for the evaluation of evaluation of pancreatic fistulas appearance.

## KEY WORDS

**Collagen ; pancreatic fistula ; polarized light microscopy ; Raman spectroscopy ; second harmonic generation microscopy ; Sirius Red**

## RESUME

La fibre de collagène, produite par les fibroblastes, est la protéine la plus abondante du corps humain. Retrouvée dans la matrice extra-cellulaire (MEC), elle assure la cicatrisation des tissus en induisant parfois la formation de fibrose dont elle est le principal constituant. Son abondance et son implication dans divers phénomènes pathologiques font de cette protéine un sujet d'intérêt dans la prédiction de fistule post-pancréaticoduodénectomie (DP). Dans cette étude, nous présentons différentes techniques microscopiques permettant la quantification du collagène au sein de coupes de pancréas humain : la micro-spectroscopie de Raman, la microscopie par génération de seconde harmonique et la microscopie en lumière polarisée utilisée après coloration du collagène au Rouge Sirius (RS). Ces données quantitatives sont ensuite confrontées aux données cliniques des patients dans le cadre d'une étude statistique mettant en évidence un lien entre la proportion de fibrose et l'apparition de fistule pancréatique post-opératoire. Nos analyses montrent, d'une part, que la quantification du complexe collagène-RS en lumière polarisée reste la technique de référence, et d'autre part, que le taux de collagène pourrait être un facteur clé dans la prédiction de fistules post-opératoires. A plus grande échelle et si les résultats futurs le permettent, cette étude préliminaire permettra la mise en avant d'un test d'intérêt clinique pour l'évaluation de l'apparition de fistules pancréatiques.

## MOTS CLÉS

**Collagène ; fistule pancréatique ; microscopie à lumière polarisée ; microscopie par génération de seconde harmonique ; Rouge Sirius ; spectroscopie Raman**

## INTRODUCTION

Le cancer du pancréas représente, à ce jour, un défi en oncologie digestive. Bien que son incidence soit faible, il reste le cancer digestif le plus fréquent après le cancer colorectal [1] et ne se manifeste par aucun symptôme, d'où sa détection tardive.

Par ailleurs, la fistule pancréatique (FP) post-DP est le principal déterminant de morbi-mortalité. Il s'agit d'une fuite de liquide pancréatique causée par une anomalie de communication canalaire affluant dans le duodénum. Elle se manifeste par un taux d'amylase dans les liquides de drainage 3 fois supérieur au taux d'amylase sérique à partir du 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> jour post-opératoire. Selon la classification de l'ISGPS de 2005, il existe 3 grades de fistules [2] :

- Fistule de grade A, dite biochimique, présente une augmentation d'activité de l'amylase. Elle est transitoire et n'a pas de répercussion clinique.
- Fistule de grade B nécessite un aménagement des soins post-opératoires par des agents thérapeutiques ou traitements peu invasifs.
- Fistule de grade C est le reflet d'une affection systémique plus grave avec un risque de défaillance des organes, d'intervention chirurgicale, de morbidité voire de décès.

Le facteur principal prédisposant à la fistule pancréatique est le caractère gras et l'absence de fibrose du pancréas [3,4]. Or, aucune mesure objective n'existe à ce jour pour prédire la survenue d'une FP et sa gravité. Le risque est, en effet, estimé par palpation du pancréas par le chirurgien pour évaluer la consistance du parenchyme pancréatique : plus le parenchyme est mou, plus le risque de fistule est élevé. Cette notion suppose qu'un pancréas dur est riche en fibres et plus particulièrement en collagène.

Cette protéine présente un intérêt grandissant dans l'étude de l'évolution tumorale. Elle est le principal composant de la MEC et représente à elle seule 6% du corps humain [5]. Sa quantification lors d'une chirurgie apporterait non seulement une plus-value aux estimations du chirurgien mais permettrait également de mieux adapter la prise en charge des patients.

Dans la présente étude, nous nous intéressons à différentes techniques microscopiques afin de déterminer celle apportant le plus de spécificité dans la quantification du collagène et d'étudier le caractère prédictif de la proportion de fibrose sur l'apparition de FP. Dans un premier temps, nous étudierons les

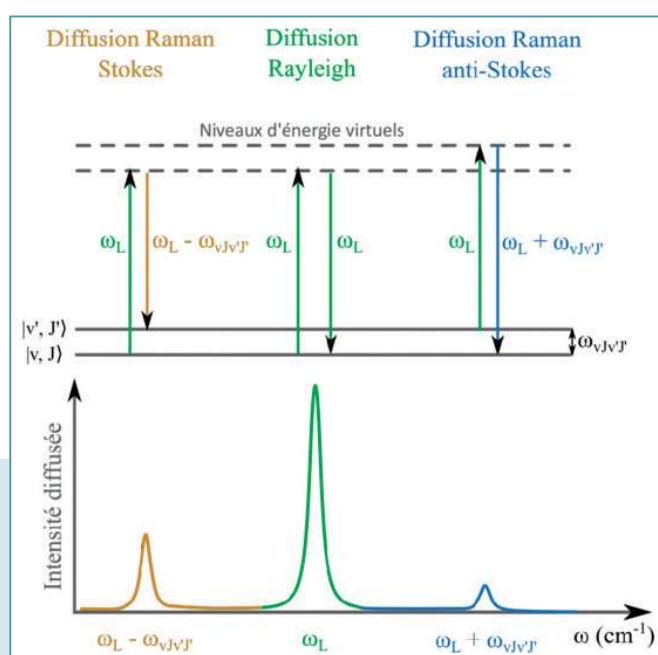
données spectroscopiques Raman, puis, celles apportées par la microscopie SHG et la coloration RS. Enfin, nous confronterons ces données expérimentales aux données cliniques des patients.

## LA SPECTROSCOPIE RAMAN

Il s'agit d'une technique d'analyse chimique non destructrice montrée expérimentalement pour la première fois par le physicien indien Raman en 1928 [6,7] et permettant de connaître les états transitoires de vibrations et de rotations d'une molécule excitée par une source lumineuse monochromatique. Modulée par les mouvements atomiques, cette spectroscopie utilise le principe de diffusion inélastique de la lumière et met en jeu un processus lié à la variation de la polarisabilité des liaisons moléculaires.

Lorsqu'une onde électromagnétique de fréquence  $\nu_0$  interagit avec une molécule, de la lumière est diffusée sous forme de rayonnements, dits élastiques, dont la fréquence est identique à la lumière incidente. Cette diffusion Rayleigh (ou diffusion élastique) constitue la majorité des rayonnements émis. Toutefois, seul un photon sur un million présente une interaction avec le matériau avec un gain ou une perte d'énergie par rapport à la lumière incidente. Le signal Raman est donc de faible intensité. La création de ces rayonnements inélastiques, caractérisant la diffusion Raman, s'explique par la polarisation du nuage électronique de la molécule après interaction avec l'onde électromagnétique et la création d'un dipôle qui oscille à une fréquence différente de celle de la lumière incidente [8,9]. Ce dipôle peut se manifester sous deux formes :

- Un rayonnement anti-Stokes de fréquence  $\nu+\nu_0$  (gain d'énergie du photon par rapport au photon incident)
- Un rayonnement Stokes de fréquence  $\nu-\nu_0$  (perte d'énergie du photon par rapport au photon incident)



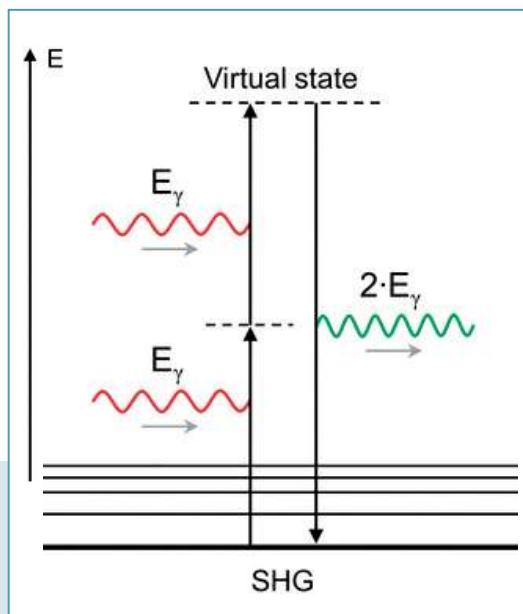
**Figure 1** : Schéma du principe de diffusion Raman où les rayonnements inélastiques Stokes et anti-Stokes accompagnent la diffusion Rayleigh.

Cependant, la probabilité et l'intensité de diffusion des rayonnements anti-Stokes étant inférieures à celles des rayonnements Stokes, seuls ces derniers sont considérés pour l'analyse spectroscopique usuelle.

A l'instar de la spectroscopie Infra-Rouge, la spectroscopie Raman permet d'accéder au niveau vibrationnel des molécules et de les caractériser chimiquement que ce soit à l'état solide, liquide ou gazeux (pour les gaz haute pression) [10]. Mais bien qu'avantageuse, cette technique présente des signaux de faible intensité, pouvant entraver l'analyse spectrale et l'avancée des travaux.

Cette technique nous donne ainsi des informations sur la composition de notre échantillon en collectant les spectres des liaisons chimiques présentes dans la matière étudiée. En l'occurrence nous essayons ici de dégager la signature spectrale du collagène pancréatique.

## LA MICROSCOPIE A GENERATION DE SECOND HARMONIQUE (SHG)



La microscopie SHG est une technique d'imagerie *in situ* reposant sur un processus optique non linéaire produit lorsqu'un champ électromagnétique interagit avec un matériau non centrosymétrique. Cette interaction aboutit à la conversion de deux photons d'une fréquence donnée en un seul photon de fréquence doublée [11-13].

**Figure 2 :** Diagramme de Jablonski du processus optique non linéaire de génération de second harmonique.

Émergeant dans les années 1970, la microscopie SHG fait l'objet de nombreuses études en biologie et physiopathologie des tissus [14]. L'existence de la SHG de collagène de type I a été mise en évidence en 1986, au cours de travaux sur les tendons de rat et depuis cette microscopie permet l'exploration des modifications d'orientation et d'organisation du collagène, le phénotypage de tissus ou encore le diagnostic de maladies. Aujourd'hui, cette technique constitue un outil privilégié dans l'étude de fibroses, le collagène de type I étant l'émetteur le plus efficace de SHG [15].

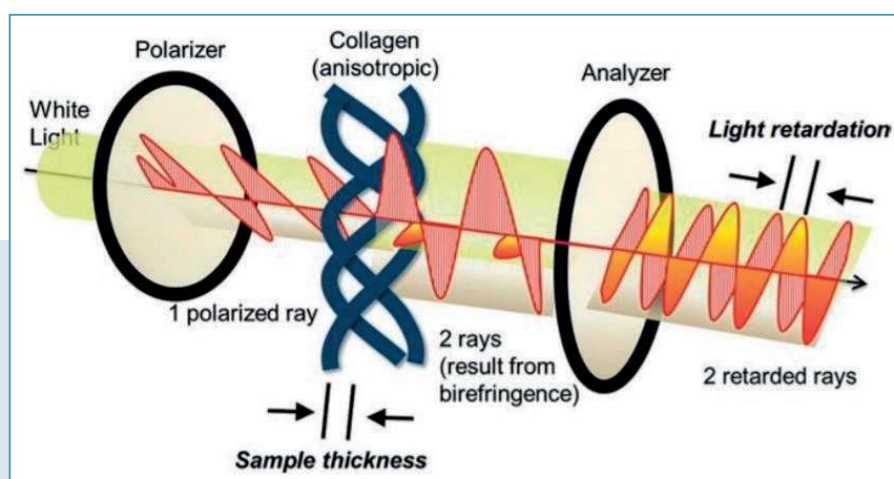
Ces signaux ne sont, en effet, produits que par des structures denses non centrosymétriques (sans centre d'inversion) telles que les fibres de collagène fibrillaires, les myofilaments ou les microtubules. Le collagène fibrillaire, de par son architecture en triple hélice, est capable de nous fournir de forts signaux SHG qui le différencient du collagène non fibrillaire (type IV) incapable d'en émettre.

Cette technique d'imagerie présente de nombreux avantages pour notre étude parmi lesquels : son caractère non invasif, sa reproductibilité, la possibilité d'observation sans immunomarquage et sa spécificité vis-à-vis du collagène fibrillaire [16].

## LA COLORATION ROUGE SIRIUS (RS)

La coloration au RS est l'une des techniques de coloration les mieux comprises. Elle se base sur la liaison des groupes sulfoniques  $\text{SO}_3\text{H}$  du colorant aux groupements basiques des acides aminés constituant le collagène. Cette interaction auxochromique accentue l'effet du chromophore azo  $\text{N}=\text{N}$  en étendant son absorption vers des longueurs d'ondes élevées [5].

Le colorant RS seul ne se lie pas sélectivement qu'aux fibres de collagène mais à une variété de molécules présentes dans la MEC telles que des polysaccharides [17]. C'est la combinaison de la coloration et de l'émission de lumière polarisée qui rend la détection du collagène fibrillaire spécifique. En effet, les matériaux biologiques anisotropes tels que les collagènes fibrillaires interagissent avec la lumière en fonction de leur orientation. Ils induisent une bi-réfraction de la lumière créant 2 rayons se déplaçant à des vitesses différentes et dont les directions de vibrations sont perpendiculaires les unes aux autres. La biréfringence du RS qui se lie parallèlement aux fibres est ainsi augmentée et permet la mise en évidence du complexe collagène fibrillaire-RS qui apparaît rouge vif, en contraste net avec le reste du tissu qui demeure sombre [5].



**Figure 3 :** Principe de bi-réfringence et détection du complexe collagène fibrillaire-RS par lumière polarisée.

L'un des 2 rayons perpendiculaires est « retourné » par l'analyseur pour qu'il soit détecté. L'intensité de détection est régie par le retard relatif d'un rayon par rapport à l'autre et est directement proportionnelle à la compaction des fibres puisque l'indice de réfraction est constant pour un matériau donné [5].

En somme, la méthode Polarisation-RS est une approche peu coûteuse qui fournit suffisamment d'informations pour l'identification du collagène [18] et peut être mise en corrélation avec la technique d'imagerie SHG, elle aussi spécifique du collagène.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Les échantillons utilisés dans le cadre de cette étude sont des prélèvements d'adénocarcinomes pancréatiques du CHU de Rennes, stockés au CRB après accord des patients et du comité d'éthique. Nous disposons donc de 11 échantillons de pancréas non tumoraux, obtenus sur des patients ayant subi une chirurgie suite à un cancer du pancréas entre 2016 et 2020. Ils sont conservés dans de l'isopentane ou de l'azote liquide à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour conserver la structure des tissus puis sont coupés au cryostat à une épaisseur de  $30\mu\text{m}$ .

### SPECTROSCOPIE RAMAN

**Objectif : Mettre en évidence la signature spectrale du collagène.**

#### **Paramètres d'acquisitions du spectrophotomètre :**

Toutes les données sont acquises à l'aide d'un spectrophotomètre Raman dont la longueur d'onde est fixée à 532 nm afin d'obtenir une signature spectrale du collagène de meilleure qualité. Nos coupes de pancréas n'ont pas été placées sous lamelles pour ne pas risquer de fausser l'acquisition de notre spectre (le verre pouvant entraîner un bruit de fond supplémentaire).

A objectif x10 puis x50, les surfaces à étudier sont sélectionnées en se repérant par rapport aux coupes colorées au HES pour détecter les zones riches en collagène. Le laser est paramétré avec une puissance de 6,5 mW, un temps d'exposition



de 9 secondes (5Hz) et un temps préalable de photoblanchiment de 2 secondes permettant de détruire la fluorescence endogène du tissu, qui masquerait les signaux Raman. Les points d'acquisition sont séparés des autres par une distance de 30,0  $\mu\text{m}$ .

### **Analyse des signatures spectrales :**

Après acquisition, les spectres sont traités et analysés sur le logiciel Omnic afin de définir la signature spectrale correspondant, *a priori*, au collagène. Pour cela, nous procédons à un lissage et à un moyennage de l'ensemble des spectres afin d'éliminer un maximum de bruit de fond et de mettre en évidence les pics caractéristiques du collagène, en comparaison avec les spectres issus des zones cellulaires.

### **Analyse chimiométrique :**

Le logiciel TQ Analyst® (thermo) nous a permis de réaliser une analyse discriminante à partir d'échantillons avec et sans collagène. Au cours de cette analyse, les spectres sont lissés et alignés par une dérivée seconde associée à un filtrage de Savitzky-Golay. Une calibration est ensuite réalisée sur différentes zones spectrales d'intérêt choisies selon la littérature et nos observations. Après analyse en composantes principales (PCA *principal component analysis*), nous avons pu mettre en évidence des zones spectrales permettant de caractériser le collagène sur nos échantillons ( $817\text{ cm}^{-1}$ ;  $1638\text{ cm}^{-1}$ ;  $1681\text{ cm}^{-1}$ ) [19,20] et aboutir à la formation de 2 groupes au sein de l'échantillon. La PCA est souvent utilisée comme première étape pour d'autres méthodes multivariées et constitue l'outil de travail le plus utilisé en chimiométrie dont les objectifs sont de permettre une visualisation des données spectrales X dans un espace multivarié, la détection d'échantillons atypiques et la sélection de variables.

## **MICROSCOPIE BIPHOTONIQUE**

**Objectif : Obtenir le signal SHG du collagène sur nos tissus.**

### **Paramètres d'acquisition du microscope biphotonique :**

Les paramètres d'acquisition sont configurés dans le logiciel Spectrapysics® (LEICA). La longueur d'onde d'excitation est fixée à 810 nm et le mode bidirectionnel est appliqué pour accélérer l'acquisition. De l'huile à immersion est déposée sur l'objectif x20 du microscope confocal avant chaque analyse de lame. Le filtre SHG

est ensuite placé entre l'objectif et le laser, il doit être étroit afin de différencier la fluorescence de la SHG. Les positions de champ sont ensuite enregistrées à une vitesse d'acquisition de 400Hz (400 images/seconde), le nombre d'accumulation d'images est ajusté à 4, pour diminuer la résonance. Puis les cartographies s'effectuent en activant les modes PMT2 et PMTtrans. Les cartographies sont réalisées sur les mêmes surfaces qu'en spectroscopie de Raman, en se basant sur les mêmes points de repères.

### **Traitement d'images :**

Le logiciel Amira®(thermo) est ici utilisé pour réduire au maximum le bruit de fond tout en conservant un maximum d'informations. Pour cela, l'option « ortho slice » est appliquée à chaque image avant de la traiter avec les filtres :

- Despeckle pour accentuer les contours du marquage
- Deblur pour lisser l'image
- Sigma filter pour finaliser le seuillage

### **Quantification du signal SHG :**

La plate-forme d'analyse d'images Halo permet de quantifier le signal SHG des fibres de collagène à l'aide du module Area Quantification FL. Dans un premier temps, la ROI de chaque coupe est définie et enregistrée dans « annotation ». Puis, le paramètre « analyse » permet d'ajuster le seuillage de détection du signal SHG appliqué sur toutes les images avant de recueillir les données issues uniquement de la ROI en appliquant l'option « annotation layer ».

## **COLORATION ROUGE SIRIUS**

*Objectif : Mettre en évidence le collagène grâce à la biréfringence qu'apporte la lumière polarisée.*

### **Coloration :**

Une fois passées sous le spectrophotomètre Raman et le microscope SHG, les coupes de pancréas sont colorées au RS avec une contre-coloration HE dilué au ¼.

### **Scan NIS :**

Après coloration, une mosaïque d'images est réalisée automatiquement pour obtenir une image de grande surface, les coupes sont ainsi numérisées au

microscope Nikon NiE à l'aide du logiciel NIS. Les modules Ni-E Pad et DS-Fi1 Settings sont utilisés pour paramétrer la numérisation avec un objectif x20, un temps d'exposition de 30 ms et une intensité lumineuse allant de 37 à 40 V pour les coupes sous lumière non polarisée et de 60 à 93 V pour les coupes analysées sous lumière polarisée. Le polariseur doit être orienté à  $\pm 45^\circ$  pour visualiser correctement les fibres de collagène.

### **Quantification du collagène sur NIS :**

Le collagène est cette fois quantifié sur coupe entière à l'aide du logiciel « NIS element » (NIKON). Le mode RGB du module Thresholding permet de réaliser une segmentation par sélection de pixels d'intérêts correspondant au complexe collagène-RS (rouge vif). Le module Binary Toolbar permet quant à lui d'affiner la sélection de pixels pour plus de précision. Une fois défini, le seuillage est enregistré et appliqué à toutes les coupes.

### **Quantification du collagène sur Halo :**

Le collagène coloré au RS a également été quantifié sur la plate-forme Halo® (INDICA LABS) au niveau des mêmes ROIs que pour la spectroscopie Raman et la SHG. Les paramètres utilisés sont les mêmes que dans le cas de la quantification du signal SHG. La ROI de chaque coupe est définie puis le seuillage de détection du complexe collagène-RS est appliqué à toutes les ROIs. Les résultats issus des quantifications sont traités dans un fichier Excel.

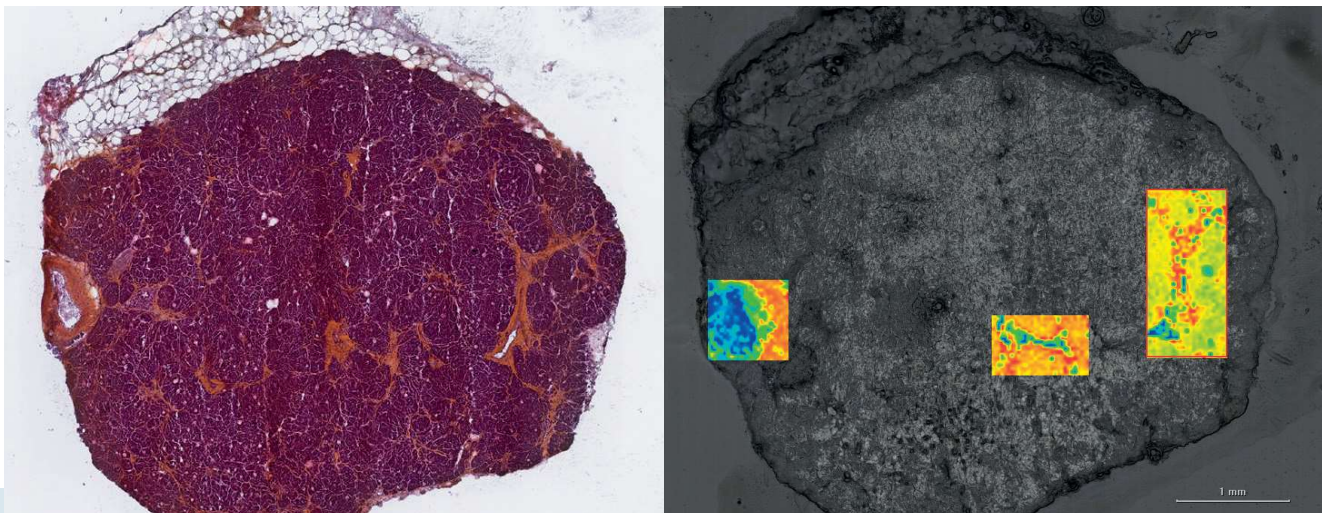
## **ANALYSES STATISTIQUES**

Dans le cadre des analyses statistiques, nous disposons d'un échantillonnage de 16 individus. Les données cliniques sont saisies dans un tableur Excel et les analyses statistiques sont effectuées à l'aide des logiciels SPSS 23.0 et Biostatgv pour les variables qualitatives avec sous-groupes. Les p-values des variables quantitatives sont calculées avec le test de Wilcoxon ou Mann-Witney bilatéral corrigé pour les ex-aequo et celles des variables qualitatives avec le test exact de Fischer. Toutes les variables sont ensuite incorporées dans une analyse univariée où celles dont le  $P < 0,05$  sont considérées comme statistiquement significatives.

## RESULTATS

Le premier objectif de notre étude a été de quantifier au mieux le collagène dans les coupes de pancréas à l'aide des 3 techniques développées en amont, en commençant par la spectroscopie Raman.

Parmi les outils disponibles dans le logiciel OmnicXi figurent la MCR permettant d'attribuer, en fonction des ressources de la bibliothèque et du seuillage appliqué, une identité chimique aux spectres détectés par le spectrophotomètre dans la zone de fibrose. Cependant, la correspondance entre le signal et le composé proposé étant faible, il nous est impossible d'affirmer avec certitude la nature du signal en question. De plus, la bibliothèque n'est, pour le moment, pas suffisamment riche pour comparer la signature spectrale hypothétique du collagène pur à celles présentes dans la zone sélectionnée.

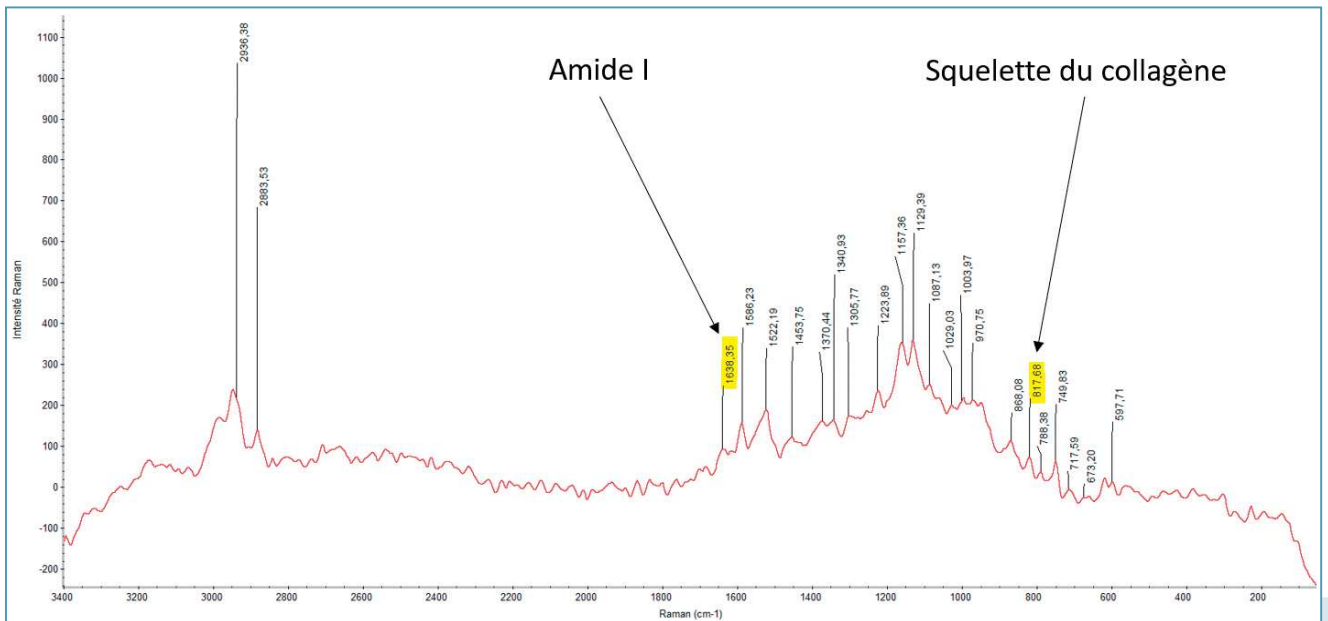


**Figure 4 :** Coupe de pancréas LEM1046 colorée au HES (a); cartographie de coupe de pancréas LEM1046 obtenue au spectrophotomètre Raman (b).

Nous nous sommes alors penchés plus en détail sur l'analyse spectrale en commençant par un moyennage des spectres obtenus dans les zones de fibrose et les zones cellulaires puis par une soustraction de ces deux moyennes afin d'éliminer l'influence de l'environnement cellulaire et de se rapprocher au maximum de ce qui correspondrait, *a priori*, à la signature spectrale du collagène pur.

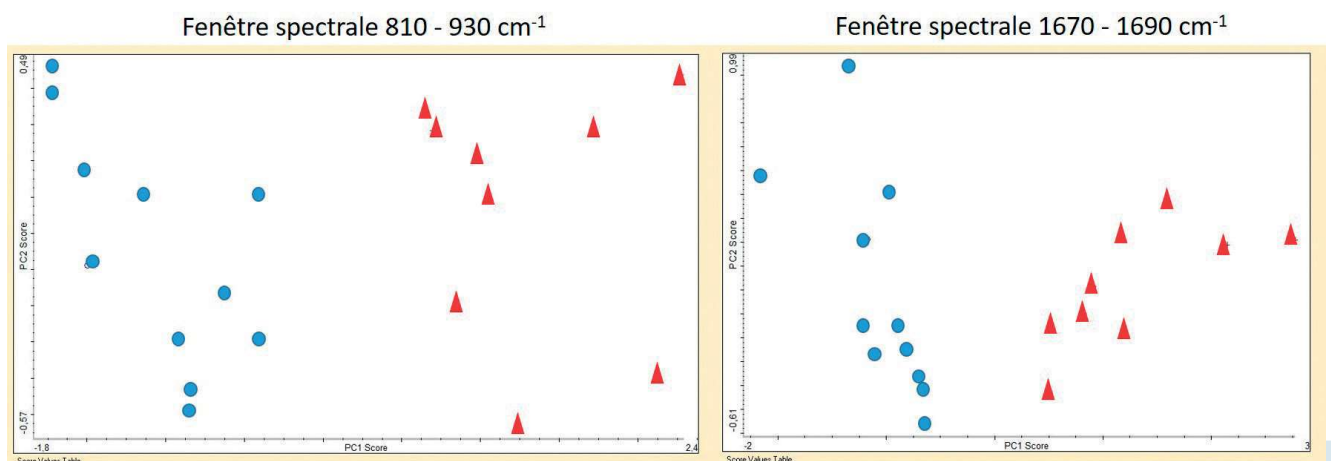
Selon la littérature, nous retrouvons certains pics caractéristiques du collagène parmi lesquels [20,21] :

- 817  $\text{cm}^{-1}$  correspondant au squelette du collagène,
- 1638  $\text{cm}^{-1}$  et 1681  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à l'amide I.



**Figure 5 :** Spectre moyen du collagène soustrait au spectre moyen des zones cellulaires.

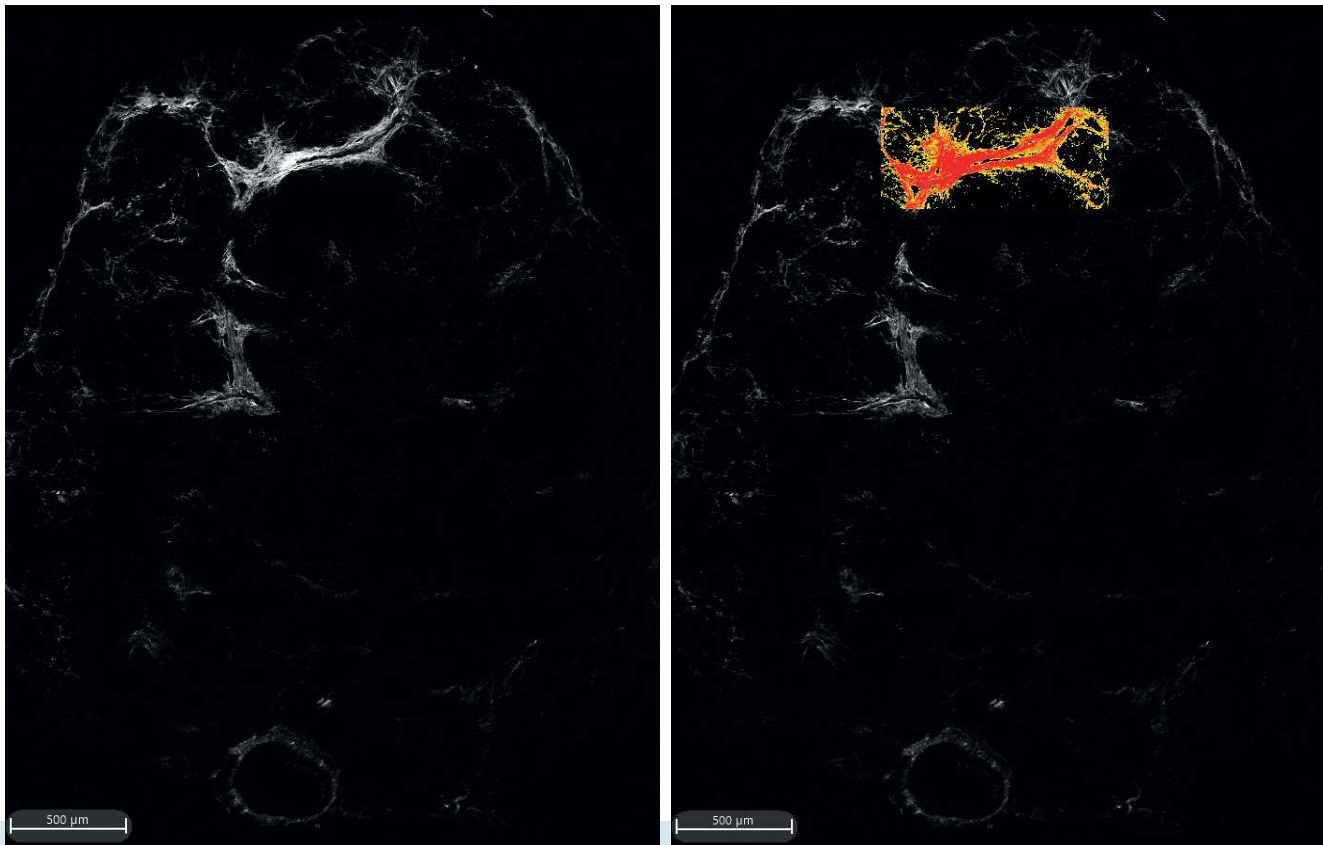
La régression par PCA permet d'interpréter les données issues de la spectroscopie Raman et offre la possibilité de déduire la concentration d'un composé, à condition de disposer d'une gamme étalon, ce qui n'était malheureusement pas notre cas. Cependant, cet outil peut tout de même être utilisé pour discriminer 2 ou plusieurs molécules biologiques, comme montré ci-dessous où le groupe « collagène » correspondant aux spectres issus des zones riches en fibrose se distingue nettement du groupe « pancréas » comprenant les spectres issus des zones cellulaires.



**Figure 6 :** Analyse PCA pour les pics à 817 cm-1 (a) et 1681 cm-1 (b)  
Ronds bleus : groupe "pancréas" - Triangles rouges : groupe "collagène" riche en fibrose.

Après avoir discriminé de manière objective les zones riches en fibrose, nous cherchons à quantifier le collagène de manière spécifique.

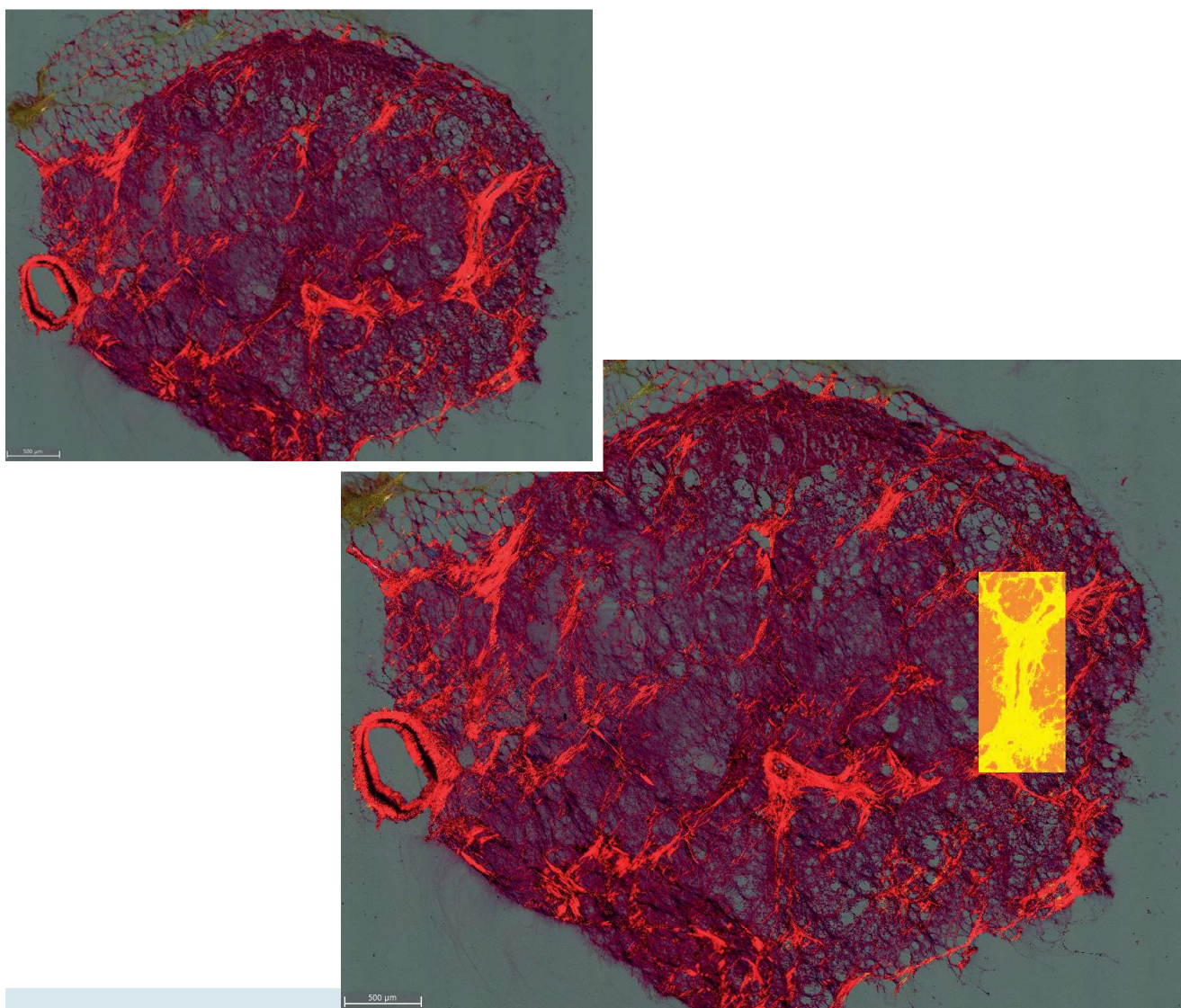
La quantification du signal SHG sur Halo révèle une large gamme de pourcentages allant de 18,07 à 99,56 %. Pour certaines coupes, le signal semble atténué par rapport à leur observation en HES ou en RS-lumière polarisée. Cette atténuation pourrait être due aux paramètres d'acquisition, au fait que la microscopie n'est spécifique qu'au collagène de type I, excluant la détection des autres types de collagène, ou à l'orientation des fibres à laquelle le signal est sensible.



**Figure 7 :** Mise en évidence du signal SHG de la coupe LEM1046 (a) et de sa quantification sur Halo au niveau d'une zone riche en fibrose (b).

La quantification du complexe collagène-RS sur Halo oscille entre 40,6% et 99,06 %. Toutefois certaines fibres de collagène ont un aspect strié et d'autres apparaissent sombres du fait de leur orientation par rapport au polariseur ce qui complique la quantification exacte des fibres.

Par ailleurs, la comparaison de la quantification du complexe collagène-RS sur coupe entière en lumière polarisée et non polarisée souligne la nécessité de l'utilisation de la lumière polarisée rendant spécifique la mise en évidence des fibres. Bien que, suivant la même tendance qu'en lumière polarisée, la quantification du



**Figure 8 :** Mise en évidence du complexe collagène-RS de la coupe LEM1046 (a) et de sa quantification sur Halo au niveau d'une zone riche en fibrose (b).

complexe en lumière non polarisée est subjective, expérimentateur dépendante et biaisée par la connaissance du positionnement des fibres par rapport aux coupes observées en lumière polarisée.

Malgré la spécificité de la microscopie SHG, nous prenons comme référence la technique RS-lumière polarisée qui reste la base en matière d'analyse du collagène. Nous mettons ainsi en corrélation le pourcentage de collagène-RS et les données cliniques des patients sur un échantillon de 16 individus afin d'évaluer les éventuelles influences des données sur le risque de survenue de fistule post-opératoire. Nous nous intéressons particulièrement aux facteurs suivants : sexe, âge, IMC, pourcentage de collagène, type de pancréas, diamètre Wirsung et fistule qui sont souvent discutés dans la littérature et font parfois l'objet de controverses.

<b>Tableau 1</b>	Total - n=16		Collagène ≤ 25% - n=11		Collagène > 25% - n=5		<b>p-value</b>
Homme	13	(81,3)	11	(100)	2	(40)	0,018
Age	70	[63-79]	71	[59-76]	70	[65-83]	0,533
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,7	[22,8-28,2]	27	[22,6-29,2]	26,4	[22,6-27,3]	0,692
Classe IMC							1
18-25	7	(43,8)	5	(45,5)	2	(40)	
25-30	8	(50)	5	(45,5)	3	(60)	
30-35	1	(6,3)	1	(9,1)	0	(0)	
Pourcentage de collagène	21,5	[8,94-40,65]	15	[7,36-22,12]	44,7	[37,38-49,68]	0,002
<b>ANTECEDENTS ONCOLOGIQUES</b>							
Familiaux	6	(37,5)	3	(27,3)	3	(60)	0,299
Personnels	5	(31,3)	5	(45,5)	0	(0)	0,119
<b>ANTECEDENTS MEDICAUX</b>							
Alcool	3	(18,8)	3	(27,3)	0	(0)	0,509
Tabac	7	(43,8)	5	(45,5)	2	(40)	1
HTA	7	(43,8)	5	(45,5)	2	(40)	1
Diabète	6	(37,5)	4	(36,4)	2	(40)	1
<b>DIAGNOSTIC</b>							
Ictère	10	(62,5)	7	(63,6)	3	(60)	1
Siège tumoral							0,328
Tête	11	(68,8)	7	(63,6)	4	(80)	
Uncus	1	(6,3)	1	(9,1)	0	(0)	
Corps	1	(6,3)	0	(0)	1	(20)	
Queue	3	(18,8)	3	(27,3)	0	(0)	
Dilatation Wirsung	11	(68,8)	6	(54,5)	5	(100)	0,119
<b>BIOLOGIE</b>							
CA19.9 (UI)	227	[11-1061]	309	[10-928]	79	[9-?]	1
Albumine (g/L)	37	[31,5-44,5]	37	[28-43]	40	[35-?]	0,77
Protide (g/L)	72	[59-75]	69	[58-73]	76	[75-?]	0,067
Créatinine (µmol/L)	75	[68-91]	81	[71-95]	73	[55-85]	0,177
PNI	48,2	[38,8-53,6]	48	[34,4-54,2]	49,7	[46,5-?]	0,77
<b>CHIRURGIE</b>							
Type de pancréas							1
Mou	2	(20)	2	(25)	0	(0)	
Dur	6	(60)	4	(50)	2	(100)	
Intermédiaire	2	(20)	2	(25)	0	(0)	
Diamètre Wirsung (mm)	5	[3-6]	4,5	[3-5,7]	5,5	[5-?]	0,352
≤ 3mm	3	(30)	3	(37,5)	0	(0)	
> 3mm	7	(70)	5	(62,5)	2	(100)	
<b>POST OPERATOIRE</b>							
Fistule	5	(31,3)	4	(36,4)	1	(20)	1
Fistule du pancréas							0,547
Aucune	11	(68,8)	7	(63,6)	4	(80)	
Biochimique	3	(18,8)	3	(27,3)	0	(0)	
Clinique (B-C)	2	(12,5)	1	(9,1)	1	(20)	

HTA : hypertension artérielle ; CA19.9 : antigène carbohydre 19.9 ; PNI : prognostic nutritional index ; IMC : indice de masse corporelle



<b>Tableau 2</b>	Total - n=16		Pas fistule - n=11		Fistule - n=5		<b>p-value</b>
Homme	13	(81,3)	8	(72,7)	5	(100)	0,509
Age	70,5	[63-79]	68	[59-83]	74	[67-78]	0,461
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,7	[22,8-28,2]	26,4	[22,6-27,7]	27	[21,5-31,9]	0,61
Classe IMC							0,506
18-25	7	(43,8)	5	(45,5)	2	(40)	
25-30	8	(50)	6	(54,5)	2	(40)	
30-35	1	(6,3)	0	(0)	1	(20)	
Pourcentage de collagène	21,49	[8,94-40,65]	22,1	[10,6-44,7]	15	[6,6-26-5]	0,336
<b>ANTECEDENTS ONCOLOGIQUES</b>							
Familiaux	6	(37,5)	5	(45,5)	1	(20)	0,588
Personnels	5	(31,3)	1	(9,1)	4	(80)	0,013
Solides	4	(80)	1	(100)	4	(100)	0,2
Lymphomes	1	(20)	1	(100)	0	(0)	0,2
<b>ANTECEDENTS MEDICAUX</b>							
Alcool	3	(18,8)	2	(18,2)	1	(20)	1
Tabac	7	(43,8)	4	(36,4)	3	(60)	0,596
HTA	7	(43,8)	6	(54,5)	1	(20)	0,308
Diabète	6	(37,5)	4	(36,4)	2	(40)	1
Score de Charlson	4	[2-6]	4	[2-6]	6	[5-7]	0,052
<b>DIAGNOSTIC</b>							
Ictère	10	(62,5)	8	(72,7)	2	(40)	0,299
Siège tumoral							0,005
Tête	11	(68,8)	10	(90,9)	1	(20)	
Uncus	1	(6,3)	0	(0)	1	(20)	
Corps	1	(6,3)	1	(9,1)	0	(0)	
Queue	3	(18,8)	0	(0)	3	(60)	
Dilatation Wirsung	11	(68,8)	9	(82)	2	(40)	0,287
<b>BIOLOGIE</b>							
CA19.9 (UI)	227	[11-1061]	391	[9-1329]	120	[13-?]	0,558
Albumine (g/L)	37	[31,5-44,5]	36	[28-40]	45	[43-?]	0,079
Protide (g/L)	72	[59-75]	69	[58-76]	72,5	[72-?]	0,694
Créatinine (µmol/L)	75	[63-91]	79	[63-96]	74	[63-87]	0,695
PNI	48,2	[38,8-53,6]	46	[34-53]	52,8	[51,5-?]	0,242
<b>CHIRURGIE</b>							
Type de pancréas							0,4
Mou	2	(20)	1	(11,1)	1	(100)	
Dur	6	(60)	6	(66,7)	0	(0)	
Intermédiaire	2	(20)	2	(22,2)	0	(0)	
Diamètre Wirsung (mm)	5	[3-6]	5	[3-6]	3	[3-3]	0,287
≤ 3mm	3	(30)	2	(22,2)	1	(100)	
> 3mm	7	(70)	7	(77,8)	0	(0)	

HTA : hypertension artérielle ; CA19.9 : antigène carbohydre 19.9 ; PNI : prognostic nutritional index ; IMC : indice de masse corporelle

**Tableau 1 : Mise en corrélation du pourcentage de collagène et des données cliniques.**

**Tableau 2 : Mise en corrélation de l'apparition ou non de fistule et des données cliniques.**

Dans un premier temps, nous avons séparé notre échantillon en 2 groupes selon le critère limitant de 25% de fibrose, lequel se base sur certaines études démontrant qu'une proportion de fibrose  $\leq 25\%$  constitue un facteur clé augmentant le risque de fistule [21]. Les résultats statistiques montrent que seul le sexe est significativement différent entre les 2 groupes. La significativité du pourcentage de collagène n'est pas prise en compte mais permet de rétro-contrôler les calculs. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la donnée « diamètre Wirsung » qui, selon certains auteurs, constitue un facteur de risque de fistule s'il est inférieur ou égal à 3 mm [21,22]. Cependant, notre échantillon est trop faible et les variables manquantes trop nombreuses pour obtenir des résultats exploitables.

Nous avons ensuite étudié la significativité des paramètres en fonction du critère limitant « fistule » / « pas fistule ». Il apparaît que les antécédents oncologiques personnels et le siège tumoral soit significativement différent.

Cependant, ce dernier résultat ne semble pas en accord avec les constats de la littérature qui stipulent que la DPC présente un risque accru de fistule contrairement à la DP gauche qui est moins fréquente car moins détectée et moins à risque puisqu'elle ne s'effectue pas au niveau d'un carrefour vasculaire. On observe également que le sexe et le pourcentage de fibrose ne sont pas significativement différents.

## DISCUSSION

Durant cette étude, nous avons discriminé les zones riches en fibrose sur nos coupes par PCA des signatures spectrales Raman, distingué et quantifié spécifiquement les fibres de collagène en microscopie non linéaire par la détection de la SHG et en microscope à lumière polarisée après coloration au RS. Mais celles-ci ont souligné certaines limites techniques qui ont contraint l'analyse de nos résultats.

Tout d'abord, le manque de banques de données au spectromètre Raman a entravé l'identification spécifique de la nature des composants étudiés. Malgré cette limite, nous avons pu différencier les zones riches en collagène des zones cellulaires par PCA. Toutefois, il serait judicieux de réaliser préalablement un dosage par étalonnage du collagène pur afin de déduire sa concentration au niveau des coupes et appuyer les résultats précédemment trouvés.

Par ailleurs, la détection de la SHG réalisée sans modification de l'angle de polarisation du laser semble insuffisante pour une détection exhaustive du collagène. En effet, Strupler et al. [16] a pu corrélérer la quantité de collagène mesurée à partir de la SHG et des colorations histologiques en utilisant une lame quart d'onde positionnée sur le passage du laser femtoseconde du multiphoton, ce qui souligne l'importance de l'utilisation de la polarisation circulaire pour la détection de la SHG.

Concernant la coloration au RS, l'utilisation de lumière polarisée ou non polarisée semble, à première vue, équivalente. Cependant, la quantification des fibres en lumière non polarisée est biaisée par le choix de seuillage expérimentateur dépendant. De plus, des études ont montré que la quantification en lumière polarisée facilite non seulement la détection des fibres de collagène mais est également nécessaire à son observation spécifique [18,5]. Par ailleurs, nous avons vu que l'aspect strié des fibres, dépendant de leur orientation par rapport au polariseur, entravait leur quantification exacte. Toutefois, des études montrent que la lumière polarisée circulairement permet de dépasser cet obstacle et de faire apparaître toutes les fibres de collagène, rendant la technique RS-lumière polarisée davantage spécifique.

Enfin, les données statistiques offrent une première approche de corrélation entre le pourcentage de fibrose et la survenue de fistules. Néanmoins la taille de l'échantillon est trop faible et les données biologiques manquantes sont trop nombreuses pour obtenir des différences significatives. Outre les limitations statistiques, il existe une variété d'études concernant les facteurs de risque de fistule après DP mais nombreuses sont les contradictions. Ainsi, le sexe et l'âge sont tantôt considérés comme des facteurs de risque de fistule, tantôt comme des facteurs indépendants [21,22,3].

Les variables sériques sont, quant à elles, globalement considérées comme non significatives, tandis que l'IMC supérieur à 25 est toujours retrouvé parmi les facteurs de risque. La texture molle du pancréas et un diamètre du CPP (Wirsung) inférieur ou égal à 3 mm sont indéniablement considérés comme des facteurs hautement prédictifs du risque de fistule. Certaines études se sont penchées sur le sujet et ont intégré le facteur « valeur CT » dans leurs données. La valeur CT correspond à une échelle de gris au scanner, mesurée en Hounsfield, reflétant la densité de l'organe corrélée à la survenue de fistule si sa mesure est inférieure à 40 Hounsfield [21]. Le pourcentage de fibrose et la valeur CT s'avèrent être supérieurs pour les patients avec une fistule de grade A par rapport aux patients avec une fistule de grade B ou C [21].

Par ailleurs, la tomодensitométrie préopératoire semble être une valeur prédictive alternative pour se prémunir des risques post-opératoires. Elle doit, cependant, être corrélée au pourcentage de fibrose, estimé après l'opération chirurgicale, et ne présente aujourd'hui qu'une valeur prédictive modérée sur l'incidence de fistule [21].

Enfin, l'influence des antécédents médicaux tels que le diabète, la consommation d'alcool ou de tabac sur le risque de fistule sont encore contestés. Selon Wellner *et al.*, par exemple, la malnutrition et la consommation de tabac constituent des facteurs de protection contre la fistule par augmentation du taux de fibrose. D'autres, au contraire, affirment que ces facteurs augmentent le risque de survenue de fistule et de mortalité après résection [4].

Une autre difficulté à laquelle nous faisons face est que toutes les études sont rétrospectives et utilisent différentes méthodes statistiques ne permettant pas la comparaison directe des essais. De plus, les procédures chirurgicales et péri-opératoires ne sont pas standardisées [3,4].

Malgré les nombreuses divergences, nous pourrions prendre en compte une méta-analyse publiée en 2017, qui a retenu les facteurs de risque de fistule suivants : texture molle du pancréas, IMC supérieur à 25, transfusion sanguine, perte de sang peropératoire et durée opératoire prolongée [3].

## CONCLUSION

Cette étude nous a permis de comparer différentes techniques de quantification du collagène. Elle révèle les limites techniques de la spectroscopie Raman, le besoin d'une détection plus exhaustive de la SHG par utilisation d'un système de polarisation circulaire pour identifier les signaux dans toutes les directions (en arrière et en avant de l'échantillon) et la nécessité d'utiliser la lumière polarisée pour quantifier spécifiquement le complexe collagène/RS. Par ailleurs, la texture molle du pancréas reste indéniablement le facteur prédictif de survenue de fistule le plus efficient mais son estimation reste encore subjective et les études prenant en compte l'évaluation du pourcentage de fibrose sont insuffisantes. Enfin, l'étude des tendances statistiques sur une grande cohorte de patients sont essentielles afin d'affirmer ou d'infirmer les résultats trouvés dans la littérature et établir avec certitude les facteurs prédictifs de fistule qui font, à ce jour, l'objet de controverses.

## REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent au Dr Romain LESOURD, chirurgien digestif au CHU de Nantes, pour le partage de son expertise et le temps qu'il nous a accordé durant toute la durée de cette étude.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. DROUILLARD A., et al. [Epidemiology of pancreatic cancer]. *Bull Cancer*, 2018,**105** (1): 63-69 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29273548>
2. BASSI C., et al. The 2016 update of the International Study Group (ISGPS) definition and grading of postoperative pancreatic fistula: 11 Years After. *Surgery*, 2017,**161** (3): 584-591 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28040257>
3. PENG Y.P., et al. Risk factors of postoperative pancreatic fistula in patients after distal pancreatectomy: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 2017,**7** (1): 185 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28298641>
4. SANDINI M., MALLEO G. & GIANOTTI L. Scores for Prediction of Fistula after Pancreatoduodenectomy: A Systematic Review. *Dig Surg*, 2016,**33** (5): 392-400 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27160158>
5. RITTIE L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. *Methods Mol Biol*, 2017,**1627** 395-407 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28836216>
6. RAMAN C.V. A Change of Wave-length in Light Scattering. *Nature*, 1928,**121** (3051): 619-619 <https://doi.org/10.1038/121619b0>
7. RAMAN C.V. & KRISHNAN K.S. A New Type of Secondary Radiation. *Nature*, 1928, **121** (3048): 501-502 <https://doi.org/10.1038/121501c0>
8. LE NADER V. Experimental and theoretical approach of enhanced Raman scattering : surface plasmons resonance and lithening rod effect - Approche expérimentale et théorique de la diffusion Raman exaltée : résonance des plasmons de surface et effet de pointe, Université de Nantes, 2010: pages. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00559365>
9. REYMOND-LARUINAZ S. Biomolecules and nanostructured systems : characterization by Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) - Biomolécules et systèmes nanostructurés : caractérisation par spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS), Université de Bourgogne, 2014: pages. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01127140>

10. BOUBEKEUR-LECAQUE L., FELIDJ N. & LAMY DE LA CHAPELLE M. Comprendre. La diffusion Raman exaltée de surface. *Photoniques*, 2018,(90): 41-44  
<https://doi.org/10.1051/photon/20189041>
11. MARIE-ANDRÉE H. Amélioration de la microscopie "stimulated raman scattering" (srs) et applications aux sciences de la terre, Université du Québec, 2017: pages.  
<https://espace.inrs.ca/id/eprint/51111/1/Houle%2C%20Marie-Andr%C3%A9e.pdf>
12. MOHAMED O. Imagerie multiphoton à génération de seconde harmonique et applications à la bioingénierie moléculaire et tissulaire, Biopôle Nancy, 2015: pages.  
[https://www.ptibc-imaging.fr/wp-content/uploads/RS29\\_MEMOIRE-1.pdf](https://www.ptibc-imaging.fr/wp-content/uploads/RS29_MEMOIRE-1.pdf)
13. PANTAZIS P., et al. Second harmonic generating (SHG) nanoprobes for in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010,**107** (33): 14535-14540  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668245>
14. RIVARD M. Imagerie tissulaire par microscopie de seconde harmonique interférométrique, Université du Québec, 2016: 311 pages.  
<https://espace.inrs.ca/id/eprint/4640>
15. DUBREUIL L. Exploration des signaux harmoniques en microscopie multiphotonique pour le phénotypage du muscle et du système nerveux. *Revue Française d'Histotechnologie*, 2018,**30** 73-84 <https://www.afhisto.fr/revue/2018-4>
16. STRUPLER M., et al. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Opt Express*, 2007,**15** (7): 4054-4065
17. COENTRO J.Q., et al. Collagen Quantification in Tissue Specimens. *Methods Mol Biol*, 2017,**1627** 341-350
18. BORGES L.F., et al. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron*, 2007,**38** (6): 580-583
19. ALSAMAD F., et al. In depth investigation of collagen non-enzymatic glycation by Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2021,**251** 119382
20. PASCHOU A.M., et al. High pressure Raman study of type-I collagen. *Febs j*, 2018,**285** (14): 2641-2653
21. DENG Y., et al. Association Between the Incidence of Pancreatic Fistula After Pancreaticoduodenectomy and the Degree of Pancreatic Fibrosis. *J Gastrointest Surg*, 2018,**22** (3): 438-443
22. HU B.Y., et al. Risk factors for postoperative pancreatic fistula: Analysis of 539 successive cases of pancreaticoduodenectomy. *World J Gastroenterol*, 2016,**22** (34): 7797-7805